



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Juliana Rios de Oliveira

**Sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral contra bactérias
cariogênicas e efeito na perda mineral do esmalte dentário**

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Juliana Rios de Oliveira

**Sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral contra bactérias
cariogênicas e efeito na perda mineral do esmalte dentário**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

Araraquara

2022

O48s

Oliveira, Juliana Rios de

Sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral contra bactérias cariogênicas e efeito na perda mineral do esmalte dentário / Juliana Rios de Oliveira. -- Araraquara, 2022

81 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Elisa Maria Aparecida Giro

Coorientadora: Fernanda Lourenção Brighenti

1. Cristais líquidos. 2. Cárie dentária. 3. Biofilmes. 4. Óleos vegetais. 5. Antibacterianos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Juliana Rios de Oliveira

**Sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral contra bactérias
cariogênicas e efeito na perda mineral do esmalte dentário**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Profa. Dra. Josimeri Hebling

3º Examinador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara, 03 de novembro de 2022.

DADOS CURRICULARES

Juliana Rios de Oliveira

NASCIMENTO: 29/06/1996 – Conceição do Coité – BA

FILIAÇÃO: Marcos Luiz Souza de Oliveira e Izalmir Iza Rios de Oliveira

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2014/2018: Graduação em Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMSP

2020/2022: Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração: Odontopediatria – Curso de Mestrado pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedico este trabalho

À Deus e a Nossa Senhora,

por todo amor e por sempre estarem presentes em tudo de mais belo que pude encontrar e viver.

Aos meus pais Marcos e Iza,

que são a razão de tudo. Vocês me ensinaram a sonhar e acreditar no melhor da vida. Obrigada por ser luz e por nunca perderem a fé em mim. Vocês são exemplo de amor, sabedoria, humanidade e companheirismo.

As minhas irmãs Alice e Amanda,

que são sinônimo de alegria, amizade e carinho. Sem vocês nada seria possível e serei eternamente grata por dividirem a vida comigo. Eu tenho muito orgulho de vocês que são os meus anjos na terra.

Amo vocês!

Agradecimentos Especiais

A minha orientadora, Professora Elisa (**Elisa Maria Aparecida Giro**) agradeço a oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela paciência e pelo carinho. Agradeço por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável, e por contribuir grandemente com meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada por tudo!

A minha coorientadora **Fernanda Lourenção Brighenti** sua contribuição foi essencial. Sempre muito cuidadosa e empenhada a ajudar. Obrigada por todos momentos compartilhados.

Ao professor **Marlus Chorolli**, que participou de todas as etapas para a realização deste trabalho. Obrigada pela disponibilidade e ensinamentos, suas considerações foram extremamente válidas.

As amigas irmãs **Amanda Brandão Soares e Luciana Solera Sales**, pelo apoio nos momentos mais difíceis e por me ajudar a ser uma pessoa melhor. Obrigada por todos os dias acreditarem em mim e por nunca duvidarem de que o meu sonho seria possível. Obrigada também, por me ofertarem uma nova família, que não mediram esforços para me ajudar nessa jornada.

Aos meus amigos **Caroline Anselmi de Oliveira, Igor Paulino Mendes Soares, Vinicius Krieger Costa Nogueira e Rafael Antonio de Oliveira Ribeiro** vocês são como casa. Obrigada por todo carinho, risadas, conselhos e ensinamentos. Sem dúvidas vocês são um dos melhores encontros que a vida me proporcionou e são a certeza de que nunca estive sozinha.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: **Elis Barbosa, Túlio Ferrisse, Paulo G. Armelin, Willian Koppe Molíria Vieira**. A vocês serei eternamente grata, por sempre me incentivarem, acreditarem que o melhor estava por vir e por tornar o trabalho mais feliz. Em especial, agradeço a **Analú Barros de Oliveira** que me acolheu com muito carinho e trouxe paz para momentos de angústia, você é luz.

A **Gabriel Nunes e Camila Fernanda Roderó**, sem vocês e seus ensinamentos essa dissertação não seria possível. Obrigada por não medirem esforços para que o trabalho fosse concluído e por todo cuidado. Eu admiro muito vocês.

A tantos amigos, colegas e parceiros que já convivi ou ainda convivo: **Juliana Gaiotto, Letícia Melo, Kassandra Yupanqui** obrigada pelo coração imenso. Vocês são preciosas, sorte a nossa ter se encontrado.

A **Lídia Fernandes, Maria Luiza Pires e Vitória Peruchi**, por sempre me encontrarem com um sorriso no rosto, eu admiro muito a força e a determinação de vocês. Todo o carinho jamais será esquecido.

As minhas queridas amigas que tenho extrema admiração **Larissa Félix, Luana Dias, Camila Padovani, Camila Cavaça** obrigada por tornarem a minha jornada mais feliz, por comemorar as minhas vitórias e ser abrigo nas dificuldades.

Ao **Ranulfo** que se disponibilizou com muito carinho para me auxiliar na realização desse trabalho.

Aos meus amigos de infância e graduação : **Ana Caroline Rocha, Ana Clara Matos, Ana Laura Marques, Cananda Maria Trindade, Ellen Santos, Emanuele Mota, Ingridh Lobo, João Victor Ramos, Laura Falcão, Mariana Carvalho, Renata Granja, Paula Strauch** vocês são o meu porto seguro e mesmo com a distância nunca mediram esforços para me apoiar e fazer me sentir amada.

As minhas tias **Berenice Rute Rios Santos e Izaulina Rios da Silva**, por me ensinarem sobre a paixão por ensinar e de que jamais devemos deixar de demonstrar amor e de agradecer pela vida. Vocês são admiráveis.

A minha Dinda, minha segunda mãe **Dirlene Rios da Silva** que transmite amor pelos olhos. Exemplo de caráter, sabedoria e autenticidade. Com ela aprendi a ser forte.

A todos meus familiares, mas em especial **Albérico, Breno, Livia Rios, Érico, Paulo, Gabriela e Isabela** que independente da distância se fizeram presentes todos os dias. Vocês são minha inspiração e os amo de todo coração! Agradeço também a **Livia Carneiro**, por ter sido a primeira a me acolher enquanto profissional, por me abraçar e mostrar a sua paixão pela odontologia, você transformou a minha vida.

Agradeço a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, para o meu crescimento e para minha felicidade.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Microbiológica (LPBM) aos cuidados da professora Fernanda Brighenti, por oferecer o suporte e auxílio para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, na pessoa do Prof. Dr. Marlus Chorilli, onde foram realizadas as preparações e caracterização das formulações.

Ao Laboratório de Biomineralização da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e ao professor Alberto Carlos Botazzo Delbem, por auxiliarem e oferecerem apoio para realização de análises importantes.

A todos os professores da Pós-Graduação, em especial aos Professores da Odontopediatria, pelos ensinamentos sobre pesquisa e docência. Vocês são referência, obrigada pela possibilidade de aprender sobre odontologia e vida.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Cristiano Lamounier e José Alexandre Garcia, por toda ajuda e prestatividade.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela ajuda na organização desse trabalho.

À Unesp, em especial à Faculdade de Odontologia de Araraquara pela oportunidade. Agradeço a todos que nela trabalham: Reitoria, Diretoria, Portaria, Limpeza, aos funcionários em geral que são essenciais para que tudo aconteça. Também agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, em especial à Odontopediatria e os funcionários do departamento.

Aos pacientes atendidos nas clínicas da faculdade, por auxiliar no meu crescimento profissional e pessoal. Serei eternamente grata a todos que tive o prazer de encontrar e atender.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“Nos bailes da vida aprendi a nada temer senão o correr da luta, aprendi também a andar com fé, pois a fé não costuma falhar.”
Berenice Rute Rios Santos”*

Santos BRR. Carta aberta [mensagem pessoal]. São Domingos, BA. Recebida pela família Rios; 2001.

Oliveira JR. Sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral contra bactérias cariogênicas e efeito perda mineral do esmalte dentário [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Diversos produtos de origem natural apresentam ação contra micro-organismos cariogênicos. Contudo, devido à complexidade do biofilme, é desejável o desenvolvimento de formulações que permitam a liberação controlada da substância ativa. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação de um sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral contra bactérias cariogênicas e o efeito na perda mineral do esmalte. O citral foi incorporado a formulação composta por 30% de ácido oleico, 50% de álcool cetílico alcoxilado e 20% de dispersão aquosa de poloxamer 1%, em concentração 10 (FC1) e 15 (FC2) vezes a concentração inibitória mínima (CIM). As formulações foram caracterizadas físico-quimicamente e tiveram o perfil de liberação do citral determinado. Para as análises microbiológica e de perda de dureza do esmalte, o sistema contendo citral (FC2) foi comparado a uma formulação veículo (F) e ao citral (C). O digluconato de clorexidina 0,12% e o meio de cultura McBain foram usados como controle positivo e negativo respectivamente. O crescimento dos biofilmes polimicrobianos foi feito sobre blocos de esmalte bovino (n=14 por grupo), utilizando inóculo obtido a partir da saliva humana, em meio McBain, com exposição a sacarose 0,2%, 6 h por dia, durante 4 dias. O tratamento dos biofilmes com as formulações F e FC2 foi realizado por 5 minutos, em dias alternados. O citral (C) foi aplicado por um minuto uma vez ao dia e o digluconato de clorexidina foi aplicado por um minuto uma vez ao dia (CLX) e em dias alternados (CLX1.3). A acidogenicidade foi avaliada pela análise do pH do meio de cultura antigo, e a concentração de bactérias totais, bactérias acidúricas e estreptococos do grupo *mutans* no biofilme foi determinada. Nos blocos de esmalte foi aferida a dureza de superfície inicial e final, e calculada a porcentagem de perda de dureza (SH%). Os dados qualitativos foram analisados de forma descritiva, e os quantitativos tiveram os pressupostos de normalidade e homocedasticidade analisados para seleção dos testes estatísticos mais adequados. O nível de significância adotado foi de 5%. As formulações FC1 e FC2 apresentaram características de fluidos não newtonianos pseudoplásticos, e a adição de saliva determinou alterações estruturais, com aumento da viscosidade e do potencial adesivo. FC1 e FC2 liberaram respectivamente 22,9% e 40,7% do citral incorporado, nas primeiras 24 horas. A formulação FC2 liberou concentrações similares a CIM entre 1 h e 3 h e foi selecionada para as análises do biofilme e da perda mineral do esmalte. FC2 demonstrou boa ação antimicrobiana em biofilmes polimicrobianos e, em meio com sacarose, diferentemente dos demais tratamentos, o pH desse grupo se manteve próximo ao neutro por maior tempo. Além disso, FC2 determinou a menor taxa de perda de dureza do esmalte. Baseado nesses resultados, o sistema cristal líquido bioadesivo com a incorporação de citral (FC2), apresentou características físico-químicas adequadas, liberação controlada de citral, boa atividade antibacteriana e reduziu a perda mineral do esmalte dentário submetido a alto desafio cariogênico. Portanto, FC2 apresenta um grande potencial de uso como método auxiliar na prevenção da cárie dentária.

Palavras – chave: Cristais líquidos. Cárie dentária. Biofilmes. Óleos vegetais. Antibacterianos.

Oliveira JR. Bioadhesive liquid crystal system containing citral against cariogenic bacteria and enamel mineral loss [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Several natural products have an action against cariogenic microorganisms. However, due to the complexity of the biofilm, the development of formulations that allow the controlled release of the active substance is desirable. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of a bioadhesive liquid crystal system containing citral against cariogenic bacteria and in mineral loss from dental enamel prevention. The concentrations of 10 times (FC1) and 15 times (FC2) citral minimum inhibitory concentration (MIC) were incorporated into a formulation composed of 30% oleic acid, 50% alkoxyated cetyl alcohol and 20% aqueous dispersion of 1% poloxamer. The formulations were physicochemically characterized and the citral release profile was determined. For microbiological and enamel hardness loss analyses, the system containing citral (FC2) was compared to a vehicle formulation (F) and to citral (C). A 0.12% Chlorhexidine digluconate solution and McBain culture medium were used as positive and negative controls, respectively. Polymicrobial biofilms were grown on bovine enamel blocks (n=14 per group), using inoculum from human saliva in McBain culture medium, with an intermittent 0.2% sucrose exposure (6 h/day), for four days. The treatment of biofilms with the formulations F and FC2 was carried out for 5 minutes every other day. Citral (C) was applied for one minute once a day and Chlorhexidine digluconate was applied for one minute once a day (CLX) and every other day (CLX1.3). The acidogenicity was evaluated by measuring the pH of the spent culture medium, and total bacteria, aciduric bacteria and *mutans* streptococci in the biofilm were quantified. The initial and final surface hardness were measured on the enamel blocks and the percentage of hardness loss (SH%) was calculated. The qualitative data were descriptively analyzed and quantitative data had the assumptions of normality and homoscedasticity analyzed to select the most appropriate statistical tests. The significance level adopted was 5%. The formulations FC1 and FC2 showed characteristics of non-Newtonian pseudoplastic fluids, and the addition of saliva determined structural changes, with an increase in viscosity and in the adhesive potential. FC1 and FC2 released 22.9% and 40.7% of the incorporated citral, respectively, in the first 24 hours. The formulation FC2 releasing between 1 h and 3 h was similar to citral MIC, and this formulation was selected for the biofilm and enamel mineral loss analyses. FC2 showed good antimicrobial action in polymicrobial biofilms and, even when exposed to sucrose-containing medium, unlike the other treatments, the pH of this group remained close to neutrality for a longer time. Overall, FC2 formulation determined the lowest rate of enamel hardness loss. Based on these findings, the bioadhesive liquid crystal system containing citral (FC2) had adequate physicochemical characteristics, controlled citral release, good antibacterial activity and decreased mineral loss from dental enamel subjected to high cariogenic challenge. Therefore, FC2 has a great potential as an adjuvant method in the prevention of dental caries.

Keywords: Liquid crystals. Dental caries. Biofilms. Plant oils. Anti-bacterial agents.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
4 MATERIAL E MÉTODO	24
4.1 Obtenção dos Materiais para Preparo do Sistema	24
4.2 Coleta de Saliva para o Desenvolvimento do Biofilme Polimicrobiano	24
4.2.1 Análise da concentração de micro-organismos na saliva	25
4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Citral	26
4.4 Preparo do Sistema Bioadesivo com a Incorporação do Citral	26
4.5 Caracterização Físico-Química dos Sistemas	27
4.5.1 Microscopia de luz polarizada	27
4.5.2 Análises reológicas	27
4.5.3 Avaliação in vitro da força adesiva	29
4.5.4 Análise do perfil de liberação in vitro do citral	30
4.6 Avaliação da Capacidade de Interferência do Sistema Bioadesivo Contendo Citral na Formação do Biofilme Polimicrobiano e na Desmineralização do Esmalte de Dentes Bovinos	30
4.6.1 Definição dos grupos experimentais	31
4.6.2 Cálculo do tamanho amostral	31
4.6.3 Preparo e seleção dos blocos de esmalte bovino	32
4.6.4 Crescimento e tratamento dos biofilmes polimicrobianos	33
4.6.5 Análise da acidogenicidade no meio de cultura	36
4.6.6 Avaliação da composição microbiológica dos biofilmes	36
4.6.7 Análise da perda de dureza de superfície do esmalte	36
4.7 Planejamento Estatístico e Análise dos Dados	37
5 RESULTADO	39
5.1 Análise da Concentração de Micro-Organismos na Saliva	39
5.2 Determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Citral	39
5.3 Caracterização Físico-Química do Sistema	40
5.3.1 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)	40
5.3.2 Análises reológicas	42
5.3.2.1 Análise reológica contínua	42
5.3.2.2 Análise reológica oscilatória	44
5.3.3 Avaliação in vitro da força adesiva	46
5.3.4 Análise de perfil de liberação in vitro do citral	47

5.4 Avaliação da Capacidade de Interferência do Sistema Bioadesivo Contendo Citral na Formação do Biofilme Polimicrobiano e na Desmineralização do Esmalte de Dentes Bovinos.....	50
5.4.1 Viabilidade bacteriana	50
5.4.2 Acidogenicidade do meio de cultura	52
5.4.3 Perda de dureza superficial do esmalte	54
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	73
APÊNDICE B CURVA PADRÃO DO CITRAL EM ÁLCOOL ETÍLICO ABSOLUTO (99,8%) /PBS, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR (R²).....	75
APÊNDICE C APÊNDICE C –MÉDIA DE DUREZA DA POUPULAÇÃO TOTAL DE BLOCOS E SEUS INTERVALOS DE CONFIANÇA	76
ANEXO A- PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS.....	77
ANEXO B –CADASTRO DO PROJETO NOSISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO- SISGEN	81

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença de etiologia multifatorial, com fatores associados ao indivíduo e ao ambiente em que se insere¹. As bactérias participantes do processo de desenvolvimento da cárie produzem ácidos orgânicos como subprodutos do metabolismo de carboidratos fermentáveis, os quais causam uma perturbação no equilíbrio mineral e, como resultado, inicia-se o processo de desmineralização da estrutura dentária².

O principal método de prevenção da cárie é o controle mecânico do biofilme por meio da escovação, associado à utilização de dentifrícios fluoretados e uma dieta alimentar equilibrada pobre em carboidratos fermentáveis³⁻⁵. Entretanto, crianças e indivíduos com problemas motores ou com comportamento pouco colaborativo podem apresentar dificuldades para realizar e manter uma rotina de higienização bucal adequada, aumentando os riscos de desenvolvimento da cárie⁶. Para essas situações, o controle químico do biofilme tem se mostrado um método complementar eficaz^{6,7}.

Vários agentes químicos com ação antibacteriana são frequentemente encontrados na composição de enxaguatórios bucais e dentifrícios⁸. A clorexidina é uma das substâncias mais indicadas como agente antibacteriano e anti-biofilme. Porém, da mesma forma que os demais agentes químicos atualmente disponíveis, desempenha ação limitada sobre biofilmes já organizados^{9,10}. Além disso, a sua utilização por tempo prolongado pode resultar em efeitos adversos, como resistência bacteriana, alteração do paladar, descamação da mucosa e pigmentação dentária¹¹⁻¹⁴. Também não foram encontradas evidências científicas que comprovem a indicação dessa substância para a prevenção da cárie em crianças e adolescentes¹⁵. Assim, alternativas devem ser pesquisadas visando manter e/ou restabelecer o equilíbrio da microbiota bucal frente aos diversos desafios impostos pelo ambiente, e apresentar ação sobre biofilmes organizados, com menor risco de efeitos adversos.

Produtos de origem natural (extratos vegetais, óleos essenciais, compostos isolados e produtos marinhos) têm sido cada vez mais investigados como alternativas preventivas, seguras, eficazes e sustentáveis^{16,17}. O citral é uma biomolécula encontrada em óleos essenciais de várias plantas medicinais, resultante da mistura natural de dois aldeídos monoterpênicos acíclicos isoméricos: geranial (transcitral, citral A) e neral (cis-citral, citral B) com destaque para seu efeito bactericida¹⁸. O

mecanismo de ação do citral envolve a alteração da membrana bacteriana, resultando na liberação de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes¹⁹⁻²¹. Apesar de ser uma substância promissora, as propriedades antimicrobianas do citral no contexto de prevenção a cárie foram pouco exploradas até o momento. Além disso, o principal desafio na sua utilização clínica consiste em manter essa substância disponível por tempo terapêutico na cavidade bucal, devido à sua instabilidade química e vulnerabilidade frente a ação de limpeza exercida pelo fluxo salivar. Neste sentido, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de sistemas mais estáveis e que apresentem liberação controlada da substância ativa^{22,23}.

Os sistemas cristais líquidos dispõem de ligações com rigidez próprias de sólidos e regiões desordenadas, com fluidez de líquidos²⁴. Na cavidade oral, a forma líquida facilita a sua aplicação, e em contato com os fluidos bucais, esses sistemas estruturam-se, tornando-se mais viscosos, o que favorece a sua aderência à estrutura dentária²². Dessa forma, eles protegem a substância ativa da remoção pela ação do fluxo salivar e permitem a sua liberação controlada no sítio de interesse^{22,23}. Além disso, com o controle das taxas de liberação, esses sistemas possibilitam uma diminuição da dose e uma menor frequência de administração, reduzindo a possibilidade de efeitos colaterais e favorecendo a adesão do paciente ao tratamento^{25,26}.

A associação de produtos naturais com os sistemas cristais líquidos tem sido testada e os resultados apontam que essa é uma alternativa viável para a administração de fármacos no tratamento de doenças microbianas da cavidade bucal^{23,27,28}. O presente estudo foi idealizado considerando o potencial antimicrobiano do citral, somado à escassez de trabalhos na literatura a respeito da incorporação desse composto a sistemas de liberação modificada de fármacos. O objetivo foi associar o citral a um sistema cristal líquido e avaliar sua ação antibacteriana e antibiofilme e seu efeito na perda mineral do esmalte.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a ação de um sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral contra bactérias cariogênicas, no acúmulo do biofilme e na perda mineral do esmalte dentário.

2.1 Objetivos Específicos

Incorporar o citral a um sistema cristal líquido e avaliar suas características físico-químicas;

Avaliar o perfil de liberação do citral incorporado ao sistema;

Avaliar a capacidade do sistema contendo o citral em interferir na formação do biofilme cariogênico;

Avaliar in vitro o efeito do sistema cristal líquido contendo citral na perda de dureza superficial do esmalte de dentes bovinos submetidos a elevado desafio cariogênico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A cárie dentária é uma doença multifatorial que ocorre como consequência do desequilíbrio dos processos de desmineralização e remineralização dos tecidos duros dentais. Entre os fatores determinantes para a ocorrência da cárie estão a presença de micro-organismos estruturados em biofilmes e o consumo frequente de carboidratos fermentáveis¹. Fatores comportamentais, sociais, biológicos e ambientais também estão associados à doença²⁹.

