

ESTUDO PRELIMINAR DA CITOTOXICIDADE DE UM ENXAGUATÓRIO VEGANO: UMA ANÁLISE *IN VITRO*

MARINDIA DE A. BORBA¹; JUAN PABLO AITKEN², WELLINGTON LUIZ DE OLIVEIRA DA ROSA², ADRIANA FERNANDES DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – marindiaab@gmail.com

²Universidade de Chile – jaitken@odontologia.uchile.cl

²Universidade Federal de Pelotas – wellington_xy@outlook.com

³Universidade Federal de Pelotas – adrisilvapiva@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os enxaguatórios bucais são utilizados em odontologia em várias áreas, como periodontia, cirurgia e prevenção odontológica (COELHO et al., 2019). Com seu uso cada vez mais difundido, e apesar de sua eficácia comprovada, o uso a longo prazo pode causar efeitos colaterais adversos (SATPATHY et al., 2013; ZAMORA-PEREZ et al., 2013, SANTI et al., 2019). Para os autores, esses efeitos estão relacionados a componentes presentes nas formulações, como álcool e clorexidina. Nesse sentido, pesquisas estão sendo conduzidas na direção de encontrar produtos que apresentem reduções de efeitos e de custos, resultando em uma posição promissora quanto a inclusão de fitoterápicos relacionados aos cuidados de saúde (MATHUR et al., 2018).

Como alternativa, os enxaguatórios bucais veganos ou naturais, estão ganhando espaço. E é crescente o número desses materiais e marcas no mercado, a escolha dos mesmos pode estar relacionada a eficácia e custo. Recentes estudo investigaram a eficácia de enxaguatórios que continham extratos de chá verde e, mostraram não haver diferença aos enxaguatórios à base de clorexidina na redução de placa e inflamação gengival (MARTHUR et al., 2018). Haas et al. (2016), concluíram a eficácia do uso de enxaguatórios contendo óleos essenciais derivados de plantas, em inflamações gengivais, comparados a outro com base de cetilpiridínio. Recentemente, Santi et al. (2019), concluiu que produtos como *Camelia sinensis*, *Curcuma*, *Anacardium occidentale* Linn, *Schinostere benthifolius*, apresentaram melhores resultados em redução de placa e gengivite em relação à clorexidina.

Mesmo com a eficácia comprovada do uso de extratos de plantas contra doenças orais, e pela existência variada de enxaguatórios disponíveis comercialmente que incluem um ou mais ingredientes ativos derivados de plantas. Ainda assim, a maioria desses produtos também incluem substâncias adicionais que podem ser artificiais e sintetizados quimicamente em laboratórios (SPRINGHOUSE, 2003; SPARABOMDE, 2019). Dessa forma não sendo totalmente de processamento natural.

Devido que nem sempre são conhecidos todos os potenciais efeitos de muitas substâncias a decisão sobre o uso destas deve ser equilibrada, através do conhecimento de seus riscos e benefícios, de maneira que seus benefícios se sobrepõem aos riscos (COELHO et al., 2019). Esse estudo foi uma análise preliminar para definir as concentrações de enxaguatórios que serão utilizadas nos próximos estudos. Desta forma, objetivou avaliar a citotoxicidade de um enxaguatório bucal vegano comparado com outras marcas comerciais.

2. METODOLOGIA

Enxaguantes bucais avaliados e grupos controles

Os produtos testados foram: enxaguatório vegano Orgânico Natural[®] (Suavetex, Uberlândia – Minas Gerais, Brasil) (grupo experimental vegano = GV), contendo extratos de cúrcuma, cravo e melaleuca, a composição com as concentrações dos extratos não é apresentada na embalagem; Panvel Oral System[®], 0,12% clorexidina (Grupo Lifar, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, Brasil) (grupo controle 1= GC1), Listerine Cool mint[®] (Johnson & Johnson, São José dos Campos – São Paulo, Brasil) (grupo controle 2= GC2) e Controle celular – CC com o uso de DMEM (meio de Eagle, controle de célula).

Ensaio de viabilidade celular

A linhagem celular utilizada foi L929 (fibroblasto de camundongo), provenientes do Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas (NCT-BIO/UFPel). Para análise de viabilidade celular, 2×10^4 células/poço foram semeadas em 96 poços, a suspensão de células foi diluída de acordo com o número de poços necessários ao ensaio, e foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ à temperatura de 37°C, para adesão e proliferação celular. As células permaneceram incubadas até que observou-se uma confluência em torno de 70-80% de fibroblastos no fundo dos poços. O meio suprajacente à essas células foi removido e em cada coluna foram adicionados 200 µL de uma solução contendo as diferentes concentrações dos enxaguatórios diluídos em meio de cultura DMEM. As células foram expostas às seguintes diluições de enxaguatórios bucais, 1%, 10%, 25% e 50% com DMEM, e o controle celular que não foi exposto a nenhuma concentração de enxaguatório. As células foram expostas por um período de 24 horas em incubadora com 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

