



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



Cristiano Silva Pontes

**Avaliação da incorporação de Geraniol em nanoemulsões e micelas:
caracterização, atividade antibiofilme e citotoxicidade**

Araraquara

2022



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



Cristiano Silva Pontes

**Avaliação da incorporação de Geraniol em nanoemulsões e micelas:
caracterização, atividade antibiofilme e citotoxicidade**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia, Área de Implantodontia

Orientador: Prof^a Dr^a Denise M. P. Spolidorio

Araraquara

2022

P814a	Pontes, Cristiano Silva Avaliação da incorporação de Geraniol em nanoemulsões e micelas: caracterização, atividade antibiofilme e citotoxicidade / Cristiano Silva Pontes. -- Araraquara, 2022 127 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientadora: Denise Madalena Palomari Spolidorio 1. Óleos voláteis. 2. Nanotecnologia. 3. Biofilmes. 4. Peri-implantite. 5. Estudos de viabilidade. 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.

Cristiano Silva Pontes

**Avaliação da incorporação de Geraniol em nanoemulsões e micelas:
caracterização, atividade antibiofilme e citotoxicidade**

Comissão julgadora

**Tese para obtenção do Título de Doutor em Odontologia, Área de
Implantodontia**

Presidente e Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º Examinador: Prof^a Dr^a Janaína de Cássia Orlandi Sardi

3º Examinador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

4º Examinador: Prof^a Dr^a Natália Leal Vizoto

Araraquara, 20 de junho de 2022.

Dedico esse trabalho a minha filha Mariana,
minha maior força nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e familiares por me apoiarem na realização deste sonho; obrigado mãe por todo esforço pela minha educação e por ser essa mulher batalhadora.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Denise, que tornou possível a execução desse trabalho. Obrigado por ter confiado em mim e por ter me acolhido nesse momento tão especial em minha vida.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, pela disponibilidade, colaboração e compartilhamento de conhecimento, fundamentais para o desenvolvimento e concretização desse trabalho.

A todos professores, técnicos, funcionários, porteiros, meninas da limpeza e colegas de laboratório, que de alguma forma contribuíram para a execução desse estudo.

A todos amigos adquiridos em Araraquara/SP.

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

À FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À SEMSA – Secretaria de Saúde de Manaus, por ter concedido o Afastamento para Estudo.

Aos membros da banca examinadora, por dedicaram parte do seu tempo na avaliação deste trabalho.

À minha amada companheira, algumas pessoas possuem o destino de se encontrar...

A todos, meus sinceros agradecimentos!

“A vida é a arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida”

*Vinícius de Moraes**

* Moraes V. Samba da benção. Rio de Janeiro: Philips; 1971.

Pontes CS. Avaliação da incorporação de Geraniol em nanoemulsões e micelas: caracterização, atividade antibiofilme e citotoxicidade [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar nanoemulsões lipídicas (NEs) e micelas (NMs) incorporadas com o composto natural geraniol (GE), e avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* destas nanopartículas sobre biofilmes de microrganismos periodontopatogênicos e células NOK-SI. A NE foi constituída de 10% de fase oleosa (colesterol), 10% de surfactantes [fosfatidilcolina de soja e polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58®), 1:2] e 80% fase aquosa (tampão fosfato). A NM foi formulada com 5% de surfactantes (fosfatidilcolina de soja e Brij58®), 90 a 95% de fase aquosa e 1% de geraniol. A incorporação do geraniol foi realizada por sonicação e as características físico-químicas e estabilidade das nanopartículas foram analisadas após sua formulação e no período de 6 meses a 1 ano. Avaliou-se a atividade antimicrobiana das nanoemulsões contra cepas planctônicas de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (JP2), e a atividade antibiofilme de *C. albicans*, *S. mutans*, e biofilme misto de *C. albicans* e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) sobre corpos de prova de Titânio. Os resultados foram submetidos à ANOVA 1-fator com correção de Welch e pós teste de Games-Howell, com nível de significância de 5%. O geraniol incorporado à nanoemulsão (GE-NE) e à micela (GE-NM) apresentaram tamanhos médios de 230 nm e 93 nm, PDI de 0,155 e 0,151, respectivamente, com boa estabilidade e homogeneidade após 6 meses a 1 ano de formulação. As concentrações acima de 300 µg/mL do GE e GE-NE foram citotóxicas e a GE-NM reduziu 4 vezes o efeito citotóxico do GE comparado ao composto puro. Os resultados indicaram uma atividade antimicrobiana das nanoemulsões contra *as cepas testadas*, mas apenas biofilmes de *C. albicans* sofreram redução significativa (6,3 Log₁₀) nas concentrações não-citotóxicas da GE-NE (< 300 µg/mL) e GE-NM (< 600 µg/mL).

