



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

FERNANDA ZAPATER PIERRE GUARDEZI

**COMPLEXOS POLIELETRÓLITOS DE QUITOSANA E XANTANA
CARREGADOS COM ATIVOS NATURAIS E SINTÉTICOS:
estudo físico/químico e microbiológico para aplicação de *drug
delivery***

FERNANDA ZAPATER PIERRE GUARDEZI

**COMPLEXOS POLIELETRÓLITOS DE QUITOSANA E XANTANA CARREGADOS
COM ATIVOS NATURAIS E SINTÉTICOS: estudo físico/químico e
microbiológico para aplicação de *drug delivery***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR(A), pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Prótese dentária. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de biomateriais em saúde bucal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientadora: Profa. Dra. Lilian de Siqueira

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Guardezi, Fernanda Zapater Pierre

Complexos polieletrólitos de quitosana e xantana carregados com ativos naturais e sintéticos: estudo físico/químico e microbiológico para aplicação de drug delivery / Fernanda Zapater Pierre Guardezi. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.

86 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientador: Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientadora: Lilian de Siqueira

1. Polieletrólitos. 2. Quitosana. 3. Compostos fitoquímicos. 4. Sistema de liberação de medicamentos. 5. Interface implante dentário-pivô. I. Borges, Alexandre Luiz Souto, orient. II. Siqueira, Lilian de, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa está diretamente alinhada com o objetivo 3 (saúde e bem-estar) dos “Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)”, que visa assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos em todas as idades. Com o aumento da expectativa de vida, a procura por tratamentos reabilitadores em pacientes edêntulos ficará cada vez maior nos consultórios odontológicos, principalmente relacionados a implante dentários, visto que a popularização deste procedimento está crescendo com os anos. Com o aumento dessa demanda, torna-se evidente a necessidade de desenvolver meios complementares para auxiliar na manutenção da saúde oral nesses casos, pois o paciente reabilitado também corre riscos de inflamação e infecção, mesmo quando há uma boa higienização e regularidade de visita ao dentista. A implementação de um biomaterial capaz de realizar a liberação controlada de fármaco localmente pode promover mais longevidade do tratamento e qualidade de vida para o paciente.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research is directly aligned with objective 3 (health and well-being) of the “Sustainable Development Goals (SDGs)”, which aims to ensure healthy lives and promote well-being for people of all ages. With increasing life expectancy, there is a growing demand for rehabilitative treatments in edentulous patients in dental offices, particularly in relation to dental implants, as the popularity of this procedure continues to grow over the years. With this increasing demand, the need to develop complementary means to help maintain oral health in these cases becomes evident, as rehabilitated patients are also at risk of inflammation and infection, even when practicing good hygiene and making regular visits to the dentist. The implementation of a biomaterial capable of locally controlled drug release can promote greater treatment longevity and enhance the quality of life for the patient.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de São Paulo

Prof. Dr. Ilton José Baraldi

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Campus de Medianeira

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. João Maurício Ferraz da Silva

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de fevereiro de 2024.

DEDICATÓRIA

À minha amada vizinha, Nancy de Camargo Zapater (*in memoriam*), por incentivar minha dedicação aos estudos e por me ensinar que o aprendizado, nunca é tirado de nós. Obrigada por ter feito parte da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me conceder a vida com saúde, por ter me colocado em uma família abençoada com pessoas incríveis, cada um com seu jeito único de ser, e por sempre me guiar pelos caminhos tortuosos da vida com esperança e fé.

Aos meus pais, Rosemeire Zapater e Mario Antonio Sawaia Pierre, pelo apoio incondicional nesta jornada que é a vida, obrigada por sempre acreditarem em mim, nos meus sonhos e por não medirem esforços para me auxiliar. Sem o amor de vocês eu não teria chegado aonde estou!

Ao meu marido, Jeferson Fernando Guardezi, por toda a paciência e cumplicidade. Por estar sempre ao meu lado, ouvindo minhas angústias, meus medos...torcendo pelas minhas superações e conquistas! Sempre disposto a ajudar, obrigada por todo o apoio e amor!

Agradeço aos familiares, por sempre torcem por mim: Geovanna Zapater Xavier, Rosenilze Zapater Xavier, Wilson Roberto Xavier, Roseana Zapater, Kleber Lopes, Bruna Zapater Xavier Alves, Diogo Socci Alves, Lorena Xavier Alves, Maria Nina Sawaya Pierre, Magaly Aparecida Sawaya Pierre, Fábio Pierre Fracasso, Daniele Oliveira Fracasso, Murilo Pierre Fracasso, Ana Lúcia Teixeira Fracasso, Sirlei Heiss Guardezi e Luis Fernando Guardezi. Obrigada especial para meus cunhados, Jéssica Sibila Guardezi e Matheus Filipe Lourenço, por terem me concedido a benção de ser madrinha da pequena Manuela.

A UNESP-SJC, por ter sido minha segunda casa desde os meus 16 anos onde entrei como aluna do cursinho PreVest. A universidade me proporcionou muito mais do que conhecimento...conheci pessoas extraordinárias ao longo dessa jornada, que enriqueceram minha vida em todos os sentidos. Vivi momentos inesquecíveis neste lugar, que vou levar para sempre comigo.

Ao meu orientador por me inspirar e sempre incentivar seus alunos ao aprendizado contínuo e a exploração de novos conhecimentos. Agradeço a oportunidade de ter trabalhado em uma área totalmente nova e desafiadora, pois acredito ter me tornado uma grande entusiasta no ramo dos biomateriais!

Agradeço imensamente a minha coorientadora Lilian de Siqueira, por ter me ajudado a desenvolver essa pesquisa desde o início, onde eu tinha muitas dúvidas e questionamentos. Obrigada pela paciência e companhia nos dias de laboratório, compartilhando conhecimento e aprendendo junto comigo. A nossa colaboração ultrapassou as fronteiras profissionais, evoluindo para uma sincera amizade. Você é uma pessoa especial, obrigada por tudo!

À empresa PRODUMED, a colaboração de vocês foi essencial para que fosse possível seguir com os ensaios microbiológicos assegurando a qualidade das amostras! Um agradecimento especial a todos os funcionários, e particularmente a Antonio Carlos Carvalho Junior, pela disposição e pela cordialidade com que fui recebida, proporcionando-me um entendimento detalhado dos processos da empresa. Esta experiência foi extremamente valiosa, pois me mostrou na prática a importância da parceria empresa-universidade!

Às amigas: Natalia Inês Gonçalves, pela amizade e por ser minha parceira nas experiências que a pós-graduação nos proporcionou; Joyce Ferreira Arcanjo, obrigada por todos os anos de amizade e por se fazer presente na minha vida e Vanessa Faria pelos momentos descontraídos e leves durante esses anos da pós.

À professora Dayane Batista Tada, docente da Unifesp-SJC, obrigada por compartilhar seus conhecimentos e me auxiliar nas análises de liberação. Sua orientação foi fundamental para a obtenção desses resultados!

Agradeço a mestranda Lara Steffany de Carvalho, por se disponibilizar a fazer os ensaios microbiológicos desta pesquisa comigo, obrigada por ter sido sempre muito atenciosa e prestativa! Foi muito bom ter trabalhado junto com você!

Agradeço a Unifesp-SJC por me disponibilizar o acesso ao equipamento de MEV e a Verônica Ribeiro dos Santos por fazer as análises com excelência.

Agradeço imensamente ao professor Leandro Raniero, docente da Universidade do Vale do Paraíba (Univap), que de prontidão aceitou meu pedido e me concedeu acesso ao equipamento que eu necessitava para fazer as análises de liberação. Estendo essa gratidão a mestranda Giulia Capizzani, pela disposição em manusear o equipamento e analisar cada gota comigo!

Agradeço ao CEANMED – Central Analítica Multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Medianeira, Paraná/Brasil, pelos ensaios realizados

Agradeço ao doutorando Rafael Pinto de Mendonça, por compartilhar seus conhecimentos e disponibilizar seu tempo em me ajudar no manuseio do equipamento de FTIR sempre com muita paciência e educação!

Ao aluno de pós-doutorado, Paulo Henrique Fonseca do Carmo, obrigada pela disposição em compartilhar seus conhecimentos quando eu me recorria a você! A clareza da sua didática me ajudou em muitos momentos desta pesquisa!

À Angela Maria Moraes, professora titular da faculdade de engenharia química da Unicamp, agradeço por ter sido tão prestativa e ter me atendido todas as vezes que solicitei sua ajuda, mesmo não a conhecendo pessoalmente.

Agradeço ao pessoal técnico-administrativo do departamento de prótese, pelas conversas, risadas e cafezinhos durante todos esses anos!

Agradeço aos professores do ICT-UNESP. Todos foram muito importantes na minha construção profissional e pessoal!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

"Crê em tí mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar". (Chico Xavier)

RESUMO

Guardezi, FZP. Complexos polieletrólitos de quitosana e xantana carregados com ativos naturais e sintéticos: estudo físico/químico e microbiológico para aplicação de *drug delivery* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

A eficácia dos implantes osseointegrados é amplamente reconhecida na literatura científica. Contudo, infiltrações bacterianas na junção implante-pilar podem desencadear inflamação nos tecidos circundantes, contribuindo para a evolução de condições mais sérias, como a peri-implantite. O objetivo desse estudo foi produzir complexos polieletrólitos (PECs) de quitosana (Q) e xantana (X) em forma de membranas, carregá-las com ativos naturais e sintéticos antimicrobianos, caracterizá-las estruturalmente e avaliá-las frente a degradação enzimática, cinética de liberação e ações antimicrobianas com finalidade de aplicação para *drug delivery*. Membranas de QX a 1% (m/v) foram produzidas em três proporções, totalizando doze grupos experimentais: QX (1:1); QX (1:2), QX (2:1), QX-P (com própolis) (1:1); QX-P (1:2); QX-P (2:1); QX-C (com canela) (1:1); QX-C (1:2); QX-C (2:1) e CLX (com clorexidina 0,2%) (1:1); CLX (1:2); CLX (2:1). Para os estudos de caracterização foram feitas análises da espessura em estado seco; análises morfológicas superficial e transversal em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); análise estrutural de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); análise de degradação por perda de massa sob ação da enzima lisozima; e análise da cinética de liberação dos ativos em saliva artificial. Para os testes microbiológicos, análises de verificação de halo de inibição e ação antibiofilme foram feitas contra cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). Os resultados demonstraram que a espessura das membranas variou conforme a proporção, sendo que o grupo QX (1:2) apresentou a maior média de 1,022 mm $\pm$ 0,2, seguida respectivamente do QX (1:1) com 0,641 mm $\pm$ 0,1 e QX (2:1) com 0,249 mm $\pm$ 0,1. Nas imagens de MEV é possível observar uma maior presença de fibras, rugosidade e porosidade nos grupos QX (1:2) e QX (1:1) respectivamente, e, no QX (2:1) uma superfície mais lisa, uniforme e fina. No FTIR foram confirmados os picos característicos dos materiais isoladamente, além de observar as ligações iônicas que ocorreram para formação dos PECs. Na análise de degradação, os grupos com ativos naturais adicionados tiveram melhores taxas de sobrevida do que os grupos QX. No teste de liberação, os grupos QX-P tiveram uma cinética mais lenta que os QX-C, cuja liberação acumulada de 100% foi feita em 24 h. Já nos testes do halo inibitório, somente os grupos CLX tiveram ação sobre as duas cepas, e os QX-P tiveram sobre *S. aureus*. Nas análises antibiofilme, os grupos CLX apresentaram as maiores taxas de redução metabólica nas duas cepas ($\pm$ 79%); os grupos QX-P apresentaram taxas de redução similares em ambas as cepas, porém com percentual um pouco maior para *E. coli* (60- 80%) e os grupos QX-C tiveram grande discrepância entre as duas cepas: de 35 a 70% para *S. aureus* e 14 a 19% para *E. coli*. Pode-se concluir que, frente as análises feitas, o comportamento do material foi afetado diretamente pelos ativos adicionados a matriz polimérica. As proporções de Q ou X afetaram somente a espessura final. Quanto a aplicação proposta de *drug delivery*, os dispositivos apresentaram grande potencial, principalmente os grupos CLX e QX-P.

Palavras-chave: polieletrólitos; quitosana; compostos fitoquímicos; sistemas de liberação de medicamentos; interface implante dentário-pivô

ABSTRACT

Guardezi, FZP. Polyelectrolyte complexes of chitosan and xanthan loaded with natural and synthetic actives: physicochemical and microbiological study for drug delivery application. [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

The effectiveness of osseointegrated implants is widely recognized in scientific literature. However, bacterial infiltrations at the implant-abutment interface may trigger inflammation in surrounding tissues, contributing to the development of more serious conditions, such as peri-implantitis. The aim of this study was to produce chitosan (Q) and xanthan (X) polyelectrolyte complexes (PECs) in the form of membranes, load them with natural and synthetic antimicrobial actives, characterize them structurally, and evaluate them for enzymatic degradation, release kinetics, and antimicrobial actions for drug delivery applications. QX membranes at 1% (w/v) were produced in three proportions, totaling twelve experimental groups: QX (1:1), QX (1:2), QX (2:1), QX-P (with propolis) (1:1), QX-P (1:2), QX-P (2:1), QX-C (with cinnamon) (1:1), QX-C (1:2), QX-C (2:1), and CLX (with 0.2% chlorhexidine) (1:1), CLX (1:2), CLX (2:1). Characterization studies included analyses of dry state thickness, surface and cross-sectional morphology using Scanning Electron Microscopy (SEM), structural analysis by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, mass loss degradation analysis under lysozyme action, and active release kinetics analysis in artificial saliva. Microbiological tests included verification analyses of inhibition halos and antibiofilm action against strains of Staphylococcus aureus (*S. aureus*) and Escherichia coli (*E. coli*). Results showed that membrane thickness varied according to proportion, with group QX (1:2) presenting the highest average of $1.022 \text{ mm} \pm 0.2$, followed by QX (1:1) with $0.641 \text{ mm} \pm 0.1$, and QX (2:1) with $0.249 \text{ mm} \pm 0.1$. SEM images showed greater presence of fibers, roughness, and porosity in groups QX (1:2) and QX (1:1) respectively, while QX (2:1) exhibited a smoother, more uniform, and thinner surface. FTIR confirmed characteristic peaks of the materials individually, besides showing ionic bonds formed for PECs. Degradation analysis revealed that groups with added natural actives had better survival rates than QX groups. In release tests, QX-P groups exhibited slower kinetics than QX-C, with 100% cumulative release achieved in 24 h. In inhibitory halo tests, only CLX groups exhibited action against both strains, while QX-P acted against *S. aureus*. Antibiofilm analyses showed CLX groups with the highest metabolic reduction rates in both strains ($\pm 79\%$); QX-P groups showed similar reduction rates in both strains, slightly higher for *E. coli* (60-80%), and QX-C groups had a significant discrepancy between strains: 35-70% for *S. aureus* and 14-19% for *E. coli*. In conclusion, material behavior was directly affected by added actives to the polymeric matrix. Proportions of Q or X only affected final thickness. Regarding proposed drug delivery applications, the devices showed great potential, especially CLX and QX-P groups.

Keywords: polyelectrolytes; chitosan; phytochemicals; drug delivery systems; dental implant-abutment design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases de instalação dos implantes dentários	21
Figura 2 - Processo de osseointegração	22
Figura 3 - Tipos de conexões dos implantes	23
Figura 4 - Fluxograma de trabalho	29
Figura 5 - Desenho esquemático dos dispositivos usados para produção das membranas	33
Figura 6 - Disposição das amostras para ensaio de degradação	36
Figura 7 - Aspecto visual antes da secagem	41
Figura 8 - Aspecto visual após a secagem	42
Figura 9 - Membranas após 24h de impregnação	42
Figura 10 - Fotomicrografias do grupo QX (1:1)	43
Figura 11 - Fotomicrografias do grupo QX (1:2)	44
Figura 12 - Fotomicrografias do grupo QX (2:1)	45
Figura 13 - Gráfico de transmitância da Q e X.....	45
Figura 14 - Gráfico de transmitância dos grupos QX.....	46
Figura 15 - Gráfico de transmitância dos extratos	47
Figura 16 - Gráfico de transmitância dos grupos QX-C	47
Figura 17 - Gráfico de transmitância dos grupos QX-P	48
Figura 18 - Comparação de todos os grupos.....	49
Figura 19 - Gráfico comparativo nos dois tempos analisados do grupo QX-C	50
Figura 20 - Gráfico comparativo nos dois tempos analisados do grupo QX-P	51
Figura 21 - Picos característicos dos extratos	52
Figura 22 - Picos observados a partir das diluições seriadas do extrato de canela ..	52
Figura 23 - Picos observados a partir das diluições seriadas do extrato de própolis	53
Figura 24 - Curva de calibração da canela	54
Figura 25 - Curva de calibração do própolis	55
Figura 26 - Cinética de liberação da canela.....	55
Figura 27 - Cinética de liberação do própolis.....	56
Figura 28 - Ensaio sobre <i>S. aureus</i>	57
Figura 29 - Ensaio sobre <i>E. coli</i>	57

Figura 30 - Placas de Petri com os grupos QX e CLX de ambas as cepas.....	58
Figura 31 - Ensaio sobre <i>S. aureus</i>	59
Figura 32 - Ensaio sobre <i>E. coli</i>	59
Figura 33 - Redução (%) metabólica sobre <i>S. aureus</i>	61
Figura 34 - Redução (%) metabólica sobre <i>E. coli</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
BHI	Brain Heart Infusion
C	Canela
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLX	Clorexidina
CMM	Concentração Microbica Mínima
DO	Densidade Óptica
ETO	Ethylene Oxide
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
P	Própolis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Policaprolactona
PECs	Polyelectrolyte complexes
PLA	Polylactic Acid
Q	Quitosana
RPM	Rotação por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônias
X	Xantana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Implantes dentários	21
2.2 Biomateriais.....	24
3 PROPOSIÇÃO	28
3.1 Objetivos específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Confeção	29
4.1.1 Escolha dos fitoterápicos	30
4.1.2 Escolha das metodologias	30
4.1.3 Confeção das membranas	31
4.2 Ensaio de caracterização	34
4.2.1 Espessura	34
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
4.2.3 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR)	35
4.2.4 Degradação enzimática	35
4.2.5 Análise de liberação dos extratos	36
4.3 Ensaio microbiológicos.....	38
4.3.1 Verificação de halo de inibição.....	38
4.3.2 Verificação da ação antibiofilme	38
5 RESULTADO	40
5.1 Confeção	40
5.2 Ensaio de caracterização	42
5.2.1 Espessura	43
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
5.2.3 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR)	45
5.2.4 Degradação enzimática	49
5.2.5 Análise de liberação	51
5.3 Ensaio microbiológicos.....	56
5.3.1 Verificação de halo de inibição.....	57

5.3.2 Verificação da ação antibiofilme	59
6 DISCUSSÃO	64
6.1 Confecção	64
6.2 Caracterização	65
6.2.1 Espessura	65
6.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	67
6.2.3 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR)	68
6.2.4 Degradação enzimática	70
6.2.5 Análise de liberação	73
6.3 Ensaios microbiológicos	74
6.3.1 Verificação de halo de inibição	74
6.3.2 Verificação da ação antibiofilme	75
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da nossa civilização, a busca pela reabilitação oral tem sido constante. Uma das primeiras evidências de uma prótese foi encontrada em uma mandíbula datada de 600 d.C., contendo fragmentos de conchas usados para substituir os dentes ausentes (Pellizzer et al., 2016). No final do século XIX, os primeiros casos utilizando implantes foram descritos na literatura, porém sem sucesso, devido à falta de biocompatibilidade dos materiais utilizados e pelo design não funcional (Pellizzer et al., 2016).

Já o século XX testemunhou avanços significativos no desenvolvimento de materiais e técnicas. Na década de 1940, o pioneiro Salvatore Formiggini, aclamado como o fundador da implantodontia moderna, inventou um implante endósseo com formato inovador em espiral, se tornando assim importante influência para os designs atuais (Pellizzer et al., 2016). Mais tarde, por volta de 1960, as pesquisas do professor Per-Ingvar Branemark introduziam um dos mais importantes marcos na história da implantodontia: o conceito de osseointegração, estabelecendo um novo padrão para o sucesso dos implantes dentários a longo prazo (Pal, 2015).

Estima-se que são instalados mundialmente mais de um milhão de implantes dentários por ano, e, as altas taxas de sucesso relatadas na literatura (90-95%) fazem desse tratamento reabilitador umas das principais escolhas de cirurgiões dentistas e pacientes, dos casos mais simples até os mais complexos (Pye et al., 2009). Outro fato que tende a crescer a demanda por essa modalidade de tratamento é o aumento da expectativa de vida da população mundial.

Dados do último censo sobre saúde oral no Brasil mostrou uma prevalência de mais de 50% de edentulismo (ausência total dos dentes) presente na população com mais de 60 anos, e aproximadamente 20% da população adulta com pelo menos um elemento dentário ausente (Kinalski et al., 2020). De acordo com projeções, em 2030, estima-se que 20% dos residentes dos Estados Unidos terão 65 anos ou mais, representando um aumento significativo em relação aos 13% registrados no ano de 2010. Além disso, é previsto que a população com 85 anos ou mais praticamente dobrará de 2030 para 2050 (Ortman et al., 2014).

Apesar do alto índice de sucesso, complicações podem ocorrer nos pacientes

implantados. As causas são frequentemente multifatoriais, e podem ser revertidas se identificadas precocemente; caso contrário, pode-se resultar na perda do implante (Park, Wang, 2005). Por isso, um planejamento cuidadoso e acompanhamento regular são essenciais. Recomenda-se que sejam feitos controles a cada 6 meses ou anuais, e, para pacientes com histórico de doença periodontal, a cada 3 meses (Academy of Osseointegration, 2010).

Um agente que é constantemente encontrado nessas complicações é o biofilme, causado pelo acúmulo de resíduos alimentares e bactérias. Essa condição desencadeia uma resposta inflamatória inicial no tecido gengival, que se denomina peri-implantomucosite (Nguyen-Hieu et al., 2012). Caso a situação não seja controlada, pode se agravar, levando a perda do osso de suporte, com a chamada peri-implantite (Derks, Tomasi, 2015). Segundo um consenso reportado em 2017, sangramento e/ou supuração a sondagem juntamente com perda óssea marginal maior ou igual a 3 mm da região mais coronal da parte intra-óssea do implante são indicativos de prognóstico de peri-implantite (Berglundh et al., 2018). Mesmo com as consultas de controle regulares e uma boa higiene oral, as inflamações podem persistir por conta da penetração de algumas bactérias na interface do implante, comprometendo a saúde dos tecidos peri-implantares (Lauritano et al., 2020).

Diante disso, estudos recentes sugerem algumas possíveis soluções como, alterar a estrutura físico-química dos implantes para reduzir a adesão de microrganismos, e, a utilização de biomateriais, como os hidrogéis, com capacidade de estocagem e liberação controlada de fármaco (*drug delivery*) (de Avila et al., 2020). Os hidrogéis são materiais hidrofílicos, altamente dilatáveis quando estão em meio aquoso, podendo ser fabricados com diferentes polímeros naturais e/ou sintéticos a partir de diferentes processos de reticulação (Baroli, 2007). Sua aplicabilidade na medicina regenerativa é vasta e tem sido muito estudada, visto que suas propriedades podem ser projetadas de acordo com cada objetivo específico (Rivest et al., 2007).