Os biofilmes dentais são estruturas extremamente organizadas, compostas por micro-organismos envolvidos por uma matriz de polissacarídeos extracelulares sobre uma camada denominada película adquirida². Essa camada é constituída por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluido gengival aderidos a superfície dentária. Nutrientes orgânicos acumulados proporcionam o recrutamento de micro-organismos que se aderem à película adquirida por meio de adesinas presentes na superfície celular bacteriana, proporcionando um ambiente favorável para a posterior colonização por outros micro-organismos. Conseqüentemente, são produzidos polissacarídeos que se depositam na superfície dentária cooperando para a formação da matriz e maturação do biofilme^{2,30}.

A desorganização do biofilme por meio da escovação e do uso de fio dental é o método preventivo mais indicado para o controle da doença cárie³¹. Porém, em situações específicas, nas quais não é possível realizar uma higiene bucal adequada, a associação com substâncias químicas antibacterianas é uma alternativa para reforço desse controle³².

Entre os principais agentes químicos utilizados para atuarem no biofilme estão: a clorexidina, o triclosan e o cloreto de cetilpiridínio. Apesar de uma indicação de uso similar, esses produtos se diferenciam na sua formulação e aplicabilidade⁸. Contudo, o uso indiscriminado dessas substâncias pode favorecer a resistência bacteriana e a ocorrência de efeitos adversos^{9-10,33}. Outra questão é que alguns dos produtos disponibilizados no mercado possuem álcool na sua composição, o que torna desaconselhável a sua utilização por crianças, gestantes, diabéticos, lactantes, alcoólatras, pacientes com xerostomia, mucosite, sob radioterapia e imunocomprometidos^{34,35}.

Apesar da expressiva ação dos agentes químicos sobre micro-organismos cariogênicos, algumas limitações ao seu mecanismo de ação são identificadas, e

estas são justificadas pela restrição de penetração, nível de concentração e tempo de contato. Altas concentrações e frequência de uso podem favorecer o desequilíbrio da microbiota bucal e aumentar o risco e ocorrência de efeitos indesejáveis. Investir em produtos naturais de prevenção ajuda na redução de custos terapêuticos e simultaneamente pode promover menos efeitos colaterais³⁶.

Muitos compostos naturais já tiveram suas propriedades anti-cárie exploradas^{37,38}. Uma das principais vantagens desses compostos em comparação aos produtos sintéticos, mais especificamente em comparação à clorexidina, é a diminuição do impacto sobre a microbiota oral geral, afetando fatores específicos do biofilme dentário, como o acúmulo e a composição dos polissacarídeos extracelulares³³. Contudo, muitos produtos de origem natural podem apresentar um teor elevado de toxicidade para as células do organismo³⁹. Então, para uma aplicação clínica, são necessários testes de citotoxicidade e estudos in vivo, estabelecendo assim, doses seguras para a sua utilização.

Entre os produtos naturais amplamente estudados estão os óleos essenciais. Sua atividade antimicrobiana está diretamente relacionada à ação sobre a camada lipídica da membrana celular bacteriana, promovendo uma alteração da sua estrutura e função, que determinam a morte celular^{40,41}. Podem, ainda, inibir a atividade enzimática das células bacterianas pela ação dos flavonóides presentes na sua composição⁴² ou pelo seu acúmulo na parede celular, com consequente ruptura da estrutura⁴³.

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) possui características anti-inflamatórias, antioxidantes, antifúngicas, antissépticas, adstringentes, analgésicas e antipiréticas⁴⁴⁻⁴⁵. Além disso, esse óleo apresenta atividade antimicrobiana com um amplo espectro de ação que abrange bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos^{46,18}. Estudos in vitro demonstraram, ainda, que esse óleo essencial possui ação antimicrobiana sobre isolados clínicos de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*, além de ação contra seis tipos de cepas de referência, incluindo fungos⁴⁴.

Mais especificamente contra colonizadores dentários primários e espécies microbianas relacionadas à cárie (*Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus*), o óleo essencial de *C. citratus* apresentou efeito inibitório contra todas as espécies bacterianas testadas, reduziu o número de células

viáveis em biofilmes de lactobacilos e estreptococos, inibiu a adesão do biofilme polimicrobiano relacionado à cárie de esmalte e apresentou baixa citotoxicidade a queratinócitos humanos⁴⁷. Além de apresentar a capacidade de reduzir a biomassa e a viabilidade microbiana, o óleo essencial também altera as características adesivas do biofilme polimicrobiano⁴⁸. Estudo recente mostrou que a associação do óleo essencial de *C. citratus* com a clorexidina potencializa o efeito antibacteriano da clorexidina sobre biofilmes polimicrobianos e reduz a acidogenicidade desses biofilmes¹⁷. Esses resultados podem ser atribuídos a um sinergismo entre os principais componentes do óleo essencial de *C. citratus* (cital e geranial) com o digluconato de clorexidina⁴⁷, e podem levar ao desenvolvimento de formulações para bochecho para uso em períodos mais curtos, e desta forma contribuir para a redução dos efeitos indesejáveis da clorexidina.

As atividades biológicas dos produtos naturais podem ser provenientes da ação de seus compostos isolados^{20,21}. Dentre eles, destaca-se o citral que compreende aproximadamente 65-85% da composição do óleo essencial de *C. citratus*^{21,18}. O citral é conhecido por exibir várias propriedades medicinais, incluindo a redução da atividade oxidante, da expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), demonstrando um potencial anti-inflamatório e anti-oxidante⁴⁹. Em altas concentrações, pode provocar alteração celular, romper a parede e estrutura da membrana, resultando na liberação de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes; e influenciar no equilíbrio do pH dentro e fora da célula bacteriana, caracterizando-se assim como um agente anti-microbiano^{20,19,21}.

Como é uma molécula quimicamente instável, o citral pode sofrer degradação rapidamente em pH ácido¹⁸. Além disso, é um composto com baixa solubilidade em água¹⁸. Como estratégia para contornar esses problemas, ele pode ser associado a emulsões e nanoemulsões que possibilitam o aumento da sua estabilidade⁵⁰ redução da toxicidade e liberação controlada¹⁸.

Ao longo dos anos, sistemas cristalinos líquidos têm ganhado destaque em áreas de pesquisa como possibilidade terapêutica para a liberação controlada de fármacos em diferentes aplicações, sendo administrados por diferentes vias⁵¹. O sistema cristalino líquido possui variedade estrutural, alto grau de organização interna e características morfológicas adaptáveis, que também beneficiam a incorporação de agentes anfífilos, hidrofóbicos e hidrofílicos⁵¹ (Figura 1A), além de possibilitar o transporte de grandes volumes de carga^{52,53}. Com a formação de multicamadas, os cristais líquidos

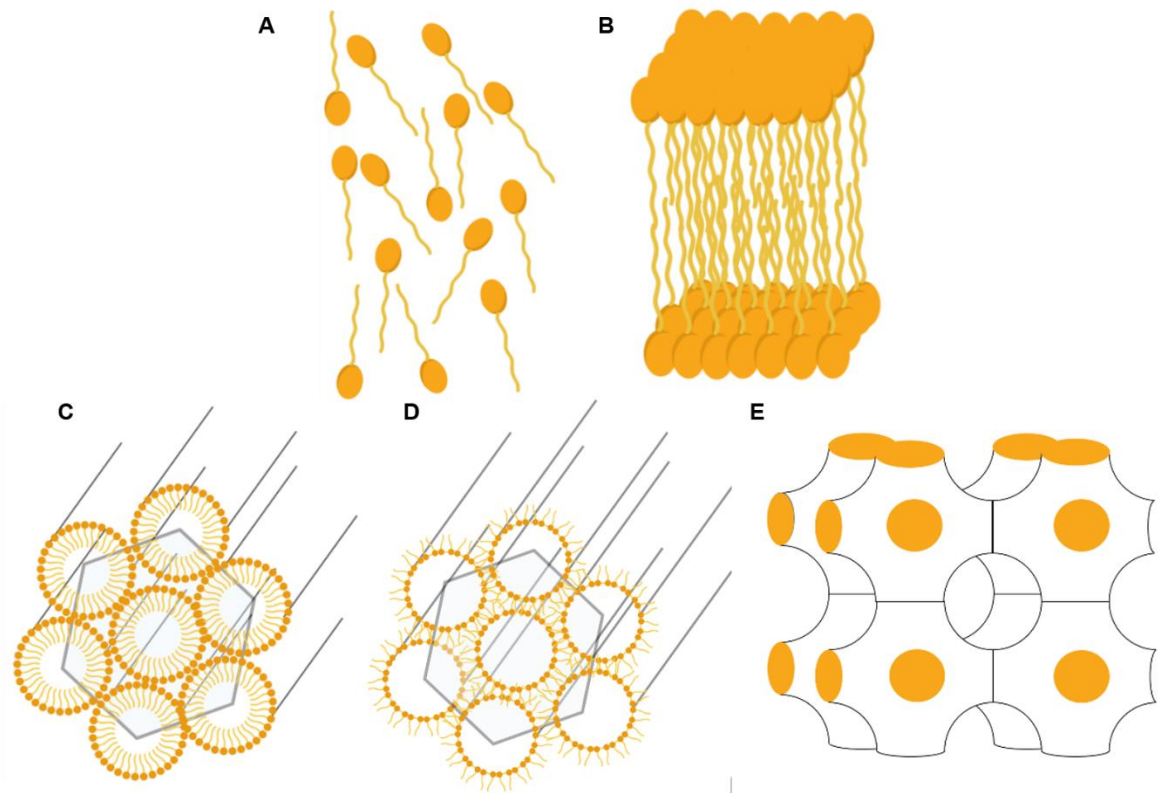
atuam como uma barreira de difusão do fármaco e, conseqüentemente, controlam a sua liberação^{52,53}. Além disso, a localização do fármaco é dependente da solubilidade e da probabilidade de inclusão entre as moléculas de tensoativo, podendo se ligar à parte polar ou apolar do cristal líquido⁵⁴.

As mesofases lamelares (Figura 1B) são estruturas formadas por camadas paralelas de tensoativo, com camadas de solvente interpostas. As cadeias hidrofóbicas do tensoativo ficam no centro da lamela, e a parte hidrofílica fica em contato com a camada de solvente. Esta mesofase apresenta anisotropia com formação de estruturas em forma de cruz de malta e é bastante fluida^{55,56}.

A mesofase hexagonal consiste em micelas empacotadas, e é formada pela união de cilindros longos com redes bi ou tridimensionais, as quais são separadas por uma região contínua de água. Essa mesofase pode ser classificada como direta ou reversa. Na mesofase hexagonal reversa as cabeças polares do tensoativo circundam os canais aquosos e a porção apolar fica localizada ao redor dos cilindros (Figura 1C). Já na mesofase hexagonal direta as cabeças polares do tensoativo ficam localizadas na região externa dos cilindros (Figura 1D). Em anisotropia, ambas as mesofases hexagonais se caracterizam pela presença de estrias^{57,56}.

A mesofase cúbica (Figura 1E) é formada por uma fase contínua polar ou por uma fase contínua apolar, em arranjo cúbico. Quando observada em microscópio de luz polarizada, diferente das mesofases lamelar e hexagonal, não apresenta birrefringência, sendo caracterizada pela formação de um “campo escuro” e apresenta alta viscosidade^{58,56}.

Figura 1 - Ilustração da estruturação dos sistemas cristais líquidos



Anfifílicos livres (A) e das principais fases de cristais líquidos liotrópicos: (B) Lamelares, (C) Hexagonais Reversas, (D) Hexagonais diretas (E) Cúbica.

Fonte: Adaptado de Calixto⁵⁶.

O contato com fluidos biológicos pode favorecer o aumento da adesão do sistema cristal líquido ao local de aplicação dependendo do tensoativo, aumentando o tempo de permanência no local alvo, característica de extrema importância para sistemas desenvolvidos para a cavidade bucal⁵⁹⁻⁶⁵. A bioadesão é o termo atribuído ao mecanismo em que dois materiais, um deles de origem biológica, permanecem ligados por forças interfaciais²⁵. Na cavidade bucal, essas interações sofrem constantes desafios de difícil reprodução *in vitro*, sendo estes associados à fala, deglutição, mastigação, excesso de água no local e a frequente produção de saliva.

Além disso, deve-se levar em consideração que propriedades iniciais das formulações podem se modificar quando submetidas a uma força externa, aumentando ou diminuindo o seu nível de fluidez. Esse comportamento pode ser avaliado por meio da análise do seu escoamento e a deformação quando elas são submetidas a uma tensão de cisalhamento^{25,23,66}. As formulações também podem se

tornar mais elásticas ou viscosas quando aumentado o seu teor aquoso, o que pode interferir na adesão ao substrato alvo^{23,63,67}. Essas características podem auxiliar na seleção de vias de aplicação para os sistemas na cavidade bucal, inclusive proporcionando o alcance a regiões de difícil acesso, facilitando sua ação terapêutica^{68,69}.

Em relação a composição, os sistemas cristais líquidos são elaborados por substâncias que podem afetar diretamente as suas características quando usadas em associação. A combinação de álcool cetílico alcoxilado (Procetyl AWS) com diferentes fases oleosas, como o ácido oleico, causam mudanças expressivas na organização estrutural dos sistemas que resultam na formação de sistemas líquidos isotrópicos, além de fases lamelares e hexagonais⁶⁴. Já o Poloxamer 407 pode otimizar as propriedades adesivas e possui propriedades de solubilização para fármacos mais ou menos lipofílicos⁷⁰.

A adição de saliva a um sistema composto por Procetyl AWS, ácido oleico e diversas dispersões de polímeros como fase aquosa (carbopol 0,5%, dispersão de policarbofil 0,5%, dispersão de hidroxietilcelulose 0,5% e dispersão de quitosana 0,5%) resulta no aumento do seu potencial de adesão ao local de aplicação⁶⁶. De forma semelhante, a mistura de Procetyl AWS, ácido oleico e dispersão de Poloxamer 407 (1%) apresenta a capacidade de formar microemulsões e sistemas de fase líquido cristalino com formação de estruturas mais organizadas a partir do aumento da sua porção aquosa⁶².

Avaliando a associação da substância própolis a formulações cristais líquidos, Alcantara et al.⁷¹ (2018) identificaram uma taxa de liberação de 36% no período de 120 h. Outro achado interessante foi obtido por Mei et al.⁷² (2018), que avaliando a formulação de um gel-isotrópico cristalino obtiveram taxa de liberação da substância ativa de 38,6% nas primeiras 24 h, enquanto na ausência do gel a liberação foi de 91,2%. Por outro lado, Marques²⁷ (2020) incorporando o óleo essencial de *C. citratus* a um sistema mucoadesivo precursor de cristal líquido contendo quitosana na sua composição, obteve uma taxa de liberação de apenas 10,73% nas primeiras 24 h. Contudo, todos esses estudos realizaram a avaliação por um período muito curto de tempo. Então, a avaliação da liberação de substâncias ativas incorporadas a sistemas cristal líquido em períodos mais extensos pode permitir uma melhor avaliação da capacidade de liberação dos sistemas. Bruschi et al.⁷³ (2008), usando uma formulação

com micropartículas de própolis incorporadas a um sistema cristal líquido, observaram uma taxa de liberação em torno de 15% em 24 horas, e de cerca de 75% em 7 dias.

Baixas taxas de liberação, assim como, o aumento do tempo necessário para se atingir uma concentração mínima para inibição dos micro-organismos (CIM), podem estar associados a uma redução do potencial de ação antimicrobiana das substâncias ativas^{27,59}. Em períodos maiores do que 48 h, as bactérias passam a se aderir umas às outras originando uma rede densa de células, e adquirem uma maior resistência a substâncias antimicrobianas⁷⁴. Portanto, a obtenção de valores de concentração equivalente a CIM nas primeiras horas é uma característica importante para uma substância usada com a finalidade antibacteriana, já que neste período, ela vai atuar sobre biofilmes prematuros, e, portanto, nesta situação as bactérias são menos resistentes.

Visando estabelecer um protocolo de aplicação do citral, Oliveira et al.⁴⁷ (2017) identificaram que o tratamento de biofilmes de *S. mutans* por um minuto reduziu significativamente o número de células viáveis de forma semelhante ao controle positivo (digluconato de clorexidina). Assim, os autores sugeriram pesquisas futuras com aumento do tempo de contato da substância ativa com os micro-organismos ou a sua incorporação a sistemas de liberação modificada, com a finalidade de melhorar a sua ação antimicrobiana.

A incorporação de fármacos a um sistema de liberação modificada não só favorece o aumento do tempo de contato do fármaco com os micro-organismos, como também permite diminuir a frequência de aplicação, favorecendo a adesão ao tratamento. Entretanto, Calixto⁶⁶ (2013) avaliando um sistema cristal líquido associado ao peptídeo p1025, num protocolo de aplicação de apenas 1 minuto, 2 vezes ao dia, não obteve uma redução significativa da viabilidade bacteriana em biofilmes de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita. Com base nesses resultados, foi sugerido um aumento do tempo de contato da formulação com o local de ação. Marques²⁷ (2020) testou in vitro, por um período de 4 dias, um protocolo de exposição dos biofilmes às formulações durante 5 min, em dias alternados. Foi identificado que para a formulação contendo a associação do digluconato clorexidina com o óleo essencial de *C. citratus*, ocorreu uma redução significativa da concentração de bactérias acidúricas e de estreptococos do grupo mutans, de forma similar àquela determinada pelo digluconato de clorexidina livre aplicada por um minuto, uma vez ao dia (grupo controle) e uma

redução da concentração de bactérias totais estatisticamente superior àquela determinada pelo digluconato clorexidina.

Além da inibição do crescimento dos biofilmes, outras características devem ser analisadas visando o controle da instalação e da evolução da doença cárie. O pH ácido do meio contribui como um dos principais fatores de virulência. Ácidos produzidos por bactérias acidogênicas, em especial o ácido láctico, difundem no esmalte e dissolvem seu conteúdo mineral. Assim, o pH abaixo de 5,5 (pH crítico do esmalte) promove uma dissolução da hidroxiapatita, promovendo a instalação da lesão de cárie².

Até onde é do conhecimento dos autores da presente pesquisa, ainda não existem estudos avaliando a associação do citral a um sistema de liberação modificada, com o objetivo de verificar a sua capacidade em interferir na formação do biofilme e o seu efeito na perda mineral do esmalte dentário submetido a desafio cariogênico. Assim, diante da literatura existente a respeito das propriedades antimicrobianas de compostos naturais, e da comprovada potencialização da ação dos fármacos quando incorporados a sistemas cristais líquidos, a utilização do citral associado a um sistema cristal líquido pode ser uma alternativa viável para o controle de biofilmes orais e, conseqüentemente, na prevenção de doenças, entre elas, a cárie dentária.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Processo: CAAE 41924721.8.0000.5416) (Anexo A), e cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional associado – SisGen (Número do cadastro: A9051AD) (Anexo B).

4.1 Obtenção dos Materiais para Preparo do Sistema

O Poloxamer 407 foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil), o ácido oleico PA., da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil), e o álcool cetílico alcoxlado (Procetyl AWS), da Croda (Campinas, São Paulo, Brasil).

O citral 95% (3,7-Dimethyl-2,6-octadienal, geranial and neral mixture), foi adquirido na empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil), em quantidade suficiente para que o mesmo lote (STBJ0146) fosse utilizado em todas as análises.

4.2 Coleta de Saliva para o Desenvolvimento do Biofilme Polimicrobiano

Para avaliar a capacidade do sistema contendo o citral em interferir na formação do biofilme cariogênico foi utilizado um inóculo polimicrobiano obtido a partir da saliva estimulada de um doador, com o objetivo de mimetizar o biofilme formado in vivo⁷⁵.

Como critérios de não inclusão foram considerados: uso de prótese bucal ou aparelho ortodôntico, doença periodontal (presença de sangramento gengival ou profundidade de sondagem igual ou maior de 4 mm⁷⁶ gestante, fumante, apresentar doenças sistêmicas, estar em terapia medicamentosa com fármacos que causam redução do fluxo salivar, como opioides, anti-histamínicos, antidepressivos, antiepiléticos, ansiolíticos e anticolinérgicos⁷⁷.

Os critérios de inclusão para o doador de saliva foram: possuir entre 25 e 30 anos de idade, ter bom estado de saúde geral e bucal, não ter feito uso de antibióticos, antifúngicos e enxaguatórios bucais nos últimos seis meses⁷⁸, e apresentar fluxo

salivar estimulado maior ou igual a 0,7 mL/min. Além disso, de acordo com estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, a saliva para o experimento deveria apresentar valores médios de concentração de bactérias contidos nos seguintes intervalos de confiança, em Log (1+UFC/mL): bactérias totais (6,56-8,67), estreptococos do grupo mutans (4,05-6,65) e bactérias acidúricas (5,14-8,14)²⁷.

Após leitura e esclarecimento das dúvidas sobre a sua participação na pesquisa, o doador de saliva selecionado assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). A coleta da saliva foi realizada entre as 9 h e 10 h da manhã⁷⁹ com o indivíduo em jejum por no mínimo 2 h, sem escovar os dentes por 24 h, e sem ter ingerido bebidas alcoólicas por um período mínimo de 24 h antes da coleta. A saliva foi estimulada por meio da mastigação de parafina plástica sem sabor (Parafilm "M", American National Can, Chicago, EUA), e a coleta foi realizada por um tempo de 5 minutos, em tubos Falcon esterilizados, mantidos em isopor com gelo. O fluxo salivar foi calculado em mL/min, a saliva foi filtrada com o auxílio de uma gaze estéril, para remoção de resíduos, e o seu pH foi determinado com auxílio de pHmetro (Quimis, Diadema, SP, Brasil), previamente calibrado.

