



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Karlla Almeida Vieira

“Estudo *in vitro* sobre o potencial anticariogênico de extratos de *Azadirachta indica* (Nim)”

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.
Área de Odontopediatria.

PIRACICABA
2006

Karlla Almeida Vieira

CIRURGIÃ-DENTISTA

“Estudo *in vitro* sobre o potencial anticariogênico de extratos de *Azadirachta indica* (Nim)”

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.
Área de Odontopediatria.

Orientador (es):

Profa. Dra. Cecília Gatti Guirado

Prof. Dr. Milton Fernando de Andrade Silva

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Cecília Gatti Guirado

Prof. Dr. Edmilson José Ambrosano

Profa. Dra. Regina Maria Puppim Rontani

PIRACICABA

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

V673e	<p>Vieira, Karlla Almeida. Estudo <i>in vitro</i> sobre o potencial anticariogênico de extratos de <i>Azadirachta indica</i> (Nim). / Karlla Almeida Vieira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.</p> <p>Orientadores: Cecília Gatti Guirado, Milton Fernando de Andrade Silva. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. <i>Streptococcus mutans</i>. 2. Perda mineral. 3. Esmalte dentário. I. Guirado, Cecília Gatti. II. Silva, Milton Fernando de Andrade. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	--

Título em inglês: *In vitro* study about the anticariogenic potential of *Azadirachta indica* (Neem).

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. *Streptococcus mutans*. 2. Mineral loss. 3. Dental enamel.

Área de concentração: Odontopediatria

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora: Cecília Gatti Guirado, Edmilson José Ambrosano, Regina Maria Puppim-Rontani

Data da defesa: 24/02/2006



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2006, considerou a candidata KARLLA ALMEIDA VIEIRA aprovada.

PROFa. DRa. CECILIA GATTI GUIRADO

PROF. DR. EDMILSON JOSÉ AMBROSANO

PROFa. DRa. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI

TOCHOSSES

Aos meus Pais, **Antônio Vieira e Maria Almeida** por propiciarem aos filhos sempre o melhor da vida.

Agradecimentos

A Deus, por me amparar em momentos difíceis, mostrando a paz e alegria.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Thales de Mattos Rocha Filho, onde obtive crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, coordenador geral do Curso de Pós-graduação; ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, coordenador do Curso de Pós-graduação em Odontologia e a Prof. Dra. Regina Maria Puppim Rontani, coordenadora da Área de Mestrado em Odontopediatria da FOP/UNICAMP.

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL), na pessoa da reitora, Profa. Ana Dayse Dória.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), pela bolsa de mestrado.

A Profa. Dra. Cecília Gatti Guirado que me acolheu como filha nesta cidade desconhecida, orientou e me apoiou em todas as etapas deste curso e da minha vida.

Ao Prof. Dr. Milton Fernando de Andrade Silva, por estar ao meu lado sempre, acolhendo minhas inquietações, com carinho, paciência e amizade. Ser sua orientada novamente foi muito importante.

A Profa. Dra. Regina Maria Puppim Rontani que cativa, ensina e estimula o saber e a amizade.

À Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa, pelo incentivo e torcida em cada etapa ultrapassada.

A Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião, pela oportunidade de aprender algo novo, por estar sempre presente e pela troca de idéias.

Ao Prof. Amaro Carlos Júnior, pela amizade e incentivo.

As minhas colegas de curso Carolina, Fernanda, Flávia, Kamila, Márcia e Milena: que a nossa convivência saudável perdure não só no âmbito profissional, mas na vida. O nosso companheirismo foi essencial.

À Milena Schaaf Teixeira, amiga e companheira, pelo apoio nos momentos de fragilidade, pela confiança e carinho. Obrigada por estar sempre presente. Você foi uma grande luz em minha vida.

À Fernanda Miori Pascon por me auxiliar em várias etapas desta tese. Sempre prestativa e companheira. Obrigada por revisar a tese comigo.

A Lidyane Karla Rodrigues, pela disponibilidade em ajudar, pelo exemplo de pessoa e profissional.

Ao Mauro Guilherme Quirino Martins, por me inserir no ciclo social de Piracicaba, me ensinar e ser meu amigo. Sou eternamente grata pelo o que você fez por mim.

As minhas colegas da Radiologia Maria Luisa, Andréa, Karina, Janaína, Flávia. Obrigada pelo alto-astral constante, pela torcida e pelo companheirismo.

À Juliana e André, companheiros do Central Park, pelos agradáveis momentos e pela amizade.

Ao Bruno e Rodrigo pelo apoio e apreço.

À Cristina, Cleone e Flávia, funcionárias do Laboratório de Odontologia Preventiva da UFAL, pela assistência e apoio durante a execução deste trabalho.

Ao Nathanael, pelas conversas e estímulo.

À Dona Janete, que me guia e me ilumina.

Aos funcionários do Laboratório de Odontopediatria da FOP/UNICAMP, Marcelo, Marcela, Rosélis e Renata.

À Dra. Círia Vieira pela ajuda com as soluções de Nim.

Ao Dr. Nivaldo Guirado, pelo incentivo e orientações sobre o Nim.

Aos Professores (a): Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião, Dr. Márcio Zaffalon Casati e ao Dr. Paulo César Doimo Mendes pelas considerações sugeridas na qualificação que contribuíram sobremaneira para melhoria deste trabalho.

À Profa. Dra. Glaucia Ambrosano por revisar as análises estatísticas.

À minha mãe por fazer minha caminhada mais tênue, apoiar-me e se dedicar aos filhos sempre.

A meu pai, Gordinho. Sempre prestativo, companheiro e compreensivo com os filhos.

Ao Meu irmão Rodrigo, por me incentivar, apoiar e dividir comigo muitas etapas da vida. Nossa aproximação nos últimos anos foi crucial neste momento.

A minha avó, Maria José, pelas orações, apoio e dedicação.

Ao Meu Noivo, Thiago. Ao nosso amor que tem raízes profundas e surge cada dia mais amante. Espero que possamos ficar juntos logo.

“Dai-me, Senhor, a perseverança das ondas do mar,/
que fazem de cada recuo/
um ponto de partida para um novo avanço.”

Cecília Meireles.

SUMÁRIO

Resumo	01
Abstract	03
1. Introdução Geral	04
2. Capítulo	10
3. Conclusão Geral	28
Referências Bibliográficas	29
Anexos	32

RESUMO

A *Azadirachta indica* A. Juss. (Nim) é uma planta tropical nativa do continente indiano. É utilizada na Índia e na Ásia há muitos anos como principal utensílio na manutenção da saúde dos dentes e gengivas. O presente estudo *in vitro* avaliou o potencial anticariogênico de extratos obtidos da semente e da folha da *Azadirachta indica* (Nim). Para tanto, 80 fragmentos dentais bovinos foram divididos aleatoriamente em 9 grupos de 9 réplicas cada, com exceção do último grupo, que apresentava 8 réplicas: grupo 1 – Água destilada estéril; grupo 2 – Colutório de gluconato de clorexidina (0,12%); grupo 3 – Dentifrício com Nim; grupo 4 – Emulsão do óleo de Nim a 0,5%; grupo 5 – Emulsão do óleo de Nim a 1%; grupo 6 – Extrato da folha do Nim a 5%; grupo 7 – Extrato da folha do Nim a 10%; grupo 8 - Extrato da folha do Nim a 25%; grupo 9 – Controle (Tween 80 + Tween 20 + água). Os blocos de esmalte foram submetidos a um modelo bacteriano de desmineralização com estreptococos mutans (cepa PS14) por 18 horas e, então, analisados quanto à perda mineral (microdureza e análise de Fósforo) e pH. Para microdureza, não houve diferença significativa entre o Colutório de gluconato de clorexidina, a Água, o Dentifrício com Nim e o Extrato da folha de Nim a 10% e 25%. Para o pH, observou-se que o Colutório de gluconato de clorexidina e o Dentifrício com Nim não diferiram estatisticamente. Para a análise de Fósforo, o grupo do Dentifrício com Nim não mostrou diferença estatística entre o grupo da Água e o Extrato da folha a 10% e 25%. No entanto, todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao grupo do Colutório de gluconato de clorexidina ($p < 0,05\%$). Os resultados mostram que os

extratos de Nim utilizados neste estudo *in vitro* não apresentam atividade anticariogênica.

