



Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e  
Clínica Integrada

ISSN: 1519-0501

alessandrouepb@gmail.com

Universidade Estadual da Paraíba  
Brasil

de Oliveira Marreiro, Raquel; Costa Lima Bandeira, Maria Fulgência; da Costa de  
Almeida, Mailza; Nagai Coelho, Cristiane; Naura Venâncio, Gisely; Chacon de Oliveira  
Conde, Nikeila

Avaliação da citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de Libidibia férrea

Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 14, 2014, pp. 34-42

Universidade Estadual da Paraíba

Paraíba, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63758925004>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

re<sup>al</sup>alyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Artigo Original

## Avaliação da citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de *Libidibia ferrea*

### Cytotoxicity evaluation of a mouthwash containing extract of *Libidibia ferrea*

Raquel de Oliveira Marreiro<sup>1</sup>, Maria Fulgência Costa Lima Bandeira<sup>2</sup>, Mailza da Costa de Almeida<sup>3</sup>  
Cristiane Nagai Coelho<sup>4</sup>, Gisely Naura Venâncio<sup>5</sup>, Nikeila Chacon de Oliveira Conde<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Cirurgiã-dentista. Especialista em Odontopediatria pela Universidade do Estado do Amazonas (UEAM), Manaus/AM, Brasil.

<sup>2</sup>Professora Associada da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus/AM, Brasil.

<sup>3</sup>Professora Adjunta do Curso de Engenharia de Produção da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro/RJ, Brasil

<sup>4</sup>Cirurgiã-dentista. Mestrado em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus/AM, Brasil.

<sup>5</sup>Secretaria de Saúde de Manaus. Mestre em Odontologia pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus/AM, Brasil.

<sup>6</sup>Professora Adjunta da Universidade Federal do Amazonas. (UFAM), Manaus/AM, Brasil.

**Correspondência:** Gisely Naura Venâncio. Secretaria Municipal de Saúde de Manaus, Policlínica Enfermeira Ivone Lima dos Santos. Av. Mário Ypiranga Monteiro, 1695. Adrianópolis. CEP 69.057-001 - Manaus, AM – Brasil. Email: [ginaura@gmail.com](mailto:ginaura@gmail.com)

**Editoria Científica:** Alessandro Leite Cavalcanti e Wilton Wilney Nascimento Padilha

---

#### Resumo

**Objetivo:** Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de um enxaguatório bucal fitoterápico de *Libidibia ferrea*. **Método:** Foram realizados testes de toxicidade em cultura de células frente a fibroblastos murinos NHI3T3 através do ensaio de Alamar Blue e teste de hemólise. No primeiro teste, as células foram semeadas em placas de 96 poços (24 horas/37°C/5% de CO<sub>2</sub>) para avaliação da solução teste. No teste de hemólise, utilizou-se suspensão de eritrócitos e solução teste, tendo como controle positivo o Triton™ X-100 (PBST, Sigma-Aldrich) e como controle negativo foi utilizada solução salina. Posteriormente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (450nm). Os dados foram analisados através da análise de variância e pós teste de Dunett. **Resultados:** A formulação do enxaguatório foi composta por 7,5 gramas do extrato da vagem da planta em etanol:água (50:50 v/v). No teste de hemólise, o enxaguatório obteve resultado satisfatório com 14,44% de hemólise. Já no teste de cultura celular, o produto foi considerado citotóxico com 8% de viabilidade celular. **Conclusão:** O enxaguatório bucal de *Libidibia ferrea* apresentou relativa toxicidade em cultura de fibroblastos murinos e baixa citotoxicidade no teste de hemólise em hemácias de camundongos.

**Descritores:** Citotoxicidade. Antissépticos bucais. Técnicas de Cultura de Células.

---

## Introdução

Nos últimos anos, as pesquisas no âmbito odontológico têm aumentado devido à busca por novos produtos com maior atividade farmacológica, menor toxicidade e custos mais acessíveis à população fornecidos pelos produtos naturais. Estudos têm sido propostos com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de produtos cuja formulação possui extratos de plantas com o objetivo de reduzir a atividade de microrganismos bucais [1,2].

