

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Desenvolvimento de filme polimérico oral contendo extrato aquoso de
Psidium guajava L. para tratamento da doença periodontal em cães**

Geraldo Augusto Pereira

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DESENVOLVIMENTO DE FILME POLIMÉRICO ORAL CONTENDO
EXTRATO AQUOSO DE *Psidium guajava* L. PARA TRATAMENTO DA
DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES**

GERALDO AUGUSTO PEREIRA

Sob Orientação da Professora

Yara Peluso Cid

e Coorientação do Professor

Douglas Siqueira de Almeida Chaves

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Março de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P436d Pereira, Geraldo Augusto, 1994-
Desenvolvimento de filme polimérico oral contendo extrato aquoso de *Psidium guajava* L. para tratamento da doença periodontal em cães / Geraldo Augusto Pereira. - Barra Mansa, 2021.
72 f.: il.

Orientadora: Yara Peluso Cid.
Coorientador: Douglas Siqueira de Chaves.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, 2021.

1. Periodontite. 2. Tecnologia Farmacêutica. 3. Preparações farmacêuticas odontológicas. 4. *Psidium*. I. Cid, Yara Peluso, 1982-, orient. II. Chaves, Douglas Siqueira de, 1981-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 5423/2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.085450/2021-20

Seropédica-RJ, 29 de novembro de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
GERALDO AUGUSTO PEREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 1º/03/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese/dissertação.

(Assinado digitalmente em 29/11/2021 17:30)

SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR DMIV (12.28.01.00.00.00.54)

Matrícula: 1722406

(Assinado digitalmente em 29/11/2021 17:35)

YARA PELUSO CID

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR DeptºCF (12.28.01.00.00.00.47)

Matrícula: 1700427

(Assinado digitalmente em 29/11/2021 16:52)

MARIA BERNADETE RIEMMA PIERRE

ASSINANTE EXTERNO CPF: 156.234.428-54

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **5423**, ano: **2021**, tipo: **ATA**, data de emissão: **29/11/2021** e o código de verificação: **561ecb5a74**

DEDICATÓRIA

Ao Curso de Farmácia da UFRRJ, e às pessoas com quem convivi ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos foi a melhor parte da minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiou, obrigado por tanto e por sempre. Em especial, a minha mãe Angela, as minhas irmãs Marcella e Fernanda, aos meus avós Darci e Ilma, para quem sempre dedico as minhas conquistas. Eu amo vocês.

As amigas e amigos, obrigado pelo apoio incondicional, pelas noites mal dormidas e pelo conhecimento compartilhado. Agradeço por toda ajuda e dedicação, sem o incentivo de vocês, que para mim são minha segunda família, nada disso seria possível.

Um agradecimento especial ao meu companheiro Henrique, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e fez com que cada passo fosse o mais confortável.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por todo acolhimento, amadurecimento e oportunidades. Ao curso de Farmácia, e todos os integrantes, que foi onde eu me apaixonei e me tornei o profissional da saúde que sou, muito obrigado por tudo. Nada fará com que eu esqueça minhas raízes, meu eterno amor e gratidão a nossa querida universidade.

Ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, pelo apoio em minha pesquisa. Pelos profissionais que ali atuam em conjunto para o funcionamento do laboratório, todo meu respeito e admiração, em especial meus amigos de bancada Thaís, Gabriela, Melina, Leandra e Isabela. Além disso, a Thereza pelo auxílio em experimentos da microbiologia.

A Yara, minha orientadora, e ao meu coorientador, que direcionaram a dissertação e fizeram com que tudo acontecesse da melhor forma possível. Muito obrigado pela motivação que sempre me transmitiram, sempre lembrarei de vocês.

À banca examinadora, Professora Dra. Bernadete e Professora Dra. Shana, obrigado pela participação e contribuição à dissertação, além disso, a orientação e a auxílio na parte experimental microbiológica.

Por fim, a todos os amigos e familiares que dividiram comigo o peso e a responsabilidade, entenderam minha ausência em momentos importantes e, juntos, hoje comemoram essa conquista. Assim, meu muito obrigado a vocês, família, que estiveram comigo e fizeram parte da minha jornada.

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

RESUMO

PEREIRA, Geraldo Augusto. **Desenvolvimento de filme polimérico oral contendo extrato aquoso de *Psidium guajava* L. para tratamento da doença periodontal em cães.** 2021. 59p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A doença periodontal é a doença oral mais comum afetando tanto homens como animais, atingindo predominantemente cães acima de três anos. É o resultado da resposta inflamatória progressiva devido ao acúmulo de placa bacteriana e os sinais e sintomas incluem halitose, dor, aumento de cálculo dental e da bolsa gengival, inflamações e infecções severas, destruição da gengiva, dentes e ossos, podendo ocorrer bacteremia com evolução para septicemia. Extratos vegetais possuem atividade antimicrobiana e têm potencial para uso na prevenção e tratamento de doenças bucais, como a *Psidium guajava* L., conhecida popularmente como goiabeira no Brasil e mundialmente utilizada na medicina tradicional e no ramo da alimentação. O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento e controle de qualidade de filme polimérico oral de liberação modificada mucoadesiva contendo o extrato aquoso da folha da goiabeira, este avaliado sua atividade antimicrobiana e antioxidante, para o tratamento e profilaxia da doença periodontal em cães. Foram utilizados métodos para o desenvolvimento do filme, como a *solvent casting*, e para o controle de qualidade, uniformidade de peso, pH, grau de inchamento, tempo de desintegração, infravermelho e esterilidade dos filmes. Além disso, métodos microbiológicos como difusão em disco e microdiluição em caldo, métodos químicos como cromatografia em camada delgada, análise antioxidante (DPPH), fenólicos totais. A formulação filme apresentou homogeneidade e maleabilidade, tendo pH compatível com o oral ($6,35 \pm 0,07$ a $6,45 \pm 0,18$), grau de inchamento de $27,0 \% \pm 62$ a $369,8 \% \pm 28$ e tempo de desintegração aproximadamente 4 minutos. O ensaio físico de infravermelho demonstrou que não houve interações entre os constituintes e a formulação desenvolvida. Na preparação do extrato aquoso obteve-se rendimento de 1,2 %, foi encontrado na cromatografia em camada delgada a presença de flavonóides, além de capacidade antioxidante (EC_{50}) de $140 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e fenólicos totais de $17,02 \text{ mg} \pm 6,87$ equivalente de ácido gálico por g de extrato seco. Na avaliação da suscetibilidade microbiana, obteve-se halos máximos de inibição para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Streptococcus* beta-hemolítico, com médias entre 16 a 21 mm, sendo a média de inibição a concentração de $3,6 \text{ mg/cm}^2$. No teste de microdiluição em caldo, a concentração inibitória mínima (CIM) para todas as cepas foi de $8,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a concentração bactericida mínima (CBM) para *S. pseudintermedius* foi de $8,8 \text{ mg.mL}^{-1}$; já para as demais cepas foi maior que $11,4 \text{ mg.mL}^{-1}$. Os resultados demonstraram que foi possível desenvolver uma formulação filme polimérico de dissolução oral possuindo capacidade antioxidante e antimicrobiana.

Palavras chave: Periodontite, Tecnologia Farmacêutica, Preparações farmacêuticas odontológicas, Psidium.

ABSTRACT

PEREIRA, Geraldo Augusto. **Development of an oral polymeric film containing aqueous extract of *Psidium guajava* L. for the treatment of periodontal disease in dogs.** 2021. 59p Dissertation (Master in Veterinary Sciences). Veterinary Institute. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Periodontal disease is the most common oral disease affecting both humans and animals, predominantly affecting dogs over three years of age. It is the result of progressive inflammatory response due to the accumulation of bacterial plaque, and signs and symptoms include halitosis, pain, increased dental calculus and gingival pockets, severe inflammation and infection, destruction of the gums, teeth and bones, and bacteremia with evolution to septicemia. Plant extracts have antimicrobial activity and the potential for use in the prevention and treatment of oral diseases, such as *Psidium guajava* L., popularly known as guava in Brazil and used worldwide in traditional medicine and food. The objective of this study was the development and quality control of an oral polymeric film of modified release mucoadhesive containing the aqueous extract of the guava leaf, this evaluated its antimicrobial and antioxidant activity, for the treatment and prophylaxis of periodontal disease in dogs. Methods were used for the development of the film, such as solvent casting, and for quality control, weight uniformity, pH, swelling index, disintegration time, infrared and sterility. In addition, microbiological methods such as disk diffusion and broth microdilution, chemical methods such as thin layer chromatography, antioxidant analysis (DPPH) and total phenolics were used. The oral film formulation presented homogeneity and malleability, with pH compatible with the oral cavity (6.35 ± 0.07 to 6.45 ± 0.18), swelling index from $27.0 \% \pm 62$ to $369.8 \% \pm 28$ and disintegration time approximately 4 minutes. The infrared test showed that there were no interactions between the constituents and the formulation developed. In the preparation of the aqueous extract a yield of 1.2 % was obtained, the presence of flavonoids was found in the thin layer chromatography, besides antioxidant capacity (EC_{50}) of $140 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and total phenolics of $17.02 \text{ mg} \pm 6.87$ gallic acid equivalent per g of dry extract. In the evaluation of microbial susceptibility, maximum halos of inhibition were obtained for *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* and beta-hemolytic *Streptococcus*, with means between 16 and 21 mm, being the inhibition mean at a concentration of 3.6 mg/cm^2 . In the microdilution broth test, the minimum inhibitory concentration (MIC) for all strains was 8.8 mg.mL^{-1} and the minimum bactericidal concentration (MBC) for *S. pseudintermedius* was 8.8 mg.mL^{-1} ; while for the other strains it was higher than 11.4 mg.mL^{-1} . The results showed that it was possible to develop an oral dissolving polymeric film formulation possessing antioxidant and antimicrobial capacity.

Keywords: Periodontitis, Pharmaceutical Technology, Dental Pharmaceutical Preparations, Psidium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do dente. Fonte: (MADEIRA, 2017).....	3
Figura 2. Progressão visual da doença periodontal. Fonte: adaptado de (PERCHYONOK, 2018).....	5
Figura 3. Goiabeira: árvore (A), folhas (B), frutos e folhas (C) e flor (D). Fonte: DAKAPPA et al., 2013	10
Figura 4. Principais classes de fitoquímicos naturais. Fonte: (FERREIRA; ABREU, 2007)	11
Figura 5. Fluxograma de preparação do extrato aquoso das folhas de goiabeira	18
Figura 6. Procedimento de difusão em disco	20
Figura 7. Esquematização do teste de microdiluição em caldo.	21
Figura 8. Aspecto do extrato liofilizado da folha da goiabeira	25
Figura 9. Cromatoplaça de CCD revelada	26
Figura 10. Eluição da fase móvel na cromatoplaça	26
Figura 11. Eluição da fase móvel na cromatoplaça	27
Figura 12. Leitura da cromatoplaça	27
Figura 12. Curva de calibração da amostra	27
Figura 13. Leitura da cromatoplaça	28
Figura 14. Curva de calibração de DPPH.	28
Figura 15. Curva de calibração da amostra	29
Figura 16. Curva de calibração de Ácido Gálico.	30
Figura 17. Teste de difusão em disco <i>Staphylococcus aureus</i> (resistente).	29
Figura 18. Teste de difusão em disco <i>Staphylococcus aureus</i> (sensível).	30
Figura 19. Teste de difusão em disco <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (resistente).	31
Figura 20. Teste de difusão em disco <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (sensível).	32
Figura 21. Teste de difusão em disco <i>Streptococcus</i> beta-hemolítico (sensível).	33
Figura 22. Teste de difusão em disco <i>Escherichia coli</i> (sensível).	34
Figura 23. Teste de difusão em disco <i>Escherichia coli</i> (resistente).	34
Figura 24. Demonstração do ensaio de microdiluição em caldo (microplaca de 96 poços)	36
Figura 25. Resultado de turbidez (média) e valor de <i>p</i> , da microdiluição em caldo utilizando extrato das folhas da goiabeira, 8,8 e 11,4 mg.mL ⁻¹ , frente às cepas bacterianas	38
Figura 26. Resultado da CBM no teste de semeadura. (A) <i>S. aureus</i> (resistente); (B) <i>S. aureus</i> (sensível); (C) <i>S. pseudintermedius</i> (resistente); (D) <i>S. pseudintermedius</i> (sensível); (E) <i>Streptococcus</i> beta-hemolítico.....	39
Figura 27. Formação do hidrogél por agitação mecânica	42
Figura 28. Processo de secagem.	42
Figura 29. Processo de secagem.	43
Figura 30. Formulação filme candidata F7.	43
Figura 31. Formulação do filme eleito contendo o extrato.	46
Figura 32. Formulação do filme eleito contendo o extrato.	47
Figura 33. Formulação do filme eleito contendo o extrato.	47
Figura 34. Método de pesagem na uniformidade de peso.	48
Figura 35. Método de pesagem na uniformidade de peso.	48
Figura 25. Resultado do espectro infravermelho das amostras estudadas.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação botânica taxonômica da goiabeira	8
Tabela 2. Composição química e propriedades farmacológicas, de acordo com a composição, de extratos obtidos de folhas de <i>Psidium guajava</i> L.	12
Tabela 3. Descrição das cepas dos microrganismos utilizados.	17
Tabela 4. Formulações candidatas do filme oral polimérico aquoso.	22
Tabela 5. Resultados halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média ± dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa <i>Staphylococcus aureus</i> (resistente) (n=3).	31
Tabela 6. Resultados dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média ± dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa <i>Staphylococcus aureus</i> (sensível) (n=3).	32
Tabela 7. Resultados dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média ± dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (resistente) (n=3).	33
Tabela 8. Resultados dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média ± dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (sensível) (n=3)	34
Tabela 9. Resultados dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média ± dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa <i>Streptococcus beta-hemolítico</i> (resistente) (n=3).	35
Tabela 10. Resultado de turbidez da microdiluição em caldo utilizando extrato das folhas da goiabeira a 8,8 mg.mL ⁻¹ frente às cepas bacterianas (n=3).	38
Tabela 11. Resultado de turbidez da microdiluição em caldo utilizando extrato das folhas da goiabeira a 11,4 mg.mL ⁻¹ frente às cepas bacterianas (n=3).	39
Tabela 12. Análise estatística dos resultados de turbidez (Média ± dp) da microdiluição em caldo utilizando extrato da goiabeira em concentrações de 8,8 mg.mL ⁻¹ e 11,4 mg.mL ⁻¹ (n=3).	39
Tabela 13. Resultado da análise dos aspectos físicos das formulações candidatas.	44
Tabela 14. Resultados de pH, grau de inchamento (GI) e tempo de desintegração (TD) das formulações candidatas.....	45
Tabela 15. Resultado e análise estatística da uniformidade de peso (mg) (Média ± dp) das formulações filmes eleitos no tipo extrato (E) e sem extrato (P) (n=10).	49
Tabela 16. Resultados de pH e grau de inchamento (GI) (Média ± dp) (n=3), e tempo de desintegração (TD) (n=1) das formulações filmes eleitos no tipo extrato (E) e sem extrato (P).	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBM - Concentração bactericida mínima
CCD - Cromatografia em camada delgada
CIM - Concentração inibitória mínima
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
cm - centímetro
CMC - Carboximetilcelulose sódica
DP - Doença periodontal
dp – Desvio padrão
DPR - Desvio padrão relativo
E – Forma farmacêutica com extrato da goiabeira
EAG – Equivalente a ácido gálico
EC₅₀ - Atividade de eliminação cinquenta por cento
FC - Folin-Ciocalteu
FF - Formas farmacêuticas
FTIR - Infravermelho com transformada Fourier
GI - Grau de inchamento
MDC - microdiluição em caldo
mg – miligrama
mL – mililitro
NP-PEG - (difetilboriloxietilamina 1 % em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5 % em etanol)
P – Forma farmacêutica sem extrato
***P. guajava* L.** - *Psidium guajava* L.
PA - Princípio ativo
pH – Potencial de hidrogênio
TD – Tempo de desintegração
UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UV - Ultravioleta
DPPH – 1,1-difenil-2-picrylhidrazil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Doença Periodontal	3
2.1.1 Tratamento e profilaxia da doença periodontal	6
2.2 Plantas Medicinais	7
2.2.1 <i>Psidium guajava</i> L.	8
2.2.2 Fitoconstituíntes e propriedades farmacológicas	10
2.2.3 Aplicações terapêuticas da <i>Psidium guajava</i> L. no tratamento da doença periodontal	12
2.3 Formulações Farmacêuticas Para Tratamento Da Doença Periodontal	13
2.3.1 Filmes orais	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Materiais	16
3.1.1 Reagentes	16
3.1.2 Matérias-primas	16
3.1.4 Equipamentos e acessórios	16
3.1.5 Microrganismos	17
3.2 Obtenção da Espécie Vegetal	17
3.3 Obtenção do Extrato	18
3.4 Caracterização Qualitativa do Extrato	18
3.4.1 Cromatografia em camada delgada	19
3.5 Caracterização Quantitativa do Extrato	19
3.5.1 Atividade antioxidante	19
3.5.3 Fenólicos totais	19
3.6 Avaliação Antimicrobiana do Extrato	19
3.6.2 Teste de difusão em disco	20

3.6.3	Teste de microdiluição em caldo	20
3.6.4	Análise estatística	21
3.7	Desenvolvimento dos Filmes Orais	21
3.7.1	Preparo das formulações candidatas	21
3.7.1	Preparo da formulação eleita	22
3.8	Análise Subjetiva Aparente	23
3.9	Propriedades Físico-Química dos Filmes	23
3.9.1	Uniformidade de peso	23
3.9.2	Potencial de hidrogênio	23
3.9.3	Grau de inchamento	23
3.9.4	Tempo de desintegração	23
3.9.5	Espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier	24
3.10	Teste de Esterilidade	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	Depósito da Espécie Vegetal e Rendimento do Extrato	25
4.2	Análise Qualitativa do Extrato	25
4.2.1	Cromatografia em camada delgada	25
4.3	Análise Quantitativa do Extrato	28
4.3.1	Atividade antioxidante	28
4.3.2	Fenólicos totais	29
4.4	Avaliação Antimicrobiana do Extrato	30
4.4.1	Teste de difusão em disco	30
4.4.2	Teste de microdiluição em caldo	37
4.5	Desenvolvimento das Formulações Candidatas	41
4.5.1	Análise subjetiva aparente	41
4.5.2	Avaliação físico-química	44
4.6.2.1	Análise de pH, grau de inchamento e tempo de desintegração	44

4.6 Desenvolvimento da Formulação Eleita	46
4.6.1 Análise subjetiva aparente	46
4.6.2 Avaliação físico-química	47
4.6.2.1 Análise de uniformidade de peso	47
4.6.2.2 Análise de pH, grau de inchamento e tempo de desintegração	49
4.6.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier	50
4.6.2.3 Teste de esterilidade	52
5. CONCLUSÃO	53
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) resulta de uma resposta inflamatória progressiva devido ao acúmulo de placa bacteriana nos dentes e nos tecidos gengivais, sendo descrita como gengivite e periodontite. É a doença oral mais comum mundialmente, afetando tanto os humanos como os animais. Além da perda do dente, a doença pode levar também a problemas sistêmicos.

A placa bacteriana é constituída por glicoproteínas e polissacarídeos extracelulares da própria saliva e de microrganismos provenientes da cavidade oral. Em casos de uma gengiva não saudável, esses microrganismos são representados por bactérias anaeróbias patogênicas. Apesar da formação da placa bacteriana ser o fator inicial da DP, a resposta inflamatória vai ser a responsável pelos danos significativos ao periodonto.

A DP é uma doença bastante comum em cães acima de três anos. Quando acometidos por esta, esses animais podem apresentar halitose, dor, acúmulo de cálculo dental, aumento da bolsa gengival, inflamações e infecções severas, destruição da gengiva, dentes e ossos, podendo ocorrer bacteremia com evolução para septicemia.

O tratamento da DP consiste no controle da microbiota bacteriana e na restauração da anatomia e fisiologia da cavidade oral. Ações profiláticas como limpeza mecânica da placa bacteriana, polimento dental, limpeza com solução antimicrobiana e solução salina são importantes para evitarem a progressão da doença. A antibioticoterapia, no entanto, não é indicada como primeiro e único tratamento, devendo ser empregada de forma auxiliar e facultativa à profilaxia periodontal.

Atualmente, no mercado, estão disponíveis alguns medicamentos para tratamento e prevenção de periodontites em cães, encontradas na forma de creme e gel dental, espuma, lenço e spray bucais, soluções orais, pastas, palitos, pó e comprimidos palatáveis. O tratamento com essas formulações convencionais é geralmente prejudicado devido a ação da saliva e atividades mecânicas que removem rapidamente o medicamento da cavidade oral, prejudicando, assim, a sua eficácia.

O aumento do número de animais de companhia nos lares consequentemente acarretou no aumento do uso desses produtos. Levando em consideração que um dos principais princípios ativos presentes nessas formulações são os antibióticos, isso também se tornou um fator preocupante com relação a eficácia na aplicação, afinal sabe-se que as bactérias estão em constante adaptação e mutação, demonstrando aprimoramento da resistência a esses antibióticos. Portanto, há uma preocupação constante com o uso de antibióticos tanto nos animais de produção como nos animais de companhia, nos quais se evidenciam fatores de risco como o uso indiscriminado devido a demanda de pacientes, pressão dos tutores e diagnóstico indefinido. Diante disso, pesquisas científicas na área odontológica, utilizando plantas medicinais com efeito antimicrobiano vêm crescendo nos últimos anos.

O uso de medicamentos fitoterápicos, logo, tem se tornado uma alternativa aos produtos sintéticos à fim de diminuir a resistência bacteriana e melhorar o custo e a acessibilidade ao tratamento. Levando em consideração a biodiversidade brasileira, a busca de plantas medicinais para fins terapêuticos tem mostrado resultado em pesquisas com a finalidade de desenvolver medicamentos fitoterápicos, buscando, assim, uma melhora na qualidade de vida da população mundial.

A *Psidium guajava* L., conhecida popularmente como goiabeira, é uma espécie vegetal bem conhecida no Brasil e mundialmente utilizada na medicina tradicional e no ramo da alimentação, sendo fonte natural de vitaminas e minerais. A goiabeira (*P. guajava* L.) é amplamente distribuída pelo mundo predominantemente em áreas tropicais e subtropicais.

Atualmente, é utilizada no ramo alimentício devido ao seu alto valor nutricional e na medicina tradicional e moderna devido às atividades farmacológicas existentes em seus componentes químicos. Seu uso no Brasil está associado ao tratamento de diarreia, disenteria, dor estomacal, anorexia, cólera, hiperlipidemia, problemas digestivos, laringite, úlceras, dentre outros.

As partes da goiabeira que são utilizadas variam entre as suas folhas, flores, frutos, casca e raízes. A partir dessas partes, podem ser extraídos os constituintes de interesse através do emprego de solventes (água, etanol, metanol). Esses solventes irão determinar a composição, concentração e propriedade de cada extrato.