4.2.1 Análise da concentração de micro-organismos na saliva

Uma alíquota de 200 µL de saliva foi usada para determinar a concentração de bactérias totais em ágar Wilkins-Chalgren⁸⁰, de estreptococos do grupo mutans em ágar Mitis Salivarius suplementado com 15% de sacarose e 0,2 UI/mL de bacitracina (MSBS)⁸¹, e de bactérias acidúricas em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) pH 4,7⁸². As placas contendo ágar Wilkins-Chalgren e ágar Mitis Salivarius foram incubadas em 5% de CO₂, a 37 °C por 48 h, enquanto as placas de BHI pH 4,7 foram incubadas nas mesmas condições, por 96 h. Para identificação das colônias de *S. mutans*, foram consideradas colônias escuras, de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, convexas, com aspecto rugoso. Colônias atípicas foram analisadas pelo método de Gram, devendo apresentar características morfotintoriais de cocos Gram positivos dispostos em cadeias.

A análise foi feita em triplicata para cada grupo microbiano. A contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi realizada com o auxílio de contador de colônias (Phoenix Lufarco CP 600 Plus, Araraquara, SP, Brasil) e os resultados foram expressos em Log (1 + UFC/mL).

A composição microbiológica da saliva foi avaliada sempre que foi realizada uma nova coleta.

4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Citral

Para esta avaliação foi utilizada a técnica de microdiluição baseada no *Clinical and Laboratory Standards Institute*, (CLSI)^{83,17} com substituição do meio de cultura tradicional (caldo Mueller-Hinton) por caldo McBain. Em placas de 96 poços, o citral foi diluído em Tween 80 (Synth, Diadema, SP, Brasil) e caldo McBain na proporção 1:1:8 (v/v/v). A partir de então, diluições seriadas de razão dois foram obtidas de modo a serem testadas concentrações entre 0,1 µL/mL e 100 µL/mL (v/v) do citral. Foram adicionados em cada poço 20 µL de saliva do doador e as placas foram incubadas a 37 °C em 5% de CO₂ por 24 h. Em seguida, o conteúdo dos poços foi submetido a uma subcultura em ágar Wilkins-Chalgren por 48 h a 37 °C em 5% de CO₂ para avaliação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e da CBM (Concentração bactericida mínima). A CIM foi avaliada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento e a CBM como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento de micro-organismos. Como controle negativo, foi utilizado água destilada, Tween 80, e caldo McBain na mesma proporção (1:1:8) e como referência foi utilizado o digluconato de clorexidina 0,12% (1,2 µL/mL) (CLX) diluído no meio de cultura, nas concentrações entre 0,0006 µL/mL e 0,6 µL/mL (v/v). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Preparo do Sistema Bioadesivo com a Incorporação do Citral

O sistema com a incorporação do citral foi adaptado segundo o trabalho desenvolvido por Bernegossi et al.⁶² (2015), e preparado em colaboração com o Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

Em condições assépticas, em temperatura de 25 ± 2 °C, foram misturados, nas seguintes proporções em massa: 30% de ácido oleico (fase oleosa), 50% de álcool cetílico alcoxilado (tensoativo) e 20% de dispersão aquosa de poloxamer 407 a 1% (fase aquosa). O citral (C) foi incorporado à fase oleosa do sistema em concentrações

10 vezes (FC1) e 15 vezes (FC2) a sua CIM. Em sequência foi realizada a homogeneização da formulação com o agitador magnético sem aquecimento Fisatom 752A (RBR – Ribeirão Preto – São Paulo) entre 300 a 600 rpm, durante 24 horas.

Todos os materiais utilizados para o preparo do sistema, desde que fossem passíveis de esterilização foram autoclavados.

4.5 Caracterização Físico-Química dos Sistemas

Para a caracterização dos sistemas (FC1 e FC2), foram realizados testes de microscopia de luz polarizada, análises reológicas, avaliação *in vitro* da força adesiva e análise do perfil de liberação. Para as três primeiras análises os sistemas também foram avaliados com a incorporação de 5% e 50% da saliva do doador (FC1+ 5%; FC1 + 50%; FC2+ 5%; FC2 + 50%), com o intuito de avaliar o comportamento das formulações quando aplicadas em ambientes com elevada taxa de umidade, como a cavidade bucal.

4.5.1 Microscopia de luz polarizada

Alíquotas do sistema com a incorporação do citral, foram colocadas em lâminas de vidro, recobertas com uma lamínula e analisadas em Microscópio de Luz Polarizada (Olympus BX41, Olympus, Japão). Imagens foram obtidas com aumento de 40 vezes.

Por esta análise, os sistemas foram classificados em sistemas cristalinos líquidos lamelares ou hexagonais, quando ocorreu o desvio da luz (anisotropia), formando diferentes estruturas denominadas cruces de malta ou estrias, respectivamente. Quando não ocorreu o desvio de luz (isotropia), foi observado aspecto de “campo escuro”, caracterizando a formação de uma microemulsão (ME) ou sistema cristalino líquido de fase cúbica⁵⁶.

4.5.2 Análises reológicas

As propriedades reológicas do sistema foram avaliadas pelas análises de fluxo contínuo e de fluxo oscilatório, realizadas com o auxílio do Reômetro AR 2000ex (TA Instruments, New Castle, Delaware, EUA).

Para a análise reológica de fluxo contínuo, em um dispositivo cone-placa de 40 mm a uma temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, uma amostra de 2 g do sistema foi depositada na placa inferior do aparelho, onde permaneceu em repouso por 5 minutos antes de cada determinação. A taxa de cisalhamento utilizada foi de 0 a 100 s^{-1} para a curva ascendente e de 100 a 0 s^{-1} para a curva descendente, durante 120 segundos cada. As análises foram realizadas em triplicata para cada formulação. Os resultados foram expressos em um gráfico que correlaciona a tensão de cisalhamento (Pa) com a taxa de cisalhamento (1/s). Esse gráfico é formado por duas curvas distintas, uma ascendente que demonstra o comportamento de fluxo do material quando a taxa de cisalhamento aumenta, e uma descendente que indica o comportamento desse material quando a taxa de cisalhamento é gradativamente removida⁸⁴.

A partir dos reogramas obtidos, foi utilizada a Equação I para caracterizar o comportamento e viscosidade do material⁶⁶:

$$\text{(Equação I): } \tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

Sendo:

τ = taxa de cisalhamento,

K = índice de consistência,

$\dot{\gamma}$ = tensão de cisalhamento,

n = comportamento de fluxo.

Neste modelo, $n < 1$ representa um fluido não Newtoniano pseudoplástico, $n > 1$ representa um fluido não Newtoniano dilatante e $n = 1$ representa um fluido Newtoniano⁶¹. Já a viscosidade dinâmica das formulações pode ser avaliada com o índice de consistência (K) que aumenta com a viscosidade da formulação.

Para a análise reológica oscilatória, primeiramente foi realizado um teste de varredura de tensão, com o reômetro no modo *amplitude sweep*, usando uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 rad/s, para determinação da região viscoelástica linear, onde a tensão é diretamente proporcional à deformação e o módulo de armazenamento é constante. Em seguida, o reômetro foi colocado no modo *frequency sweep* para realização do teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico ou de armazenagem (G') e módulo viscoso ou módulo de perda (G''), no qual a tensão se dissipa na forma de deformação irreversível. Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz (1Hz =

6,28 rad/s), a uma tensão constante de 1 Pa⁶⁶. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Altos valores para o módulo de armazenagem refletem em uma amostra predominantemente elástica e altamente estruturada ($G' > G''$), enquanto, altos valores para o módulo de perda indicam que a amostra é predominantemente viscosa ($G' < G''$)^{23,56}. A fim de se estabelecer uma análise mais específica do comportamento das formulações foi determinado o valor de “r” a partir da regressão linear dos dados obtidos. Além disso, foi calculado o expoente viscoelástico (n) através da equação da lei da potência (Equação II), que indica o nível de estruturação dos sistemas^{61,66}:

(Equação II): $G' = S \cdot \omega^n$

Sendo:

G' = módulo de armazenamento;

ω = frequência oscilatória;

S = resistência do gel;

n = expoente viscoelástico.

Os parâmetros S e n são indicativos da densidade de reticulação no interior do sistema, quanto mais alto for o valor de S, mais reticulada e forte é a estrutura da formulação. No entanto, o valor de n diminui com o aumento da densidade de reticulação. Assim, valores de n altos indicam formulações com estruturas mais fracas, características de microemulsões⁶¹.

4.5.3 Avaliação in vitro da força adesiva

Para essa avaliação foram confeccionados discos de mucina de diâmetro similar ao diâmetro da sonda analítica no analisador de textura (10 mm) e espessura igual a 2 mm⁸⁵. Estes foram acoplados à parte inferior da sonda analítica do analisador de textura TA-XT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra). As amostras do sistema a ser analisado (n=7) foram mantidas em pequenos recipientes de plástico sob a sonda à 37 °C. O teste foi iniciado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mm/s) até que o disco de mucina entrasse em contato com o sistema. O disco e o sistema foram mantidos em contato durante 60 segundos sem aplicação de força. Em seguida, a sonda se afastou em velocidade constante (0,5 mm/s) até ocorrer o destacamento entre o disco de mucina e o sistema. A força máxima necessária para

o destacamento foi medida em mili Newtons (mN). Para comparação, esse teste foi realizado também, usando amostras de verniz fluoretado Duraphat (D) (Colgate-Palmolive Industrial Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil).

4.5.4 Análise do perfil de liberação in vitro do citral

O equipamento Microette Hanson (Teledyne Hanson, Californica, EUA) constituído por células de difusão de Franz foi utilizado para o estudo da liberação do citral incorporado nas formulações. Com a utilização de uma membrana sintética Polietersulfona PES) com poro de 0,47 μ m (Perfecta, São Paulo, Brasil) hidratada por 20 minutos na solução receptora (saliva artificial: HEPES 11,9g/L, cloreto de cálcio monohidratado 3,67g/L, azida sódica 0,195g/L e cloreto de zinco 0,027 g/L), pH 7,4 a 37 °C e sob agitação de 300 rpm, as amostras (2g) foram colocadas sob o anel dosador disposto no compartimento doador da célula de difusão de Franz. Em tempos pré-determinados (1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 10 h, 14 h, 16 h e 24 h) foram coletadas alíquotas de 1,5 mL da solução receptora. O citral liberado das amostras foi quantificado em espectrofotômetro UV com comprimento de onda de 240 nm⁸⁶. A concentração de citral na solução receptora utilizada na célula de Franz foi calculada com base na curva padrão realizada para esta substância em álcool etílico absoluto (99,8%) e PBS (Apêndice B). Em seguida, esta foi transformada em porcentagem de liberação, considerando a quantidade incorporada na formulação como 100%. A difusão transmembrana do citral livre foi usada para comparação.

4.6 Avaliação da Capacidade de Interferência do Sistema Bioadesivo Contendo Citral na Formação do Biofilme Polimicrobiano e na Desmineralização do Esmalte de Dentes Bovinos

A metodologia para avaliação da capacidade de interferência do sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral na formação do biofilme polimicrobiano e na desmineralização do esmalte dentário será apresentada nos itens subsequentes.

4.6.1 Definição dos grupos experimentais

Para esta parte do estudo foi usada apenas a formulação com a concentração de citral 15x a CIM (FC2) que apresentou os melhores resultados nas análises de caracterização do sistema e de liberação do citral.

Os grupos utilizados nesta avaliação estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Descrição dos grupos avaliados no estudo da ação do sistema bioadesivo sobre biofilmes polimicrobianos e pH

GRUPO	DESCRIÇÃO	pH
CN	Controle negativo, tratamento da superfície de esmalte com meio de cultura Mcbain, diariamente, por 1 minuto.	7,0
T	Tratamento com a substância veículo Tween 80, diariamente, por 1 minuto.	7,0
CLX	Controle Positivo 1: tratamento com a substância de referência, digluconato de clorexidina 0,12% (1,2 µL/mL), diariamente, por 1 minuto.	7,2
CLX 1.3	Controle Positivo 2: tratamento com a substância de referência, digluconato de clorexidina 0,12% (1,2 µL/mL), nos dias 1 e 3 do experimento, por 1 minuto.	7,2
C	Tratamento com o citral na concentração equivalente a 15 vezes a CIM, diariamente, por 1 minuto.	7,4
F	Tratamento com formulação do sistema bioadesivo sem citral, nos dias 1 e 3 do experimento, por 5 minutos.	5,2
FC2	Tratamento com formulação do sistema bioadesivo contendo citral na concentração de 15 x a CIM, nos dias 1 e 3 do experimento, por 5 minutos.	5,1

Fonte: Elaboração própria.

4.6.2 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo amostral foi feito com auxílio do Programa G*Power versão 3.1.9.4⁸⁷ baseado nos dados de Marques (2020)²⁷ e de Santos et al.⁸⁸ (2019), para seguintes desfechos principais: (1) concentração de micro-organismos, e (2) porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) do esmalte, respectivamente.

A análise foi planejada considerando um delineamento experimental de variáveis independentes, com um poder de 90%, erro tipo 1 de 5% (*2-sided test*). Para a concentração de micro-organismos foram necessários 12 blocos de esmalte por grupo para detectar uma diferença de 0,55 log entre os grupos, considerando um

desvio padrão de 0,41, enquanto, para % SH foram necessários 11 blocos de esmalte por grupo para detectar uma diferença de 8,4% SH entre os grupos, considerando um desvio padrão de 5,9%. Foi feito um ajuste de 10%, para o caso de perdas ou necessidade de uso de testes não paramétricos. Assim, foram tratados 14 blocos de esmalte por grupo. O experimento foi realizado em 4 ocasiões diferentes para permitir visualizar a reprodutibilidade, sendo duas ocasiões com 4 blocos e duas ocasiões com 3 blocos por grupo.

4.6.3 Preparo e seleção dos blocos de esmalte bovino

Foram utilizados incisivos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos, os quais foram mantidos em formol a 2%, pH 7,0 durante 30 dias. Após profilaxia com pasta profilática, os dentes foram analisados por meio de um estereomicroscópio, e aqueles que apresentaram rachaduras, hipoplasias e manchamentos foram excluídos da amostra. As coroas dentárias foram separadas das raízes e blocos de esmalte medindo 4 mm x 4 mm foram preparados a partir da porção mais plana da superfície vestibular das coroas, utilizando cortadeira elétrica (Buehler, Lake Bluff, EUA and Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Todos os blocos foram submetidos à regularização da superfície dentinária por meio de movimentos giratórios manuais sobre lixas de óxido de alumínio de granulação 400 e 600 (Extec, Enfield, CT, EUA), para obtenção de paralelismo com o esmalte. Em seguida, o esmalte foi polido com discos de papel de carboneto de silício (granulação 600, 800 e 1200, Extec, Enfield, CT, EUA) usando máquina de polimento automática (Vector-Phoenix Beta, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), operada com 4 lbs, 200 rpm e refrigeração a água. O polimento final do esmalte foi realizado com disco de feltro umedecido com solução aquosa diamantada (0,25 μm , Extec, Enfield, CT, EUA). Ao final do uso de cada lixa, os blocos foram limpos em água deionizada utilizando ultrassom (Unique USC 1400, Indaiatuba, SP, Brazil), operado a 40 Hz e 135 W durante 20 minutos a temperatura ambiente⁸⁹. Os blocos de esmalte foram conservados em ambiente úmido e foram submetidos ao teste de dureza de superfície inicial (SH1), utilizando microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 g e tempo de 10 s, acoplado ao software para na análise de imagem Buehler OmniMet (Buehler, Lake Bluff, EUA)⁹⁰. Foram realizadas cinco impressões na região central do bloco de esmalte, separadas entre si por uma distância de 100 μm .

Um total de 98 blocos, com SH1 entre 340-380 KHN foram distribuídos em grupos estatisticamente homogêneos, de acordo com a média de dureza e intervalo de confiança (95% IC) (Apêndice C).

4.6.4 Crescimento e tratamento dos biofilmes polimicrobianos

Para o crescimento do inóculo polimicrobiano, foi utilizado o meio de cultura idealizado por McBain⁸⁰ composto por mucina gástrica suína (2,5 g/L), peptona bacteriológica (2,0 g/L), triptona (2,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L), NaCl (0,35 g/L), KCl (0,2 g/L), CaCl₂ (0,2 g/L), cloridrato de cisteína (0,1 g/L), hemina (0,001 g/L) e vitamina K1 (0,0002 g/L), pH 7,0.

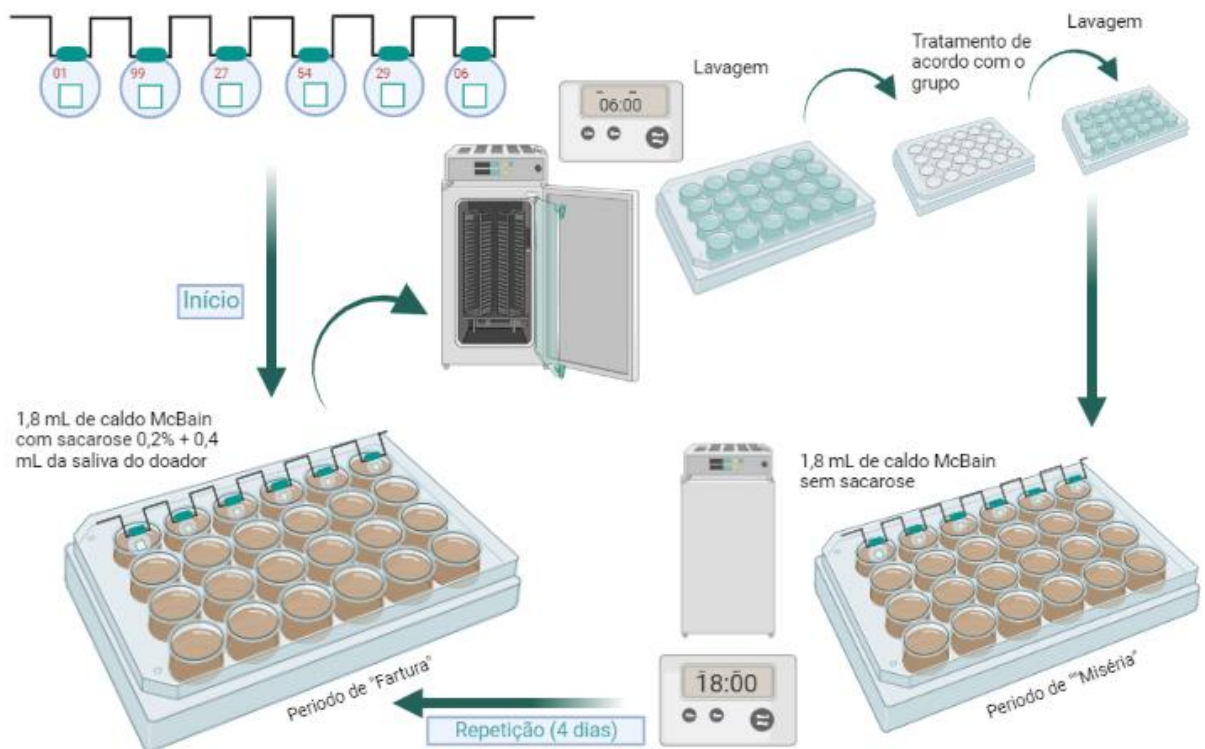
O experimento seguiu o modelo de fatura e miséria proposto por van de Sande et al.⁷⁸ (2011) e o modelo de aderência ativa descrita por Exterkate et al.⁹¹ (2010), com modificações de Albuquerque et al.⁹² (2018). A adoção desses modelos teve como objetivo mimetizar os desafios de aderência dos micro-organismos à superfície dentária e as condições de limitação de carboidratos fermentáveis a que biofilmes dentários estão sujeitos. Para os períodos de fatura, o meio McBain foi suplementado com 0,2% de sacarose, baseado em estudos piloto.

Os blocos de esmalte foram fixados em dispositivos confeccionados com fio ortodôntico que se adaptavam em placas de cultura de 24 poços⁹², e foram esterilizados em micro-ondas a 650 W, por 3 min⁹³. Para o crescimento dos biofilmes, a saliva do doador foi coletada na manhã do experimento, conforme descrito anteriormente (item 4.2). Em cada poço de placas de 24 poços foram colocados 1,8 mL de caldo McBain com sacarose 0,2% (período de “fatura”) e 0,4 mL de saliva. O dispositivo de fio ortodôntico com os blocos de esmalte foi adaptado nessas placas, de forma que os blocos ficassem imersos verticalmente no meio sem tocar as paredes e o fundo dos poços. As placas foram incubadas a 37 °C em 5% CO₂ durante 6 horas. Depois desse período, as placas foram retiradas da estufa, os blocos de esmalte foram imersos em 2 mL de solução salina 0,9% estéril, por 10 segundos para lavagem, e imersos em 2mL da substância de tratamento conforme os grupos descritos no item 4.6.1 deste projeto. Após os tratamentos, os blocos foram novamente lavados por imersão por 10 s em 2 mL de solução salina 0,9% estéril, transferidos para 1,8 mL de caldo McBain sem sacarose e as placas foram incubadas em estufa, nas mesmas condições realizadas anteriormente, por um período de 18 horas (período de

“miséria”). Nos grupos CN, T, CLX e C, os tratamentos foram realizados uma vez ao dia, ao término do período de fartura, por um período de quatro dias. Nos grupos CLX1.3, F e FC2 os tratamentos foram realizados em dias alternados (dias 1 e 3 do experimento), ao término do período de “fartura”, os blocos de esmalte foram lavados em 2 mL de solução salina 0,9% estéril por 10 segundos e transferidos para outra placa contendo meio de cultura sem sacarose onde permaneceram por 18 horas e foram novamente transferidos para placa com meio de cultura contendo sacarose 0,2%.