Diferentes configurações e formatos de hidrogéis são citados na literatura científica voltada para a engenharia de tecidos, como por exemplo, os “arcabouços” ou *scaffolds* para crescimento ósseo e celular (de Souza et al., 2020), membranas ou filmes para tratamento de lesões de pele (Bellini et al., 2012; Pires et al., 2020), e em formulação de géis para regeneração do tecido pulpar (Dobie et al., 2002; Galler et al., 2012; Ishimatsu et al., 2009). Com resultados positivos e atraentes na literatura, é

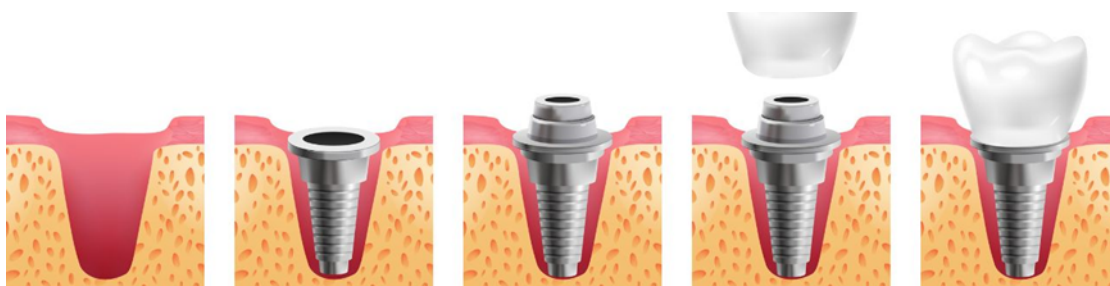
notável observar a gama de possibilidades que esses biomateriais podem trazer para a odontologia preventiva e regenerativa (Cicciù et al., 2019). Para o controle e prevenção de doenças infecciosas e inflamatórias como a peri-implantite, a liberação controlada de fármacos através de hidrogéis pode ser promissora e se tornar uma ferramenta adicional para o controle e manutenção de pacientes implantados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Implantes dentários

A reabilitação com implantes dentários acontece em duas etapas: a fase cirúrgica e a protética. Na primeira fase é feita a instalação do parafuso no osso alveolar. Normalmente o titânio é o material de escolha, devido a biocompatibilidade e alta capacidade de promover o crescimento ósseo (Subramani et al., 2009). Já a segunda fase vai depender da técnica empregada, pois a instalação da prótese pode acontecer imediatamente após a cirurgia ou até que aconteça a osseointegração (de 3 a 6 meses) (Pigozzo et al., 2018), processo pelo qual é definido uma conexão estável e de íntimo contato entre o osso e a superfície do implante (Albrektsson T, Albrektsson B, 1987). As figuras 1 e 2 ilustram as fases de instalação dos implantes e o processo de osseointegração.

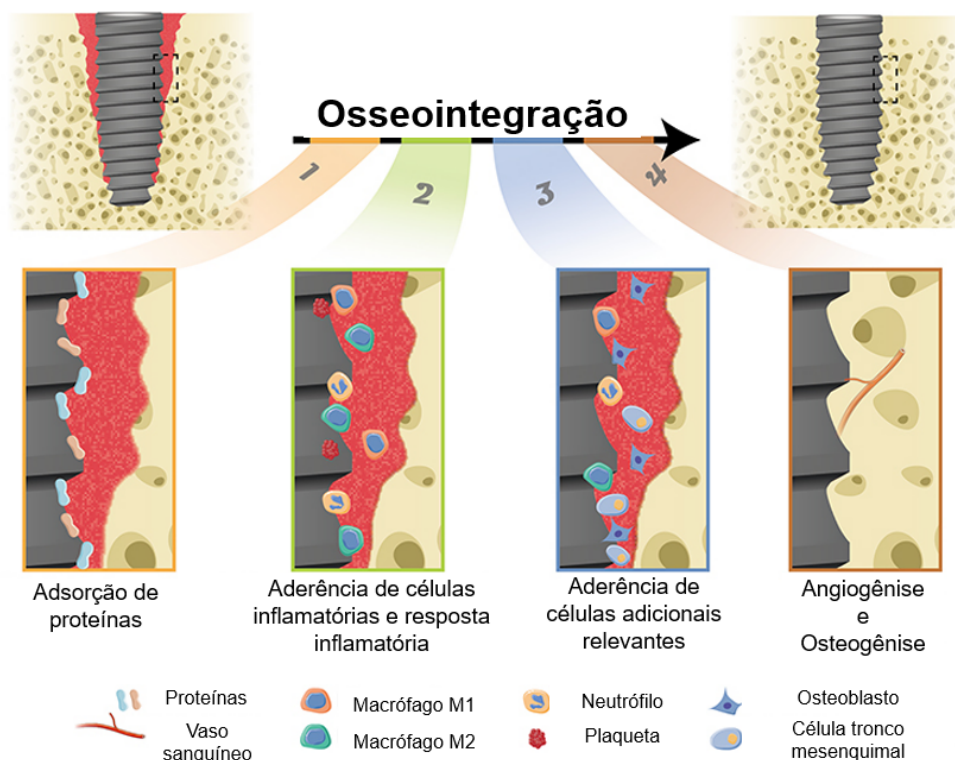
Figura 1 - Fases de instalação dos implantes dentários



Legenda: A primeira fase cirúrgica de instalação do parafuso do implante pode ser feita imediatamente após a extração de um elemento dentário ou não, isso vai depender de cada caso e do planejamento proposto. Nesta ilustração, na primeira imagem, o osso alveolar encontra-se vazio sem elemento dentário simulando uma extração recente; na imagem 2 foi feito a instalação do parafuso do implante; a imagem 3 mostra o implante já com um cicatrizador em posição. Este componente é usado para preparar o tecido gengival para a segunda fase, receber a prótese. A prótese vai ser sustentada por um componente intermediário, podendo ser ela parafusada ou cimentada. A última ilustração mostra a finalização do implante instalado.

Fonte: <https://oraldents.com.br/especialidades/implante-dentario>.

Figura 2 - Processo de osseointegração



Legenda: A osseointegração é um processo complexo envolvendo múltiplas etapas biológicas interativas com a superfície do implante dental. Inicialmente, após a inserção do parafuso no osso alveolar, a superfície do implante é rapidamente umedecida por moléculas de água e proteínas do sangue, resultando na formação de uma camada proteica. Esta camada facilita a adesão celular e induz uma resposta inflamatória inicial, com a aderência de células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos. A nanoestrutura dos implantes de titânio auxilia na imitação da topografia óssea natural, promovendo a adesão de células osteoblásticas e iniciando a osteogênese. Embora a angiogênese, essencial para o fornecimento de nutrientes e oxigênio, esteja representada apenas na fase final nesta ilustração, ela ocorre concomitantemente ao longo de todo o processo.

Fonte: Adaptada de (Wu et al., 2022).

Mesmo sendo um tipo de tratamento reabilitador com grandes chances de sucesso, intercorrências podem acontecer. As falhas nos implantes podem ser acometidas por fatores precoces ou tardios, sendo os precoces aqueles que ocorrem antes da osseointegração e os tardios após esse processo (Pye et al., 2009). Os precoces podem estar correlacionados aos implantes (problemas de fabricação, alterações na superfície do material, pureza e esterilização), ao ato cirúrgico (contaminação, superaquecimento ósseo, traumas desnecessários), problemas mecânicos (torque prematuro, sobrecarga, contatos prematuros) e ao paciente (problemas sistêmicos e/ou locais). Alcoolismo, tabagismo, diabetes, osteoporose,

problemas nutricionais, histórico de radioterapia e quimioterapia, são alguns problemas sistêmicos que podem interferir no sucesso do tratamento (Academy of Osseointegration, 2010; Pye et al., 2009). Já como fatores locais, o histórico de doença periodontal, má higiene oral, inflamação e/ou infecção dos tecidos de suporte e qualidade do osso alveolar, são alguns exemplos (Compton et al., 2017; Pye et al., 2009; Srinivasan et al., 2017).

As falhas tardias são causadas por mudanças estruturais no osso alveolar de suporte devido a problemas mecânicos, infecções e/ou inflamação (Pye et al., 2009). A prótese é confeccionada em um componente chamado pilar ou *abutment*, que é encaixado no parafuso do implante por um método de fixação mecânica. Esse sistema de duas peças gera *micro-gaps* que acabam servindo de reservatórios para o crescimento bacteriano (Aloise et al., 2010). Existem diferentes tipos de conexões entre o implante e a parte protética que podem variar conforme o fabricante, mas as mais conhecidas são: hexágono externo, interno e cônico (*cone morse*). Estudos relatam que os *micro-gaps* existem em todas as conexões, porém o hexágono externo é o mais propício a falhas e a uma maior infiltração bacteriana (Mishra et al., 2017). A figura 3 ilustra os três tipos de conexões.

Figura 3 - Tipos de conexões dos implantes



Fonte: <https://clinicacanova.com.br/implantes>.

A interface implante-pilar normalmente está localizada em nível ósseo, abaixo da gengiva, e essa proximidade com os tecidos juntamente com o infiltrado bacteriano pode levar a uma resposta inflamatória (Lauritano et al., 2020). Inicialmente ela se desenvolve superficialmente gerando sangramento e edema na região, com a chamada peri-implantomucosite, podendo se aprofundar para o osso de suporte gerando reabsorção do tecido, conhecida como peri-implantite (Persson et al., 2010). Segundo o estudo de Melo et al. (2020), o microbioma presente nos *micro-gaps* é complexo, podendo mudar de pessoa para pessoa, levando em consideração problemas sistêmicos e histórico de doença periodontal prévia.

O biofilme encontrado em pacientes saudáveis dentados é predominantemente composto por coco e bacilos gram-positivos facultativos, entretanto na peri-implantite outros micro-organismos são encontrados (Cerbasi, 2010). O *S. aureus* é frequentemente encontrado (44–70%) em bolsas periodontais e lesões peri-implantares, e estudos sugerem que ele desempenha um importante papel no desenvolvimento da peri-implantite (Nguyen-Hieu et al., 2012). O *S. aureus* é comumente reconhecido como um dos principais agentes patogênicos causadores de falha precoce em implantes, devido a sua capacidade de fixação na superfície do titânio, e habilidade de invadir e persistir em osteoblastos causando morte celular (Hu et al., 2021; Shrestha et al., 2012).

Um estudo de caso de 2015 relatou uma possível ligação entre bactérias gram-negativas entéricas resistentes, como a *E. coli*, e falhas precoces em implantes dentários. Os pesquisadores observaram que, embora a composição exata do microbioma não fosse determinada, as comunidades bacterianas eram semelhantes às associadas com periodontite (Medina, Villa-Correa, 2015). A *E. coli*, comum em infecções do sistema nervoso central, do aparelho respiratório e do trato gastrointestinal, também foi detectada em fluidos gengivais (Brolund, 2014). Contudo, sua presença foi muito mais acentuada em pacientes com peri-implantite em comparação com aqueles que apresentavam periodontite (Belibasakis, 2014).

2.2 Biomateriais

Biomateriais são produtos da convergência entre biologia, engenharia e ciências dos materiais. Historicamente presentes na medicina, sua exploração moderna os posicionou em uma variedade de aplicações, incluindo próteses ortopédicas, lentes de contato e dispositivos implantáveis para liberação controlada de fármacos e regeneração de tecidos. Focados primariamente no setor médico, os biomateriais são projetados para diagnóstico, terapêutica e como interfaces ativas com tecidos biológicos, visando otimizar as interações com o organismo e promover resultados clínicos favoráveis. (AlKahtani, 2018; Bapat et al., 2019; Jin, 2022).

Os biomateriais podem ser naturais ou sintéticos, feitos de metais, cerâmicas, polímeros ou combinações. Entre os naturais, normalmente são encontrados os derivados de colágeno, fibras proteicas, polissacarídeos e tecidos biológicos processados (Blocher, Perry, 2017). Dentro desse grupo, os hidrogéis são uma classe bem conhecida, e, podem ser definidos como polímeros tridimensionais que são gerados através de reações de um ou mais monômeros (Ahmed, 2015; Buwalda et al., 2014).

São materiais hidrofílicos, com capacidade de intumescimento quando estão em meio aquoso, e dependendo do processo de reticulação podem ser divididos em quimicamente reticulados, formados através de ligações covalentes, e fisicamente reticulados, formados por interações não covalentes como pontes de hidrogênio (Buenger et al., 2012; Ma et al., 2016). Sua aplicabilidade na medicina regenerativa é vasta, visto que suas propriedades podem ser projetadas de acordo com cada objetivo específico (Rivest et al., 2007). A partir da engenharia dos tecidos, podem ser usados na reconstrução de tecidos ou órgãos, na integridade estrutural para garantir o crescimento celular, como barreiras para prevenir trombozes em pós-operatórios, deposição de medicamentos de maneira controlável, encapsulamento celular e os hidrogéis “inteligentes” com incorporação de biossensores para realização de diagnósticos (Rivest et al., 2007; Slaughter et al., 2009).

Crosslinking ou reticulação pode ser descrita como o processo de indução de ligações físico-químicas entre as cadeias poliméricas dos hidrogéis a fim de alterar suas propriedades para melhorar o material conforme sua necessidade de uso, sendo a reticulação química a mais conhecida e efetiva (Ma et al., 2016). Os produtos desses processos reticulados por íons são conhecidos como coacervados complexos, complexos de pólio ou complexos de polieletrólito (PECs) (Buenger et al., 2012).

A quitosana, derivada da quitina, é um polissacarídeo linear encontrado no exoesqueleto de crustáceos e insetos. É o segundo biopolímero natural mais abundante no mundo, superado apenas pela celulose (Ahmed, 2015; Bhattarai et al., 2010). Suas propriedades, incluindo atividade antimicrobiana e antifúngica, biocompatibilidade, biodegradabilidade, além de ser não-carcinogênica e não-tóxica, fazem dela um material extremamente versátil para várias aplicações biomédicas, como por exemplo, utilizada como componente estrutural em hidrogéis, formados por meio de reticulação físico-química (Bhattarai et al., 2010; Oryan et al., 2018). A quitosana pode ser encontrada em diversas formulações como em géis líquidos, cápsulas, membranas, micropartículas, arcabouços, nano fibrilas e compósitos inorgânicos (Oryan et al., 2018).

A xantana é um polissacarídeo produzido através da fermentação bacteriana da sacarose ou glicose. Ela é amplamente utilizada na indústria alimentícia e em outras aplicações devido às suas propriedades espessantes e estabilizadoras. Devido à sua versatilidade, excelente biocompatibilidade e outras vantagens como estabilidade termal, a xantana tem demonstrado ser um excelente biopolímero para a indústria de engenharia de tecidos para melhorar formulações industriais de produtos com liberação controlada de fármaco, *scaffolds* e até em aplicações de bioimpressões 3D (Kumar et al., 2018; Patel et al., 2020).

A quitosana é solúvel em soluções ácidas, onde adquire um caráter catiônico (carregado positivamente), enquanto a xantana é solúvel em água e apresenta um caráter aniônico (carregado negativamente) devido aos seus grupos carboxilatos. A interação eletrostática entre os grupos funcionais desses polímeros resulta na formação de um complexo polieletrólítico (Bellini et al., 2012). A força das ligações neste complexo pode variar com o pH; em meios mais alcalinos, a quitosana apresenta menos grupos amino protonados, resultando em uma carga positiva reduzida, o que pode enfraquecer as interações eletrostáticas com a xantana (Ćirić et al., 2020). Estudos sugerem que devido as suas propriedades, esses complexos formados têm grande potencial para aplicações no ramo da engenharia de tecidos (Patel et al., 2020).

Dispositivos de *drug delivery* representam um avanço promissor na medicina moderna, oferecendo vantagens significativas na administração de medicamentos. Eles possibilitam a liberação controlada e direcionada de fármacos, maximizando a

eficácia terapêutica enquanto minimizam os efeitos colaterais. Isso é especialmente importante no tratamento de infecções bacterianas, onde a resistência aos antibióticos está se tornando um desafio crescente (Denkbaş, Ottenbrite, 2006). Diante disso, pesquisas emergentes são imperativas para explorar novos métodos de combate às bactérias. Alternativas aos medicamentos tradicionais, como o uso de extratos vegetais e preparações fitoterápicas, têm mostrado potencial devido às suas propriedades antibacterianas inerentes (Meccatti et al., 2023). O desenvolvimento de novos dispositivos de entrega que podem incorporar essas substâncias naturais poderia revolucionar o tratamento de infecções, reduzindo a dependência de antibióticos convencionais e combatendo a ameaça da resistência antimicrobiana.

3 PROPOSIÇÃO

Produzir, caracterizar e analisar microbiologicamente PECs de quitosana e xantana, estruturados em forma de membrana em três diferentes proporções, com a incorporação de ativos naturais e sintéticos para finalidade de liberação controlada de fármaco.

3.1 Objetivos específicos

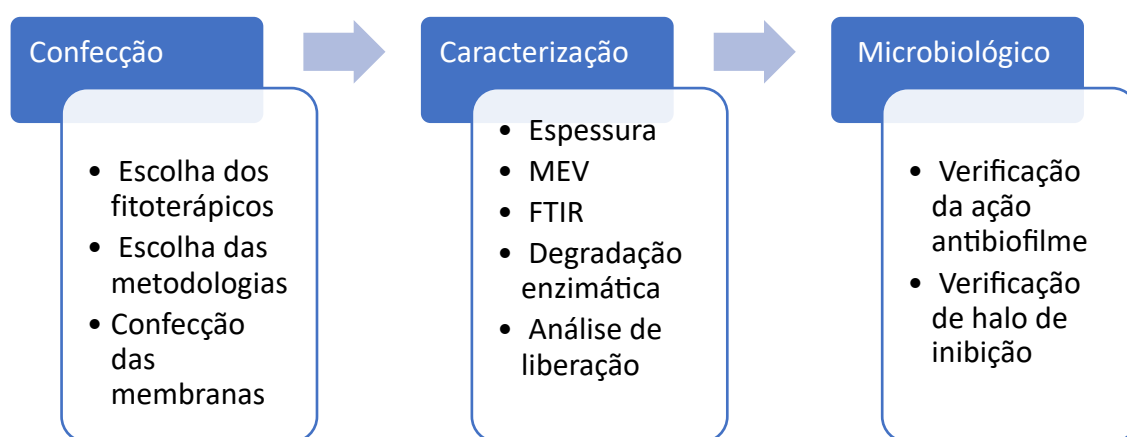
Na perspectiva de objetivos específicos esperou-se:

- Desenvolver membranas uniformes, estáveis na manipulação e possíveis de reprodutibilidade;
- Incorporar ativos de maneira efetiva com objetivo de liberação controlada;
- Caracterizar o material morfolologicamente e estruturalmente;
- Analisar o comportamento frente a degradação enzimática e cinética de liberação;
- Analisar a atividade antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada seguindo três etapas de desenvolvimento, segundo o fluxograma ilustrado na figura 4.

Figura 4 - Fluxograma de trabalho



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1 Confeção

Nesta primeira etapa foram conduzidos: ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de Concentração Microbicida Mínima (CMM) para escolher os extratos vegetais com melhor ação sobre cepas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli*; e testes preliminares para definir a metodologia de produção das membranas e a de incorporação dos fitoterápicos.

4.1.1 Escolha dos fitoterápicos

Para a escolha dos fitoterápicos que seriam incorporados nas membranas, foi realizado um teste piloto para verificar a ação antibacteriana sobre cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Extratos de gengibre, romã, quilaia, alecrim, canela e própolis foram preparados no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LabQ) do ICT-UNESP de São José dos Campos em três diferentes veículos: alcoólico, hidroalcoólico e aquoso, seguindo a proporção 30 g da matéria-prima para cada 100 mL do veículo, com tempo de extração de 48 h. Os extratos foram filtrados em duas etapas: filtração para remoção dos resíduos sólidos (filtro de papel com microfuros) e filtração para esterilização (filtro de membrana 0,22 μm).

Para o teste antimicrobiano, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo a *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, norma M7-A9, para a determinação da CIM e da CMM dos extratos isolados para cada cepa bacteriana. O inóculo foi padronizado em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil) utilizando-se o comprimento de onda de 590 nm e densidade óptica de 0,324 para *E. coli* e o comprimento de onda de 490 nm e densidade óptica de 0,374 para *S. aureus* resultando em uma suspensão padrão de 10^6 UFC/mL. Em diferentes microplacas (Kasvi K12-096, São José do Pinhais, Brasil), foram realizadas 10 diluições seriadas (1:2) dos extratos em meio de cultura Mueller Hinton (HiMedia® Mumbai, Índia). Alíquotas de 100 μL de cada suspensão microbiana foram adicionadas em todos os poços. Após incubação por 24 h a 37°C, a CIM foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvações que indiquem crescimento microbiano. Para que a CMM dos extratos fosse determinada, alíquotas de todos os poços foram diluídos e semeados (pela técnica da gota) em ágar BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi Ltda, Curitiba, PR, Brasil). Após secagem das gotas (~ 5 min), a placa foi invertida e incubada (37°C/24 h). As colônias foram contadas em cada gota e os valores médios foram apresentados em UFC/mL.

4.1.2 Escolha das metodologias

Para criar membranas estáveis de quitosana (Q) e xantana (X), algumas técnicas relatadas na literatura científica foram testadas (Argin-Soysal et al., 2009; Bellini et al., 2012; Dumitriu et al., 1994; Kim et al., 2017; Sundaram et al., 2019; Veiga & Moraes, 2012). A metodologia selecionada foi baseada nos melhores resultados observados, levando em conta a uniformidade da suspensão final e a capacidade de consistência na reprodução do material. Os procedimentos experimentais avaliados estão resumidos no quadro 1.

Quadro 1 - Testes preliminares para escolha da metodologia

Testes	Variáveis
Diferentes concentrações das soluções de Q e X	0.2%, 0.5%, 1%, 1.5% e 2%
Equipamentos para realizar a diluição das soluções	Agitador magnético; agitador mecânico; sonificador ultrassônico; centrífuga
Neutralização do ácido residual	NaOH ou sem neutralização
Mistura das duas soluções finais	Agitador magnético; agitador mecânico (com ou sem auxílio de bomba injetora)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para incorporar os extratos selecionados de maneira efetiva, duas técnicas foram testadas: impregnação por solução (Sato et al., 2020) e adição direta na solução de fabricação das membranas (Pires et al., 2020). A metodologia de escolha foi baseada nos melhores resultados observados segundo teste piloto.

4.1.3 Confeção das membranas

Os testes preliminares determinaram que os extratos alcoólicos de própolis verde (*Baccharis dracunculifolia*), na concentração de 111,4 mg/mL, e canela (*Cinnamomum verum*), concentração de 4,2 mg/mL seriam os fitoterápicos

empregados nesta pesquisa. Para a fabricação das membranas, adotou-se a metodologia de Bellini et al. (2012), enquanto a incorporação dos extratos foi realizada pela técnica de adição direta, conforme descreve Pires et al. (2020). O quadro 2 detalha os materiais utilizados.