A flora amazônica é considerada a maior reserva de plantas medicinais do mundo, no entanto ainda é pequeno o número de plantas cientificamente estudado do ponto de vista químico e farmacológico. É nessa floresta amazônica que pode ser encontrada a espécie *Libidibia ferrea*, conhecida popularmente como jucaina, jucá, pau-ferro-verdadeiro e birá-obi. Nos sertões do Norte e Nordeste do Brasil, principalmente em Pernambuco e no Ceará, esta espécie também pode ser encontrada, sendo utilizada em forma de chá, xarope e tintura [3,4], por apresentar atividade analgésica, anti-inflamatória, antiulcerogênica e antibacteriana [5,6].

Na Odontologia, diferentes tipos de materiais utilizados para procedimentos operatórios podem entrar em contato com a mucosa bucal, gengiva marginal e/ou do complexo dentinopulpar. Portanto, é de grande importância a realização de testes de biocompatibilidade, efeitos carcinogênicos e mutagênicos de materiais odontológicos. Diversos estudos têm chamado a atenção para a relevância de se verificar o grau de citotoxicidade dos materiais odontológicos, considerando este um passo importante antes de sua aplicação clínica na cavidade bucal [7,8].

A toxicidade é um dos parâmetros cruciais para a avaliação de resposta biológica e do potencial lesivo de causar a morte de células ou tecidos, sendo o primeiro teste de escolha utilizado para quase todas as novas substâncias. Sua importância está na observação do mecanismo biológico pelo qual o efeito citotóxico é produzido [9,10].

A utilização de cultura de células em pesquisas para estudo de biocompatibilidade de materiais tem avançado bastante nos últimos anos. Experimentos celulares laboratoriais possibilitam reproduzir condições e até reações semelhantes às ocorridas no organismo podendo, dessa forma, observar e quantificar alterações sofridas pelas células frente a um determinado produto ou medicamento, bem como o comportamento de cada componente celular isoladamente, restringindo o número de variáveis [11,12].

Desta forma, este estudo objetivou avaliar a toxicidade do enxaguatório bucal à base de *Libidibia ferrea* através do teste de hemólise e em cultura de células.

## Metodologia

Para a formulação do enxaguatório bucal, a espécie botânica *Libidibia ferrea* (228.022A), foi coletada no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e processada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM). A solução extrativa do jucá foi preparada com 7,5 gramas da vagem de jucá em 500 mL de água destilada e 500 mL de

álcool a 96°C em decocção por um período de 15 minutos em manta térmica e sob refluxo. Após esse período, o material foi retirado, esfriado e filtrado e em seguida levado ao Spray Dry.

A formulação do enxaguatório apresentou os seguintes componentes [13]: benzoato de sódio (0,06g), sacarina (0,03g), glicerina (0,8 mL), extrato da planta (0,2g), tween 80% (0,08 mL), tween 20% (0,08 mL), óleo de hortelã (0,08 mL) e água destilada (20 mL).

Para o teste de hemólise a solução de eritrócitos (S.E) 2% foi preparada coletando-se sangue venoso em citrato e centrifugando em 2.500 rpm por 10 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 2 mL do infranadante (hemácias) em 98 mL de solução tampão fosfato pH 7,2.

Para a diluição das substâncias testes pesou-se uma amostra de 5 mg de extrato seco de jucá e dilui-se em 1 mL de solução salina. Após esse procedimento, 600µL dessa solução foram adicionados em 1mL de solução salina e foram realizadas 8 diluições seriadas. Em todos os 8 tubos foram adicionados 1000µL de NaCl e, em seguida, 500µL da solução teste diluída (600µL jucá + 1000µL NaCl) ao primeiro tubo. A partir deste primeiro tubo iniciou-se a diluição seriada para o segundo tubo, e assim sucessivamente até o oitavo tubo, retirando-se 500µL deste para o próximo tubo.