A viabilidade celular foi verificada através do ensaio MTT 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Após a exposição inicial de 24 horas, o meio com enxaguatório foi aspirado, as células foram lavadas por duas vezes com PBS (Phosphate-buffered saline) e adicionou-se a cada um dos poços 200 µL de meio DMEM e 10 µL da solução MTT, as placas foram incubadas por 3h. Após o período removeu-se toda a solução MTT e adicionou-se aos poços 200 µL de DMSO (Synth, São Paulo, Brasil). As placas foram levadas para o espectrofotômetro (Thermoplate, TP-Reader) que realiza a leitura das absorvâncias utilizando o comprimento de onda de 540 nM. A viabilidade celular foi então expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle sem tratamento, e em seguida foi determinada a realização da análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SIGMA PLOT[®]. Análise estatística descritiva incluindo média e desvio padrão foi calculada. Os valores da quantidade de células viáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA) uma via para determinar se havia diferenças estatísticas entre os grupos, e posteriormente ao teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da viabilidade celular permite demonstrar o efeito citotóxico de diferentes substâncias durante sua interação com os tecidos. A ausência de um efeito citotóxico do enxaguatório bucal vegano pode garantir uma boa resposta clínica. Por outro lado, a presença de um efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material é toxico quando aplicado *in vivo* (MARREIRO et al., 2014)

Resultados da análise de viabilidade celular, apresentaram comportamento dependente da taxa de concentração. As concentrações de 50% e 25% não apresentaram diferença significativa ($p<0,001$) para ambas as marcas. As

concentrações de 10 e 1% foram diferentes significativamente ($p<0,001$) para o GV, e 1% para o GC2. Essas concentrações apresentaram valores de média próximos aos 80% de viabilidade celular (Figura 1). Para o GC1 que contém 0,12% clorexidina, apresentou as menores porcentagem de células viáveis, resultando em um efeito citotóxico. Quanto as concentrações avaliadas, as correspondentes aos 10% e 1% foram as que apresentaram melhores resultados de viabilidade celular após incubação de 24 horas, com ausência de efeitos citotóxicos. Dessa forma, serão consideradas viáveis para os próximos estudos. O ensaio de viabilidade celular resultou em efeito promissor para o enxaguatório vegano, nas concentrações de 10% e 1%, quando comparado as outras marcas avaliadas.

Na literatura ainda não foram relatados ensaios com o uso de enxaguatório da marca Natural. Phiton et al. (2011) em ensaios de citotoxicidade para enxaguantes da marca Listerine, relatou citotoxicidade. Alguns autores relataram a citotoxicidade de enxaguatórios que contêm clorexidina em células de fibroblastos L929 (FLEMINGSON et al., 2008; WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA et al., 2016; BALLONI et al., 2016). Sparabombe et al. (2019) avaliando um enxaguatório com sua composição 100% natural, apresentou resultados satisfatórios em um ensaio randomizado, provando ser eficaz quando comparado ao placebo. Em outro ensaio randamizado, autores forneceram evidências para sugerir o uso de um enxaguatório vendido comercialmente, que contêm extratos de cúrcuma, como adjuvante para doenças orais (ANUSHA et al., 2019). Mesmo com a existência de estudos que visem avaliar a citotoxicidade da clorexidina em fibroblastos, assim como de outros componentes (MARIOTTI et al., 1999), uma comparação de resultados se torna difícil, devido à variabilidade de metodologia aplicada, produto comercial utilizado (com diferentes composições de aditivos e às vezes contendo álcool), concentrações estudadas, tempo de exposição e meio escolhido (COELHO et al., 2019).

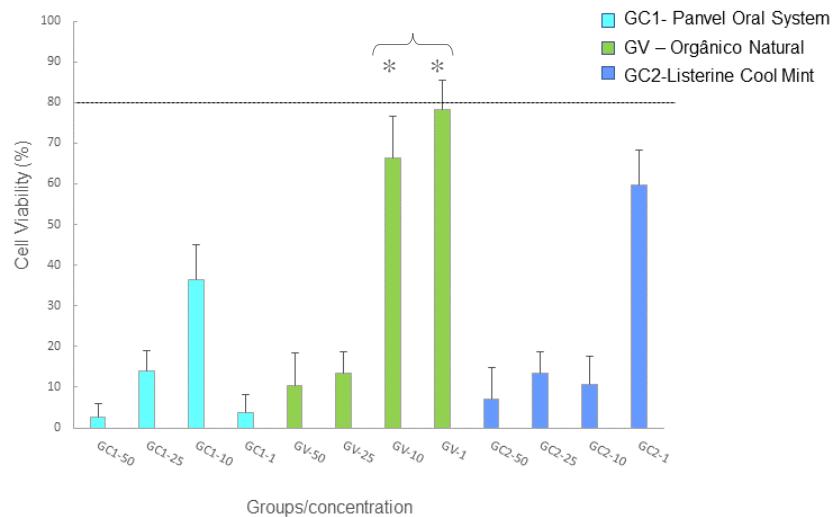


Figura 1- Viabilidade celular e desvio padrão (%) após 24 h – CC (representa 100% no gráfico). Diferenças estatísticas representadas * ($p<0,001$) ANOVA uma via seguido de TUKEY.