Quadro 2 - Materiais utilizados e informações

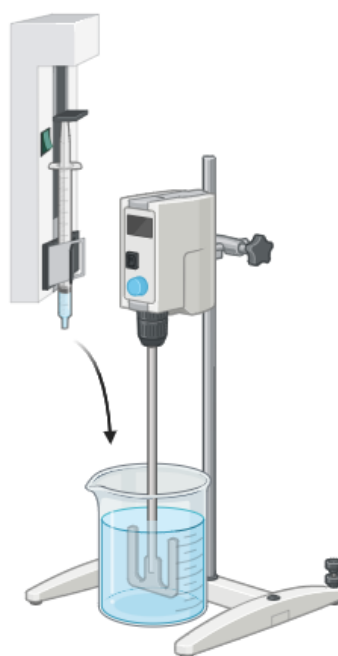
Material	Fabricante	Composição	Lote
Quitosana de alta massa molecular	Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA	$C_{12}H_{24}N_2O_9$ Poly (D-glicosamina) Quitina desacetilada	419419 – 50 g
Xantana	Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA	Goma Xantana de <i>Xanthomonas campestris</i>	43708 – 50 g
Ácido Acético Glacial P.A.	Lafan Química Fina Ltda.	$C_2H_4O_2$ (99,5%)	32963
Água destilada	Produção própria	-	-
Extratos vegetais	Produção própria	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Primeiramente, as soluções foram produzidas separadamente. Uma solução de Q 1% (m/v) foi feita a partir da dissolução de 2 g do pó em 200 mL de solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v). Outra solução de X 1% (m/v) foi feita a partir da dissolução de 2 g do pó em 200 mL de água destilada. Ambas as soluções foram levadas ao agitador magnético (FISATOM 753A - Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e ficaram sob agitação em temperatura ambiente durante 1 h até completa dissolução. Após, a solução de X foi levada ao agitador mecânico (FISATOM 713 DS - Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, São Paulo, SP Brasil) onde ficou sob agitação constante de aproximadamente 1000 rpm enquanto a solução de Q foi colocada em seringa hipodérmica de 60 mL (Descarpak, São Paulo, SP, Brasil) e com auxílio de uma bomba injetora (KD-100, KDScientific, Holliston, MA, EUA) foi despejada sob a solução de X a uma vazão de 200 mL/h conforme o

esquema da figura 5. Após o término do gotejamento, as suspensões se mantiveram sob agitação por mais 10 min para uma melhor uniformidade. Antes de se realizar a mistura das duas soluções, as mesmas foram divididas em quantidades pré-definidas para formarem 3 proporções diferentes: 1:1, 1:2 e 2:1 (Q:X). Após feito cada proporção, 6 mL dos extratos foram acrescentados em cada grupo, correspondendo a 10% do volume total.

Figura 5 - Desenho esquemático dos dispositivos usados para produção das membranas



Fonte: <https://app.biorender.com> (elaborado pelo autor).

Em seguida as suspensões de QX foram despejadas em placas de Petri de poliestireno 90 x 15 mm (CRAL Artigos para Laboratório Ltda, Cotia, SP, Brasil), totalizando um volume de 60 mL por placa, e levadas para secagem em estufa a 37°C por 24 h. Depois desse período, as membranas passaram pelo processo de lavagem a fim de se remover o ácido residual, onde elas foram imersas em 200 mL de água deionizada por 30 min. O processo de lavagem foi feito duas vezes. Por fim, as

membranas foram devolvidas para estufa a 37°C por mais 24 h e, após, foram armazenadas em uma jarra dessecadora a vácuo até serem submetidas aos testes *in vitro*. Os grupos feitos para essa pesquisa estão descritos no quadro 3.

Quadro 3 - Representação dos grupos conforme sua composição

	QX (1:1)	QX (1:2)	QX (2:1)	QX-P (1:1)	QX-P (1:2)	QX-P (2:1)	QX-C (1:1)	QX-C (1:2)	QX-C (2:1)
Quitosana (Q)	30 mL	20 mL	40 mL	27 mL	18 mL	36 mL	27 mL	18 mL	36 mL
Xantana (X)	30 mL	40 mL	20 mL	27 mL	36 mL	18 mL	27 mL	36 mL	18 mL
Própolis (P)	-	-	-	6 mL	6 mL	6 mL	-	-	-
Canela (C)	-	-	-	-	-	-	6 mL	6 mL	6 mL
Total	60 mL								

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Ensaios de caracterização

4.2.1 Espessura

Esse teste foi realizado somente nos grupos QX. A espessura das membranas foi medida utilizando um micrometro digital (APB-3D, Mitutoyo Corporation, Tokyo, Japão) em 5 pontos distintos, tanto nas regiões centrais como nas periféricas. As medições ocorreram logo após a fase de secagem, antes das membranas serem cortadas para os outros testes. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software Jamovi (versão 2.3).

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia superficial e corte transversal das membranas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV; JEOL, JSM6360-LV), onde os corpos de prova foram previamente fixados em um suporte adequado e metalizados com fina camada de ouro (Bal-Tec, SCD 050). Somente os grupos QX foram analisados utilizando os aumentos de 500x. Esse teste foi realizado no ICT-Unifesp de São José dos Campos.

4.2.3 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização estrutural foi feita através da análise FTIR nas membranas e nos seus componentes isoladamente. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (FTIR LR 64912C, Perkin Elmer, EUA) através de acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR), em um intervalo de comprimento de onda de 4000 a 650 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras. A leitura em cada grupo foi feita em triplicata e os gráficos com os resultados foram plotados utilizando o software OriginPro2 2024 (versão 10.1.0.170)

4.2.4 Degradação enzimática

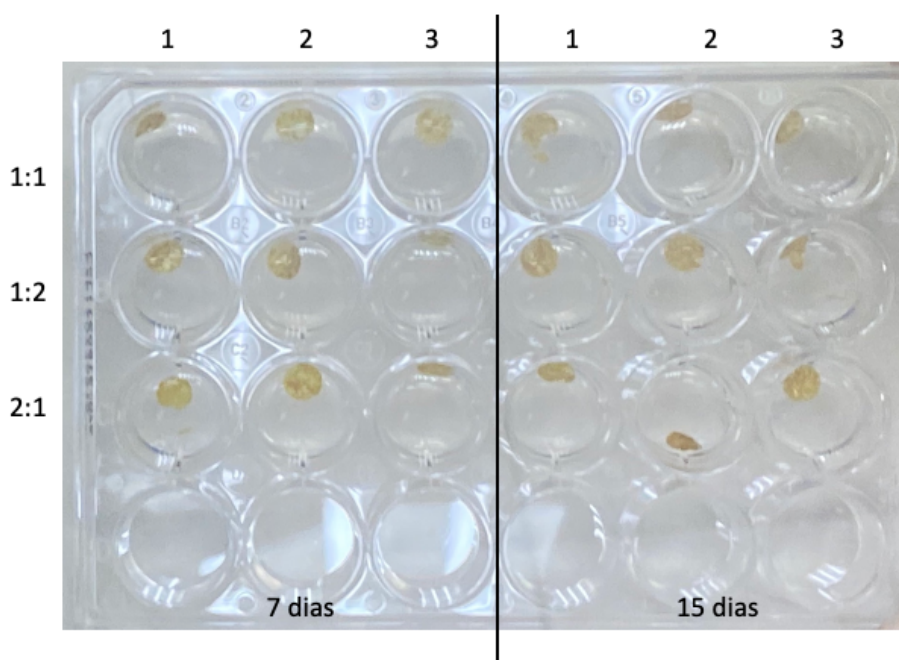
A metodologia empregada foi baseada no estudo de Dallan et al. (2006) e na norma ASTM F 1635-16. Membranas secas foram cortadas com auxílio de um perfurador obtendo discos de 6 mm de diâmetro. As amostras foram previamente pesadas (massa inicial - *M_i*) em balança analítica e esterilizadas em óxido de etileno (ETO). As membranas foram colocadas em placas de 24 poços (Corning Co., Cambrigne, MA, USA) onde adicionou-se 3 mL em cada poço de uma solução de lisozima (lisozima humana, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a 5 mg/mL em tampão fosfato estéril (PBS) de pH 7.4. A disposição dos grupos na placa está demonstrado na figura 6. As amostras foram incubadas em estufa à 37°C, e retiradas em 7 e 15

dias. Por fim, as membranas foram lavadas três vezes com água destilada, secas por mais 24 h em estufa a 37°C e pesadas em balança analítica para se obter a massa final (M_f). A estabilidade foi quantificada com base na perda de massa ($\mathcal{L}$), utilizando a equação:

$$\mathcal{L} = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \cdot 100$$

O ensaio foi realizado em triplicata e os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software Jamovi (versão 2.3). Além disso, os gráficos com os resultados foram plotados utilizando o software OriginPro2 2024 (versão 10.1.0.170).

Figura 6 - Disposição das amostras para ensaio de degradação



Legenda: Placa correspondente ao grupo QX-P. As linhas correspondem aos grupos conforme a proporção e as colunas, da esquerda para a direita, refere-se ao tempo do ensaio de 7 a 15 dias. Foram feitas mais duplas placas com os grupos QX e QX-C.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.5 Análise de liberação dos extratos

As leituras de absorvência foram feitas no laboratório de nanossensores do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Univap-SJC. Primeiramente foi realizada uma curva analítica obtida através de diluições seriadas (1:2) dos extratos que foram lidas em espectrofotômetro de gota Uv-visível (DS-11 FX +, DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) na faixa de 220 a 750 nm. O ensaio foi realizado em triplicata utilizando membranas de 1 x 1 cm², onde foram colocadas em frascos de vidros contendo 3 mL de saliva artificial (Kin Hidrat, Pharma Kin, São Paulo, SP, Brasil). Os frascos foram incubados a 37°C e em períodos determinados (60 min, 240 min, 480 min, 1.440 min e 2880 min) eram retirados 200 µL para posterior medição da absorvência em espectrofotômetro de Uv-visível. Em todos os períodos houve troca do meio com uma nova solução de saliva até o fim do ensaio. A leitura da absorvência no espectrofotômetro foi realizada entre os comprimentos de onda de 220 a 750 nm e os valores foram correlacionados com a concentração de partículas do composto ativo liberada através da Lei de Lambert-Beer (Paramelle et al., 2014):

$$A = C \cdot \epsilon \cdot b$$

Em que *A* é a absorvência, *C* a concentração de partículas, ϵ o coeficiente de absorvência molar e *b* é a distância do caminho óptico. Os dados obtidos na curva analítica possibilitaram calcular a concentração dos valores de absorvência nos diferentes tempos analisados. Com esses dados, foi possível plotar gráficos de cinética de liberação acumulada (%) pelo tempo relacionados ao total de extrato incorporado em cada amostra de 1 x 1 cm². Para calcular a concentração total dos extratos em cada amostra a seguinte fórmula foi utilizada:

$$C = \left(\frac{V_{se} \cdot C_{se}}{A_p} \right) \cdot A_a$$

Onde *C* é a concentração total da amostra, *V_{se}* é o volume total da solução estoque do extrato, *C_{se}* é a concentração da solução estoque, *A_p* é a área da placa de Petri e *A_a* é a área da amostra. Os gráficos gerados foram plotados utilizando o software OriginPro2 2024 (versão 10.1.0.170) e Excel (versão 16.83).

4.3 Ensaios microbiológicos

Todas as membranas utilizadas nos ensaios microbiológicos, assim como na análise de degradação, foram previamente cortadas com auxílio de um perfurador de papel em formato de disco com aproximadamente 6 mm de diâmetro e esterilizadas em ETO pela empresa Produmed – Serviços Industria e Comercio LTDA (Arujá - São Paulo/SP) conforme os parâmetros: pré-vácuo de 36 min; pressão de - 0,50 kfg/cm², tempo de aquecimento de 20 min; tempo de esterilização de 180 min, peso do gás ETO 660 mg/m³, taxa de umidade 87,5%; taxa de temperatura de 52,7°C e tempo de mecânica de 6 pulsos (72 min). Para os testes microbiológicos foram produzidas membranas contendo clorexidina a 0,2% (Riohex, Rioquímica Ltda, Goiânia, Brasil) que foram denominados como grupo “CLX”. A mesma metodologia citada no item 4.1.3 foi usada para a produção.

4.3.1 Verificação de halo de inibição

Este teste foi realizado nos grupos QX-C, QX-P e CLX com um n=3. Cepas de *S. aureus* e *E. coli* foram padronizadas em espectrofotômetro (10⁶ UFC/mL) e espalhadas uniformemente em placas de Petri com ágar BHI usando um swab. Em seguida, as membranas foram posicionadas com auxílio de uma pinça clínica em locais previamente demarcados. As placas foram então incubadas a 37°C em estufa de cultura de 24 a 48 h, e foi verificado se havia a formação de um halo na área que circundava as membranas, indicando assim inibição do crescimento bacteriano. Após cada período, os halos foram medidos com auxílio de uma régua e média e desvio padrão.

4.3.2 Verificação da ação antibiofilme

Esse teste foi realizado nos grupos QX-C, QX-P e CLX com um n=8. Placas de 96 poços foram acrescidas de 100 µL/poço de caldo BHI e as membranas esterilizadas. Após preparo e padronização em espectrofotômetro (10^5 UFC/mL), suspensões bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* foram adicionadas (100 µL/poço) totalizando 200 µL/poço. O controle negativo foi feito usando os poços somente com os microrganismos e caldo BHI. As placas foram levadas para incubação a 37°C durante 48 h para formação do biofilme, com substituição do caldo após 24 h. Após as 48h, foi realizado o teste de viabilidade celular das células microbianas no qual foram adicionados 100 µL de solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em cada poço. As placas foram então incubadas ao abrigo da luz a 37 °C durante 1h. Depois desse período, a solução de MTT e as membranas foram retiradas dos poços e foram adicionados 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram novamente incubadas em estufa a 37°C por 10 min e colocadas sob agitação constante por mais 10 min. Por fim, as placas foram colocadas em espectrofotômetro (Epoch™; BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) em 570 nm, para se obter a densidade óptica (DO) de cada poço e assim serem convertidas em percentual de atividade metabólica através da fórmula:

$$R(\%) = 100 - \left(\frac{D1 \cdot 100}{D2} \right)$$

Onde **R**(%) é redução da viabilidade, **D1** é densidade óptica do poço tratado e **D2** é a média da densidade óptica do grupo controle negativo. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software Jamovi (versão 2.3) e os gráficos foram plotados utilizando o software OriginPro2 2024 (versão 10.1.0.170).

5 RESULTADO

5.1 Confecção

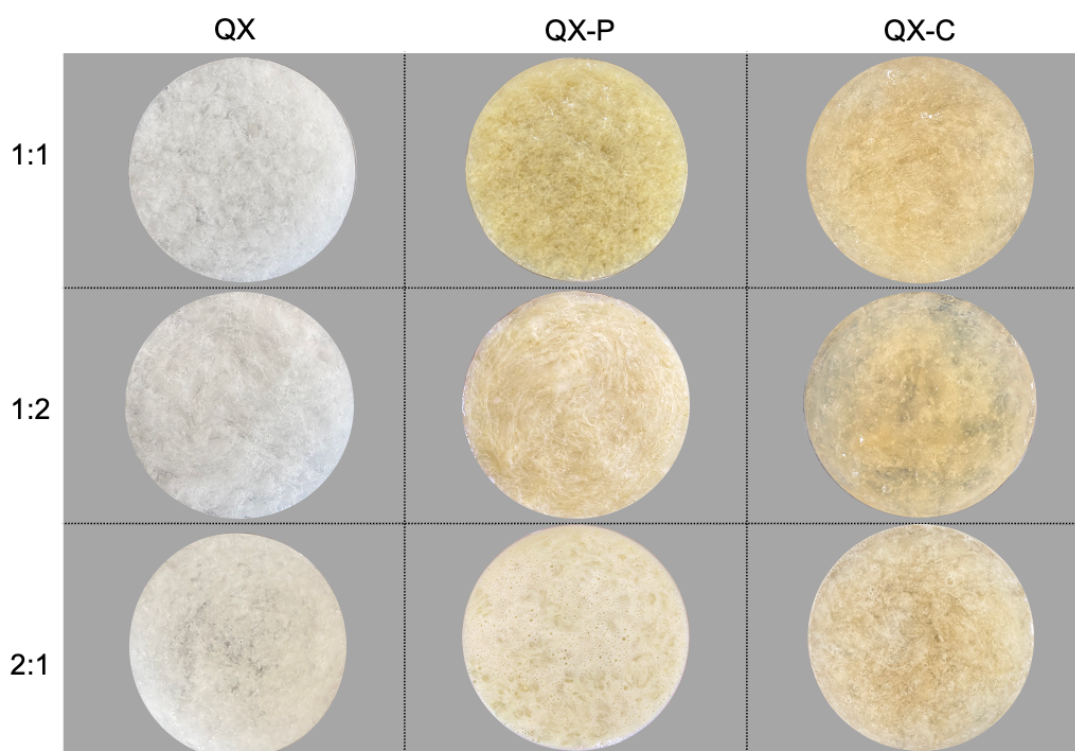
Os testes preliminares foram conduzidos com o intuito de selecionar os fitoterápicos e a metodologia de produção das membranas, além de escolher a técnica para a incorporação dos extratos na matriz polimérica. Os extratos que tiveram os melhores resultados nos testes microbiológicos frente ao *E. coli* e *S. aureus* foram os de própolis verde a uma concentração de 111,4 mg/mL, e canela, na concentração de 4,2 mg/mL, ambos extraídos com etanol absoluto (álcool etílico 99.5% - Merck Darmstadt, Alemanha). O própolis verde foi preparado a partir da própolis bruta cedida pelo fornecedor Apis Brasil (Pindamonhangaba, SP, Brasil) e a canela em casca foi adquirida comercialmente (Com-ciência Saúde, São José dos Campos, SP, Brasil). Os valores encontrados no ensaio de CIM para cada cepa testada foram:

- *E. coli*: Canela = 1 mg/mL e Própolis = 27,8 mg/mL
- *S. aureus*: Canela = 0,5 mg/mL e Própolis = 3,4 mg/mL

A metodologia mais promissora para a produção das membranas foi a descrita por Bellini et al. (2012), onde se utilizou a Q e X nas concentrações de 1% no agitador magnético em conjunto com o agitador mecânico de alta capacidade, controlando a mistura das duas soluções com bomba injetora. Assim, as suspensões finais de QX obtidas apresentaram-se mais uniformes e com presença de bolhas. A metodologia não tem passos longos e complexos, sugerindo uma facilidade de reprodutibilidade. Além disso, os autores não indicaram a neutralização da solução de Q, pois assim possibilitou uma maior quantidade de ligações iônicas do complexo, resultando em um material final mais estável. O ácido residual proveniente da solução de Q é removido nas lavagens que são conduzidas após a secagem, portanto não há grandes vantagens em se fazer a neutralização. Nesta pesquisa foi incluído a variável de proporcionalidade dos materiais para verificar se havia influência maior da Q ou X na aplicabilidade proposta.

Quanto a incorporação dos extratos nas membranas, a técnica selecionada foi a de adição direta, conforme descreve Pires et al. (2020). A figura 7 mostra o aspecto visual dos grupos antes da secagem e a figura 8 mostra alguns grupos no estado seco. A técnica da impregnação por solução não apresentou resultados favoráveis nos testes microbiológicos preliminares, demonstrando que possivelmente não se teve uma eficiência de incorporação. A figura 9 apresenta os tubos *ependorf* contendo as membranas após 24 h imersas tanto nos extratos vegetais quanto na solução de clorexidina a 0,2%. É perceptível que a membrana submersa na clorexidina sofreu intumescimento, em contraste com as imersas nos extratos vegetais, que não apresentaram inchaço visível.

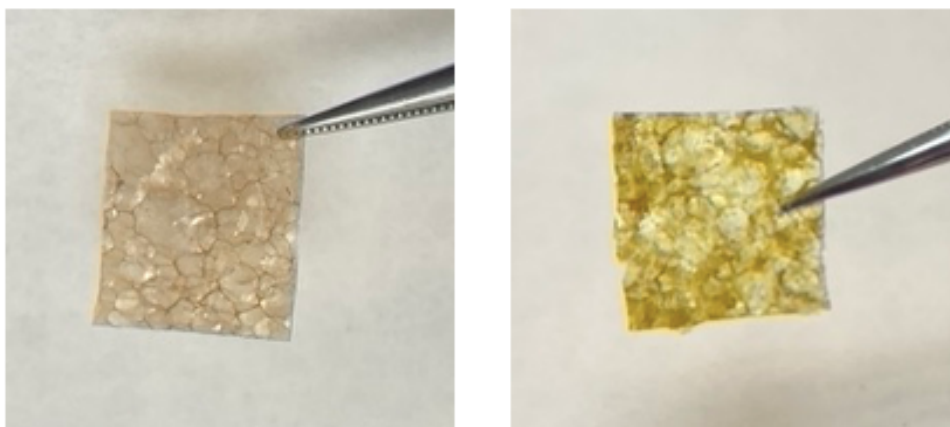
Figura 7 - Aspecto visual antes da secagem



Legenda: Fotos tiradas das placas de Petri.

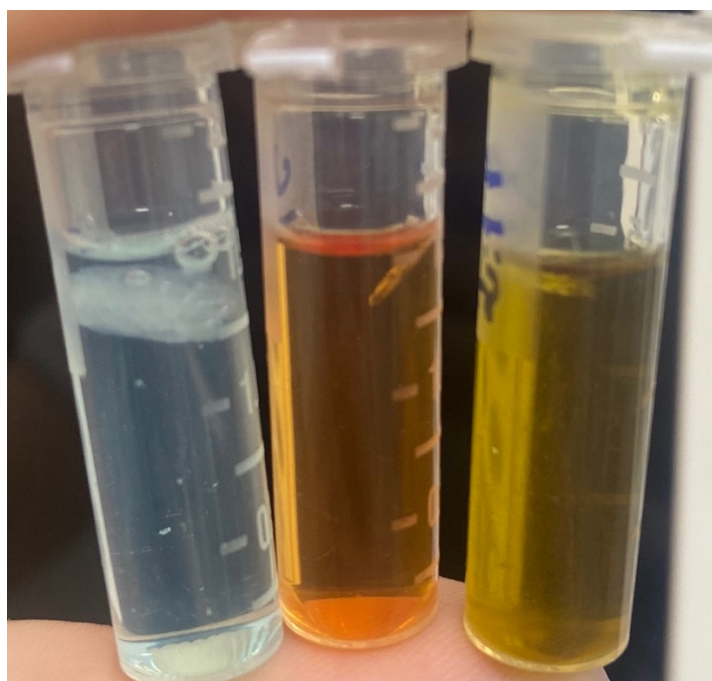
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 - Aspecto visual após a secagem



Legenda: Da esquerda para a direita: grupo QX-C e QX-P em amostras de 1x1 cm.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Membranas após 24h de impregnação



Legenda: Da esquerda para a direita, clorexidina 0,2%, canela e própolis.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Ensaios de caracterização

5.2.1 Espessura

A estatística descritiva aplicada aos dados das medições de espessura revelou uma homogeneidade consistente e uma distribuição tendendo à normalidade, conforme evidenciado por valores de $p > 0,05$ no teste de Shapiro-Wilk. Portanto, aplicou-se testes paramétricos de análise de variância (ANOVA - 1 fator) e teste Post-Hoc de Tukey com nível de significância de 5%. Os detalhes estão na tabela 1.