Palavras-chave: Óleos voláteis. Nanotecnologia. Biofilmes. Peri-implantite. Estudos de viabilidade.

Pontes, CS. Evaluation of Geraniol incorporation in nanoemulsions and micelles: characterization, antibiofilm activity and cytotoxicity. [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

Abstract

The objective of this work was to synthesize and characterize lipid nanoemulsions (NEs) and micelles (NMs) incorporated with the natural compound geraniol (GE), and to evaluate the in vitro antimicrobial and cytotoxic activity of these nanoparticles on biofilms of periodontopathogenic microorganisms and NOK-SI cells. The NE consisted of 10% oil phase (cholesterol), 10% surfactants [soy phosphatidylcholine and polyoxyethylene 20-cetyl ether (Brij 58®), 1:2] and 80% aqueous phase (phosphate buffer). NM was formulated with 5% surfactants (soy phosphatidylcholine and Brij58®), 90 to 95% aqueous phase and 1% geraniol. The incorporation of geraniol was performed by sonication and the physicochemical characteristics and stability of the nanoparticles were analyzed after their formulation and in the period from 6 months to 1 year. The antimicrobial activity of the nanoemulsions was evaluated against planktonic strains of *Candida albicans* (ATCC 90028), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (JP2), and the antibiofilm activity of *C. albicans*, *S. mutans*, and mixed biofilm of *C. albicans* and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) on Titanium specimens. The results were submitted to 1-factor ANOVA with Welch correction and post-Games-Howell test, with a significance level of 5%. The geraniol incorporated into the nanoemulsion (GE-NE) and the micelle nanoemulsion (GE-NM) presented average sizes of 230 nm and 93 nm, PDI of 0.155 and 0.151, respectively, with good stability and homogeneity after 6 months to 1 year of formulation. Concentrations above 300 µg/mL of GE and GE-NE were cytotoxic and GE-NM reduced 4 times the cytotoxic effect of GE compared to the pure compound. The results indicated an antimicrobial activity of the nanoemulsions against the tested strains, but only *C. albicans* biofilms suffered a significant reduction (6.3 Log 10) in the non-cytotoxic concentrations of GE-NE (< 300 µg/mL) and GE-NM (< 600 µg/mL).

Keywords: Oils, volatile. Nanotechnology. Biofilms. Periimplantitis. Feasibility studies.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO.....	14
2.1Objetivos específicos	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Peri-implantite	15
3.1.1 Etiologia da peri-implantite	16
3.1.2 Fatores de risco	22
3.1.2.1 Periodontite	22
3.1.2.2 Má higiene oral	22
3.1.2.3 Diabetes	23
3.1.2.4 Tabagismo	24
3.1.2.5 Sobrecarga oclusal	24
3.1.3 Tratamento da peri-implantite	25
3.2 Óleos Essenciais	28
3.2.1 Geraniol	29
3.2.1.1 Atividade anti-inflamatória	31
3.2.1.2 Atividade antimicrobiana	31
3.3 Nanotecnologia	32
3.3.1 Nanoemulsões	35
3.3.2 Micelas	37
4 MATERIAL E MÉTODO	41
4.1 Material	41
4.2 Método	44
4.2.1 Desenvolvimento das nanoemulsões	44
4.2.1.1 Incorporação dos compostos na NE lipídica	45
4.2.2 Desenvolvimento e caracterização da micela de geraniol	45
4.2.3 Caracterização estrutural dos sistemas	46
4.2.4 Atividade antimicrobiana.....	48
4.2.4.1 <i>Candida albicans</i>	48
4.2.4.2 <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	49
4.2.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	51
4.2.5 Atividade antibiofilme	52
4.2.5.1 Biofilme de <i>C. albicans</i>	52
4.2.5.1.1 Quantificação do biofilme (UFC/mL).....	53
4.2.5.1.2 Caracterização morfológica pela técnica de <i>Microscopia eletrônica de Varredura com Emissão</i> <i>de Campo (MEV-FEG)</i>	53