ABSTRACT

The *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) is a tropical tree native to the Indian continent. It is used in India and Asia for many years as a tool for keeping teeth and gums healthy. This *in vitro* study evaluated the anticariogenic potential of seed and leaf extracts of *Azadirachta indica* (Neem). For this purpose, 80 bovine dental fragments were randomly divided in 9 groups of 9 specimens (with the exception of the group 9 which had 8 specimens): group 1 – Sterile distilled water; group 2 - Chlorhexidine gluconate mouthwash (0.12%); group 3 – Neem dentifrice; group 4 – 0.5% Neem Emulsion; group 5 – 1% Neem Emulsion; group 6 – 5% Neem leaf extract ; group 7 - 10% Neem leaf extract; group 8 – 25% Neem leaf extract; group 9 – Control (Tween 80 + Tween 20 + water). The blocks were submitted to a demineralization bacterial model using a *Streptococcus mutans* (PS14 strain) for 18 hours. Then, the blocks were analyzed for surface mineral loss (microhardness and Phosphorus analysis) and pH. For microhardness, no statistical difference was observed between Chlorhexidine gluconate mouthwash, Water, Neem dentifrice, 10% and 25% Neem leaf extracts. For pH, no statistical difference was observed between Chlorhexidine gluconate mouthwash and Neem dentifrice. For the Phosphorus analysis, the Neem dentifrice not displayed a statistical difference between Water, 10% and 25% Leaf extracts groups. Nevertheless, all groups were differently from Chlorhexidine gluconate mouthwash ($p < 0.05\%$). The results shows that the Neem extracts used in this *in vitro* study do not show anticariogenic activity.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A planta *Azadirachta indica* A. Juss (conhecida, comumente, como Nim ou *Neem*) é original da Índia e Sudeste da Ásia, e pertence à família *Meliaceae*, tal como a santa bárbara ou cinamomo, cedro e mogno. É utilizada há mais de 2000 anos na Índia para controle de insetos / pragas, nematóides, alguns fungos e bactérias; e na medicina humana (anti-séptico curativo ou como vermífugo, em sabões medicinais, dentifrícios). Posteriormente, disseminou-se por outras regiões tropicais e subtropicais do mundo, como África, onde é bastante cultivada, Austrália, Ilhas do Pacífico e Américas (Schmutterer, 1995; Martinez, 2000).

No Brasil, as primeiras introduções realizadas para pesquisa do Nim como inseticida foram realizadas no IAPAR (Instituto de Agronomia do Paraná) em Londrina, em 1986, com sementes originárias das Filipinas. Em 1989 e 1990, dando seqüência ao citado projeto, materiais oriundos da Índia, Nicarágua e República Dominicana foram plantados em Londrina, Paranaíba (PR) (região mais quente e arenosa), Jaboticabal (SP) e Brasília (DF), para avaliação do desenvolvimento dessa planta (Martinez, 2000).

Na África e no Caribe, as pessoas, principalmente as crianças, comem frutos maduros de Nim. Na Índia, extratos de folhas são utilizados no preparo de chá e são consumidas como alimento para humanos e animais. Quando utilizados na agricultura para controlar pragas e doenças, os produtos à base de Nim, praticamente, não oferecem riscos à saúde humana ou animal. Não há registro de toxicidade do Nim para humanos; o consumo de Nim só se torna letal se ingerido em grandes quantidades. Ainda assim, a dose letal dessa substância é, sobremaneira, menos tóxica que o sal de cozinha, por exemplo: a dose letal 50 do Nim é de 5000 mg por kg / peso corporal e a do sal de cozinha é de 3000. Schmutterer (1995) chegou a afirmar que o Nim é cerca de 70% menos tóxico que o sal de cozinha.

Atualmente, um grande número de remédios, cosméticos, produtos de perfumaria e farmacêuticos têm como base derivados do Nim, devido as suas

propriedades únicas. Cada parte desta árvore possui ações diferentes na produção de produtos e agentes: o extrato é antidiabético (Chattopadhyay, 1999), antibacteriano (Rao *et al.*, 1986) e antiviral (Rao *et al.*, 1969); a cortiça combate à malária (MacKinnon *et al.*, 1997) e doenças da pele; as folhas são adstringentes, funcionando também contra hepatite, varicela, úlceras, furúnculos; as sementes produzem um óleo verde-amarelado-castanho, pungente, amargo, chamado “óleo margoso” que serve para úlceras infectadas, dores de cabeça, tétano, lepra, urticária, dermatose inflamatória, erisipelas, escrófula, micoses em geral (Bhowmick & Choudhary, 1982), escabiose, pênfigo, problemas dentários e periodontais (Patel & Venkatakrishna, 1988); as flores são estimulantes, tônicas e servem como remédio para o estômago (Schmutterer, 1995; Singh & Singh, 2003; Bandyopadhyay, 2004). O creme de óleo de Nim é um efetivo espermicida (Khan & Awasthy, 2003), cujo efeito dura até 5 horas. Conforme atestaram Riar *et al.* (1988) é um excelente contraceptivo. Se injetado no colo uterino, o Nim pode provocar, inclusive, aborto em gestante de seis meses (Garg *et al.*, 1993). Os cremes de Nim também atuam contra o câncer (Aruna & Sivaramakrishnan, 1990) suprimindo a carcinogênese na próstata (Kumar *et al.*, 2005). Existem milhares de fórmulas para o uso do Nim na *Ayurvedica* ou ciência médica indiana.

Os constituintes do Nim pertencem a várias classes químicas e podem ser divididos em: isoprenóides e não-isoprenóides. Os isoprenóides são diterpenóides e triterpenóides considerando os glicerídeos, polissacarídeos, compostos sulfurosos e flavonóides. Os outros glicosídeos, aminoácidos e compostos alifáticos constituem os não-isoprenóides (Akhila & Rani, 1999).

O sabor amargo do Nim é devido à presença de limonóides (tetrano-triterpenóides), os quais ocorrem em muitas plantas, sendo, também, conhecidos como meliacinas nas espécies da família *Meliaceae*. Cerca de 350 limonóides são conhecidos até o momento, e 150 encontrados no Nim. Inclui-se, dentre estes, o mais promissor descoberto até agora, a azadiractina, que está presente nas folhas, frutos e sementes. Existe uma controvérsia sobre a variação no conteúdo de azadiractina nas sementes do Nim entre as províncias em uma

mesma região e diferentes países. Estas variações são atribuídas às condições climáticas como temperatura e umidade (Sidhu *et al.*, 1996).

Similar a outros óleos vegetais, o óleo de Nim é composto primariamente de triglicerídeos, ácido palmítico, ácido linoléico, ácido esteárico, neemola e margosin. Também do óleo do Nim, isolaram-se três princípios ativos: Nimbim, Nimbinim e Nimbimim. O óleo de Nim contém componentes sulfurosos que lhe conferem um odor pungente (Kaura *et al.*, 1998).

Tanto na Índia como na África, milhões de pessoas usam pequenos galhos de Nim como escovas de dente na higiene bucal diária. Dentistas aprovam esta prática primitiva por acharem que realmente previne doenças periodontais e cáries (Elvin-Lewis, 1980; Wolinsky & Sote, 1983). Rao *et al.* (1986) demonstraram que o óleo de Nim tem propriedades antibacterianas contra bacilos gram negativos e cocos gram positivos. Patel & Venkatakrishna (1988) afirmaram em seu estudo sobre o efeito terapêutico de plantas nativas da Índia nas desordens periodontais (dentre elas o Nim) que o tratamento com o extrato da folha causou redução de 50% na população bacteriana particularmente com respeito aos microorganismos gram positivos e negativos, filamentosos e espiralados. Assim, os extratos de plantas nativas foram bons agentes terapêuticos nos casos de periodontites especialmente quando usados por longos períodos. Todavia, não está claro se o benefício da indigitada planta é devido a: massagens regulares da gengiva, prevenção da formação do biofilme, pelas propriedades anti-sépticas do Nim, ou as três hipóteses juntas. Companhias alemãs utilizam o Nim como um ingrediente ativo em dentifrícios. O Nim se mostrou eficaz na preservação e cura de inflamações gengivais e nas doenças periodontais.

Wolinsky *et al.* (1996) utilizaram cepas de estreptococos (*S mutans*, *S sanguis*, *S sobrinus* e *S cricetus*) para avaliar os efeitos inibitórios do extrato aquoso dos galhos de Nim nas propriedades bacterianas que poderiam influenciar na formação de biofilme. Ensaio *in vitro* foram utilizados para medir a atividade antimicrobiana, a aderência bacteriana a hidroxiapatita e a atividade enzimática da glicosiltransferase (medida pela síntese de glucano extracelular insolúvel). Os

resultados apresentados neste estudo suportam a hipótese que extratos solúveis em água de galhos de Nim afetam algumas propriedades bacterianas que podem alterar a adesão bacteriana e a habilidade de alguns estreptococos de colonizar as superfícies dentárias. Especificamente, que os extratos de galhos de Nim exibiram uma ampla atividade contra a agregação bacteriana de estreptococos bucais, uma vez que a presença de taninos (polifenóis que pertencem a famílias orgânicas naturais), durante os estágios iniciais da formação de placa, poderiam reduzir efetivamente o número de bactérias disponíveis em se ligar à superfície dentária pelo aumento de sua remoção física da cavidade bucal. Por conseguinte, o efeito inibitório na atividade da glicosiltransferase e a redução da adesão bacteriana a película salivar sugerem algum potencial antiplaca.

Venugopal *et al.* (1998) avaliando 2000 crianças de 1-14 anos de idade em um estudo epidemiológico em Mumbai, na Índia, em relação à prevalência de cárie constataram que crianças bem nutridas e que consumiam uma dieta vegetariana possuíam uma baixa prevalência de cárie. A frequência do consumo de açúcar estava associada à prevalência de cárie e que àquelas que faziam uso do Nim eram menos afetadas pelas cáries.