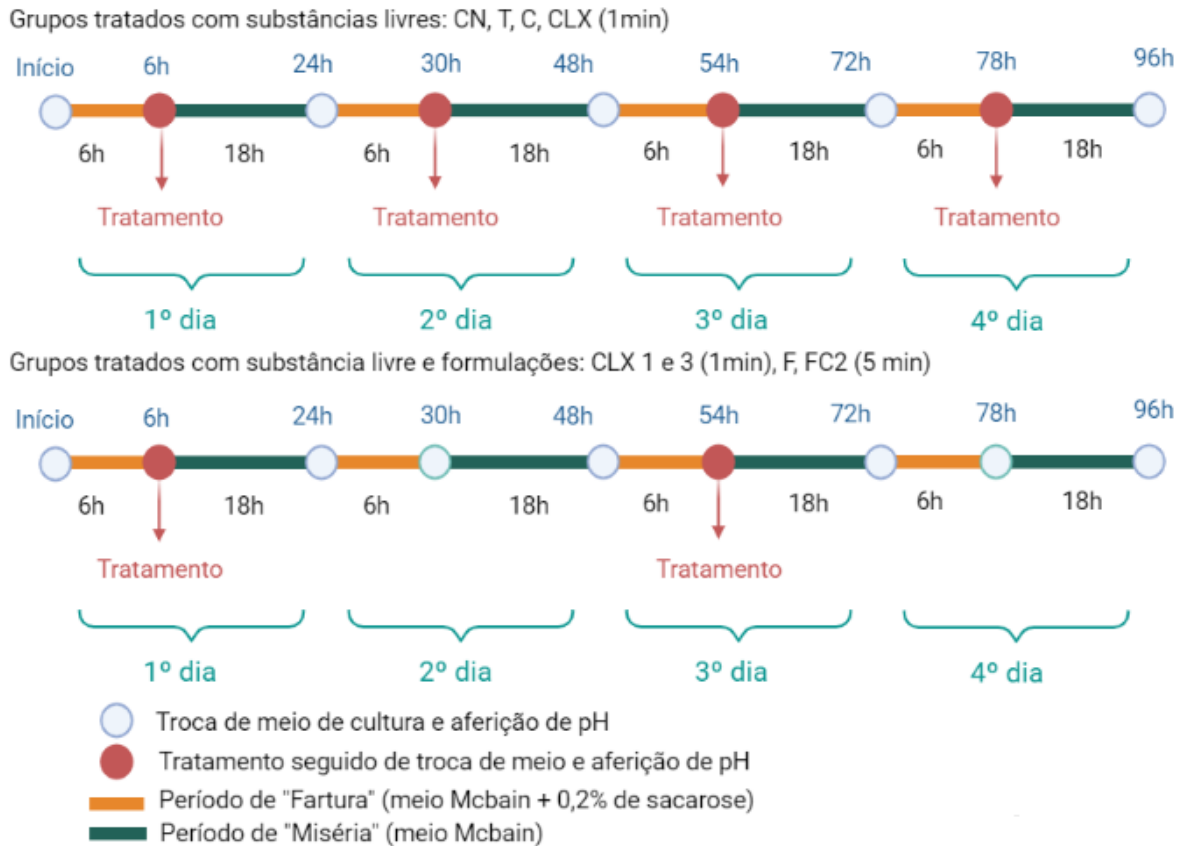
As figuras 2 e 3 mostram, respectivamente, os esquemas de crescimento dos biofilmes no modelo de aderência ativa sob as condições de “fartura” e “miséria”, e os diferentes regimes de tratamento empregados no estudo.

Figura 2- Esquema de crescimento dos biofilmes nos modelos de aderência ativa sob as condições de “fartura e miséria”



Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 – Esquema de crescimento dos biofilmes sob os diferentes regimes de tratamento empregados



Fonte: Elaboração própria.

Visando o controle de esterilidade, antes da realização dos tratamentos dos biofilmes, as substâncias foram expostas à luz ultravioleta (UV) por 20 minutos.

No final do quarto dia de crescimento dos biofilmes, para todos os grupos, as placas de 24 poços foram retiradas da estufa, os biofilmes formados sobre o esmalte foram removidos com o auxílio de lâmina de bisturi estéril e colocados individualmente em tubos de vidro contendo 2 mL de solução salina a 0,9% estéril. Em seguida, foram dispersos em cuba de ultrassom (Cristófoli, Campo Mourão Paraná, Brasil) por 10 s, em uma potência de 42 kHz e agitados em vórtex para obter uma suspensão com os micro-organismos do biofilme, que foi usada para a realização da análise da composição microbiológica dos biofilmes.

Sobre os blocos de esmalte foi realizada a análise da dureza de superfície final (SH2).

4.6.5 Análise da acidogenicidade no meio de cultura

Durante todo o experimento, após cada troca de meio, foi feita a leitura do pH no meio de cultura antigo. Para isso, foi utilizado um eletrodo específico acoplado a um analisador de íons (pHmetro Quimis, Diadema – SP, Brasil), devidamente calibrado com soluções padrão de pH 7,00 e 4,00. No final do experimento os dados referentes ao pH foram usados para fazer uma comparação entre os grupos de tratamento, quanto a acidogenicidade dos biofilmes formados.

4.6.6 Avaliação da composição microbiológica dos biofilmes

Para avaliação da composição microbiológica, alíquotas de 200 µL da suspensão com os micro-organismos dos biofilmes dispersos foram transferidas para microtubos estéreis e foi realizada a diluição seriada na razão 1/10 até 10⁻⁶. Alíquotas de 15 µL foram semeadas (em triplicata) em placas de ágar Wilkins-Chalgren, ágar Mitis Salivarius suplementado com 15% de sacarose e 0,2 UI/mL de bacitracina (MSBS) e BHI pH 4,7, para determinação da concentração de bactérias totais, estreptococos do grupo *mutans* e de bactérias acidúricas, respectivamente. As placas de ágar contendo as amostras foram incubadas por 48 horas para ágar Wilkins Chalgren e MSBS, e por 96 horas para ágar BHI pH 4,7, em 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, foi feita a contagem das colônias com o auxílio de um contador de colônias (Phoenix Luferto CP 600 Plus, Araraquara, SP, Brasil) e realizado o cálculo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

4.6.7 Análise da perda de dureza de superfície do esmalte

Após o período experimental, os blocos de esmalte bovino foram submetidos a um novo teste de dureza de superfície (SH2) de acordo com a metodologia descrita no item 4.6.3. A porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) foi calculada de acordo com a fórmula: $\%SH = 100 \times (SH2 - SH1) / SH1$.

4.7 Planejamento Estatístico e Análise dos Dados

O presente trabalho é um estudo experimental laboratorial, dividido em várias etapas. Os dados da análise da saliva do doador, dos testes de CIM e CBM do citral, e as análises de microscopia de luz polarizada e de reologia foram analisados descritivamente com auxílio do programa Microsoft Excel 2013 (Microsoft®).

Os demais dados do estudo foram analisados com o programa IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram verificados para seleção dos testes estatísticos mais indicados. O nível de significância adotado foi de 5%.

Para a avaliação da força adesiva, tivemos como variável dependente a força máxima de destacamento (em mN), e como variável independente o material, em nove níveis (FC1, FC1+5%, FC1+50%, FC2, FC2+5%, FC2+50%, D, D+5% e D+50%). Todos os grupos apresentaram distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk; $p \geq 0,054$), com exceção do grupo "FC1+50%" (Shapiro-Wilk; $p = 0,035$). Assim, optou-se pela aplicação do teste paramétrico ANOVA a um fator (material), por ser um teste mais robusto. Como não houve homogeneidade de variâncias entre os grupos (Levene; $p \leq 0,0001$), foi aplicada a correção de Welch, e a comparação dos grupos aos pares foi feita pelo pós-teste de Games-Howell.

A análise do perfil de liberação do citral pelas formulações, teve como variável dependente a quantidade de citral recuperado na solução receptora (em porcentagem), e como variáveis independentes: o material em três níveis (C, FC1 e FC2), e o tempo, que é uma variável de medidas repetidas, em oito níveis (1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 10 h, 14 h, 16 h, 24 h). Todos os grupos apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk; $p \geq 0,108$), e o pressuposto de esfericidade foi verificado (teste de Esfericidade de Mauchly, $p = 0,955$). Assim, foi aplicado o teste de ANOVA de medidas repetidas mista a dois fatores (material e tempo), seguido por pós-teste de Bonferroni.

Para a análise da viabilidade bacteriana no biofilme tivemos como variável dependente, a concentração bacteriana no biofilme (em $\text{Log } 1 + \text{UFC/mL}$), de bactérias totais, bactérias acidúricas e estreptococos do grupo *mutans* e como variáveis independentes: o tipo de tratamento, em sete níveis (CN, T, CLX, CLX1.3, C, F e FC2), e o tempo em oito níveis (6 h, 24 h, 30 h, 48 h, 54 h, 72 h, 78 h e 96 h). Três tipos de tratamento apresentaram distribuição não-normal dos dados para bactérias totais (Shapiro-Wilk: $p \leq 0,034$) e estreptococos do grupo *mutans* (Shapiro-Wilk: $p \leq 0,027$), e

dois tipos de tratamento apresentaram distribuição não-normal dos dados para bactérias acidúricas (Shapiro-Wilk: $p \leq 0,035$). Também não houve homogeneidade de variâncias para bactérias totais e bactérias acidúricas (Levene: $p \leq 0,001$). Portanto, para cada grupo microbiano, separadamente, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Dunn, com correção de Bonferroni.

A análise da acidogenicidade do meio de cultura, teve como variável dependente o pH do meio, e como variáveis independentes: o tipo de tratamento, em sete níveis (CN, T, CLX, CLX1.3, C, F e FC2), e o tempo em oito níveis (6 h, 24 h, 30 h, 48 h, 54 h, 72 h, 78 h e 96 h). Como a grande maioria dos grupos de dados apresentou distribuição normal (Shapiro-Wilk: $p \geq 0,051$), e o fator tempo é uma variável de medidas repetidas, foi aplicado o teste Anova de medidas repetidas mista a dois fatores (tipo de tratamento e tempo). Devido ao pressuposto de esfericidade para o fator tempo não ter sido verificado (teste de Esfericidade de Mauchly, $p < 0,001$), aplicou-se a correção de Greenhouse-Geisser. As comparações múltiplas foram feitas pelo pós-teste de Bonferroni.

Para a análise de perda de dureza de superfície do esmalte de dentes bovinos, tivemos como variável dependente, a perda de dureza (em porcentagem), e como variável independente, o tipo de tratamento, em sete níveis (CN, T, CLX, CLX1.3, C, F e FC2). Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram testados e confirmados (Shapiro-Wilk: $p \geq 0,087$, Levene: $p = 0,946$). Assim, foi aplicada a análise de variância a um fator (tipo de tratamento) e as comparações múltiplas foram realizadas utilizando o pós-teste de Tukey.

5 RESULTADO

Os resultados serão apresentados nos itens subsequentes.

5.1 Análise da Concentração de Micro-Organismos na Saliva

Atendendo aos critérios de inclusão do estudo, a saliva do doador selecionado apresentou os valores médios de concentração de bactérias em Log (1 + UFC/mL) contidos nos intervalos de confiança inicialmente determinados: bactérias totais (6,56-8,67), estreptococos do grupo *mutans* (4,05-6,65) e bactérias acidúricas (5,14- 8,14) (Tabela 1), fluxo salivar de 1,2 mL/min e pH de 7,2.

Tabela 1 - Concentração de bactérias totais, estreptococos do grupo *mutans* e bactérias acidúricas na saliva do doador

Micro-organismos	Concentração em Log(1+UFC/mL)	
	Média	DP
Bactérias Totais	7,93	0,03
Bactérias acidúricas	5,99	0,06
estreptococos do grupo mutans	5,85	0,06

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Citral

O citral e o digluconato de clorexidina (substância de referência) apresentaram atividade antimicrobiana contra o biofilme polimicrobiano produzido a partir da saliva do doador selecionado (Tabela 2).

Tabela 1 - Valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) do citral e do digluconato de clorexidina para inóculo polimicrobiano

Material	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
Citral	2,81	2,81
Digluconato de clorexidina 0,12%	0,15	0,15

Fonte: Elaboração própria.

A concentração de citral incorporada no sistema foi de 10 vezes a CIM para FC1 e 15 vezes a CIM para FC2. Já o digluconato de clorexidina, foi usado na concentração de uso clínico, 0,12%, que é correspondente ao valor de 15x a sua CIM.

5.3 Caracterização Físico-Química do Sistema

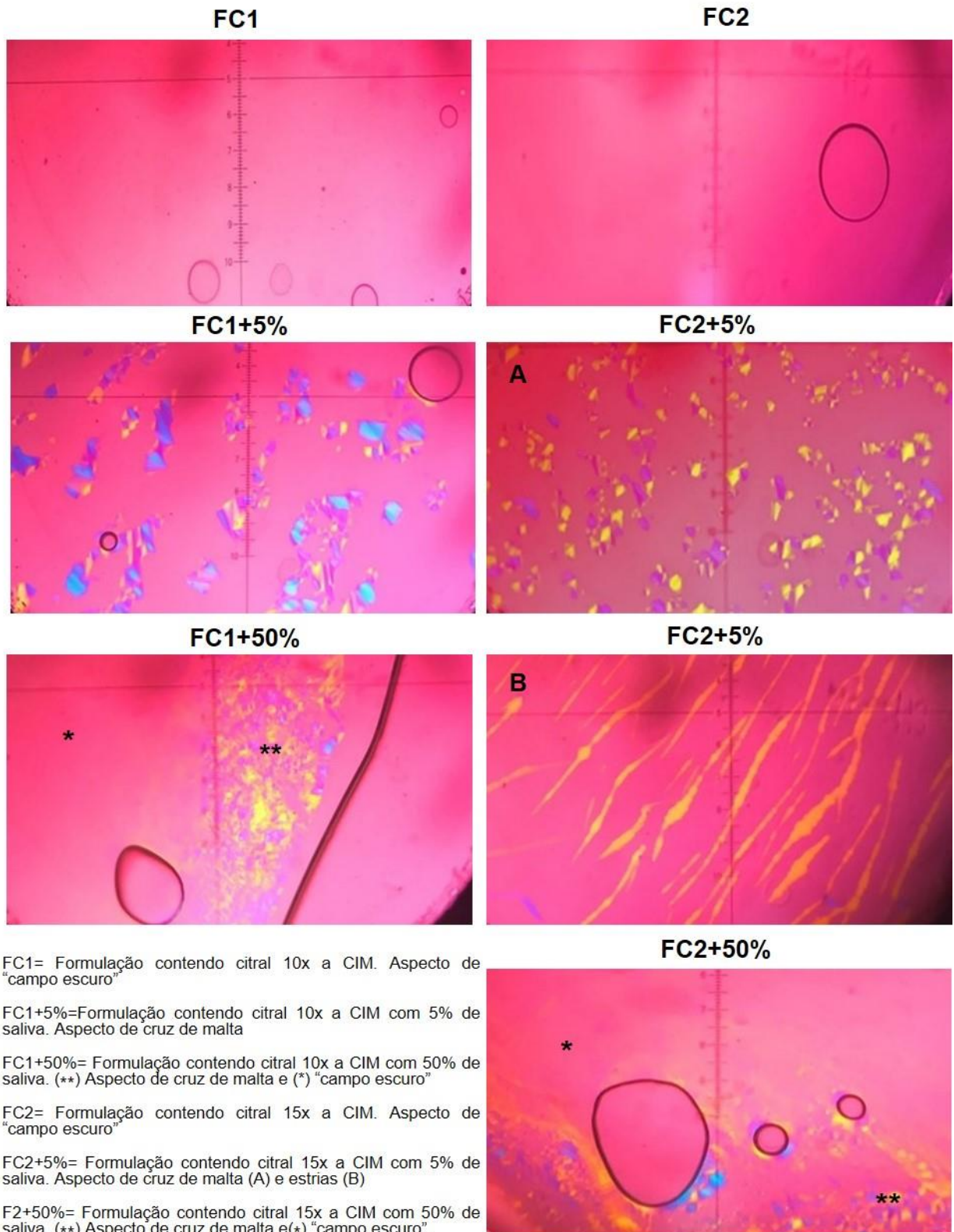
Para a caracterização dos sistemas (FC1, FC1+5%, FC2, FC2+5% e FC2+50%), foram realizados testes de microscopia de luz polarizada, análises reológicas, avaliação in vitro da força adesiva e análise do perfil de liberação.

5.3.1 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

As formulações FC1 e FC2 mostraram comportamento isotrópico com a identificação de “campo escuro”, possivelmente uma região de microemulsão. Contudo, para FC1 com a adição de 5% de saliva (FC1+5%) ocorreu o surgimento de estruturas semelhantes a cruces de malta, que são características da mesofase líquido cristalina lamelar. A formulação FC1+50% foi identificada como uma fase transicional de um sistema isotrópico para um sistema anisotrópico, entretanto com a identificação de “campo escuro” em sua maior porção (Figura 4).

Para FC2 ao se adicionar 5% de saliva (FC2+5%) a formulação foi considerada anisotrópica, pois houve o desvio de luz e ocorreu a formação de estruturas em forma de cruz de malta características de mesofase líquido cristalina lamelar e de estrias que correspondem a mesofase líquido cristalina hexagonal. Já com a adição de 50% de saliva (FC2+50%), ocorreram apenas algumas formações de cruces de malta, mas a sua maior porção se caracterizou por “campo escuro”. Foi identificado, assim, sistema em mesofase líquido cristalina possivelmente lamelar e cúbico caracterizando um processo de transição de fases (Figura 4).

Figura 4- Fotomicrografias das formulações do sistema cristal líquido contendo citral



Microscópio de luz polarizada, aumento de 10x.

Fonte: Elaboração própria

5.3.2 Análises reológicas

As análises reológicas foram divididas em análise reológica contínua e análise reológica oscilatória.

5.3.2.1 *Análise reológica contínua*

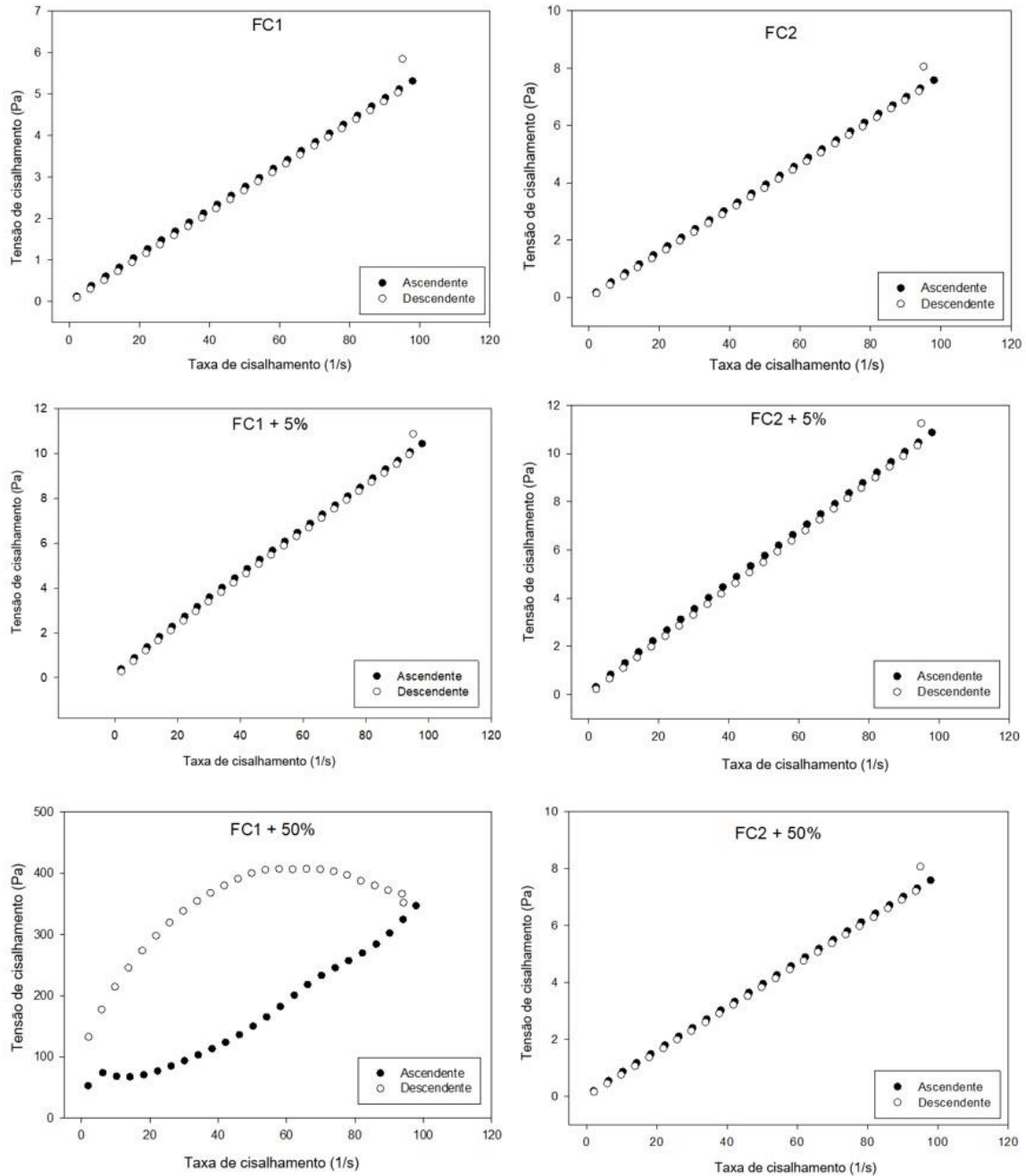
A Figura 5 mostra os reogramas obtidos na análise das formulações do sistema cristal líquido, e a Tabela 3 mostra os valores de comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K).