4.2.5.1.3 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL).....	54
4.2.5.2 Biofilme de <i>Streptococcus mutans</i>	54
4.2.5.3 Biofilmes mistos de <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> em corpos de prova de titânio	55
4.2.5.3.1 Quantificação do biofilme.....	55
4.2.5.3.2 Microscopia confocal de varredura laser (MCVL)	57
4.2.5.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
4.2.6 Citotoxicidade	57
4.2.6.1 Obtenção dos compostos e soluções testadas.....	58
4.2.6.2 Ensaio de viabilidade celular (Alamar Blue).....	59
4.2.6.3 Microscopia de fluorescência	60
4.3 Análise Estatística	60
 5 RESULTADO	 62
5.1 Desenvolvimento e Caracterização da GE-NE	62
5.2 Avaliação da Estabilidade da GE-NE no Decorrer de 6 a 12 Meses Após a Formulação.....	68
5.3 Caracterização da Micela de Geraniol (GE-NM)	70
5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	71
5.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i> do Geraniol Incorporado a uma Nanoemulsão sob Cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	72
5.6 Análise da Atividade Antibiofilme.....	74
5.6.1 <i>Candida albicans</i>	75
5.6.2 <i>Streptococcus mutans</i>	79
5.6.3 Biofilme misto de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i> sobre corpos de prova de Titânio.....	80
5.7 Citotoxicidade	85
 6 DISCUSSÃO.....	 89
 7 CONCLUSÃO.....	 100
 REFERÊNCIAS	 101
 ANEXO A – COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA.....	 126

1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários revolucionaram a reabilitação protética de pacientes edêntulos parciais e totais, e novos materiais e designs possibilitaram uma taxa de sobrevida de 94% no período superior a 13 anos^{1,2}. Entretanto, a peri-implantite (PI) é a principal doença infecciosa que compromete sua estrutura de suporte biológica, com prevalência de 9,25% a 19,83% baseada em implantes e sujeitos, respectivamente^{3,4}, acarretando a perda dos implantes e suas próteses. O desenho e as superfícies rugosas destes implantes e conectores protéticos podem representar um ambiente propício para adesão de microrganismos orais e formação de biofilme. Bactérias proteolíticas, anaeróbias⁵⁻⁸, espécies de *Streptococcus*^{9,10}, e *Candida albicans*^{5,6} estão envolvidos na modulação da virulência de biofilmes bacterianos em estágios iniciais e tardios de PI.

Os métodos utilizados para o tratamento das doenças periimplantares como o debridamento mecânico e uso de antimicrobianos podem danificar as propriedades de superfície dos implantes ou promover a resistência bacteriana¹¹. A clorexidina é considerada o padrão-ouro na redução dos microrganismos periodontopatogênicos e possui um excelente desempenho no controle químico, entretanto, acarreta na alteração da coloração dos dentes, descamação da mucosa oral, sensibilidade e alteração do paladar¹². Além disso, não há consenso para o tratamento de infecções periimplantares devido à heterogeneidade dos estudos e à variabilidade dos tipos de superfícies de implantes¹³⁻¹⁵.

Diante disso, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de se desenvolver novos fármacos e diferentes produtos naturais estão sendo estudados como agentes alternativos na tentativa de suprimir a destruição dos tecidos periodontais e periimplantares, auxiliando na remoção do biofilme de superfície, prevenção e tratamento periodontal¹⁶. Os produtos naturais apresentam características notáveis, como excelente diversidade química, propriedades químicas e biológicas e menor toxicidade¹⁷.