Esses resultados preliminares, mostraram que as concentrações a serem testadas devem estar entre 10 e 1% , para garantir resultados satisfatórios. É válido ressaltar que o tempo de exposição é muito importante, o próximo estudo vai ser protocolar as devidas concentrações em ensaios que simulem os tempos de bochecho usualmente utilizados em ensaios científicos.

4. CONCLUSÕES

O enxaguatório bucal vegano nas concentrações de 10 e 1% não apresentou toxicidade, com diferenças significativas ($p<0,001$), estabelecendo a nova faixa de concentração a ser avaliada. Para os enxaguatórios GC1 e GC2, identificou-se uma diminuição na viabilidade celular nas concentrações de 50% e 25%, sendo citotóxico nessas concentrações. Novas pesquisas futuras para estabelecer a eficácia do enxaguatório bucal vegano serão aplicadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUSHA, D.; CHALY, P.E.; JUNAID, M. Efficacy of a mouthwash containing essential oils and curcumin as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy among rheumatoid arthritis patients with chronic periodontitis: A randomized controlled trial. *Indian J of Dental Research*, v.30, pp.506-511, 2019.
- BALLONI, S; LOCCI, P; LUMARE, A; MARINUCCI, L. Cytotoxicity of three commercial mouthrinses on extracellular matrix metabolism and human gingival cell behaviour. *Toxicol In Vitro*, v.34 pp.88–96, 2016. doi.org/10.1016/j.tiv.2016.03.015
- COELHO, AS; LARANJO, M; GONÇALVES, AC; PAULA, A, et al. Cytotoxic effects of a chlorhexidine mouthwash and of an enzymatic mouthwash on human gingival fibroblasts. *Odontology*. 2020 Apr;108(2) pp.260-270, 2019 doi: 10.1007/s10266-019-00465-z.
- EREN, K; OZMERIC, N; SARDAS, S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clin Oral Investig*, v.6(3) pp.150–4, 2002. doi.org/10.1007/s00078-002-0168-1
- FLEMINGSON, Emmadi P; AMBALAVANAN N; RAMAKRISHNAN T; VIJAYALAKSHMI, R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: an in vitro study. *Indian J Dent Res*, v.19(1) pp.29–35, 2008.
- HAAS, A. N.; WAGNER, T. P.; MUNIZ, F. W., et al. Essential oils-containing mouthwashes for gingivitis and plaque:meta-analyses and meta-regression. *J. Dent.* 55, 7–15, 2016. doi: 10.1016/j.jdent.2016.09.001
- MARREIRO, R; BANDEIRA, MF.; ALMEIDA, M, et al. Avaliação da citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de Libidibia férrea. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria Integrada**, vol. 14, pp.34-42, 2014. Universidade Estadual da Paraíba, Brasil.
- MATHUR, A.; GOPALAKRISHNAN, D.; MEHTA, V., et al. Efficacy of green tea-based mouthwashes on dental plaque and gingival inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Indian J. Dent. Res.* v.29, pp. 225-232, 2018. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_493_17
- MORAIS, LS; SERRA, GS; MULLER, CA, et al. In vivo metal ion release from Ti-6Al-4V orthodontic mini-implants. *Revista Matéria*, v.12 pp.290-297, 2011.
- PITHON, M.; SANTOS, RL.; RIBEIRO, DL; et al. In vitro of Listerine® mouthwash. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial*, v. 11, n.04, 2011.
- SANTI, S.; CASARIN, M.; GRELLMANN, A.P., et al. Effect of herbal mouthrinses on dental plaque formation and gingival inflammation: A systematic review. *Oral diseases*, v.00, pp.1-15, 2019. doi: 10.1111/odi.13254.
- SPARABOMBE, S; MONTERUBBIANESI, R; TOSCO, V, et al. Efficacy of an All-Natural Polyherbal Mouthwash in Patients with Periodontitis: A Single-Blind Randomized Controlled Trial. *Front Physiol*. V.10 pp. 632. Published, 2019.
- SATPATHY, A.; RAVINDRA, S.; PORWAL, A., et al. Effect of alcohol consumption status and alcohol concentration on oral pain induced by alcohol-containing mouthwash. *Journal of Oral Science*, v.55, pp.99–105, 2013. doi.org/10.2334/josnusd.55.99.
- WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA M; KOTWICKA M; URBANIAK P., et al. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. *Int J Mol Med*. v.37(6) pp.1594–600, 2016.