Vanka *et al.* (2001) avaliaram o efeito antibacteriano do colutório de Nim nos níveis salivares de *streptococcus mutans* e *lactobacillus* por um período de mais de dois meses. O efeito do Nim em reverter lesões incipientes de cáries também foi observado. Os *streptococcus mutans* foram inibidos pelos colutórios de Nim, com e sem álcool assim como o colutório de clorexidina. O crescimento dos *lactobacillus* somente foi inibido pelo colutório de clorexidina. Estes dados parecem provar o efeito do Nim em inibir o *streptococcus mutans* e reverter às lesões iniciais de cárie.

Pai *et al.* (2004a) avaliaram a efetividade do extrato da folha de Nim contra a formação de biofilme em homens de 20-30 anos de idade por um período de mais de 6 semanas. Foi formulado um gel dental mucoadesivo que continha 25mg/g de extrato da folha do Nim. Um estudo clínico foi conduzido para se avaliar a eficácia do gel mucoadesivo de Nim tendo como controle positivo um

colutório comercialmente disponível de gluconato de clorexidina (0,2%). Uma avaliação microbiana de *streptococcus mutans* e *lactobacillus* para determinar a diminuição total da contagem bacteriana usando um método semi-quantitativo foi feita. Os resultados do estudo sugeriram que o gel dentário que continha o extrato de Nim reduziu significativamente o índice de biofilme e contagem bacteriana quando comparado ao grupo controle (gel placebo).

Pai *et al.* (2004b) analisaram a eficácia de duas formulações de gel contendo gluconato de clorexidina (0,2%) e extrato de Nim (5%) com um colutório disponível comercialmente de gluconato de clorexidina (0,2%). Um estudo clínico de 6 semanas com um grupo paralelo de 48 grupos foi dividido em 4 grupos (1. gel placebo; 2. colutório de gluconato de clorexidina 0,2%; 3. gel de gluconato de clorexidina 0,2%; 4. gel com o extrato do Nim 5%). A acumulação de biofilme e a condição gengival foram registradas usando índice de biofilme e índice gengival. No início do estudo os voluntários foram alocados aleatoriamente em 4 grupos que deveriam usar o seu respectivo material teste duas vezes ao dia (antes de dormir e depois do café da manhã). Os escores de biofilme e gengival foram registrados após 3 e 6 semanas. Os resultados mostraram que os índices gengival e de biofilme foram reduzidos no período experimental de 6 semanas para os grupos experimentais e controle. O gel de gluconato de clorexidina reduziu mais significativamente ($p < 0,05$) os escores gengival e de biofilme do que o colutório de gluconato de clorexidina. O gel com o extrato do Nim reduziu significativamente ($p < 0,05$) os escores gengival e de biofilme quando comparado ao grupo controle. No entanto, não houve diferença entre os grupos tratados com gel de gluconato de clorexidina e o gel com o extrato do Nim.

Atualmente, existem poucas pesquisas no mundo sobre os efeitos do uso do Nim na Odontologia e, no Brasil, não há investigação científica nesse sentido. Como alguns estudos (Elvin-Lewis, 1980; Wolinsky & Sote, 1983; Rao *et al.*, 1986; Patel & Venkatakrishna, 1988; Wolinsky *et al.*, 1996; Vanka *et al.*, 2001; Pai *et al.*, 2004a) mostraram os efeitos de extratos do Nim contra bactérias gram positivas e

gram negativas, considerou-se pertinente à análise *in vitro* do potencial anticariogênico dos extratos do Nim (folha e óleo da semente).

Esta tese foi elaborada de acordo com a Deliberação da CCPG – 001/98 que permite um formato alternativo: capítulos (cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato).

***In vitro* study about the anticariogenic potential of *Azadirachta indica* (Neem)**

K. A. VIEIRA^{1*}, C.G. GUIRADO*, M.F. de A. SILVA**

*Faculty of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas (UNICAMP),
Piracicaba, SP, Brazil

**Department of Dentistry, Federal University of Alagoas (UFAL),
Maceió, AL, Brazil

Key words: *Azadirachta indica*, Neem, *Streptococcus mutans*, pH, mineral loss, dental enamel.

Short Title: The anticariogenic potential of *Azadirachta indica* (Neem).

¹Send all correspondence to Karlla Almeida Vieira, Rua Dom Pedro I, No. 818 Apto.133
Centro 13400-410 Piracicaba – SP Brasil.

Tel. (55 19) 3432 7497
(55 19) 3412 5287
(55 19) 3412 5285

Fax. (55 19) 3412 5218
(55 19) 3421 0144
(55 82) 3231 3113

E-mail. karlla.almeida@telefonica.com.br
karlla.almeida@fop.unicamp.br

Abstract

This *in vitro* study evaluated the anticariogenic potential of seed and leaf extracts of *Azadirachta indica* (Neem). For this purpose, 80 bovine dental fragments were randomly divided in 9 groups of 9 specimens (with the exception of the group 9 which had 8 specimens): group 1 – Sterile Distilled water; group 2 - Chlorhexidine gluconate mouthwash (0.12% w/v); group 3 – Neem dentifrice; group 4 – 0.5% Neem Emulsion; group 5 – 1% Neem Emulsion; group 6 – 5% Neem leaf extract ; group 7 - 10% Neem leaf extract; group 8 – 25% Neem leaf extract; group 9 – Control (Tween 80 + Tween 20 + water). The blocks were submitted to a demineralization bacterial model (*Streptococcus mutans* – PS14 strain) for 18 hours. Then, they were analyzed for mineral loss (microhardness and Phosphorus analysis) and pH. For microhardness, no statistical difference was observed between Chlorhexidine gluconate mouthwash, Water, Neem dentifrice, 10% and 25% Neem leaf extracts. For pH, no statistical difference was observed between Chlorhexidine gluconate mouthwash and Neem dentifrice. For the Phosphorus analysis, the Neem dentifrice group not displayed a statistical difference between Water, 10% and 25% Leaf extracts groups. Nevertheless, all groups were differently from Chlorhexidine gluconate mouthwash ($p < 0.05\%$). The results shows that the Neem extracts used in this *in vitro* study do not show anticariogenic activity.

Introduction

Neem (Indian lilac, *Azadirachta indica* A. Juss., family Meliaceae), a native plant of the Indian sub-continent, has received world-wide attention [National Research Council; Washington, 1992], because their compounds, either in pure form or in the form of extracts obtained from different plant parts, display a vast array of biological activities [Koul et al., 1990]. Products and preparations of almost every part of the tree are used as antimicrobial [Rao et al., 1986], antifungal [Bhowmick and Choudhary, 1982], antiviral [Rao et al., 1969], vaginal contraceptive [Riar et al., 1988], hypoglycemic, antidiabetic [Chattopadhyay, 1999], antigingivitis, anti-inflammatory, antiperiodontitis [Patel and Venkatakrishna, 1988], antipyretic, nematicidal, pesticide, diuretic, antimalarial [MacKinnon et al., 1997] and several others activities [Akhila and Rani, 1999].

This tree has been used in India and south Asia for thousands of years as a tool for maintaining healthy teeth and gums. Brushing with Neem twigs and chewing Neem leaves and seeds after a meal has been the traditional dental care practice in this area [Pai et al., 2004]. Patel and Venkatakrishna [1988] studied the therapeutic use of Neem in periodontal disorders (gingivitis and periodontitis) in India. Neem showed better efficacy in reducing the human plaque cultures and gram-negative bacteria compared to the commercially available dentifrice. It was hypothesized that this plant may contain polyphenolic components capable of altering dental plaque formation [Wolinsky et al., 1996]. Due to bitter taste of the drug, the overall usage of the Neem in various commercial preparations was restricted. With the availability of modern preparations, many people are now using commercial products (dentifrices, mouthwashes) that contain the same Neem components [Pai et al., 2004]. Rao et al. [1986] described the *in vitro* antibacterial activity of the Neem oil on different bacterial pathogens isolated from varied clinical sources.

Wolinsky et al. [1996] investigated the inhibitory effects of aqueous extracts derived from bark-containing sticks (Neem stick) of *Azadirachta indica* upon bacterial aggregation, growth, adhesion to hydroxyapatite, and production of insoluble glucan, which may affect *in vitro* plaque formation. The aqueous extract was prepared by taking 220g of an individual powder (Neem) and suspending it in 500mL of boiling distilled water. *Streptococcal* strains (*S mutans*, *S sanguis*, *S sobrinus* and *S cricetus*) were used to investigate the bacterial properties that influence dental plaque formation. From the data presented, it was concluded that Neem plant contains (apparently) components (tannins), which can inhibit some oral *streptococci* virulence factors that influence plaque formation.

Venugopal et al. [1998] evaluated the caries prevalence in a total of 2000 children (1-14 age group) in Mumbai. Their results showed that children who were using Neem datun were found to be less affected with dental caries.

Vanka et al. [2001] tested the antibacterial effect of Neem mouthwash against salivary levels of *streptococcus mutans* and *lactobacillus* over a period of 2 months. Its effect in reversing incipient carious lesions was assessed. The data showed that *streptococcus mutans* was inhibited by Neem mouthwashes, with or without alcohol, as well as chlorhexidine. The *lactobacillus* growth was inhibited only by chlorhexidine. They said that Neem appears to prove its effect inhibiting *streptococcus mutans* and reversing incipient carious lesions.