O geraniol (GE) é o constituinte comum de vários óleos essenciais, como a citronela, e é amplamente usado como um produto químico em fragrâncias cosméticas e uso no lar¹⁸. Além de apresentar baixa toxicidade, suas propriedades efetivas como repelente e inseticida para o controle de pragas, apresentaram boa atividade quimiopreventiva, assim como propriedades antimicrobianas, antioxidantes

e anti-inflamatórias¹⁹⁻²². Portanto, as propriedades promotoras do GE incentivam estudos a fim de explorar e viabilizar formulações de produtos contendo este composto. Contudo, possui elevada volatilidade exacerbada com o aumento da temperatura, curto tempo de ação e grande hidrofobicidade.

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar da ciência com inúmeras aplicações, e tem proporcionado uma alternativa promissora para a pesquisa e desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos através do seu encapsulamento em sistemas nanométricos propiciando uma melhor estabilidade e proteção aos extratos voláteis contra a degradação ambiental, e permitindo uma melhor distribuição do composto ao seu local de ação, fator que proporciona uma série de benefícios ao paciente, como aumento da eficácia terapêutica, redução de doses, menor número de administrações e diminuição dos efeitos colaterais^{17,23,24}.

Inúmeras nanopartículas vêm sendo utilizadas como sistemas de transporte de fármacos²⁵, e os sistemas coloidais possuem vantagens devido à sua capacidade de proteção e encapsulamento de soluções bioativas insolúveis (lipofílicas ou hidrofílicas)²⁶. As nanoemulsões são sistemas constituídos de uma fase contínua e uma fase dispersa e podem ser formadas por dispersão do óleo na água ou água em óleo, permitindo a incorporação de diferentes substâncias ativas. Possuem facilidade de preparação, composição simples, estabilidade termodinâmica e baixo custo de produção, proporcionando uma vantagem substancial a essa tecnologia como carreadora de substâncias hidrofóbicas²⁷⁻²⁹.

Os surfactantes são compostos orgânicos anfifílicos que contêm grupos hidrofóbicos e hidrofílicos que podem organizar-se sob condições ambientais específicas em estruturas organizadas denominadas micelas. Estas são formadas por um núcleo hidrofóbico interno, no qual fármacos pouco solúveis em água podem ser aprisionados e por uma casca hidrofílica externa que isola a droga encapsulada do meio externo³⁰⁻³³. Possuem tamanho aproximado de 5 a 200 nm e se formam dependendo da concentração micelar crítica (CMC) das moléculas anfifílicas, podendo ser utilizadas como sistema de distribuição de compostos de tamanho nanométrico, fornecendo maior solubilidade e estabilidade aos fármacos hidrofóbicos³⁴, além de evitar a eliminação precoce via filtração glomerular com consequente melhoria da absorção celular.

Portanto, os sistemas nanoestruturados surgem como alternativas eficazes e seguras à incorporação do GE com objetivo de aumentar o seu tempo de ação,

permitindo a sua liberação de forma mais lenta, garantindo um espalhamento nas superfícies³⁵. Além disso, possibilitam uma melhor biodegradabilidade, tolerabilidade e biodisponibilidade do fármaco a fim de orientar sua ação para o local específico de interesse³⁶.

Em vista do problema exposto, há grande interesse em desenvolver novas estratégias de tratamento e controle da PI. Isso inclui a busca de novas fontes de moléculas bioativas com capacidade antimicrobiana, eficiência farmacológica e baixos níveis de efeitos colaterais. Este projeto propõe avaliar a incorporação do geraniol em nanoemulsões e o seu efeito em biofilmes microbianos envolvidos na iniciação e progressão da Peri-implantite.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a incorporação do geraniol em sistemas nanoestruturados, atividade antimicrobiana em biofilmes orais e periimplantares e citotoxicidade.