Dentro da DP, a goiabeira atua no controle do biofilme, diminuição do estresse oxidativo e aceleração da cicatrização. A ação antimicrobiana se dá pelos flavonóides guaijaverina e quercetina. A ação anti-inflamatória é devida à inibição de citocinas pró-inflamatórias.

Para que se obtenha um resultado positivo com a terapia periodontal, a escolha correta da forma farmacêutica será um fator condicionante, muito embora questões como a seleção de um agente antimicrobiano e a escolha da via de administração também tenham impactos na resposta ao tratamento. Nas últimas décadas, constata-se que novos métodos de liberação de fármacos vêm sendo pesquisados e desenvolvidos, buscando sobretudo atender às diversas necessidades de inovação do mercado.

Para que o objetivo terapêutico no tratamento da DP seja alcançado, é fundamental um sistema de liberação oral de fácil administração, de liberação controlada, biodegradável e biocompatível, além de não responder negativamente com irritação aos tecidos adjacentes.

Diante disso, este presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e controle de qualidade de uma formulação oral de liberação modificada mucoadesiva contendo o extrato aquoso da folha da goiabeira para o tratamento da DP em cães. Além de uma caracterização antimicrobiana, antioxidante e identificação de componentes majoritários do extrato.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença Periodontal

O periodonto (Figura 1) é o conjunto de estruturas adjacentes ao dente, tais como gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar, que atua com a função de proteção e sustentação de um dente na cavidade oral. A gengiva reveste o osso alveolar, fixa-se ao dente pelo epitélio juncional, que quando saudável encontra-se aderido ao esmalte, e é constituída de tecido de epitelial e conjuntivo formando uma faixa de mucosa. O ligamento periodontal possui função de conectar o dente ao osso alveolar, constituído por fibras de tecido conjuntivo fibroso. Já o cemento, é definido pelo revestimento de tecido conjuntivo ao longo da raiz, isento de vascularização e possuindo capacidade de reparação e reabsorção. Por fim, o osso alveolar envolve os dentes através de uma projeção cônica dos ossos da mandíbula e maxila, possuindo vasos e nervos. Além disso, os tecidos de revestimento exercem importante atividade imune e anti-inflamatória, contribuindo para o equilíbrio da microbiota local (BAIA et al., 2017; CUNHA; SANTOS; SANTOS, 2017; MADEIRA, 2017).

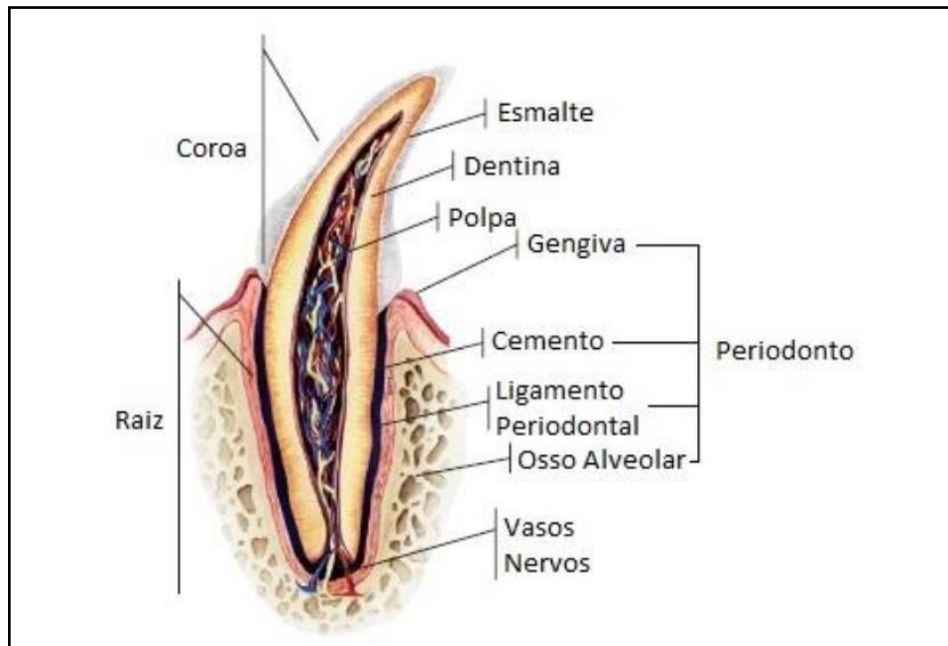


Figura 1. Anatomia do dente. Fonte: (MADEIRA, 2017).

Representada por um conjunto de manifestações e possuindo caráter inflamatório, a doença periodontal (DP) é causada inicialmente pela formação de placa bacteriana nos tecidos de suporte do dente, podendo ocorrer gengivite e a periodontite. No decorrer da DP, ocorrem dois processos: o primeiro é descrito como gengivite, sendo um processo inflamatório que afeta a gengiva e o tecido de revestimento, que na maioria dos casos é um processo reversível; e o segundo processo descrito como a periodontite, onde há comprometimento dos tecidos de sustentação, o osso alveolar, ligamento periodontal e o cemento, sendo esta obrigatoriamente antecedida pela gengivite (ALBUQUERQUE et al., 2012; BAIA et al., 2017; BAUER et al., 2018).

Sendo a doença oral mais comum que afeta humanos e animais no mundo, a DP está relacionada como a causa mais frequente da perda de dentes em cães adultos e humanos, além de associada com sérios problemas sistêmicos de saúde (ALBUQUERQUE et al., 2012;

CUNHA; SANTOS; SANTOS, 2017; BAUER et al., 2018). Dentre os animais de companhia, cães acima de três anos de idade possuem prevalência de 80 a 89 % (FERNANDES et al., 2012; ENLUND et al., 2020).

A placa bacteriana, entendida como biofilme bacteriano, é o fator inicial no desenvolvimento da DP. É composta por uma matriz orgânica de glicoproteínas e polissacarídeos extracelulares provenientes da própria saliva, adicionada a um conjunto de microrganismos da cavidade oral dispersa na língua, mucosa oral e superfície dos dentes. O biofilme é formado em decorrência de fatores superficiais, fatores nutricionais ou fatores de proteção, que em conjunto promovem o acúmulo dos constituintes do biofilme na superfície oral, ocorrendo, então, a gengivite e periodontite (BAIA et al., 2017; THURNHEER; BAO; BELIBASAKIS, 2018). O biofilme pode ser classificado como supra ou subgingival, de acordo com a sua localização. O Biofilme supragingival encontra-se na parte superior do dente, podendo se espalhar até o sulco gengival. Por outro lado, o biofilme subgingival encontra-se na parte inferior do dente, entre o sulco da gengiva ou bolsas periodontais. Além disso, o biofilme pode se mineralizar e formar o tártaro ou cálculo dental, migrando para o sulco gengival causando maior inflamação, perda do ligamento periodontal, perda óssea e, por consequência, a perda do dente (RADICE; MARTINO; REITER, 2006; THURNHEER; BAO; BELIBASAKIS, 2018; PERCHYONOK, 2018).

A constituição do biofilme é modificada de acordo com sua maturação, consequentemente de acordo com a evolução da DP, ocorrendo a progressão de um periodonto saudável para uma gengivite e periodontite. Em uma gengiva saudável, predominam cocos seguidos por bacilos imóveis, sendo a maioria gram-positivas, como *Streptococcus* α -hemolítico, *Escherichia coli* e *Pasteurella multocida*, quase sem representação de tipos bacterianos mais virulentos. Na gengivite, os bacilos aumentam gradualmente, superando os cocos e o número de bactérias gram-negativas cresce. Então, na periodontite predominam uma microbiota anaeróbica gram-negativa mais patogênica, como *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Assim, espiroquetas representam quase metade das bactérias, enquanto os gram-positivos estão sub-representados. Com a maturação do biofilme, ocorre o processo inflamatório que marca o início da DP, com um biofilme mais patogênico dando continuidade aos estágios posteriores da doença (NIEVES et al., 1997; RADICE; MARTINO; REITER, 2006; RIGGIO et al., 2011; PERCHYONOK, 2018; THURNHEER; BAO; BELIBASAKIS, 2018).

Apesar da formação de placa bacteriana ser o início da DP, a resposta inflamatória do hospedeiro é quem vai causar dano significativo ao periodonto, sendo esta condição um acometimento multifatorial. Fatores microbiológicos, comportamentais, ambientais, imunológicos, sistêmicos, metabólicos e genéticos podem contribuir para a suscetibilidade do animal. Além disso, fatores idiopáticos ou hereditários existem em algumas raças. A severidade da doença aumenta com a idade, além disso raças menores e braquiocefálicas são mais vulneráveis (CUNHA; SANTOS; SANTOS, 2017).

Animais com dieta seca tem formação menor de placa bacteriana comparado a alimentação úmida ou à comida caseira. O efeito da ação mecânica da alimentação sólida pode auxiliar a remoção do biofilme dentário e reduzir a ocorrência da afecção (ALMEIDA; VIEIRA, 2018; FERNANDES et al., 2012). A alimentação onde é ofertado ao animal macronutrientes com ação antioxidante ou no sistema imunológico são, particularmente, importantes em relação ao controle e prevenção de doenças periodontais nos animais de companhia. Ao passo que nutrientes ou dietas que aumentem o estresse oxidativo e promovam a inflamação, como as gorduras saturadas e as dietas hipocalóricas, devem ser evitados para prevenir a periodontite (NAVARRO-HORTAL; BERNAL-MORENO; VARELA-LÓPEZ, 2018).

Ao decorrer da inflamação, embora alguns animais sejam assintomáticos, em estágios avançados costumam apresentar sinais clínicos de dor, alteração no comportamento, halitose, disfagia, mobilidade dentária e retração de gengiva. Os sinais clínicos são essenciais para avaliação e resolução do caso (RIGGIO et al., 2011; BAIA et al., 2017). A forma progressiva da doença pode levar a diversos efeitos adversos em animais, incluindo anorexia, perda de peso, dor e inflamação crônica e bacteremia (NIEVES et al., 1997; CUNHA; SANTOS; SANTOS, 2017). Já vem sendo relatada a associação da periodontite a doenças sistêmicas hematopoiéticas e cardiovasculares, como sopro cardíaco, insuficiência cardíaca crônica, endocardite e monocitose, entre outras comorbidades (PEDDLE et al., 2009; PENLINGTON; FAIXOVÁ, 2019). Dos estágios da doença, subdividimos em gengivite e periodontite, onde na gengivite há sinais como eritema de gengiva seguido de edema, sangramento de gengiva, retração, hiperplasia e halitose. Já na periodontite há perda do ligamento periodontal, formação de bolsa periodontal pela migração do epitélio juncional, retração da gengiva, perda óssea ou reabsorção alveolar e lesão de furca (CUNHA; SANTOS; SANTOS, 2017).

Nos cães, o desenvolvimento progressivo da doença pode ser dividido em quatro estágios (Figura 2) baseados em avaliação clínica da gengiva e severidade da lesão, progredindo de uma gengiva saudável a uma gengiva com séria perda óssea, aderência e aumento da bolsa gengival. No primeiro estágio, gengivite, observa-se somente inflamação na gengiva marginal, sendo reversível. No segundo estágio, periodontite leve, há maior área inflamada na gengiva, podendo haver halitose e dor. No terceiro estágio, periodontite moderada, observa-se maior acúmulo de cálculo dental, bolsa gengival e perda óssea acentuada. E no quarto estágio, periodontite avançada, ocorre inflamação e infecção severas, bolsa gengival profunda, destruição da gengiva, dentes e ossos, podendo haver bacteremia com evolução para septicemia (BAIA et al., 2017; PERCHYONOK, 2018).

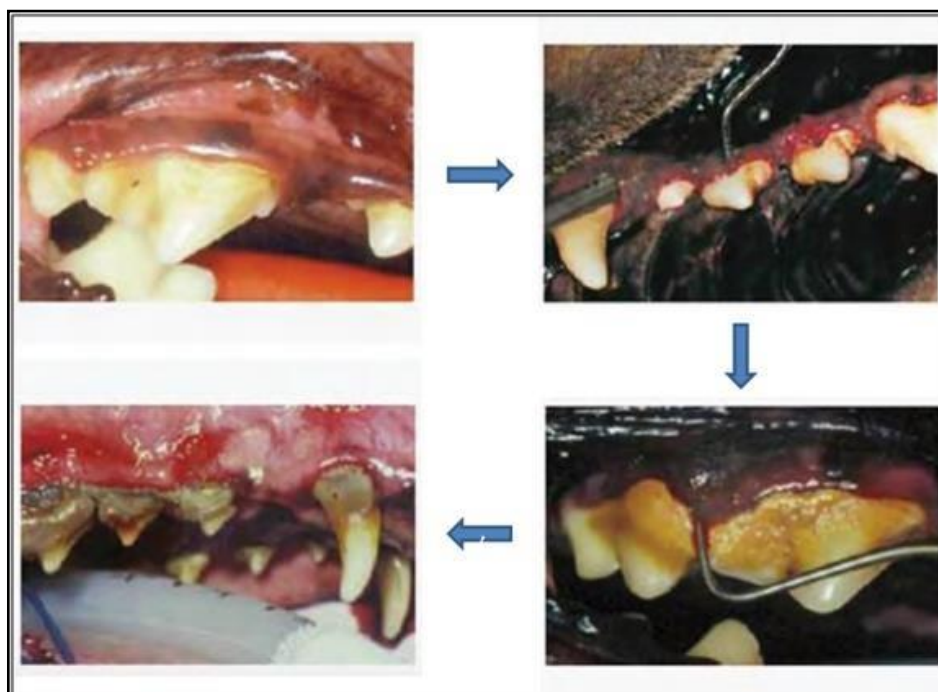


Figura 2. Progressão visual da doença periodontal. Fonte: adaptado de (PERCHYONOK, 2018).

Dentre as formas de diagnósticos usadas atualmente, a radiografia e a avaliação oral estão como o padrão na investigação da DP em animais de companhia, sendo vital para a

avaliação da progressão da doença. De início, a análise do histórico do paciente, anamnese e triagem pré-anestésica são importantes para prosseguir com o exame clínico oral e específicos. Lembrando que os exames radiográficos sempre serão feitos sob efeito de sedação. A maior parte dos componentes dentários são vistos somente pela radiografia, portanto, deixar de fazê-la é visto como negligência, uma vez que, a partir dela, o investigador traçará o monitoramento e a evolução da doença. Sendo assim, a radiografia definirá alguns processos como a redução da opacidade óssea na imagem, indicando osteólise; lesão de furca, quando há perda óssea das raízes de um dente multirradicular; aumento no espaço do ligamento periodontal; perda óssea da margem alveolar; perda óssea horizontal; e perda óssea vertical. Quanto mais precoce for o diagnóstico, melhor para a execução do tratamento e a possibilidade de melhora (BAIA et al., 2017; CUNHA; SANTOS; SANTOS, 2017; BAUER et al., 2018).

2.1.1 Tratamento e profilaxia da doença periodontal

O tratamento da DP visa o controle da microbiota bacteriana e a restauração da anatomia e da fisiologia da cavidade oral, evitando novas deposições de biofilme. O tratamento consiste na profilaxia periodontal, limpeza mecânica da placa bacteriana, polimento dental, limpeza com solução antimicrobiana e solução salina, a fim de evitar a progressão da doença e, quando necessária, a extração do dente (CUNHA; SANTOS; SANTOS, 2017; FERNANDES et al., 2012). Antibioticoterapia não é indicada como primeiro e único tratamento, devendo ser empregada de forma auxiliar e facultativa à profilaxia periodontal. A escolha do antibiótico na maioria das vezes é empírica, visto que na cultura de células da cavidade oral há fácil ocorrência de contaminação. Torna-se obrigatória a administração de antibióticos quando previamente é encontrada lesões renais diagnosticadas o que indica infecção sistêmica (BAIA et al., 2017; RADICE; MARTINO; REITER, 2006).

Como profilaxia, recomenda-se ao tutor a higiene oral do seu animal de companhia, consistindo na escovação em movimentos circulares, com ângulo de 45° em relação a gengiva, usando pasta de dente específica e de uma a três vezes por semana (BAIA et al., 2017; CUNHA; SANTOS; SANTOS, 2017). Atualmente, alguns medicamentos para tratamento e prevenção de periodontites estão disponíveis no mercado sob diversas formas farmacêuticas, como creme dental (C.E.T Virbac®), gel dental (Orozyme® InoVet, PerioVet® Vetnil), espuma bucal (Ibasa®), solução oral (Ibasa®, Care Dental Splash®, Periovet®, Aquadent Virbac®), spray bucal (Pet Clean®, Pro Canine®), lenço bucal (Ibasa®), pasta (Defengy OC®), palitos (Organnact Cães Fitodent®), comprimido palatáveis (Cooldent Virbac®) e pó (Plaque Off ProDen®). Os princípios ativos presentes nessas formulações são, por exemplo, enzimas para carboidratos, enzimas antimicrobianas, minerais abrasivos, antissépticos, estimulantes salivares, tamponantes e sequestrantes. Além disso, produtos naturais com propriedades antissépticas, antimicrobianas e anti-inflamatórias. O tratamento geralmente é prejudicado pelas formulações convencionais devido a ação da saliva e atividades mecânicas que removem rapidamente o medicamento aplicado sobre a superfície oral, dificultando a retenção da formulação e conseqüentemente sua eficácia (ESCUADERO-CASTAÑO; PEREA-GARCÍA; BASCONES-MARTÍNEZ, 2008).

As bactérias estão em constante adaptação e mutação, como por exemplo, as trocas de genes de resistência através de plasmídeos, demonstrando o rápido processo evolutivo das mesmas. O grande aumento de animais de companhia nos lares resultou no conseqüente aumento do uso de antibióticos e, estes, na maioria de amplo espectro, como penicilinas, cefalosporinas e fluorquinolonas, resultaram no aprimoramento da resistência contra eles próprios. Devido a isso, atualmente, observa-se uma preocupação com o uso de antibióticos nos animais de produção e também nos animais de companhia, nos quais se evidenciam fatores de

risco como o uso indiscriminado devido a demanda de pacientes, pressão dos tutores e diagnóstico indefinido (RADICE; MARTINO; REITER, 2006).

2.2 Plantas Medicinais

As plantas medicinais, utilizadas no campo da medicina tradicional, são consumidas mundialmente por serem de fácil acesso e pela grande biodiversidade disponível ao redor do mundo. Seu uso está relacionado diretamente à evolução humana e transpassa nas práticas religiosas, na medicina, no folclore e nas lendas. Nota-se registros à cerca de 5000 a.C. pelos chineses, onde já relacionavam doenças e plantas para seus tratamentos. Além disso, evidências arqueológicas do uso de plantas medicinais que embasam seu uso na era paleolítica vêm crescendo, como por exemplo, evidências biomoleculares de plantas medicinais, tais como *Achillea millefolium* L. (Milefólio) e *Matricaria chamomilla* L. (camomila), em amostras de cálculo dentário identificados em indivíduo da era paleolítica, um neandertal de 49000 anos de idade, *El Sidrón*, ao norte da Espanha (VELLOSO; PEGLOW, 2003; HARDY, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) indicou que países em desenvolvimento possuem de 65 a 80 % da população dependente das plantas medicinais como forma única de cuidado primário, sendo uma questão financeira e de inclusão social. Dessa forma, sua utilização para cuidados com a saúde é descrita e relatada como alternativa de tratamento, cura e prevenção para doenças, existindo cada vez mais uma demanda por tratamentos alternativos. O aumento do uso da medicina tradicional é relacionado também à percepção das limitações da medicina convencional, ao aumento das doenças iatrogênicas e crônicas, ao enfraquecimento da relação médico-paciente e a busca por atenção integral à saúde (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; WHO, 2011; ZENI et al., 2017). Devido a isso, espera-se encontrar produtos que sejam seguros, efetivos e economicamente acessíveis à população, principalmente de países em desenvolvimento, obtidos de produtos naturais ou componentes químicos isolados destes (NGBOLUA et al., 2018; PALOMBO, 2009; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As propriedades farmacológicas dos produtos naturais como, por exemplo, anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antitumorais, podem ser usadas como alternativas terapêuticas em casos de resistência bacteriana e como um benefício da minimização dos efeitos colaterais. Estes são pontos positivos na busca de novos fitoterápicos para tratamento e profilaxia de doenças que acometem a cavidade oral (HENLEY-SMITH; BOTHA; LALL, 2013; GUPTA et al., 2019).

Levando em consideração a mega biodiversidade brasileira, a busca de fins terapêuticos nas plantas medicinais é necessária por razões de precariedade do sistema de saúde, o que resulta na pesquisa com intenção de desenvolver medicamentos fitoterápicos para serem aplicados e melhorar a qualidade de vida da população mundial. O desenvolvimento de um medicamento fitoterápico segue etapas como caracterização e análise da composição qualitativa e quantitativa da matéria-prima vegetal. Após comprovação farmacológica e avaliação da eficácia e segurança do medicamento fitoterápico, este pode ser apresentado sob diferentes formas farmacêuticas como xaropes, cremes, pomadas, géis, filmes, granulados, pós, entre outras (VALLI et al., 2018; CASTRO et al., 2014).

Na área odontológica, o crescimento de pesquisas científicas por plantas medicinais como terapia antimicrobiana intensificou nos últimos anos. A popularidade dos produtos derivados de plantas também vem crescendo e cada vez mais a busca pelo natural é solicitada. Estes produtos vêm sendo usados com frequência nas limpezas, desinfecções e irrigações (ALMADI; ALMOHAIMED, 2018).

Derivados vegetais vêm sendo usados como agentes antimicrobianos na medicina tradicional e há crescente interesse na sua utilização, inclusive para prevenção e tratamento das

cáries dentais (BESRA; KUMAR, 2018). Além disso, na Índia, com sua medicina tradicional milenar *Ayurvédica*, são usadas diversas plantas medicinais como a Cúrcuma, Calêndula e Aloe vera para tratar doenças orais (RAVI; DIVYASHREE, 2014).

Mediante o exposto, as principais vantagens para o uso terapêutico das plantas medicinais nas doenças são a segurança, economia, eficácia e facilidade de obtenção. E é devido a estes fatores que elas são utilizadas desde os primórdios por curandeiros, benzedeiros, xamãs, pajés e raizeiros (NGBOLUA et al., 2018).

2.2.1 *Psidium guajava* L.

A *Psidium guajava* L., nome popular goiabeira, é uma espécie vegetal bem conhecida no Brasil e mundialmente utilizada na medicina tradicional e no ramo da alimentação, sendo fonte natural de vitaminas e minerais. Ela pertence ao gênero *Psidium*, sendo a espécie *Psidium guajava* Linn estudada no presente trabalho (DAKAPPA et al., 2013; DASWANI; GHOLKAR; BIRDI, 2017).

A *P. guajava* L. pertence à família *Myrtaceae*, constituída por mais de 133 gêneros e 3800 espécies. As espécies da família estão dispostas pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta (América, Ásia e África), sendo constituídos por árvores e arbustos. O gênero *Psidium*, no qual se encontra a espécie estudada, é composto por aproximadamente 150 espécies, com algumas produzindo frutos comestíveis. A Tabela 1 apresenta detalhes de sua classificação taxonômica (BANDERA FERNÁNDEZ; PÉREZ PELEA, 2015).