As Neem had showed good *in vitro* broad range antibacterial activity, including *streptococcus mutans*, this *in vitro* study was planned to evaluate the anticariogenic activity of extracts (leaf and oil) and a dentifrice of *Azadirachta indica* (Neem).

Materials and Methods

Enamel blocks - 80 bovine enamel dental blocks ($\approx 2 \times 2 \times 2$ mm) were cut and polished with sand papers (400, 600, and 1200) to produce a flat enamel surface. Final

mirror like polishing of the enamel surface was achieved with 1µm alumina slurry (Arotec, São Paulo, Brazil). Then the enamel surface was screened for cracks and white spots. The enamel blocks were kept moist, according to need, before experimentation was begun. The blocks were assessed for microhardness with a Knoop indenter [Knoop et al., 1939] mounted on a HMV 2000 (Shimadzu, Japan). Five baseline indentations, 100 µm apart were produced with a 50g load applied for 15 seconds at the surface of the enamel block and read at 200 X magnification. The average of the five indentations was used as the microhardness score for each block. After the demineralization period (18 hours), 5 new indentations were made as described above between the baselines indentations and averaged as before. The results were expressed in mean changes in indentation length between the baseline and after demineralization microhardness value from each block. For transverse microhardness assessment, the blocks were involved in an acrylic transparent resin. After polymerization, each block was cut through the middle, polished with a 1000µm sand paper and five indentations were made with a 25g load applied for 15 seconds at the surface of the enamel block and read at 200 X magnification. The initial indentation was made 20 µm below the enamel surface and the other four after each 20 µm. Then the Knoop value of each indentation was transformed in volume mineral percent using the equation: $4.3 (\sqrt{\text{KHN}}) + 11.3$ [Featherstone et al., 1983].

Streptococcus mutans – *S mutans* strain PS-14 [Ikeda et al., 1975] was grown on mitis-salivarius agar containing bacitracin (MSB) [Gold et al., 1976] and was checked for purity using colony morphology characteristics. Cells from the MSB plates were then inoculated into brain-heart infusion broth containing 0.2% glucose (Difco Laboratories, Detroit, MI) to which 2% of sucrose was added and grown anaerobically in an atmosphere of 10% H₂, 10% CO₂ and 80% N₂ for 18 hours at 37°C. After the incubation period, 0.1 mL of the culture was used to inoculate a fresh 10 mL of the same broth, which was also

allowed to grow for 18 hours under the above conditions. The cultures tubes were then centrifuged at 1400g for 10 min and the supernatant discarded. The bacterial pellet was re-suspended in a sufficient volume of 0.1mol/L maleic acid-KOH-buffer, pH 5.8 [Luoma et al., 1983], so that the final bacterial suspension, when diluted 10 times, had an optical density (at 550nm) of between 0.65 and 0.7 [Silva et al., 1987].

In vitro experimental model - The cariostatic activities of *Azadirachta indica* (Neem) were assayed by *in vitro* caries model of Turtola [1977], modified by Silva et al. [1987] as follows: the lower third of a 1.5 mL polypropylene centrifuge tube was cut off and filled with sticky wax, on top of which one enamel block was placed, leaving the enamel face uncovered and flush with the surface of the wax. This assembly was then seated inside another 1.5 mL polypropylene centrifuge tube and sealed in place with sticky wax. Each tube assembly containing an enamel block was chilled in an ice-bath and then inoculated with 0.1 mL of the *S mutans* suspension, followed by 0.1 mL of a 20% sucrose solution. The tubes were vortexed for 10 seconds, then centrifuged for five min at 1400g to form an artificial plaque layer, and then returned to the ice-bath, where 0.4 mL of one of the following test solutions was added: group 1 - Sterile distilled water; group 2 - Chlorhexidine gluconate mouthwash (0.12% w/v) (Periogard, Colgate- Palmolive CO.); group 3 - Neem dentifrice with 5% glycolic extract (Sattiva, Brazilian Ind.) (1:3 w/v) slurry in deionized water [Featherstone et al., 1988]; group 4 - 0.5% Neem emulsion (0.5% of Neem seed oil + 2% Tween 80 + 0.3% Tween 20 + water till complete 15 mL); group 5 - 1% Neem emulsion (1% of Neem seed oil + 2% Tween 80 + 0.3% Tween 20 + water till complete 15 mL); group 6 - 5% Neem leaf extract; group 7 - 10% Neem leaf extract; group 8 - 25% Neem leaf extract; group 9 - Control (2% Tween 80 + 0.3% Tween 20 and water till complete 15 mL). The group 9 contained eight replicates; all the other groups' contained nine replicates each. After the 18-hour incubation period, each tube was vortexed for 10

seconds and the final pH of the solutions were assessed with an Orion glass electrode and Procyon 720 A pH meter (Procyon, San Pablo, Brazil). The enamel blocks were recovered and re-assessed for microhardness. The results were expressed as changes in indentation length (ΔIP , μm). At the end of the experimental period, the solutions of each sample were analyzed for phosphorus (P) content. The quantity of P ($\mu\text{g/mL}$) in experimental solutions were measured using the colorimetric method of Chen et al. [1956]

To obtain the seed oil - The fruits of Neem were depulped and seeds were thoroughly washed with tap water and air dried at room temperature (humidity of 15%) for 2-3 days until they get a brown color [Kaura et al., 1998]. The seeds were pressed in a mechanical press and 4 kg of the seeds produced 0.5L of oil with 0.1% of azadirachtin. As Neem oil is hydrophobic, an emulsion (a mixture of two immiscible substances) was done to solubilize it in water. The Tween 80 and Tween 20 are a series of nonionic surfactants derived from sorbitan esters used to stabilize the emulsion.

To obtain the water extract of leaf – 12.5g of dried leaves of Neem were mixed on a blender with one liter of distilled water. Then this solution were kept resting for 12 hours (for the most part of the active ingredient pass to liquid medium). The brownish-clear solution was then passed through a 0.2-micron filter to remove any bacterial and fungal contaminants [Wolinsky et al., 1996; Guirado and Ambrosano, 2004], stored in a sterile flask and used as needed.

Statistical analysis – Shapiro-Wilk test indicated that the microhardness and transverse microhardness data were not normally distributed. Therefore, pairwise comparisons between groups were performed using a nonparametric test (Kruskal-Wallis) with differences considered statistically significant for p values less than 5%.

The results for pH were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). The level of significance was set at $p < 0.05$.

The P results were transformed in square root and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). The level of significance was set at $p < 0.05$.

Statistical analyses were carried out using Biostat 3.0 and SAS v 8.2 for Macintosh and Windows, SAS Institute Incorporation, USA. Pearson's correlation coefficient (r) was used to express the correlations between Microhardness X pH; Microhardness X P and pH X P. A p value less than 0.0001 was considered as statistically significant.

Results

Enamel Microhardness - The microhardness profile are summarized as changes that occurred in the outer enamel surface using mean values for each group (Table. 1). Statistical comparison of the data showed that Chlorhexidine gluconate mouthwash's group (0.12%) was statistically different from 0.5% Neem emulsion, 1% Neem emulsion, 5% leaf extract and control group ($p < 0.05$). No statistical difference was observed between Chlorhexidine gluconate mouthwash, Water, Neem dentifrice, 10% and 25% Neem leaf extract. ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis's test).

The analysis of transverse microhardness by Kruskal-Wallis's test showed a mineral loss at 20 μm distance from the surface only, however, this loss was not significant among the groups (data not showed).

Hydrogen ion concentration (pH) - The final pH values reached by the demineralization media were significantly different between the groups ($p < 0.05$) (Table.2). When compared with Chlorhexidine gluconate mouthwash's group (0.12%), almost all groups, except Neem dentifrice's group, showed a statistical mean difference for pH ($p < 0.05$, ANOVA).

Phosphorus (P) content - Analysis of experimental groups indicated that all groups lost more P than chlorhexidine gluconate mouthwash's group (0.12%) ($p < 0.05$). The Neem dentifrice's group not showed a statistical difference between Water's, 10% and

25% Leaf extract's groups. All groups were differently from chlorhexidine gluconate mouthwash. The Water's group and the Leaf's groups (5%, 10%, 25%) were not different statistically ($p < 0.05$, ANOVA) (Table. 3).

The Pearson's correlation for Microhardness and Phosphorus was positive ($r = 0.6417$; $p < 0.0001$). For Microhardness and pH the correlation was negative ($r = - 0.6103$; $p < 0.0001$). Also for pH and Phosphorus the correlation was negative ($r = - 0.8007$; $p < 0.0001$).

Discussion

The results presented here are unexpected. First, the oil of Neem in an emulsion of Tween 80 and Tween 20 appears to increase the demineralization produced by the *S mutans* experimental biofilm, so as the control containing the Tweens and water (fig. 1). This could be explained by the presence of Tweens, which might have increased the glucosyltransferases produced by *S mutans* strain PS14 [Tomita et al., 1998] and the possible inactivity of Neem in this formulation. Other formulations with extravon, eumulgin HRE40, lauril-sodium sulphate were tried. However, the extravon itself was bactericidal for *S mutans* and the others substances did not make a homogeneous solution. This would not allow verifying the real effects of the tested extracts.