2.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão (NE) incorporada com Geraniol (GE);
- Analisar a estabilidade da NE incorporada com GE (GE-NE) no decorrer de 6 a 12 meses após a formulação;
- Desenvolver e caracterizar uma micela incorporada com Geraniol (GE-NM);
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do GE, GE-NE e GE-M sobre cepas de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, e *Staphylococcus aureus*;
- Analisar a atividade antibiofilme da GE-NE e GE-NM em biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*;
- Analisar a atividade antibiofilme da GE-NE e GE-NM em biofilmes mistos de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em corpos de prova de Titânio;
- Avaliar a citotoxicidade do GE, GE-NE e GE-NM sobre células de queratinócitos orais humanos (NOK-SI);

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os implantes dentários vêm sendo utilizados há alguns anos e propiciaram uma revolução na Odontologia, principalmente na Reabilitação protética de indivíduos edêntulos parciais e totais, com restabelecimento da função, estética e consequente melhoria da sua qualidade de vida^{37,38}. Semelhante à dentição natural, os implantes dentários ficam situados entre os ossos maxilares e a cavidade oral, e a mucosa ao seu redor forma uma barreira entre os dois ambientes. O equilíbrio entre estas estruturas de suporte periimplantares garantem a estabilidade e o sucesso dos implantes a longo prazo.

3.1 Peri-implantite

Complicações na região periimplantar não são raras, podendo ocorrer doenças inflamatórias similares à doença periodontal, acarretando em perda óssea progressiva ocasionada principalmente devido à presença de biofilme³⁹ e comprometendo a saúde do implante. Essas doenças são definidas como lesões inflamatórias que circundam os tecidos periimplantares e compreendem a mucosite periimplantar (MP) e peri-implantite (PI)^{40,41}.

A MP é definida como uma doença inflamatória reversível limitada à mucosa circundante de um implante, evidenciada pela mudança de contorno e cor da mucosa, e sangramento à sondagem, enquanto a PI é uma doença inflamatória que afeta progressivamente o osso de suporte associado com sangramento à sondagem ou supuração, sinais clínicos de inflamação, aumento das profundidades de sondagem e/ou recessão da margem da mucosa, além da perda óssea radiográfica^{42,43}.

Estudos relataram que a MP afeta 50-90% dos implantes em 80% dos indivíduos, enquanto 20% dos implantes desenvolvem PI após 5 a 11 anos em função⁴⁴⁻⁴⁶. Numa revisão sistemática realizada com o objetivo de avaliar a prevalência, extensão e gravidade das doenças periimplantares, a prevalência de MP e PI variaram de 19 a 65% e de 1 a 47%, respectivamente (intervalo de confiança de 95%, IC). As meta-análises estimaram prevalências ponderadas médias de MP e PI de 43% (IC: 32-54%) e 22% (IC: 14-30%), respectivamente³⁸. A prevalência da PI depende de fatores como a população em investigação e os parâmetros estabelecidos para avaliação da doença, sendo difícil estimar sua ocorrência global devido à heterogeneidade dos estudos⁴³.

3.1.1 Etiologia da peri-implantite

Implantes dentários vêm sendo utilizados para reabilitação de pacientes edêntulos há mais de quatro décadas, entretanto, a documentação da natureza infecciosa da doença ocorreu duas décadas depois⁴⁷, e quaisquer falhas que os dentistas encontravam àquela época eram relacionadas a parâmetros diferentes de microrganismos, como a sobrecarga oclusal⁴⁸, pois acreditava-se que as bactérias associadas à periodontite eram removidas da cavidade oral juntamente com os dentes extraídos.

A colonização bacteriana foi mais tarde considerada como a principal causa de doenças periimplantares (DPI). Foram realizados estudos iniciais em animais para avaliar a reação do tecido periimplantar após a formação do biofilme e observaram o estabelecimento de lesões inflamatórias na mucosa periimplantar após o acúmulo de placa em beagles^{49,50}. Outro estudo avaliou o efeito da formação de placa nos dentes e implantes em cães beagle, constatando que os tecidos periimplantares e periodontais reagiram semelhantemente. Foi gerada uma resposta inflamatória caracterizada pelo aumento da transmigração de leucócitos e pelo estabelecimento de uma lesão de tecido conjuntivo⁵¹.