Tabela 1. Classificação botânica taxonômica da goiabeira.

Reino:	<i>Plantae</i>
Filo:	<i>Tracheophyta</i>
Classe:	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem:	<i>Myrtales</i>
Família:	<i>Myrtaceae</i>
Subfamília:	<i>Myrtoideae</i>
Gênero:	<i>Psidium</i>
Espécie:	<i>Psidium guajava</i> Linn

De acordo com o site *The Plant List* (2020), a *P. guajava* L. tem diferentes sinônimos ao redor do mundo, como *Guajava pumila* (Vahl) Kuntze, *Guajava pyrifera* (L.) Kuntze, *Myrtus guajava* (L.) Kuntze, *Myrtus guajava* var. *pyrifera* (L.) Kuntze, *Psidium angustifolium* Lam., *Psidium cujavillus* Burm.f., *Psidium cujavus* L., *Psidium fragrans* Macfad., *Psidium guajava* var. *cujavillus* (Burm.f.) Krug & Urb., *Psidium guajava* var. *guajava*, *Psidium guajava*

var. *minor* Mattos, *Psidium guava* Griseb., *Psidium igatemyense* Barb. Rodr., *Psidium igatemyensis* Barb. Rodr., *Psidium intermedium* Zipp. ex Blume, *Psidium pomiferum* L., *Psidium pomiferum* var. *sapidissimum* (Jacq.) DC., *Psidium prostratum* O. Berg, *Psidium pumilum* Vahl, *Psidium pumilum* var. *guadalupense* DC., *Psidium pyriferum* L., *Psidium pyriferum* var. *glabrum* Benth., *Psidium sapidissimum* Jacq., *Psidium vulgare* Rich. e *Syzygium ellipticum* K.Schum. & Lauterb.

A goiabeira é oriunda e se desenvolve nas áreas tropicais e subtropicais das Américas, tendo preferência pelos climas secos. Ainda, expande-se naturalmente pela América Tropical, entre o sul do México e o norte da América do Sul. Distante das Américas, também está presente em territórios da África, Europa, Ásia e Oceania. É considerado um dos frutos tropicais e subtropicais com alto valor e importância devidos suas fontes naturais de vitaminas e sais minerais (BANDERA FERNÁNDEZ; PÉREZ PELEA, 2015).

É de conhecimento científico que o uso desta espécie antecede as civilizações atuais, principalmente pela sua presença em registros dos primórdios na cultura tradicional indígena mundo afora. Na Índia, por exemplo, a decocção das folhas da espécie é comumente usada como febrífugo, antiespasmódico e até para tratamento de reumatismo (THAKUR; UPADHYAY; SAMANT, 2020).

No Brasil, seus usos tradicionais são para tratar diarreia, disenteria, dor estomacal, anorexia, cólera, hiperlipidemia, problemas digestivos, laringite, úlceras, dentre outros (DAKAPPA et al., 2013). Segundo Ferreira Rodrigues Sarquis et al. (2019), as folhas são utilizadas como ação antidiarreica, para infecções renais e intestinais; conforme relatado, seu uso na região do rio Manzáo, no Amapá, se dá pela decocção e ingestão de um copo duas vezes ao dia, por sete dias.

Segundo Batista (2015), com relação ao comércio, o Brasil é o terceiro maior exportador de frutas do mundo, perdendo apenas para Índia e China. A espécie, portanto, possui um mercado consolidado em mais de 60 países, onde estão por exemplo Austrália, Brasil, Colômbia, Egito, Estados Unidos, México, Filipinas, Índia, África do Sul e Venezuela (GONZÁLEZ-CUETO, 2019). Nestes, dispõe de diferentes codinomes como guava, guayaba, goiaba, perala, pichi, posh, além disso codinomes locais como, por exemplo, *guava* (espanhol), *guava tree* (inglês), *goyave* e/ou *goyavier* (francês), *fan shi liu* (chinês), dentre outros. No Brasil, no entanto, a espécie é popularmente conhecida como araçá-goiaba, guaiaba ou goiaba (RAVI; DIVYASHREE, 2014).

Atualmente, a *P. guajava* L. está presente no ramo alimentício e na medicina tradicional e moderna devido ao seu alto valor nutricional e das suas atividades farmacológicas existentes em seus componentes químicos. Suas partes usadas variam entre as folhas, flores, frutos, casca e raízes; sendo consumida medicinalmente por métodos de infusão, decocção, cataplasma, dentre outros (DAKAPPA et al., 2013; DÍAZ-DE-CERIO et al., 2017).

Em sua forma biológica, *P. guajava* L., é uma árvore de pequeno porte podendo atingir de 3 a 6 metros de altura com uma copa irregular. Possui tronco de casca lisa e tortuoso. As folhas apresentam características decussadas simples, oblongas, de margem inteira, verde brilhantes variando de 8 a 12 centímetros de comprimento e 3 a 6 centímetros de largura. Possui flores brancas, hermafroditas, isoladas ou em grupos de 2 ou 3, situadas nas axilas das folhas e nas brotações de ramos maduros. Sua fecundação ocorre por polinização cruzada e o fruto em formato de baga, que é o tipo mais comum de fruto carnudo simples, no qual a parede do ovário inteiro amadurece em um pericarpo comestível. O fruto possui tamanho entre 5 a 7 centímetros quando maduro, possuindo coloração amarela, internamente coloração vermelha ou branca dependendo de sua variedade (BANDERA FERNÁNDEZ; PÉREZ PELEA, 2015; DAKAPPA et al., 2013; PIER *species info*, 2020).

Na Figura 3, a seguir, exploramos um esquema das partes da planta:



Figura 3. Goiabeira: árvore (A), folhas (B), frutos e folhas (C) e flor (D). Fonte: DAKAPPA et al., (2013).

2.2.2 Fitoconstituíntes e propriedades farmacológicas

Fitoquímicos são compostos de natureza química produzidos pelas espécies vegetais em seus metabolismos. Possuem atividades essenciais para as plantas, como por exemplo a defesa, além também de atividades biológicas para a saúde humana, dentre as quais destaca-se as propriedades antioxidantes que fazem parte ativa do sistema biológico de defesa, reduzindo riscos de doenças crônicas. Quando fitoquímicos são utilizados como proteção ao sistema endógeno de um organismo, ele é denominado de nutracêutico, sendo então, seguindo o exemplo anterior antioxidante, promotores de proteção oxidativa (FERREIRA; ABREU, 2007). Na Figura 4 é elucidada, em forma de esquema, as principais classes de fitoquímicos naturais.

Em sua ampla literatura já descrita, a *P. guajava* L. possui ampla diversidade de fitoquímicos, entre eles flavonóides, taninos, saponinas, esteróides, glicosídeos, fenóis e alcalóides, além de minerais, enzimas, proteínas, álcoois sesquiterpenóides e ácidos triterpenóides. É uma planta rica em antioxidantes e vitaminas, também rica em luteína, zeaxantina e licopeno (DAKAPPA et al., 2013).

O fruto da goiabeira, a goiaba, possui vitaminas A (retinol) e vitamina C (ácido ascórbico), é relatada contendo também uma das maiores concentrações de ácido ascórbico entre as frutas, indo a aproximadamente 60 mg a 1000 mg por 100 g. Além do mais, há minerais como ferro, cálcio, fósforo e manganês existindo na combinação com ácidos fosfóricos, oxálicos e málicos. Também é rico em fitoquímicos como as saponinas (como o ácido oleanóico) e os flavonóides (como guaijavirina e quercetina). Nas sementes, encontra-se óleos, proteínas e amido (NGBOLUA et al., 2018).

As folhas da goiabeira, essência do presente estudo, possuem componentes químicos variados que já foram descritos por diversos autores. Sendo assim, possuem enorme diversidade química. Ademais, apresentam óleo essencial rico em cineol, taninos, triterpenos e flavonóides, anteriormente já destacados (DAKAPPA et al., 2013; OLAJIDE; AWE; MAKINDE, 1999).

Rupali et al. (2020) relatam, em estudo fitoquímico qualitativo das folhas da goiaba, quantidade máxima de alcalóides, flavonóides e saponinas; triterpenos em quantidade média; presença de glicosídeos cardíacos e taninos; e ausência de esteróides, florotanos e aminoácidos.

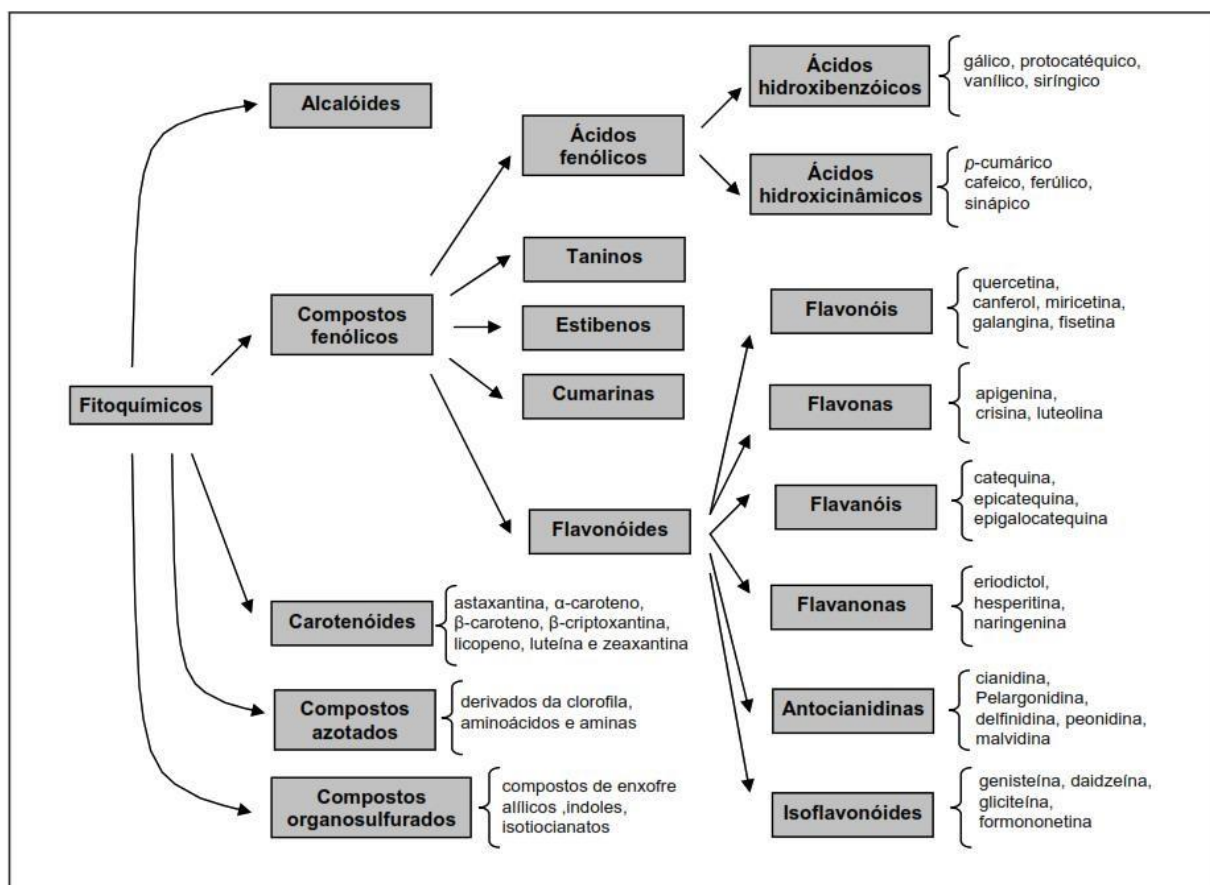


Figura 4. Principais classes de fitoquímicos naturais. Fonte: (FERREIRA; ABREU, 2007).

A partir das diferentes partes da espécie vegetal se extrairão os constituintes de interesse, e para isso, os solventes são os responsáveis por extrair os diferentes compostos, tornando, assim, cada extrato com uma composição, concentração e propriedade distintos uns dos outros. Ademais, os métodos de extração podem incluir fluido supercrítico, refluxo com soxhlet, destilação a vapor e extração por ultrassom, além de métodos básicos como a decocção, a infusão e a percolação (PORWAL; SINGH; GURJAR, 2012).

Para adquirir um extrato com propriedades antibacterianas, deve-se obter uma extração a partir de metanol, etanol, acetato de etila e/ou água. No estudo de Porwal, Singh e Gurjar (2012), a composição química do extrato que obteve melhor valor de concentração inibitória mínima, no geral, foi o extrato etanólico. Na Tabela 2, segundo o estudo mencionado, destaca-se, então, a composição química e propriedades farmacológicas encontradas para os diferentes tipos de extrato.

Tabela 2. Composição química e propriedades farmacológicas, de acordo com a composição, de extratos obtidos de folhas de *Psidium guajava L.*

Tipo de extrato	Composição química	Propriedades
Aquoso	Flavonóides, taninos, ácido gálico, ácido ferrúlico, quercetina, flavonóides e compostos funcionais	Antioxidante, antiviral, antihiperlipidêmica, antihipertensiva, anticoagulante, anti-inflamatória e hepatoprotetora
Etanólico	Flavonóides, compostos polifenólicos	Antioxidante, antiulcera
Metanólico	Óxido de cariofileno, cariofileno e taninos	Antioxidante
Hidroetanólico	Óleos aromáticos e compostos funcionais	Antibacteriana
Hidroalcoólico	Flavonóides	Anti-inflamatória

Fonte: adaptado de (PORWAL; SINGH; GURJAR, 2012).

O extrato aquoso das folhas descrito por Ratnakaran (2020) obteve no teste qualitativo dos fitoconstituintes a presença de fenóis, flavonóides, terpenóides e saponinas. Flavonóides, fenóis e taninos são geralmente descritos em maior quantidade, à medida que triterpenos, alcalóides e saponinas estão em menor proporção no extrato das folhas. Os flavonóides, fenóis, terpenóides e taninos são os responsáveis pela atividade antibacteriana, tem efeitos como a inibição do ergosterol (fenóis) na parede celular fúngica, além de privação de substrato, inibição da fosforilação oxidativa e inibição de enzimas extracelulares (taninos). Entende-se, portanto, que a atividade antibacteriana se dá pela atuação de diferentes compostos polifenólicos (RATNAKARAN et al., 2020).

Entre os compostos polifenólicos, estão a guajaverina e quercetina (flavonóides), ácido psidiólico, triterpenos taninos e elagitaninos, que promovem precipitação de proteínas (BONA et al., 2014). Além disso, extratos aquosos e orgânicos revelam atividade satisfatória contra *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.* e *Shigella spp.* No entanto, atividade contra *Citrobacter spp.*, *Alcaligenes fecalis* e *Aspergillus spp.* não foi observada. Além disso, atividade do extrato aquoso da raiz, casca e caule foram ativos frente bactérias gram-positivas *Bacillus subtilis* e inativos contra as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (NGBOLUA et al., 2018).

Em questões de segurança, a goiabeira é uma planta usada como alimento e medicinalmente há séculos na forma tradicional sem apresentar efeitos adversos em seu uso comum. No entanto, o uso excessivo dos fitoquímicos pode gerar efeitos adversos e existe a possibilidade de interações medicamentosas. Portanto, é sempre recomendado cuidado ao utilizar qualquer tipo de planta ou organismo (RAVI; DIVYASHREE, 2014).

2.2.3 Aplicações terapêuticas da *Psidium guajava L.* no tratamento da doença periodontal

Conforme exposto, o biofilme oral é o fator inicial da DP, pois os efeitos patológicos dos microrganismos presentes nele liberam mediadores inflamatórios gerando destruição tecidual e do osso. O estresse oxidativo também é considerado fator chave, visto que espécies reativas de oxigênio são componentes chave para a inflamação na periodontite, ativando fatores nucleares que induzem transcrição gênica dos principais mediadores pró-inflamatórios, além disso, a osteoclastogênese. Assim, a DP é composta por uma origem multifatorial e, devido a sua magnitude, estratégias para controle do biofilme são necessárias para prevenir ou moderar a adesão bacteriana (RAVI; DIVYASHREE, 2014).

As aplicações terapêuticas do derivado vegetal estudado no tratamento da DP são diversificadas, sendo a ação antiplaca de grande importância em virtude de o biofilme ser o fator de desenvolvimento inicial da doença.

Os flavonóides são os responsáveis pela ação antimicrobiana. São eles a quercetina e a galunina. Os mecanismos de ação da quercetina são provavelmente oriundos do rompimento e a formação de complexos, inativando proteínas na membrana celular bacteriana. Sobre a galunina, é relatado sua propriedade bacteriostática, inibindo o crescimento de *S. mutans* e *S. aureus* e sua capacidade de diminuir a hidrofobicidade, por se ligar às proteínas de superfície celular, resultando numa menor adesão à superfície dental. Além disso, os extratos da goiaba demonstram ação antiplaca *in vitro* ao inibir o crescimento, a aderência e a coagregação de bactérias. Sendo assim, se apresenta como um ótimo agente antiplaca e antibacteriano para ser usado no tratamento convencional da DP (RAVI; DIVYASHREE, 2014).

Acerca das ações anti-inflamatórias, o extrato é capaz de inibir a prostaglandina, cinina e histamina; como demonstrado na literatura, é capaz de neutralizar completamente a resposta citolítica e pró-inflamatória dos leucócitos humanos, inibindo a óxido nítrico sintase induzível, prevenindo a liberação de interleucina e diminuindo os níveis de proteína C reativa, modulando, dessa forma, a resposta inflamatória (RAVI; DIVYASHREE, 2014).

O desequilíbrio causado pelo estresse oxidativo é também afrontado pelo extrato da goiaba. Pacientes com DP tendem a possuir capacidade de tamponamento de glutathione reduzida que pode ser protegida na ingestão geral de micronutrientes antioxidantes, como a vitamina C, importantes para limitar os danos oxidativos, teciduais e também para prevenir o avanço da doença. Sendo assim, o extrato da goiaba possui ação antioxidante e é uma excelente fonte de vitamina C, no qual esses fitoquímicos antioxidantes eliminam peróxido de hidrogênio livre, superóxido e inibem a hidroxila. Os compostos fitoquímicos associados a ação antioxidante são: quercetina, carotenóides, vitamina C e polifenóis. Portanto, um ótimo agente antioxidante para ser usado no tratamento convencional da DP (RAVI; DIVYASHREE, 2014).

Além disso, para acelerar o processo de cicatrização tecidual, a vitamina C modula a expressão do gene procolágeno, levando à formação do colágeno. Além, auxilia na manutenção das funções imunológicas, integridade estrutural e funcional dos tecidos epiteliais. Sendo assim, um ótimo agente cicatrizante no uso referente ao tratamento convencional da DP (RAVI; DIVYASHREE, 2014).

2.3 Formulações Farmacêuticas Para Tratamento Da Doença Periodontal

A terapia periodontal é influenciada essencialmente pela seleção de um agente antimicrobiano, pela escolha da via de administração e, além disso, a escolha correta da forma farmacêutica como fator importante que impactará em um tratamento bem-sucedido. Para os tratamentos antimicrobianos, por exemplo, a terapia sistêmica exige doses que sejam suficientes para atingir dose terapêutica do fármaco na bolsa periodontal. Portanto, para pacientes com DP moderada, a administração local de medicamentos é considerada um método que acarretará menos efeitos colaterais. O uso indevido e/ou indiscriminado dos tratamentos sistêmicos, além

da falha de atingir o alvo terapêutico e insuficiente penetração nos tecidos, foram fatores associados à resistência antimicrobiana e, portanto, hoje em dia são utilizados somente em casos graves ou generalizados (H.R. et al., 2019).

Com o advento da tecnologia, novos sistemas de liberação de fármacos vêm sendo desenvolvidos para atender as necessidades de inovações e, além disso, nota-se crescente avanço nos conhecimentos acerca dos antimicrobianos (H.R. et al., 2019). No sistema de liberação de fármacos têm-se o objetivo de modular a liberação do fármaco na faixa terapêutica por tempo prolongado, utilizando-se dosagem única. Sendo assim, as estratégias para este sistema são os polímeros que controlarão a liberação do ativo apresentando vantagens como (i) evitar doses tóxicas e subterapêuticas (ii) controlar os níveis de fármaco no sítio de aplicação (iii) obter concentrações maiores de fármaco no local de ação e, conseqüentemente, direcionar o princípio ativo (PA) a alvos específicos. Além disso, um sistema de liberação controlada diminui a frequência de dosagem e com isso reduz os efeitos colaterais (BIZERRA e SILVA, 2016; DUSANE et al., 2016).

Também se encontra vantagens como aplicação minimamente invasiva, personalizada e direta; prevenção de problemas gastrointestinais e metabolismo de primeira passagem; administração de agentes inadequados para administração sistêmica, melhora da eficácia terapêutica e a adesão do paciente (H.R. et al., 2019; DUSANE et al., 2016).

Sobre as desvantagens, é relatado como uma via de administração inviável para PA irritantes, quando, no local, há presença de eritema, coceira ou arritmia local, a dose é limitada devido à pequena área, em alguns casos o custo pode ser levado em consideração. Além, pode ocorrer metabolismo pré-sistêmico por enzimas, devido a peptidase, sendo assim não viável para entregar peptídeos, e, por último, há dificuldade em chegar em concentrações terapêuticas nas partes mais profundas das bolsas e lesões periodontais (DUSANE et al., 2016).

Um sistema de liberação oral para tratamento da PD deve ser de fácil administração, liberar de forma controlada, manter a concentração da droga por um período, além de ser biodegradável, biocompatível e não causar qualquer irritação aos tecidos. Estes sistemas específicos estão disponíveis na forma de sistemas de irrigação, fibras, géis, tiras, filmes, micropartículas e nanopartículas (H.R. et al., 2019).

2.3.1 Filmes orais

Filmes orais, filme solúvel oral, filmes orais de rápida dissolução, filmes mucoadesivos ou filmes orodispersíveis, são nomenclaturas que descrevem o mesmo sistema de liberação. São formas farmacêuticas (FF) sólidas estruturadas por polímeros que formam uma matriz onde se aloja o PA que será liberado de forma sustentada utilizando absorção oral, bucal, sublingual, palatal ou gastrointestinal. Quando administrado na cavidade oral para tratamento e profilaxia da DP, terá intuito de atingir espaços periodontais e adjacentes (H.R. et al., 2019; EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019; HAJU et al., 2021)

Estes sistemas de liberação revolucionários são alternativa para superar desafios na prática clínica humana. Desafios estes para pacientes com dificuldade de engolir, acamados, com vômitos repetidos, enjoo de movimento ou com transtornos mentais (EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019).

Noguchi et al. (1984) demonstraram pela primeira vez a aplicação e metodologia desses sistemas. Entre os métodos de preparo dessas FF, estão a fundição, a impressão, a pulverização, a extrusão e a rolagem. Um método mais simples e mais utilizado, no entanto, dentre os demais, é a *solvent casting* (evaporação e moldagem), que pertence à técnica de fundição. O método consiste em fundir o polímero obtendo-se uma solução e, posteriormente, adicioná-la a PA e

excipientes. Então, remove-se o solvente por evaporação e os filmes são cortados conforme desejado (H.R. et al., 2019; EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019).

