

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

Matheus Henrique Garcia

**Avaliação do potencial de sistemas nanoestruturados mucoadesivos para
administração bucal do peptídeo p1025**

Araraquara – SP

2013

Matheus Henrique Garcia

**Avaliação do potencial de sistemas nanoestruturados mucoadesivos para
administração bucal do peptídeo p1025**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP para obtenção do
grau de Farmacêutico – Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Marco e Maria, que sempre me ajudaram em todo o trajeto durante a faculdade, ao meu orientador Marlus e à Giovana Calixto, que sempre me ajudou e apoiou nos experimentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares por toda atenção, ensinamentos, apoio durante estes anos de graduação e por estarem ao meu lado sempre.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pelos ensinamentos, atenção, apoio e confiança no meu trabalho. Sou muito grato a ele por me proporcionar a realização deste trabalho.

À Giovana Calixto pela atenção e paciência. Sempre tirando minhas dúvidas e auxiliando no que era necessário. Seu apoio foi essencial para o desenvolvimento do meu TCC.

Aos meus amigos de república Guilherme e Robson pela amizade nesses anos.

À todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por todo o conhecimento e auxílios.

À Profa. Denise Spolidorio pela colaboração nos ensaios microbiológicos.

À FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, na forma de bolsa de Iniciação Científica (Processo FAPESP: 2011/19066-6).

RESUMO

A cárie dental é uma das doenças crônico-infecciosas mais comuns no mundo e é potencializada por fatores que favorecem a colonização da bactéria *Streptococcus mutans* na cavidade oral. O presente trabalho visa avaliar o potencial de sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração bucal do peptídeo sintético p1025, potencialmente ativo contra cárie dental. Este peptídeo, análogo aos fragmentos 1025-1044 da adesina celular de *S. mutans* mostrou-se, em estudos recentes, eficaz contra a adesão do patógeno na superfície do biofilme bacteriano. Acredita-se que, se incorporado em sistemas nanoestruturados mucoadesivos, sobretudo os sistemas líquido-cristalinos, sua ação possa ser modulada, pelo fato de que estes sistemas podem se aderir na mucosa bucal, de modo a proteger o peptídeo da degradação enzimática, além de prolongar o tempo de contato com a mucosa, diminuindo assim a frequência de administração. Os sistemas nanoestruturados de liberação controlada foram analisados estruturalmente através de microscopia de luz polarizada, determinação do comportamento reológico, TPA e bioadesão. Os resultados evidenciaram, através das análises de microscopia de luz polarizada, a presença de sistemas líquido-cristalinos de fase hexagonal e lamelar, além de domínios de microemulsões. As análises reológicas mostraram que ao adicionar dispersões poliméricas na fase aquosa do sistema, características como pseudoplasticidade e tixotropia são favorecidas, o que pode facilitar a aplicação do produto na mucosa bucal. O teste de bioadesão mostrou que o emprego de dispersões poliméricas contribuiu para a adesão na mucosa bucal, sendo os melhores resultados obtidos com dispersão de Policarbofil® a 0,5 %. O teste microbiológico demonstrou a potencialização do efeito inibidor/reductor da carga microbiana com a utilização de óleo de melaleuca na fase oleosa do sistema. Os resultados obtidos sugerem que o sistema obtido parece ser promissor no tratamento da cárie dental.

Palavras-chave: Nanotecnologia Farmacêutica; Cárie dental; Sistemas líquido-cristalinos; Peptídeos.

ABSTRACT

Dental caries is the most common chronic infectious disease in the world and is enhanced by factors that ease the colonization of the bacterium *Streptococcus mutans* in the oral cavity. This work aims to evaluate the potential of nanostructured systems for mucoadhesive buccal administration of the synthetic peptide p1025, potentially effective against dental caries. This peptide, analogous to the fragments 1025-1044 of cellular adhesin of *S. mutans* was shown in recent studies, effective against pathogen adhesion of the surface of the biofilm. It is believed that, if incorporated into nanostructured mucoadhesive systems, especially liquid crystalline system, its action can be modulated because these systems can adhere to the oral mucosa so as to protect the peptide from enzymatic degradation, and prolong contact with the mucosa, thereby decreasing the frequency of administration. Nanostructured systems for controlled release were structurally analyzed by polarized light microscopy, rheological characterization, TPA and bioadhesion. The results revealed through the analysis of polarized light microscopy, the presence of liquid crystalline systems of lamellar and hexagonal phase, and areas of microemulsions. Rheological analyzes have shown that by adding the aqueous polymer dispersions of the system, characteristics such as shear thinning and thixotropy are favored, which can ease the application of the product on the buccal mucosa. Bioadhesion test showed that the polymer dispersions contributed to the adhesion in the oral mucosa, with best results obtained with polycarbophil[®] 0.5% dispersion. The microbiological test demonstrated the inhibitory effect of reducing microbial load with tea tree oil in the oil phase of the system. The results obtained suggest that the system seems to be promising in the treatment of dental caries.

Keywords: Pharmaceutical Nanotechnology; dental caries; liquid crystalline systems; Peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama de fases do sistema: Água, Óleo de melaleuca e Procetyl	20
Figura 2.	Diagrama de fases do sistema: Policarbofil (PC) 0,5%, Óleo de melaleuca e Procetyl.	21
Figura 3.	Diagrama de fases do sistema: Carbopol (C974) 0,5%, Óleo de melaleuca e Procetyl.	21
Figura 4.	Diagrama de linhas do sistema Água, Óleo de melaleuca e Procetyl.	22
Figura 5.	Diagrama de linhas do sistema PC 0,5%, Óleo de melaleuca e Procetyl.	22
Figura 6.	Diagrama de linhas do sistema Carbopol 0,5%, Óleo de melaleuca e Procetyl.	23
Figura 7.	Microscopia de F1-A.....	25
Figura 8.	Microscopia de F2-A.....	25
Figura 9.	Microscopia de F3-A.....	25
Figura 10.	Microscopia de F1-P.....	25
Figura 11.	Microscopia de F2-P.....	25
Figura 12.	Microscopia de F3-P.....	25
Figura 13.	Microscopia de F1-C.....	26
Figura 14.	Microscopia de F2-C.....	26
Figura 15.	Microscopia de F3-C.....	26
Figura 16.	Curva de fluxo para F1-A.....	27
Figura 17.	Curva de fluxo para F1-P.....	27
Figura 18.	Curva de fluxo para F1-C.....	28
Figura 19.	Curva de fluxo para F2-A.....	28
Figura 20.	Curva de fluxo para F2-P.....	28
Figura 21.	Curva de fluxo para F2-C.....	29

Figura 22	Curva de fluxo para F3-A.....	29
Figura 23	Curva de fluxo para F3-P.....	29
Figura 24	Curva de fluxo para F3-C.....	30
Figura 25	Avaliação da bioadesão das formulações.....	32
Figura 26	Compressibilidade de F1-A, F1-P e F1-C (N.s).....	34
Figura 27	Dureza de F1-A, F1-P e F1-C (N).....	35
Figura 28	Adesividade de F1-A, F1-P e F1-C (N).....	35
Figura 29	Coesividade de F1-A, F1-P e F1-C.....	35
Figura 30	<i>S.mutans</i> com clorexidina 0,12%.....	38
Figura 31	<i>S.mutans</i> com PBS.....	38
Figura 32	<i>S.mutans</i> com F3-P.....	38
Figura 33	<i>S.mutans</i> com F3-P - p1025.....	38
Figura 34	Placa BHI - teste com clorexidina 0,12%.....	39
Figura 35	Placa BHI – teste com PBS.....	39
Figura 36	Placa BHI – teste com F3-P.....	39
Figura 37	Placa BHI – teste com F3-P – p1025.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulações selecionadas para análises.....	24
Tabela 2	Turvação de <i>S.mutans</i> na placa de well após 48h a 75 rpm.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

SLC – Sistemas Líquido-Cristalinos
T - Tensoativo
O - Óleo
A - Água
SF - Separação de fase
MLP - Microscopia de luz polarizada
TPA - Análise de textura
SLT - Sistema líquido transparente
SLTr - Sistema líquido translúcido
SLO - Sistema líquido opaco
SVT - Sistema viscoso transparente
SVTr - Sistema viscoso translúcido
SVO - Sistema viscoso opaco
ME - Microemulsão
CL - Cristal líquido
CE - Campo escuro
® Marca Registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Preparação das formulações.....	15
3.2 Análise das formulações	16
3.2.1 Microscopia de luz polarizada	16
3.2.2 Determinação do comportamento reológico	16
3.2.3 Avaliação da bioadesão	16
3.3 Ensaio microbiológicos <i>in vitro</i>	16
3.3.1 Preparo da suspensão bacteriana	16
3.3.2 Preparação de saliva.....	17

3.3.3	Obtenção dos blocos de esmalte	18
3.3.4	Adesão de <i>S. mutans</i> nos blocos de esmalte.....	19
3.3.5	Indicativo de crescimento presente no biofilme inicial.....	19
3.4	Análise estatística.....	20
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	Preparação das formulações.....	23
4.2	Análise das formulações	23
4.2.1	Microscopia de luz polarizada	23
4.2.2	Determinação do comportamento reológico	26
4.2.3	Avaliação da bioadesão.....	31
4.2.4	TPA (Texture profile analysis)	33
4.3	Ensaio microbiológicos <i>in vitro</i>	36
4.3.1	Adesão de <i>S. mutans</i> nos blocos de esmalte	36
4.3.2	Indicativo de crescimento presente no biofilme inicial.....	36
5.	CONCLUSÃO	40
6.	REFERÊNCIAS.....	40

I. INTRODUÇÃO

Peptídeos, como o p1025, tornaram-se fármacos de escolha para tratamento de diversas doenças, pois apresentam alta seletividade e eficácia e, em geral, causam menos efeitos colaterais, como a resistência bacteriana, possuindo dessa forma grande potencial para a prevenção da doença ao invés de apenas tratar os sintomas. Portanto, uma grande variedade de fármacos peptídicos está sendo produzida em escala comercial como resultado das vantagens apresentadas, além do avanço no campo da biotecnologia (MORISHITA *et al.*, 2006).