Posteriormente na literatura, avaliações do acúmulo de placas em implantes também foram analisados em estudos humanos. Os primeiros estudos utilizaram microscopia eletrônica de contraste de fase direta para examinar a microflora subgingival de 17 implantes dentários. Os implantes saudáveis e sem sinais de inflamação apresentaram uma colonização predominantemente cocóide, mas quatro implantes que exibiam bolsas profundas e perda óssea demonstraram altos níveis de espiroquetas^{52,53}.

Outro estudo analisou a microbiota associada à PI e implantes saudáveis utilizando-se microscopia, métodos de cultura e imunoquímicos, evidenciando-se um maior número de unidades formadoras de colônias, predominância de bastonetes anaeróbios Gram-negativos, bactérias fusiformes, *Fusobacterium* spp. e espiroquetas nos sítios doentes comparados aos implantes saudáveis, que apresentaram uma ampla comunidade cocóide facultativa⁵⁴.

As DPI são consideradas análogas à gengivite e à periodontite, com algumas diferenças na resposta do hospedeiro⁵⁵. Inúmeros estudos foram realizados com o objetivo de comparar a flora microbiana da periodontite e da PI. O início da colonização bacteriana no implante é análogo à do dente e acontece no momento que

o implante dentário é exposto na cavidade oral, sendo coberto por uma camada de película salivar composta de proteínas, glicoproteínas e lipídios. A película adquirida desencadeia a colonização bacteriana, fornecendo receptores para a adesão dos microrganismos. Os primeiros colonizadores são *Estreptococos* e *Actinomyces* spp.^{56,57} que adequam as condições para o acúmulo de bactérias de colonização tardia, como as espécies de *Fusobacterium* e *Prevotella*^{58,59}.

Estudos encontraram diferenças na película formada nos dentes e implantes, que incluíam mucinas de alto peso molecular, α -amilase salivar e glicoproteínas ricas em prolina no titânio. Não foram detectadas mucinas de baixo peso molecular geralmente presentes em películas de esmalte⁶⁰. Entretanto, apesar das diferenças existentes entre as películas adquiridas, a sequência de formação do biofilme foi considerada idêntica⁴², e os dentes e implantes apresentam o mesmo perfil microbiano⁶¹. A composição bacteriana do biofilme formado nos implantes assemelha-se muito à dos dentes vizinhos^{62,63} e esta funciona como um reservatório para biofilmes que se acumulam nos tecidos periimplantares.

A microbiota periimplantar saudável consiste principalmente de cocos Gram-positivos, bacilos não móveis e um pequeno número de anaeróbias Gram-negativas, semelhantes à saúde gengival⁵⁴. Na evolução para mucosite observa-se aumento da presença de cocos, bacilos móveis e espiroquetas, comparável à gengivite³⁹, e a mudança para PI é caracterizada com o surgimento de espécies Gram-negativas, móveis e anaeróbias encontradas comumente na periodontite. Entretanto, a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella Forsythia* e *Treponema denticola* podem ser maiores na PI⁶³⁻⁶⁵.

Além disso, diversos estudos realizados com tecnologias moleculares baseadas em metagenômica e de cultura para identificação de microrganismos têm demonstrado a presença de bactérias oportunistas e que não estão associadas às doenças periodontais^{63,66-68}. Leveduras, bacilos entéricos e *Staphylococcus* spp. estavam presentes em áreas periimplantares com tecidos inflamados e saudáveis⁶⁷. Posteriormente, utilizando-se técnicas de cultura como o sequenciamento do ácido ribossômico 16S (rRNA), observaram que a microbiota das lesões periimplantares são mais complicadas do que se supunha anteriormente⁶⁹. Outro estudo analisou amostras periimplantares sadias e doentes de 40 pacientes, concluindo que a PI é uma infecção mais simples e heterogênea comparada à periodontite, e que os tecidos

periimplantares podem abrigar bactérias periodontais que diferem das observadas adjacentes aos tecidos periodontais⁶³.

Uma revisão sistemática avaliou perfis microbiológicos de PI, periodontite e implantes saudáveis com base em estudos que avaliaram biofilmes microbianos e microbiomas inteiros com o objetivo de estabelecer suas semelhanças e diferenças. Os resultados mostraram colonização de microrganismos periodontais na periodontite, implantes saudáveis e PI. *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedius/nigrescens* foram identificadas em locais de PI, além de anaeróbias Gram-positivas, Gram-negativas e bactérias oportunistas como *Staphylococcus aureus*⁷⁰.