Para compor essas FF, utiliza-se basicamente o PA e o polímero formador de filme. Além disso, excipientes e adjuvantes, como plastificantes, surfactantes, corantes, agentes estimulantes de saliva e agentes aromatizantes serão incluídos de acordo com as necessidades de cada FF, de cada PA e da adesão ao paciente (EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019).

Os polímeros formadores de filme compõem a maior parte dos filmes orais. São eles que fazem possível a fabricação destes. Estes polímeros são comumente biodegradáveis, como o ácido polilático, o ácido poliglicólico, a poli-caprolactona e o ácido poli-hidroxilbutírico, ou polímeros não biodegradáveis, como a etilcelulose, o acetato de celulose e o metacrilato de etila (H.R. et al., 2019; EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019; HAJU et al., 2021).

Para classificar os filmes orais, são observados três pontos: liberação, solubilidade do PA e o local de administração. Pelo tempo de liberação, englobam-se três tipos: a liberação imediata, quando o PA é liberado segundos após a administração, sendo esse filme geralmente de uma só camada; a liberação em derretimento, quando se desintegra em minutos e possuem capacidade de mucoadesão, podendo ser de uma ou mais camadas; e a liberação sustentada mucoadesiva, dissolvendo-se entre 8 a 10 horas buscando efeito local ou sistêmico, podendo ter várias camadas. Os PA são incorporados na FF por dissolução ou dispersão. Filmes possuindo PA solúveis são chamados de filmes de dissolução oral, enquanto filmes possuindo PA dispersos (não solúveis) são denominados filmes dispersíveis orais. Quanto ao local ou via de administração, estes podem ser denominados palatinos (quando administrados no palato), filmes sublinguais (administrados sob a língua), filmes gengivais (aderidos à gengiva) ou filmes bucais (aderidos a bochecha interna). O objetivo das classificações é para obter clareza sobre as formulações, além de ter um registro de maneira correta, garantindo, dessa forma, a precisão das informações (EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019).

A absorção é o caminho que o PA irá percorrer desde a administração até ser absorvido pelo organismo, pelas camadas da pele e mucosas. A mucosa oral possui locais distintos no quesito da absorção de acordo com a permeabilidade do local e suprimento sanguíneo. Sendo então, a taxa e extensão de absorção segue a ordem: sublingual > bucal > gengival > palatal. Além disso, como já citado, a aplicação de formulações na mucosa oral é uma estratégia para prevenir da absorção sistêmica, escapar do metabolismo hepático e melhorar a biodisponibilidade (EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019; HAJU et al., 2021).

Para o controle de qualidade, os filmes orais são avaliados quanto à características organolépticas, incluindo a palatabilidade, aparência física e morfologia da superfície; propriedades mecânicas, incluindo a aderência, resistência à tração, alongamento, força de rasgo, resistência de dobramento, absorção de umidade, grau de inchamento e pH; compatibilidade de excipiente e o PA, utilizando infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e/ou calorimetria de varredura diferencial (DSC); estudo de estabilidade, avaliando por período de 45 dias, 3 meses ou 6 meses, verificando alteração física e de conteúdo; teste de desintegração, indicando as características de dissolução; estudo de dissolução *in vitro*, indicando o perfil de liberação; e estudo de permeação, utilizando célula de Franz (EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019; HAJU et al., 2021). A liberação do PA é dependente do polímero e dos agentes de reticulação utilizados, agentes que promovem ligações entre moléculas lineares produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar e tornando a estrutura mais rígida. No geral, a liberação dependerá da propriedade de biodegradação do polímero onde será liberado por difusão e/ou dissolução ou erosão da matriz. A liberação de drogas a partir de filmes feitos com polímeros não degradáveis ocorre apenas pelo processo de difusão, enquanto aqueles feitos com polímeros biodegradáveis liberam a droga por difusão ou erosão (H.R. et al., 2019; HAJU et al., 2021).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

No preparo dos ensaios foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico e pureza:

- Ágar Brain Heart Infusion (BHI), Merck®, 399940;
- Ágar Muller-Hinton (MH), HiMedia®, 425227;
- Água deionizada, Gehaka, OS 10 LZ;
- Ácido acético;
- Ácido gálico;
- Butanol;
- Caldo Brain Heart Infusion, Merck®, 90715204;
- Caldo Muller-Hinton, HiMedia®, 20660;
- Cloreto de cálcio (CaCl_2), Vetec, 0607442;
- DPPH, Sigma-Aldrich;
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3);
- Folin-Ciocalteu, Sigma-Aldrich;
- Cloreto de potássio (KCl), Proquímica, lote 16/0164;
- Fosfato monopotássio (KH_2PO_4), Vetec, lote 0501002;
- Cloreto de magnésio (MgCl_2), Proquímica, lote 19/0141;
- Cloreto de sódio (NaCl), Vetec, lote 88525;
- Difenilborato de aminoetano (NP);
- Polietilenoglicol (PEG);
- Sorbitol, Vetec, lote 1100435.

3.1.2 Matérias-primas

No preparo das formulações foram empregadas as seguintes matérias-primas, com pureza de grau farmacêutico:

- Carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) (90,000 Mw), Sigma Aldrich, lote MKBQ6723V;
- Poli álcool vinílico (PVA) (85,000-124,000 Mw, grau de hidrólise 99,0 %), Sigma Aldrich, MKCK4857;
- Metilparabeno, Synth, lote 217678;
- Propilparabeno, Vetec, lote 1108888;
- Propilenoglicol (PG), Synth, lote 198262.

3.1.4 Equipamentos e acessórios

No preparo das formulações e ensaios foram empregadas os seguintes equipamentos e acessórios devidamente qualificados:

- Balança analítica Tecnal, modelo 210;

- Cromatoplasmas sílica Gel, 60 F254;
- Estufa de circulação e renovação de ar, Solab, SL-102/1152;
- Espectrômetro de infravermelho FTIR, Vertex, 70;
- Geladeira, Electrolux, DC51;
- Incubadora Shaker Digital, Cienlab, CE-720;
- Lâmpada de ultravioleta (254 e 365 nm), Boiton;
- Liofilizador, Liobras, K105;
- Moinho de facas, IKA-11 basic;
- Pipeta automática 1000µL 5µL, Control Lab. CAL 0214;
- Placa de agitação e aquecimento, Warmnest, 78HW-1;
- Placa de Petri em poliestireno;
- Peagâmetro, Quimis, Q400MT;
- Termômetro, Incoterm, 002/15;
- Ultrapurificador de água acoplado a osmose reversa, Gehaka, OS 10 LZ.

3.1.5 Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus pseudintermedius*, além da cepa *Streptococcus* beta-hemolítico coletado da microbiota oral de cão que foi atendido no hospital veterinário da UFRRJ. Os microrganismos foram provenientes da bacterioteca do Labac (Laboratório de Bacteriologia) do Instituto de Veterinária da UFRRJ, e são descritas na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Descrição das cepas dos microrganismos utilizados.

Microrganismos	Código	Perfil de resistência
<i>Escherichia coli</i> (ESBL)	CMY-2	Resistente à betalactâmicos
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Sensível
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	ATCC 43300	Resistente à Oxacilina/Meticilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Sensível
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	B19	Resistente à Sulfametoxazol-trimetoprim
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	B20	Sensível
<i>Streptococcus</i> beta-hemolítico	-	Sensível

Legenda: ESBL: Beta-Lactamase de Espectro Estendido; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

3.2 Obtenção da Espécie Vegetal

As folhas de goiabeira foram obtidas no campo experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (Km 07 da BR 465, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil) e a espécie foi classificada e depositada no Jardim Botânico da própria universidade.

3.3 Obtenção do Extrato

O extrato foi preparado utilizando as folhas da goiabeira. Após a obtenção das folhas, o material vegetal foi seco a 40 °C durante 72 horas em estufa com circulação e renovação de ar. As folhas secas de goiaba foram trituradas utilizando moinho de facas e, posteriormente, o material pulverizado foi extraído por decocção em água à 80 °C a 10 % p/v (10 g gramas em 100 mL), a partir de 100 g de folha. Em seguida, o material foi filtrado com algodão, concentrado em chapa de aquecimento e liofilizado, a -90 °C e vácuo de 50 mmHg, visando obter o rendimento final. O fluxograma de preparo do extrato aquoso das folhas de goiabeira está descrito na Figura 5.

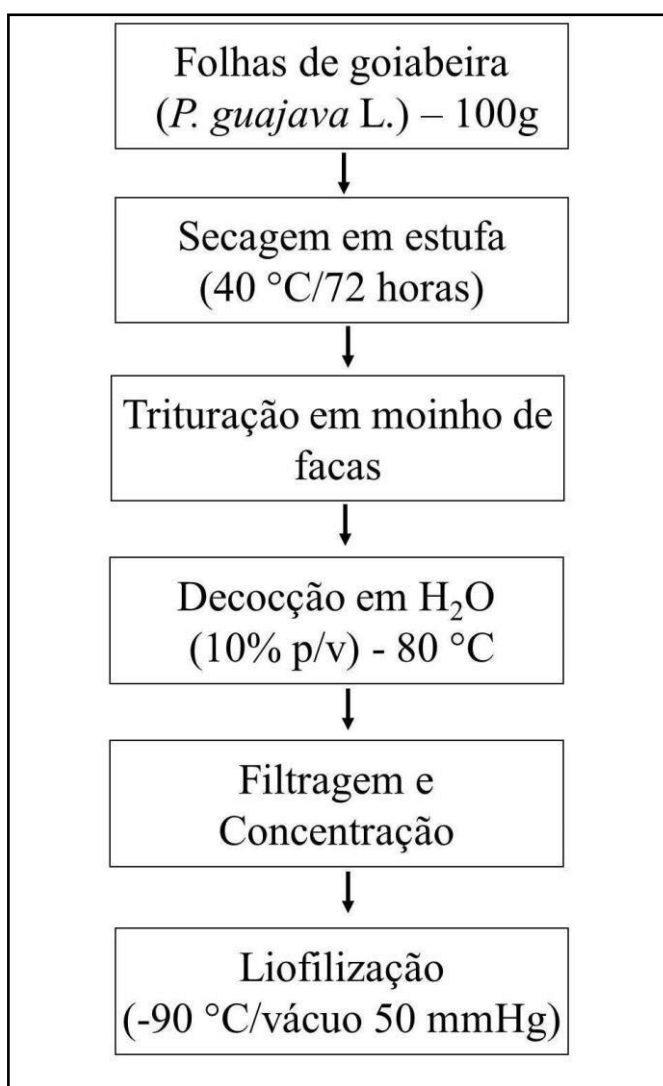


Figura 5. Fluxograma de preparação do extrato aquoso das folhas de goiabeira.

3.4 Caracterização Qualitativa do Extrato

3.4.1 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada visando a identificação dos taninos gálicos e/ou condensados, na qual uma amostra do extrato foi ressuspensa em etanol e aplicada sobre a placa cromatográfica. O eluente, fase móvel, foi constituído de butanol, ácido acético e água, na concentração de 60 %, 20 % e 20 %, respectivamente. Para identificação dos compostos, foram utilizados o revelador físico, lanterna de UV em 254 nm e 365 nm e o revelador químico NP-PEG (difetilboriloxietilamina 1 % em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5 % em etanol).

3.5 Caracterização Quantitativa do Extrato

3.5.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato foi avaliada pelo ensaio do radical livre de DPPH, que é capturado pelo antioxidante produzindo decréscimo da absorbância (utilizando espectrofotômetro UV). A estabilização do radical livre citado é vista na mudança da cor violeta-escura para violeta-clara (RUFINO et al., 2007). Foram preparadas, previamente, soluções aquosas de metanol 50 % e acetona 70 %, solução metanólica de DPPH 0,06 mM (protegidas contra a luz) e diluições metanólicas do extrato (amostra) (1, 2, 5, 7 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A mistura de reação consistiu na adição de 0,1 mL de amostra com 3,9 mL de solução de DPPH 0,06 mM. A leitura da absorbância foi medida a 515 nm, em pentaplicata; a curva de calibração de DPPH (1, 2, 3, 4 e 5 μM) utilizando metanol como branco, para criar a primeira equação da reta. No mesmo comprimento de onda a leitura foi feita depois de 55 minutos de reação e a curva do EC_{50} (amostra e DPPH), em triplicata, para criar a segunda equação da reta.

O valor da atividade de eliminação, EC_{50} , expressa a quantidade de extrato necessária para diminuir a absorbância do DPPH em 50 %, foi determinada graficamente ao plotar a regressão linear da absorbância contra a concentração de extrato. Este experimento seguiu a metodologia descrita por Rufino et al. (2007) e De Menezes Epifanio et al. (2020).

3.5.3 Fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (FC) utilizando curva de calibração de solução alcoólica de ácido gálico em concentrações diferentes (1, 3 5, 7, 9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Nessas diluições da curva de calibração foram adicionados água e o reagente FC (0,10 % v/v). A partir de uma solução metanólica do extrato (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), foi retirada uma alíquota de 0,5 mL, adicionada a frasco âmbar com tampa e acrescida de 2,5 mL de solução de FC (10 % v/v) agitados rapidamente e deixados em repouso por 5 minutos. Uma alíquota de 2,0 mL da solução de carbonato de sódio (4 % m/v) foi adicionada para neutralizar o meio, então homogeneizada e deixada em repouso por 2 horas protegido da luz. A densidade óptica foi medida no espectrofotômetro no λ 765 nm, contra um branco, em triplicata. A partir dos resultados obtidos, foi construída a curva de calibração analítica e o teor de fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido tânico, em miligramas por g de extrato seco. Este experimento seguiu a metodologia descrita por De Menezes Epifanio et al. (2020).

3.6 Avaliação Antimicrobiana do Extrato

Para a avaliação antimicrobiana, diluições do extrato foram colocadas frente às cepas descritas no item 3.1.5, utilizando dois métodos, sendo eles a difusão em disco e a microdiluição

em caldo. Inicialmente o ensaio de difusão em disco determinou a partir de qual concentração houve a formação de halos de inibição. Posteriormente, através do método microdiluição em caldo, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Esta segunda através do método de semeadura.

3.6.2 Teste de difusão em disco

O ensaio foi feito utilizando discos de filtro de papel ($0,38 \text{ cm}^2$) impregnados com diferentes concentrações do extrato (1200, 2400, 3600, 4800 e 6000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dispostos em placas de ágar Mueller-Hinton (MH) inoculadas com as cepas, descritas no item 3.6.1, e incubadas por 24 horas. O resultado é observado visualmente na forma de halos de inibição dos quais foram medidos seus diâmetros. Os inóculos utilizados nesses testes foram obtidos a partir de culturas incubadas por 24 horas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 35°C e ajustados à escala 0,5 de McFarland (CLSI, 2020).

A Figura 6 demonstra o esquema da técnica da difusão em disco realizado no presente estudo. Os testes foram realizados em triplicatas e, a partir dos resultados, os halos de inibição foram obtidos pela interação extrato e microrganismo e realizada a projeção para o próximo ensaio.

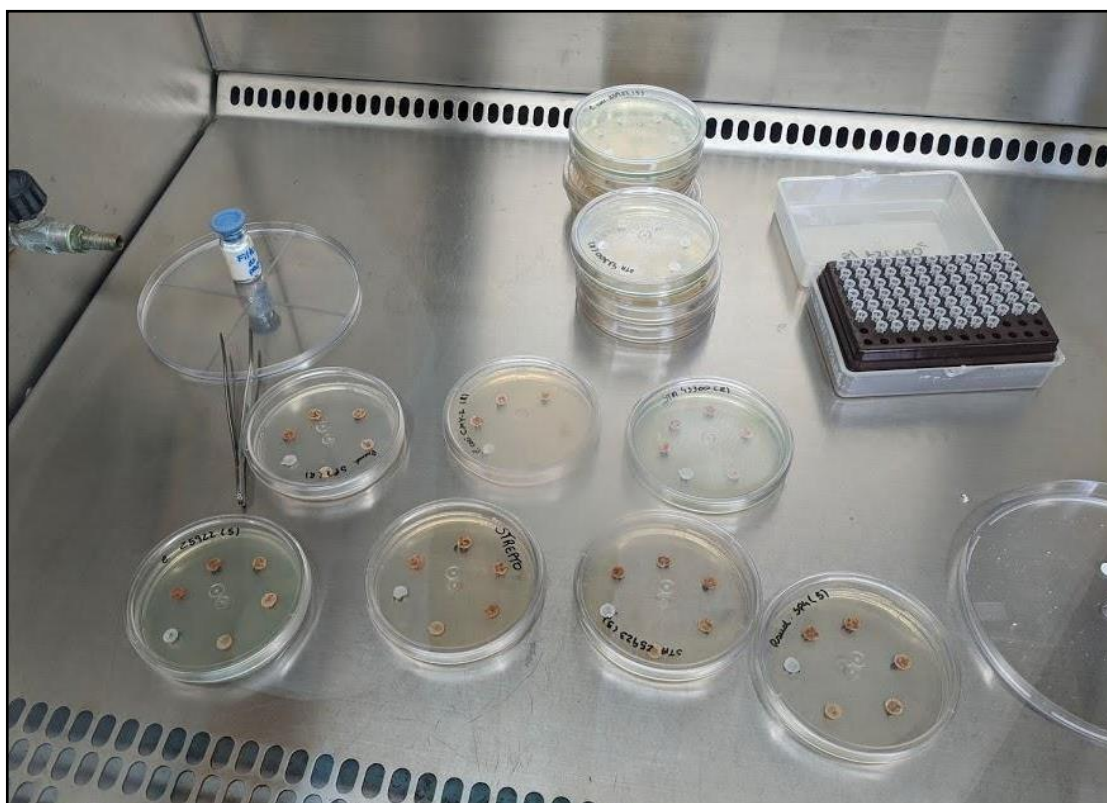


Figura 6. Procedimento de difusão em disco.

3.6.3 Teste de microdiluição em caldo

Em placa de microtitulação de 96 poços foram distribuídas o caldo contendo as cepas e as duas diluições do extrato, definidas na análise preliminar de difusão em disco, sendo elas 3600 e 6000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, convertidas para 8,84 e 11,40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. As cepas utilizadas foram previamente inoculadas em caldo MH à 35°C e utilizadas após 24 horas. Para os controles foram utilizadas: só as cepas para o controle positivo, cepas e antibiótico (Imipenem) para o

controle negativo e as diluições do extrato com caldo MH puro, para o branco. Esse esquema é demonstrado na Figura 7. Para aferição da turvação produzida, utilizou-se espectroscopia UV no λ 655 nm (RAKMAI et al. 2018), e a CIM foi determinada pela concentração de extrato na amostra que não apresentou turvação quando comparada ao branco (CLSI, 2020).

A CBM foi determinada a partir de uma alíquota dos poços da amostra (cepa e extrato), onde se observou ausência de turvação, inoculada por semeadura em meio de cultura BHI a 36 °C e, após 24 horas, foi definida a CBM como a menor concentração do extrato capaz de causar inviabilidade de crescimento (morte) do inóculo (CLSI, 2020).

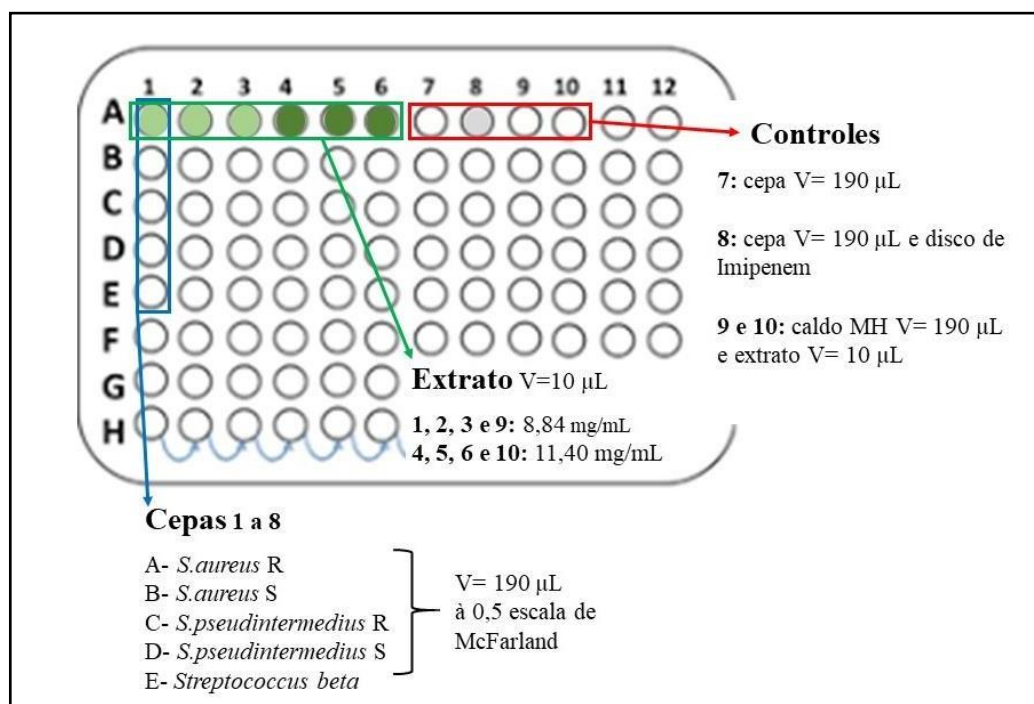


Figura 7. Esquematização do teste de microdiluição em caldo.

3.6.4 Análise estatística

Na análise estatística dos ensaios antimicrobianos, os números médios de halos e a turbidez foram submetidos a análise estatística para comparação dos valores das médias. Inicialmente os dados foram avaliados quanto à normalidade de distribuição através de Shapiro Wilk. Os resultados que apresentaram distribuição normal (paramétricos) foram avaliados através da análise de variância ANOVA (teste de Tukey). Os resultados que não apresentaram distribuição normal (não paramétricos) foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância considerado em todos os testes foi de 95 % ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

3.7 Desenvolvimento dos Filmes Orais

3.7.1 Preparo das formulações candidatas

Os filmes orais foram obtidos pela técnica de *solvent casting*, onde o polímero foi dissolvido em água, formando um hidrogél, por agitação mecânica e calor (até 80 °C). Os filmes foram desenvolvidos utilizando os polímeros formadores de filme carboximetilcelulose sódica

(CMC-Na) e poliálcool vinílico (PVA). Além dos polímeros fundidos, foram somados os excipientes farmacotécnicos, como a solução de parabenos e o propilenoglicol, conservante e plastificante, respectivamente. Esta composição foi feita em diferentes concentrações a fim de avaliar as diferentes propriedades físico-químicas (EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019).

Os conservantes foram adicionados na formulação na forma de uma solução de parabenos preparada de acordo com o formulário da farmacoepia Brasileira (ANVISA, 2012).