Tabela 1 - Espessura das membranas no estado seco

Grupos	Espessura (mm)
QX (1:1)	$0,641 \pm 0,1$ <i>b</i>
QX (1:2)	$1,022 \pm 0,2$ <i>a</i>
QX (2:1)	$0,211 \pm 0,02$ <i>c</i>

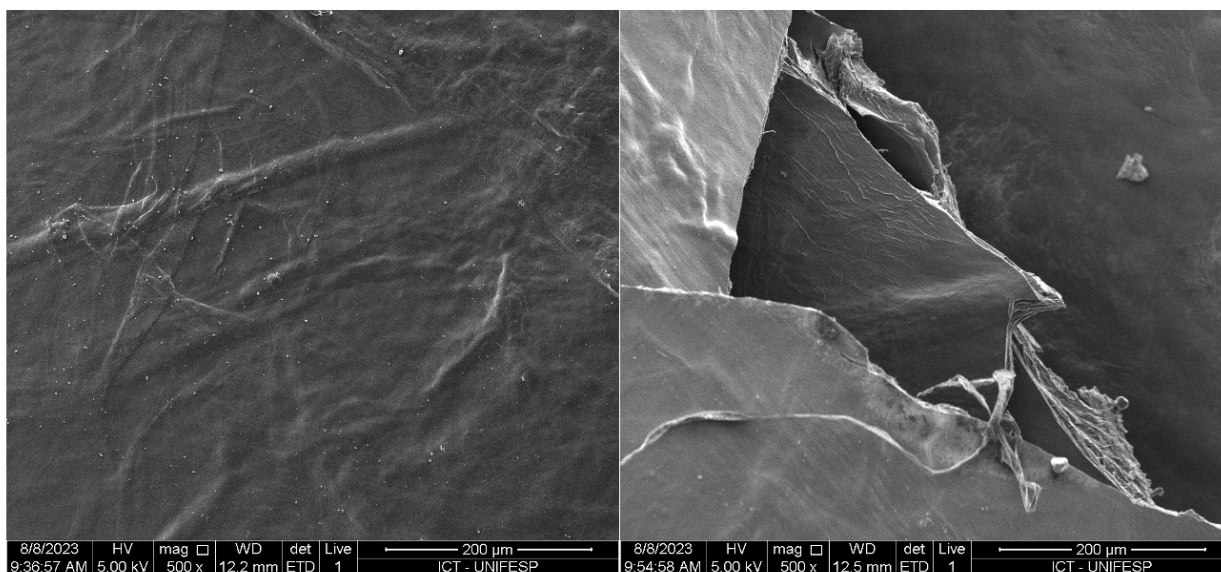
Legenda: Letras diferentes corresponde a diferença significativa entre os grupos (p menor ou igual a 0,05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

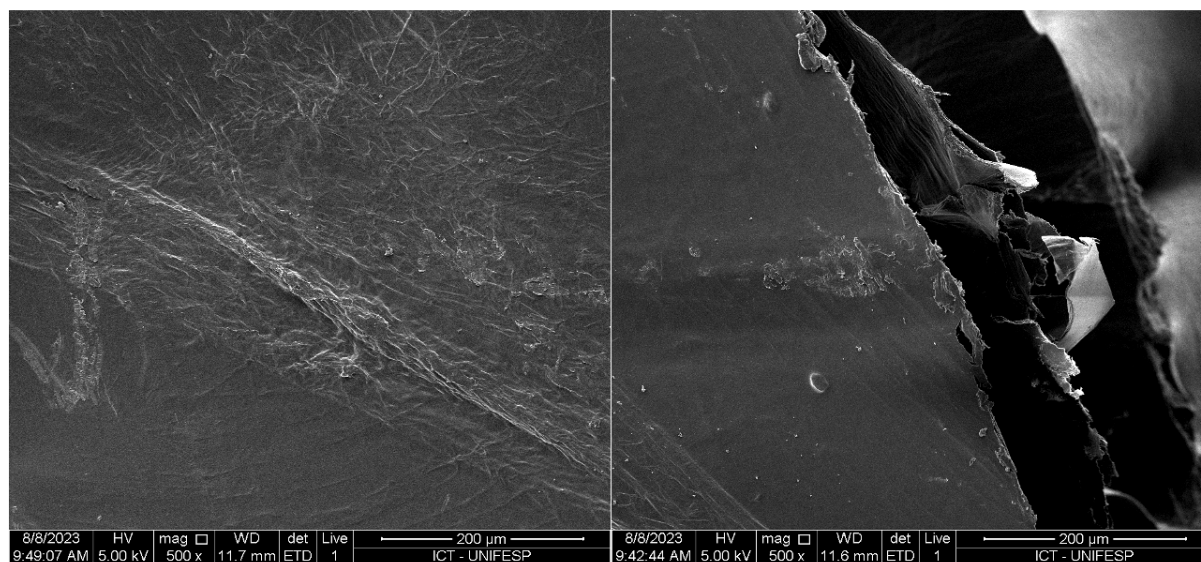
As fotomicrografias de superfície e borda obtidas pela análise do MEV estão apresentadas nas figuras de 10 a 12.

Figura 10 - Fotomicrografias do grupo QX (1:1)



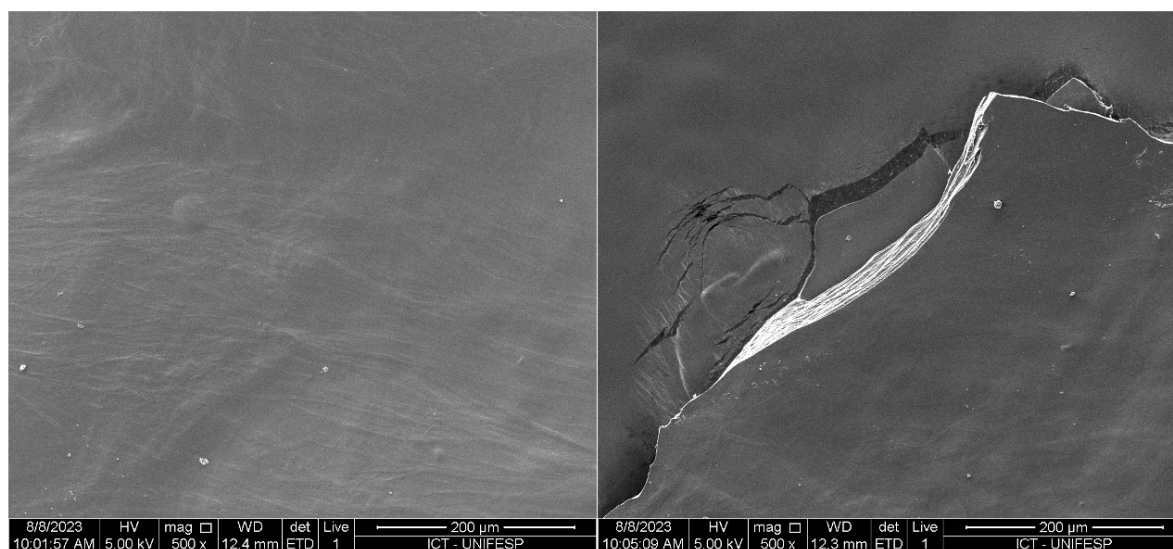
Legenda: Vista superficial (esquerda) e de borda (direita). Aumento de 500x.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Fotomicrografias do grupo QX (1:2)



Legenda: Vista superficial (esquerda) e de borda (direita). Aumento de 500x.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 - Fotomicrografias do grupo QX (2:1)



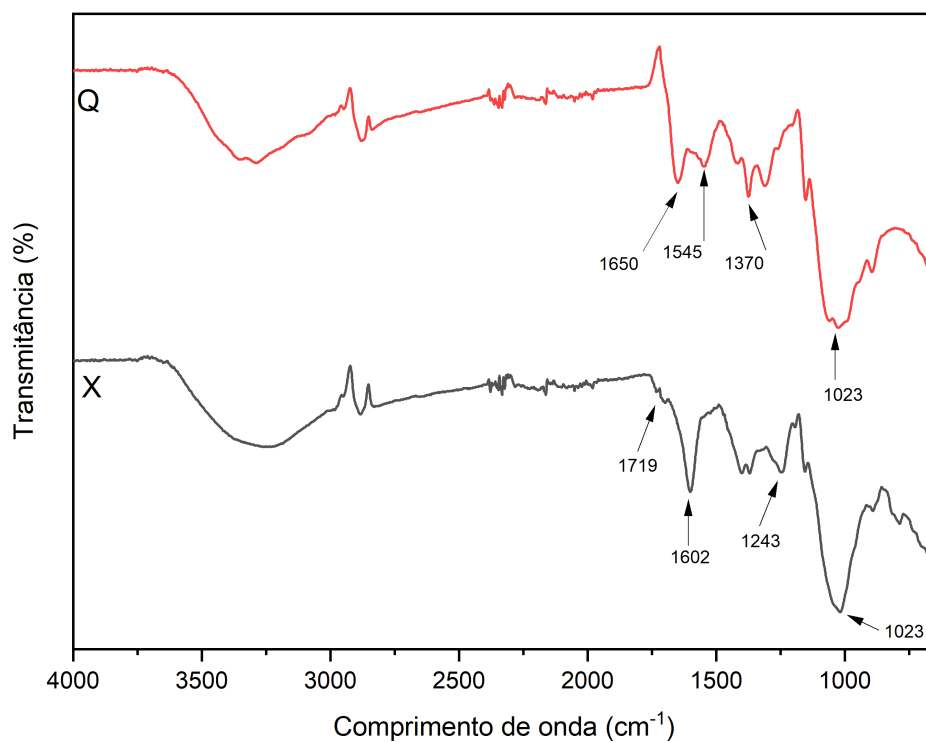
Legenda: Vista superficial (esquerda) e de borda (direita). Aumento de 500x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

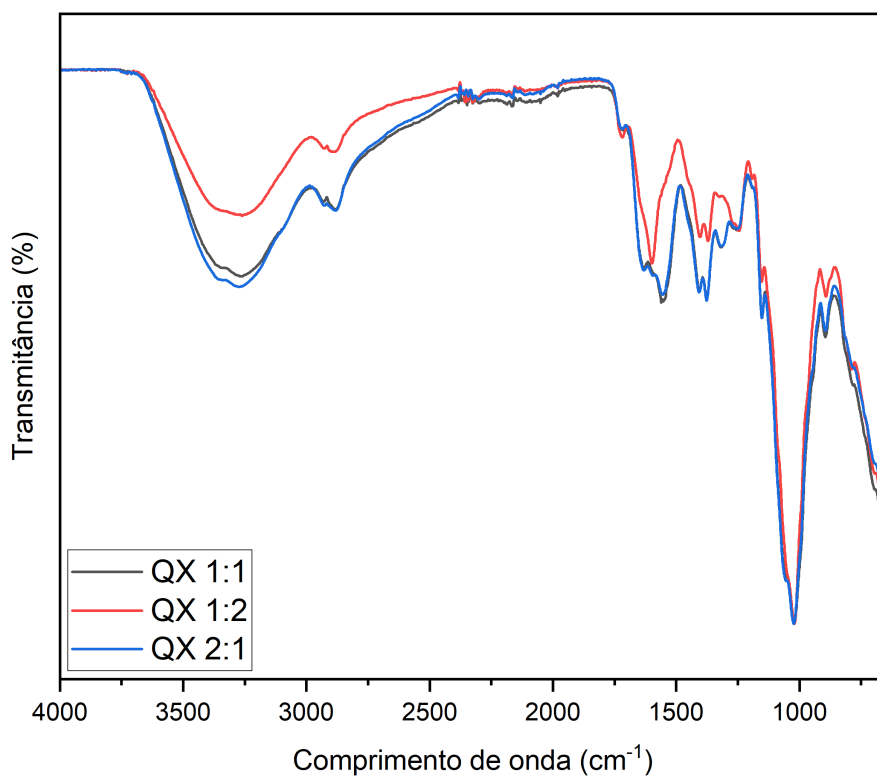
A análise de FTIR foi feita nos 9 grupos avaliados neste trabalho, bem como para os seus componentes individuais. Os gráficos obtidos estão apresentados nas figuras 13 a 18.

Figura 13 - Gráfico de transmitância da Q e X



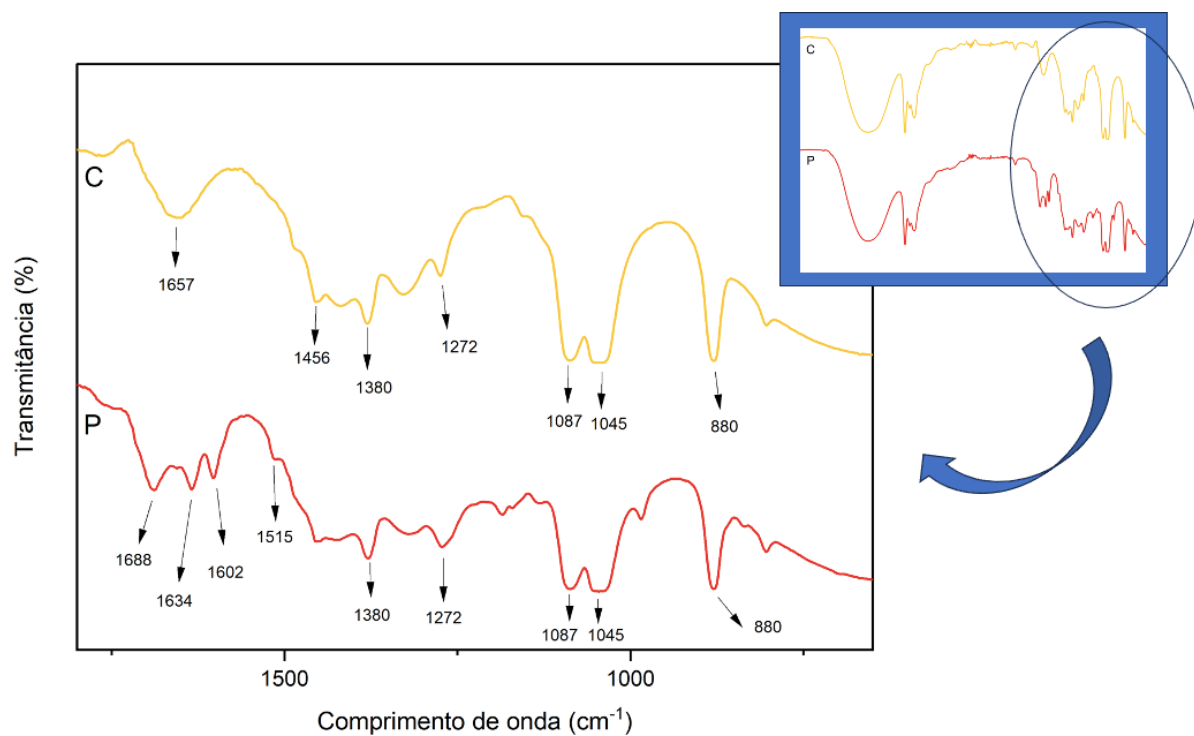
Legenda: As setas mostram os picos característicos de cada material.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Gráfico de transmitância dos grupos QX



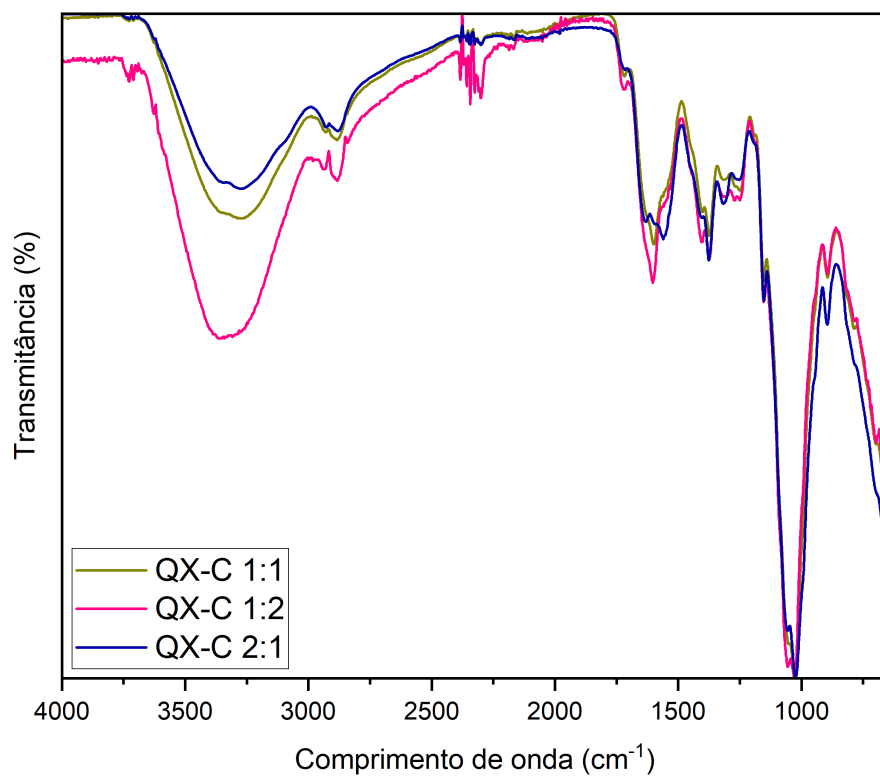
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Gráfico de transmitância dos extratos



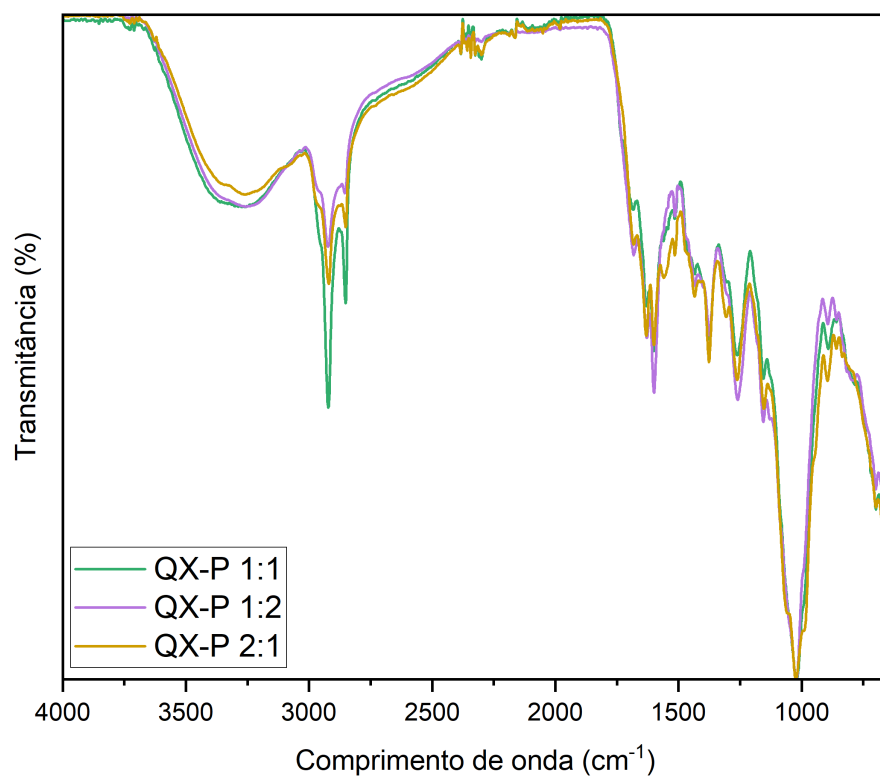
Legenda: C = canela e P = própolis. A imagem menor superior demonstra o espectro inteiro obtido e a outra maior com zoom mostra os grupos funcionais a partir do comprimento de onda 1800 cm^{-1} . As setas mostram os picos característicos de cada material.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - Gráfico de transmitância dos grupos QX-C



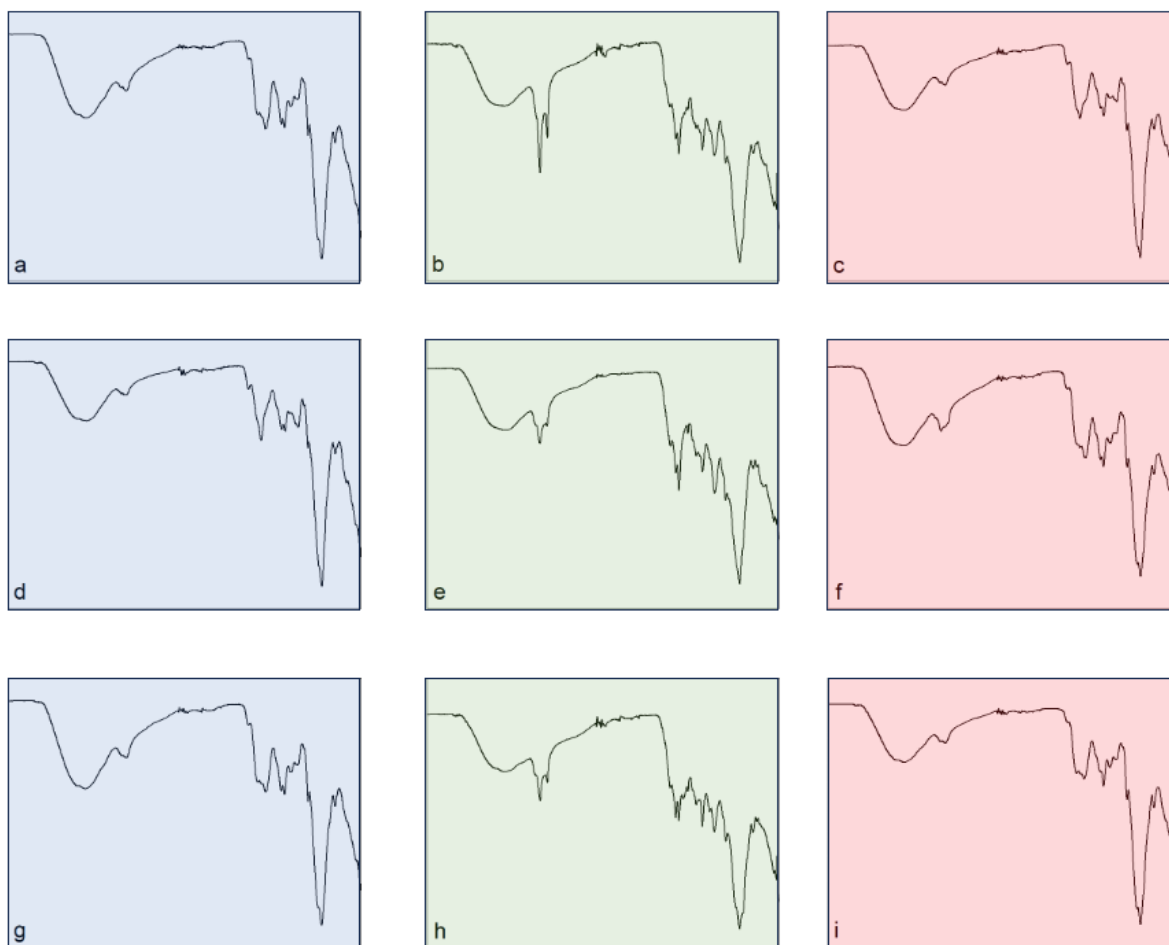
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 - Gráfico de transmitância dos grupos QX-P



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 - Comparação de todos os grupos



Legenda: Azul representa os grupos QX, verde os grupos QX-P e rosa os grupos QX-C. Letras a,b e c representam os grupos na proporção 1:1; letras d,e e f representam os grupos na proporção 1:2; letras g, h e i representam os grupos 2:1.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.4 Degradação enzimática

Os grupos QX tiveram 100% de degradação nos dois tempos estudados, por conta disso foi feita análise estatística somente nos outros grupos. A estatística descritiva dos dados conferiu homogeneidade dos resultados e uma distribuição tendendo à normalidade, conforme evidenciado por valores de $p > 0,05$ no teste de Shapiro-Wilk. Portanto, aplicou-se testes paramétricos de análise de variância (ANOVA) e teste Post-Hoc de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados

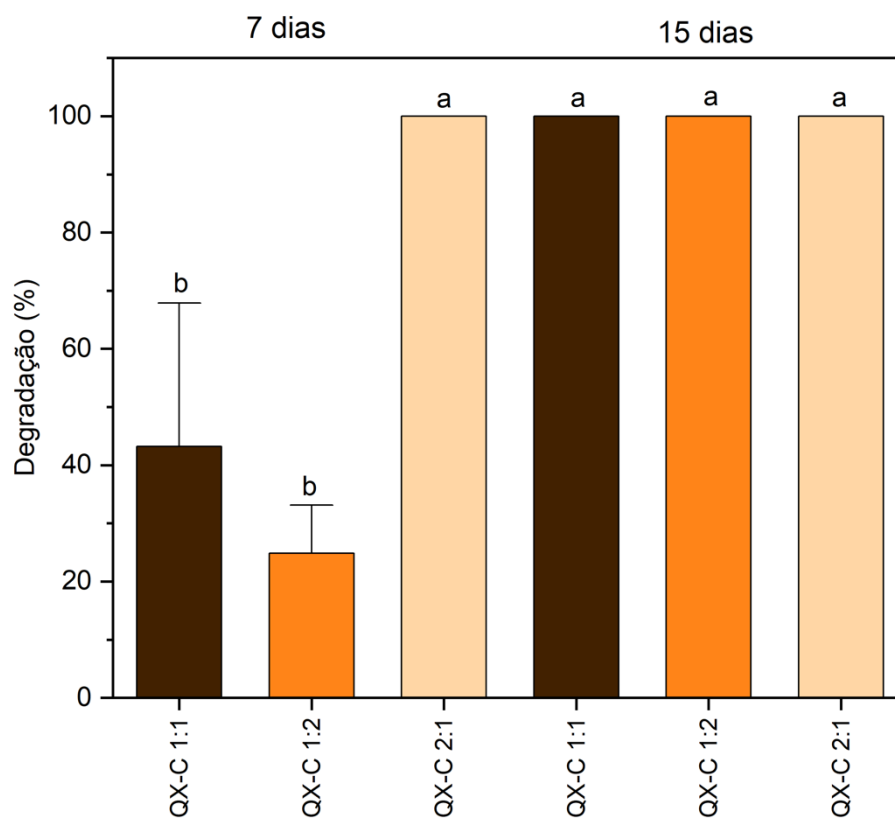
obtidos no ensaio podem ser visualizados na tabela 2 e nos gráficos ilustrativos nas figuras 19 e 20.