Esse resultado também foi observado em outro estudo que avaliou a presença de microbiota oportunista como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., e leveduras, com prevalência considerável desses microrganismos, concluindo que as superfícies dos implantes podem abrigar bactérias diferentes das periodontopatogênicas⁷¹.

Técnicas de PCR e pirosequenciamento demonstraram que o microbioma periimplantar é distinto do periodontal devido à topografia e características imunológicas dos implantes serem diferentes às dos dentes^{6,9}. Uma série de microrganismos que não são encontrados na periodontite foram identificados na PI, que incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas* spp., fungos *Candida* spp.^{7,47,67,72-74} e *Streptococcus anaerobius*, *Escherichia coli*, e *Streptococcus* spp.⁷⁴

Escassos estudos têm focado no papel efetivo desses patógenos na DPI. Acredita-se que eles podem sustentar e piorar as infecções orais pós cirúrgicas em bolsas subgengivais juntamente com as bactérias periodontopatogênicas putativas que comumente estão associados às formas agressivas de PI, manifestando resistência aos agentes terapêuticos, além de serem fontes potenciais de infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos⁷⁵. Portanto, apesar de escassos estudos sobre suas funções etiopatogenéticas, seus fatores de virulência sugerem sua participação na patogênese da PI, principalmente *Candida albicans*⁷⁶.

A patogenicidade de *Candida* envolve uma série de fatores de virulência, incluindo dimorfismo, secreção de enzimas hidrolíticas, adesão e formação de biofilme no epitélio mucoso e em dispositivos médicos^{77,78}. A colonização de leveduras de

superfícies bióticas e abióticas é o primeiro passo no desenvolvimento de biofilmes, seguido pela divisão celular e geração de micro colônias que contribuem para a maturação de um biofilme definido pela presença de hifas e leveduras (células sésseis) dispersas em uma matriz extracelular e consequente soltura de algumas células possibilitando colonizar novas superfícies e desencadear novos focos de infecção⁷⁹. *C. albicans* foi identificada em biofilmes de implantes com PI devido a sua capacidade de interação com proteínas da parede celular de espécies de *Streptococcus*⁸⁰, que são considerados os colonizadores iniciais desses biofilmes⁸¹.

Este fungo pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão da doença devido à sua capacidade de colonizar superfícies epiteliais, inibindo a função de neutrófilos polimorfonucleares e a secreção de enzimas líticas como collagenases, fosfolipases e proteínas, facilitando a penetração na célula epitelial e posterior invasão do tecido conjuntivo gengival degradando as imunoglobulinas⁸². Além disso, *Candida albicans* podem induzir reações inflamatórias e coagregarem-se a diferentes microrganismos, especialmente várias espécies de *Streptococcus* e *Fusobacterium nucleatum*, contribuindo para a formação de biofilmes multiespécies⁸³.

Dados de prevalência e epidemiologia molecular de leveduras e distribuição de espécies relacionadas à PI ainda são escassos. As leveduras são habitantes comumente isoladas da cavidade oral⁸⁴ e também foram identificadas em pacientes com periodontite⁸⁵ e PI^{67,86,87}. Um estudo analisou e correlacionou organismos fúngicos e espécies bacterianas em locais de PI através de ensaio PCR em tempo real e TaqMan para a quantificação de *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra*, *Tannerella forsythia*, *Mycoplasma salivarium*, *Veillonella parvula*, e *Staphylococcus aureus*. A prevalência de organismos fúngicos foi maior na PI (31,6%) e em locais de implante saudáveis (40%), sendo menores nos dentes selecionados (20%). Nos locais de implante, os organismos fúngicos foram significativamente correlacionados com *P. micra* e *T. forsythia*⁸⁸.