O suporte para as formulações foram placas de Petri descartáveis (90 mm de diâmetro) que foram usadas para a secagem da mistura dos componentes. Estes foram secos em estufa de circulação de ar à 50 °C por tempo de 36 a 48 horas, ou até que o peso da formulação fosse mantido estável. Na Tabela 4 estão descritas as formulações candidatas ao filme aquoso.

Tabela 4. Formulações candidatas do filme oral polimérico aquoso.

Formulações/ Componentes	CMC-Na	PVA	Propilenoglicol	Metilparabeno/ Propilparabeno
F1			5	
F2		0,2	15	
F3			25	
F4			5	
F5	4,0	0,4	15	0,18 / 0,02
F6			25	
F7			5	
F8		0,6	15	
F9			25	
Função:	Polímeros (%)	Plastificante (%)	Conservante (%)	

CMC-Na - Carboximetilcelulose sódica; PVA – Poli álcool vinílico.

Posteriormente ao desenvolvimento das formulações candidatas foi realizado o controle de qualidade e, então, escolheu-se a formulação eleita que obteve o melhor desempenho.

3.7.1 Preparo da formulação eleita

A partir das formulações candidatas desenvolvidas e seus resultados de controle de qualidade, nos quais incluem análise subjetiva aparente e análises físico-químicas, foi escolhida

a formulação eleita com as melhores características para prosseguir o desenvolvimento e, então, ser incorporado o extrato. A concentração do extrato foi definida a partir dos resultados do estudo *in vitro* de atividade antimicrobiana. A inserção do extrato na formulação deu-se por agitação na formulação líquida final e em temperatura ambiente. Juntamente com a formulação contendo o princípio ativo (extrato de *P. guajava*) foi feita a formulação controle (sem extrato) que, após a secagem, passou novamente pelos testes de controle de qualidade.

3.8 Análise Subjetiva Aparente

Os filmes foram avaliados através de análises subjetivas baseadas nos critérios de umidade aparente, transparência, homogeneidade, maleabilidade e aderência ao molde. A avaliação seguiu um score de 1 a 3, atribuindo valores às características analisadas, onde 1 está mais próximo do ideal (EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019; HAJU et al., 2021).

3.9 Propriedades Físico-Química dos Filmes

3.9.1 Uniformidade de peso

Para a uniformidade de peso 10, pedaços de filmes de 1 cm² foram cortados de diferentes locais de uma mesma formulação. Em seguida, calculou-se a média e desvio padrão da massa de cada pedaço, que foram pesados em balança analítica digital. Metodologia adaptada de Samal et al. (2017).

Na análise estatística dos ensaios físico-químicos, os resultados, que se aplicaram, foram submetidos a análise estatística para comparação de seus valores de acordo com o item 3.6.4.

3.9.2 Potencial de hidrogênio

O valor do potencial de hidrogênio (pH) foi determinado dissolvendo uma amostra (pedaço de 1 cm²) do filme em 10 mL de água destilada e aferindo por meio de medidor de potencial hidrogeniônico. É necessário que os filmes orais tenham valor de pH próximo ao pH bucal (5,5 a 7) para não irritar a mucosa oral ou ser tóxico (EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019).

3.9.3 Grau de inchamento

O grau de inchamento (GI) dos filmes foi conduzido em fluido salivar simulado no pH 6,6 (CID, 2009). Amostras de filme (1 cm²) foram pesadas e submersa em 15 mL de saliva artificial disposta em um bécher. Em intervalos de tempo definidos, foi aferido o peso removendo o excesso de umidade cuidadosamente ao tocá-lo com um papel toalha. O aumento no peso do filme foi determinado em cada intervalo de tempo até que um peso constante fosse observado. Este foi utilizado para calcular o grau de inchamento.

O GI foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$GI \% = (Pf - Pi) / Pi \times 100$$

GI é a porcentagem de inchamento, Pf é o peso do filme inchado e Pi é o peso inicial do filme, antes da adição da saliva artificial. A metodologia foi adaptada de Samal et al. (2017).

3.9.4 Tempo de desintegração

Para avaliar o tempo de desintegração (TD), amostras dos filmes (2 cm²) foram levadas a desintegração colocando-as em 25 mL de saliva artificial, já mencionado no item 3.9.3, em erlenmeyer à 100 rpm e temperatura de 39 °C. Utilizando um cronômetro para a aferição, o tempo em que a forma farmacêutica começa a quebrar ou se desintegrar é anotado como sendo o tempo de desintegração. A metodologia foi adaptada de Sharma et al. (2018).

3.9.5 Espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier

A espectroscopia no infravermelho com transformada Fourier (FTIR) é considerada uma das técnicas experimentais mais importantes para a caracterização de polímeros, em termos de identificação estruturais e grupos funcionais da formulação. Estudos espectrais de FTIR foram realizados para o extrato puro, polímeros e filmes, para verificar a compatibilidade, utilizando equipamento espectrômetro de infravermelho FTIR. O espectro foi registrado na faixa de 4000 a 500 cm⁻¹. A interação entre os componentes, se houve, foi indicada pela produção de picos adicionais ou ausência de pico característico correspondente ao extrato e ao transportador (SAMAL, 2017).

3.10 Teste de Esterilidade

Para confirmar a esterilidade dos filmes produzidos, uma amostra do filme, na forma de disco de 0,38 cm², foi colocada em 1 mL caldo BHI, que por ser um meio não seletivo apresentaria turvação caso houvesse qualquer crescimento microbiano. Após 24 horas uma alçada desse caldo foi, então, semeada em uma placa com o mesmo ágar por 24 horas e, para confirmar esterilidade, não deve apresentar crescimento de colônias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Depósito da Espécie Vegetal e Rendimento do Extrato

A espécie vegetal foi obtida no campo experimental da UFRRJ e depositada no Jardim Botânico da própria universidade, sendo seu código de depósito RBRv00000047.

A partir de 100 g de folhas de goiabeira, obteve-se um rendimento de 1,20 g de extrato aquoso através do método de decocção seguido de liofilização (Figura 8), sendo então um rendimento de 1,2 % da extração.



Figura 8. Aspecto do extrato liofilizado da folha da goiabeira.

4.2 Análise Qualitativa do Extrato

4.2.1 Cromatografia em camada delgada

Na análise da CCD foi possível identificar dois componentes majoritários qualitativamente, revelados fisicamente nas lâmpadas 254 e 365 nm. E, ao revelar com NP-PEG específico para flavonóides (WAGNER e BLADT, 1996), demonstrou reação positiva. Corroborando, dessa forma, com os resultados de fenólicos totais descritos por Raj et al. (2020), Araújo et al. (2014), Iha et al. (2008) e Sanches et al. (2005). As substâncias reveladas obtiveram fatores de retenção únicos de 0,59 e 0,74. As Figuras 9 demonstra de maneira clara a cromatoplaça revelada e as Figuras de 10 a 13 parte do processo da cromatografia em camada delgada.



Figura 9. Cromatoplaça de CCD revelada.

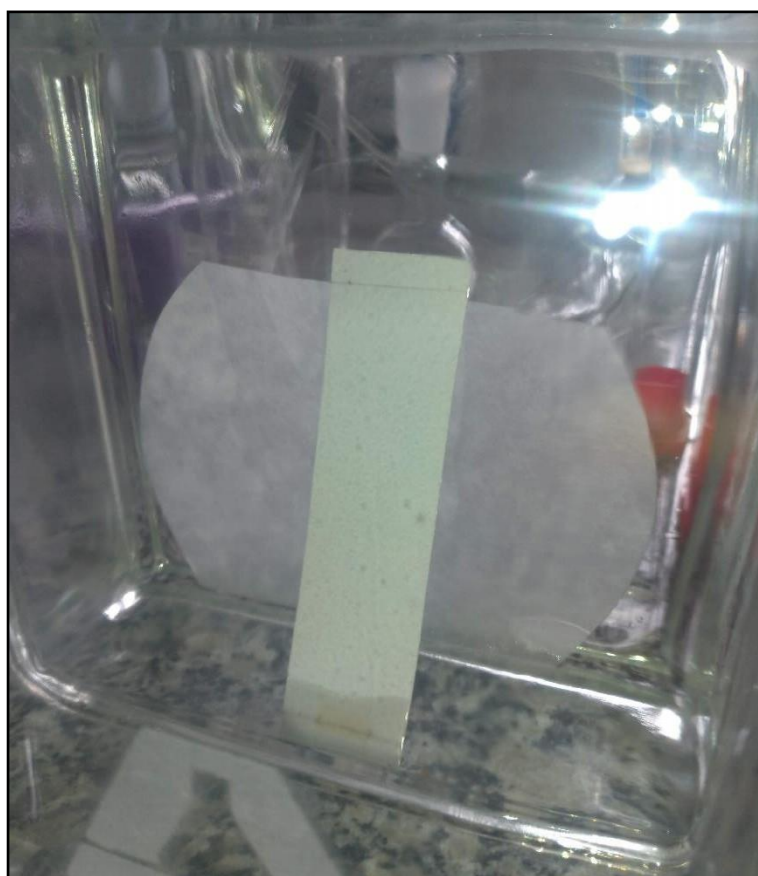


Figura 10. Eluição da fase móvel na cromatoplaça.



Figura 11. Eluição da fase móvel na cromatoplaca.

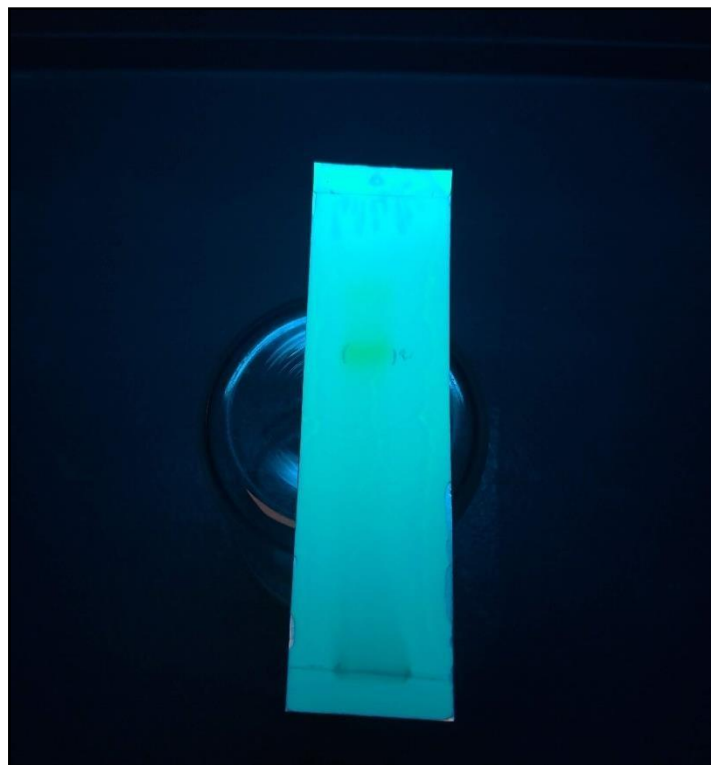


Figura 12. Leitura da cromatoplaca.



Figura 13. Leitura da cromatoplaca.

4.3 Análise Quantitativa do Extrato

4.3.1 Atividade antioxidante

O ensaio DPPH mede a capacidade do extrato capturar seu radical, resultando no clareamento da solução de DPPH. A figura 14 e 15 representam as curvas de calibração de DPPH (equação da curva de calibração $y = 0,1415x - 0,005$; $r = 0,9988$) e da amostra extrato aquoso (equação da curva de calibração $y = -0,044x + 0,7214$; $r = 0,9921$), respectivamente. Em consequente, foi possível calcular a atividade antioxidante total e o EC_{50} .

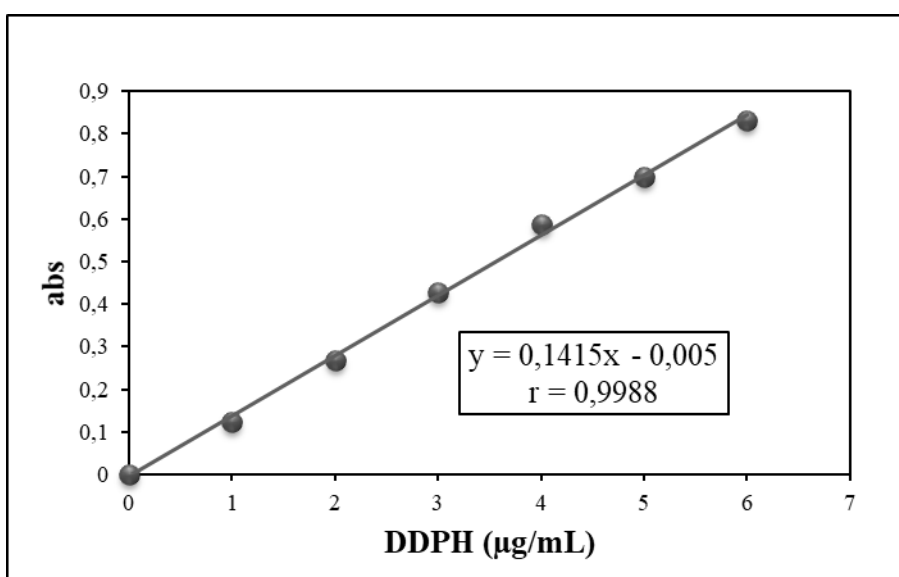


Figura 14. Curva de calibração de DPPH.

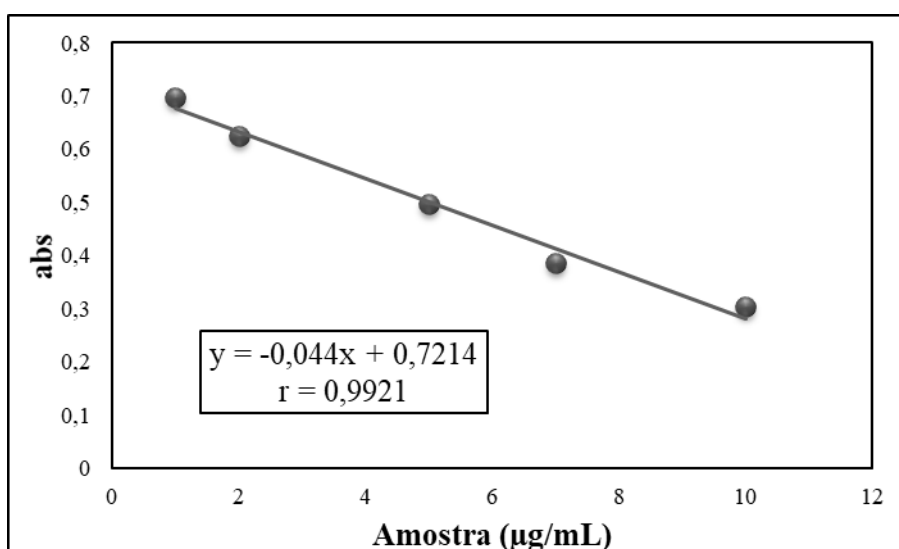


Figura 15. Curva de calibração da amostra.

O extrato aquoso das folhas de goiabeira apresentou uma excelente capacidade antioxidante com valor de $EC_{50} = 140 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, corroborando com os resultados descritos por Iha et al. (2008) ($EC_{50} = 150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), Qian e Nihorimbere (2004) (EC_{50} de 130 mg/g DPPH) e Camarrena-Tello et al. (2018) ($EC_{50} = 269,78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Como descrito na literatura, a geração excessiva de radicais livres pode ser estimulada por bactérias associadas à doença periodontal e este desequilíbrio pode levar aos danos teciduais. Para a proteção oxidativa, pode ser empregado a ingestão de micronutrientes antioxidantes em geral, como por exemplo a vitamina C, inibindo assim a progressão da DP (RAVI; DIVYASHREE, 2014). A espécie em estudo, *P. guajava* L., exibiu boa capacidade antioxidante *in vitro* e pode, portanto, ser uma fonte potencial de antioxidantes naturais para o tratamento e profilaxia da DP.

4.3.2 Fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais foi avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu (FC) utilizando uma curva de calibração de ácido gálico (equação da curva de calibração $y = 0,1401x + 0,0047$; $r = 0,9971$), demonstrada na figura 16.

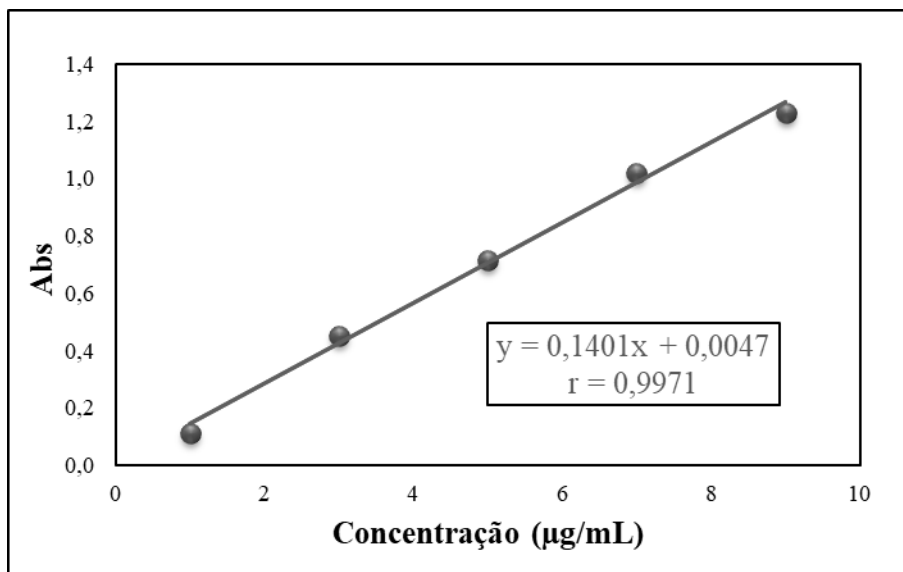


Figura 16. Curva de calibração de Ácido Gálico.

Sendo assim, obtivemos resultado de $17,02 \text{ mg} \pm 6,87$ equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato seco.

O ensaio de Araújo et al. (2014) encontrou $5,07 \text{ µg}$ por equivalente de pirogalol por g de extrato, análise feita através do extrato aquoso das folhas de *P. guajava*. Já o ensaio de Nantitanon et al. (2010), encontrou resultados de $80,28 \text{ mg} \pm 1,58$ a $136,02 \text{ mg} \pm 5,55$ EAG por g de extrato em diferentes tipos de preparo, em um estudo que investigou a influência de fatores sobre o rendimento, atividade antioxidante e fenólicos totais do extrato da folha de goiabeira. O resultado do presente estudo foi superior e inferior respectivamente a estes descritos na literatura.

A metodologia do presente estudo para ensaio de fenólicos totais foi baseada em de Menezes et al., 2020, que encontraram para o extrato aquoso de salsa $15,05 \text{ mg} \pm 2,20$ de fenólicos totais, equivalente a quercetina.

Utilizada na metodologia do presente estudo, o estudo de De Menezes Epifanio et al. (2020), o mesmo ensaio de fenólicos totais para o extrato aquoso de salsa encontrou resultado de $15,05 \text{ mg} \pm 2,20$ equivalente de quercetina, de fenólicos totais.

A espécie em questão, *P. guajava* L., exibiu quantidade excelente de fenólicos totais e pode, portanto, ser uma fonte potencial de antioxidantes naturais para o tratamento e profilaxia da DP.

4.4 Avaliação Antimicrobiana do Extrato

4.4.1 Teste de difusão em disco

Nos ensaios de difusão em disco foram encontrados resultados de halos de inibição, em milímetros, frente a interação das cepas bacterianas citadas e as diluições do extrato aquoso da goiabeira, demonstrados nas Figuras 17 a 23 e Tabelas de 5 a 9. Nestas, são exibidos os valores de halos, média, dp e DPR, além da análise estatística demonstrando a significância dos resultados.

Os ensaios foram realizados em triplicata e o volume de impregnação foi de 6 µL , utilizando água e metanol a 10 % como branco.

Tabela 5. Resultados dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média \pm dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa *Staphylococcus aureus* (resistente) (n=3).

Concentração (mg/cm ²)	1,2	2,4	3,6	4,8	6,0
Placa 1 (halo)	16	18	18	20	22
Placa 2 (halo)	14	14	16	16	16
Placa 3 (halo)	12	14	16	16	16
Média \pm dp	14,0 \pm 2,00 ^a	15,3 \pm 2,31 ^a	16,7 \pm 1,15 ^a	17,3 \pm 2,31 ^a	18,0 \pm 3,46 ^a
DPR (%)	14,29	15,06	6,93	13,32	19,25

*Letras iguais não diferem significativamente entre as concentrações - $p > 0,05$;

**Letras diferentes diferem significativamente entre as concentrações - $p < 0,05$.



Figura 17. Teste de difusão em disco *Staphylococcus aureus* (resistente).

Tabela 6. Resultados dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média \pm dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa *Staphylococcus aureus* (sensível) (n=3).

Concentração (mg/cm ²)	1,2	2,4	3,6	4,8	6,0
Placa 1 (halo)	10	12	14	14	16
Placa 2 (halo)	10	12	14	16	16
Placa 3 (halo)	8	10	14	14	16
Média \pm dp	9,3 \pm 1,15 ^a	11,3 \pm 1,15 ^a	14,0 \pm 0,00 ^b	14,7 \pm 1,15 ^b	16,0 \pm 0,00 ^b
DPR (%)	12,37	10,19	0,00	7,87	0,00

*Letras iguais não diferem significativamente entre as concentrações - $p > 0,05$;

**Letras diferentes diferem significativamente entre as concentrações - $p < 0,05$.



Figura 18. Teste de difusão em disco *Staphylococcus aureus* (sensível).

Tabela 7. Resultados dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média \pm dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa *Staphylococcus pseudintermedius* (resistente) (n=3).

Concentração (mg/cm ²)	1,2	2,4	3,6	4,8	6,0
Placa 1 (halo)	10	16	16	16	16
Placa 2 (halo)	10	16	18	18	18
Placa 3 (halo)	10	14	16	16	18
Média \pm dp	13,3 \pm 1,15 ^a	15,3 \pm 1,15 ^b	15,3 \pm 1,15 ^b	16,0 \pm 0,00 ^b	18,0 \pm 0,00 ^b
DPR (%)	0,00	7,53	6,93	6,93	6,66

*Letras iguais não diferem significativamente entre as concentrações - $p > 0,05$;

**Letras diferentes diferem significativamente entre as concentrações - $p < 0,05$.



Figura 19. Teste de difusão em disco *Staphylococcus pseudintermedius* (resistente).

Tabela 8. Resultados dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média \pm dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa *Staphylococcus pseudintermedius* (sensível) (n=3).