Tabela 2 – Médias das taxas de degradação enzimática dos grupos

Grupo	Degradação enzimática (%)	
	7 dias	15 dias
QX 1:1	100 ± 0	100 ± 0
QX 1:2	100 ± 0	100 ± 0
QX 2:1	100 ± 0	100 ± 0
QX-P 1:1	6,9 ± 8,7	100 ± 0
QX-P 1:2	22,6 ± 3,9	48,9 ± 44,2
QX-P 2:1	7,46 ± 2,2	25,5 ± 12,6
QX-C 1:1	43,2 ± 49,2	100 ± 0
QX-C 1:2	24,8 ± 16,6	100 ± 0
QX-C 2:1	100 ± 0	100 ± 0

Fonte: Elaborado pelo autor.

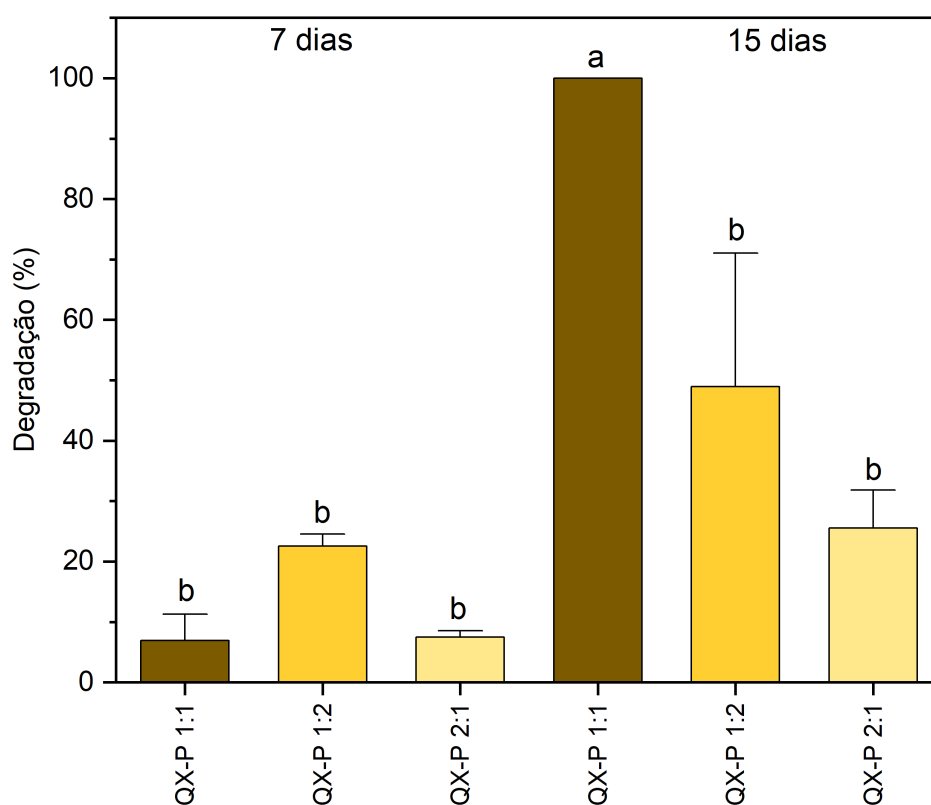
Figura 19 - Gráfico comparativo nos dois tempos analisados do grupo QX-C



Legenda: Letras diferentes corresponde a diferença significativa entre os grupos (p menor ou igual a 0,05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 - Gráfico comparativo nos dois tempos analisados do grupo QX-P



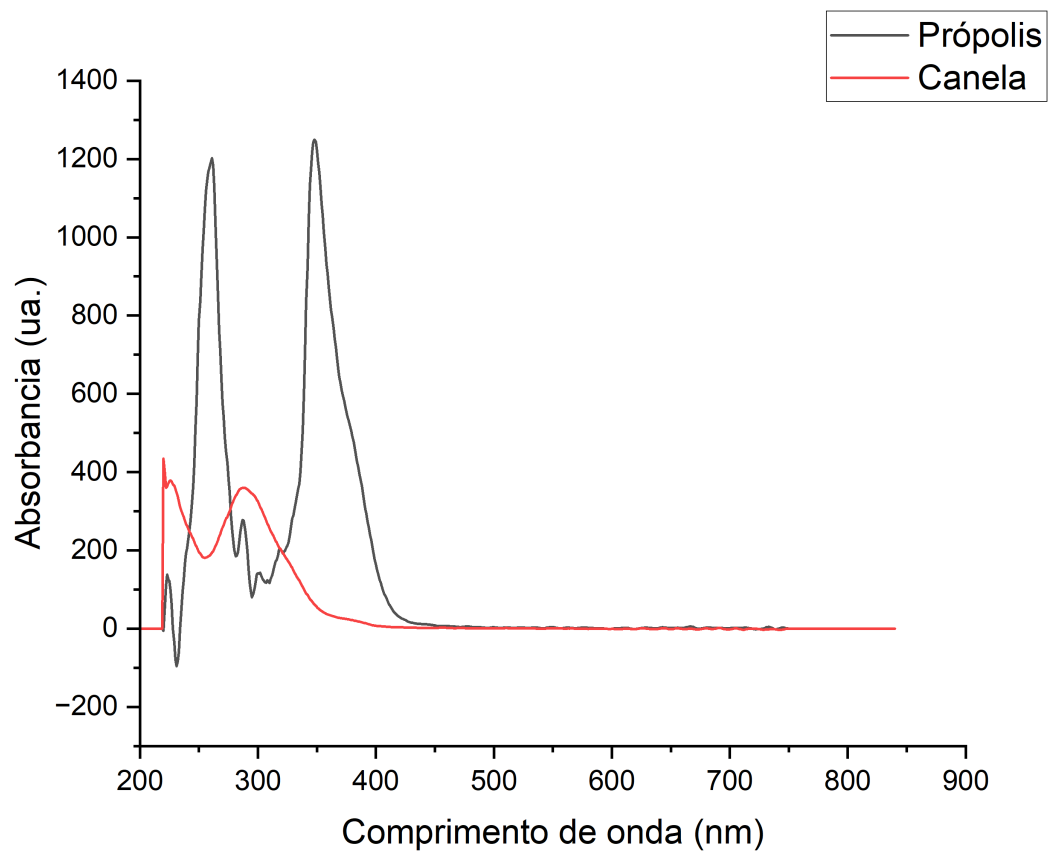
Legenda: Letras diferentes corresponde a diferença significativa entre os grupos (p menor ou igual a 0,05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.5 Análise de liberação

Primeiramente foram obtidos os espectros dos extratos isoladamente (figura 21). Os picos característicos de cada extrato foram localizados nos comprimentos de onda de 286 nm para a canela e 304 nm para a própolis. Após a diluição seriada dos extratos em saliva artificial (figuras 22 e 23), foi possível confeccionar as curvas de calibração conforme apresentadas nas figuras 24 e 25.

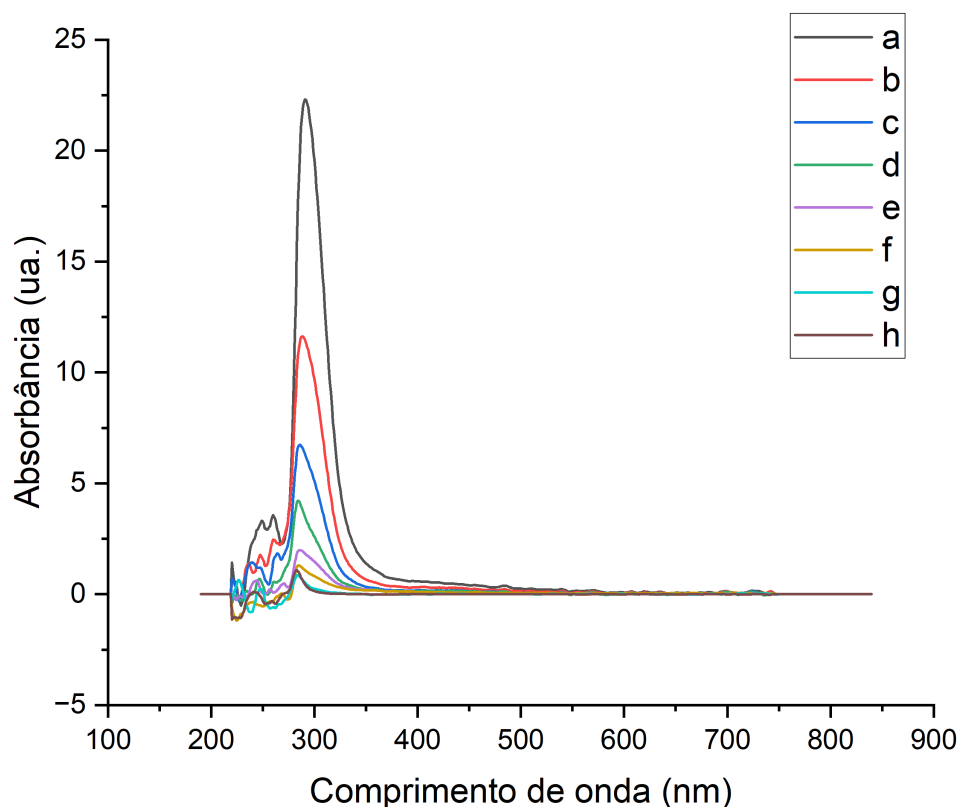
Figura 21 - Picos característicos dos extratos



Legenda: Análise dos extratos de 220 a 750 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

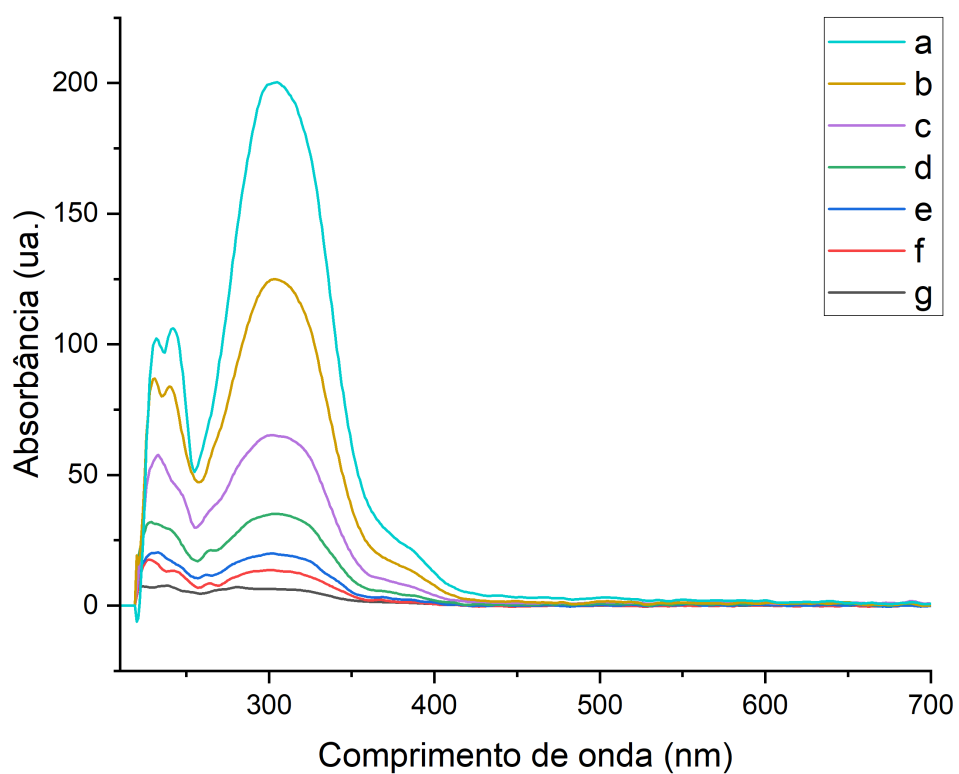
Figura 22 - Picos observados a partir das diluições seriadas do extrato de canela



Legenda: Diluições seriadas (1:2) do extrato da canela a partir da solução estoque de 4,2 mg/ml. As letras correspondem as soluções em diferentes concentrações: a=1,05 mg/ml; b=0,525 mg/ml; c=0,2625 mg/ml; d=0,13 mg/ml; e=0,065 mg/ml; f=0,033 mg/ml; g=0,016 mg/ml; h=0,008 mg/ml. Nota-se que a primeira diluição que seria de 2,1 mg/ml não foi utilizada pois a solução encontrou-se muito turva e não foi possível fazer a leitura adequadamente.

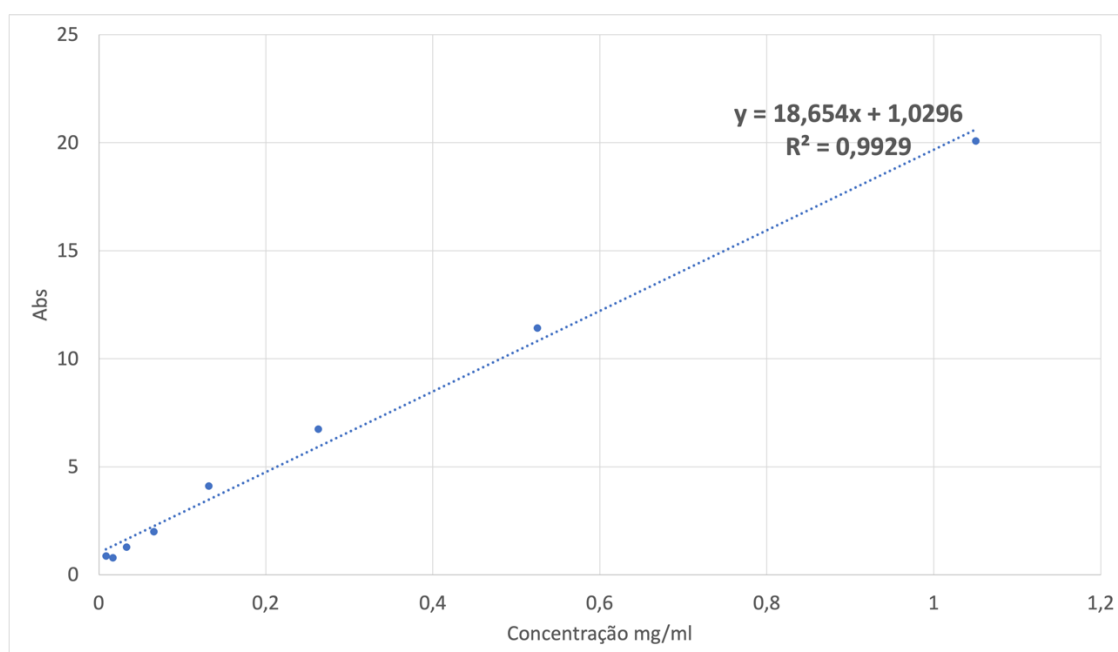
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 - Picos observados a partir das diluições seriadas do extrato de própolis



Legenda: Diluições seriadas (1:2) do extrato de própolis a partir da solução estoque de 111,4 mg/ml. As letras correspondem as soluções em diferentes concentrações: a=13,925 mg/ml; b=6,962 mg/ml; c=3,48 mg/ml; d=1,74 mg/ml; e=0,87 mg/ml; f=0,43 mg/ml; g=0,21 mg/ml. Nota-se que as duas primeiras diluições que seriam 55,7 e 27,85 mg/ml não foram utilizadas pois as soluções estavam turvas e não foi possível fazer a leitura adequadamente. Fonte: Elaborado pelo autor.

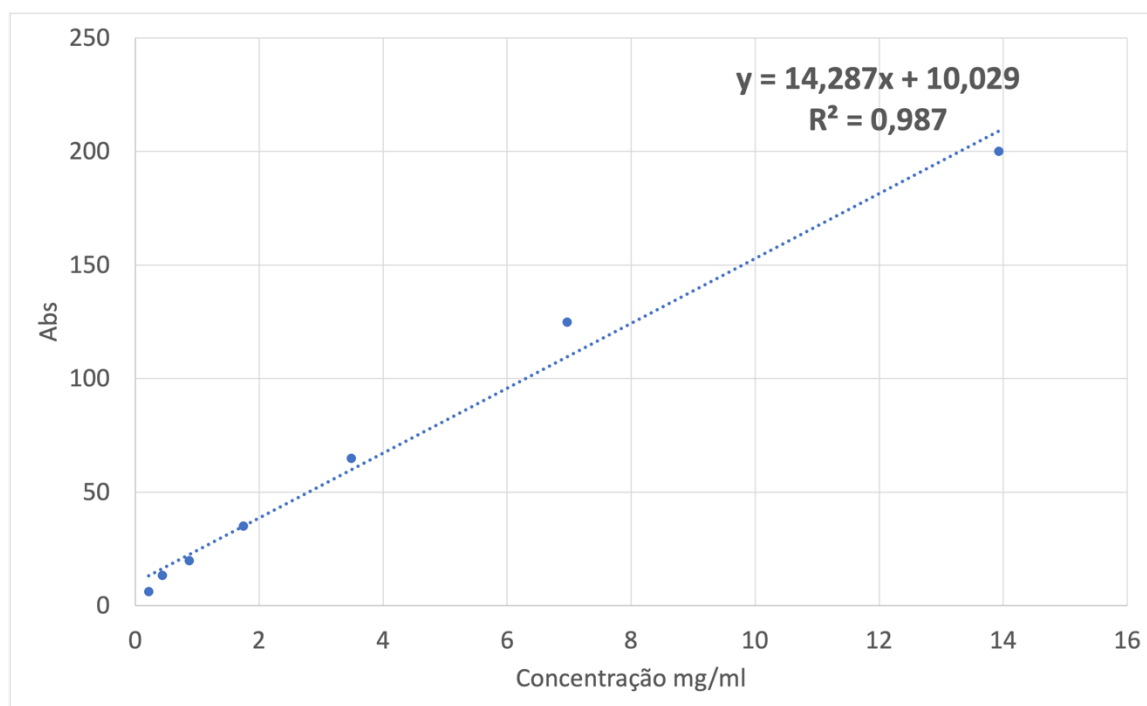
Figura 24 - Curva de calibração da canela



Legenda: Pode ser observado o coeficiente de correlação de 0,9929 e a equação da reta que foi utilizada para quantificação da concentração liberada pelo tempo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 - Curva de calibração do própolis

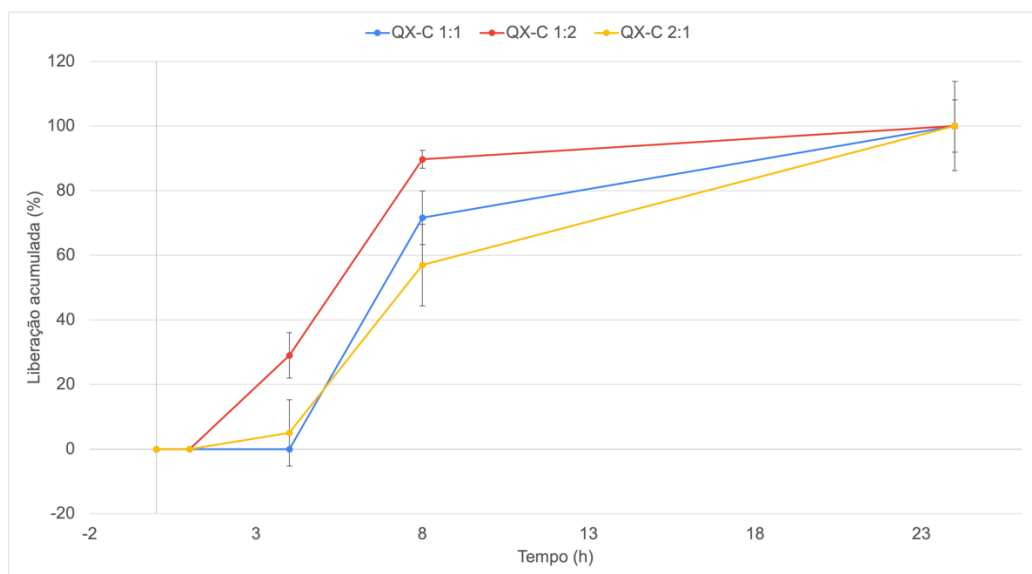


Legenda: Pode ser observado o coeficiente de correlação de 0,987 e a equação da reta que foi utilizada para quantificação da concentração liberada pelo tempo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos dados obtidos acima e os valores coletados de cada amostra nos intervalos de tempos determinados, foi possível confeccionar os gráficos da cinética de liberação de cada extrato conforme ilustrados nas figuras 26 e 27. A liberação acumulada (%) está relacionada ao total de extrato incorporado em cada amostra de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, cujos valores são: amostras do QX-P = 11,78 mg/mL e QX-C = 0,44 mg/mL. Esses valores foram obtidos através do cálculo pela fórmula ilustrada na seção de materiais e métodos.