As formulações FC1, FC1+5%, FC2, FC2+5% e FC2+50% foram considerados fluídos não newtonianos, pseudoplásticos devido a relação não-linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, apesar da forte tendência a linearidade (Figura 5). e à diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento.

Já a formulação FC1+50% foi classificada como fluido não newtoniano dependente do tempo, reopético, devido a não linearidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento, e a um aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento.

Na Tabela 3 observa-se que os valores de comportamento de fluxo (η) das formulações FC1, FC1+5%, FC2, FC2+5% e FC2+50% foram menores que 1, confirmando que essas formulações apresentaram características de fluídos não - newtonianos, pseudoplásticos. Os valores de índice de consistência (K), são dependentes tanto da presença de saliva quanto da fase aquosa utilizada. Dessa forma, o aumento da concentração de saliva aumentou gradativamente a consistência das formulações.

Figura 5 - Reogramas das formulações do sistema cristal líquido contendo citral. Símbolos cheios representam a curva ascendente e símbolos vazios representam a curva descendente



FC1= Formulação contendo citral 10x a CIM; FC1+5%=Formulação contendo citral 10x a CIM com 5% de saliva; FC1+50%= Formulação contendo citral 10x a CIM com 50% de saliva; FC2= Formulação contendo citral 15x a CIM; FC2+5%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 5% de saliva; F2+50%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 50% de saliva.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 - Valores de Comportamento de fluxo (n) e Índice de consistência (K) das formulações

Formulação	K	η
FC1	0,061	0,972
FC1 +5%	0,161	0,908
FC1 +50%	3,000	1,020
FC2	0,086	0,978
FC2 +5%	0,140	0,948
FC2 +50%	3,800	0,980

FC1= Formulação contendo citral 10x a CIM; FC1+5%=Formulação contendo citral 10x a CIM com 5% de saliva; FC1+50%= Formulação contendo citral 10x a CIM com 50% de saliva; FC2= Formulação contendo citral 15x a CIM; FC2+5%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 5% de saliva; F2+50%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 50% de saliva.

Fonte: Elaboração própria.

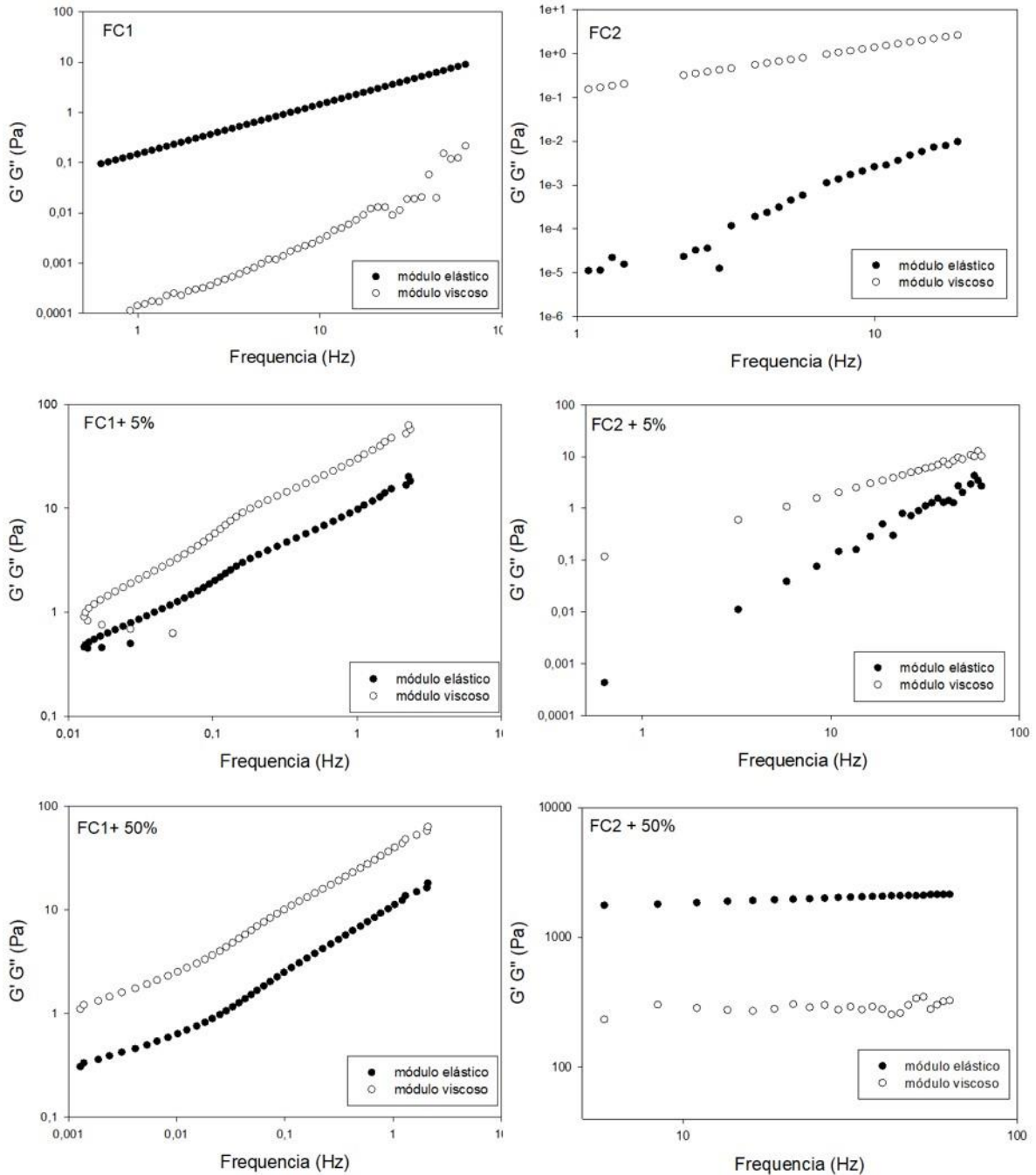
5.3.2.2 *Análise reológica oscilatória*

Pela análise reológica oscilatória observou-se que a formulação FC1 era mais elástica do que viscosa ($G' > G''$). No entanto, a adição de 5% e 50% de saliva tornou a formulação mais viscosa do que elástica ($G' < G''$). Independentemente da quantidade, com a adição de saliva, as formulações apresentaram o módulo de perda (G'') maior que o módulo de armazenagem (G'), demonstrando o caráter mais fluido dessas formulações, característica típica de sistemas pouco organizados (Figura 6).

As formulações FC2 e FC2+5% também se apresentaram mais viscosas do que elásticas ($G' < G''$), diferente da formulação FC2+50% que se comportou de maneira inversa sendo mais elástica do que viscosa ($G' > G''$) (Figura 6).

Na Tabela 4 os parâmetros S e n são indicativos da densidade de reticulação da estrutura, quanto mais alto o valor de S , mais reticulada e forte é a estrutura formada. Já o n diminui com o aumento da densidade de organização. Assim, valores de n altos indicam formulações com estruturas mais fracas.

Figura 6 - Variação do módulo de armazenamento ou elástico, G' (símbolos cheios) e módulo de perda ou viscoso, G'' (símbolos vazios), em função da frequência para as diferentes formulações



FC1= Formulação contendo citral 10x a CIM; FC1+5%=Formulação contendo citral 10x a CIM com 5% de saliva; FC1+50%= Formulação contendo citral 10x a CIM com 50% de saliva; FC2= Formulação contendo citral 15x a CIM; FC2+5%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 5% de saliva; F2+50%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 50% de saliva.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Valores de regressão linear (r), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n)

Formulação	r ²	s	n
FC1	1,0000	0,1453	0,9960
FC1 +5%	0,9976	10,098	10,841
FC1+50%	0,9999	10,841	0,6360
FC2	0,9977	1,8599	2,1330
FC2 +5%	0,9406	0,0030	1,6950
FC2 +50%	0,9790	1409,0	0,1058

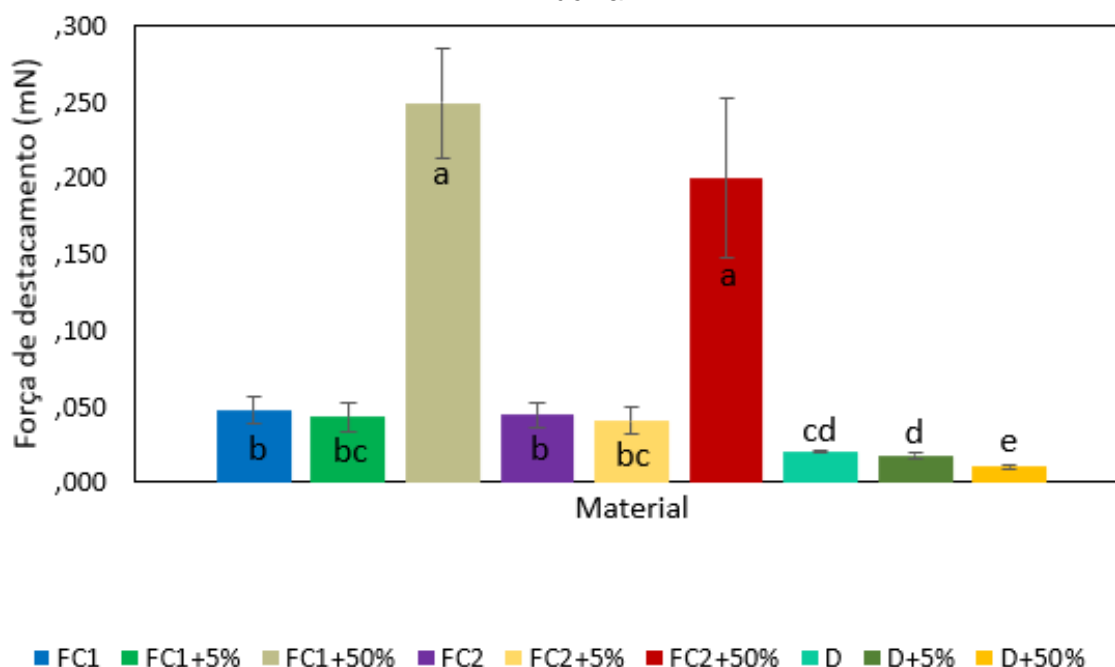
FC1= Formulação contendo citral 10x a CIM; FC1+5%=Formulação contendo citral 10x a CIM com 5% de saliva; FC1+50%= Formulação contendo citral 10x a CIM com 50% de saliva; FC2= Formulação contendo citral 15x a CIM; FC2+5%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 5% de saliva; F2+50%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 50% de saliva.

Fonte: Elaboração própria.

5.3.3 Avaliação in vitro da força adesiva

As médias e desvios padrão da força necessária para o destacamento das formulações dos discos de mucina estão expressos na Figura 7. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA com correção de Welch; $p \leq 0,0001$). Na comparação entre os grupos dois a dois, observou-se que o comportamento das formulações FC1 e FC2 foi semelhante (Games-Howell; $p = 0,997$), e, com a adição de 50% de saliva (FC1+50% e FC2+50%), ambas mostraram um aumento significativo da força adesiva em relação as formulações sem adição de saliva (FC1 e FC2) e com adição de apenas 5% de saliva (FC1+5% e FC2+5%) (Games-Howell; $p \leq 0,023$ e $p \leq 0,022$, respectivamente). Numa comparação com o verniz fluoretado Duraphat (D), as formulações apresentaram força adesiva significativamente maior (Games-Howell; $p \leq 0,023$), com exceção daquelas com adição de 5% de saliva que não apresentaram diferença significativa em relação ao Duraphat (Games-Howell; $p \geq 0,052$). Com a adição de 50% de saliva, o Duraphat teve sua força adesiva significativamente reduzida (Games-Howell; $p \leq 0,0001$).

Figura 7- Força máxima de destacamento (mN) das formulações estudadas dos discos de mucina



FC1= Formulação contendo citral 10x a CIM; FC1+5%=Formulação contendo citral 10x a CIM com 5% de saliva; FC1+50%= Formulação contendo citral 10x a CIM com 50% de saliva; FC2= Formulação contendo citral 15x a CIM; FC2+5%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 5% de saliva; F2+50%= Formulação contendo citral 15x a CIM com 50% de saliva. D= Duraphat; D+5= Duraphat com 5% de saliva; D+50%= Duraphat com 50% de saliva.

Colunas representam as médias e barras representam os desvios padrão.

Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (Games Howell, $p \geq 0,052$) e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Games Howell, $p \leq 0,022$).

Fonte: Elaboração própria.

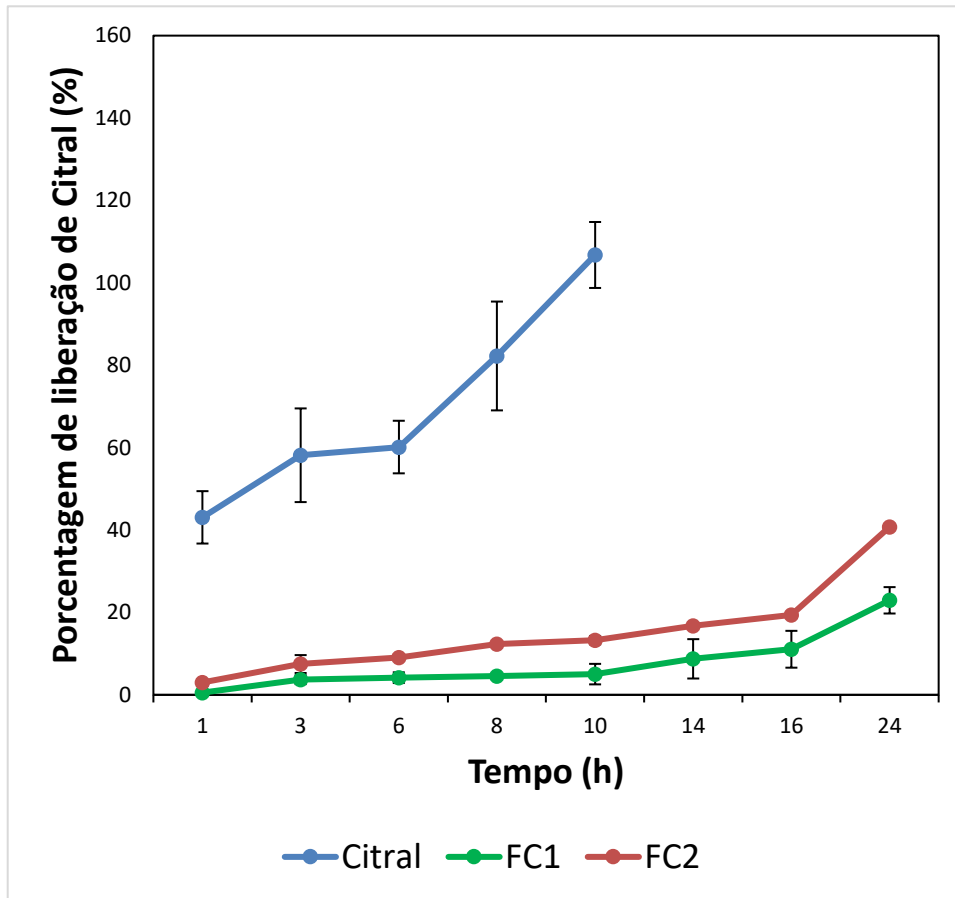
5.3.4 Análise de Perfil de Liberação In Vitro do Citral

Os perfis de liberação das formulações durante 24 horas estão apresentados na Figura 8. Pela análise estatística, pôde-se observar efeito do tempo, do tipo de substância e interação entre tempo e tipo de substância (Anova; $p \leq 0001$). Como houve interação entre as variáveis, foi analisado o pós-teste dessa interação para comparações de pares. O citral (C) não incorporado no sistema foi 100% recuperado na solução receptora nas primeiras 10 horas, o que foi estatisticamente superior (Bonferroni, $p \leq 0,006$) a porcentagem de citral liberado pelas formulações contendo citral 10x a CIM (FC1) e 15x a CIM (FC2), as quais liberaram, respectivamente, $5,3\% \pm 1,02\%$ e $13,27 \pm 2,49\%$, neste mesmo período, e foram significativamente

diferentes entre si (Bonferroni, $p \leq 0,036$). No período de 24 horas, FC2 liberou $40,76\% \pm 1,02\%$, enquanto FC1 liberou uma quantidade significativamente menor ($22,94\% \pm 0,41\%$) do citral incorporado (Bonferroni, $p \leq 0,025$). Esses resultados evidenciam que ambas as formulações se comportaram como sistemas de liberação controlada de fármacos, tendo a FC2 liberado uma concentração de citral proporcional a sua CIM num período entre 1 h e 3 h, enquanto a FC1 demorou entre 14 h e 16 h para que a liberação atingisse a CIM.

A fim de fornecer dados para melhor entendimento dos perfis de liberação dos fármacos, foi realizado o estudo matemático da cinética de liberação, investigando qual modelo de liberação (Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Weibull ou Primeira ordem) se adequava mais às formulações. Os dados ajustados para os modelos cinéticos selecionados estão listados na **Tabela 5**.

Figura 8- Perfil de liberação das formulações citral 10x a CIM (FC1), citral 15x a CIM (FC2) comparados a difusão transmembrana do citral não incorporado no sistema (média e desvio padrão)



C= citral não incorporado no sistema; FC1= Formulação contendo citral 10x a CIM; FC2= Formulação contendo citral 15x a CIM

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 5- Os parâmetros ajustados dos modelos cinéticos utilizados na liberação dos fármacos

R ²	Material		
	C	FC1	FC2
Weibull	0,0004	0,7415	0,6656
Peppas	0,8981	0,9805	0,9646
Higuchi	0,8888	0,7918	0,8432
Primeira ordem	0,9692	0,9921	0,9915

C=citral; FC1= Formulação contendo citral 10x a CIM; FC2= Formulação contendo citral 15x a CIM.

Fonte: Elaboração própria.

Com base nos maiores valores de R² ajustado, o modelo matemático que melhor se aplicou ao modelo de liberação foi o de Primeira ordem. Esse é o modelo cinético de liberação que descreve a absorção e eliminação de fármacos. Além disso, possui a constante de velocidade proporcional à concentração do fármaco liberado, ou seja, quanto maior a concentração, mais rápida é a liberação.

5.4 Avaliação da Capacidade de Interferência do Sistema Bioadesivo Contendo Citral na Formação do Biofilme Polimicrobiano e na Desmineralização do Esmalte de Dentes Bovinos

A avaliação da capacidade de interferência do sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral na formação do biofilme polimicrobiano e na desmineralização do esmalte dentário levou em consideração a viabilidade bacteriana, a acidogenicidade do meio de cultura e a perda de dureza superficial do esmalte.

5.4.1 Viabilidade bacteriana

A viabilidade bacteriana está representada na Tabela 6. Para a concentração de bactérias totais, bactérias acidúricas e estreptococos do grupo *mutans*, houve diferença entre os tipos de tratamento (Kruskal-Wallis, $p \leq 0,0001$). A comparação aos pares mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle negativo e Tween para as bactérias estudadas (Dunn, $p \geq 0,210$). Com

exceção do sistema sem citral (F), para bactérias totais (Dunn; $p=0,052$), todos os demais tratamentos tiveram uma ação estatisticamente significativa na redução da viabilidade bacteriana no biofilme dos três grupos microbianos, quando comparados aos grupos controle negativo e Tween (Dunn, $p\leq 0,040$). Não houve diferença entre os grupos nos quais a CLX foi aplicada diariamente (CLX) e em dias alternados (CLX 1.3) (Dunn, $p\geq 0,268$). Também não houve diferença entre os tratamentos com CLX, CLX 1.3 e C (Dunn, $p\geq 0,053$). Entretanto, quando o citral foi incorporado ao sistema (FC2), houve uma redução estatisticamente significativa na concentração de bactérias acidúricas e estreptococos do grupo *mutans* em relação ao grupo C (Dunn, $p=0,003$) e ao F (Dunn, $p\leq 0,01$). Para bactérias totais, também houve redução significativa da concentração de bactérias no biofilme quando FC2 foi comparado a F (Dunn; $p=0,049$). O sistema FC2, mesmo sendo aplicado em dias alternados, se comportou de forma semelhante a CLX aplicada 1 vez ao dia, para todas as bactérias estudadas (Dunn, $p\geq 0,141$).