Second, the Neem based dentifrice, 25% and 10% Neem leaf's extract and Water produced a demineralization that did not have significantly mean with. However, the Chlorhexidine gluconate mouthwash's group (0.12%), as assessed by microhardness was almost significantly different from the water and the Neem containing dentifrice ($p = 0.06$).

This *in vitro* model was sensitive to the anticariogenic effect of a chlorhexidine preparation (0.12%). This effect of chlorhexidine is due to its bactericidal effect against the *streptococcus mutans* [Emilson, 1994; Bowden, 1996]. In spite of the results of Vanka et al. [2001] that showed that Neem mouthwashes inhibit *streptococcus mutans*, the results

presented in this study did not show the activity of Neem extracts against oral *streptococci* virulence factors also observed by Wolinsky et al. [1996]. Pai et al. [2004] showed in their study the clinical efficacy of two formulations containing chlorhexidine gluconate and Neem extract with a commercial available gluconate mouthwash and concluded that the antiplaque activity of Neem extract gel (5%w/w) was similar to chlorhexidine gluconate gel (0.2%w/w). The data showed in this study did not exhibit similarity of chlorhexidine gluconate and Neem extracts activities.

It is possible that another Neem oil or extract, in other formulation, could have a demineralizing effect. Wolinsky et al. [1996] raised the question that it may possess some anti-plaque properties, specially because Elvin-Lewis [1980] calls attention to the fact that dentists working in areas, where there is a widespread use of Neem, report effectiveness in reducing certain plaque-related diseases (gingivitis, periodontitis). The firsties studies about Neem in Brazil were made in 1986 and involved its use as an ecological control of plagues. However, despite the availability of commercial dental products (dentifrices, mouthwashes) using Neem components in Brazil no study had been published up to now. They are scanty in the international dental literature as well.

The **P** results reflected the changes in microhardness and they were similar to those shown using the microhardness methodology. The groups that contained the Neem extracts did not diminish the loss of Phosphorus as the Chlorhexidine gluconate mouthwash's group (0.12%).

As a substitute for human teeth, this study chose bovine teeth as many others investigations. Their advantages are both availability and size [Schilke et al., 1999]. Although the composition of bovine enamel is not the same as human enamel, the effects of fermenting plaque and additives on bovine enamel could be expected to be reasonably similar to the effects on human enamel [Luoma et al., 1983].

As an *in vitro* study, this study has limitations. One is that in the mouth there is the presence of saliva. Saliva contains proline-rich proteins, which might interact with tannins from plants, including Neem, [Hagerman and Butler, 1981] via hydrogen bonding which may result in an inhibition of bacterial adherence. The inhibition of bacterial metabolism is only one of the mechanisms by which a drug may exert an anti-disease effect. Another point is that it might be that Neem components are more effective against periodontal disease microorganisms, as showed by Patel and Venkatakrishna [1988] and Husain et al. [1992], than against the cariogenic ones.

Another topic to be raised is that the azadirachtin is the most active in more than a hundred terpenoid compounds that have been identified from different parts of the Neem tree [Akhila and Rani, 1999]. Thus, an investigation on the components of the oil and extract here tested are worthy, however, this was out of the aims for this study.

Results suggested that the Neem extracts used in this *in vitro* study do not have anticariogenic activity. Further studies are being conducted in our laboratories in order to disclose if any anti-caries effect can be ruled out.

Acknowledgments

This study was a part of Post-graduated Program in Dentistry - Pediatric Dentistry - of FOP/UNICAMP and has been supported by FAPEAL. We gratefully acknowledge Dr. Nivaldo Guirado for the samples and instructions about Neem; Professor Glaucia Ambrosano for the statistical review. We would also like to thank Dra. Círia Vieira for the preparation of Neem`s emulsions and Cleone, Cristina and Flavia for technical assistance. We are thankful for the work done at the Preventive Dentistry Laboratory of the Federal University of Alagoas.

References

- Akhila A, Rani K.: Chemistry of the Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss.). Fortschr Chem Org Naturst 1999; 78: 47-149. Review.
- Bhowmick BN, Choudhary BK: Antifungal activity of leaf extracts of medicinal plants on *Alternaria alternata*. Indian Bot Reporter. 1982; 1: 164.
- Bowden GH: *Mutans streptococci* caries and chlorhexidine. J Can Dent Assoc 1996; 62: 703-7.
- Chattopadhyay RR. Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azadirachta indica* leaf extract: Part V: J Ethnopharmacol. 1999; 60:337-41.
- Chen PS, Toribara TY, Warner H: Microdetermination of Phosphorus. Anal Chem 1956; 28: 1756-8.
- Elvin-Lewis M: Plants use for teeth-cleaning throughout the world. J Prev Dent 1980; 6:61-70.
- Emilson CG: Potential efficacy of chlorhexidine against *mutans streptococci* and human dental caries. J Dent Res 1994; 73: 682-91.
- Featherstone JDB, ten Cate JM, Arends J: Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res 1983; 17: 385-91.
- Featherstone JDB, Shariati M, Brugler S, Fu J, White DJ: Effect of an anticalcific dentifrice on lesion progression under pH cycling conditions *in vitro*. Caries Res 1988; 22: 337-41.
- Gold OG, Jordan HV, Van Houte J: A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1976; 13:57-64.
- Guirado N, Ambrosano E: Cultive and use of Neem; in Technical Production Center (ed), 2004, vol. 1, 102p. [in Portuguese]

Hagerman AE, Butler LG: The specificity of proanthocyanidin protein interactions. J Biol Chem 1981; 256: 4494-7.

Husain A, Virmani OP, Popli SP, Misra LN, Gupta MM, Srivastava GN, Abraham Z, Singh AK: Dictionary of Indian Medicinal Plants. Vap Enterprises, New Delhi 1992, pp 62-3.

Ikeda T, Mukasa T, Iagi S, Ochiai K, Doi Y, Shiota T, Sandham HJ: The characteristics of *Streptococcus mutans* PS-14. Nihon Univ J Oral Sci 1975; 1: 202-8.

Kaura SK, Gupta SK, Chowdhury JB: Morphological and oil content variation in seeds of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from northern and western provenances of India. Plant Foods Hum Nutr 1998; 52(4):293-8.

Knoop F, Peters CG, Emerson WB: A sensitive pyramidal-diamond tool for indentation measurements. J Res Natl Bur Stand 1939; 23: 39-61.

Koul O, Isman MB, Ketkar CM: Properties and uses of Neem, *Azadirachta indica*. Can J Bot 1990; 68: 1.

Luoma AR, Raisanen J, Luoma H, Turtola L: Bovine enamel hardness and its Ca-, P-, Mg- e F- contents modified by the bacterium *Streptococcus mutans*, artificial dental plaque and fluoride. Arch Oral Biol 1983; 28: 347-352.

MacKinnon S, Durst T, Arnason JT. Antimalarial activity of tropical *Meliaceae* extracts and Gedunin derivatives: J Nat Prod. 1997; 60: 336-41.

National Research Council: Neem – A tree for solving global problems. Washington, DC: National Academic Press, 1992.

Pai MR, Acharya LD, Udupa N: The effect of two different dental gels and a mouthwash on plaque and gingival scores: a six-week clinical study. Int Dent Journal 2004; 54: 219-23.

Patel VK, Venkatakrishna BH: Folklore therapeutic indigenous plants in periodontal disorders in India (review). Int J Clin Pharmacol and Therapeutic Toxicol. 1988; 26: 176–84.

Rao AR, Sukumar S, Paramasivam TV, Kamalakshi S, Parashuraman AR, Shanta M: Study of antiviral activity of tender leaves of margosa tree (*Melia azadirachta*) on vaccinia and variola virus – a preliminary report. *Ind J Med Res.* 1969; 57:495.

Rao DVK, Singh I, Chopra P, Chhabra PC, Ramanujalu G: *In vitro* antibacterial activity of Neem oil. *Ind J Med Res* 1986; 84: 314-6.

Riar SS, Bardhan J, Thomas P, Kain AK, Parshad R. Mechanism of antifertility action of Neem oil: *Ind J Med Res.* 1988 Oct; 88: 339-42.

Schilke R, Baub O, Lisson JA, Schuckar M, Geurtsen W: Bovine dentin as a substitute for human dentin shear bond strength measurements. *Am J Den* 1999; 12(2):92-6.

Silva MFdeA, Burgess RC, Sandham HJ: Effects of cheese extract and its fractions on enamel demineralization *in vitro* and *in vivo* in Humans. *J Dent Res* 1987; 66(10): 1527-31.

Tomita Y, Watanabe T, Takeuchi T, Nanbu A, Shinozaki N, Ikemi T, Fukushima K: Effects of surfactants on glucosyltransferases production and *in vitro* sucrose-dependent colonization by *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 735-40.

Turtola LO: Enamel microhardness and fluoride uptake underneath fermenting and non-fermenting artificial plaque. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 373-9.