No entanto, observa-se grande dificuldade na administração de peptídeos, sobretudo por via oral, devido principalmente às propriedades físico-químicas dessas moléculas, como por exemplo, a suscetibilidade à degradação proteolítica enzimática devido à hidrólise ácida, o efeito de primeira-passagem hepático, meia vida biológica curta e alto peso molecular (ICHIKAWA *et al.*, 2003).

Dessa forma, algumas estratégias podem ser adotadas para se administrar peptídeos, como, por exemplo, a escolha de vias alternativas à oral para administração, como a via bucal, que é um alvo atrativo para a administração de tais substâncias, pois fornece um ambiente propício devido à baixa atividade enzimática quando comparada com outras vias (MILLER *et al.*, 2005). Em adição, esta via permite fácil aplicação de formulações e é bem aceita pelos pacientes, permitindo fácil remoção do medicamento em possíveis casos de efeito colateral (SENEL *et al.*, 2001).

Por outro lado, a mucosa bucal apresenta baixa permeabilidade, pequena área de superfície e secreção contínua de saliva (0,5 – 2 L/dia), que podem levar à diluição do fármaco e à sua baixa retenção no local de aplicação resultando em baixa biodisponibilidade do peptídeo (MILLER *et al.*, 2005). Dessa forma, sob o aspecto tecnológico, pode ser interessante a utilização de sistemas nanoestruturados, com o objetivo de aumentar a retenção local do fármaco, permitindo sua liberação controlada (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Dentre os sistemas nanoestruturados, tem-se destacado nos últimos anos o estudo de sistemas líquido-cristalinos. Trata-se de sistemas termodinamicamente estáveis, que são formados com baixo fornecimento de energia, os quais

apresentam estabilidade e potencial para aplicação em pele e mucosas (BUNGES *et al.*, 2005).

Os sistemas líquido-cristalinos caracterizam-se por uma fase distinta de estruturas condensadas, cujas características físicas os posicionam entre sólidos e líquidos, com parcial ordem/ desordem das espécies atômicas. Por isso, são também chamados de mesofases (fases intermediárias). Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos, enquanto que cristais líquidos termotrópicos têm sua estabilidade dependente da temperatura. Conforme ocorre aumento da concentração de tensoativos, podem ser formadas diferentes formas líquido-cristalinas: lamelares, hexagonais e cúbicas (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Especificamente sobre cristais-líquidos liotrópicos, estes estão atraindo cada vez mais e mais atenção por causa de suas propriedades físico-químicas e de microestrutura únicas. Várias moléculas bioativas como fármacos, proteínas e peptídeos podem ser solubilizados tanto na fase aquosa quanto na fase oleosa e podem, desta forma, serem protegidos de hidrólise ou oxidação, além de terem sua liberação modulada (GUO *et al.*, 2010).

Lee *et al.* (2000) estudaram a permeabilidade bucal de [d-Ala², d-Leu⁵] encefalina (DADLE) incorporada em fases líquido-cristalinas cúbicas e lamelares, empregando monoelato de glicerila (GMO) como fase oleosa. Os resultados demonstraram que o fluxo de DADLE foi muito maior para este peptídeo incorporado em fases cúbicas e lamelares quando comparado ao fluxo a partir de solução de PBS, sugerindo que estas fases podem ser consideradas promissoras na liberação controlada deste peptídeo.

Na obtenção de sistemas líquido-cristalinos, podem ser utilizados como componentes de formulação misturas de óleos, água e tensoativos (FORMARIZ *et al.*, 2005). Dessa forma, pode ser interessante incorporar como fase oleosa do sistema o óleo de melaleuca ou TTO (*tea tree oil*), pois a utilização do TTO em aplicações dentais tem demonstrado ser promissora no combate ao *S. mutans*. O efeito de 0,2% de TTO em enxaguatório bucal e dois outros agentes ativos na flora oral de 40 voluntários sugeriu que o TTO usado diariamente por sete dias poderia

reduzir o número de *S. mutans* e o número total de bactérias orais, comparado com o tratamento placebo. Os dados também indicam que a redução microbiana foi mantida por duas semanas depois do término do tratamento (CARSON *et al.*, 2006).

O óleo de melaleuca é um óleo volátil essencial (extraído da folha) derivado principalmente da espécie *Melaleuca alternifolia*, planta nativa da Austrália. Empregado largamente por suas propriedades antimicrobianas, pode ser incorporado como ingrediente ativo em muitas formulações tópicas (COX *et al.*, 2000). Este óleo é composto por hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpeno, sesquiterpeno e seus alcoóis associados. Considerando sua atividade biológica, a atividade antimicrobiana é atribuída principalmente ao terpinen-4-ol (CARSON *et al.*, 2006).

Estudo de Prabhakar *et al.* (2009) tem mostrado que a ação antimicrobiana é atribuída aos hidrocarbonetos, que rompem as membranas biológicas, interrompendo assim as funções vitais da bactéria.

Um estudo realizado na Índia com 36 crianças entre 9 e 11 anos, utilizando bochechos à partir de folhas de curry, alho ou óleo de melaleuca, demonstrou significativa redução da atividade de *S. mutans* e *Lactobacilli* a partir de contagem em placas inoculadas com as salivas. Também foi observado que a manutenção dos baixos níveis de micro-organismos foi observada somente para o alho e óleo de melaleuca no 14º dia do estudo (PRABHAKAR *et al.*, 2009). Outros estudos mostraram que TTO também é eficaz contra diversos micro-organismos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (COX *et al.*, 2000).

Na fase aquosa do sistema líquido cristalino, pode ser interessante a incorporação de polímeros mucoadesivos na formulação para maior fixação do sistema nanoestruturado no seu local de ação. Tais polímeros possuem a propriedade de aderir à mucosa e reter, dessa forma, grande quantidade de fármaco no local de aplicação, propiciando liberação de forma controlada do fármaco e contornando, desta forma, possíveis desvantagens apresentadas pela aplicação na mucosa bucal, como a salivagem e os movimentos da deglutição. (MILLER *et al.*, 2005). O termo mucoadesão pode ser definido como a capacidade de aderência à

camada de muco que recobre os órgãos que estão expostos na superfície externa do corpo não coberto com pele (PINHAS *et al.*, 2010).

Os mecanismos de fixação de polímeros em mucosas ainda não estão totalmente compreendidos. No entanto, certas teorias têm sugerido que a fixação pode ocorrer através de entrelaçamento físico (teoria da difusão) e/ou interações químicas, como eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações de van der Waals (teorias eletrônicas e de adsorção), que podem ser afetadas pelo peso molecular, flexibilidade, capacidade de ligação de hidrogênio, concentração e hidratação (intumescimento) do polímero (MILLER *et al.*, 2005).

Acredita-se, portanto, que o sistema líquido-cristalino no qual se pretende incorporar o peptídeo prolongue o seu tempo de contato com a superfície do substrato biológico, diminuindo assim a frequência de administração e o risco de efeitos colaterais, acarretando, dessa forma, em provável aumento da adesão do paciente ao tratamento. O sistema proposto será composto por álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl[®] AWS) como tensoativo, óleo de melaleuca como fase oleosa e uma dispersão de policarbofil (Noveon[®] AA-1) 0,5% como fase aquosa. O emprego da dispersão de policarbofil justifica-se pelo aumento da mucoadesão que propiciará à formulação, pois em estudos anteriores demonstrou ser capaz de aderir à mucosa do esôfago suíno exibindo maior força mucoadesiva durante o teste de mucoadesão, quando comparado a outros polímeros (PATEL *et al.*, 2011), além de ser interessante por proteger fármacos peptídicos da degradação, por competir com enzimas proteolíticas (MILLER *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana e ação sobre o biofilme dental de sistemas nanoestruturados mucoadesivos incorporados de peptídeo sintético p1025 serão realizados, pois são fundamentais no sentido de se estabelecer parâmetros seguros e confiáveis para seu futuro uso com fins terapêuticos.

II. OBJETIVOS

- Desenvolver sistemas nanoestruturados mucoadesivos para incorporação de peptídeo p1025 contra *Streptococcus mutans*.
- Caracterizar físico-quimicamente os sistemas por meio de microscopia de luz polarizada, reologia e avaliação da bioadesão *in vitro*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e ação *in vitro* sobre o biofilme dental do p1025, incorporado ou não no SLC, comparado com o padrão-ouro clorexidina.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação das formulações

O peptídeo p1025 foi fornecido pelo Grupo de Pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química - UNESP - Campus Araraquara, o qual foi responsável por sua síntese, caracterização e purificação. Os componentes (óleo de melaleuca (O) e álcool cetílico etoxilado propoxilado (ST)) foram pesados em balanças semi-analítica e analítica, sendo transferidos para frascos transparentes e posteriormente titulados com fase aquosa (A), constituída de água ou dispersão de Policarbofil[®] 0,5% ou dispersão de Carbopol 974[®] 0,5%. Os sistemas foram preparados por mistura direta de seus componentes. Transições de mistura semi-sólida para sistema líquido transparente, sistema viscoso transparente ou sistema opaco foram detectadas visualmente contra fundo escuro. Para obtenção dos diagramas ternários foram usadas relações de ST/O na faixa de 1:9 até 9:1. O peptídeo foi adicionado numa concentração de 900 µmol/L na fase aquosa, conforme estudos de Kelly e colaboradores (1998) e Li e colaboradores (2009), que demonstraram que esta faixa de concentração peptídeo apresenta efeito inibitório na aderência de *S. mutans*.

3.2 Análise estrutural das formulações

3.2.1 Microscopia de luz polarizada

As análises foram realizadas colocando-se pequena quantidade da formulação sobre uma lâmina de vidro e coberto com uma lamínula, as quais foram analisadas com um microscópio de luz polarizada Jenamed, Carl Zeiss, avaliando-se a homogeneidade das dispersões, observando a presença de anisotropia (indicativo de presença de cristais líquidos) (CHORILLI *et al.*, 2009).