Concentração (mg/cm ²)	1,2	2,4	3,6	4,8	6,0
Placa 1 (halo)	12	16	16	16	18
Placa 2 (halo)	14	14	14	16	18
Placa 3 (halo)	14	16	16	16	18
Média \pm dp	13,3 \pm 1,15 ^a	15,3 \pm 1,15 ^b	15,3 \pm 1,15 ^b	16 \pm 0 ^b	18 \pm 0 ^c
DPR (%)	0,00	7,53	6,93	6,93	6,66

*Letras iguais não diferem significativamente entre as concentrações - $p > 0,05$;

**Letras diferentes diferem significativamente entre as concentrações - $p < 0,05$.



Figura 20. Teste de difusão em disco *Staphylococcus pseudintermedius* (sensível).

Tabela 9. Resultados dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em disco (média \pm dp e significância) frente diferentes concentrações do extrato das folhas da goiabeira e a cepa *Streptococcus beta-hemolítico* (resistente) (n=3).

Concentração (mg/cm ²)	1,2	2,4	3,6	4,8	6,0
Placa 1 (halo)	14	20	14	16	21
Placa 2 (halo)	16	17	22	22	23
Placa 3 (halo)	14	19	18	20	19
Média \pm dp	14,7 \pm 1,15 ^a	18,7 \pm 1,53 ^a	18,0 \pm 4,0 ^a	19,3 \pm 3,06 ^a	21,0 \pm 2,0 ^a
DPR (%)	7,87	8,18	22,22	15,80	9,52

*Letras iguais não diferem significativamente entre as concentrações - $p > 0,05$;

**Letras diferentes diferem significativamente entre as concentrações - $p < 0,05$.

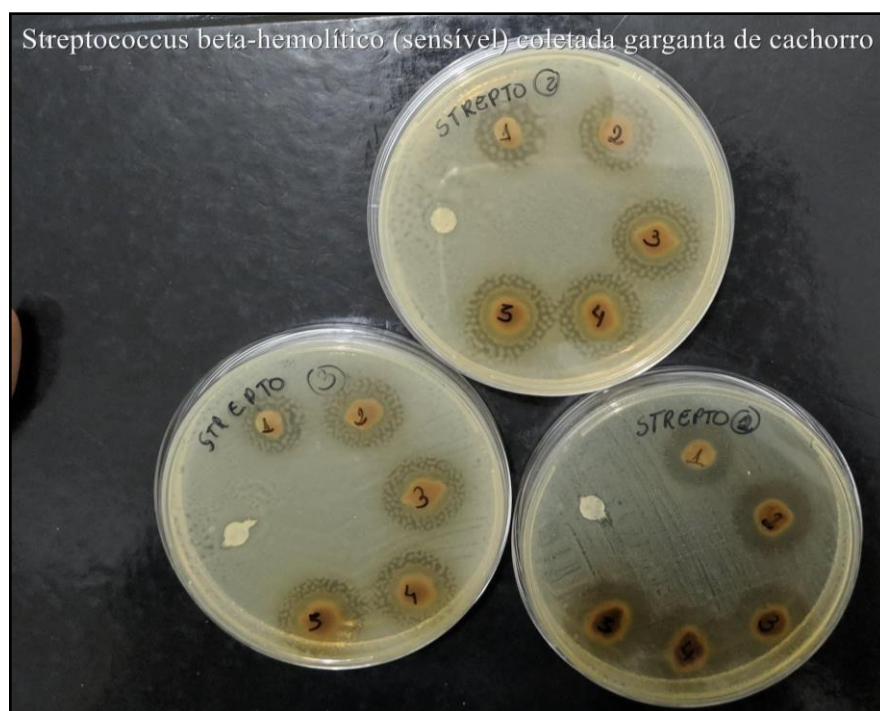


Figura 21. Teste de difusão em disco *Streptococcus beta-hemolítico* (sensível).

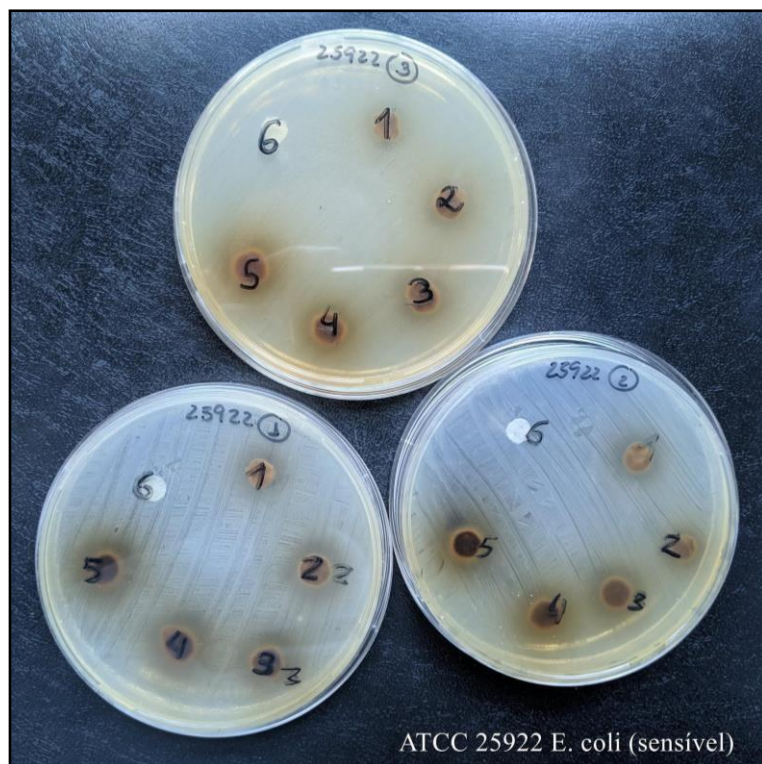


Figura 22. Teste de difusão em disco *Escherichia coli* (sensível).

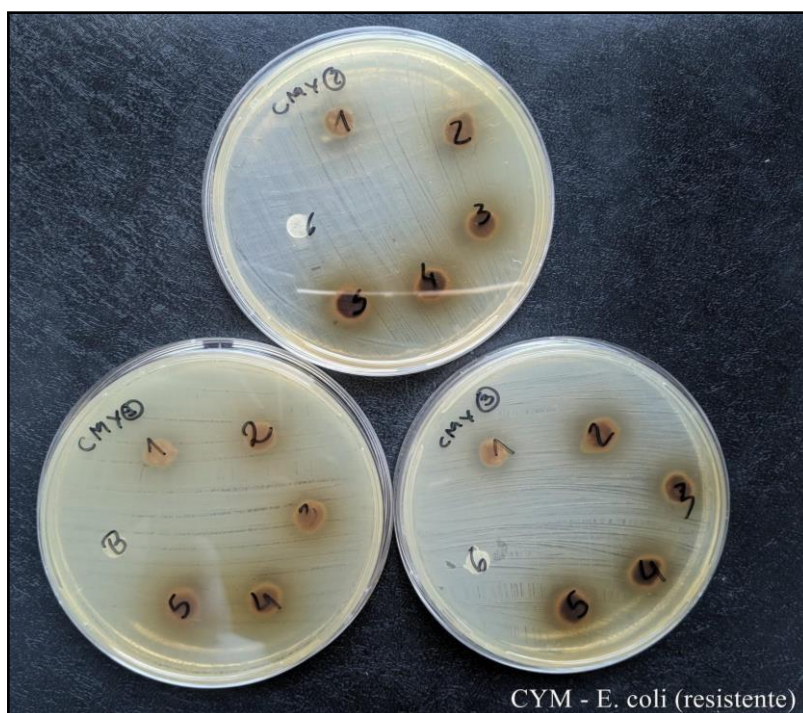


Figura 23. Teste de difusão em disco *Escherichia coli* (resistente).

O resultado do experimento foi satisfatório, onde foram encontrados halos de inibição nas bactérias gram-positivas testadas; entretanto nas gram-negativas não houve inibição (Figura 22 e 23). Este resultado já foi relatado na literatura, onde bactérias gram-negativas são geralmente mais resistentes aos antimicrobianos de origem vegetal em comparação com as gram-positivas, que são mais sensíveis. Questão esta que se atribui ao fato de as bactérias gram-

negativas apresentarem uma membrana externa adicional que pode protegê-las dos compostos antimicrobianos (SEHGAL; KHANNA; YADAV, 2021; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Foi, então, exposto os resultados dos halos de inibição (mm) para as cepas testadas, em conjunto com as médias, desvio padrão e análise estatística, sendo que para a cepa *Escherichia coli*, sensível e resistente, não houve inibição e conseqüentemente a formação de halo (Figura 15 e 16), o que corrobora com os resultados encontrados por Araújo et al. (2014), nos quais não foram encontrados resultados de halos de inibição.

O resultado dos halos de máxima inibição são demonstrados para *S. aureus* resistente como $18 \text{ mm} \pm 3,46$, para *S. aureus* sensível, $16 \text{ mm} \pm 0$, para *S. pseudintermedius* resistente $17,3 \text{ mm} \pm 1,15$, para *S. pseudintermedius* sensível $18 \text{ mm} \pm 0$ e para *Streptococcus* beta-hemolítico sensível $21 \text{ mm} \pm 2,00$.

No estudo de Raj et al. (2020), os halos de máxima inibição para *S. aureus* deu-se a $10 \text{ mm} \pm 0,71$, porém, somente na concentração de extrato aquoso a 50 mg.mL^{-1} . No presente trabalho, a máxima concentração utilizada, 6000 mg/cm^2 , que correspondendo a $11,40 \text{ mg.mL}^{-1}$, concentração inferior ao estudo da literatura e, mesmo assim, o halo máximo de inibição foi superior.

Os resultados corroboram para a pesquisa de Araújo et al. (2014), onde *S. aureus* resistente e sensível apresentaram halos máximos de inibição de $14,67 \text{ mm} \pm 0,58$ e $17,67 \text{ mm} \pm 0,58$, respectivamente. Entretanto, a concentração do extrato aquoso utilizada para este experimento foi de $62,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a do presente estudo de $11,40 \text{ mg.mL}^{-1}$, sendo assim, foi encontrado resultado de halo máximo de inibição superior em menor concentração testada. Pode-se sugerir que a menor atividade antimicrobiana demonstrada pelo autor pode estar relacionada com os resultados, também inferiores, de fenólicos totais, uma vez que os compostos fenólicos desempenharão atividade antibacteriana.

Para analisar os resultados, foi feita análise estatística dos resultados de halos de inibição em diferentes concentrações e cepas, demonstrando sua significância nas Tabelas de 5 a 9.

Houve diferença estatística entre as concentrações analisadas, sendo que, unicamente, para *S. pseudintermedius* sensível os halos de inibição foram diferentes estatisticamente na maior concentração, 6 mg/cm^2 . Para *S. aureus* sensível, a concentração de $3,6 \text{ mg/cm}^2$ e para *S. pseudintermedius* resistente, a concentração de $2,4 \text{ mg/cm}^2$ foram, respectivamente, as concentrações onde houveram diferença estatística. Além disso, para *Streptococcus* e *S. aureus* resistente, obteve-se diferença estatística na concentração de $1,2 \text{ mg/cm}^2$.

Devido a isso, nesta análise preliminar de inibição bacteriana através da difusão em disco, as concentrações de $3,6 \text{ mg/cm}^2$ e 6 mg/cm^2 foram selecionadas para serem utilizadas nos ensaios de microdiluição em caldo. As concentrações foram convertidas para a unidade de mg/mL devido ao teste ser em meio líquido.

4.4.2 Teste de microdiluição em caldo

Nos ensaios de microdiluição em caldo, onde é demonstrada a placa de microdiluição na Figura 24, foram encontrados os resultados de turbidez frente a interação das cepas com as diluições do extrato aquoso das folhas de goiabeira, demonstrados nas Tabela 10 e 11. A turbidez do teste foi medida por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 655 nm , em relação ao branco (RAKMAI et al. 2018).

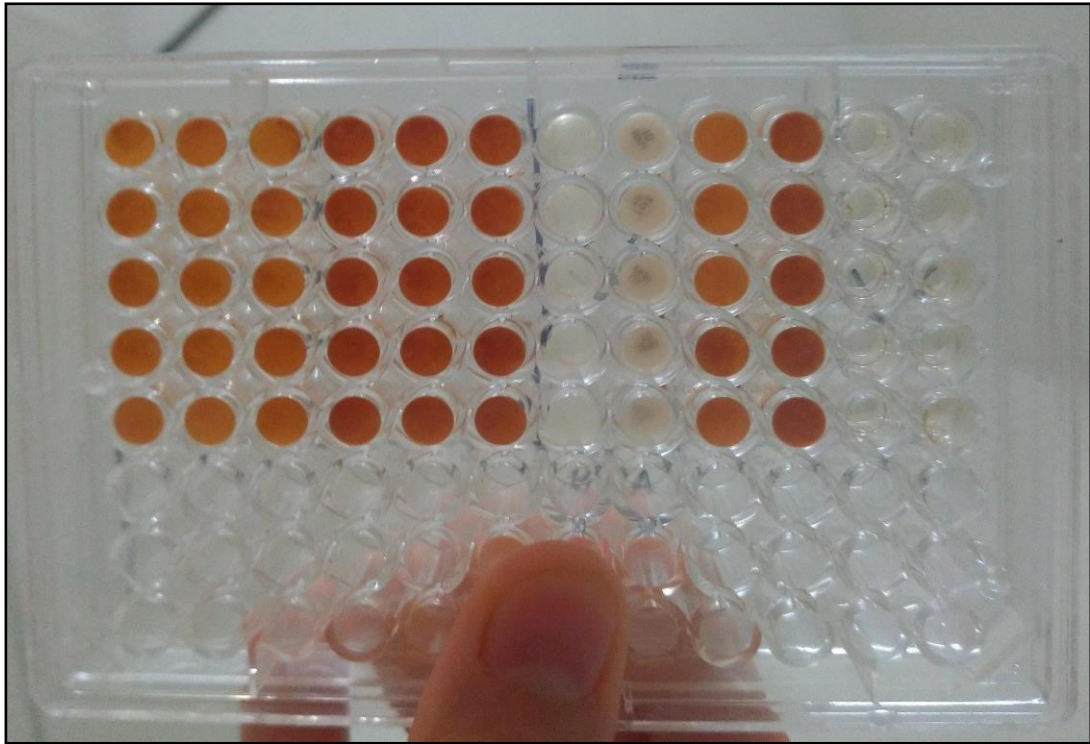


Figura 24. Demonstração do ensaio de microdiluição em caldo (microplaca de 96 poços).

Tabela 10. Resultados de turbidez da microdiluição em caldo utilizando extrato das folhas da goiabeira a $8,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ frente às cepas bacterianas (n=3).

Cepas	$8,8 \text{ mg.mL}^{-1}$			Média	dp	DPR	Branco
<i>S. aureus</i> (resistente)	1,759	1,334	1,428	1,507	0,22	14,8	1,628
<i>S. aureus</i> (sensível)	1,518	1,450	1,880	1,616	0,23	14,3	2,013
<i>S. pseudintermedius</i> (resistente)	1,693	1,667	1,630	1,663	0,03	1,9	1,892
<i>S. pseudintermedius</i> (sensível)	2,086	1,962	2,227	2,092	0,13	6,3	2,170
<i>Streptococcus</i> beta-hemolítico	1,946	1,676	1,736	1,786	0,14	7,9	1,950

dp= desvio padrão, DPR= desvio padrão relativo.

Tabela 11. Resultados de turbidez da microdiluição em caldo utilizando extrato das folhas da goiabeira a 11,4 mg.mL⁻¹ frente às cepas bacterianas (n=3).

Cepas	11,4 mg.mL ⁻¹			Média	dp	DPR	Branco
<i>S. aureus</i> (resistente)	1,946	1,753	1,784	1,828	0,10	5,7	2,130
<i>S. aureus</i> (sensível)	1,925	2,030	2,329	2,095	0,21	10,0	2,186
<i>S. pseudintermedius</i> (resistente)	2,396	2,145	2,271	2,271	0,13	5,5	2,317
<i>S. pseudintermedius</i> (sensível)	2,406	2,373	3,058	2,612	0,39	14,8	2,304
<i>Streptococcus</i> beta-hemolítico	2,181	2,129	2,194	2,168	0,03	1,6	2,310

dp= desvio padrão, DPR= desvio padrão relativo.

Na Tabela 12 e na Figura 25 estão demonstrados os resultados de turbidez do teste na microdiluição em caldo, comparando turbidez das amostras e o branco para todas as cepas em cada concentração. E, para uma segunda análise entre as cepas, foi feita análise estatística comparando somente os resultados de turbidez das amostras entre si em cada concentração.

Tabela 12. Análises estatísticas dos resultados de turbidez (Média ± dp) da microdiluição em caldo utilizando extrato da goiabeira em concentrações de 8,8 mg.mL⁻¹ e 11,4 mg.mL⁻¹ (n=3).

Cepas	8,8 mg/mL ⁻¹	Branco	<i>P</i> -valor	11,4 mg/mL ⁻¹	Branco	<i>P</i> -valor
<i>S. aureus</i> (resistente)	1,507 ± 0,22	1,628	0,447	1,827 ± 0,104	2,130	0,037
<i>S. aureus</i> (sensível)	1,616 ± 0,23	2,013	0,097	2,094 ± 0,210	2,186	0,529
<i>S. pseudintermedius</i> (resistente)	1,663 ± 0,032	1,892	0,006	2,270 ± 0,126	2,317	0,588
<i>S. pseudintermedius</i> (sensível)	2,091 ± 0,133	2,170	0,414	2,612 ± 0,386	2,304	0,301
<i>Streptococcus</i> beta-hemolítico	1,786 ± 0,142	1,950	0,183	2,168 ± 0,034	2,310	0,019

dp= desvio padrão; significativo para $p < 0,05$; Teste estatístico: *One-way* Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey).

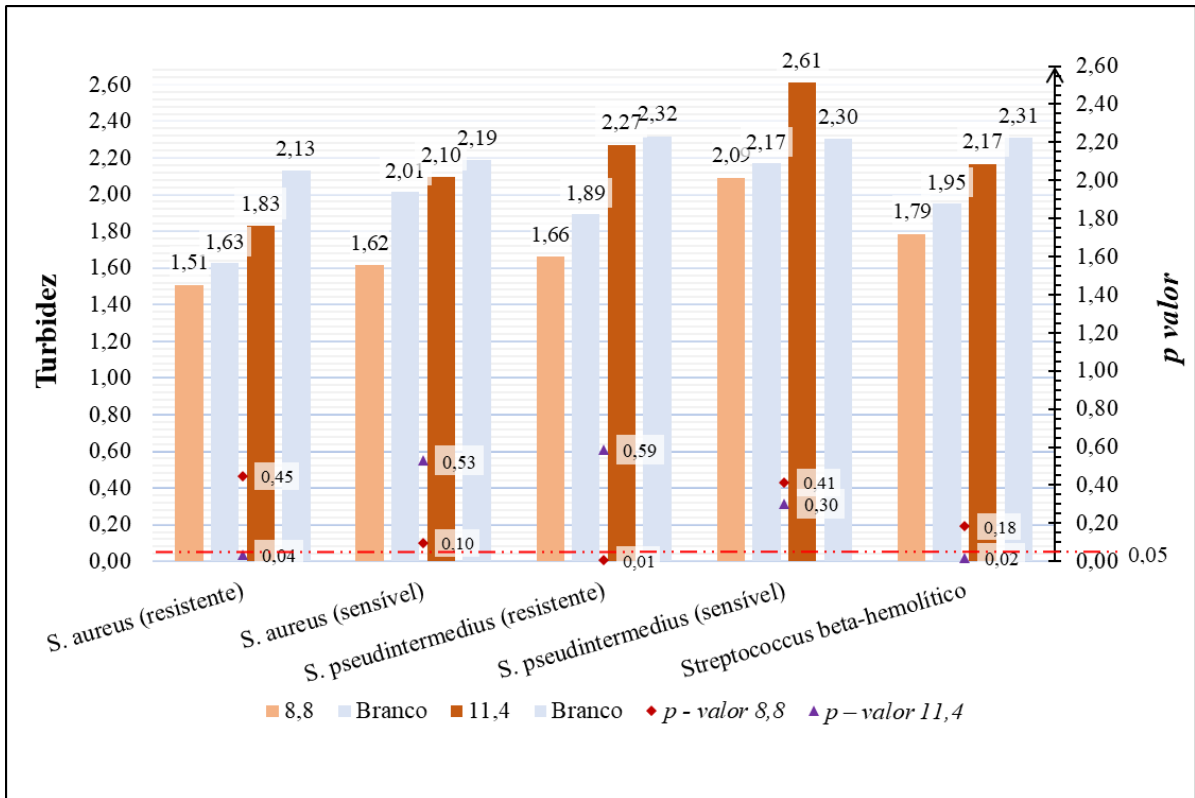


Figura 25. Resultado de turbidez (média) e valor de p , da microdiluição em caldo utilizando extrato das folhas da goiabeira, 8,8 e 11,4 mg.mL⁻¹, frente às cepas bacterianas. Significativo para $p < 0,05$.

As análises demonstraram que não há diferença significativa entre os valores de turbidez da amostra em relação ao branco ($p > 0,05$) e nem entre os resultados de turbidez entre si. Sendo assim, ocorreu a inibição do crescimento microbiano em todas as cepas. No caso do *S. pseudintermedius* (sensível), na concentração 8,8 mg.mL⁻¹, a amostra estava com menor turvação que o branco e, na concentração de 11,4 mg.mL⁻¹, observou-se turvação maior que o branco, portanto estima-se a ocorrência de contaminação na maior concentração. Nos casos onde há significância ($p < 0,05$), as médias de turbidez da amostra e branco são diferentes, porém significam, também, que não houve crescimento, afinal a turbidez da amostra é menor que a do branco.

Sendo assim, a CIM foi de 8,8 mg.mL⁻¹ para todas as cepas (Tabela 12). Estima-se que houve contaminação na amostra contendo *S. pseudintermedius* (sensível) e extrato a 11,4 mg.mL⁻¹, pois houve inibição na concentração menor, de 8,8 mg.mL⁻¹. Estes resultados corroboram com de Araújo et al. (2014), porém foram encontrados resultados de CIM menores, como 0,625 mg.mL⁻¹ para *S. aureus* (sensível e resistente).

A CBM para *S. pseudintermedius* (resistente) foi de 8,8 mg.mL⁻¹ e para as demais cepas foi maior que 11,4 mg.mL⁻¹, pois no método de semeadura, após o teste de microdiluição, houve crescimento microbiano nas placas, demonstrados na Figura 26. O resultado indicou que somente para *S. pseudintermedius* (resistente) (Figura 26-C) foi possível, através da interação extrato e microrganismo, inviabilizar o seu crescimento.