Vanka A, Tandon S, Rao SR, Udupa N, Ramkumar P: The effect of indigenous Neem *Azadirachta indica* [correction of (*Adirachta indica*)] mouth wash on *Streptococcus mutans* and lactobacilli growth. *Indian J Dent Res* 2001; 12(3): 133-44.

Venugopal T, Kulkarni VS, Nerurker RA, Damle SG, Patnekar PN: Epidemiological study of dental caries. *Indian J Pediatr* 1998; 65(6): 883-9.

Wolinsky LE, Mania S, Nachnani S, Ling S: The inhibiting effect of aqueous *Azadirachta indica* (Neem) extract upon Bacterial Properties influencing *in vitro* plaque formation. *J Dent Res* 1996; 75(2): 816-22.

Headings for tables and legends for illustrations.

Table 1. Mean changes in indentation length (μm) produced by the different group treatments.

Table 2. The pH-values of *S mutans* plaque kept on the enamel surface, measured after 18h incubation of enamel slabs .

Table 3. Means for P ($\mu\text{g/ mL}$) in the experimental groups.

Groups	Count	Median	Minimum value	Maximum value	Mean Rank
I. Water	9	25.0800	10.5600	34.7200	31.8889 ^{bc}
II. Chlorhexidine mouthwash (0.12%)	9	5.5200	-2.8600	15.1800	5.6667 ^c
III. Neem Dentifrice	9	23.7600	13.3600	35.2200	29.2222 ^{bc}
IV. 0.5% Neem Emulsion	9	102.70000	43.1600	160.2200	71.1111 ^a
V. 1% Neem Emulsion	9	89.6200	7.3000	129.3800	59.6667 ^{ab}
VI. 5% Neem Leaf extract	9	32.3400	21.1600	43.1000	44.0000 ^{ab}
VII. 10% Neem Leaf extract	9	27.5000	6.9800	55.8800	39.7778 ^{abc}
VIII. 25% Neem Leaf extract	9	21.0800	13.4400	31.9600	27.1111 ^{bc}
IX. Control	8	54.6900	25.3600	116.1400	58.0000 ^{ab}

Means followed by distinct letters are statistically different by the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

Groups	Count	Mean ± S. D.
I. Water	9	5.087 ± 0.129 ^b
II. Chlorhexidine mouthwash (0.12%)	9	5.658 ± 0.146 ^a
III. Neem Dentifrice	9	5.687 ± 0.087 ^a
IV. 0.5% Neem Emulsion	9	4.316 ± 0.085 ^d
V. 1% Neem Emulsion	9	4.520 ± 0.148 ^c
VI. 5% Neem Leaf extract	9	5.078 ± 0.048 ^b
VII. 10% Neem Leaf extract	9	5.067 ± 0.119 ^b
VIII. 25% Neem Leaf extract	9	5.067 ± 0.086 ^b
IX. Control	8	4.429 ± 0.140 ^c

Means followed by distinct letters are statistically different by ANOVA ($p < 0.05$).

Groups	Count	Mean ± S. D.
I. Water	9	15.032 ± 4.692 ^{cd}
II. Chlorhexidine mouthwash (0.12%)	9	0.455 ± 1.365 ^e
III. Neem Dentifrice	9	8.961 ± 4.28 ^d
IV. 0.5% Neem Emulsion	9	36.417 ± 19.854 ^a
V. 1% Neem Emulsion	7	46.231 ± 7.107 ^a
VI. 5% Neem Leaf extract	9	17.863 ± 4.577 ^c
VII. 10% Neem Leaf extract	9	17.349 ± 1.563 ^{cd}
VIII. 25% Neem Leaf extract	9	14.372 ± 5.771 ^{cd}
IX. Control	8	29.35 ± 9.622 ^b

Means followed by distinct letters are statistically different by ANOVA ($p < 0.05$).

3. CONCLUSÃO GERAL

Os extratos de Nim utilizados neste estudo não apresentam atividade anticariogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. Akhila A, Rani K. Chemistry of the Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Fortschr Chem Org Naturst** 1999; 78: 47-149. Review.
2. Aruna K, Sivaramakrishnan VM. Indian Plant products as protective agents against cancer. **J Exp Biol.** 1990 Nov; 28(11): 1008-11.
3. Bandyopadhyay U, Biswas K, Sengupta A, Moitra P, Dutta P, Sarkar D et al. Clinical studies on the effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract on gastric secretion and gastroduodenal ulcer. **Life Sci.** 2004 Oct 29; 75(24): 2867-78.
4. Bhowmick BN, Choudhary BK. Antifungal activity of leaf extracts of medicinal plants on *Alternaria alternata*. **Indian Bot Reporter.** 1982; 1: 164.
5. Chattopadhyay RR. Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azadirachta indica* leaf extract: Part V. **J Ethnopharmacol.** 1999; 60:337-41.
6. Elvin-Lewis M. Plants use for teeth-cleaning throughout the world. **J Prev Dent.** 1980; 6: 61-70.
7. Garg S, Taluja V, Upadhyay SN, Talwar GP. Studies on the contraceptive efficacy of Praneem polyherbal cream. **Contraception.** 1993 Dec; 48(6): 591-6.
8. Kaura SK, Gupta SK, Chowdhury JB. Morphological and oil content variation in seeds of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from northern and western provenances of India. **Plant Foods Hum Nutr.** 1998; 52(4):293-8.
9. Khan PK, Awasthy KS. Cytogenetic toxicity of Neem. **Food and Chemical Toxicol.** 2003; 41:1325-8.
10. Kumar S, Suresh PK, Vijayababu MR, Arunkumar A, Arunakaran J. Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3). **J Ethnopharmacol.** 2005; Dec 22; [Epub ahead of print].

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

11. MacKinnon S, Durst T, Arnason JT. Antimalarial activity of tropical *Meliaceae* extracts and Gedunin derivatives. **J Nat Prod.** 1997;60: 336-41.
12. Martinez SS. O nim – *Azadirachta indica* – um Inseticida Natural. http://www.pr.gov.br/iapar/ni06_00.html. 2000
13. Pai MR, Acharya LD, Udupa N. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel--a 6-week clinical study. **J Ethnopharmacol.** 2004a; 90(1): 99-103.
14. Pai MR, Acharya LD, Udupa N. The effect of two different dental gels and a mouthwash on plaque and gingival scores: a six-week clinical study. **Int Dent J.** 2004b; 54: 219-23.
15. Patel VK, Venkatakrishna BH. Folklore therapeutic indigenous plants in periodontal disorders in India (review). **Int J Clin Pharmacol and Therapeutic Toxicol.** 1988; 26: 176–84.
16. Rao AR, Sukumar S, Paramasivam TV, Kamalakshi S, Parashuraman AR, Shanta M. Study of antiviral activity of tender leaves of margosa tree (*Melia azadirachta*) on vaccinia and variola virus – a preliminary report. **Ind J Med Res.** 1969; 57:495.
17. Rao DVK, Singh I, Chopra P, Chhabra PC, Ramanujalu G. *In vitro* antibacterial activity of Neem oil. **Ind J Med Res.** 1986; 84: 314-6.
18. Riar SS, Bardhan J, Thomas P, Kain AK, Parshad R. Mechanism of antifertility action of Neem oil. **Ind J Med Res.** 1988 Oct; 88: 339-42.
19. Schmutterer H. **The Neem Tree, source of unique products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes.** Cambridge; Tóquio; 1995.
20. Sidhu OP, Behl HM. Seasonal variations in azadirachtins in seeds of *Azadirachta indica*. **Curr Sci.** 1996; 70(12): 1084-6.
21. Singh UP, Singh DP. Neem in human and plant disease therapy. **J Herb Pharmacother.** 2003; 2(3): 13-28.
22. Vanka A, Tandon S, Rao SR, Udupa N, Ramkumar P. The effect of indigenous Neem *Azadirachta indica* [correction of (*Adirachta indica*)] mouth

- wash on *Streptococcus mutans* and lactobacilli growth. [Abstract]. **Indian J Dent Res.** 2001 Jul-Sep; 12(3): 133-44.
23. Venugopal T, Kulkarni VS, Nerurker RA, Damle SG, Patnekar PN. Epidemiological study of dental caries. [Abstract]. **Indian J Pediatr.** 1998 Nov-Dec; 65(6): 883-9.
24. Wolinsky LE, Sote EO. Inhibiting effect of aqueous extracts of eight nigerian chewing sticks on bacterial properties favouring plaque formation. **Caries Res.** 1983; 17: 253-7.
25. Wolinsky LE, Mania S, Nachnani S, Ling S. The inhibiting effect of aqueous *Azadirachta indica* (Neem) extract upon bacterial properties influencing *in vitro* plaque formation. **J Dent Res.** 1996 Feb; 75(2): 816-22.