3.2.2 Determinação do comportamento reológico

Os sistemas foram analisados por medidas reológicas usando reômetro de tensão controlada Carri Med CSL 100, modelo CLS 100, com dispositivo placa – placa de 20 mm de diâmetro, empregando ensaios de escoamento e mecânico-dinâmicos ou de oscilação (JONES *et al.*, 2009).

3.2.3 Avaliação da bioadesão

Um analisador de textura TAXTplus foi utilizado, empregando como membrana blocos de esmalte de dente bovino. Com os resultados obtidos, uma curva força-distância foi construída, em que foram obtidos a força de separação e o tempo de contato, o pico da força, trabalho de tração e a deformação do sistema até a ruptura. Os ensaios foram realizados em triplicata (KOFII *et al.*, 2006).

3.3. Ensaio microbiológicos *in vitro*

Os ensaios microbiológicos foram realizados na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em colaboração com a Profa. Dra. Denise M. P. Spolidorio.

3.3.1 Preparo da suspensão bacteriana

O *S. mutans* (ATCC 25175) foi reativado em 5 mL de BHI (Brain Heart Infusion, Acumedia) em jarra de microaerofilia a 37 °C por 18 h. Após o crescimento,

a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos e as células foram lavadas 2 vezes com tampão PBS estéril. Em seguida, o material teve sua turbidez ajustada em espectrofotômetro (Eppendorf AG, Hamburg) até atingir absorvância similar à 0,15 em 600 nm que corresponde a uma suspensão para solução estoque de 1×10^7 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Foi feita a leitura em espectrofotômetro e a absorvância observada foi de 0,954. Como a absorvância desejada é de 0,15 o ajuste teve que ser feito. Foram utilizados 8 blocos de dente para o experimento e em cada poço usou-se 1 mL da solução de *S.mutans*, a quantidade total desejada de suspensão de *S.mutans* é 8 mL. Logo, o seguinte cálculo ($C_1 =$ DO encontrada, $V_1 =$ volume da suspensão a ser utilizada, $C_2 =$ DO desejada e $V_2 =$ volume total desejado) foi feito:

$$\begin{aligned} C_1 \times V_1 &= C_2 \times V_2 \\ 0,954 \times V_1 &= 0,15 \times 8 \\ V_1 &= 1,26 \text{ mL} \end{aligned}$$

Com isso, o tubo de *S.mutans* foi preparado adicionando 1,26 mL da suspensão de 0,954 e 6,74 mL de BHI (totalizando 8 mL, que é a quantidade total desejada para o ensaio).

3.3.2 Preparação de saliva

O método para preparação de saliva foi baseado no método descrito por Moura e colaboradores (2006). A saliva não estimulada foi obtida de vários doadores adultos e saudáveis, de ambos os sexos, e que não fizeram uso de antibióticos, soluções para bochecho ou qualquer outro medicamento conhecido por afetar a composição e fluxo salivar, nos últimos três meses. A saliva foi coletada em tubos Falcon resfriados por gelo e, posteriormente, uma quantidade igual de saliva de cada doador foi misturada, homogeneizada e submetida à centrifugação 10.000 g por 5 minutos a 4 °C (MOURA, *et al.*, 2006), sendo, em seguida, filtrada por meio de sistema de filtração com membrana de 0,22 µm (PEROS & GIBBONS, 1981) e armazenada a -70 °C. É importante salientar que esta etapa do projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, sob o protocolo 14/2011.

3.3.3 Obtenção dos blocos de esmalte

Sessenta e seis ($n = 66$) blocos de esmalte foram preparados a partir de incisivos bovinos obtidos do Frigorífico Mondello. Os dentes foram submetidos à remoção de restos de ligamento periodontal e armazenados até a utilização em solução de timol 0,1% a 4 °C. Da região central da coroa de cada dente foi obtido um bloco de esmalte com 5x5 mm. As medidas foram determinadas com o auxílio de um paquímetro digital (Modelo 500-144B). Para obtenção dos blocos de esmalte, foi utilizado um disco de diamante (11-4254, 4"x 0,012"/ série 15LC) acoplado ao aparelho para cortes seriados (ISOMET 1000, Buehler). Para a regularização da superfície, os blocos foram desgastados com lixas d'água de granulação 200 (T469-SF). Uma solução de EDTA 0,5M (pH 7,2) foi aplicada, por 1 minuto, sobre os blocos de esmalte para limpeza superficial, com o objetivo de limpeza superficial e remoção da *smear layer*. Este procedimento proporciona adequado substrato dentinário para adesão e crescimento celular. Em seguida os espécimes tiveram as superfícies lavadas, por 60 segundos, com água deionizada esterilizada. Os blocos foram submetidos à avaliação da rugosidade superficial ($R_a - \mu\text{m}$) pelo rugosímetro portátil (Mitutoyo surfest SJ-401) e, em seguida, distribuídos entre os grupos experimentais e controle, a partir desses valores, por aleatorização por restrição, sendo escolhidos 8 blocos de dente no total. Os espécimes foram esterilizados por meio de gás de óxido de etileno (ACECIL – Central de Esterilização Com. Ind. Ltda., Campinas, SP, Brasil). O delineamento experimental está apresentado no Esquema 1.



Esquema 1. Delineamento experimental.

3.3.4 Adesão de *S. mutans* nos blocos de esmalte

O método de adesão de *S. mutans* em placas de cultura celular foi como descrito por Thein e colaboradores (2007). Nos blocos de esmalte foram formados biofilmes de *S. mutans* (n=8). Utilizando pinça estéril, cada bloco de esmalte foi colocado em um poço de placa de cultura celular de 24 poços contendo 1 mL de saliva durante 1 hora para a formação da película adquirida sobre a superfície dos blocos. Após este tempo, os blocos foram removidos destes poços e lavados com PBS e com o auxílio de uma pinça estéril, foram colocados nos poços de uma nova placa de cultura. Após a reativação das espécies, uma alíquota de 1 mL das suspensões de *S. mutans* com concentração de 10^7 UFC/mL foi dispensada em poços diferentes para formação da primeira fase do biofilme, a adesão, e, concomitantemente, foi acrescido 1mL das seguintes amostras: SLC, peptídeo incorporado em SLC na concentração de 2000 µg/mL, clorexidina 0,12% (padrão-ouro) e PBS (controle positivo). A placa foi incubada em temperatura de 37 °C por 2 horas, em agitador a 75 rpm. Posteriormente, a suspensão celular foi aspirada e cada bloco foi lavado duas vezes com PBS estéril para a remoção de micro-organismos não aderidos.

3.3.5 Indicativo de crescimento presente no biofilme inicial

Após o procedimento de lavagem dos blocos realizada na etapa 4.4, os blocos de esmalte (n=8) foram reinseridos em outro poço com 500 mL de BHI acrescido de 2% de sacarose, e então, as placas foram incubadas em estufa a temperatura de 37 °C por 48 h a 75 rpm. Após este período, foi realizada a visualização das colônias no biofilme. Após incubação, os blocos foram retirados do poço da placa de cultura e colocados em tubo de ensaio, contendo 500 µL de PBS. Em seguida o tubo de ensaio foi imerso em ultrassom (Ultrasonic, 1440 Plus) por 20 minutos para separação do biofilme. A partir dos 500 µL da suspensão bacteriana, foram realizadas diluições seriadas, que foram, então, plaqueadas em duplicatas para crescimento e posterior visualização da turvação.

3.4 Análise estatística

Foram feitos testes para determinar o tipo de distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias. Em seguida, foram empregados testes não paramétricos (como Kruskal-Wallis) ou paramétricos (análise de variância seguida do teste de Tukey) para análise dos resultados.

IV. Resultados & Discussão

4.1 Desenvolvimento dos sistemas

Os diagramas de fases obtidos no desenvolvimento dos sistemas encontram-se nas Figuras 1, 2 e 3. Nas figuras 4, 5 e 6 foram delimitadas áreas de anisotropia (característica em desviar o plano de luz polarizada) para melhor visualização dos resultados. De acordo com os diagramas das figuras verificou-se que em regiões com concentração de tensoativo menor ou igual a 30% ocorreu separação de fases ou formação de sistemas opacos (emulsões). Também é possível notar que, com a substituição da água pelos polímeros, o sistema também começou a se estruturar na região de 40% de tensoativo, indicando estabilidade do sistema.

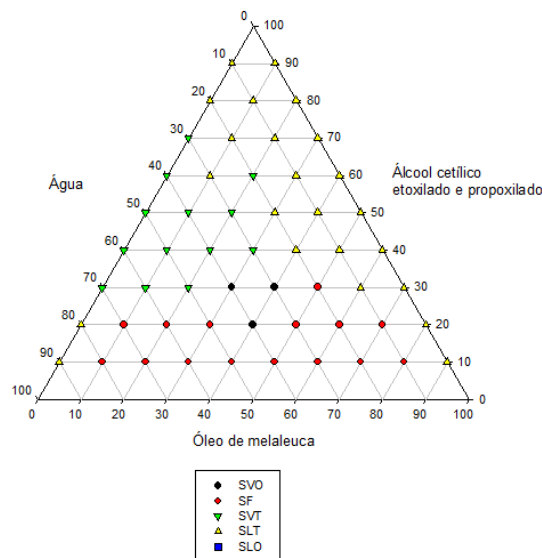


Figura 1. Diagrama de fases do sistema: Água, Óleo de melaleuca e Álcool cetílico etoxilado e propoxilado. SVO = sistema viscoso opaco, SF = separação de fases, SVT = sistema viscoso transparente, SLT = sistema líquido transparente, SLO = sistema líquido opaco.