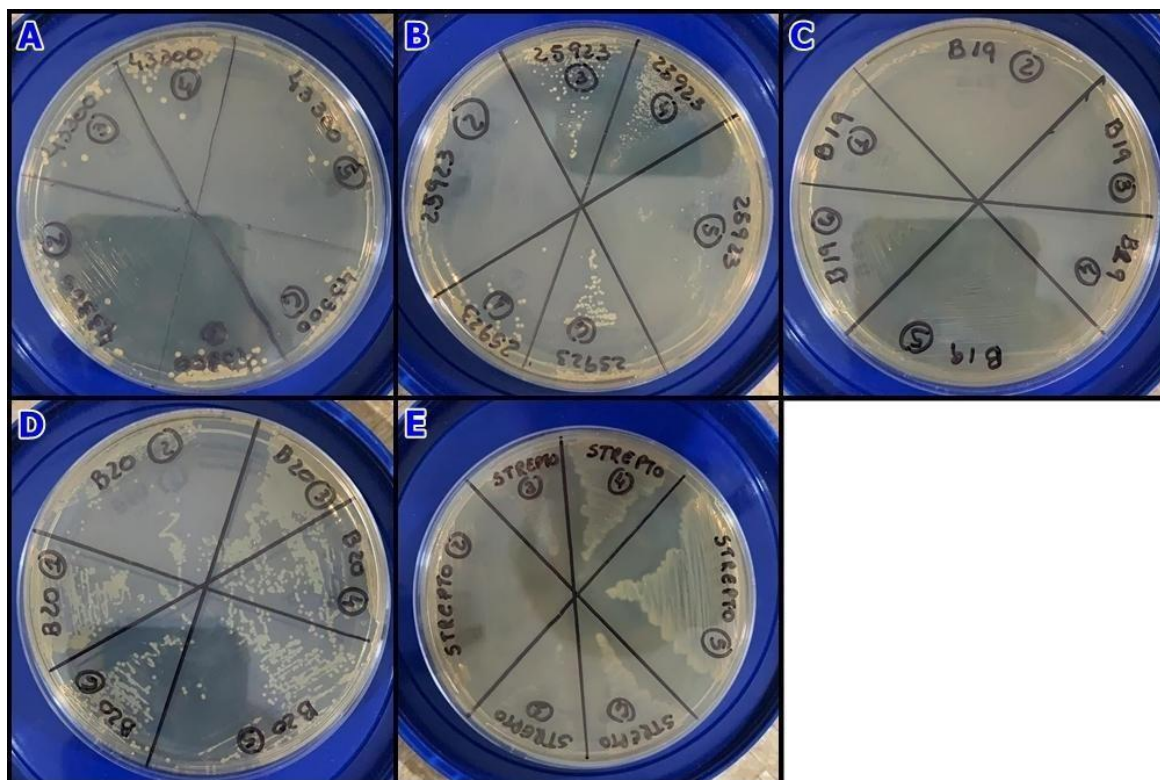


Figura 26. Resultado da CBM no teste de semeadura. (A) *S. aureus* (resistente); (B) *S. aureus* (sensível); (C) *S. pseudintermedius* (resistente); (D) *S. pseudintermedius* (sensível); (E) *Streptococcus* beta-hemolítico.

4.5 Desenvolvimento das Formulações Candidatas

4.5.1 Análise subjetiva aparente

Os filmes foram avaliados subjetivamente quanto aos aspectos físicos seguindo os critérios descritos na Tabela 13. A avaliação seguiu um score de 1 a 3 de acordo com as características analisadas, quanto mais próximo de 1, mais próximo ao ideal proposto.

Foram obtidos filmes que apresentaram aspecto liso, sendo a maioria transparente, homogênea, descolados facilmente do molde e resistentes ao rasgo. Aparentemente eram secos, com exceção de F3, F6 e F9, que após secagem apresentaram aspecto úmido.

A formulação F1, F4 e F7 apresentaram pouca opacidade. F1 e F9 apresentaram poucos grânulos transparentes em sua extensão.

As formulações F1, F4 e F9 foram pouco maleáveis; F2, F5 e F8 apresentaram forma maleável; e muito maleáveis responderam às formulações F3, F6 e F9. Ficaram mais aderidas ao molde as formulações F2, F3, F5, F6, F8 e F9.

Nas figuras de 27 a 30 é demonstrado o processo de obtenção do filme pelo método de *solvent casting* e o processo de secagem do filme desenvolvido, respectivamente. Na Figura 23 é exibido a formulação filme candidata F7.

A umidade excessiva pode ter sido proveniente da concentração do agente plastificante (Propilenoglicol) em excesso, pois ocorreu um acréscimo de 5 % deste agente em todas as formulações candidatas. A presença de grânulos se deu em formulações com concentrações diferentes de PVA (0,1 e 0,6 %). Portanto, o erro não seria justificável pela alta concentração do mesmo. Sendo assim, estima-se que o erro foi devido à falta de solubilização, apresentando,

então, poucos grânulos visíveis. A maleabilidade e a aderência foram diretamente proporcionais à concentração do agente plastificante o que é esperado.

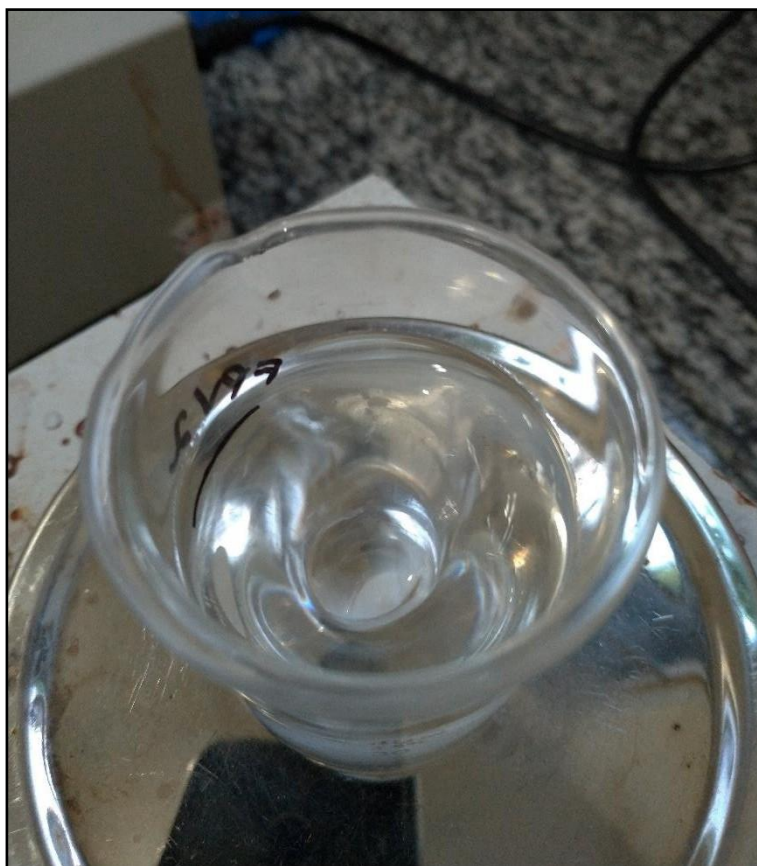


Figura 27. Formação do hidrogél por agitação mecânica.



Figura 28. Processo de secagem.



Figura 29. Processo de secagem.



Figura 30. Formulação filme candidata F7.

Tabela 13. Resultado da análise dos aspectos físicos das formulações candidatas.

Formulações/ Aspectos Físicos	Umidade	Transparência	Homogeneidade	Maleabilidade	Aderência
F1	1	2	2	2	1
F2	1	1	1	1	2
F3	2	1	1	3	2
F4	1	2	1	2	1
F5	1	1	1	1	2
F6	2	1	1	3	2
F7	1	2	1	2	1
F8	1	1	1	1	2
F9	2	1	2	3	2

Sendo assim, a escolha de uma formulação mais próxima do ideal no quesito aspecto se dá inicialmente pelas formulações F2, F5 e F8, seguindo as formulações F4 e F7.

4.5.2 Avaliação físico-química

4.6.2.1 Análise de pH, grau de inchamento e tempo de desintegração

Os resultados referentes às análises de pH, grau de inchamento (GI) e tempo de desintegração estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados de pH, grau de inchamento (GI) e tempo de desintegração (TD) das formulações candidatas.

Formulações/ Parâmetros	pH	GI (%)	TD (min)
F1	7,22	275,8	8
F2	7,59	96,7	6
F3	7,32	65,7	7
F4	7,20	477,4	10
F5	7,27	101,3	7
F6	7,38	87,2	6
F7	7,13	271,3	40
F8	7,30	195,2	28
F9	7,53	61,8	17

O pH em solução dos filmes candidatos desenvolvidos variou de 7,13 a 7,59, sendo, então, adequados para entrar em contato com a mucosa oral sem causar danos.

Com relação ao grau de inchamento, as formulações candidatas F1, F4 e F7 foram as que obtiveram maior valor, 275,8, 477,4 e 271,3 %, respectivamente. Sendo assim, sugere-se que estas formulações foram as que absorveram maior quantidade do meio líquido.

Para o tempo de desintegração, as formulações F7, F8 e F9 apresentaram os maiores tempos: 40, 28, 17 min, respectivamente.

O resultado obtido por Sharma et al. (2018), que desenvolveram filme de dissolução rápida, indicou o pH da formulação também na faixa de 6 a 7. Já o grau de inchamento, entre 18 e 26, foram bem inferiores ao do presente estudo. Para o tempo de desintegração encontrou-se 2219 minutos \pm 0,11.

Foram encontradas correlações entre os componentes e suas concentrações. Por exemplo os valores de pH e TD aumentam conforme o aumento da concentração de plastificante, enquanto os valores de GI diminuem conforme essa mesma adição de plastificante. Estes efeitos de variável independente precisam ser analisados por gráfico de cubo usados para mostrar as relações entre os fatores.

Após a avaliação destes parâmetros físico-químicos, a formulação F7 foi eleita devido adequação aos critérios avaliados para a incorporação do extrato aquoso das folhas de *P. guajava* L. devido a seu alto tempo de desintegração e seu grau de inchamento. O objetivo é obter uma formulação que libere lentamente o ativo e que se inche aderindo à mucosa.

4.6 Desenvolvimento da Formulação Eleita

A formulação eleita foi desenvolvida com e sem o extrato, seguindo a metodologia usada, para que as caracterizações e avaliações citadas fossem realizadas.

4.6.1 Análise subjetiva aparente

O filme contendo extrato, como demonstra na Figura 31, apresentou aspecto seco, pouco opaco, homogêneo, pouco maleável e não aderiu às placas de Petri durante o processo de secagem. Foi possível observar que a adição do extrato proporcionou maior rigidez aparente ao filme, em relação a formulação sem o extrato. O aspecto da formulação sem extrato seguiu como já descrito no desenvolvimento das candidatas. Nas Figuras de 32 e 33 são demonstradas as formulações em triplicata.

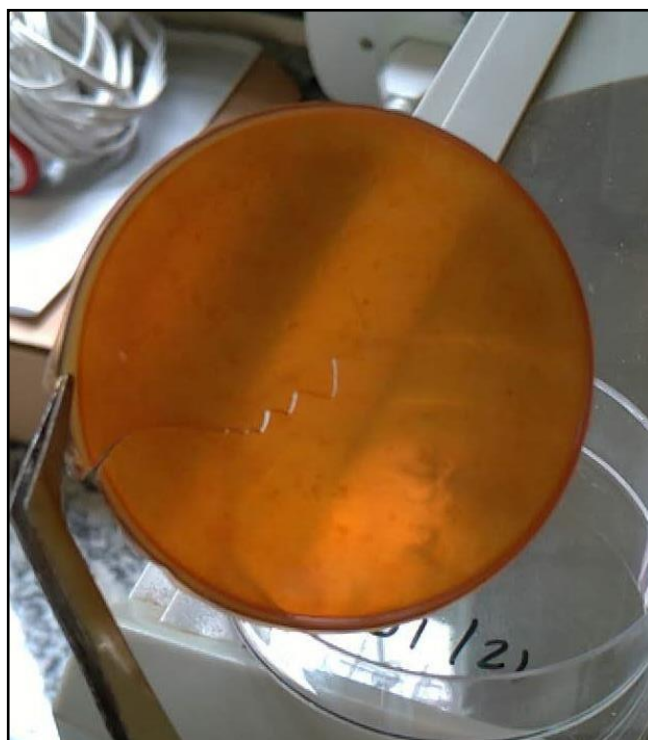


Figura 31. Formulação do filme eleito contendo o extrato.

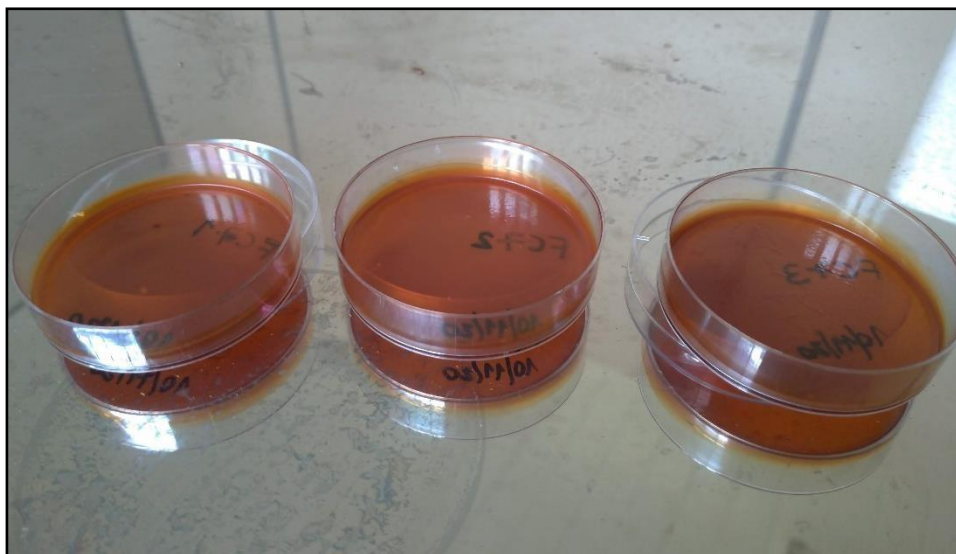


Figura 32. Formulação do filme eleito contendo o extrato.

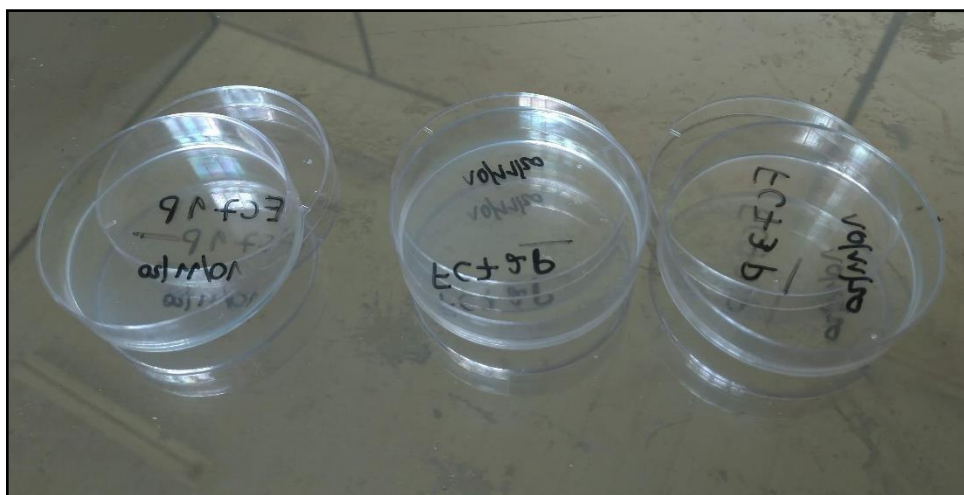


Figura 33. Formulação do filme eleito contendo o extrato.

4.6.2 Avaliação físico-química

4.6.2.1 Análise de uniformidade de peso

A análise de uniformidade de peso da formulação eleita foi realizada a partir de uma triplicata de filmes idênticos, do tipo com e sem extrato ($6,0 \text{ mg/cm}^2$). Para a análise foram cortados pedaços ($n = 10$) de 1 cm^2 (demonstrado na Figura 34), de 10 diferentes locais, dos filmes desenvolvidos. Os resultados obtidos nesta análise estão descritos na Tabela 15 e o procedimento é demonstrado na Figura 35.

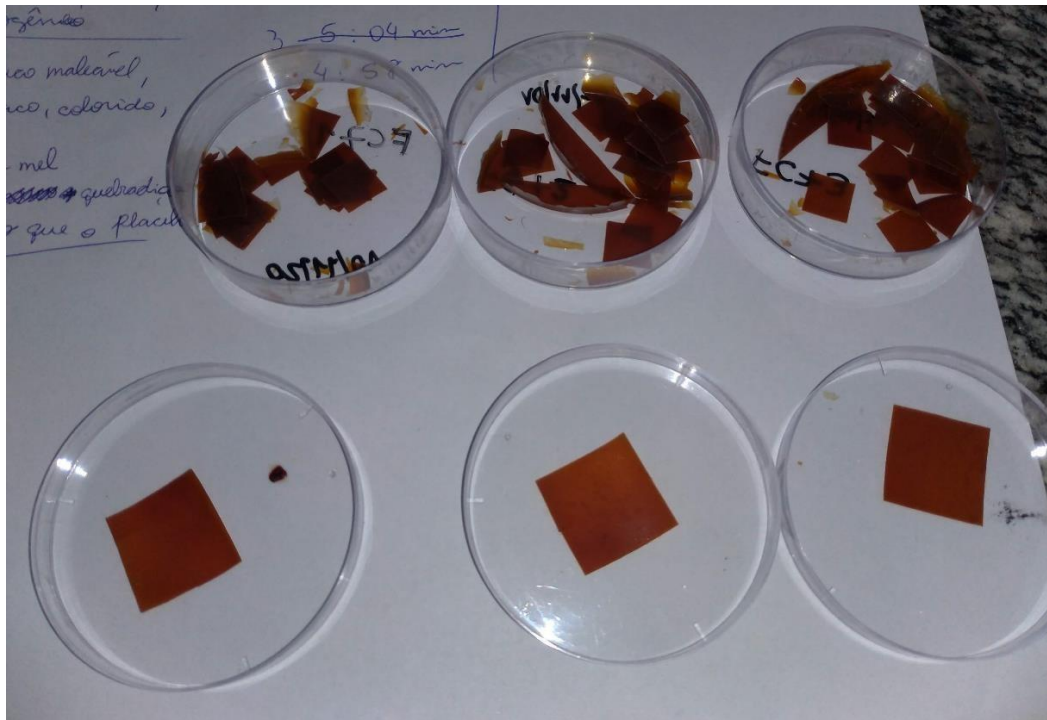


Figura 34. Método de pesagem na uniformidade de peso.



Figura 35. Método de pesagem na uniformidade de peso.

Tabela 15. Resultados e análise estatística da uniformidade de peso (mg) (Média ± dp) das formulações filmes eleitos no tipo extrato (E) e sem extrato (P) (n=10).

	E7(1)	E7(2)	E7(3)	P7(1)	P7(2)	P7(3)
1	33,7	25,0	41,9	23,1	23,1	24,8
2	44,1	37,6	24,7	32,8	26,5	34,7
3	30,3	44,7	34,3	22,1	27,2	15,2
4	35,7	26,2	32,7	38,4	26,8	17,5
5	24,8	30,0	39,2	25,4	37,0	25,4
6	29,6	20,9	30,0	38,6	36,1	19,2
7	40,5	28,8	28,8	13,5	23,8	20,4
8	26,9	27,9	32,4	14,1	26,8	25,9
9	29,8	30,1	23,8	29,1	23,3	20,8
10	28,2	41,0	23,2	24,0	23,1	20,7
Media ± dp	32,36 ± 6,14 ^a	31,22 ± 7,51 ^a	31,10 ± 6,32 ^a	26,11 ± 8,78 ^a	27,37 ± 5,12 ^a	22,46 ± 5,52 ^a
DPR (%)	18,98	24,06	20,33	33,63	18,71	24,55

dp: desvio padrão; DPR (%): desvio padrão relativo; Letras iguais não diferem significativamente entre si - $p > 0,05$; Letras diferentes diferem significativamente entre si - $p < 0,05$.

No resultado da uniformidade de peso das amostras das formulações eleitas, no tipo com e sem extrato, foi encontrada uma variação de peso de 31,10 mg ± 6,32 até 32,36 mg ± 6,14, nos filmes com extrato. Nos filmes sem extrato foi encontrada uma variação de peso de 22,46 mg ± 5,52 até 27,37 mg ± 5,12, já era esperado um menor peso. Observou-se uma homogeneidade de peso, uma vez que as médias não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si, apesar do DPR relativamente alto.

4.6.2.2 Análise de pH, grau de inchamento e tempo de desintegração

Os resultados referentes às análises de pH, grau de inchamento (GI) e tempo de desintegração (TD) estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados de pH e grau de inchamento (GI) (Média \pm dp) (n=3), e tempo de desintegração (TD) (n=1) das formulações filmes eleitos no tipo extrato (E) e sem extrato (P).

Formulação/Parâmetros	pH	GI (%)	TD (min)
E7(1)	6,35 \pm 0,07	327,0 \pm 62,8	4' 20''
E7(2)	6,45 \pm 0,18	362,5 \pm 40,1	4' 10''
E7(3)	6,44 \pm 0,13	369,8 \pm 28,0	4' 8''
P7(1)	7,46 \pm 0, 21	369,8 \pm 16,9	3' 48''
P7(2)	7,28 \pm 0,09	437,2 \pm 73,0	4' 2''
P7(3)	7,56 \pm 0,22	440,1 \pm 107,5	4' 50''

(* = minuto; ** = segundos)

O pH em solução das formulações sem extrato variou entre 7,28 e 7,56 e das formulações extrato entre 6,35 e 6,45, sendo então observado um decréscimo no pH nas formulações que contiveram o extrato (E71, E72 e E73). Sendo assim para as formulações eleitas nenhuma irritação a mucosa oral é esperada.

Os dados de GI demonstram uma relação com os ensaios das formulações candidatas, sendo os maiores GI em 369,8 % \pm 28,0 nas formulações com extrato, e 440,1 % \pm 107,5 nas formulações sem extrato. Nota-se que nas formulações contendo o extrato houve um ligeiro decréscimo no GI, sendo então atribuído à adição deste.

Sobre o TD, foi observado que houve uma precisão maior no ensaio e, devido a isso, valores mais reais de desintegração foram observados. O estudo de Sharma et al. (2018), utilizado neste trabalho desenvolveu filme de rápida dissolução, logo seu tempo de desintegração do filme que mais se assemelhava ao presente foi 22,19 segundos \pm 0,11.

Foi possível, então, o desenvolvimento de uma formulação de filme polimérico de dissolução bucal, classificação segundo Ekpa, Alozie e Uwah (2019).

4.6.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier

Foram selecionados para a análise de infravermelho os seguintes componentes: CMC, PVA, extrato bruto, filme sem extrato e filme com extrato. Foram realizadas as correlações entre as bandas principais observadas na faixa de 4000 - 500 cm^{-1} , descritas na Figura 25. Todas as análises foram realizadas com auxílio do *Spectra Database for Organic Compounds* (SDBS).