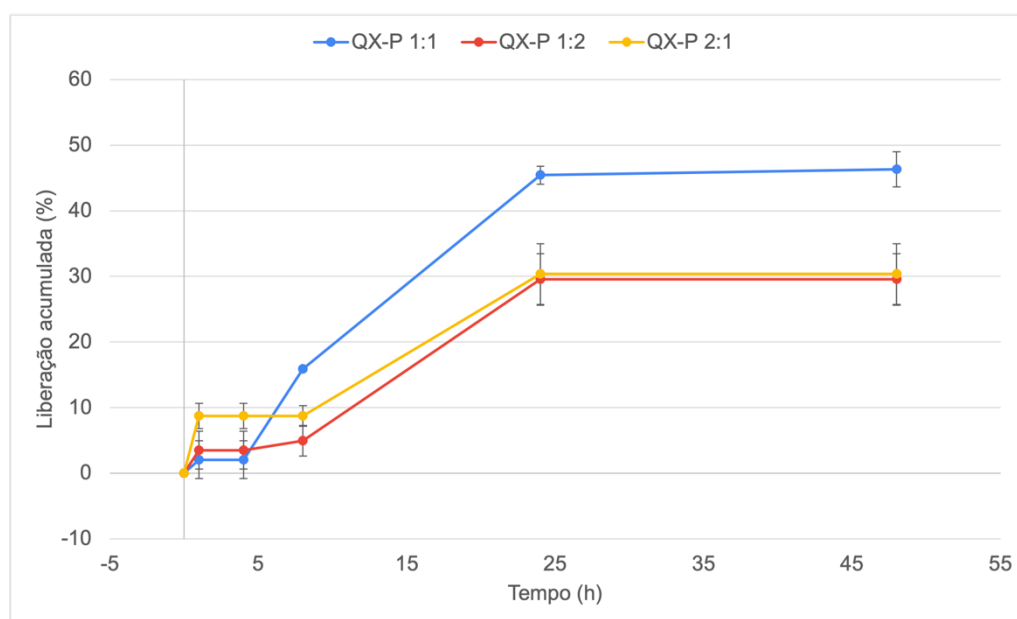
Figura 26 - Cinética de liberação da canela



Legenda: Liberação acumulada X tempo (%). Valores obtidos em relação a quantidade total de extrato na amostra.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 - Cinética de liberação do própolis



Legenda: Liberação acumulada X tempo (%). Valores obtidos em relação a quantidade total de extrato na amostra.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Ensaios microbiológicos

5.3.1 Verificação de halo de inibição

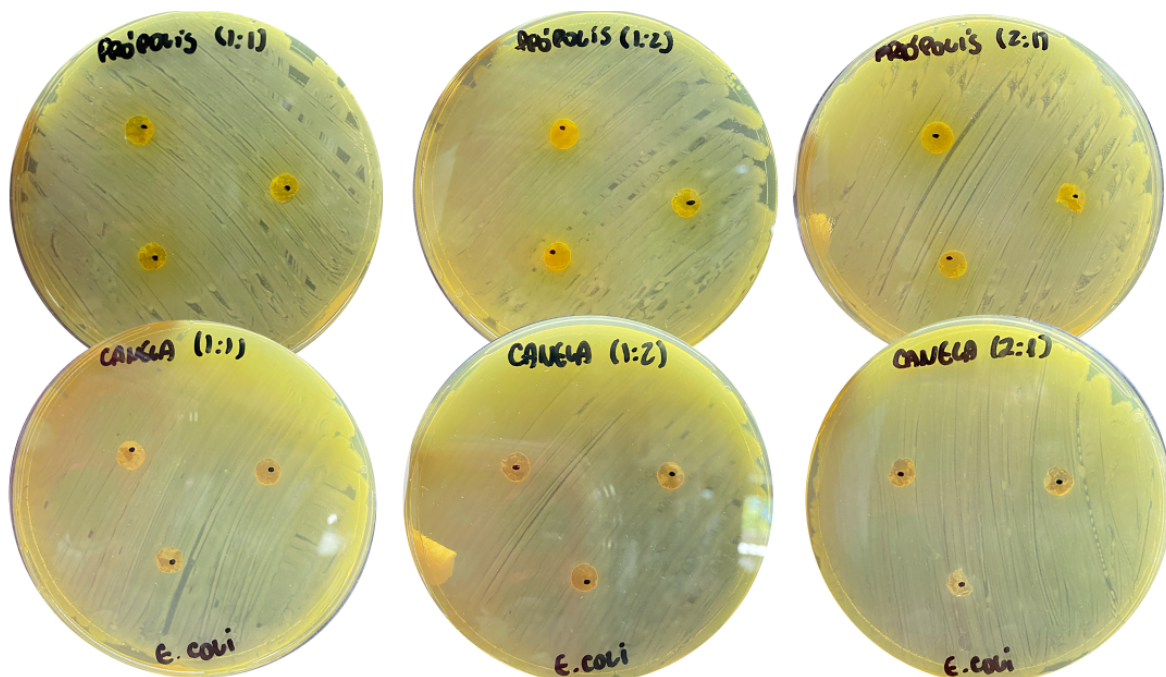
Os resultados obtidos revelaram que os grupos QX e QX-C não apresentaram nenhum halo de inibição contra as cepas testadas. Os grupos CLX apresentaram as seguintes médias (cm) para *S. aureus*: $1,05 \pm 0,2$ (1:1); $1,2 \pm 0$ (1:2) e $1,25 \pm 0,07$ (2:1). Os grupos CLX contra *E. coli* apresentaram uma média de $0,9 \pm 0,14$ para todas as proporções testadas. Já os grupos QX-P apresentaram atividade antimicrobiana somente sobre as cepas de *S. aureus* com as seguintes medições: $1,0 \pm 0,11$ (1:1); $1,0 \pm 0,05$ (1:2) e $0,8 \pm 0,15$ (2:1). Os resultados estão ilustrados nas figuras 28 a 30.

Figura 28 - Ensaio sobre *S. aureus*



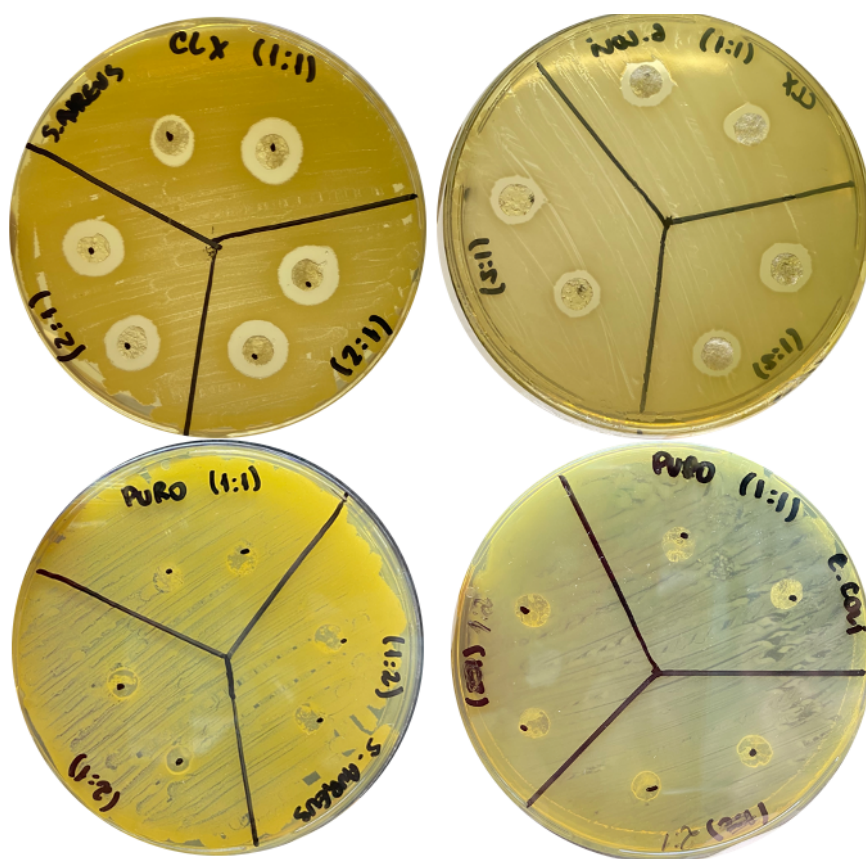
Legenda: Grupos QX-P (acima) e QX-C (abaixo) após incubação. É possível observar os halos de inibição presentes no grupo QX-P.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 - Ensaio sobre *E. coli*



Legenda: Grupos QX-P (acima) e QX-C (abaixo) sobre *E. coli* após incubação. Não foram observados halos de inibição.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 - Placas de Petri com os grupos QX e CLX de ambas as cepas

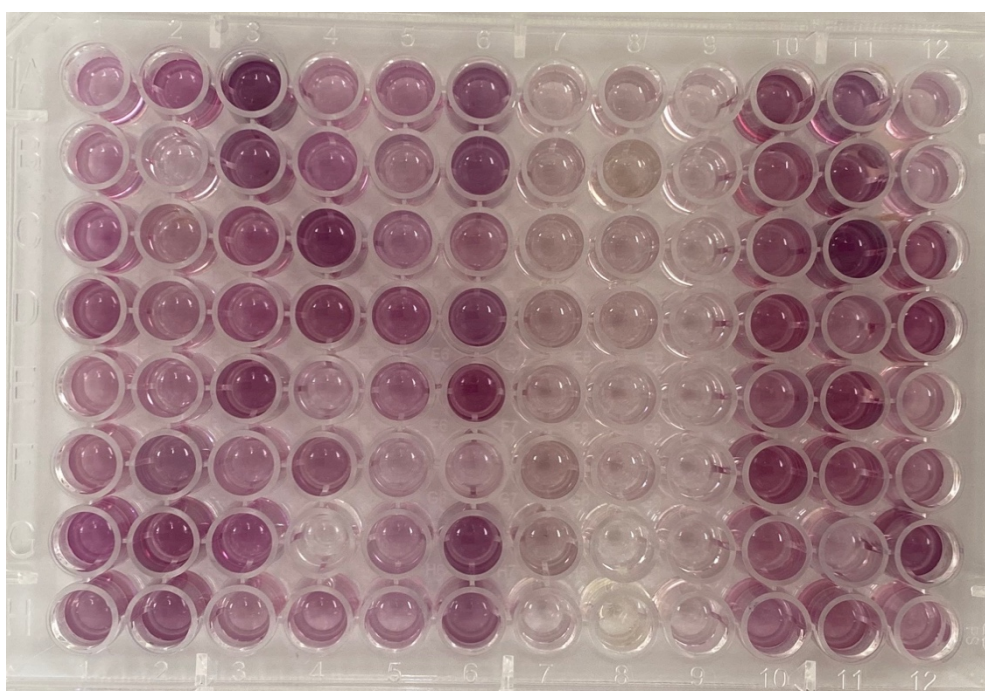


Legenda: As placas da esquerda são de *S. aureus* e da direita do *E. coli*. Nos grupos CLX (acima) é possível observar os halos de inibição, já nos QX (abaixo) não foram observados halos de inibição.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Verificação da ação antibiofilme

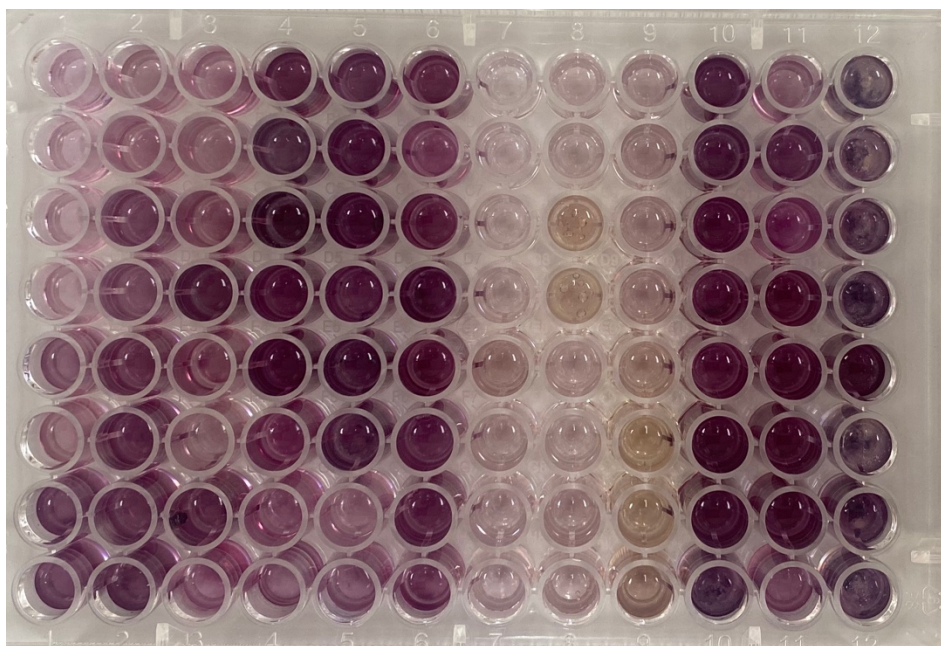
Os resultados obtidos das placas imediatamente após leitura em espectrofotômetro estão ilustrados nas figuras 31 e 32.

Figura 31 - Ensaio sobre *S. aureus*



Legenda: As colunas de 1 a 9 correspondem respectivamente aos grupos: QX-P (1:1); QX-P (1:2); QX-P (2:1); QX-C (1:1); QX-C (1:2); QX-C (2:1); CLX (1:1); CLX (1:2); CLX (2:1). Colunas de 10 a 12 foram usadas para controle negativo. Quanto mais corado o poço, maior a atividade metabólica.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 - Ensaio sobre *E. coli*



Legenda: As colunas de 1 a 9 correspondem respectivamente aos grupos: QX-P (1:1); QX-P (1:2); QX-P (2:1); QX-C (1:1); QX-C (1:2); QX-C (2:1); CLX (1:1); CLX (1:2); CLX (2:1). Colunas de 10 a 12 foram usadas para controle negativo. Quanto mais corado o poço, maior a atividade metabólica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nos valores obtidos de absorvância, foi feita análise estatística e obtidos a média e desvio-padrão. A estatística descritiva dos dados conferiu homogeneidade dos resultados e uma distribuição tendendo à normalidade, conforme evidenciado por valores de $p > 0,05$ no teste de Shapiro-Wilk. Portanto, aplicou-se testes paramétricos de análise de variância (ANOVA) e teste Post-Hoc de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados estatísticos estão nas tabelas 3 e 4, e a porcentagem de redução metabólica estão evidências em gráficos nas figuras 33 e 34.

Tabela 3 - Média e desvio-padrão dos valores de D.O. sobre *S. aureus*

Grupos	Média e DP
C-	0,764 ± 0,175
CLX (1:1)	0,129 ± 0,039
CLX (1:2)	0,148 ± 0,044

CLX (2:1)	0,104 ± 0,009
QX-C (1:1)	0,310 ± 0,101
QX-C (1:2)	0,229 ± 0,044
QX-C (2:1)	0,577 ± 0,289
QX-P (1:1)	0,291 ± 0,090
QX-P (1:2)	0,362 ± 0,078
QX-P (2:1)	0,412 ± 0,148

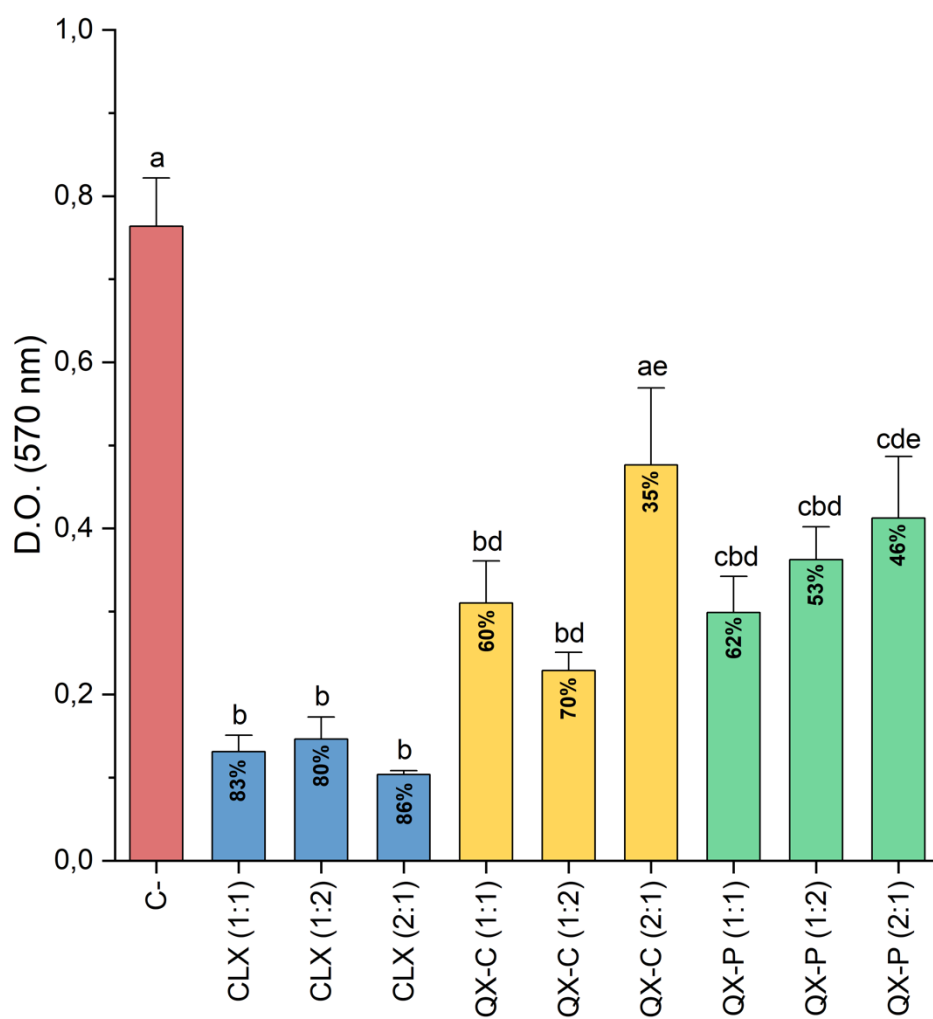
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Média e desvio-padrão dos valores de D.O. sobre *E. coli*

Grupos	Média e DP
C-	1,190 ± 0,142
CLX (1:1)	0,121 ± 0,038
CLX (1:2)	0,188 ± 0,059
CLX (2:1)	0,250 ± 0,041
QX-C (1:1)	0,952 ± 0,252
QX-C (1:2)	1,020 ± 0,321
QX-C (2:1)	0,976 ± 0,143
QX-P (1:1)	0,244 ± 0,089
QX-P (1:2)	0,464 ± 0,192
QX-P (2:1)	0,444 ± 0,091

Fonte: Elaborado pelo autor.

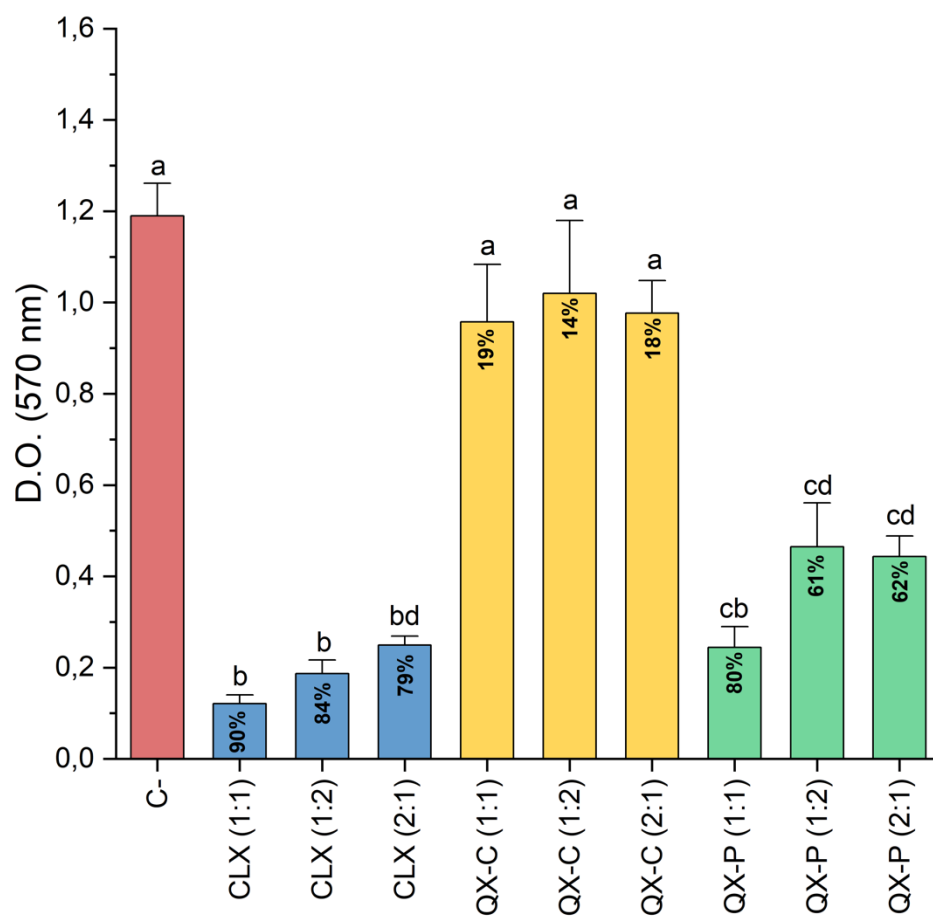
Figura 33 - Redução (%) metabólica sobre *S. aureus*



Legenda: Letras diferentes corresponde a diferença significativa entre os grupos (p menor ou igual a 0,05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 34 - Redução (%) metabólica sobre *E. coli*



Legenda: Letras diferentes corresponde a diferença significativa entre os grupos (p menor ou igual a 0,05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 Confecção

A partir das metodologias testadas nos ensaios preliminares, foi possível obter membranas estáveis na manipulação depois de secas e possíveis de reprodutibilidade, quando feitas a partir da metodologia de Bellini et al. (2012). Antes da secagem, foi possível observar que a proporção 1:1 resultou em uma suspensão mais estável, já a 1:2 ficou mais viscosa e a 2:1 mais fluída. Isso já era esperado, visto que a xantana é um espessante, porém outro fato que pode ser relacionado a isso é devido a quantidade de íons disponíveis para a interação dos dois materiais, a proporção igual levou a uma mistura mais estável pois a interação foi equilibrada. O estudo de Dallan et al. (2007) relata as divergências encontradas na literatura científica frente a produção de complexos feitos a partir da quitosana com outros componentes. Não existe um consenso, e as variáveis são muitas, podendo comprometer ou modificar o estado final do material, como a secagem, neutralização, lavagem e acondicionamento. A massa molar, concentração, volume e equipamentos para a dissolução dos componentes também são pontos importantes e que muitas vezes não são citados pelos artigos ou não são especificados.