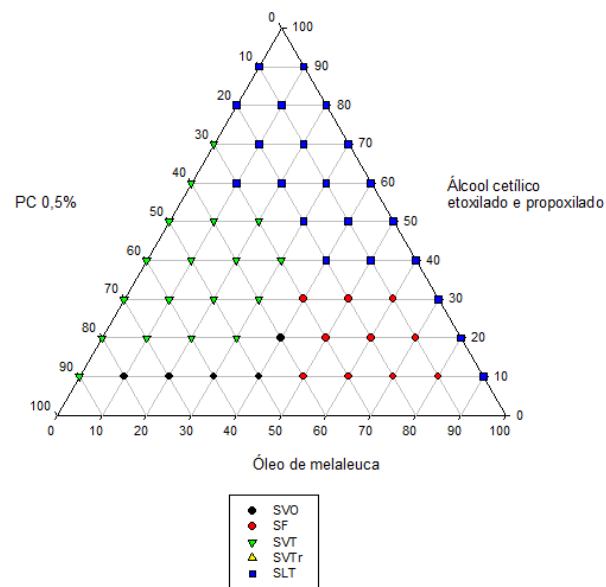


Figura 2. Diagrama de fases do sistema: dispersão de Polycarbofil[®] (PC) 0,5%, Óleo de melaleuca e Álcool cetílico etoxilado e propoxilado. SVO = sistema viscoso opaco, SF = separação de fases, SVT = sistema viscoso transparente, SVTr = sistema viscoso translúcido, SLT = sistema líquido transparente.

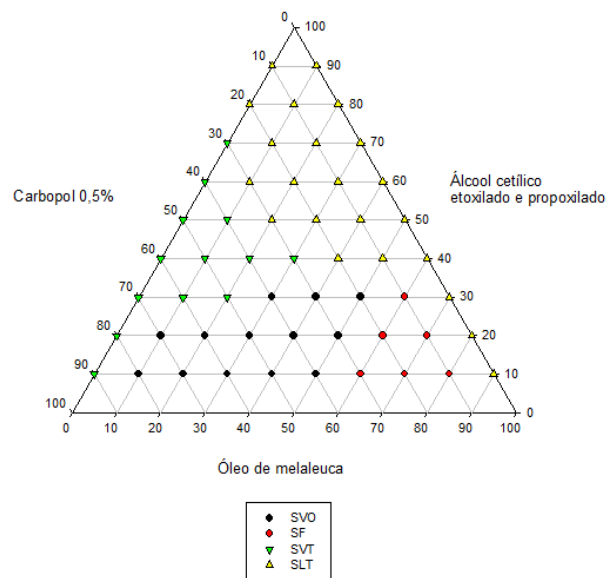


Figura 3. Diagrama de fases do sistema: dispersão de Carbopol[®] (C974) 0,5%, Óleo de melaleuca e Álcool cetílico etoxilado e propoxilado. SVO = sistema viscoso opaco, SF = separação de fases, SVT = sistema viscoso transparente, SLT = sistema líquido transparente.

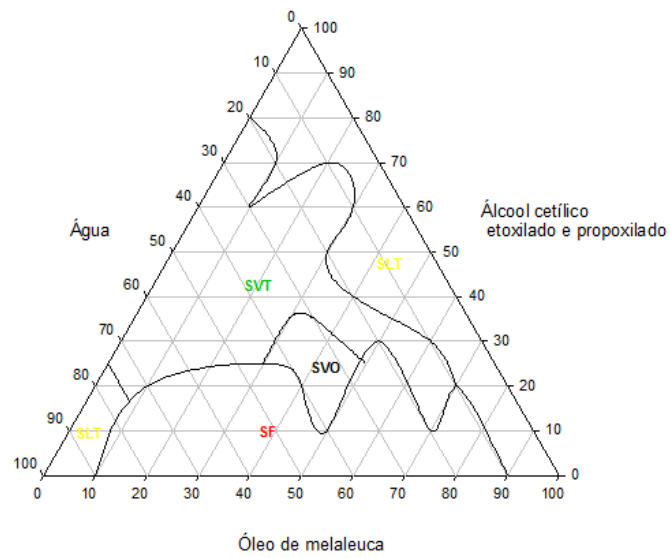


Figura 4. Diagrama de linhas do sistema Água, Óleo de melaleuca e Álcool cetílico etoxilado e propoxilado.

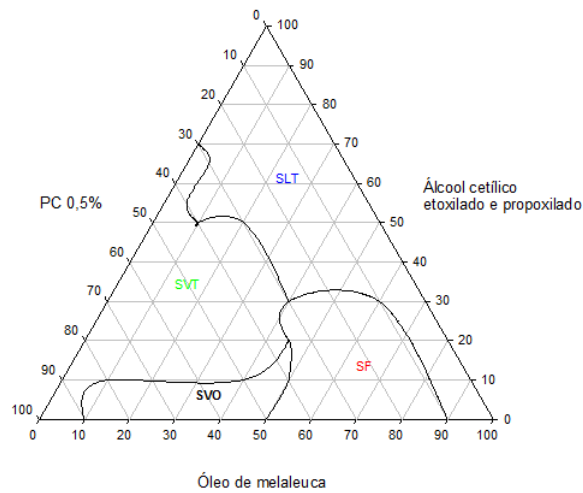


Figura 5. Diagrama de linhas do sistema PC[®] 0,5%, Óleo de melaleuca e Álcool cetílico etoxilado e propoxilado.

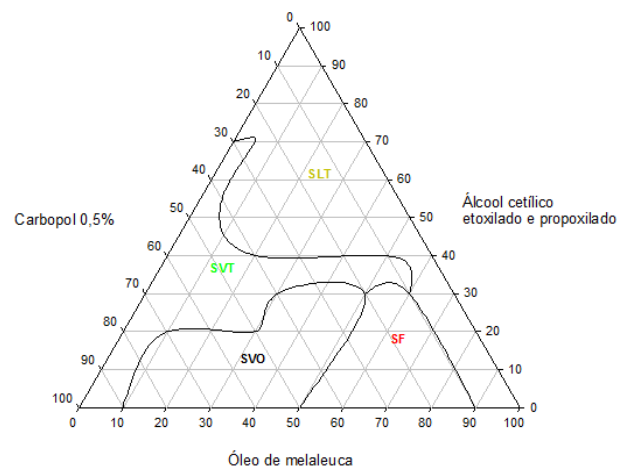


Figura 6. Diagrama de linhas do sistema Carbopol[®] 0,5%, Óleo de melaleuca e Álcool cetílico etoxilado e propoxilado.

4.2 Análise estrutural das formulações

4.2.1 Microscopia de luz polarizada

Uma maneira de se classificar os sistemas líquido–cristalinos é através da técnica de microscopia de luz polarizada (MLP). Sob um plano de luz polarizada, a amostra é caracterizada como anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Cristais líquidos de fases lamelares e hexagonais são anisotrópicos, enquanto que os cristais líquidos de fase cúbica são isotrópicos (NORLING *et al.*, 1992; BRINON *et al.*, 1999; HYDE, 2001).

Mesofases hexagonais podem ser reconhecidas pela sua textura típica de estrias. Mesofases lamelares normalmente apresentam manchas oleosas com cruces de malta inseridas (MULLER, 2004).

Entre as inúmeras vantagens apresentadas pelos cristais líquidos como veículos para administração de fármacos, a literatura também tem demonstrado propriedades bioadesivas das fases cúbicas e lamelares, embora o mecanismo de bioadesão ainda não esteja completamente elucidado (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Através da análise em MLP dos 3 sistemas foram selecionadas 9 formulações, considerando também que sistemas líquido-cristalinos estáveis são

formados com concentrações de tensoativo entre 30 a 60% (GURSOY *et al.*, 2004). As formulações selecionadas para observação em MLP (microscopia de luz polarizada) e análises subsequentes (reologia, TPA e bioadesão) foram 9, que se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Formulações selecionadas para análises.

Formulações	Componentes (%)				
	Óleo de melaleuca	Álcool cetílico etoxilado e propoxilado	Água	Disp. PC 0,5%	Disp. Carbopol 0,5%
F1-A	20	40	40	-	-
F2-A	30	40	30	-	-
F3-A	40	40	20	-	-
F1-P	20	40	-	40	-
F2-P	30	40	-	30	-
F3-P	40	40	-	20	-
F1-C	20	40	-	-	40
F2-C	30	40	-	-	30
F3-C	40	40	-	-	20

Mesofases líquido-cristalinas podem ser grosseiramente caracterizadas verificando-se a viscosidade. A fase lamelar geralmente se apresenta como líquido viscoso e a fase hexagonal possui a viscosidade semelhante à de um gel, enquanto que a viscosidade da fase cúbica é muito elevada (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Através da análise em MLP das formulações selecionadas notou-se a presença de estrias em F1-A, F2-A, F1-P, F2-P, F1-C e F2-C, evidenciando mesofases hexagonais, e em F3-A, F3-P e F3-C apresentaram cruces de malta, evidenciando mesofases lamelares.

As análises em MLP encontram-se nas figuras de 7 a 15. Considerando que as formulações nas quais se observaram fases lamelares possuem menor quantidade de água na formulação (quando comparadas com as formulações de mesofases hexagonais) e que a água é responsável por hidratar os polímeros, fica-se claro que a menor quantidade de água promove a formação de formulações líquidas viscosas e a maior quantidade de água promove a formação de formulações com caráter de gel viscoso, como é o caso das hexagonais.

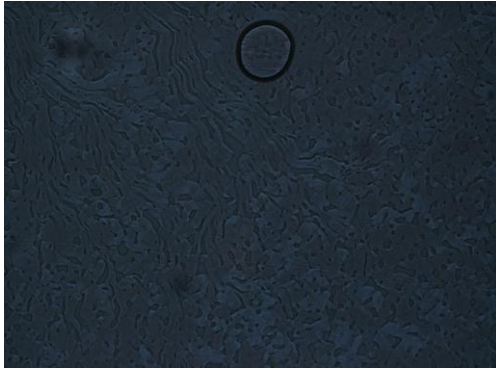


Figura 7. Fotomicrografia de F1-A (200x).



Figura 8. Fotomicrografia de F2-A (100x).