A diluição para o enxaguatório foi realizada transferindo-se para um tubo o volume de 50µL do produto adicionado a 450µL de solução salina. Dessa solução (50µL de enxaguatório + 450µL de solução salina) foi transferido 30µL para a placa teste e adicionados de 270µL de solução de hemácia (triplicata) e 270µL de salina (controle negativo). A mesma sequência de diluição do enxaguatório foi realizada para o veículo.

Para o preparo da placa, as amostras testes, salina e Triton™ X-100 (PBST, Sigma-Aldrich) foram colocadas nos poços das colunas indicadas. Adicionou-se 270µL de solução salina + extrato de jucá na coluna 1 e 270µL de S.E. 2% em todos os poços nas colunas 2, 3 e 4 + extrato de jucá. Os poços E<sub>10</sub>, E<sub>11</sub> e E<sub>12</sub> foram constituídos de 270µL de hemácias + 30µL de veículo. No poço E<sub>9</sub> foi adicionado 270µL de salina a 30µL do veículo. Nos poços F<sub>10</sub>, F<sub>11</sub> e F<sub>12</sub> foram constituídos de 270µL de S.E + 30µL de enxaguatório. O poço F<sub>9</sub> foi utilizado como controle (270µL de salina + 30µL de enxaguatório). O controle positivo esteve representado nos poços G<sub>10</sub>, G<sub>11</sub> e G<sub>12</sub> (270µL de S.E. + 30µL de Triton™ X-100). O controle negativo esteve presente nos poços H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub> e H<sub>12</sub> (270µL de S.E. + 30µL de salina). A placa foi incubada por uma hora sob agitação constante e em temperatura ambiente (25°C) e, após centrifugada em 3000 rpm por 10 minutos, transferiu-se o sobrenadante para outra placa e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 450nm (Figura 1).

A citotoxicidade dos produtos foi testada contra (fibroblastos murinos) NHI3T3, através do ensaio de Alamar Blue™ [14]. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina, e incubados a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após as células cultivadas terem atingido uma confluência entre 70 a 100% ocorreu o processo de tripsinização e a contagem das mesmas em câmara de Neubauer.