Tabela 6 - Viabilidade bacteriana no biofilme [(Log 1+UFC/mL)] para: bactérias totais, bactérias acidúricas e estreptococos do grupo *mutans*, de acordo com o tipo de tratamento

Tipo de tratamento	Concentração Bacteriana no Biofilme		
	Bactérias Totais	Bactérias Acidúricas	Estreptococos do grupo mutans
CN	7,99* (6,82-8,58) ^{ab**}	7,78 (7,35-8,46) ^a	6,98 (6,12-7,67) ^a
T	8,08 (6,95-8,60) ^a	7,49 (6,76-8,71) ^a	7,40 (6,82-8,05) ^a
CLX	6,51 (5,15-7,43) ^d	6,37 (4,84-7,55) ^{bc}	6,00 (5,12-6,55) ^{bc}
CLX 1.3	6,81 (6,12-7,52) ^{cd}	6,88 (6,04-7,19) ^b	5,70 (3,81-6,84) ^{bc}
C	7,05 (5,35-7,95) ^{cd}	6,86 (5,35-7,85) ^b	6,46 (5,19-7,35) ^b
F	7,09 (6,43-8,17) ^{bc}	6,85 (6,43-7,73) ^b	6,49 (3,49-7,69) ^b
FC2	6,73 (3,39-7,71) ^d	5,86 (3,49-6,82) ^c	5,25 (4,17-6,68) ^c

CN = controle negativo (meio de cultura McBain); T = Tween; CLX = digluconato de clorexidina aplicação diária; CLX1.3 = digluconato de clorexidina aplicação em dias alternados; C = citral aplicação diária; F = sistema aplicação em dias alternados; FC2 = sistema com citral 15 x a CIM, aplicação em dias alternados.

*valores correspondem a mediana (mínimo-máximo), n = 14.

**Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos dentro de um mesmo grupo microbiano (Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni; $\alpha \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

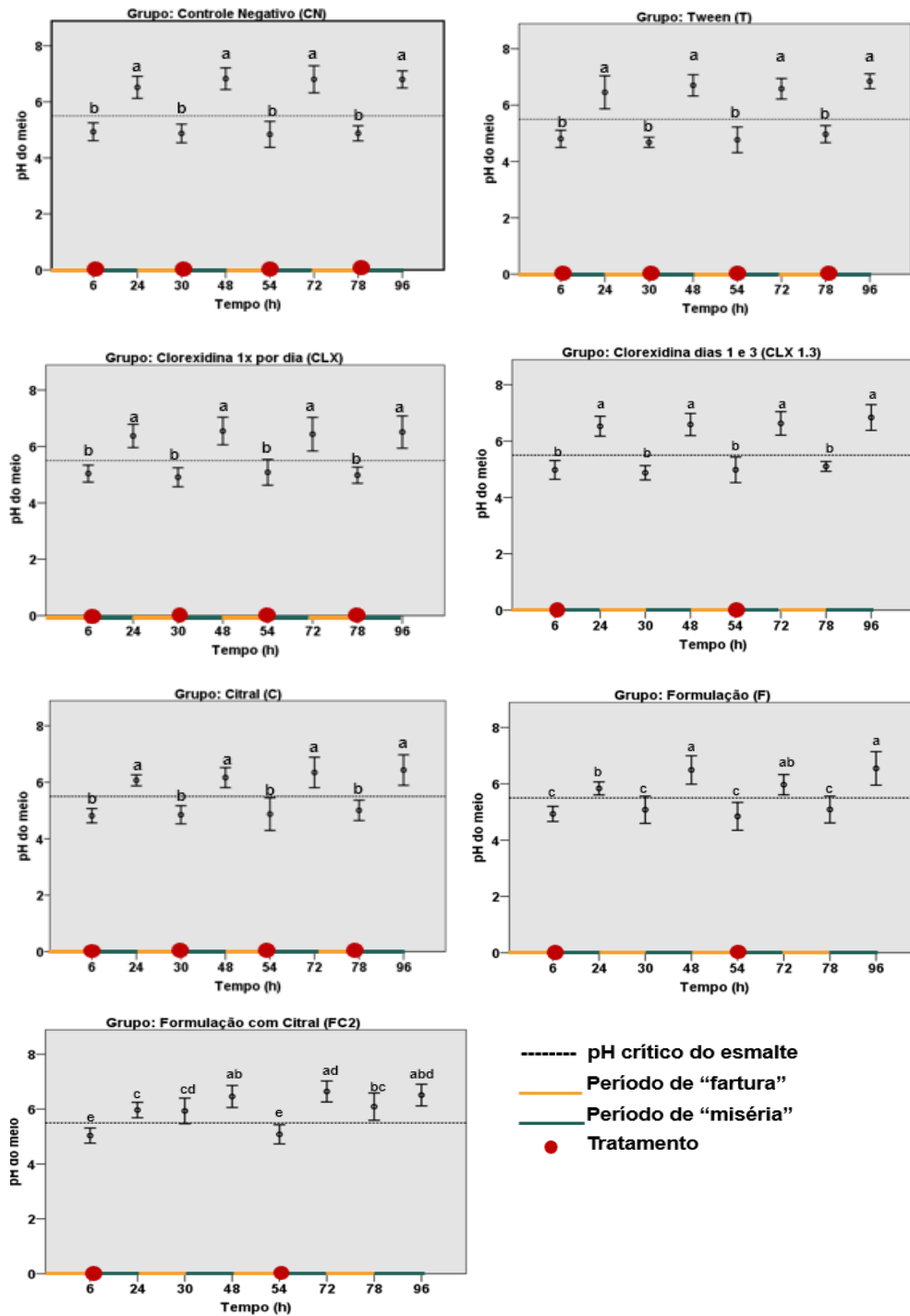
5.4.2 Acidogenicidade do meio de cultura

Para a aplicação do teste Anova de medidas repetidas mista a dois fatores, inicialmente foi aplicado o teste de esfericidade de Mauchly. Este mostrou que existe esfericidade para a variável tipo de tratamento (Mauchly, $p=0,401$) e não existe esfericidade para a variável tempo (Mauchly; $p \leq 0001$). Pela análise dos efeitos entre os fatores, pode-se observar efeito do tempo, do tipo de tratamento e interação entre tempo e tipo de tratamento (Anova; $p \leq 0001$). Como houve interação entre as variáveis, foi analisado o pós-teste dessa interação. As figuras 9 e 10 mostram, respectivamente, os resultados da comparação entre os tempos de análise dentro de cada tipo de tratamento e dos tipos de tratamento para cada tempo de análise.

O meio de cultura usado com o inóculo bacteriano para o desenvolvimento dos biofilmes sobre os blocos de esmalte, e para todas as trocas de meio, teve o pH ajustado para $pH=7,0$. Decorridas as primeiras 6 h que os blocos de esmalte permaneceram em meio de cultura com sacarose 0,2% (período de “fartura”), o meio dispendido de todos os grupos apresentou pH médio variando entre $4,80 \pm 0,30$ e $5,04 \pm 0,30$ (abaixo do pH crítico do esmalte, $pH=5,5$) e não houve diferença entre eles (Bonferroni, $p \geq 0,056$). Neste tempo (6 h) foram iniciados os tratamentos e, a partir de então, os grupos CN, T, CLX e C mostraram comportamento semelhante no decorrer do experimento, com aumento significativo do pH nos períodos de “miséria” após o tratamento (24 h, 48 h, 72 h e 96 h) e redução significativa do pH nos períodos de “fartura” (30 h, 54 h e 78 h), para valores abaixo do pH crítico do esmalte (Bonferroni, $p \leq 0,001$). Os grupos CLX 1.3 (CLX aplicada em dias alternados) e F (Sistema aplicado em dias alternados) tiveram um comportamento semelhante aos grupos anteriores. A formulação FC2 (Sistema contendo citral, aplicado em dias alternados) mostrou comportamento estatisticamente diferente dos demais grupos, conseguindo manter um pH mais elevado, acima do pH crítico do esmalte, mesmo nos dias de não tratamento (tempos: 30 h, 48 h, 78 h e 96 h). Desta forma, após o início dos tratamentos do esmalte no tempo de 6 h e durante todo o período do estudo (total de 96 horas = 4 dias), enquanto nos grupos CN, T, CLX, CLX1.3, C e F ocorreram três

quedas de pH para abaixo do pH crítico do esmalte (tempos: 30 h, 54 h e 78 h) no grupo FC2 ocorreu apenas uma queda do pH (tempo: 54 h).

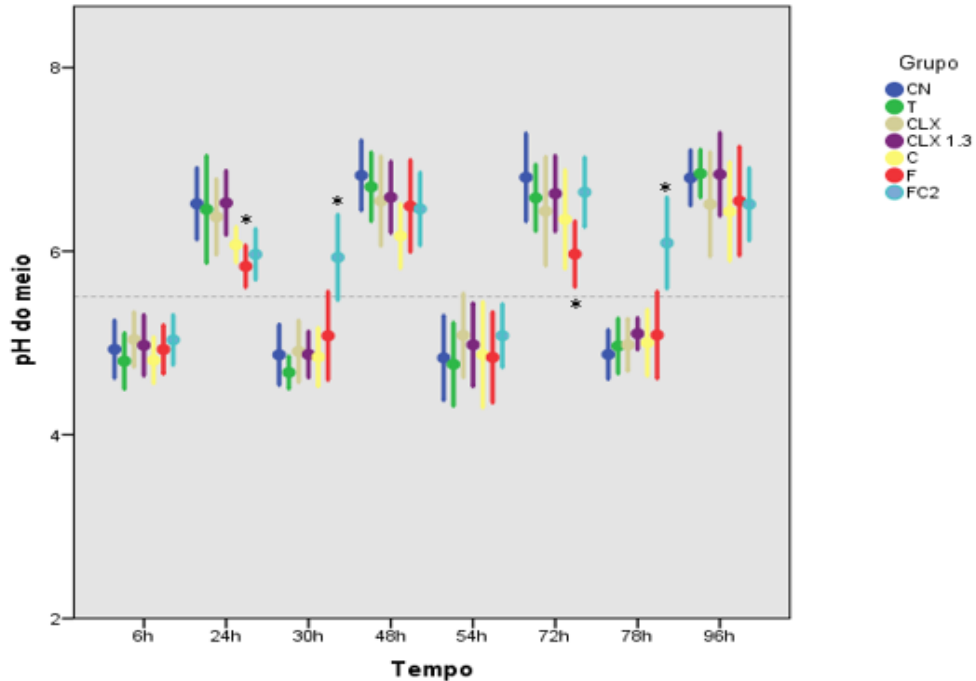
Figura 9 - Acidogenicidade do meio de cultura (média e desvio-padrão), de acordo com o tempo de experimento dentro de cada tipo de tratamento



Letras minúsculas distintas denotam diferença estatística entre os tempos para cada tratamento ($p \leq 0,029$). Anova de medidas repetidas mista a dois fatores (tipo de tratamento e tempo), seguido do pós-teste de Bonferroni ($\alpha \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 - Acidogenicidade dos biofilmes de acordo com tratamento ao longo do tempo de experimento (média e desvio-padrão). Comparação entre os tipos de tratamento dentro de cada tempo



CN = controle negativo (meio de cultura McBain); T = Tween; CLX = digluconato de clorexidina, aplicação diária; CLX1.3 = digluconato de clorexidina, aplicação em dias alternados; C = citral, aplicação diária; F = sistema, aplicação em dias alternados ; FC2 = sistema com citral 15 x a CIM, aplicação em dias alternados.

Linha tracejada corresponde ao pH crítico do esmalte (pH=5,5). Asteriscos denotam diferença estatística entre tipos de tratamento dentro de um mesmo período de tempo ($p \leq 0,034$). Anova de medidas repetidas mista a dois fatores (tipo de tratamento e tempo), seguido do pós-teste de Bonferroni ($\alpha \leq 0,05$).

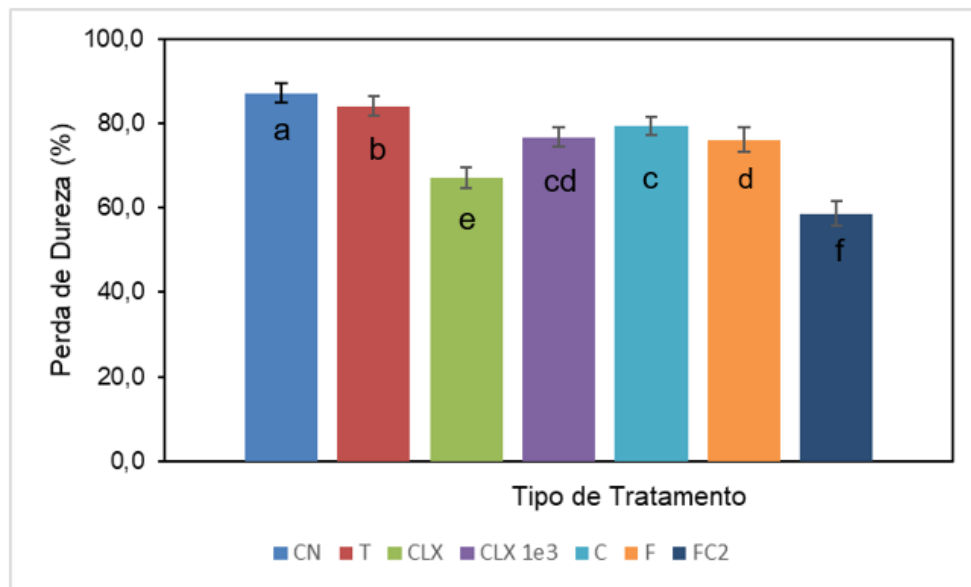
Fonte: Elaboração própria.

5.4.3 Perda de dureza superficial do esmalte

A figura 11 mostra diferença significativa na porcentagem de perda de dureza de superfície do esmalte para os diferentes tipos de tratamento (Anova; $p \leq 0,0001$). O grupo controle negativo apresentou maior perda de dureza (CN, %SH = $87,2 \pm 2,3\%$), estatisticamente significativa em relação ao Tween (T, %SH = $84,1 \pm 2,2\%$) (Tukey; $p \leq 0,024$), e em ambos a perda de dureza foi significativamente maior em relação aos demais grupos (Tukey; $p \leq 0,0001$). A perda de dureza para o grupo tratado com digluconato de clorexidina em dias alternados (CLX1.3; %SH = $76,8 \pm 2,3$) foi semelhante ao citral (C; %SH = $79,3 \pm 2,2$) (Tukey; $p = 0,108$), e ao sistema (F, %SH =

76,1±2,8) (Tukey; $p=0,993$), entretanto o citral e o sistema diferiram entre si (Tukey; $p=0,018$). O esmalte tratado com digluconato de clorexidina aplicada diariamente (CLX, %SH = 67,0±2,5) apresentou perda de dureza diferente de todos os grupos (Tukey; $p\leq 0,0001$), e esta foi superior apenas aquela apresentada pelo grupo tratado com o sistema contendo citral (FC2, %SH = 58,7±2,9) que teve a menor perda de dureza (Tukey; $p\leq 0,0001$).

Figura 11 - Porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) nos blocos de esmalte de dentes bovinos após crescimento de biofilmes polimicrobianos e exposição aos diferentes tipos de tratamentos



CN = controle negativo (meio de cultura Mcbain); T = Tween; CLX = digluconato de clorexidina, aplicação diária; CLX1.3 = digluconato de clorexidina, aplicação em dias alternados; C = citral, aplicação diária; F = sistema, aplicação em dias alternados; FC2 = sistema com citral 15 x a CIM, aplicação em dias alternados.

Letras diferentes representam diferença estatística significativa entre os tipos de tratamento ($p\leq 0,024$). Análise de Variância a um fator, seguida do pós-teste de Tukey ($\alpha\leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Em busca de uma nova estratégia de prevenção da cárie dentária associada a utilização de produtos naturais, esse estudo teve como objetivo desenvolver e explorar as propriedades de um sistema cristal líquido bioadesivo com a incorporação de uma substância de origem natural, o citral, visando o controle do biofilme e a prevenção da desmineralização dentária. A caracterização físico-química permitiu a identificação de características particulares da formulação estudada. A presença de diferentes arranjos de cristal líquido, viscoelasticidade, além de um perfil de liberação modificado foram confirmados a partir da microscopia de luz polarizada (MLP), análises reológicas e de liberação da substância ativa. Além disso, quando a formulação foi avaliada quanto a sua atividade antibacteriana, mostrou uma ação expressiva sobre o biofilme, além de reduzida perda mineral do esmalte dentário em comparação ao controle negativo. Assim, foi confirmada a possibilidade de utilização do sistema cristal líquido com a incorporação de citral, como uma substância auxiliar na prevenção da cárie dentária.

O biofilme dental é uma comunidade microbiana estruturada e organizada³⁰. Dessa forma, é importante enfatizar que a variação da composição salivar entre diferentes indivíduos pode impactar diretamente na formação e composição microbiológica do biofilme⁸⁰. Assim, foi proposta a utilização de um inóculo polimicrobiano obtido a partir da saliva de um doador que atendeu aos padrões estabelecidos em estudo anterior, por meio da análise da saliva de seis doadores²⁶ objetivando a manutenção da heterogeneidade do biofilme e a seleção de agentes antimicrobianos mais específicos^{17,94}.

A determinação da concentração de uma substância ativa a ser usada como antimicrobiano, seja na sua forma livre ou incorporada a um sistema, baseia-se na sua CIM. Os resultados da CIM e CBM indicaram suscetibilidade do inóculo polimicrobiano ao citral (CIM = 2,81 mg/mL) e ao digluconato de clorexidina (CIM = 0,15 mg/mL). Corroborando com este estudo, Sutili et al.⁹⁵ (2015) demonstraram ação do citral contra *S. aureus* com a concentração similar de 2,8 mg/mL e Oliveira et al. (2017)⁴⁷ identificaram que os valores de CIM variaram de 1,33 mg/mL e 2,75 mg/mL respectivamente, para cepas de biofilme de *L. acidophilus* e *S. mutans*, demonstrando uma promissora ação antimicrobiana do citral contra bactérias cariogênicas nos biofilmes. Embora a CIM do citral neste estudo e nos de Sutili et al.⁹⁵ (2015) e Oliveira

et al.⁴⁷ (2017) tenha sido muito superior àquela do digluconato de clorexidina, é importante investir em pesquisas com esta substância por se tratar de um produto de origem natural e, possivelmente com menores efeitos adversos ao organismo. Além disso, a CIM de uma substância é determinada a partir de uma medição estática durante o crescimento de um inóculo bacteriano⁹⁶, uma limitação que pode refletir na não obtenção do efeito inibitório desejado sobre micro-organismos em condições clínicas reais. Um produto natural pode então, apresentar valores de CIM considerados bons, e não apresentar boa atividade antibiofilme ou vice-versa⁹⁷. Assim, a partir da determinação da CIM do citral, duas concentrações de incorporação para as formulações passaram a ser estudadas: 10 vezes a CIM (FC1) e 15 vezes a CIM (FC2), a fim de determinar qual delas iria apresentar melhores características estruturais e permitir a liberação controlada do citral, atingindo a CIM no período mais adequado para interferir na formação e composição do biofilme polimicrobiano.

A partir da MLP as formulações FC1 e FC2 foram caracterizadas como cristais líquidos isotrópicos, pois sob a luz do microscópio houve ausência de desvio de luz sugerindo a formação de “campo escuro”. Com a adição de saliva, ou seja, um aumento da fase aquosa, as formulações se tornaram anisotrópicas (houve o desvio de luz). Tal classificação é possível por meio da identificação de estruturas características em forma de cruz de malta e estrias dispostas espontaneamente. Além disso, sugere-se que o contato e a exposição a água (saliva) podem ditar o nível organizacional das moléculas no interior das formulações⁹⁸.

Diante de baixas concentrações de água (até 15%) pode ocorrer a formação da fase lamelar⁹⁹. Esse parâmetro, suporta os achados do presente estudo, já que em FC1 e FC2 a adição de 5% de saliva determinou o surgimento de estruturas semelhantes a cruces de malta, características da mesofase lamelar. Contudo, muitas formulações podem se encontrar em um estado de transição apresentando diferentes arquiteturas moleculares, devido ao teor aquoso adicionado. Isso pode justificar a presença de estrias da mesofase líquido cristalina hexagonal, geralmente encontradas com a incorporação em concentrações acima de 30% de água ou saliva ao sistema^{27,61}. Esse efeito foi observado para as formulações FC1 e FC2, com a adição de 50% de saliva, sendo evidenciada a presença de cruces de malta, entretanto, na sua maior porção prevaleceu a formação de “campo escuro”, caracterizando uma transição da mesofase lamelar para a mesofase cúbica. Estudos mostram ainda, que com a adição de concentrações de água maiores que 70% os sistemas podem se

reorganizar causando o rompimento da mesofase do cristal líquido, resultando assim na fase cúbica com a formação de “campo escuro”^{61,62}.

O comportamento reológico confirma a propriedade dos sistemas cristais líquidos de gelificar no local de aplicação^{100,60,63}. Para todas as amostras o aumento do percentual de saliva adicionado elevou de forma gradativa a consistência das formulações, ou seja, favoreceu a viscosidade. Diante de uma força, a reologia contínua classificou somente, FC1+50% como sistema não newtoniano reopético, ao longo do tempo, o aumento da força elevou a viscosidade, e a redução da força determinou a redução da viscosidade e a reestruturação da formulação para suas características iniciais. Já em sua maioria as formulações (FC1, FC2, FC1+5% e FC2+5% e FC2+50%) se caracterizaram como fluídos não newtonianos, pseudoplásticos, com uma fluidez imediata diante da impressão de uma força^{63-65,101,102}. Assim, argumenta-se que as características identificadas são favoráveis ao desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de investigar formas de aplicação de sistemas cristais líquidos na cavidade bucal¹⁰³.