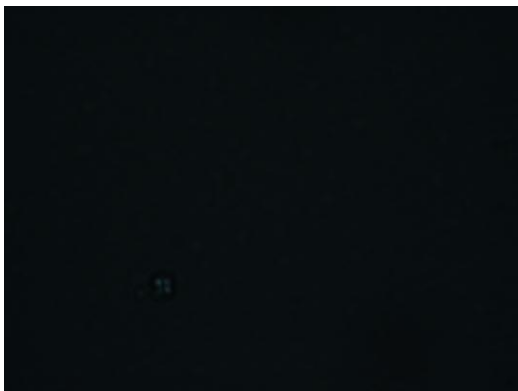


Figura 9. Fotomicrografia de F3-A(100x).

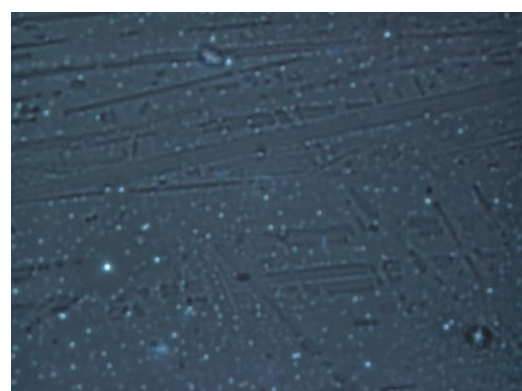


Figura 10. Fotomicrografia de F1-P (100x).



Figura 11. Microscopia de F2-P(100x).

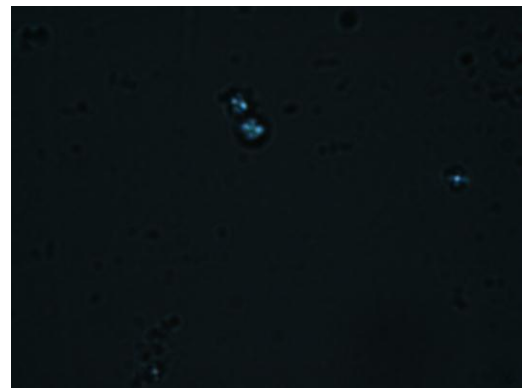


Figura 12. Microscopia de F3-P (100x).

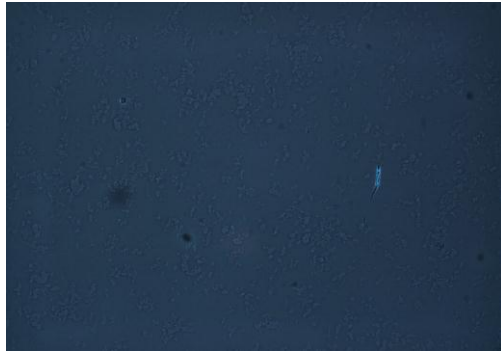


Figura 13.Microscopia de F1-C (100x).

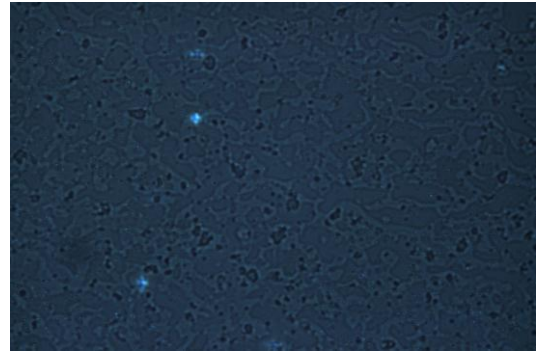


Figura 14.Microscopia de F2-C (100x).



Figura 15. Microscopia de F3-C (200x).

4.2.2. Determinação do comportamento reológico

Produtos desenvolvidos para administração bucal são submetidos a forças de cisalhamento, por exemplo, mastigação, respiração, deglutição e fala. Por isto, é importante examinar os efeitos de tais forças oscilatórios sobre a reologia do produto, e, portanto, sobre o seu desempenho clínico (JONES *et al.*, 1997).

Essa resposta reológica durante o processo está diretamente relacionada com as mudanças na microestrutura, a qual pode contribuir significativamente para benefícios funcionais. A reologia ajuda a estabelecer um entendimento teórico das relações entre as propriedades viscoelásticas e as microestruturas do sistema (SIDDIG *et al.*, 2006).

A correlação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento que define o comportamento de fluxo de um líquido é mostrada graficamente em diagramas chamados de curvas de fluxo. Os diferentes tipos de curva de fluxo têm seus correspondentes tipos de curva de viscosidade. As curvas de fluxo representam

duas partes do experimento, a curva ascendente que indica o aumento da taxa de cisalhamento, e a curva descendente, quando a taxa de cisalhamento é reduzida continuamente (SCHRAMM, 2006).

As curvas de fluxo para as 9 formulações, em que os pontos pretos representam a curva de ida e os pontos vermelhos representam a curva de volta encontram-se nas Figuras de 16 a 24.

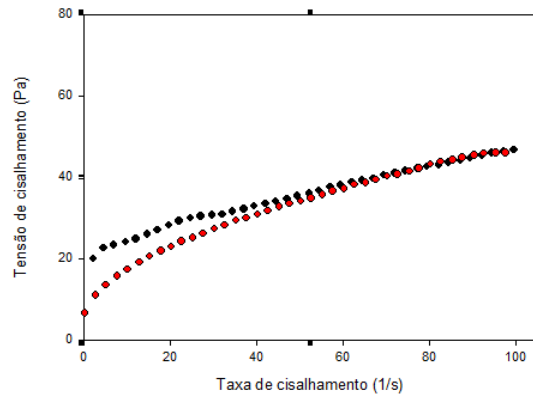


Figura 16. Curva de fluxo para F1-A.

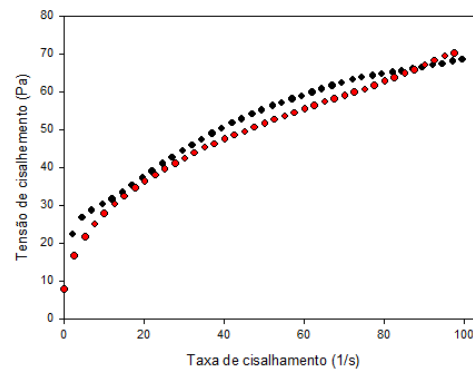


Figura 17. Curva de fluxo para F1-P.

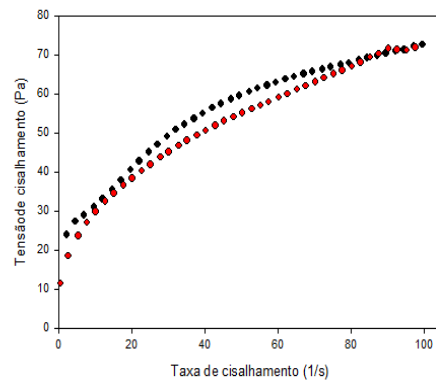


Figura 18. Curva de fluxo para F1-C.

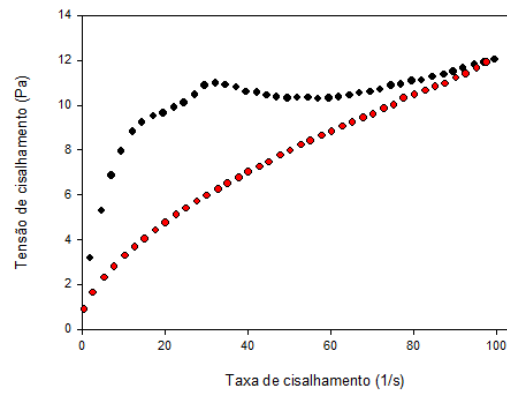


Figura 19. Curva de fluxo para F2-A.

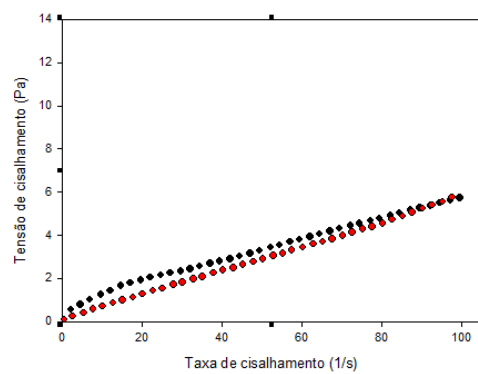


Figura 20. Curva de fluxo para F2-P.

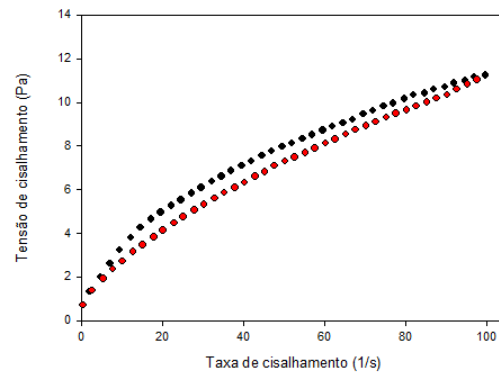


Figura 21. Curva de fluxo para F2-C.

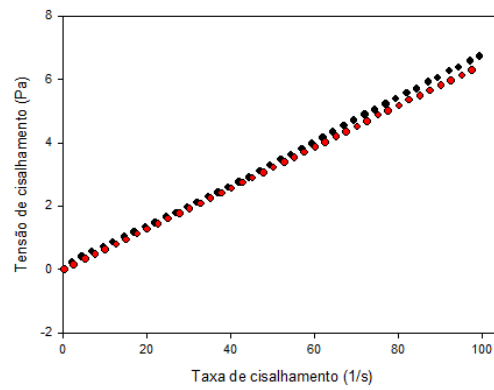


Figura 22. Curva de fluxo para F3-A.

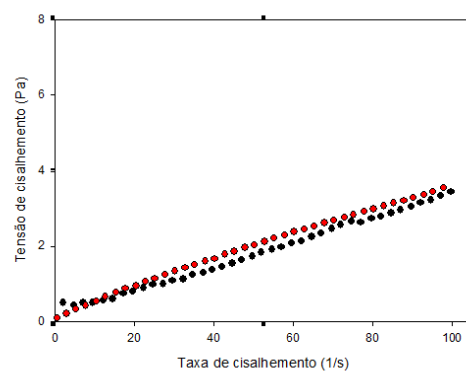


Figura 23. Curva de fluxo para F3-P.