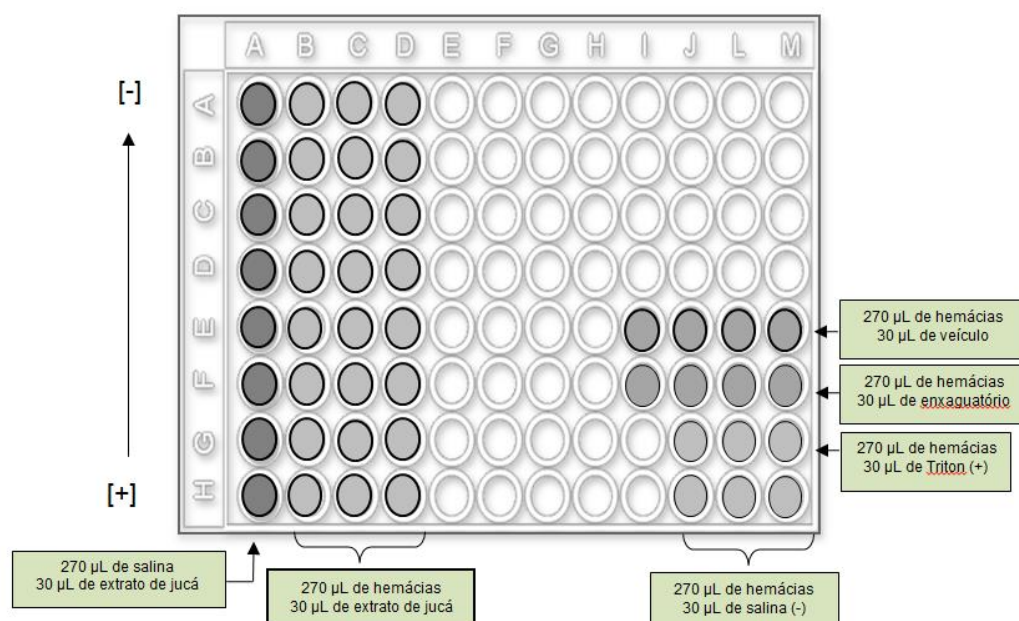


Figura 1 – Esquema da placa de Elisa para o teste de hemólise

Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 96 poços ( $2,5 \times 10^4$  células/100µL/poço) durante 24 horas, período necessário para que ocorra a adesão das células na placa, incubadas a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, 100µL dos produtos foram adicionados a cada poço, na concentração de 5µL/mL, e as células incubadas durante 72 horas, nas mesmas condições ambientes. Os poços controles positivos receberam somente meio de cultura. O experimento foi realizado em triplicata. Três horas antes do final da incubação, 10µL de Alamar Blue™ 0,02% foi adicionado a cada poço. O sinal de fluorescência foi monitorado através de um leitor multiplaca usando comprimento de onda de excitação 530-560 nm e 590 nm de comprimento de onda de emissão. O sinal fluorescente gerado a partir do ensaio foi proporcional ao número de células vivas na amostra, de acordo com o ensaio.

Para o teste de cultura de células foi realizada a análise de variância 1 way com pós teste de comparação múltipla de Dunnett, valores de (\*)  $p < 0,05$ . N=3. Já para o teste de hemólise foram realizadas médias e desvio-padrão.

## Resultados

Os resultados mostraram-se satisfatórios para os produtos testes apresentado uma baixa porcentagem de hemólise. Para o extrato de jucá, na maior concentração testada (300µg/mL), a porcentagem de hemólise apresentou uma média de 5,99% +/- 3,21. Já para o veículo (30µL/mL) e a formulação comercial de enxaguatório de jucá (10µL/mL) essa média foi de, respectivamente, 5,99% +/- 3,21 e 14,44% +/- 9,72 (Figura 2).

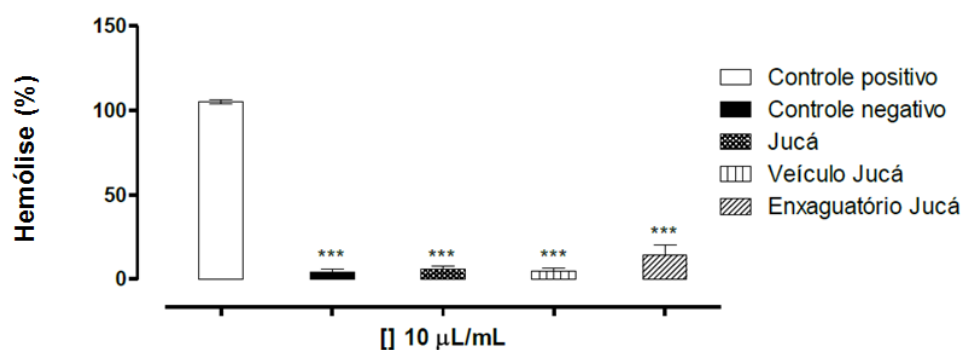


Figura 2 - Teste de hemólise: Triton™ X-100 (Controle positivo), enxaguatório de jucá, extrato de jucá e veículo do enxaguatório.

No teste de cultura celular verificou-se que ambos (o enxaguatório e o veículo da formulação) apresentaram-se citotóxicos frente a fibroblastos murinos, tendo o enxaguatório apresentado viabilidade celular de 8% e o veículo de 7% (Figura 3).

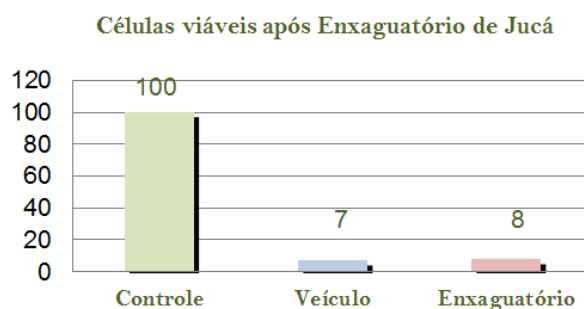


Figura 3 - Efeito do enxaguatório bucal de Libidibia ferrea e do veículo da formulação após 72 h de tratamento em cultura de NIH3T3 pelo método de Alamar Blue™.