DELIBERAÇÃO CCPG – 001/98

Dispõe a respeito do formato das teses de Mestrado e de Doutorado aprovadas pela UNICAMP

Tendo em vista a possibilidade, segundo parecer PG N° 1985/96, das teses de Mestrado e Doutorado terem um formato alternativo àquele já bem estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º - Todas as teses de mestrado e de doutorado da UNICAMP terão o seguinte formato padrão:

- I) Capa com formato único, dando visibilidade ao nível (mestrado e doutorado), e à Universidade.
- II) Primeira folha interna dando visibilidade ao nível (mestrado ou doutorado), à Universidade, à Unidade em foi defendida e à banca examinadora, ressaltando o nome do orientador e co-orientadores. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III) Segunda folha interna onde conste o resumo em português e o Abstract em inglês.
- IV) Introdução Geral.
- V) Capítulo.
- VI) Conclusão geral.
- VII) Referências Bibliográficas.
- VIII) Apêndices (se necessários).

Artigo 2º - A critério do orientador, os Capítulos e os Apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

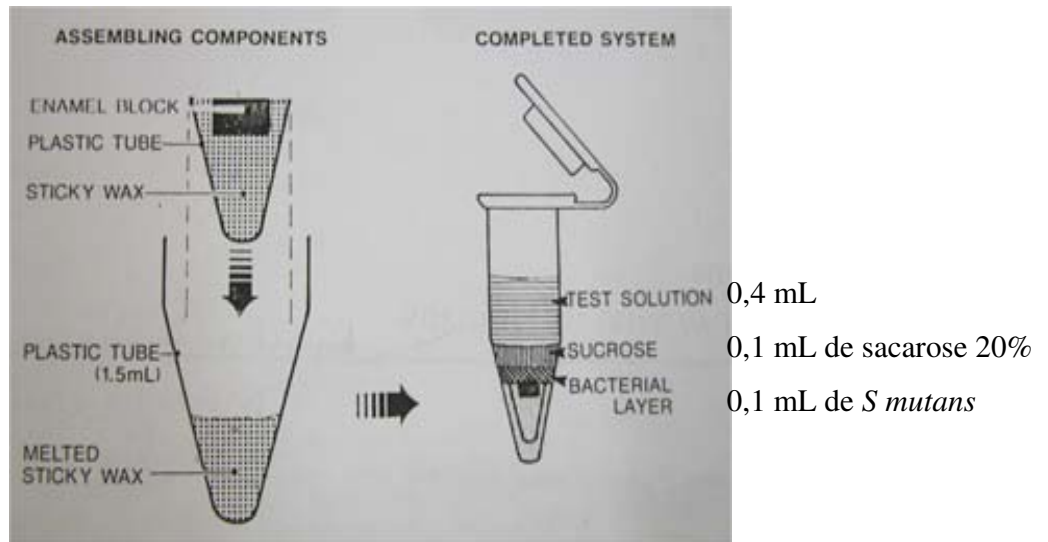
Parágrafo único – Os veículos de divulgação deverão ser expressamente indicados.

Artigo 3º - A PRPG providenciará o projeto gráfico das capas bem como a impressão de um número de exemplares, da versão final da tese a ser homologada.

Artigo 4º - Fica revogada a resolução CCPG 17/97.

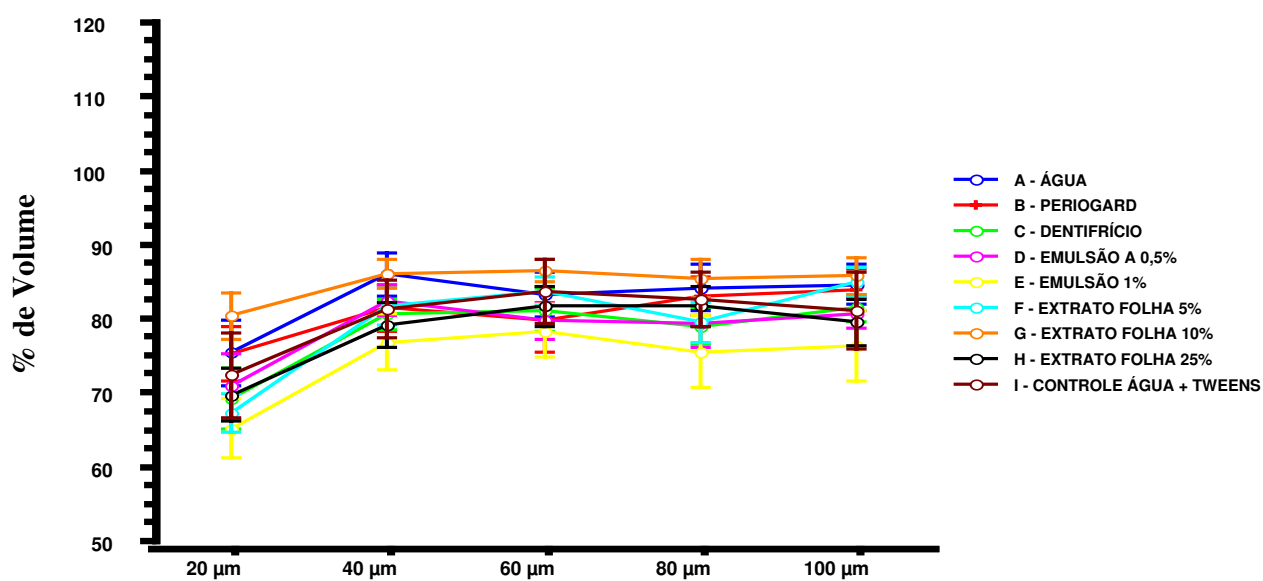
ANEXO 2

Modelo do procedimento de desmineralização.



ANEXO 3

Microdureza Transversal - Conteúdo mineral do esmalte a diferentes profundidades em percentual de volume mineral para todos os grupos (médias \pm desvio padrão [barras pequenas])



ANEXO 4

ANOVA Table for pH

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
GRUPO	8	17.239	2.155	165.650	<.0001	1325.198	1.000
Residual	71	.924	.013				

Means Table for pH

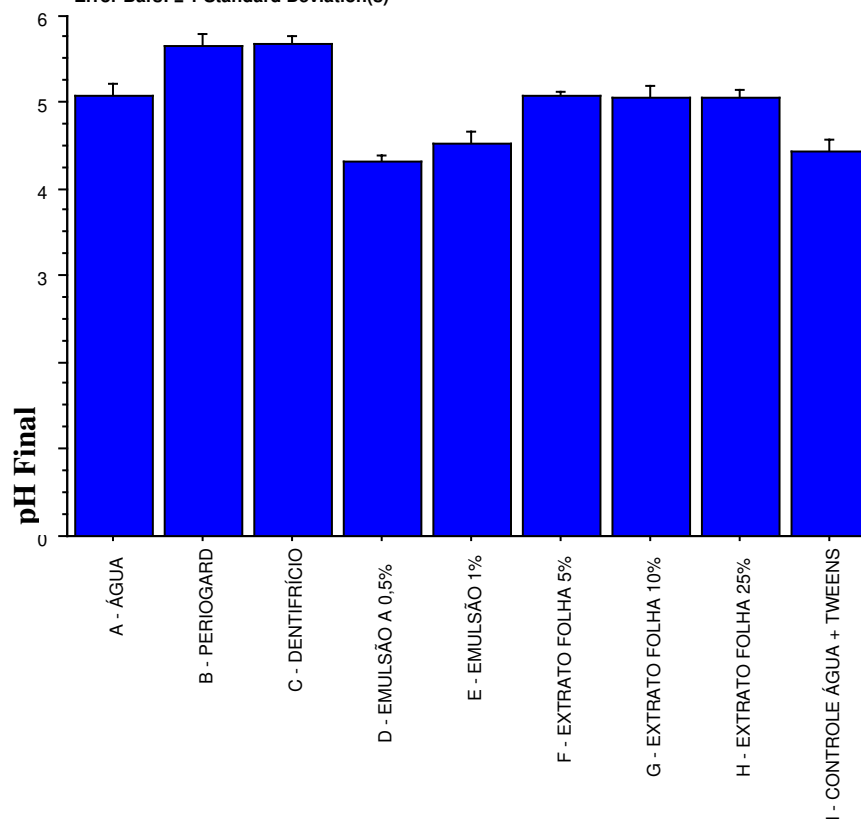
Effect: GRUPO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A - ÁGUA	9	5.087	.129	.043
B - PERIOGARD	9	5.658	.146	.049
C - DENTIFRÍCIO	9	5.687	.087	.029
D - EMULSÃO A 0,5%	9	4.316	.085	.028
E - EMULSÃO 1%	9	4.520	.148	.049
F - EXTRATO FOLHA 5%	9	5.078	.048	.016
G - EXTRATO FOLHA 10%	9	5.067	.119	.040
H - EXTRATO FOLHA 25%	9	5.067	.086	.029
I - CONTROLE ÁGUA + TWEENS	8	4.429	.140	.050

Interaction Bar Plot for pH

Effect: GRUPO

Error Bars: ± 1 Standard Deviation(s)