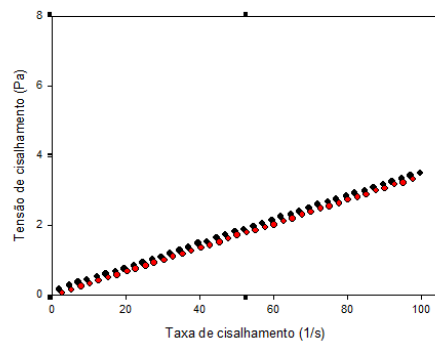


Figura 24. Curva de fluxo para F3-C.

Pelos gráficos obtidos (figuras 16 a 24) através do ensaio de escoamento notou-se, primeiramente, que as formulações apresentaram características típicas de fluidos não-newtonianos, ou seja, não apresentaram linearidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento, e que as formulações apresentaram comportamento de pseudoplásticos, ou seja, com diminuição da viscosidade quando a taxa de cisalhamento passa de níveis baixos para níveis mais altos, sugerindo também a formação de estrias, já que mesofases hexagonais apresentam características de fluido pseudoplástico. (MULLER, 2004) Também é possível notar a presença de tixotropia nas formulações.

Sistemas pseudoplásticos podem apresentar o fenômeno de tixotropia. Em geral, materiais que apresentam tixotropia apresentam forte habilidade em recuperar sua estrutura quando a tensão é removida (BARNES *et al.*, 1989) Este fenômeno é uma característica desejável em dispersões farmacêuticas, porque o decréscimo na viscosidade facilita a aplicação do produto, enquanto que a recuperação estrutural tempo-dependente após a administração estrutura permite uma bioadesão eficiente (WANG *et al.*, 2006; BRUSCHI *et al.*, 2007).

Para materiais com características tixotrópicas os resultados do taxa de cisalhamento contra curva tensão de cisalhamento geralmente incluem um ascendente curva para cima deslocado em relação à curva para baixo (CHORILLI *et al.*, 2011).

Os resultados mostraram que a substituição de água pelas dispersões poliméricas de Policarbofil® 0,5% ou Carbopol® 0,5% aumentou a característica pseudoplástica dos sistemas, o que é desejável para sistemas farmacêuticos bioadesivos, além do que a característica tixotrópica é interessante num sistema bucal pois, primeiramente com as forças de cisalhamento (como a língua por exemplo), o sistema irá perder viscosidade e fluir, e após um tempo irá recuperar sua estrutura, voltando a fixar-se mais firmemente.

4.2.3 Avaliação da bioadesão

Muitas pesquisas têm-se centrado em formulações de medicamentos que permitam o prolongamento do efeito terapêutico na cavidade oral, a proteção do fármaco a partir da degradação no ambiente biológico adverso tem sido um foco adicional. Estas exigências podem ser cumpridas por uma formulação mucoadesiva adequado no interior da cavidade bucal: formas de dosagem convencionais, de fato, mantêm seus efeitos na cavidade durante um período significativo de tempo com dificuldade, porque eles são facilmente removidos por salivação, temperatura, movimento da língua e deglutição. Além disso, a mucosa bucal é uma região adequada para sistemas de bioadesivos por causa da sua superfície suave e relativamente imóvel e acessibilidade direta: como consequência, formulações mucoadesivas adequadas representam uma alternativa às convencionais formas de liberação de fármacos não controladas (GANDHI *et al.*, 1994).

A atividade enzimática na mucosa bucal é relativamente baixa, porém, fármacos suscetíveis, especialmente peptídeos e proteínas, ainda podem ser degradados por enzimas presentes na saliva e na mucosa bucal. Portanto, inibidores enzimáticos incorporados na dosagem podem aumentar a biodisponibilidade do fármaco. Alguns polímeros bioadesivos, tais como policarbofil e carbopol, podem também inibir certas enzimas proteolíticas (tripsina, α -quimotripsina, carboxipeptidases A e B, e leucina aminopeptidase (MILLER *et al.*, 2005).

Os derivados de celulose (metil-, hidroxipropil-, carboximetilcelulose) e poli (ácido acrílico) com molecular elevado (policarbofil, carbômero) têm demonstrado propriedades formadoras de hidrogel que são necessárias para mucoadesão. Esta

mudança aumenta a viscosidade, o que resulta em uma liberação controlada de fármacos (MILLER *et al*, 2005).

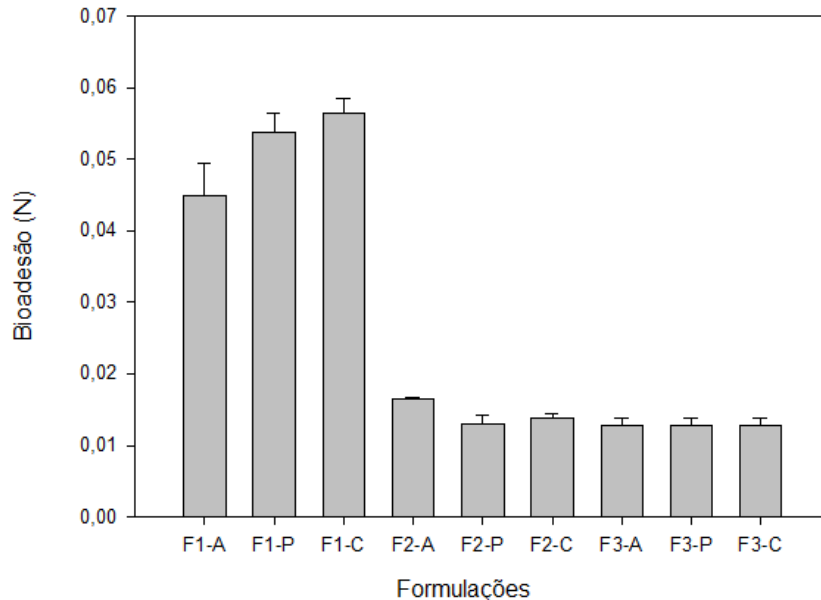


Figura 25. Avaliação da bioadesão das formulações.

Os resultados apresentados na Figura 25 mostraram que a substituição de água pelos polímeros nas formulações F1 aumentou relativamente a bioadesão, ou seja, a presença dos polímeros Policarbofil e Carbopol contribuiu para o aumento na bioadesão na cavidade bucal, representado pelo aumento no trabalho de adesão para essas formulações. Já para as formulações F2 e F3 o mesmo resultado não foi demonstrado. Possivelmente a redução da quantidade de água nas formulações F2 e F3 (quando comparado com F1) contribuiu para a formação de sistemas menos viscosos e, como consequência, menos bioadesivos, já que polímeros bioadesivos que possuem propriedades mucoadesivas são capazes de formar ligação de hidrogênio, resultado num inchaço na presença de água (FINI *et al.*, 2011).

Em um estudo, comparando a mucoadesividade de géis de CMC (carboximetilcelulose), HPMC (hidroxipropilmetilcelulose), HPC (hidroxipropilcelulose) e Carbopol em comprimidos mostrou que o Carbopol, oferecendo melhor controle de liberação, por meio de uma densidade maior em suas cadeias, pode ser usado para terapias que requerem tratamento prolongado de infecções bucais, fixando, por exemplo, a noite toda (FINI *et al.*, 2011).

Isto sugere que a utilização de dispersões poliméricas como componentes de sistemas mucoadesivos, que apresentam propriedades mucoadesivas e são não-tóxicos, pode ser interessante por atuarem como inibidores enzimáticos e prolongarem a liberação de fármacos.

4.2.4 TPA (Texture profile analysis)

As propriedades de textura de uma formulação são um parâmetro importante na otimização de formulações tópicas. Estas propriedades irão afetar a aplicabilidade da formulação no local de administração e conseqüentemente o resultado da terapia. (HURLER *et al.*, 2011). Vários atributos desejáveis nas formulações que contribuem para a aceitabilidade final do paciente e eficácia clínica do produto podem ser definidos. Estes incluem ótimas propriedades mecânicas (por exemplo, facilidade de remoção do produto a partir do recipiente, boa espalhabilidade sobre o substrato, por exemplo, pele ou mucosa), boa bioadesão (para assegurar a retenção no local da aplicação), viscosidade aceitável, liberação e absorção do fármaco. (JONES *et al.*, 1997)

A análise do perfil de textura (TPA) foi originalmente proposto como um método adequado para caracterizar formas farmacêuticas semi-sólidas de fármacos por Jones *et al.* (1997). Os parâmetros mecânicos, tais como dureza, adesividade e compressibilidade, foram correlacionados com o resultado terapêutico da formulação (HURLER *et al.*, 2011)

No teste de TPA, uma sonda analítica comprime duas vezes uma amostra a uma taxa e profundidade definidas, permitindo atraso (“delay”) entre as duas compressões. A partir do gráfico força-tempo resultante, os seguintes parâmetros mecânicos podem ser descritos: dureza (força necessária para atingir uma dada deformação), adesividade (uma quantidade que simula o trabalho necessário para vencer as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da sonda com a qual a amostra entra em contato), compressibilidade (a força por unidade de tempo necessária para deformar o produto durante o primeiro ciclo de compressão da sonda), e coesão (a razão entre a área de força positiva durante a segunda compressão até a primeira

compressão). Tais parâmetros podem ser usados dentro de aplicações farmacêuticas, fornecendo informação relativa à facilidade de remoção de um produto a partir de um recipiente, facilidade de espalhamento, além das propriedades adesivas (JONES *et al.*, 1997).

A adesividade, no entanto, é uma medida do trabalho necessário para remover a sonda a partir da amostra, a qual pode, em alguns casos, envolver fraturas de ligações coesivas dentro da amostra, e, por conseguinte, é dependente, em parte, da direção da amostra (JONES *et al.*, 1997).

As formulações identificadas como sistemas líquidos, transparentes e isotrópicos não foram sujeitas às análises de propriedades mecânicas, como dureza, compressibilidade, adesividades e coesividade, pois não impuseram resistência mecânica ao fluxo.