A introdução de compostos naturais bioativos em estruturas biodegradáveis pode ter um notável impacto na prevenção e tratamento de infecções e processos inflamatórios. Isso ocorre porque, ao liberar o princípio ativo de maneira controlada, é possível aumentar a eficácia do tratamento (Dash et al., 2011). A incorporação desses compostos pode ser realizada durante a produção do dispositivo, pela adição à suspensão polimérica ou pela impregnação do dispositivo em soluções contendo o agente bioativo. Uma outra possibilidade é a incorporação usando fluidos supercríticos, mas nesse caso, o processo é bem mais complexo (Braga et al., 2008). Nesta pesquisa foi testado a incorporação dos extratos primeiramente pela impregnação, contudo foi observado que as membranas não intumesciam com os extratos alcoólicos. O mesmo fato ocorreu no estudo de Pires et al. (2020), onde os autores verificaram uma eficácia de incorporação muito baixa do extrato alcóolico de

Arrabidaea chica em membranas de quitosana e alginato. Portanto, optou-se pela adição durante a produção das membranas.

Os extratos vegetais oferecem diversas vantagens como ação antibacteriana, incluindo atividade de amplo espectro, potencial para efeitos sinérgicos, e custo-benefício. Eles são considerados mais seguros e menos tóxicos que os antibióticos sintéticos e a complexa mistura de compostos pode dificultar o desenvolvimento de resistência das bactérias (Meccatti et al., 2023). Os extratos testados nesta pesquisa foram obtidos por métodos de extração controlados, a fim de se assegurar a qualidade e pureza componentes.

O própolis é uma mistura resinosa natural produzida pelas abelhas, e sua composição química pode variar dependendo da origem geográfica e das plantas disponíveis. Geralmente, contém uma variedade de compostos, incluindo: ácidos fenólicos, flavonóides, terpenóides, entre outros. Estes são responsáveis pelas propriedades biológica, incluindo atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antitumorais (Alves et al., 2024). O própolis usado nesse estudo foi o própolis verde, produzido pelas abelhas *Apis mellifera* através da *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como ‘alecrim-do-campo’ (Meccatti et al., 2023). Ele é rico em ácido clorogênico, ácido p-cumárico e artepilina C., compostos com grande potencial antibacteriano inclusive para micro-organismos resistentes (Veiga et al., 2017).

A canela provém da casca interna de uma pequena árvore nativa do Sri Lanka, a *Cinnamomum verum*. Possui uma gama de substâncias, mas a mais predominante é o cinamaldeído (Meccatti et al., 2023). Estudos comprovam que esse composto tem várias significâncias biológicas e farmacológicas, incluindo atividade antimicrobiana contra vários micro-organismos patogênicos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como fungos e leveduras (Kenawy et al., 2019). Os testes feitos para seleção dos extratos corroboraram com esses achados da literatura, pois demonstraram a eficácia dos dois extratos sob cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

6.2 Caracterização

6.2.1 Espessura

É fundamental enfatizar que quantidades equivalentes das suspensões de polissacarídeos foram vertidas nas placas de Petri (total de 60 ml por placa), com o propósito de tornar as espessuras das membranas comparáveis quando secas. Um estudo conduzido em 2021, investigou a relação entre a espessura de filmes de quitosana contendo diferentes quantidades de extrato de cúrcuma, e os resultados indicaram que todos os grupos apresentaram espessuras uniformes, sugerindo que o controle da espessura em função da massa da solução e à área da placa utilizada para secagem foi eficaz (Rachtanapun et al., 2021). Nesta pesquisa somente os grupos QX foram medidos a espessura, porém era esperado obter resultados semelhantes conforme o estudo acima citado, já que todos os grupos mantiveram as relações de massa X área da placa.

De acordo com os valores obtidos nas medições no estado seco, o grupo contendo mais xantana (QX - 1:2) teve a maior espessura encontrada, seguida do grupo 1:1 e 2:1. Essa mesma tendência pode ser vista no trabalho de Veiga e Moraes (2011), onde os autores estudaram as propriedades de membranas de Q e X, e observaram que aumentando a concentração dos polissacarídeos, proporcionalmente aumenta a espessura, mesmo apresentando o mesmo volume inicial. Os valores de espessura encontrados variaram entre 0,1 e 0,2 mm. Outra variável estudada foi o fluxo da vazão da Q sobre a X, e os autores concluíram que quanto maior o fluxo, menor a espessura da membrana, além disso ocorreu melhora na capacidade de resistência à tensão e na habilidade de drenagem.

Outro estudo voltado para indústria alimentícia analisou filmes de Q e X em diferentes proporções (Lima et al., 2017). A espessura foi avaliada juntamente com outras propriedades, e os resultados demonstraram que a adição de X nos filmes melhorou algumas das características mecânicas dos PECs, porém não houve diferença estatística entre os grupos com relação a espessura. Já Bellini et al. (2012), examinaram membranas de Q e X, tanto porosas quanto compactas, com potencial aplicação no tratamento de lesões na pele. Os pesquisadores investigaram grupos com diferentes proporções de massa e avaliaram a influência da presença de surfactantes na suspensão. Os resultados indicaram que as membranas mais espessas eram aquelas que continham surfactante, pois a adição desses componentes aumentava o grau de porosidade, conferindo benefícios significativos

às propriedades mecânicas e à adesão celular das membranas.

As proporções avaliadas neste trabalho foram similares com as dos dois últimos estudos citados. Se compararmos os grupos com relações mássicas iguais (1:1), os autores obtiveram membranas em torno de 0.1 mm, enquanto neste presente estudo foi de 0.6 mm. Para a aplicação proposta nesta tese, era esperado que os dispositivos adentrassem no espaço entre o implante e o pilar, por isso o teste de espessura foi realizado. Levando em consideração que a rosca interna dos implantes tem pelo menos 2.0 mm de profundidade as membranas fabricadas são possíveis de serem introduzidas neste espaço. Após o torque entre os componentes, muito provavelmente o dispositivo irá se compactar, porém espera-se que o mesmo acabe preenchendo os *gaps* existentes.

As variações descritas na literatura quanto aos métodos de produção e as diferentes características dos materiais utilizados para confeccionar os PECs justificam as variabilidades estruturais que podem ocorrer no momento de se fabricar um dispositivo (Luo, Wang, 2014). Neste estudo buscou-se utilizar de uma metodologia simples e que entregasse um material final mais uniforme, manipulável e replicável. As espessuras finais obtidas foram maiores que as encontradas na literatura, o que pode ser justificada que a metodologia usada não incluiu a etapa de desgaseificação, ou seja, a retirada de bolhas da suspensão obtida durante o processo de fabricação que alguns autores preconizam.

A literatura descreve algumas vantagens das membranas porosas: facilidade de migração de células e nutrientes em aplicações de engenharia de tecidos; aumento da capacidade de absorver líquidos, como soluções de cultura celular ou fluídos biológicos, tornando-as úteis em aplicações de curativos para feridas; maior área superficial disponível, o que pode ser benéfico para interações com células ou moléculas em aplicações biomédicas (Bellini et al., 2012).

6.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias geradas através da análise de MEV permitiram identificar as características estruturais das amostras, incluindo a topografia da superfície,

porosidade e a distribuição dos polímeros. É possível notar que as amostras contendo mais X apresentaram maiores irregularidades superficiais, com a presença de bolhas e rugosidade, sugerindo a formação de uma rede polimérica mais densa. Esses fatores contribuíram para uma maior espessura das membranas como foi discutido anteriormente, além de uma maior área superficial disponível. A presença de fibras dos polissacarídeos e estrutura lamelar também são vistos nas imagens, contudo o grupo com maior quantidade de Q apresentou uma superfície mais lisa e quase sem bolhas. Fato esperado, pois a suspensão final antes da secagem se apresentou bem menos viscosa que dos outros grupos. Esses achados estruturais corroboram com os citados na literatura (Batista et al., 2020; Bellini et al., 2012; Lima et al., 2017; Veiga, Moraes, 2011).

6.2.3 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

Os picos encontrados foram bem similares com os da literatura científica. Todas as amostras apresentaram uma banda larga na região de 3600 a 3000 cm^{-1} indicando estiramento do grupo hidroxila (O-H) e grupos aminas (N-H) (Malik et al., 2020). Na figura 13, encontram-se os espectros de absorção obtidos a partir da Q e X em pó. Em Q são vistos os grupos funcionais das amidas I (carbonila C=O), II (N-H) e III (C-N) nos picos de 1650 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} e 1370 cm^{-1} respectivamente (Kim et al., 2017; Malik et al., 2020). Além de uma banda forte em 1023 cm^{-1} que também é vista por conta do estiramento do grupo ésteres (C-O) (Malik et al., 2020). Em X, picos característicos em 1719 e 1602 cm^{-1} correspondendo à ligação (C=O), característica dos grupos acetato e piruvato (Kim et al., 2017; Popa et al., 2010); banda em 1243 cm^{-1} , referente as vibrações de estiramento da ligação (C-O-C) e/ou deformações de (C-O-H); além de sinal intenso em 1023 cm^{-1} por conta do estiramento de (C-O) (Malik et al., 2020).

Na figura 14 encontram-se os espectros dos PECs nas diferentes proporções sem os extratos. Nota-se os picos de absorção das duas substâncias presentes em todos os grupos, além de não ter o aparecimento de nenhum pico novo, o que comprova que os complexos são formados somente pelas interações iônicas dos

grupos amida (NH_3^+) e carbonila (COO^-) (Buenger et al., 2012). É possível observar que há um estiramento da região de 3600 a 3000 cm^{-1} , além de deslocamentos com aumento de intensidade dos grupos funcionais das amidas, indicando interações de ligação de hidrogênio entre a Q e X (Ngwabebhoh et al., 2021). Esse padrão foi visto em todos os grupos testados, com poucas alterações entre eles, sobreposições e deslocamentos das bandas podem ocorrer, visto que os picos surgem em faixas muito próximas.

Os gráficos referentes aos extratos isolados estão apresentados na figura 15. Caracterizar extratos naturais é algo desafiador que requer extensiva investigação, dada a complexidade e a ampla variedade de compostos ativos que podem ser encontrados. Além disso, a composição específica de um mesmo extrato pode variar significativamente conforme a região geográfica de sua proveniência (Alves et al., 2024). Contudo, algumas similaridades foram encontradas com a literatura científica. Picos característicos de grupos hidroxila de álcoois e fenóis, como o pico bem pronunciado de estiramento de (O-H) nas regiões de 3100 - 3400 cm^{-1} e bandas de (C-H) em 2975 e 2881 cm^{-1} (Pavia et al., 2010) são observados. Assim como as vibrações de estiramento axial de ligações (C-O) nas bandas entre 1200 - 1000 cm^{-1} e em 880 cm^{-1} provavelmente relacionado a vibrações do anel aromático ou ao etanol (Oliveira et al., 2016).

Ainda na figura 15, é possível observar na imagem aumentada os grupos funcionais de cada extrato. No caso do própolis as bandas 1688 cm^{-1} (estiramento de C=O), 1634 cm^{-1} (C=O; C=C; N-H) e 1515 cm^{-1} (anel aromático C=C) correspondem aos lipídios, flavonóides e aminoácidos, sendo que a banda em torno de 1630 cm^{-1} está mais correlacionada as propriedades antioxidantes (Andrade et al., 2018; Moç et al., 2011; Oliveira et al., 2016). No espectro da canela foi encontrada uma banda em 1657 cm^{-1} que representa o alongamento vibracional de (C=O), indicando altos níveis de aldeídos e cinamaldeídos. Já o pico em 1450 cm^{-1} representa a absorção de flexão vibracional de (C-OH) das porções de álcool (Bai et al., 2021).

Todos esses resultados obtidos na análise de FTIR comprovam que houve o processo de *crosslink* dos PECs e uma incorporação dos extratos na matriz polimérica. Pode-se observar nas imagens 16 e 17, que nos grupos QX-P e QX-C o padrão do espectro se manteve o mesmo nas três proporções feitas, com poucas alterações de intensidade e deslocamentos das bandas, conservando os picos

característicos de formação dos PECs e dos extratos utilizados. A comparação de todos os grupos pode ser vista na figura 18, onde os 9 grupos estão dispostos em uma única imagem.

6.2.4 Degradação enzimática

O teste de degradação desempenha um papel crucial na análise de caracterização, pois é capaz de prever a durabilidade e a vida útil dos materiais. No contexto da engenharia de tecidos essa informação é fundamental, pois fornece dados acerca da interação dos biomateriais com o meio biológico, assegurando ou não sua funcionalidade proposta (Tenório et al., 2021). A quitosana e a xantana já são conhecidos como biodegradáveis, contudo, dependendo das variáveis utilizadas na formulação dos dispositivos feitos com esses materiais, pode-se prolongar ou encurtar a taxa de degradação.

Em 2007, autores relataram que a taxa de degradação da Q é inversamente proporcional ao grau de acetilação e cristalinidade do polímero (Nair, Laurencin, 2007). Outro estudo em 2019 expõe que quanto maior a densidade de reticulação, mais lenta a taxa de degradação (Cao et al., 2019), e isso pode ser explicado devido à diminuição da mobilidade das cadeias, reduzindo a sensibilidade ao pH, e melhorando a estabilidade da rede (Malik et al., 2020). O tipo de agente de reticulação e sua hidrofobicidade também são fatores importantes que determinam tanto o comportamento de inchaço sensível ao pH quanto a estabilidade das membranas (Pieróg et al., 2009).

Outro estudo concluiu que a densidade de *crosslink* da rede Q e X depende muito da concentração da X, e quanto mais o aumento da X, mais afeta a hidrofilição do complexo, aumentando a capacidade de intumescimento da rede (Argin-Soysal et al., 2009). Esse fato pode ser observado nos resultados do grupo QX-P em 7 dias, onde o grupo com mais X teve a maior degradação. Porém esse padrão não foi visto nos outros grupos e no outro tempo analisado.

Neste teste foi utilizado uma solução de lisozima-PBS a 5 mg/mL (pH 7.4). O grupo QX teve uma degradação de 100% das amostras em 7 dias, diferentemente

dos grupos que tiveram as membranas incorporadas com os extratos. Esse fato pode ser explicado por conta da mudança de hidrofiliicidade dos PECs quando tiveram os extratos incorporados. Em 2019, os autores observaram uma redução na perda de massa de membranas com cinamaldeído quando comparadas com as membranas de gelatina e quitosana puras. Os autores atribuíram isso ao composto aldeído presente na canela que provavelmente interagiu com grupos hidrofílicos presentes na matriz polimérica, reduzindo assim essa propriedade física (Kenawy et al., 2019).

A mudança na hidrofiliicidade afeta o mecanismo de difusão da água no material ocasionando assim a chamada “degradação hidrolítica” (Woodruff, Hutmacher, 2010). Quando as moléculas de água penetram na matriz, a hidrólise das cadeias poliméricas permite que os monômeros ou oligômeros difundam para fora do material, resultando em uma degradação gradual (Mohamadinooripoor et al., 2022). Os materiais biodegradáveis, não são necessariamente bioabsorvíveis, ou seja, eles sofrem degradação de moléculas por elementos biológicos, mas não são necessariamente eliminados do corpo pelos fluidos corpóreos, por isso eles devem possuir uma propriedade importante de serem atóxicos (Nair, Laurencin, 2007; Woodruff, Hutmacher, 2010).

Em 2022, um estudo avaliou membranas de PCL (policaprolactona) puras e dopadas com extrato alcoólico de própolis para aplicações médicas. No ensaio de degradação, eles utilizaram a mesma solução de lisozima a 5 mg/mL (pH 7.4) e PBS puro. Os resultados mostraram que as membranas com própolis absorveram mais água que as de PCL pura, gerando assim uma perda de massa gradual maior. Os valores de degradação das membranas com própolis que os autores encontraram nos primeiros 10 dias foram em torno de 15 a 20%, aumentando para aproximadamente 25% a perda de massa em 30 dias (Mohamadinooripoor et al., 2022).

Os tempos avaliados neste estudo diferiram estatisticamente entre os grupos QX-P e QX-C, como visto nas figuras 19 e 20. Os grupos com canela incorporada, 1:1 e 1:2, foram os únicos que se mantiveram em pelo menos 7 dias, apresentando uma taxa de degradação de 43% e 24%, sem diferenças significativas entre eles. Já os grupos contendo própolis tiveram menores taxas em 7 dias de 6,9% (QX-P 1:1), 7,5% (QX-P 2:1) e 22% (QX-P 1:2), além disso, os dois grupos que se mantiveram nos 15 dias tiveram degradação menor que 50%, todos sem apresentar diferença significativa. Essa sobrevida maior pode ser relacionada ao fato que o própolis está em uma

concentração maior que a canela, e portanto pode ter apresentado um caráter mais hidrofóbico, mesmo que a literatura relate que os dois extratos possuem componentes hidrofílicos e hidrofóbicos (Alves et al., 2024; de Castro et al., 2024).

Essa elevada taxa de degradação no 15º dia pode ser explicada por alguns fatores. A lisozima é uma proteína que está presente nos fluídos corporais, inclusive na saliva, que auxilia o sistema imunológico dissolvendo as paredes mucopolissacarídicas das bactérias (Dallan et al., 2006). Ela é muito utilizada em testes *in vitro* pois degrada a quitosana através da hidrólise (Nair, Laurencin, 2007). A concentração de 5 mg/mL usada no teste de degradação foi baseada na metodologia de Dallan et al. (2006), e outros autores também citam essa concentração (Mohamadinooripoor et al., 2022). Contudo, estudos mostram que a lisozima presente na saliva humana está em concentrações bem menores, em torno de 0.5 mg/mL (Balekjian et al., 1969).

Nos ensaios realizados por Dallan e Mohamadinooripoor, os autores realizaram o teste de degradação de suas amostras usando duas soluções: PBS a 7.4 pH e solução de lisozima-PBS a 5 mg/mL, e os resultados mostraram que as taxas de degradação foram praticamente iguais nas duas circunstâncias, mesmo utilizando uma concentração alta de lisozima, sugerindo que o PBS seria o real causador da degradação. Como neste estudo não foi feita a degradação somente com PBS, não há como afirmar essa situação.

Outro ponto importante neste teste é que ele foi realizado com uma quantidade considerável de solução (3 ml), porém na aplicabilidade proposta isso não aconteceria, já que o dispositivo estaria disposto dentro dos implantes dentários. O estudo de Cao et al. (2019) fez um teste bem similar onde hidrogéis termossensíveis foram desenvolvidos com a finalidade de selamento e lubrificação nos *gaps* dos implantes dentários. Os autores realizaram dois tipos de testes de degradação, um seguindo a mesma metodologia citada neste, e um outro com a simulação nos implantes e foi observado que a degradação do hidrogel no *micro-gap* entre o implante e o pilar foi mais lenta do que nos testes de degradação nas placas, devido ao ambiente fechado e com pouca troca de líquidos com o ambiente externo.

Com base nos resultados deste estudo, onde a sobrevida dos dispositivos testados não foi tão prolongada, sua aplicabilidade seria mais eficaz como um suporte temporário para prevenir a proliferação bacteriana nos tecidos adjacentes aos

implantes. Esse uso poderia ser especialmente benéfico no pós-operatório de instalação do parafuso, visto que é um período crítico de cicatrização, muitas vezes associado a desafios na higienização adequada. Também poderia ser aplicado entre as consultas de controle, após profilaxias, em coroas sob implante parafusadas. Por fim, mesmo utilizando uma alta concentração de lisozima, e mantendo as membranas em um ambiente muito mais exposto do que seria na situação de uma aplicação dentro dos implantes dentários, os resultados obtidos neste estudo demonstraram taxas de sobrevida interessantes principalmente no grupo do própolis, sugerindo que estes dispositivos são bem resistentes a hidrólise, e possivelmente teriam um bom desempenho de liberação controlada de fármaco.

6.2.5 Análise de liberação

Os espectros dos extratos mostrados na figura 21 apresentaram características pertinentes a sua composição e corroboram com a literatura científica. A canela apresentou um pico evidente de máxima absorção em 286 nm, correspondente a seu composto majoritário, o cinamaldeído (Chirila et al., 2020; Rieger, Schiffman, 2014). Já o própolis destacou dois picos bem pronunciados próximos a 260 nm e 300 nm, que estão relacionados aos flavonóides (Moğ et al., 2011; Paganotti et al., 2014). O pico utilizado para elaboração da curva de calibração do própolis foi o de 300 nm, pois ficou mais evidente durante as diluições seriadas conforme a figura 23.

No gráfico ilustrado na figura 26 é possível observar a cinética de liberação dos grupos QX-C. Na primeira hora não se constatou a presença da canela no meio, porém após as 4h, teve uma rápida e alta liberação do composto, chegando a liberar 100% de todo o conteúdo nas primeiras 24h. Isso pode estar relacionado a baixa concentração do extrato de canela que foi adicionado as membranas, permitindo uma rápida degradação do polímero como descrito anteriormente. Em um estudo feito em 2021, nanofibras de quitosana e gelatina foram impregnadas com extrato de canela, e no ensaio foi observado uma tendência lenta de liberação, pois até o 6º dia se constatou uma liberação de 70%. Contudo, a concentração da canela utilizada foi de 2 a 6% (Ahmadi et al., 2021).

Já na figura 27, é visto que a cinética dos grupos QX-P se comportou diferente. De 0 a 8h, a liberação do composto esteve abaixo de 10% praticamente. Após, houve um aumento na liberação entre 30 a 45% até 24h, mantendo a tendência até a última verificação em 48h. Esse mesmo cenário foi relatado por Mohamadinooripoor et al. (2022), onde dispositivos de nanofibras de PCL e própolis foram produzidos e analisados para aplicações médicas. Os autores observaram uma tendência de liberação acumulada na faixa dos 50% nos primeiros 5 dias analisados e no final de 10 dias os dispositivos ainda não tinham liberado 100% do composto.

O comportamento das amostras foi semelhante quando comparado em relação à proporção. Tanto no grupo QX-C como no QX-P a tendência da liberação ocorreu da mesma forma para os três grupos testados, portanto pode-se dizer que não houve influência da quantidade de Q ou X sobre a cinética da liberação. Sendo assim, pode-se constatar que o própolis foi o responsável por essa diferença de comportamento, mantendo uma liberação mais lenta e controlada do que a canela, muito possivelmente pelas mudanças de hidrofiliabilidade do dispositivo como um todo, conforme mencionado anteriormente na análise de degradação.

Para a aplicabilidade clínica sugerida, era melhor que o dispositivo apresentasse uma cinética de liberação de fármaco mais lenta. No caso de um pós-cirúrgico, o período de cicatrização gengival pode variar de 7 a 15 dias, já para um procedimento não invasivo, como uma profilaxia supra gengival, de 24 a 48 h seria o suficiente para ajudar na recuperação. Dessa forma os grupos QX-P apresentaram resultados mais promissores que os QX-C. Contudo a quantidade de fármaco liberado dentro desse tempo também é uma informação importante que deve ser observada, pois a concentração mínima inibitória para cada tipo de cepa deve ser liberada, caso contrário não haverá uma efetividade para conter a proliferação bacteriana.

6.3 Ensaios microbiológicos

6.3.1 Verificação de halo de inibição

Nos dois micro-organismos analisados, os grupos QX e QX-C não apresentaram halo, contudo os grupos CLX, como esperado, demonstraram ação antimicrobiana. Já os grupos QX-P formaram halo nas placas de *S. aureus*. As três proporções foram muito semelhantes com relação ao tamanho da zona de inibição, tanto para CLX como QX-P, reforçando as evidências de que a quantidade de Q e X não tem grande influência sobre esse comportamento do material. No estudo de Kim et al. (2017), foram avaliadas as zonas de inibição de membranas de Q e X em três diferentes proporções carregadas com clorexidina, e os autores também concluíram que os efeitos inibitórios não eram dependentes da concentração de X ou Q (Kim et al., 2017).