## Discussão

Os testes de biocompatibilidade são essenciais na aceitação de qualquer material, juntamente com outros testes que avaliem suas propriedades. Em função do grande número de produtos lançados no mercado e, por conseguinte, a serem avaliados, torna-se necessário aprimorar as metodologias e selecionar aquelas mais fidedignas quanto à presença de possíveis elementos tóxicos [15].

Não existem materiais totalmente seguros, desta forma, a decisão sobre o uso destes materiais deve ser equilibrada através do conhecimento de seus potenciais riscos e benefícios de maneira que seus benefícios se sobreponham aos riscos [16].

As plantas contêm princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas, mas também, por reações adversas que podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contado direto com a mesma [17]. O teste de hemólise *in vitro* vem sendo empregado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais [18].



No presente estudo, o enxaguatório de jucá apresentou uma porcentagem de hemólise inferior a 50%, tornando o produto satisfatório quanto a esse teste. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo onde foi verificado o efeito tóxico da aroeira do sertão através do ensaio de toxicidade *in vitro* da atividade hemolítica do seu extrato bruto metanólico de folhas, concluindo que esta não apresentou ação hemolítica. A ausência da atividade hemolítica em eritrócitos sugere que a citotoxicidade do extrato em estudo não está relacionada ao dano da membrana, podendo essa atividade estar relacionada a outro mecanismo de ação como, por exemplo, a apoptose [17].

Os modelos de estudos *in vitro* são alternativas imprescindíveis na pesquisa relacionada à biocompatibilidade de materiais odontológicos, reduzindo as experimentações em animais [19]. Todavia, apesar do desenvolvimento de grande variedade de métodos alternativos experimentais, estes ainda não substituem a experimentação animal em sua totalidade. Mesmo diante destes fatos, tendências futuras à curto prazo são a completa substituição dos testes envolvendo animais pelos testes *in vitro* [20].

A avaliação da citotoxicidade é importante porque permite compreender o mecanismo biológico que produz o efeito citotóxico e o mecanismo de ação de diferentes substâncias durante a sua interação com os tecidos. No entanto, reconhece-se que o teste tem suas limitações. A utilização de culturas de células em monocamadas não é fisiológica e não reproduz a real arquitetura do tecido vivo em que as células subjacentes poderiam reparar as agressões sofridas. Desta forma, a presença de um efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material é tóxico quando aplicado *in vivo*. Por outro lado, a ausência de um efeito citotóxico garante uma boa resposta clínica [21].

Neste estudo, o teste *in vitro* de citotoxicidade frente a fibroblastos murinos apresentou elevada citotoxicidade tanto para a formulação de enxaguatório de jucá quanto para os constituintes da formulação (veículo) sendo uma possível explicação para esse resultado de citotoxicidade frente ao teste de cultura celular para fibroblastos, a presença de algum dos componentes utilizados na formulação e não a planta *Libidibia ferrea*, já que um dos constituintes da formulação é o Tween 80 que é um surfactante não-iônico, tóxico para as membranas biológicas, constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol.

O Tween, utilizado como veículo, apresentou toxicidade frente à cultura de células, podendo isto estar relacionado a sua capacidade de alterar a morfologia e a superfície da parede celular devido a sua ação detergente, contribuindo para o resultado tóxico [22]. Tal situação pode corroborar com os resultados da presente pesquisa e este item será avaliado em estudos posteriores para que, se necessário, seja alterado ou até mesmo substituído nesta formulação de enxaguatório.

## Conclusão

O enxaguatório à base de *Libidibia ferrea* apresentou-se citotóxico frente ao teste de cultura celular com fibroblastos. No entanto, o resultado para o teste de hemólise apresentou-se pouco tóxico com baixa taxa de hemólise.