As análises de compressibilidade, dureza, adesividade e coesividade estão presentes nas Figuras de 29 até 32.

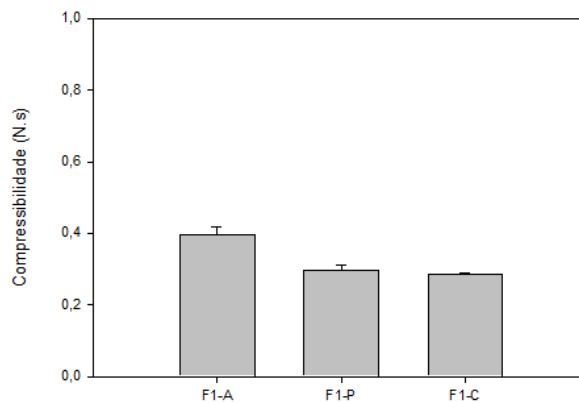


Figura 26. Compressibilidade de F1-A, F1-P e F1-C (N.s).

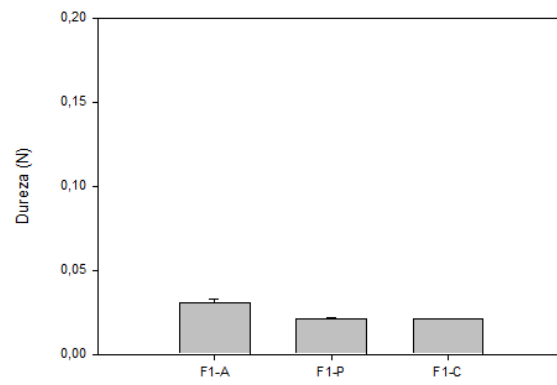


Figura 27. Dureza de F1-A, F1-P e F1-C (N).

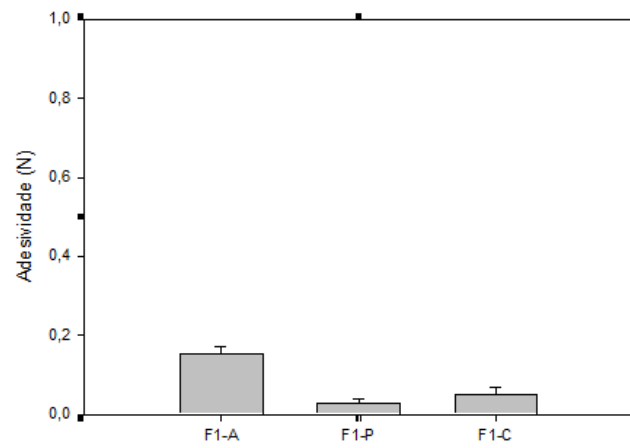


Figura 28. Adesividade de F1-A, F1-P e F1-C (N).

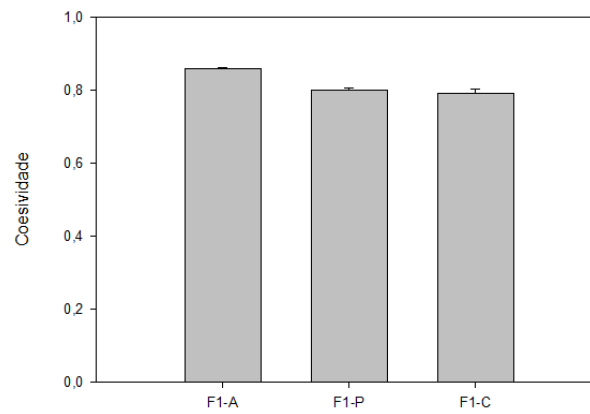


Figura 29. Coesividade de F1-A, F1-P e F1-C.

As análises estatísticas mostraram que não houve diferença entre os resultados, sugerindo que a presença dos polímeros não alteraram significativamente as características mecânicas das formulações, como compressibilidade, dureza, adesividade e coesividade.

4.3 Ensaio microbiológicos *in vitro*

4.3.1 Adesão de *S. mutans* nos blocos de esmalte

Bactérias comensais da boca podem se aderir aos dentes e formar um biofilme conhecido como placa dentária (BRADSHAW *et al.*, 1999). Esta placa abriga um conjunto de bactérias inseridas numa matriz exopolissacarídea pegajosa, tendo o *S. mutans* como componente importante (YAMASHITA *et al.*, 1993). Glicosil transferases clivam a sacarose em glicose e frutose e incorporam a glicose liberada em glucanas. Estas últimas promovem a adesão do *S. mutans* aos dentes (OOSHIMA *et al.*, 2001). A fermentação da frutose residual provoca acumulação de ácido láctico ácido com proximidade da superfície do esmalte dentário, acidez que conduz a desmineralização e cárie dentária. A presença de biofilme bacteriano nos dentes também contribui para infecções endodônticas e doenças periodontais.(HONRAET *et al.*, 2006).

4.3.2 Indicativo de crescimento presente no biofilme inicial

A família de antígenos I/II (Agl/II), variando de 1310 até 1653 resíduos de aminoácido, são adesinas ancoradas na parede da maioria das espécies de estreptococos orais. Eles interagem com uma grande variedade de moléculas hospedeiras, em particular, a glicoproteína aglutinina salivar (ou gp340) e também com ligantes de outras bactérias. O principal receptor do hospedeiro para polipeptídeos da família AGI / II (em que se encontra o p1025) é a glicoproteína aglutinina salivar (ou gp340), secretada pela glândula parótida e por outras células secretórias. (JAKUBOVICS *et al.*, 2005)

A habilidade do gp340 em agregar bactérias e vírus na mucosa bucal é uma função inata desta molécula. A ligação das proteínas AG I/II a gp340 encontrada na saliva contribui para limpeza/higiene bucal através da deglutição por exemplo. Por outro lado, a gp340 pode ser incorporada na película salivar na superfície do dente e ser depositado na superfície do biofilme bacteriano, atuando como receptor para a adesão de *S. Mutans* neste caso. (LAMONT *et al.*,1991)

Em um estudo *in vitro*, observou-se inibição da ligação de uma adesina encontrada na superfície de *S. mutans* a receptores salivares, medida por ressonância de plasma de superfície, utilizando o péptido sintético p1025, que corresponde aos resíduos 1025-1044 da adesina (KELLY *et al.*, 1998). Num modelo humano *in vivo* de adesão estereoespecífica, a aplicação direta de p1025 nos dentes preveniu a recolonização de *S. mutans*. Esta nova estratégia antimicrobiana, aplicando-se inibidores peptídicos competitivos de adesão, pode ser utilizada contra outros micro-organismos em que adesinas medeiam a colonização da superfície das mucosas. (KELLY *et al.*, 1998).

Também em estudo prévio foi mostrado que o peptídeo p1025 inibe a interação de SpaPg (adesina de *S. mutans*) com gp340 e também a adesão da cepa de *S. mutans* na película salivar. O peptídeo também inibiu o polipeptídeo PAc de *S. mutans* e SspA de *S. gordonii* em se ligar ao gp340, ambos expressos por um *Lactobacillus lactis* (adesina de *S. mutans*) num estudo envolvendo diversas adesinas de *Streptococcus* (JAKUBOVICS *et al.*, 2005).

Embora os resultados de caracterização tenham demonstrado melhores resultados de bioadesão para F1-P, foi escolhido F3-P pela viscosidade menor, o que facilitou o ensaio microbiológico.

A limpidez ou turvação observada na placa de well sugerem que nos blocos apenas com o SLC (sem o peptídeo) - Figura 36, não houve crescimento de *S. mutans* (solução estava límpida), enquanto que na solução de PBS (Figura 35) houve turvação, indicando crescimento de *S. mutans*. O crescimento de *S. mutans* também não foi evidenciado no controle com clorexidina 0,12% (Figura 34) e quando empregou-se o SLC com peptídeo (Figura 37), conforme relatado também na Tabela 2.

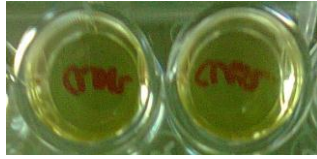


Figura 30. *S.mutans* com clorexidina 0,12%

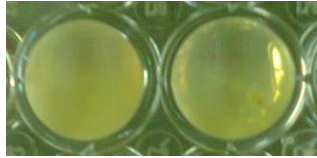


Figura 31. *S.mutans* com PBS



Figura 32. *S.mutans* com F3-P



Figura 33. *S.mutans* com F3-P - p1025

Tabela 2. Turvação de *S. mutans* na placa de well após 48h a 75 rpm

Clorexidina 0,12%	Límpido
Clorexidina 0,12%	Límpido
PBS	Turvo
PBS	Turvo
F3-P	Límpido
F3-P	Límpido
F3-P - p1025	Límpido
F3-P - p1025	Límpido

Tais resultados sugerem a eficácia tanto da formulação controle (F3-P) como da formulação contendo o peptídeo 1025 (F3-P-p1025) contra *S. mutans*, uma vez que as placas se mostraram límpidas, indicando a ausência ou redução de *S. mutans* quando comparado à solução de PBS. Após a etapa 4.5, as placas foram incubadas por dois dias em estufa a 37 °C e as fotos das placas estão representadas nas figuras 38 até 41. Os resultados evidenciaram que não houve o crescimento de *S. mutans* nas placas.