Visando atingir este objetivo, a reologia oscilatória busca identificar as propriedades viscoelásticas das formulações¹⁰⁴. Este é um aspecto importante não só a nível comportamental dos sistemas, mas é um fator que pode estar intimamente ligado ao processo de adesão ao substrato alvo⁶⁷. O presente estudo, no entanto, identificou que independentemente do módulo elástico ou viscoso, a adição de saliva provocou modificações estruturais internas das formulações, mas não a ponto de prejudicar a adesão ao substrato. Esse efeito também foi observado em outros estudos com formulações similares^{63,64}. Vale ressaltar também, que as diferenças viscoelásticas das formulações podem ser justificadas pelo aumento ou diminuição das interações entre os domínios estruturais⁶⁵.

Assim, foi possível observar o aumento da força necessária para destacamento das formulações do disco de mucina, quando a quantidade de saliva aumentou (FC1+50% e FC2+50%), o que corrobora com a literatura quando avaliada a da adesão a um substrato alvo^{65,60,103,23,72,69,61}. Além disso, sugere-se que o processo de adesão é proporcional ao aumento da porção aquosa no sistema^{61,65}. Também, já foi demonstrado que formulações semi-sólidas que contêm polímeros mucoadesivos podem interpenetrar e interagir através de ligações químicas com glicoproteínas de mucina¹⁰⁵. Mas, o contato com fluidos corporais pode ser o fator determinante para a retenção local da formulação⁶⁵. Considera-se então, que a configuração estrutural e

comportamental confirmadas pela caracterização físico-química do sistema estudado, pode assegurar a sua aplicação em locais úmidos, uma característica extremamente desejável a produtos destinados ao uso na cavidade bucal.

A principal vantagem das características bioadesivas é a manutenção do fármaco ou substância ativa no local de interesse por períodos mais longos, favorecendo a sua ação⁷³. Isso pode impactar na redução da frequência de aplicação do produto e na adesão do paciente a programas preventivos, ou mesmo ao tratamento de determinadas doenças.

Em estudos *in vitro*, o grande desafio do fármaco consiste em após a sua liberação atravessar uma “barreira” e atingir uma concentração suficiente para desempenhar sua ação terapêutica no local de interesse. No presente estudo, para a análise do perfil de liberação, foram usadas células de difusão de Franz com membrana sintética poliestersulfona (PES) com poro de 0,47 μ m. As formulações FC1 e FC2 liberaram para a solução receptora, 22,94% e 40,75% do citral incorporado, nas primeiras 24 horas, respectivamente. Contudo, ressalta-se que para a formulação FC2, a quantidade de citral liberado atingiu a concentração equivalente a sua CIM entre 1h e 3 h de experimento, o que permite sua atuação sobre bactérias em suspensão e biofilmes imaturos. Em comparação, a formulação FC1 só atingiu valores de liberação correspondentes a CIM, num período entre 14 h e 16 h, período em que as bactérias já estão mais organizadas no biofilme, e portanto, mais resistentes a ação de antibacterianos⁷⁴.

Para a análise microbiológica e de perda de dureza do esmalte, foram realizados inicialmente estudos piloto com as duas formulações (FC1 e FC2), usando lamínulas de vidro e esmalte de dentes bovinos para o crescimento dos biofilmes polimicrobianos. Diante dos resultados obtidos nesses estudos piloto, e considerando os resultados da caracterização físico-química das formulações, e em particular, o fato de a formulação FC2 ter liberado citral em concentração equiparável a sua CIM num menor período de tempo, optou-se por realizar essas análises usando apenas a formulação FC2.

Os dados de viabilidade bacteriana demonstraram que o sistema contendo o citral 15x a CIM (FC2), apresentou uma maior ação estatisticamente significativa comparado ao citral livre, na redução da concentração de bactérias acidúricas e estreptococos do grupo *mutans* (em média, uma redução de 1,2 Log para ambas as bactérias). O tratamento do esmalte com a formulação FC2, também determinou

redução estatisticamente significativa da viabilidade dos três grupos bacterianos estudados, quando comparada a formulação sem citral (F) (em média, redução de 1 Log para bactérias totais, 1,35 Log para bactérias acidúricas e 0,83 Log para estreptococos do grupo *mutans*). Além disso, a formulação FC2, mesmo sendo aplicada em dias alternados, se comportou de forma semelhante a CLX aplicada uma vez ao dia, para todas as bactérias.

O tempo de um minuto, uma vez ao dia, usado para o tratamento com substâncias ativas livres, segundo Oliveira et al.⁴⁷ (2017) é suficiente para atuação sobre biofilme em esmalte. Para as formulações determinou-se, neste estudo, um maior tempo de exposição (cinco minutos), por dias alternados, embasado nas características bioadesivas apresentadas e visando reduzir a frequência de aplicação em situações clínicas^{47,59,27}. Salienta-se que, a presença física do sistema aderido ao esmalte, além de possibilitar a liberação da substância ativa por mais tempo no local de interesse, pode também funcionar como um fator limitante para a adesão bacteriana e, desta forma inibir a formação do biofilme²⁷. A inibição dos microorganismos, pode ainda estar vinculada a componentes da formulação veículo (F)^{62,103} o que explicaria o fato de a formulação F ter promovido diminuição de células viáveis para bactérias acidúricas e estreptococos do grupo *mutans*, quando comparada com o grupo controle negativo.

Com relação a acidogenicidade dos biofilmes, após o primeiro tratamento, no período de 24 h, o pH do meio referente ao citral 15x a CIM (C) e as formulações F e FC2 apresentou valores estatisticamente inferiores ao das demais substâncias. Isso pode ser justificado pelo fato de o citral não incorporado ser uma molécula quimicamente instável¹⁸, necessitando de aplicação diária para apresentar um comportamento semelhante ao do digluconato de clorexidina (CLX e CLX1.3). As formulações F e FC2, tendem a ser originalmente ácidas e, num primeiro momento, apresentam um comportamento semelhante. Entretanto, a formulação FC2 no período entre 24 h e 30 h apresentou um comportamento diferente de todos os demais tratamentos, provavelmente pela característica de liberação controlada do citral incorporado. Assim, os grupos CN, T, CLX, CLX1.3, C e F mostraram comportamento semelhante no decorrer do tempo com aumento significativo do pH para valores próximos do pH neutro, nos períodos de “miséria” após o tratamento (24 h, 48 h, 72 h e 96 h) e redução significativa do pH nos períodos de “fartura” (30 h, 54 h e 78 h), para valores abaixo do pH crítico para o esmalte, enquanto para a formulação FC2, após o

início do tratamento, o pH do meio se manteve próximo ou acima do pH = 6,0, e ocorreu apenas uma queda de pH para valores abaixo do pH crítico do esmalte (pH=5,08; tempo de 54 h). Considerando que essa formulação foi aplicada em dias alternados, este comportamento pode ser justificado pelas propriedades bioadesivas, que determinam um maior tempo de contato da substância ativa com o biofilme²⁷. Em oposição, os grupos tratados com as soluções livres, mesmo com aplicações diárias, apresentaram maiores variações de pH, o que pode ser justificado porque, em estudos *in vitro*, essas substâncias são facilmente removidas pela lavagem dos espécimes, ficando sua ação limitada ao tempo de aplicação. Comparativamente, em situações clínicas, estas substâncias sofrem a ação da saliva e estruturas bucais e, por não apresentarem a propriedade de adesão ao substrato, são rapidamente removidas do local de interesse²⁷.

Controle da microbiota cariogênica, inibição de adesão dos micro-organismos ao esmalte dentário e, conseqüentemente, da sua organização em biofilmes, além do controle do pH, são características desejáveis em substâncias que visam a prevenção da cárie³⁸. Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se considerar que a formulação FC2 apresenta nitidamente essas características, tendo o tratamento com a mesma resultado no menor índice de perda de dureza superficial do esmalte (SH%=58,7±2,9%), quando comparado com os demais tratamentos, cuja SH% variou de 67,0±2,5% até 79,3±2,2%. O modelo experimental empregado (modelo de “fartura” e “miséria”) determinou um grande desafio cariogênico, tendo sido observada uma perda média de dureza superficial do esmalte (%SH) de 87,2±2,3% para o grupo controle negativo (CN). A ação preventiva de desmineralização pode ser apontada como um desfecho principal nesse tipo de estudo, assim o controle da perda mineral do esmalte consiste no objetivo final da avaliação de substâncias destinadas ao controle químico do biofilme¹⁰⁶.

Desta forma, os resultados do presente estudo indicam que o sistema com a incorporação do citral (FC2) teve ação sobre o biofilme, no controle da acidogenicidade, e reduzindo os níveis de desmineralização do esmalte frente a elevado desafio cariogênico. Além disso, a formulação FC2 apresentou facilidade de aplicação, controle de liberação da substância ativa e bioadesão na presença de saliva. Contudo, este é um estudo preliminar e uma das limitações foi não ter sido incluído um grupo de tratamento com a formulação FC2 aplicada por 1 minuto, pois pelas suas características, o tempo de 5 minutos não seria necessário, uma vez que

a adesão ao esmalte se dá quando o sistema entra em contato com a umidade. Também existem eventos que ocorrem in vivo na cavidade bucal que não puderam ser reproduzidos in vitro, como por exemplo, a força de destacamento da estrutura dentária, mecanismos de ação salivar, associação a estruturas orais, entre outras. Além disso, testes de citotoxicidade são necessários para uma maior segurança para sua posterior utilização em pesquisas in vivo e indicação para aplicação clínica. Portanto, sugere-se futuras investigações sobre os efeitos do uso do sistema cristal líquido com a incorporação do citral em condições mais próximas do contexto clínico, visando o desenvolvimento de métodos mais eficazes de prevenção da cárie dentária, em especial, naquelas situações em que o controle mecânico do biofilme não é adequado.

7 CONCLUSÃO

As características físico-químicas do sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral são adequadas para uma formulação destinada a aplicação em cavidade bucal, com liberação modificada no sítio de ação. Além disso, a formulação contendo citral 15 vezes a CIM possui boa atividade antibacteriana contra bactérias cariogênicas e reduz a perda mineral do esmalte dentário submetido a desafio cariogênico.

REFERÊNCIAS*

1. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The caries microbiome: implications for reversing dysbiosis. *Adv Dent Res.* 2018; 29(1): 78-85.
2. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* 2008; 53(3): 286-91.
3. Philip N, Suneja B, Walsh LJ. Ecological approaches to dental caries prevention: paradigm shift or shibboleth? *Caries Res.* 2018; 52(1-2):153–65.
4. Cury JA, Tenuta LMA. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv Dent Res.* 2008; 20(1):13-16.
5. Al-Dajani M, Limeback H. Emerging science in the dietary control and prevention of dental caries. *J Calif Dent Assoc.* 2012; 40(10):34-8.
6. Featherstone JDB, Chaffee BW. The evidence for caries management by risk assessment (CAMBRA®). *Adv Dent Res.* 2018; 29(1):9–14.
7. Figuero E, Nobrega DF, Gargallo MG, Tenuta LMA, Herrera D, Carvalho JC. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2017; 44(18): 116–34.
8. Freires AI, Denny C, Benso B, Alencar SM, Rosalen PL. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules.* 2015; 20(4): 7329-58.
9. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M et al. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech.* 2005; 68(2): 85–9.
10. Zanatta FB, Rösing CK, Batistin Zanatta F, Kuchenbecker Rösing C. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A.* 2007; 1(2): 35–43.
11. Saleem HGM, Seers CA, Sabri AN, Reynolds EC. Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. *BMC Microbiol.* 2016; 16(1): 1–9.
12. Sakaue Y, Takenaka S, Ohsumi T, Domon H, Terao Y, Noiri Y. The effect of chlorhexidine on dental calculus formation: An in vitro study. *BMC Oral Health.* 2018; 18(1): 1–7.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. McCoy LC, Wehler CJ, Rich SE, Garcia RI, Miller DR, Jones JA. Adverse events associated with chlorhexidine use: Results from the department of veterans affairs dental diabetes study. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139(2): 178–83.
14. Quirynen M, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, van Steenberghe D. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(12): 1127–36.
15. Walsh T, Oliveira-Neto JM, Moore D. Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane database Syst Rev.* 2015; 2015(4): 1-52.
16. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges, and future perspective. *Caries Res.* 2011; 45(3): 243-63.
17. Mouta LFGL, Marques RS, Koga-Ito CY, Salvador MJ, Giro EMA, Brighenti FL. *Cymbopogon citratus* essential oil increases the effect of digluconate chlorhexidine on microcosm biofilms. *Pathogens.* 2022; 11(10), 1067.
18. Sharma S, Habib S, Sahu D, Gupta J. Chemical properties and therapeutic potential of citral, a monoterpene isolated from lemongrass. *Med Chem.* 2021; 17(1): 2-12.
19. Zhang J, Du C, Li Q, Hu A, Peng R, Sun F et al. Inhibition mechanism and antibacterial activity of natural antibacterial agent citral on bamboo mould and its anti-mildew effect on bamboo. *R Soc Open Sci.* 2021; (8): 1-12.
20. Gupta P, Patel DK, Gupta VK, Pal A, Tandon S, Darokar MP. Citral, a monoterpenoid aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine.* 2017 Oct.; 34: 85-96.
21. Lim AC, Tang SGH, Zin NM, Maisarah AM, Ariffin IA, Ker PJ, Mahlia TMI. Chemical composition, antioxidant, antibacterial, and antibiofilm activities of *backhousia citriodora* Essential Oil. *Molecules.* 2022; 27(15): 4895.
22. Kang ML, Cho SC, Yoo HS. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnology Advances.* 2009; (6): 857-65.
23. Fonseca-Santos B, Bonifácio BV, Baub TM, Gremião MPD, Chorilli M. In-situ gelling liquid crystal mucoadhesive vehicle for curcumin buccal administration and its potential application in the treatment of oral candidiasis. *J Biomed Nanotechnol.* 2019; 15(6): 1334–44.
24. Chorilli M, Prestes PS, Rigon RB, Leonardi GR, Chiavacci LA, Scarpa MV. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. *Quim Nova.* 2009; 32(4): 1036-40.

25. Carvalho FC, Chorilli M, Gremião MPD. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos: propriedades, metodologias e aplicações. *Polimeros*. 2014; 24(2): 203–13.
26. Lacevic A, Vranic E, Zulic I, Endodontic-periodontal locally delivered antibiotics, *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2004; 4(1): 73-9.
27. Marques RS. Sistemas bioadesivos precursores de cristais líquidos para controle de biofilme bucal [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.
28. Francisconi RS, Maquera-Huacho PM, Tonon CC, Calixto GMF, de Cássia Orlandi Sardi J, Chorilli M, Spolidorio DMP. Terpinen-4-ol and nystatin co-loaded precursor of liquid crystalline system for topical treatment of oral candidiasis. *Sci Rep* 2020; (1): 12984.
29. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, JablonskiMomeni A et al. Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and cariology research group of IADR. *Caries Res.* 2020; 54(1): 7-14.
30. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1): 69-86.
31. Jentsch HFR. Actual Concepts for Individual Interdental Biofilm Removal. *Monogr Oral Sci.* 2021; 29: 74-79.
32. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008; 42(6): 409-18.
33. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res.* 2005; 84(11): 1016-020.
34. Rauber BF, Palhano HS, Antonini MF, Sonza QN, Drebes MHE, Ehrhardt A et al. Avaliação da presença de álcool em enxaguatórios bucais informados pelo fabricante como sem álcool. *Braz Oral Res* 2014; 28(1): 98.
35. Quirynen M, Soers C, Desnyder M, Dekeyser C, Pauwels M, van Steenberghe D. A 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2005; 32(4): 390–400.
36. Chen X, Daliri EB, Kim N, Kim JR, Yoo D, Oh DH. Microbial etiology and prevention of dental caries: exploiting natural products to inhibit cariogenic biofilms. *Pathogens.* 2020; 9(7): 1-15.
37. Cheng L, Li J, He L, Zhou X. Natural Products and Caries Prevention. *Caries Res* 2015;49(1): 38-45.

38. Koo H, Jeon JG. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. *Adv Dent Res.* 2009; 21(1): 63-68.
39. Bodiba DC, Prasad P, Srivastava A, Crampton B, Lall NS. Antibacterial activity of *azadirachta indica*, *pongamia pinnata*, *psidium guajava*, and *mangifera indica* and their mechanism of action against *Streptococcus mutans*. *Pharmacogn Mag.* 2018; 14(53): 76-80.
40. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94(3): 223- 53
41. Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol.* 2006; 43(2):149-54
42. Hsouna A, Hamdi N. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *pelargonium graveolens* growing in Tunisia. *Lipids Health Dis.* 2012: Dec 5(11), 167.
43. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000; 88(2): 308–16
44. Ambade SV, Bhadbhade BJ. In vitro comparison of antimicrobial activity of different extracts of *Cymbopogon citratus* on dental plaque isolates. *Int.J.Curr. Microbiol.App.Sci.* 2015; 4(7): 672-81
45. Almeida RBA, Akisue G, Cardoso LML, Junqueira JC, Jorge AOC. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2013; 15(4): 474-82
46. Onawunmi GO. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology.* 1989; 9(3):105-8
47. Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Kogaito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz. Oral Res.* 2017; 31:89.
48. Gao S, Liu G, Li J, Chen J, Li L, Li Z et al. Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 603858
49. Pucci M, Raimondo S, Zichittella C, Tinnirello V, Corleone V, Aiello G, Moschetti M, Conigliaro A, Fontana S, Alessandro R. Biological properties of a citral-enriched fraction of citrus limon essential oil. *Foods.* 2020; 9(9): 1290.
50. Yang X, Tian H, Ho CT, Huang Q. Inhibition of citral degradation by oil-in-water nanoemulsions combined with antioxidants. *J. Agric. Food Chemistry,* 2011; 59(11): 6113-119.

51. Chountoulesi M, Pispas S, Tseti IK, Demetzos C. Lyotropic liquid crystalline nanostructures as drug delivery systems and vaccine platforms. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022; 15(4): 429.
52. Farkas E, Zelkó R, Németh Z, Pálinkás J, Marton S, Rácz I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. *Int J Pharm*. 2000; 193(2): 239-45.
53. Patravale VB, Mandawgade SD. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *Int J Cosmet Sci*. 2008; 30(1): 19–33.
54. Otto A, Plessis JD, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci*; 2009; 31(1): 1-19.
55. Wang Z, Zhou W. Lamellar liquid crystals of brij 97 aqueous solutions containing different additives. *J Solution Chem*; 2009; 38: 659-68.
56. Calixto GMF. Sistemas precursores de cristais líquidos bioadesivos para administração bucal de peptídeo antigelatinolítico associados à terapia fotodinâmica no tratamento do câncer bucal. [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2017.
57. Yariv D, Efrat R, Libster D, Aserin A, Garti N. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; 78(2): 185-92.
58. Formariz TP, Urban MCC, Silva Júnior AA, Gremião MPD, Oliveira AG. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005; 41(3): 301-13.
59. Calixto GM, Garcia MH, Cilli EM, Chiavacci LA, Chorilli M. Design and characterization of a novel p1025 peptide-loaded liquid crystalline system for the treatment of dental caries. *Molecules*. 2016; 21(2): 158.
60. Calixto GMF, Duque C, Aida KL, dos Santos VR, Massunari L, Chorilli M. Development and characterization of p1025-loaded bioadhesive liquid crystalline system for the prevention of *Streptococcus mutans* biofilms. *Int J Nanomedicine*. 2017; 13: 31–41.
61. Aida KL, Kreling PF, Caiaffa KS, Calixto GMF, Chorilli M, Spolidorio DMP, et al. Antimicrobial peptide-loaded liquid crystalline precursor bioadhesive system for the prevention of dental caries. *Int J Nanomedicine*. 2018; 13: 3081–91.
62. Bernegossi J, Calixto GM, Sanches PR, Fontana CR, Cilli EM, Garrido SS, Chorilli M. Peptide KSL-W-Loaded mucoadhesive liquid crystalline vehicle as an alternative treatment for multispecies oral biofilm. *Molecules*. 2015; 21(1): 1-14.
63. Salmazi R, Calixto G, Bernegossi J, Aparecido Dos M, Ramos S, Bauab TM, et al. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. *Int J Nanomedicine*. 2015; 10: 4815–824.