---

## Abstract

**Purpose:** To evaluate the in vitro cytotoxicity of an herbal mouthwash of *Libidibia ferrea*. **Methods:** Toxicity tests were conducted cell culture against murine fibroblasts NHI3T3 by testing Alamar Blue™ and hemolysis test. In the first test, cells were seeded in 96-well plates (24 hours/37°C/5% CO<sub>2</sub>) to evaluate the test solution. In the hemolysis test erythrocyte suspension and test solution were used. As a positive control was used Triton™ X-100 (PBST, Sigma-Aldrich) and as a negative control was used saline. Subsequently, the reading was done by a spectrophotometer (450nm). Data were analyzed by analysis of variance and post test Dunett. **Results:** In the hemolysis test, the mouthwash obtained satisfactory results with 14.44% of hemolysis. In the cell culture test, the product was considered cytotoxic with 8% of cell viability. **Conclusion:** The mouthwash of *Libidibia ferrea* presented cytotoxic test against cell culture cytotoxicity and hemolysis test.

**Descriptors:** Cytotoxicity. Cell Culture Techniques. Mouthwashes.

---

## Referências

1. Castilho AR, Murata RM, Pardic V. Produtos Naturais em Odontologia Natural. Rev Saúde 2007; 1(1):11-9.
2. Modesto A, Lima KC, Uzeda M. Atividade antimicrobiana de três dentifrícios utilizados na higiene oral de bebês. Rev Assoc Paul Cir Dent 2001; 55(1):43-8.
3. Teske MH. Compêndio de Fitoterapia. 3. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. 231p.
4. Borrás MRL. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágica? – Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa. Manaus: Valer/Governo do Estado do Amazonas, 2003. 322p.
5. Carvalho JC, Teixeira JR, Souza PJ, Bastos JK, Dos Santos Filho D, Sarti SJ. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. J Ethnopharmacol 1996; 53(3):175-8.
6. Diniz MFFM, Oliveira RAG, Medeiros, ACD, Malta Júnior A. Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica, conhecimentos populares e científicos. João Pessoa: Universitária, 1997. 202p.
7. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. Dent Mater 2002; 18(4):318-23.
8. Costa CA, Oliveira MF, Giro EM, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. Int Endod J 2003; 36(12):831-9.
9. Senne MI, Lemos N, Fidel SR, Fidel RAS. Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares. RSBO 2009; 6(1):71-6.
10. Siqueira Gonçalves T, Minghelli Schmitt V, Thomas M, Lopes de Souza MA, Macedo de Menezes L. Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. Angle Orthod 2008; 78(5):926-30.
11. Schmalz, G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. Clin Oral Inveting 1997; 1(4):154-62.
12. Queiroz CES. Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos quanto à liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos. [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 1997.
13. Zanin SMW, Miguel MD, Barreira SMW, Nakashima T, Cury CD, Costa CK. Enxaguatório bucal: principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. Visão Acadêmica 2007; 8(1): 19-24.
14. Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JEA. New rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. J Immunol Methods 1994; 170(2):211-24.



15. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. *In vitro* models of biocompatibility: a review. Dent Mater 1996; 12(3):186-193.
16. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practioners. J Prosthet Dent 2001; 86(2):203-9.
17. Carvalho MS, Oliveira DA, Valério HM. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* fr. Alemão. BioFar 2012; 8(2):97-103.
18. Pequeno NF, Soto-Blanco B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. Acta Sci Vet 2006; 34(1):45-8.
19. Vitral JCA, Silva AA, Souza MA, Ferreira AP, Vitral RWF. Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e produção de óxido nítrico: descrição de uma técnica. Pesq Bras Odontoped Clin Integr 2008; 8(3):359-65.
20. Chorilli M, Tamascia P, Rossim C, Salgado HRN. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Rev Ciênc Farm Básica Apl 2009; 30(1):19-30.
21. Martins VJM, Lins RX, Berlinck TCA, Fidel, RAS. Cytotoxicity of root canal sealers on endothelial cell cultures. Braz Dent J 2013; 24(1):15-20.
22. Domingues FC, Queiroz JA, Cabral JM, Fonseca LP. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzyme Microb Technol 2000; 26(5-6):394-401.