Figura 34. Placa BHI - teste com clorexidina 0,12%



Figura 35. Placa BHI – teste com PBS

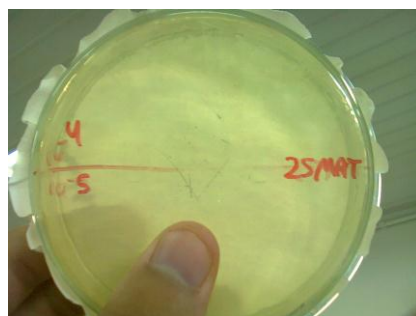


Figura 36. Placa BHI – teste com F3-P

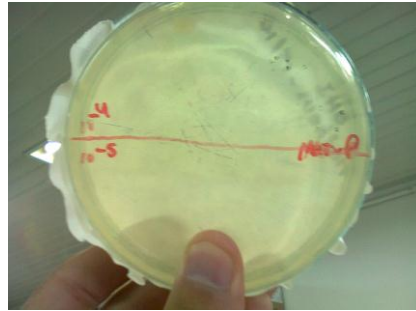


Figura 37. Placa BHI – teste com F3-P – p1025

V. Conclusões finais

Acredita-se que as formulações analisadas podem ser utilizadas como sistemas de liberação controlada para administração bucal do peptídeo p1025, uma vez que possuem características líquido-cristalinas, são bioadesivas e possuem características pseudoplásticas. Os ensaios de caracterização físico-química demonstraram que a adição das dispersões poliméricas na fase aquosa do sistema permitiu a obtenção de estruturas líquido-cristalinas pelas análises de MLP, proporcionando maior biadesão em relação à fase aquosa constituída somente por água. Tendo em vista ainda a eficácia das formulações acrescidas ou não do peptídeo p1025 no ensaio microbiológico, acredita-se que o sistema proposto pode ser utilizado contra a formação do biofilme por *S. mutans*.

VI. Referências bibliográficas

AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.4, p.1407-1417, 2008.

AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5721-5732, 2005.

ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.478-490, 2007.

AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ O. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. **DNA and Cell Biology**, v.28, p.405-411, 2009.

BEAUCAGE, G. *et al.* Multiple size scale structures in silica-siloxane composites studied by small-angle scattering. **American Chemical Society Symposia Proceedings**, v. 585, p. 97-111, 1995.

BRADSHAW, D.J., MARSCH, P.D. Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms. **Methods Enzymol.** 310, p.279– 296, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”, Brasília, 2003.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J-T., COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens form liquid crystalline phases. **J. Control. Rel., Arlington**, v.60, p.67-76, 1999.

BUNGES, H.; RADES, T. Thermotropic liquid crystalline drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p.807-816, 2005.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **American Society for Microbiology**, v.19, n.1, p.50-62, 2006.

CARVALHO, F. C. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina, p.32, 2009.

CARVALHO, F. C. *et al.* Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **Journal of biomedical nanotechnology.**, v. 8, n. 2, 2012

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluído de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1036-1040, 2009.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.V; OLIVEIRA, A.G; SCARPA, M.V. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.85, p.182–188, 2011.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.170-175, 2000.

DALE, B. A.; TAO, R.; KIMBAL, J. R.; JUREVIC, R. J. Oral Antimicrobial Peptides and Biological Control of Caries. **BMC Oral Health**, v.6, p.13, 2006.,

DONG, L.; TONG, Z.; LINGHU, D.; LIN, Y.; TAO, R.; LIU, J.; TIAN, Y.; NI, L. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans*

biofilm formation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.39, p.390-395, 2012.

FINI, A; BERGAMANTE, V; CESCHEL, G.C. Mucoadhesive Gels Designed for the Controlled Release of Chlorhexidine in the Oral Cavity. **Pharmaceutics**, v.3, p.665-679, 2011.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. D. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. D. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.3, 2005.

GANDHI, R.B.; ROBINSON, J.R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev** , v.13, p.43-74, 1994.

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R. J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v.15, n.24/25, 2010.

GURSOY, R.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. **Biomedic. & Pharmacother**, v.58, p.173-182, 2004.

BARNES, H.A; HUTTON, J.F; WALTER, K. **An Introduction to Rheology**, Elsevier, New York, 1989.

HONRAET, K.; NELIS, H. J.; Use of the modified robbins device and fluorescent staining to screen plant extracts for the inhibition of *S. mutans* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, p.217– 224, 2006.

HOLMQVIST, P. *et al.* Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer-Water-Oil Systems by Varying the Oil Type. **Macromolecules**. v. 30, p. 6788-6797, 1997.

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K., ed. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap.16, p.299-332, 2011.

HURLER, J; ENGESLAND, A; KERMANY, B.P; BASNET, N.S. Improved Texture Analysis for Hydrogel Characterization: Gel Cohesiveness, Adhesiveness, and Hardness. **Journal of Applied Polymer Science** DOI 10.1002/app. 2011.

WANG, H., ZHANG, G; DU Z; LI, Q; WANG, W; LIU, D; ZHANG, X, **J. Colloid Interface Sci**, v.300, p. 348, 2006.

ICHIKAWA, H.; PEPPAS, N. A. Novel complexation hydrogels for oral peptide delivery: In vitro evaluation of their cytocompatibility and insulintransport enhancing effects using Caco-2 cell monolayers. **J. Biomed Mater Res A**, v.67, p.609-617, 2003.

JAKUBOVICS, N. S.; STROMBERG, N.; DOLLEWEERD, C. J. V.; KELLY, C. G.; JENKINSON, H. F. Differential binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands. **Molecular Microbiology**, v.55, p.1591-1605, 2005.

JONES, D. S.; BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O.; GREMIÃO, M. P. D.; LARA, E. H. G.; ANDREWS, G. P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, p 49-58, 2009.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.151, p.223-233, 1997.

KELLY, G.; YOUNSON, J.S.; HIKMAT, B.Y.; TODRYK, S.M.; CZISCH, M.; PARVEZ, I.H.; FLINDALL, I.R.; NEWBY, C.; MALLET, A.I.; MA, J.K.C; LEHNER, T. A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent. **Nature Biotechnology**, v.17, p.42-47, 1998.

KELLY, C. G.; LEHNER, T. Peptide Inhibitors of *Streptococcus mutans* in the Control of Dental Caries. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v.13, n.4, p.517-523, 2007.

KOFFI, A.A.; AGNELY, F.; PONCHEL, G.; GROSSIORD, J.L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 328-335, 2006.

LAMONT, R.J., DEMUTH, D.R., DAVIS, C.A., MALAMUD, D., AND ROSAN, B. Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria. **Infect Immun** v.59LAM, p.3446–3450, 1991.

LEE, J.; KELLAWAY, I. W. Buccal permeation of [d-Ala², d-Leu⁵]enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **International Journal of Pharmaceutics**, v.195, p.35-38, 2000.

LI, M.Y.; WANG, J.; LAI, G.Y. Effect of a dentifrice containing the peptide of streptococcal antigen I/II on the adherence of mutans streptococcus. **Archives of Oral Biology**, v.54, p.1068-1073, 2009.

MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v.6, p.14, 2006.

MILLER, N. S.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1666-1691, 2005.

BRUSCHI, M.L; JONES, D.S; PANZERI, H; GREMIÃO, M.P.D; FREITAS, O; LARA E.H.G, **J. Pharm. Sci.** v.96, p.2074, 2007.

MOURA, J. S.; SILVA, W. J.; PEREIRA, T.; CURY, A. A. D. B.; GARCIA, R. C. M. R. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 96, p. 205-211, 2006.

MORISHITA, M.; PEPPAS, N. A. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? **Drug Discovery Today**, v.11, n.19/20, 2006.

MULLER, G.; Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.343–356, 2004.

OOSHIMA, T., MATSUMURA, M., HOSHINO, T., KAWABATA, S., SOBUE, S., FUJIWARA, T. Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.** 80, 1672– 1677, 2001.

PATEL, V.F.; LIU, F., BROWN, M. B. Advances in oral transmucosal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 106–116, 2011.

NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRON, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S.S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol., Copenhagen**, v.19, p.687-692, 1992.

PAREDES, S. D. O.; ALMEIDA, D. B. D.; FERNANDES, J. M. F. D. A.; FORTE, F. D. S.; SAMPAIO, F. C. Behavioral and social factors related to dental caries in 3 to 13 year-old children from João Pessoa, Paraíba, Brazil. **Rev. odonto ciênc.**, v.24, p.231-235, 2009.

PEROS, W.J.; GIBBONS, R.J. Influence of growth medium on adsorption of *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, and *Actinomyces naeslundii* to saliva-treated hydroxyapatite surfaces. **Infect Immun.** v. 32, p. 111-117, 1981

PETERSEN, F. C.; ASSEV, S.; MEI, H. C. V. D.; BUSSCHER, H. J.; SCHEIE, A. A. Functional Variation of the Antigen I/II Surface Protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. **American Society for Microbiology**, v.70, n.1, p.249-256, 2002.

PINHAS, M. D.; PELED, H. B. Mucoadhesion: a review of characterization techniques. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.7, n.2, p.259-271, 2010.

PRABHAKAR, A. R.; VIPIN, A.; BASAPPA, N. Effect of Curry Leaves, Garlic and Tea Tree Oil on *Streptococcus Mutans* and *Lactobacilli* in Children: A Clinical and Microbiological Study. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa**, v.9, p.259-263, 2009.

RUBIO, L.; ALONSO, C.; CODERCH, L.; PARRA, J. L.; MARTÍ, M.; CEBRIÁN, J.; O NAVARRO, J. A., Skin Delivery of Caffeine Contained in Biofunctional Textiles. **Textile Research Journal**, 2010.

- SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006.
- SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **The Lancet**, v.369, p.51-59, 2007.
- SENEL, S.; KREMER, M.; NAGY, K.; SQUIER, C. Delivery of Bioactive Peptides and Proteins Across Oral (Buccal) Mucosa. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.2, p.175-186, 2001.
- SIDDIG, M. A.; RADIMANC, S.; JAN L. S.; MUNIANDY, S. V. Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucohone (APG) surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* v. 276, p. 15–21, 2006.
- THEIN, Z.M.; SMARANAYAKE, Y.H.; SMARANAYAKE, L.P. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. **APMIS**, v.115, p.1241-1251, 2007.
- USP 29. The United States Pharmacopeia. Rockville, USP Convention, 2009.
- WEI, G., CAMPAGNA, A. N.; BOBEK, L. A. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v 57, p. 1100–1109, 2006.
- YAMASHITA, Y., BOWEN, W.H., BURNE, R.A., KURAMITSU, H.K.,. Role of *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect. Immun.* 61, 3811 –3817, 1993
- YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, p. 185–192, 2010