ANEXO 5

Fisher's PLSD for pH

Effect: GRUPO

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
A - ÁGUA, B - PERIOGARD	-.571	.107	<.0001	S
A - ÁGUA, C - DENTIFRÍCIO	-.600	.107	<.0001	S
A - ÁGUA, D - EMULSÃO A 0,5%	.771	.107	<.0001	S
A - ÁGUA, E - EMULSÃO 1%	.567	.107	<.0001	S
A - ÁGUA, F - EXTRATO FOLHA 5%	.009	.107	.8692	
A - ÁGUA, G - EXTRATO FOLHA 10%	.020	.107	.7110	
A - ÁGUA, H - EXTRATO FOLHA 25%	.020	.107	.7110	
A - ÁGUA, I - CONTROLE ÁGUA + TWEENS	.658	.111	<.0001	S
B - PERIOGARD, C - DENTIFRÍCIO	-.029	.107	.5927	
B - PERIOGARD, D - EMULSÃO A 0,5%	1.342	.107	<.0001	S
B - PERIOGARD, E - EMULSÃO 1%	1.138	.107	<.0001	S
B - PERIOGARD, F - EXTRATO FOLHA 5%	.580	.107	<.0001	S
B - PERIOGARD, G - EXTRATO FOLHA 10%	.591	.107	<.0001	S
B - PERIOGARD, H - EXTRATO FOLHA 25%	.591	.107	<.0001	S
B - PERIOGARD, I - CONTROLE ÁGUA + TWE ...	1.229	.111	<.0001	S
C - DENTIFRÍCIO, D - EMULSÃO A 0,5%	1.371	.107	<.0001	S
C - DENTIFRÍCIO, E - EMULSÃO 1%	1.167	.107	<.0001	S
C - DENTIFRÍCIO, F - EXTRATO FOLHA 5%	.609	.107	<.0001	S
C - DENTIFRÍCIO, G - EXTRATO FOLHA 10%	.620	.107	<.0001	S
C - DENTIFRÍCIO, H - EXTRATO FOLHA 25%	.620	.107	<.0001	S
C - DENTIFRÍCIO, I - CONTROLE ÁGUA + TW ...	1.258	.111	<.0001	S
D - EMULSÃO A 0,5%, E - EMULSÃO 1%	-.204	.107	.0003	S
D - EMULSÃO A 0,5%, F - EXTRATO FOLHA ...	-.762	.107	<.0001	S
D - EMULSÃO A 0,5%, G - EXTRATO FOLHA ...	-.751	.107	<.0001	S
D - EMULSÃO A 0,5%, H - EXTRATO FOLHA ...	-.751	.107	<.0001	S
D - EMULSÃO A 0,5%, I - CONTROLE ÁGUA ...	-.113	.111	.0448	S
E - EMULSÃO 1%, F - EXTRATO FOLHA 5%	-.558	.107	<.0001	S
E - EMULSÃO 1%, G - EXTRATO FOLHA 10%	-.547	.107	<.0001	S
E - EMULSÃO 1%, H - EXTRATO FOLHA 25%	-.547	.107	<.0001	S
E - EMULSÃO 1%, I - CONTROLE ÁGUA + T091	.111	.1041	
F - EXTRATO FOLHA 5%, G - EXTRATO FOL011	.107	.8369	
F - EXTRATO FOLHA 5%, H - EXTRATO FOL011	.107	.8369	
F - EXTRATO FOLHA 5%, I - CONTROLE ÁGU649	.111	<.0001	S
G - EXTRATO FOLHA 10%, H - EXTRATO FO ...	-8.882E-16	.107	>.9999	
G - EXTRATO FOLHA 10%, I - CONTROLE ÁG638	.111	<.0001	S
H - EXTRATO FOLHA 25%, I - CONTROLE ÁG638	.111	<.0001	S

ANEXO 6

ANOVA Table for $\mu\text{g P por mL}$

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Grupo	8	13087.213	1635.902	23.057	<.0001	184.456	1.000
Residual	69	4895.561	70.950				

Means Table for $\mu\text{g P por mL}$

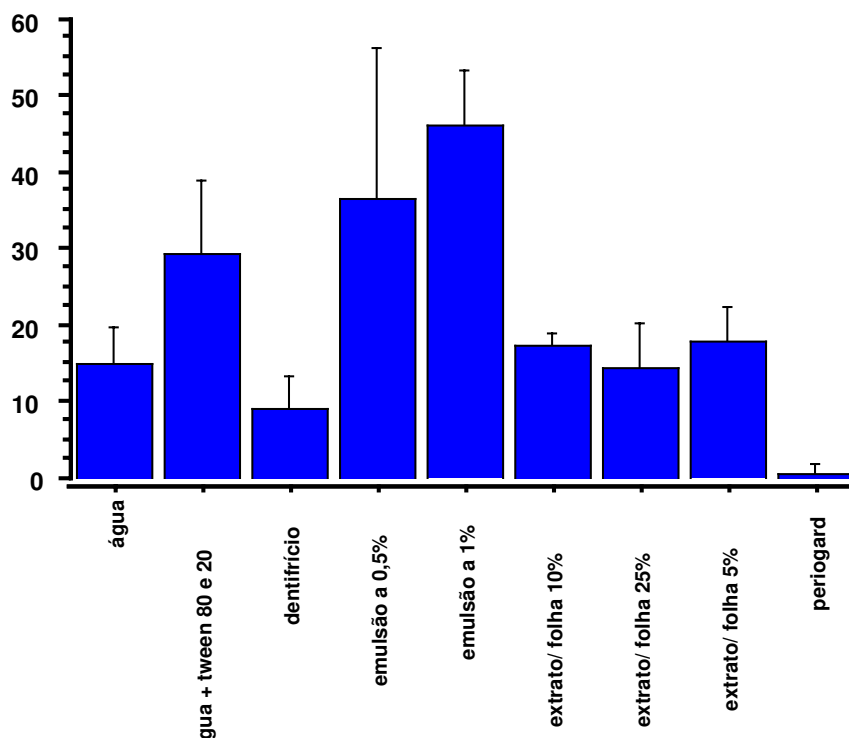
Effect: Grupo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
água	9	15.032	4.692	1.564
água + tween 80 e 20	8	29.350	9.622	3.402
dentífrico	9	8.961	4.280	1.427
emulsão a 0,5%	9	36.417	19.854	6.618
emulsão a 1%	7	46.231	7.107	2.686
extrato/ folha 10%	9	17.349	1.563	.521
extrato/ folha 25%	9	14.372	5.771	1.924
extrato/ folha 5%	9	17.863	4.577	1.526
periogard	9	.455	1.365	.455

Interaction Bar Plot for $\mu\text{g P por mL}$

Effect: Grupo

Error Bars: ± 1 Standard Deviation(s)



ANEXO 7

Fisher's PLSD for µg P por mL

Effect: Grupo

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
água, água + tween 80 e 20	-14.318	8.165	.0008	S
água, dentifrício	6.071	7.921	.1308	
água, emulsão a 0,5%	-21.385	7.921	<.0001	S
água, emulsão a 1%	-31.199	8.468	<.0001	S
água, extrato/ folha 10%	-2.317	7.921	.5614	
água, extrato/ folha 25%	.660	7.921	.8684	
água, extrato/ folha 5%	-2.831	7.921	.4783	
água, periogard	14.577	7.921	.0005	S
água + tween 80 e 20, dentifrício	20.389	8.165	<.0001	S
água + tween 80 e 20, emulsão a 0,5%	-7.067	8.165	.0887	
água + tween 80 e 20, emulsão a 1%	-16.881	8.697	.0002	S
água + tween 80 e 20, extrato/ folha 10%	12.000	8.165	.0046	S
água + tween 80 e 20, extrato/ folha 25%	14.978	8.165	.0005	S
água + tween 80 e 20, extrato/ folha 5%	11.487	8.165	.0065	S
água + tween 80 e 20, periogard	28.895	8.165	<.0001	S
dentifrício, emulsão a 0,5%	-27.456	7.921	<.0001	S
dentifrício, emulsão a 1%	-37.270	8.468	<.0001	S
dentifrício, extrato/ folha 10%	-8.389	7.921	.0383	S
dentifrício, extrato/ folha 25%	-5.411	7.921	.1774	
dentifrício, extrato/ folha 5%	-8.902	7.921	.0282	S
dentifrício, periogard	8.506	7.921	.0357	S
emulsão a 0,5%, emulsão a 1%	-9.814	8.468	.0238	S
emulsão a 0,5%, extrato/ folha 10%	19.068	7.921	<.0001	S
emulsão a 0,5%, extrato/ folha 25%	22.046	7.921	<.0001	S
emulsão a 0,5%, extrato/ folha 5%	18.555	7.921	<.0001	S
emulsão a 0,5%, periogard	35.962	7.921	<.0001	S
emulsão a 1%, extrato/ folha 10%	28.882	8.468	<.0001	S
emulsão a 1%, extrato/ folha 25%	31.859	8.468	<.0001	S
emulsão a 1%, extrato/ folha 5%	28.368	8.468	<.0001	S
emulsão a 1%, periogard	45.776	8.468	<.0001	S
extrato/ folha 10%, extrato/ folha 25%	2.978	7.921	.4559	
extrato/ folha 10%, extrato/ folha 5%	-.513	7.921	.8975	
extrato/ folha 10%, periogard	16.894	7.921	<.0001	S
extrato/ folha 25%, extrato/ folha 5%	-3.491	7.921	.3823	
extrato/ folha 25%, periogard	13.917	7.921	.0008	S
extrato/ folha 5%, periogard	17.408	7.921	<.0001	S