A falta de atividade antimicrobiana sobre o *E. coli* pode ser explicado pelo fato da maior necessidade de liberação dos ativos sobre essa cepa conforme foi mostrado nos ensaios preliminares de CIM. Além disso, esse tipo de análise não coloca as amostras em solução, sendo assim a troca dos compostos para o meio pode não ser tão efetiva ou não ocorrer. O teste do halo de inibição é comumente divulgado na literatura científica nos estudos que analisam dispositivos com capacidade de intumescimento (Chirila et al., 2020; Kim et al., 2017; Ngwabebhoh et al., 2021), entretanto nesta pesquisa os resultados foram basicamente visuais, pois não foram feitos grupo controle para gerar análise estatística.

6.3.2 Verificação da ação antibiofilme

Sobre os resultados contra *S. aureus*, comparando os grupos com o controle negativo, as maiores porcentagens de redução de atividade metabólica foram vistas nos grupos CLX, como esperado, com valores de 80 a 86%, não demonstrando diferença significativa entre eles. Entre os grupos QX-C e QX-P, os de proporção 2:1 tiveram os menores valores de redução de 35 e 46%, sem diferença significativa. Já os grupos 1:1 e 1:2 tiveram reduções de 53 a 70%, também sem diferenças significativas. Os resultados obtidos sobre as cepas de *E. coli*, também tiveram altas taxas de reduções dos grupos CLX (79 – 90%, sem diferença estatística entre eles). Os grupos QX-P demonstraram valores altos, principalmente o 1:1 com 80% de redução, seguido de 61% (1:2) e 62% (2:1). Já os grupos QX-C apresentaram os

menores valores de redução (14 – 19%).

A discrepância dos resultados dos grupos QX-C entre os dois micro-organismos é grande e isso pode ser atribuído à composição estrutural bacteriana. É relatado que *E. coli* (gram-negativa) tem uma parede celular composta por peptidoglicano seguida por uma camada externa de lipo-polissacarídeo fina, enquanto *S. aureus* (gram-positivo) é composto por camadas espessas de peptidoglicano (Jorge, 2012). Essa diferença faz com que o *E. coli* seja mais resistente a compostos hidrofóbicos como o cinamaldeído (Ahmadi et al., 2021). Contudo, a baixa atividade antimicrobiana não pode ser totalmente atribuída a isso visto que o própolis também tem compostos hidrofóbicos.

O cálculo feito no ensaio de liberação para se determinar a quantidade dos extratos nas amostras de 1 x 1 cm², mostrou que a quantidade encontrada nos grupos QX-C (0,44 mg/mL) não era suficiente para inibir o crescimento bacteriano em ambas as cepas (1 e 0,5 mg/mL), baseando nos resultados preliminares do CIM dos extratos isolados. Já os grupos QX-P (11,78 mg/mL) foi suficiente somente para inibir o *S. aureus* conforme o CIM (3,4 mg/mL, contra 27,8 mg/mL do *E. coli*). Além disso, nota-se que, como a liberação acontece de forma acumulativa, as concentrações que foram sendo liberadas foram bem menores ao longo do tempo, portanto os grupos não conseguiram inibir o crescimento bacteriano dentro de 48h, mas foram capazes de reduzir a quantidade dos micro-organismo. A baixa concentração inicial da canela, somado a dificuldade de permeabilidade na parede celular do *E. coli* pode explicar a baixa redução de atividade antimicrobiana nesta cepa.

Um estudo em 2014 analisou os efeitos bactericidas de nanofibras eletrofiadas de PLA (ácido polilático) com própolis (2 a 10%) sob cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis* e *E. coli*. Os autores concluíram que o efeito das atividades antimicrobianas estava relacionado diretamente com a concentração do ativo adicionado à nanofibra, as maiores concentrações foram as que apresentaram inibição de crescimento dos micro-organismos (Sutjarittangtham et al., 2014). Outro estudo com nanofibras eletrofiadas foi conduzido testando a atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *E. coli*. As fibras de quitosana/gelatina foram carregadas com canela (2 a 6%) e as maiores concentrações obtiveram os melhores resultados (Ahmadi et al., 2021). Contudo, o estudo de Sutjarittangtham et al. (2014) observou que os grupos que continham as maiores concentrações de própolis alteraram a morfologia das

nanofibras, pois a resina presente atuou como um plastificante, baixando a resistência mecânica e tornando as nanofibras quebradiças.

Novamente é notado que praticamente não há uma diferença significativas entre os grupos segundo as proporções analisadas. As membranas de Q e X mostraram grande potencial para aplicação em *drug delivery*, entretanto, com os resultados obtidos, pressupõe que os ativos adicionados podem alterar o comportamento final do material. A composição e a concentração inicial de extratos vegetais adicionados a matriz polimérica podem ter influência direta sobre a degradação, liberação, atividade antimicrobiana e outras propriedades.

Por fim, analisando a aplicabilidade sugerida dos dispositivos, com os resultados obtidos nos testes microbiológicos, é notável que os grupos CLX apresentam grande potencial, visto que a clorexidina é um antisséptico sintético muito usado dentro da odontologia com uma ampla gama de inibição bacteriana. Contudo, as membranas contendo os fitoterápicos, principalmente o própolis, também apresentaram resultados notáveis que devem ser melhor explorados. Mais estudos devem ser conduzidos, inclusive clínicos, verificando a ação antibacteriana em outros micro-organismos isolados e combinados.

7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos e analisados, pode-se listar as seguintes conclusões:

- A metodologia de produção dos PECs afetou o aspecto final das membranas, e a utilização de agitador mecânico de alta capacidade juntamente com uma bomba injetora foi fundamental para garantir suspensões finais mais uniformes e possíveis de reprodutibilidade;
- A incorporação dos extratos alcoólicos por impregnação não foi eficaz;
- A alteração na proporção de Q:X não afetou diretamente os resultados de degradação, liberação e atividade antimicrobiana. Porém teve diferenças significativas quanto a espessura final;
- A adição dos extratos nas membranas aumentou a taxa de sobrevivência frente a degradação enzimática;
- Os grupos QX-P apresentaram uma cinética de liberação mais lenta comparado aos QX-C.
- Os grupos CLX apresentaram as maiores taxas de redução metabólica (>79%) frente as cepas de *S. aureus* e *E. coli* quando comparados aos grupos QX-P e QX-C, com diferenças estatisticamente significantes.
- Os grupos QX-P e QX-C tiveram taxas de redução semelhantes frente ao *S. aureus* (de 70 a 35%) sem apresentar diferenças estatisticamente significantes.
- Os grupos QX-P tiveram taxas de redução maiores (de 80 a 62%) frente ao *E. coli* quando comparados aos grupos QX-C (de 14 a 19%), com diferenças estatisticamente significante.

REFERÊNCIAS

Academy of Osseointegration. 2010 Guidelines of the Academy of Osseointegration for the provision of dental implants and associated patient care. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:620–7.

Ahmadi S, Hivechi A, Bahrami SH, Milan PB, Ashraf SS. Cinnamon extract loaded electrospun chitosan/gelatin membrane with antibacterial activity. *Int J Biol Macromol* 2021;173:580–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.156>.

Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* 2015;6:105–21.

Albrektsson T, Albrektsson B. Osseointegration of bone implants: A review of an alternative mode of fixation. *Acta Orthop* 1987;58:567–77. <https://doi.org/10.3109/17453678709146401>.

AlKahtani RN. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. *Saudi Dental Journal* 2018;30:107–16. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.01.002>.

Aloise JP, Curcio R, Laporta MZ, Rossi L, da Silva AMÁ, Rapoport A. Microbial leakage through the implant-abutment interface of morse taper implants in vitro. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:328–35. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01837.x>.

Alves MJ dos S, de Sousa MHO, de Moura NF, Cesca K, Verruck S, Monteiro AR, et al. Starch nanoparticles containing phenolic compounds from green propolis: Characterization and evaluation of antioxidant, antimicrobial and digestibility properties. *Int J Biol Macromol* 2024;255:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128079>.

Andrade JKS, Denadai M, Andrade GRS, Nascimento C da C, Barbosa PF, Jesus MS, et al. Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. *Food Research International* 2018;109:278–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.048>.

Argin-Soysal S, Kofinas P, Lo YM. Effect of complexation conditions on xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocoll* 2009;23:202–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.011>.

de Avila ED, van Oirschot BA, van den Beucken JJJP. Biomaterial-based possibilities for managing peri-implantitis. *J Periodontal Res* 2020;55:165–73. <https://doi.org/10.1111/jre.12707>.

Bai M, Jin X, Cen Z, Yu K, Yu H, Xiao R, et al. GC–MS and FTIR spectroscopy for the identification and assessment of essential oil components of five cinnamon

leaves. *Brazilian Journal of Botany* 2021;44:525–35. <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00751-7>.

Balekjian AY, Hoerman KC, Berzinskas VJ. Lysozyme of the human parotid gland secretion: its purification and physicochemical properties. *Biochem Biophys Res Commun* 1969;35:887–94.

Bapat RA, Joshi CP, Bapat P, Chaubal T V., Pandurangappa R, Jnanendrappa N, et al. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discov Today* 2019;24:85–98.

Baroli B. Hydrogels for tissue engineering and delivery of tissue-inducing substances. *J Pharm Sci* 2007;96:2197–223. <https://doi.org/10.1002/jps.20873>.

Batista RA, Espitia PJP, Vergne DMC, Vicente AA, Pereira PAC, Cerqueira MA, et al. Development and evaluation of superabsorbent hydrogels based on natural polymers. *Polymers (Basel)* 2020;12:2–11. <https://doi.org/10.3390/POLYM12102173>.

Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol* 2014;59:66–72. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.09.013>.

Bellini MZ, Pires ALR, Vasconcelos MO, Moraes ÂM. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *J Appl Polym Sci* 2012;125:E421–31. <https://doi.org/10.1002/app.36693>.

Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 2018;89:S313–8. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0739>.

Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:83–99. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>.

Blocher WC, Perry SL. Complex coacervate-based materials for biomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2017;9:76–8. <https://doi.org/10.1002/wnan.1442>.

Braga MEM, Pato MTV, Silva HSRC, Ferreira EI, Gil MH, Duarte CMM, et al. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. *J Supercrit Fluids* 2008;44:245–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.10.002>.

Brolund A. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol* 2014;4. <https://doi.org/10.3402/iee.v4.24555>.

Buenger D, Topuz F, Groll J. Hydrogels in sensing applications. *Prog Polym Sci* 2012;37:1678–719.

Buwalda SJ, Boere KWM, Dijkstra PJ, Feijen J, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release* 2014;190:254–73. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>.

Cao X, Cai X, Chen R, Zhang H, Jiang T, Wang Y. A thermosensitive chitosan-based hydrogel for sealing and lubricating purposes in dental implant system. *Clin Implant Dent Relat Res* 2019;21:324–35. <https://doi.org/10.1111/cid.12738>.

de Castro LLRL, Silva LGL, Abreu IR, Braz CJF, Rodrigues SCS, Moreira-Araújo RS dos R, et al. Biodegradable PBAT/PLA blend films incorporated with turmeric and cinnamomum powder: A potential alternative for active food packaging. *Food Chem* 2024;439:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138146>.

Cerbasi KP. Bacterial etiology and treatment of peri-implantitis. *Innov Implant j, Biomater Esthet (Impr)* 2010;5:50–5.

Chirila L, Constantinescu GC, Danila A, Popescu A, Constantinescu RR, Săndulache IM. Functionalization of textile materials with bioactive polymeric systems based on propolis and cinnamon essential oil. *Industria Textila* 2020;71:186–92.

Cicciù M, Fiorillo L, Cervino G. Chitosan use in dentistry: A systematic review of recent clinical studies. *Mar Drugs* 2019;17:1–14. <https://doi.org/10.3390/md17070417>.

Ćirić A, Medarević Đ, Čalija B, Dobričić V, Mitrić M, Djekic L. Study of chitosan/xanthan gum polyelectrolyte complexes formation, solid state and influence on ibuprofen release kinetics. *Int J Biol Macromol* 2020;148:942–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.138>.

Compton S, Clark D, Chan S, Kuc I, Wubie B, Levin L. Dental Implants in the Elderly Population: A Long-Term Follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2017;32:164–70. <https://doi.org/10.11607/jomi.5305>.

Dallan PRM, Moreira PDL, Petinari L, Malmonge SM, Beppu MM, Genari SC, et al. Effects of chitosan solution concentration and incorporation of chitin and glycerol on dense chitosan membrane properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;80:394–405. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30610>.

Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 2011;36:981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>.

Denkbaşı EB, Ottenbrite RM. Perspectives on: Chitosan drug delivery systems based on their geometries. *J Bioact Compat Polym* 2006;21:351–68. <https://doi.org/10.1177/0883911506066930>.

- Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol* 2015;42:S158–71. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12334>.
- Dobie K, Smith G, Sloan AJ, Smith AJ. Effects of alginate hydrogels and TGF- β 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connect Tissue Res* 2002;43:387–90. <https://doi.org/10.1080/03008200290000574>.
- Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2012;18:176–84. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0222>.
- Hu Y, Zhou W, Zhu C, Zhou Y, Guo Q, Huang X, et al. The Synergistic Effect of Nicotine and *Staphylococcus aureus* on Peri-Implant Infections. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.658380>.
- Ishimatsu H, Kitamura C, Morotomi T, Tabata Y, Nishihara T, Chen KK, et al. Formation of Dentinal Bridge on Surface of Regenerated Dental Pulp in Dentin Defects by Controlled Release of Fibroblast Growth Factor-2 From Gelatin Hydrogels. *J Endod* 2009;35:858–65. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.03.049>.
- Jin SG. Production and application of biomaterials based on polyvinyl alcohol (PVA) as Wound Dressing. *Chem Asian J* 2022;2–13.
- Jorge AOC. *Microbiologia e Imunologia Oral*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
- Kenawy E, Omer AM, Tamer TM, Elmeligy MA, Eldin MSM. Fabrication of biodegradable gelatin/chitosan/cinnamaldehyde crosslinked membranes for antibacterial wound dressing applications. *Int J Biol Macromol* 2019;139:440–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.191>.
- Kim J, Hwang J, Seo Y, Jo Y, Son J, Choi J. Engineered chitosan–xanthan gum biopolymers effectively adhere to cells and readily release incorporated antiseptic molecules in a sustained manner. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2017;46:68–79. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.10.017>.
- Kinalski M de A, Pires ALC, Saporiti JM, dos Santos MBF. Dental implant therapy in the Brazilian Public System: an overview of the last decade. *Braz J Oral Sci* 2020;1–11.
- Kumar A, Rao KM, Han SS. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydr Polym* 2018;180:128–44. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.009>.
- Lauritano D, Moreo G, Lucchese A, Viganoni C, Limongelli L, Carinci F. The impact of implant-abutment connection on clinical outcomes and microbial colonization: A narrative review. *Materials* 2020;13:1–12. <https://doi.org/10.3390/ma13051131>.

Lima M de M, Carneiro LC, Bianchini D, Dias ARG, Zavareze E da R, Prentice C, et al. Structural, Thermal, Physical, Mechanical, and Barrier Properties of Chitosan Films with the Addition of Xanthan Gum. *J Food Sci* 2017;82:698–705. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13653>.

Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *Int J Biol Macromol* 2014;64:353–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.017>.

Ma S, Yu B, Pei X, Zhou F. Structural hydrogels. *Polymer (Guildf)* 2016;98:516–35.

Malik NS, Ahmad M, Minhas MU, Tulain R, Barkat K, Khalid I, et al. Chitosan/Xanthan Gum Based Hydrogels as Potential Carrier for an Antiviral Drug: Fabrication, Characterization, and Safety Evaluation. *Front Chem* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00050>.

Meccatti VM, Martins KMC, Ramos L de P, Pereira TC, de Menezes RT, Marcucci MC, et al. Synergistic Antibiofilm Action of *Cinnamomum verum* and Brazilian Green Propolis Hydroethanolic Extracts against Multidrug-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* and Their Biocompatibility on Human Keratinocytes. *Molecules* 2023;28:2–16. <https://doi.org/10.3390/molecules28196904>.

Medina CMA, Villa-Correa YA. Gram-Negative Enteric Rods Associated to Early Implant Failure and Peri-Implantitis: Case Report and Systematic Literature Review. *Int J Odontostomat* 2015;9:329–36.

de Melo F, Milanesi FC, Angst PDM, Oppermann RV. A systematic review of the microbiota composition in various peri-implant conditions: data from 16S rRNA gene sequencing. *Arch Oral Biol* 2020;117:104776. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104776>.

Mohamadinooripoor R, Kashanian S, Moradipour P, Sajadimajd S, Arkan E, Tajehmiri A, et al. Novel elastomeric fibrous composites of poly- ϵ -caprolactone/propolis and their evaluation for biomedical applications. *Journal of Polymer Research* 2022;29:3–17. <https://doi.org/10.1007/s10965-022-03165-5>.

Moț AC, Silaghi-Dumitrescu R, Sârbu C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis* 2011;24:516–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.11.006>.

Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 2007;32:762–98. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>.

Nguyen-Hieu T, Borghetti A, Aboudharam G. Peri-implantitis: from diagnosis to therapeutics. *J Investig Clin Dent* 2012;3:79–94. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2012.00116.x>.

Ngwabebhoh FA, Zandraa O, Patwa R, Saha N, Capáková Z, Saha P. Self-crosslinked chitosan/dialdehyde xanthan gum blended hypromellose hydrogel for the controlled delivery of ampicillin, minocycline and rifampicin. *Int J Biol Macromol* 2021;167:1468–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.100>.

Oliveira RN, Mancini MC, de Oliveira FCS, Passos TM, Quilty B, Thiré RM da SM, et al. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Revista Matéria* 2016;21:767–79. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620160003.0072>.

Ortman JM, Velkoff VA, Hogan H. An Aging Nation: The Older Population in the United States Population Estimates and Projections Current Population Reports. 2014.

Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baharvand H, Daemi H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *Int J Biol Macromol* 2018;107:678–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>.

Paganotti RSN, Rezende J de C, Barbeira PJS. Discrimination Between Producing Regions of Brazilian Propolis by UV-VIS Spectroscopy and Partial Least Squares Discriminant Analysis. *Curr Anal Chem* 2014;10:537–44.

Pal TK. Fundamentals and history of implant dentistry. *Journal of the International Clinical Dental Research Organization* 2015;7:6. <https://doi.org/10.4103/2231-0754.172933>.

Paramelle D, Sadovoy A, Gorelik S, Free P, Hobley J, Fernig DG. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* 2014;139:4855–61. <https://doi.org/10.1039/c4an00978a>.

Park SH, Wang HL. Implant reversible complications: classification and treatments. *Implant Dent* 2005;14:211–20. <https://doi.org/10.1097/01.id.0000173334.60107.1a>.

Patel J, Maji B, Moorthy NSHN, Maiti S. Xanthan gum derivatives: Review of synthesis, properties and diverse applications. *RSC Adv* 2020;10:27103–36. <https://doi.org/10.1039/d0ra04366d>.

Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introdução à Espectroscopia*. 4th ed. Cengage Learning; 2010.

Pellizzer EP, Mello CC de, Santiago Junior JF, Mazaro JVQ. *Introdução ao estudo da prótese sobre implante . Prótese sobre implante - baseado em evidências científicas*. 1ª, Nova Odessa - SP: Napoleão; 2016, p. 19–49.

Persson GR, Samuelsson E, Lindahl C, Renvert S. Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: A single-blinded randomized longitudinal clinical study. II. Microbiological results. *J Clin Periodontol* 2010;37:563–73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01561.x>.

Pieróg M, Gierszewska-Drużyńska M, Ostrowska-Czubenko J. Effect of ionic crosslinking agents on swelling behaviour of chitosan hydrogel membranes. *Prog Chem Appl Chitin Derivatives* 2009;14:75–82.

Pigozzo MN, da Costa TR, Sesma N, Laganá DC. Immediate versus early loading of single dental implants: A systematic review and meta-analysis. *J Prosthet Dent* 2018;120:25–34.

Pires ALR, Westin CB, Hernandez-Montelongo J, Sousa IMO, Foglio MA, Moraes AM. Flexible, dense and porous chitosan and alginate membranes containing the standardized extract of *Arrabidaea chica* Verlot for the treatment of skin lesions. *Materials Science and Engineering C* 2020;112:2–12. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110869>.

Popa N, Novac O, Profire L, Lupusoru CE, Popa MI. Hydrogels based on chitosan-xanthan for controlled release of theophylline. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:1241–8. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3937-4>.

Pye AD, Lockhart DEA, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. *Journal of Hospital Infection* 2009;72:104–10.

Rachtanapun P, Klunklin W, Jantrawut P, Jantanasakulwong K, Phimolsiripol Y, Seesuriyachan P, et al. Characterization of chitosan film incorporated with curcumin extract. *Polymers (Basel)* 2021;13:2–15. <https://doi.org/10.3390/polym13060963>.

Rieger KA, Schiffman JD. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers. *Carbohydr Polym* 2014;113:561–8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.075>.

Rivest C, Morrison DWG, Ni B, Rubin J, Yadav V, Mahdavi A, et al. Microscale hydrogels for medicine and biology: synthesis, characteristics and applications. *Journal of Mechanics Os Materials and Structures* 2007;2:1103–19.

Sato T, Mello D, Vasconcelos L, Valente AJM, Borges A. Chitosan-based coacervate polymers for propolis encapsulation: Release and cytotoxicity studies. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21124561>.

Shrestha B, Srithavaj Theerathavaj ML, Thaweboon S, Thaweboon B. In vitro antimicrobial effects of grape seed extract on peri-implantitis microflora in craniofacial implants. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012:822–5.

Slaughter B V., Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials* 2009;21:3307–29. <https://doi.org/10.1002/adma.200802106>.

de Souza RFB, de Souza FCB, Thorpe A, Mantovani D, Popat KC, Moraes ÂM. Phosphorylation of chitosan to improve osteoinduction of chitosan/xanthan-based

scaffolds for periosteal tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2020;143:619–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.004>.

Srinivasan M, Meyer S, Mombelli A, Müller F. Dental implants in the elderly population: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:920–30. <https://doi.org/10.1111/clr.12898>.

Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CHF. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24:616–26. <https://doi.org/10.5167/uzh-26110>.

Sutjarittangtham K, Sanpa S, Tunkasiri T, Chantawannakul P, Intatha U, Eitssayeam S. Bactericidal effects of propolis/polylactic acid (PLA) nanofibres obtained via electrospinning. *J Apic Res* 2014;53:109–15. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.11>.

Tenório FS, Montanheiro TL do A, dos Santos AMI, Silva M dos S, Lemes AP, Tada DB. Chitosan hydrogel covalently crosslinked by gold nanoparticle: Eliminating the use of toxic crosslinkers. *J Appl Polym Sci* 2021;138:1–13. <https://doi.org/10.1002/app.49819>.

Veiga IG, Moraes ÂM. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. *J Appl Polym Sci* 2011;124:E154–60. <https://doi.org/10.1002/app.35526>.

Veiga RS, De Mendonça S, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Lagareiro Netto AA, et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol* 2017;122:911–20. <https://doi.org/10.1111/jam.13400>.

Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 2010;35:1217–56. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>.

Wu B, Tang Y, Wang K, Zhou X, Xiang L. Nanostructured Titanium Implant Surface Facilitating Osseointegration from Protein Adsorption to Osteogenesis: The Example of TiO₂ NTAs. *Int J Nanomedicine* 2022;17:1865–79. <https://doi.org/10.2147/IJN.S362720>.