64. Carvalho FC, Campos ML, Peccinini RG, Gremião MPD. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013; 84(1): 219–27.
65. de Araújo PR, Calixto GMF, da Silva IC, de Paula Zago LH, Oshiro Junior JA, Pavan FR, Ribeiro AO, Fontana CR, Chorilli M. Mucoadhesive In Situ Gelling Liquid Crystalline Precursor System to Improve the Vaginal Administration of Drugs. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2019; 20(6): 225.
66. Calixto GMF. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do *Streptococcus mutans*. [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2013.
67. Carvalho FC, Barbi MS, Sarmiento VH, Chiavacci LA, Netto FM, Gremião MP. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. *J Pharm Pharmacol.* 2010; 62(4): 430-9.
68. Jiang X, Liang X, Wang S, Guo J, Tao Y, Gui S. An injectable in situ hexagonal mesophase system for local delivery of minocycline hydrochloride: Preparation and pharmacodynamics in rats. *Pharmazie.* 2017; 72(5): 249-56.
69. Yang Z, Liang X, Jiang X, et al. Development and evaluation of minocycline hydrochloride-loaded in situ cubic liquid crystal for intra-periodontal pocket administration. *Molecules.* 2018; 23(9): 2275.
70. Grela KP, Marciniak DM, Karolewicz B. Poloxamer 407-based thermosensitive emulgel as a novel formulation providing a controlled release of oil-soluble pharmaceuticals-ibuprofen case study. *Materials (Basel).* 2021; 14(23): 7266.
71. de Alcântara Sica de Toledo L, Rosseto HC, dos Santos RS, Spizzo F, Del Bianco L, Montanha MC, et al. Thermal magnetic field activated propolis release from liquid crystalline system based on magnetic nanoparticles. *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19(7): 3258–71.
72. Mei L, Huang X, Xie Y, et al. An injectable in situ gel with cubic and hexagonal nanostructures for local treatment of chronic periodontitis. *Drug Deliv.* 2017;24(1): 1148-1158.
73. Bruschi ML, de Freitas O, Lara EH, Panzeri H, Gremião MP, Jones DS. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: development and characterization. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008; 34(3): 267-78.
74. Bertolini MM, Oliveira G, Charone S, Soares RMA, Souza IPR, Portela MB. Avaliação in vitro da microdureza de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina submetidos a biofilme de *Candida albicans*. *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.* 2010; 10(2): 249-255.
75. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res.* 1997; 11(1): 110–26

76. Van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling*. 2011; 27(9): 1057–63.
77. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *J Can Dent Assoc*. 2000; 66 (11): 594-7.
78. Feio M, Sapeta P. Xerostomia in palliative care. *Acta Med Port*. 2005; 18(6): 459–66.
79. Siqueira WL, Santos MTBR, Elangovan S, Simoes A, Nicolau J. The influence of valproic acid on salivary pH in children with cerebral palsy. *Spec Care Dent*. 2007; 27(2): 64–6.
80. McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol*. 2005; 98(3): 624–34.
81. Gold OG, Jordan HV, van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 1973; 18(11): 1357–64.
82. Azevedo MS, van de Sande FH, Maske TT, Signori C, Romano AR, Cenci MS. Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. *Biofouling*. 2014; 30(8): 903–9.
83. Patel JB, Cockerill FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler JA, Jenkins SG, Lewis JS, Limbago B et al. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; M07-A10: Approved Standard—Tenth Edition. 2015; 35(2).
84. Isaac VLB, Cefali LC, Chiari BG, Oliveira CCLG, Salgado HRN, Corrêa MA. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocósméticos. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl*. 2008; 29(1): 81–96.
85. Carvalho FC, Calixto G, Hatakeyama IN, Luz GM, Gremião MP, Chorilli M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013; 39(11): 1750-7.
86. Weisheimer V, Miron D, Silva CB, Guterres SS, Schapoval EE. Microparticles containing lemongrass volatile oil: preparation, characterization and thermal stability. *Pharmazie*. 2010; 65(12): 885-90.
87. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007; 39(2): 175-91.
88. Santos SS, Delbem ACB, Moraes JCS, Souza JAS, Oliveira LQC, Pedrini D. Resin-modified glass ionomer containing calcium glycerophosphate: physico-mechanical properties and enamel demineralization. *J Appl Oral Sci*. 2019; 27: 1-10.

89. Nunes GP, Danelon M, Pessan JP, Capalbo LC, Junior NAN, Matos AA, Souza JAS, Buzalaf MAR, Delbem ACB. Fluoride and trimetaphosphate association as a novel approach for remineralization and antiproteolytic activity in dentin tissue. *Arch Oral Biol.* 2022; 142: 105508.
90. Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res.* 2005; 39(6): 514–20.
91. Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by streptococcus mutans and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res.* 2010; 44(4): 372–9.
92. Albuquerque YE, Danelon M, Salvador MJ, Koga-Ito CY, Delbem ACB, Ramirez-Rueda RY, Gontijo AVL, Brighenti FL. Mouthwash containing croton doctoris essential oil: in vitro study using a validated model of caries induction. *Future Microbiol.* 2018; 13 (1): 631-43
93. Viana P G S. Esterelização de esmalte bovino por meio de irradiação por microondas: efeito sobre a microdureza superficial e resistência à desmineralização. 2009. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara.
94. Fernandez y Mostajo, M.; Exterkate, R.A.M.; Buijs, M.J.; Crielaard, W.; Zaura, E. Effect of Mouthwashes on the Composition and Metabolic Activity of Oral Biofilms Grown in Vitro. *Clin. Oral Investig.* 2017, 21, 1221–1230.
95. Sutili FJ, Cunha MA, Ziech RE, Krewer CC, Zeppenfeld CC, Heldwein CG, Gressler LT, Heinzmann BM, Vargas AC, Baldisserotto B. Lippia alba essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. *An Acad Bras Cienc.* 2015; 87(1): 95-100.
96. Gehring R, Riviere JE. Limitations of MIC as the sole criterion in antimicrobial drug dosage regimen design: the need for full characterization of antimicrobial pharmacodynamic profile especially for drug-resistant organisms. *Vet J.* 2013; 198(1): 15–8.
97. Ribeiro SM, Fratucelli ÉDO, Bueno PCP, de Castro MK V, Francisco AA, Cavalheiro AJ, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts from distinct Brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med.* 2019; 19(1): 308.
98. Zabara A, Mezzenga R. Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases. *J Control Release.* 2014; 188: 31-43.
99. Souza C, Watanabe E, Borgheti-Cardoso LN, De Abreu Fantini MC, Lara MG. Mucoadhesive system formed by liquid crystals for buccal administration of poly (hexamethylene biguanide) hydrochloride. *J Pharm Sci.* 2014; 103(12): 3914-3923.

100. Nunes KM, Teixeira CC, Kaminski RC, Sarmiento VH, Couto RO, Pulcinelli SH, Freitas O. The monoglyceride content affects the self-assembly behavior, rheological properties, syringeability, and mucoadhesion of In situ-gelling liquid crystalline phase. *J Pharm Sci.* 2016; 105(8): 2355-64.
101. Pretes PS, Chorilli M, Chiavacci LA, Scarpa MV, Leonardi GR. Physicochemical characterization and rheological behavior evaluation of the liquid crystalline mesophases developed with different silicones. *J Dispers Sci Technol.* 2009; 31(1): 117-23.
102. Chang, JY, Oh, YK, Choi, H, Kim, YB, Kim, CK. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. *Int J Pharm.* 2002; 241:155-63
103. Calixto GMF, Victorelli FD, Dovigo LN, Chorilli M. Polyethyleneimine and chitosan polymer-based mucoadhesive liquid crystalline systems intended for buccal drug delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19(2): 820-36.
104. Jones DS, Brown AF, Woolfson AD. Rheological characterization of bioadhesive, antimicrobial, semisolids designed for the treatment of periodontal disease: transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis. *J Pharm Sci.* 2001; 90(12): 1978-90.
105. Andrews GP, Lavery TP, Jones DS. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 71(3): 505-18.
106. Brighenti FL. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de produtos naturais contra microorganismos de interesse odontológico [tese]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA
UNESP – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa: “Sistema cristal líquido bioadesivo contendo citral contra bactérias cariogênicas e efeito na perda mineral do esmalte dentário” de responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro, da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. O objetivo do estudo será avaliar a atividade de uma formulação farmacêutica contra micro-organismos de interesse odontológico. A sua participação na pesquisa será apenas com o fornecimento de saliva. Os procedimentos para coleta de saliva serão:

Você terá que ficar sem escovar os dentes durante 24 horas e sem ingerir alimentos ou líquidos por 2 horas antes da coleta. A salivagem será estimulada por meio da mastigação de goma de mascar sem sabor, um material que não causa prejuízo à saúde. Serão coletados o equivalente a 15 ml de saliva (cerca de duas colheres de sopa), esta será armazenada no Laboratório de Pesquisas Bioquímica e Microbiológica da Faculdade de Odontologia de Araraquara e utilizada para a formação de biofilmes (acúmulo de micro-organismos) sobre lamínulas de vidro. O material coletado não será utilizado para outras pesquisas além da descrita nesse termo de consentimento livre e esclarecido.

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar e receberá uma via desse termo de consentimento livre e esclarecido. Esta pesquisa não trará nenhum benefício imediato em relação à sua pessoa, porém, poderá contribuir para o desenvolvimento de um material para prevenção da cárie dentária. Os riscos são considerados mínimos e incluem o desconforto de permanecer em jejum e sem escovação pelos períodos determinados. Para minimizar tais riscos, após a coleta, será servido um desjejum e você receberá uma limpeza profissional dos dentes.

Não haverá pagamento pela colaboração, mas você terá direito a ressarcimento dos custos tais quais, transporte e alimentação, referentes a você e ao seu acompanhante, caso solicite. Você também terá direito à indenização em caso de danos decorrentes dessa pesquisa. Você receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa.

Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O sigilo da sua identidade será preservado pela pesquisadora, ou seja, você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo, mas os dados encontrados nessa pesquisa poderão ser divulgados em revistas da área, aulas e congressos. Os avanços resultantes desse estudo serão informados a você no final do estudo.

Em caso de dúvida ou qualquer outro esclarecimento, você poderá entrar em contato com a Professora responsável, Elisa Maria Aparecida Giro na Faculdade de Odontologia de Araraquara (Rua Humaitá, 1680) ou pelo telefone 3301-6336 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Rua Humaitá, 1680) ou pelo telefone 3301-6459.

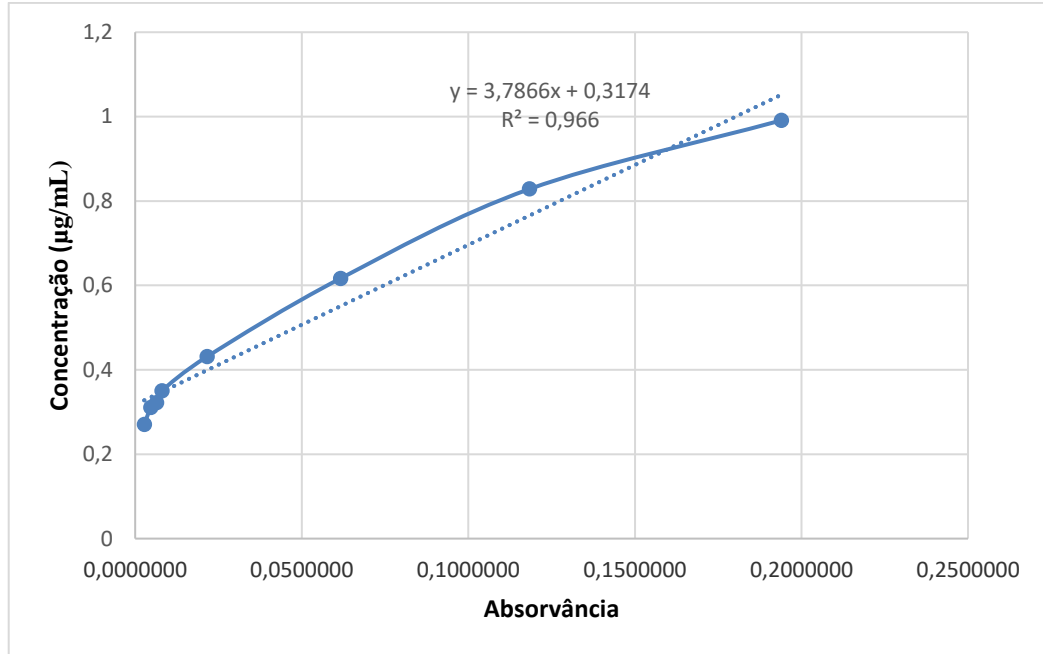
Sendo assim, eu, _____, RG _____ tendo sido informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Araraquara, __/__/__.

Pesquisadora

Participante da Pesquisa

APÊNDICE B – CURVA PADRÃO DO CITRAL EM ÁLCOOL ETÍLICO ABSOLUTO (99,8%) /PBS, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR (R²)



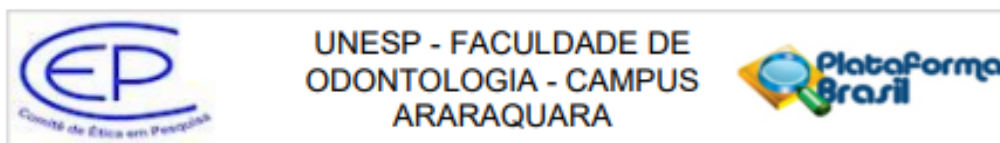
APÊNDICE C –MÉDIA DE DUREZA DA POUPULAÇÃO TOTAL DE BLOCOS E SEUS INTERVALOS DE CONFIANÇA

Tabela - Média de dureza da população total de blocos e seu intervalo de confiança

	Grupos						
	C	T	CLX	CLX1.3	C	F	FC2
Bloco 01	359,4	367,4	365,6	355,8	368,4	367,8	361,8
Bloco 02	362,8	361,6	367,2	359,2	368,4	354,2	363,0
Bloco 03	369,2	356,4	358,6	361,8	364,6	358,4	354,2
Bloco 04	361,0	357,2	345,8	347,0	348,2	351,4	374,2
Bloco 05	357,6	357,6	374,2	366,0	355,4	363,6	365,8
Bloco 06	362,8	344,8	366,0	369,8	367,6	366,6	369,4
Bloco 07	362,2	369,2	361,8	357,0	359,4	366,0	370,0
Bloco 08	346,6	361,8	359,8	361,4	365,8	369,4	365,4
Bloco 09	375,6	351,8	357,0	363,2	357,8	342,4	359,0
Bloco 10	358,8	371,8	365,4	357,2	353,6	361,0	349,2
Bloco 11	375,6	359,4	357,0	366,4	368,0	364,4	361,6
Bloco 12	358,6	368,4	356,6	367,6	359,6	364,8	365,2
Bloco 13	353,8	368,4	362,2	367,2	361,6	367,8	356,6
Bloco 14	363,2	370,2	367,2	358,2	363,2	366,8	348,2
Média	361,9	361,9	361,7	361,3	361,5	361,8	361,7
IC(95%)	(357,9-365,9)	(358-365,8)	(358,2-365,2)	(358,2-364,4)	(358,3-364,7)	(357,8-365,8)	(357,7-365,6)

Fonte: Elaboração própria.

ANEXO A- PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efetividade de um sistema mucoadesivo de liberação modificada contendo citral contra bactérias cariogênicas e na prevenção da perda mineral do esmalte dentário

Pesquisador: Elisa Maria Aparecida Giro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41924721.8.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

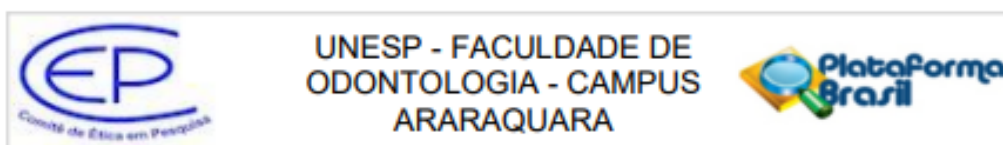
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.538.921

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apresentação do projeto de pesquisa cujo resumo consta: "Somado ao grande incentivo para o uso de produtos naturais com ação antimicrobiana, existe o desafio para o desenvolvimento de formulações de fácil aplicação na cavidade bucal e que permitam a liberação controlada da substância ativa. Portanto, o objetivo deste estudo será avaliar a efetividade de um sistema mucoadesivo de liberação modificada contendo citral contra bactérias cariogênicas e na prevenção da perda mineral do esmalte dentário. O citral será incorporado a um sistema composto por ácido oleico, tensoativo e dispersão aquosa de poloxamer 1%, em concentração 15 vezes a sua concentração inibitória mínima. O sistema será caracterizado físico-quimicamente e terá o perfil de liberação do citral determinado. Para as análises microbiológica e de perda mineral do esmalte, o sistema contendo o citral será comparado com o sistema sem citral e com o citral livre. A solução de digluconato de clorexidina 0,12% e a água destilada serão usadas como controle positivo e negativo, respectivamente. O crescimento dos biofilmes será feito sobre blocos de esmalte bovino (n=14 por grupo), utilizando inóculo polimicrobiano obtido a partir da saliva de um doador, em meio de cultura McBain com adição de sacarose, a 37 °C com 5% CO₂, por 5 dias. O sistema será aplicado em dias alternados, enquanto o citral livre, a clorexidina e a água destilada serão aplicados diariamente. A acidogenicidade será avaliada pelo pH do meio de cultura antigo, enquanto, a concentração de bactérias totais, bactérias acidúricas e Streptococcus do



Continuação do Parecer: 4.538.921

grupo mutans, e a concentração de polissacarídeos insolúveis em água, serão avaliadas no biofilme. Nos blocos de esmalte será avaliada a dureza de superfície inicial e final e calculada a porcentagem de perda de dureza superficial. A análise estatística adequada será determinada após o teste de normalidade da distribuição dos dados, e o nível de significância adotado será de 5%.*

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a efetividade de um sistema mucoadesivo de liberação modificada contendo citral contra bactérias cariogênicas e na prevenção da perda mineral do esmalte dentário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos relativos à participação nesta pesquisa no momento da coleta da saliva são considerados mínimos e incluem o desconforto de permanecer em jejum por 2 horas e sem escovar os dentes por 24 horas. Para minimizar tais riscos, após o procedimento, será servido um desjejum e participante receberá uma limpeza profissional dos dentes. Além disso, o pedaço de filme de parafina usado para estimular a salivagem poderá ser engolido. Se isso acontecer, ele se dissolverá no estômago do mesmo modo como uma goma de mascar se dissolve sem causar prejuízo à sua saúde. Todas as informações referentes ao participante serão arquivadas em local seguro e a divulgação dos resultados da pesquisa em congressos e/ou publicações em revistas científicas será feita de forma a não identificar o participante.

Benefícios: Esta pesquisa não trará nenhum benefício direto e imediato em relação ao participante da pesquisa, porém, contribuirá para o avanço do conhecimento na área da odontologia e poderá contribuir para o desenvolvimento de um material para prevenção e/ou tratamento precoce da cárie dentária, do qual o participante e outras pessoas poderão se beneficiar no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo nacional, unicêntrico, do tipo experimental in vitro com uso de saliva humana para formação de biofilme para testes de atividade anti-biofilme e anti-cárie de um sistema mucoadesivo contendo citral.

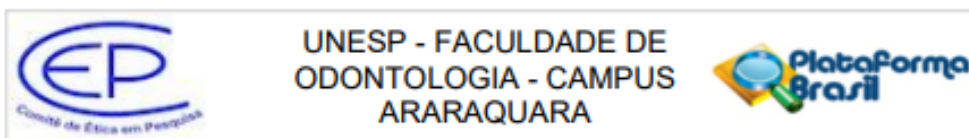
Patrocinador: não há.

Número de participantes incluídos: 1

Não haverá armazenamento de amostras em banco de material biológico

Previsão de início: 06/05/2021 e encerramento do estudo: 02/02/2023

Crterios de inclusão: Para inclusão no estudo, o doador de saliva deverá ter entre 25 e 30 anos de idade, bom estado de saúde geral e bucal, e não poderá ter feito uso de antibióticos, antifúngicos e enxaguatórios bucais nos últimos seis meses e deverá apresentar fluxo salivar estimulado 0,7



Continuação do Parecer: 4.538.921

mL/min.

Forma de abordagem do participante doador de saliva para a pesquisa: não foi informado no projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: folha de rosto, projeto de pesquisa, orçamento, protocolo PB Informações, cronograma, autorização para uso do laboratório, autorização para uso da clínica, Previsão de ressarcimento de gastos aos voluntários da pesquisa, Termo de compromisso do pesquisador, TCLE.

Recomendações:

Vide campo conclusões ou pendências e lista de inadequações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugere-se a aprovação, condicionada a inserção no relatório parcial da forma de abordagem ao único participante da pesquisa.

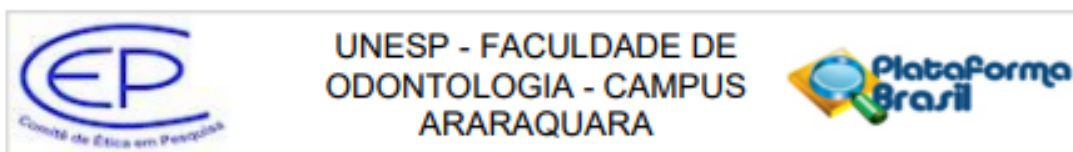
Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 11 de fevereiro de 2021.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_1675351.pdf	11/01/2021 14:18:17		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_Responsavel_Laboratorio.pdf	11/01/2021 11:41:19	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	11/01/2021 11:40:22	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	11/01/2021 11:39:49	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_Chefe_Departamento.pdf	11/01/2021 11:39:04	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito
Outros	Previsao_de_ressarcimento.pdf	08/01/2021 21:27:17	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE.pdf	08/01/2021 21:21:43	Elisa Maria Aparecida Giro	Aceito



Continuação do Parecer: 4.538.921

Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/01/2021 21:21:43	Elisa Maria Aparecida Giro	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_Pesquisador_responsavel.pdf	08/01/2021 21:20:59	Elisa Maria Aparecida Giro	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisa_Completo.pdf	08/01/2021 21:18:40	Elisa Maria Aparecida Giro	Acelto
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	08/01/2021 21:15:37	Elisa Maria Aparecida Giro	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 12 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

ANEXO B –CADASTRO DO PROJETO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO- SISGEN



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A9051AD

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A9051AD**
 Usuário: **UNESP**
 CPF/CNPJ: **48.031.918/0001-24**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Citral Citral

Título da Atividade: **Efetividade de um sistema mucoadesivo de liberação modificada contendo citral contra bactérias cariogênicas e na prevenção da perda mineral do esmalte dentário.**

Equipe

Juliana Rios de Oliveira	UNESP
Elisa Maria Aparecida Giro	UNESP
Fernanda Lourenção Brighenti	UNESP
Marius Chorilli	UNESP

Data do Cadastro: **16/07/2022 17:53:41**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **12:20** de **16/09/2022**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de defesa

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 03 de novembro de 2022.

Juliana Rios de Oliveira