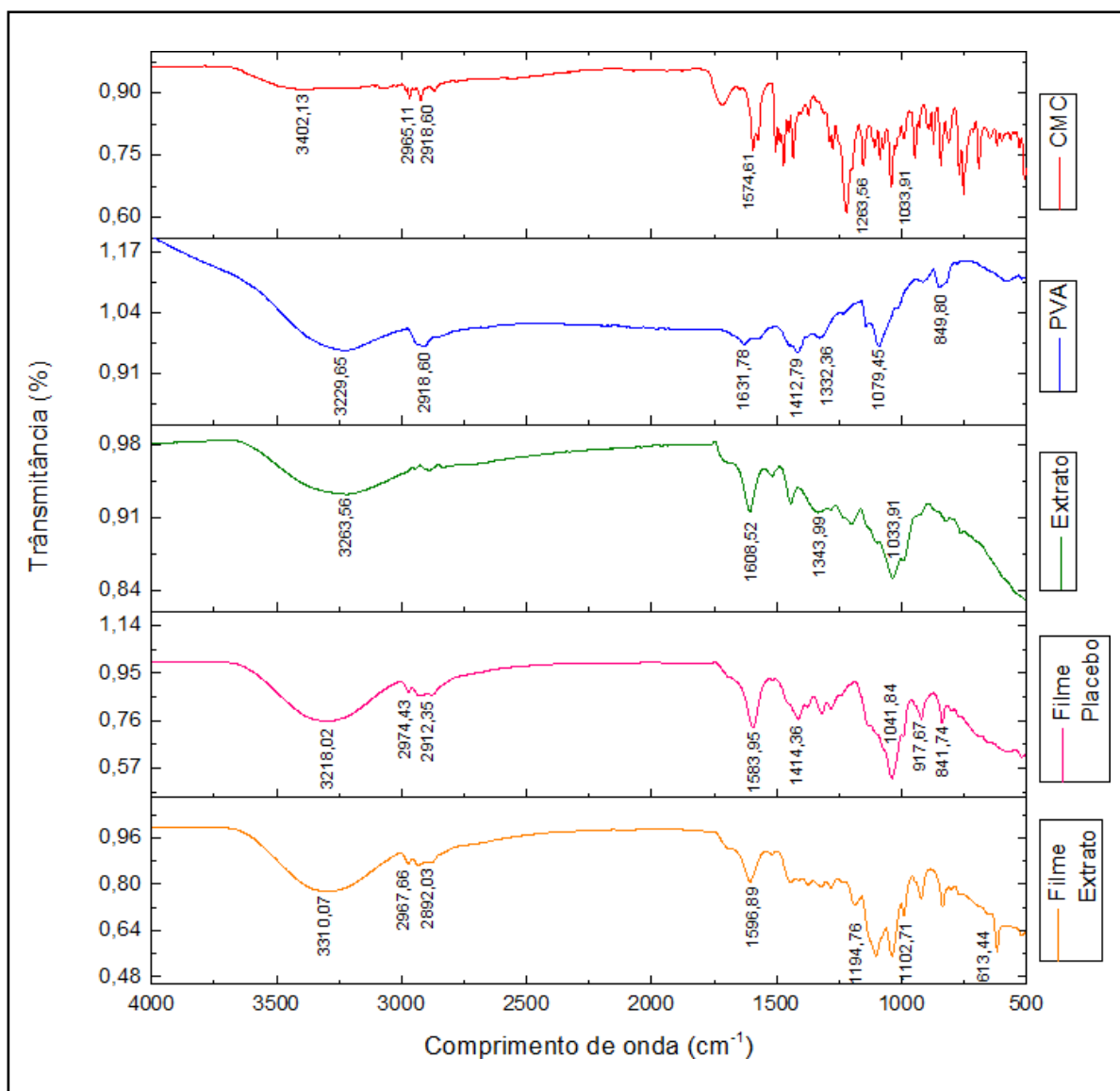


Figura 25. Resultado do espectro infravermelho das amostras estudadas.

As bandas de absorção características encontradas para CMC são demonstradas como bandas de ligação de hidrogênio OH (alongamento) em $3402,13\text{ cm}^{-1}$, bandas de ligação C-H (alongamento) em $2965,11\text{ cm}^{-1}$ e $2918,60\text{ cm}^{-1}$, bandas do grupo carboxila COO- (alongamento) em $1574,61\text{ cm}^{-1}$ um pico acentuado (este pico muda caso ocorra complexos). Além disso, bandas de ligação C-O em $1033,91\text{ cm}^{-1}$ (alongamento), características em esqueletos de polissacarídeos (ROZALI; AHMAD; MOHAMAD ISA, 2015).

Para o PVA foram encontradas as bandas características OH (alongamento) em $3229,65\text{ cm}^{-1}$, banda C-H₂ (alongamento) em $2918,60\text{ cm}^{-1}$, bandas devido à absorção de água em $1631,78\text{ cm}^{-1}$, banda OH em $1332,36\text{ cm}^{-1}$, banda C-O (alongamento) em $1137,59\text{ cm}^{-1}$, banda C-O (alongamento) e O-H (flexão) em $1079,45\text{ cm}^{-1}$, banda CH₂ em $907,94\text{ cm}^{-1}$, banda C-C (alongamento) em $849,80\text{ cm}^{-1}$ (JIPA et al., 2012).

No espectro resultante da análise do extrato também foram encontradas bandas que são características na literatura, sendo elas banda de ligações hidrogênio OH (alongamento) do grupo polifenólico em $3263,56\text{ cm}^{-1}$, bandas fortes característica de compostos heterocíclicos, tais como flavonóides e polifenóis, em $1343,99\text{ cm}^{-1}$ e $1033,91\text{ cm}^{-1}$ (WANG et al., 2018).

Observando a formulação sem extrato é possível identificar banda OH, que correspondem a CMC e PVA, em $3218,02\text{ cm}^{-1}$, banda C-H₂, correspondente ao PVA, em $2912,35\text{ cm}^{-1}$ e banda COO, correspondente ao CMC, em $1583,95\text{ cm}^{-1}$. Já na formulação extrato é possível identificar bandas OH, correspondentes aos três componentes principais (CMC, PVA e extrato), em $3310,07\text{ cm}^{-1}$; banda C-H, correspondente ao CMC, em $2967,66\text{ cm}^{-1}$; banda C-H₂, correspondente ao PVA, em $2892,03\text{ cm}^{-1}$ e, por fim, banda correspondendo com compostos heterocíclicos, tais como flavonóides e polifenóis, em $1102,71\text{ cm}^{-1}$ e $613,44\text{ cm}^{-1}$.

Sendo assim, os dados espectrais das formulações sem extrato e extrato apresentam semelhança entre picos comparando os constituintes das mesmas, CMC, PVA e extrato. Devido a isso não foram observadas alterações dos espectros que nos mostrassem novos picos ou desaparecimento deles, elucidando que não houve interação entre os constituintes e a formulação desenvolvida, inclusive na versão da formulação que contém o princípio ativo extrato.

4.6.2.3 Teste de esterilidade

Foi encontrada ausência de crescimento microbiano nas amostras ($n = 3$) de filmes testadas, sendo assim o filme apresentou esterilidade após seu preparo.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, foram analisados aspectos quantitativos e qualitativos das propriedades químicas, antioxidantes e antibacterianas do extrato aquoso das folhas de goiabeira, *P. guajava* L.;

Foi possível revelar qualitativamente, através da CCD, a presença de flavonóides, avaliar quantitativamente a atividade antioxidante pelo método de DPPH e fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, os quais apresentaram boa capacidade antioxidante e de fenólicos;

A partir dos ensaios de difusão em disco e microdiluição em caldo, foi possível avaliar a atividade antibacteriana do extrato frente bactérias gram-positivas e gram-negativas. Pelo método de difusão em disco, foram encontrados resultados satisfatórios para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Streptococcus* beta-hemolítico, com médias entre 16 a 21 mm de raio de inibição, sendo a média de inibição a concentração de 3,6 mg/cm². No método da microdiluição em caldo, a CIM para todas as cepas foi de 8,8 mg.mL⁻¹; e a CBM para *S. pseudintermedius* foi de 8,8 mg.mL⁻¹; para as demais foi maior que 11,4 mg.mL⁻¹;

Foi desenvolvido um grupo de formulações filmes candidatas que foram caracterizadas e avaliadas conforme seu aspecto e suas características físico-químicas, buscando melhor desempenho e qualidade para prosseguir com a adição do extrato. Sendo o filme mais adequado a formulação F7;

O filme eleito foi caracterizado e avaliado, onde incorporou-se o extrato aquoso das folhas da goiabeira, apresentando homogeneidade, maleabilidade, pH compatível com o oral, bons níveis de grau de inchamento e tempo de desintegração. Não houve interação entre os constituintes e a formulação e, por fim, esta apresentou esterilidade após seu preparo;

Sendo assim, se obteve uma forma farmacêutica filme polimérico de dissolução oral para o tratamento e profilaxia da doença periodontal em cães.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É necessário que ensaios e estudos sejam feitos a fim de concluir e somar informações, além de novos resultados para integrarem as publicações científicas que estão por vir. Sendo assim, vê-se necessário o desenvolvimento dos ensaios físicos, como os ensaio de espessura, a resistência à tração, a resistência a dobra, a análise térmica e a difração de raio-x; além de estudo de estabilidade, que valide a forma farmacêutica desenvolvida. Para além, a uniformidade de conteúdo (teor), estudo de liberação e mucoadesão. Por outro lado, pensando em integridade do filme, o armazenamento adequado deve ser feito para que proteja este da umidade, calor e luz.

Estes ensaios e estudos são necessários para que o desenvolvimento do filme seja contemplado da melhor maneira e gere um resultado capaz de torná-lo uma forma farmacêutica alternativa, que seja de fabricação simples em local adequado, com o seu princípio ativo de fácil acesso e obtenção, e que, principalmente, seja uma formulação utilizada no tratamento e profilaxia da doença periodontal em cães e posteriormente em humanos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOOFAZELI, S.-A. M. R. PREPARATION AND IN VITRO ASSESSMENT OF VARIOUS MUCOSA-ADHESIVE FILMS FOR BUCCAL DELIVERY. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1–2, p. 9–18, 2000.
- ALBUQUERQUE, C. et al. Canine periodontitis: the dog as an important model for periodontal studies. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 191, n. 3, p. 299–305, 2012.
- ALMADI, E. M.; ALMOHAIMED, A. A. Natural products in endodontics. **Saudi Medical Journal**, v. 39, n. 2, p. 124–130, 2018.
- ALMEIDA, R. S.; VIEIRA, C. S. PREVALÊNCIA DE PLACA BACTERIANA EM CÃES SUBMETIDOS À ALIMENTAÇÃO SÓLIDA E/OU MACIA. p. 11, 2018.
- AMADI, C. N.; AGHALIBE, P. O. Evaluation of Drug-diet interaction between Psidium guajava (Guava) fruit and Metoclopramide. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 144–147, 2019.
- ANVISA. Formulário nacional da farmacopeia brasileira, Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012. 224 p.
- BAIA, J. D. et al. Periodontal Disease: Literature Review. **Scientific Electronic Archives**, v. 10, n. 5, p. 150–162, 2017.
- BANDERA FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ PELEA, L. Mejoramiento genético de guayabo (Psidium guajava L.). **Cultivos Tropicales**, v. 36, p. 96–110, 2015.
- BAUER, A. E. et al. Evaluating the validity and reliability of a visual dental scale for detection of periodontal disease (PD) in non-anesthetized dogs (Canis familiaris). **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0203930, 2018.
- BESRA, M.; KUMAR, V. In vitro investigation of antimicrobial activities of ethnomedicinal plants against dental caries pathogens. **3 Biotech**, v. 8, n. 5, 2018.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1–12, 7 jul. 2016.
- BONA, E. A. M. D. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, set. 2014.
- CAMARENA-TELLO, J. C. et al. Quantification of Phenolic Compounds and In Vitro Radical Scavenging Abilities with Leaf Extracts from Two Varieties of Psidium guajava L. **Antioxidants**, v. 7, n. 3, 2018.
- CARBALLOSA DE LA PAZ, A. V. et al. Poda de fructificación del cultivo de la guayaba (Psidium guajava L.), influencia en el rendimiento. **Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias**, v. 28, n. 4, dez. 2019.
- CASTRO, R. D. et al. Brazilian scientific production on herbal medicines used in dentistry. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 618–627, set. 2014.
- CASTRO, M. R.; FIGUEIREDO, F. F. SABERES TRADICIONAIS, BIODIVERSIDADE, PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES: O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO SUS. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 31, p. 56–70, 5 jul. 2019.
- CID, Y. P. Desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivas para o celecoxibe na quimioprevenção do câncer oral: influência da azona como promotor de penetração. Dissertação (mestrado). UFRJ / Faculdade de Farmácia, xviii, 129f., 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed. 2020; CLSI supplement M100; CLSI: Wayne, PA, USA, 2020; ISBN 978-1-68440-066-9. [Google Scholar]

CUNHA, E.; SANTOS, R.; SANTOS, J. D. Canine periodontal disease and its systemic implications - a review. p. 24, 2017.

DAKAPPA, S. S. et al. A REVIEW ON THE MEDICINAL PLANT PSIDIUM GUAJAVA LINN. (MYRTACEAE). **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 3, n. 2, 2013.

DASWANI, P. G.; GHOLKAR, M. S.; BIRDI, T. J. Psidium guajava: A Single Plant for Multiple Health Problems of Rural Indian Population. **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, n. 22, p. 167–174, 2017.

DE ARAÚJO, A. A. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, out. 2014.

DE MENEZES EPIFANIO, N. M. et al. Chemical characterization and in vivo antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) aqueous extract. **Food & Function**, v. 11, n. 6, p. 5346–5356, 24 jun. 2020.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. Health Effects of *Psidium guajava* L. Leaves: An Overview of the Last Decade. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 897, 2017.

DOMINGUES, L. M. et al. Microbiota saprófita associada à doença periodontal em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 4, p. 329–332, ago. 1999.

DUSANE, J. et al. Recent trends in treatment of periodontitis. **Pharmaceutical and Biological Evaluations**, v. 3, p. 13, 2016.

DUPONT, G. A. Prevention of periodontal disease. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 28, n. 5, p. 1129–1145, 1998.

ENLUND, K. B. et al. Dental home care in dogs - a questionnaire study among Swedish dog owners, veterinarians and veterinary nurses. **BMC Veterinary Research**, v. 16, 2020.

ESCUADERO-CASTAÑO, N.; PEREA-GARCÍA, M. A.; BASCONES-MARTÍNEZ, A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. **Avances en Periodoncia e Implantología Oral**, v. 20, n. 1, abr. 2008.

FERNANDES, N. A. et al. Prevalence of periodontal disease in dogs and owners' level of awareness - a prospective clinical trial. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 446–451, 2012.

FERREIRA, I. C.; ABREU, R. M. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. p. 8, 2007.

FERREIRA RODRIGUES SARQUIS, R. DO S. et al. The Use of Medicinal Plants in the Riverside Community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: Ethnobotanical and Ethnopharmacological Studies. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2019, 2019.

GONZÁLEZ-CUETO, C.-D. LA P. Poda de fructificación del cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.), influencia en el rendimiento. v. 28, n. 4, p. 9, 2019.

GHORPADE, V. S. et al. Citric acid crosslinked carboxymethylcellulose-polyvinyl alcohol hydrogel films for extended release of water soluble basic drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 421–430, 1 ago. 2019.

GUPTA, R. C. et al. Nutraceuticals in Periodontal Health and Diseases in Dogs and Cats. In: GUPTA, R. C.; SRIVASTAVA, A.; LALL, R. (Eds.). **Nutraceuticals in Veterinary Medicine**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 447–466.

HAJU, S. et al. Buccal film: a novel approach for oral mucosal drug delivery system. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 14, p. 27–35, 1 jan. 2021.

HENNET, P. R.; HARVEY, C. E. Anaerobes in Periodontal Disease in the Dog: A Review. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 8, n. 2, p. 18–21, 1991a.

HARVEY, C. E. Periodontal Disease in Dogs: Etiopathogenesis, Prevalence, and Significance. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 28, n. 5, p. 1111–1128, 1998.

- HARDY, K. Paleomedicine and the Evolutionary Context of Medicinal Plant Use. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 9 out. 2020.
- IHA, S. M. et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocósmica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 387–393, 2008.
- ISOGAI, E. et al. Oral Flora of Mongrel and Beagle Dogs with Periodontal Disease. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 51, n. 1, p. 110–118, 1989.
- QIAN, He; NIHORIMBERE, Venant. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **Journal of Zhejiang University - Science A**, v. 5, n. 6, p. 676–683, 2004.
- HENLEY-SMITH. **The use of plants against oral pathogens**. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/The-use-of-plants-against-oral-pathogens-Lall/910942b6780c067bb5625bf0b1fcab7248d5f4d1>>. Acesso em: 14 abr. 2020.
- H.R., R. et al. Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. **Journal of Controlled Release**, v. 307, p. 393–409, 2019.
- JIPA, I. et al. Potassium sorbate release from poly(vinyl alcohol)-bacterial cellulose films. **Chemical Papers**, v. 66, n. 2, p. 138–143, 1 fev. 2012.
- KAMTHANE, R. B.; QUAZI, D. A.; VIDHATE, T. Formulation and Evaluation of Nicotine Buccal Films for Smoking Cessation. v. 9, n. 1, p. 10, 2018.
- KHAN, M. A. et al. FAST DISSOLVING ORAL FILM: A MODERN DEVELOPMENT IN DRUG DELIVERY SYSTEM. *International Journal of Pharmaceutics*, p. 14, 2018.
- MADEIRA, B. A. M. Patologias orais: será que os tutores portugueses sabem o estado da saúde oral dos seus animais? 2017.
- NAVARRO-HORTAL, M. D.; BERNAL-MORENO, C.; VARELA-LÓPEZ, A. Macronutrient effect on animal models of periodontal disease: a systematic review. 2018.
- NGBOLUA, K.-N. et al. **A review on the Phytochemistry and Pharmacology of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and Future direction**. Disponível em: <<https://www.phytomedicine.ejournals.ca/index.php/phytomedicine/article/view/58>>. Acesso em: 8 mar. 2020.
- NIEVES, M. A. et al. Bacterial isolates from plaque and from blood during and after routine dental procedures in dogs. **Veterinary surgery: VS**, v. 26, n. 1, p. 26–32, 1997.
- Noguchi T, Izumizawa K, Fukuda M, Kitamura S, Suzuki Y, Ikura H. New method for local drug delivery using resorbable base material in periodontal therapy. **Bull Tokyo Med Dent Univ**. 1984 Sep;31(3):145-53. PMID: 6598415.
- OLAJIDE, O. A.; AWE, S. O.; MAKINDE, J. M. Pharmacological studies on the leaf of. p. 7, 1999.
- PALOMBO, E. A. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–15, 2009.
- PEDDLE, G. D. et al. Association of periodontal disease, oral procedures, and other clinical findings with bacterial endocarditis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 1, p. 100–107, 2009.
- PENLINGTON, L.; FAIXOVÁ, Z. Periodontal Disease in Association with Systemic Diseases in the Dog. **Folia Veterinaria**, v. 63, n. 4, p. 1–8, 2019.
- PERCHYONOK, V. T. Copazan Oral Gel: Functional Biomaterial and Periodontal Disease in Veterinary Medicine from Concept to Application in Vitro. v. 4, n. 1, p. 10, 2018.
- PIER species info from United States Department of Agriculture, 2020.

PORWAL, V.; SINGH, P.; GURJAR, D. A Comprehensive Study On Different Methods Of Extraction From Guajava Leaves For Curing Various Health Problem. **International Journal of Engineering**, v. 2, n. 6, p. 7, 2012.

RADICE, M.; MARTINO, P. A.; REITER, A. M. Evaluation of Subgingival Bacteria in the Dog and Susceptibility to Commonly Used Antibiotics. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 23, n. 4, p. 219–224, 2006.

RAJ, A.; MENON, V.; SHARMA, N. Phytochemical screening, antimicrobial, antioxidant and cytotoxic potential of different extracts of *Psidium guajava* leaves. **Vegetos**, 2020.

RAKMAI, J. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 219–225, 1 jan. 2018.

RATNAKARAN, P. et al. Phytochemical and antimicrobial activities of leaf extract of Guava (*Psidium guajava* L.). p. 5, 2020.

RAVI, K.; DIVYASHREE, P. *Psidium guajava*: A review on its potential as an adjunct in treating periodontal disease. **Pharmacognosy Reviews**, v. 8, n. 16, p. 96–100, 2014.

RIGGIO, M. P. et al. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 3–4, p. 394–400, 2011.

ROZALI, M.; AHMAD, N.; MOHAMAD ISA, M. I. N. Effect of Adipic Acid Composition on Structural and Conductivity Solid Biopolymer Electrolytes Based on Carboxy Methylcellulose Studies. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 9, p. 39–45, 11 mar. 2015.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico**, 2007.

RUPALI ET AL. *Psidium Guajava* Leaves: Phytochemical study and Pharmacognostic evaluation. p. 6, 2020.

SAMAL, H. B. Design and In Vitro Evaluation of Curcumin Dental Films for the Treatment of Periodontitis. **Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm**, v. 11, n. 03, 2017.

SANCHES, N. R. et al. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 429–436, maio 2005.

SEHGAL, S.; KHANNA, P.; YADAV, R. Phytochemical Constituents of *Hibiscus rosa-sinensis*, *Laurus nobilis* and *Psidium guajava* Leaves and their Antimicrobial Activity. v. 11, p. 28549–28557, 26 jan. 2021.

SHARMA, P. K. et al. Development and Evaluation of Fast-dissolving Oral Film of Poorly Water-soluble Drug Felodipine. p. 12, 2018.

SHAHEENA, S. et al. Extraction of bioactive compounds from *Psidium guajava* and their application in dentistry. **AMB Express**, v. 9, 2019.

THAKUR, N.; UPADHYAY, S.; SAMANT, P. MEDICINAL AND TRADITIONAL PROPERTIES OF *PSIDIUM GUAJAVA*: A REVIEW. v. 8, p. 4, 2020.

THE PLANT LIST, 2020. (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-166741>) (acessado em 04.11.20).

THURNHEER, T.; BAO, K.; BELIBASAKIS, G. N. Subgingival Biofilms as Etiological Factors of Periodontal Disease. In: BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G. N. (Eds.). **Pathogenesis of Periodontal Diseases: Biological Concepts for Clinicians**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 21–29.

TUNDO, I.; GRACIS, M. Guidelines for the management of dental and periodontal trauma in dogs and cats: narrative review of the literature. **Veterinaria (Cremona)**, v. 32, n. 6, p. 345–358, 2018.

VALLI, M. et al. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 763–778, 2018.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, jun. 2005.

VELLOSO, C. C.; PEGLOW, K. Plantas medicinais. Porto Alegre: **EMATER/RS: ASCAR**, 2003. 83 p. (Coleção: Aprendendo a Fazer Melhor, nº 4).

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis. ISBN 978-3-642-00574-9. Springer, 1996.

WANG, L. et al. Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts. **Materials Science and Engineering: C**, v. 86, p. 1–8, 1 maio 2018.

WHO (World Health Organization) (2011) The World Traditional Medicines Situation, in *Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges*. Geneva 3:1–14.

ZENI, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2703–2712, ago. 2017.