Outro estudo teve como objetivo determinar a prevalência e distribuição de leveduras no biofilme periimplantar e estudar a relação genética de *Candida albicans*. Leveduras foram isoladas de amostras de biofilme periimplantar e amostras bucais de 40 pacientes imunocompetentes e não fumantes que receberam reabilitação oral com implantes há mais de 5 anos. As análises foram efetuadas através de RAPD-PCR, e a prevalência de leveduras no sulco periimplantar foi de 73%, sendo *C. albicans* a

espécie mais prevalente nos 2 locais de amostragem, sugerindo que o biofilme periimplantar favorece o crescimento de espécies de leveduras, e que *C. albicans* presentes no biofilme originaram-se da infecção endógena de cepas comensais⁸⁹.

As próteses sobre implantes podem representar um nicho ecológico favorável ao crescimento de espécies de leveduras, especialmente em implantes com reabilitação protética removível de acrílico que favorece a adesão de *Candida* spp., sendo *C. albicans* a mais prevalente. Além disso, dispositivos bucais aumentam a quantidade de leveduras localmente e em toda a mucosa⁹⁰. As características das próteses dentárias confeccionadas com resinas acrílicas como rugosidade, hidrofobicidade e forças eletrostáticas favorecem a adesão do microrganismo e posterior formação de um biofilme^{91,92}. O manejo dessa infecção é dificultado devido à alta resistência do biofilme de *Candida* spp. aos agentes antifúngicos e ao contato contínuo da prótese infectada com a mucosa⁹³⁻⁹⁵.

Biofilmes de *C. albicans* foram desenvolvidos sobre discos de titânio com perfis de rugosidade diferentes para avaliar se diferentes topografias da superfície do implante influenciam a sua formação. O ângulo de contato e a energia livre de superfície (ELS) foram determinados para cada grupo. Os discos de titânio com menor rugosidade apresentaram menor ELS e formação de biofilme de *C. albicans* comparados com as superfícies com rugosidade maior, sugerindo que a ELS pode ser um fator mais determinante para a formação de biofilme em superfícies de titânio do que a rugosidade⁹⁶.

A presença concomitante de microrganismos envolvidos na patogênese da PI com *C. albicans* parece aumentar sua produção de hifas e a expressão de enzimas hidrolíticas e genes associados à adesão⁹⁷. A constatação de que os fungos podem esgotar o nível de oxigênio no interior de biofilmes formados por microrganismos de espécies mistas incentivou a produção de estudos que avaliassem a interação de anaeróbicos obrigatórios com *C. albicans* na cavidade oral⁹⁸. Vários relatórios recentes identificaram possíveis interações entre *P. gingivalis* e *C. albicans* que podem permitir a cooperação de ambos os microrganismos para o desenvolvimento mútuo de biofilmes e invasão de hospedeiros^{98,99}.

Um recente estudo teve como objetivo avaliar como a função protetora de *C. albicans* dentro de biofilme misto com *Porphyromonas gingivalis* atua nas células hospedeiras de contato. A coexistência microbiana influenciou a imunidade do hospedeiro atenuando as respostas do macrófago e do fibroblasto. Além disso, a

produção de citocinas diminuiu comparada à infecção bacteriana pura. Os fibroblastos isolados de pacientes com periodontite grave foram menos suscetíveis à colonização fúngica, indicando uma modulação do ambiente hospedeiro pela infecção bacteriana dominante¹⁰⁰.

Efeito semelhante foi observado em biofilme misto de *F. nucleatum* e *C. albicans*, onde a coagregação de ambos os microrganismos reduziu a produção de MCP-1 e TNF- α . Essa proteção mútua contra a eliminação de micróbios por fagócitos foi proposta como o mecanismo subjacente ao aumento da persistência bacteriana¹⁰¹.

Outro microrganismo rotineiramente isolado do biofilme da superfície do implante é o *Streptococcus mutans*, bactéria gram-positiva que facilita a colonização da superfície de titânio pelos colonizadores bacterianos secundários¹⁰², levando ao estabelecimento de um ambiente microbiano anaeróbio gram-negativo⁶⁵. Isolados de *S. mutans* têm capacidade exponencial de formar biofilme e sobreviver em baixos valores de pH¹⁰³, além de produzir uma matriz polimérica insolúvel com grande afinidade por superfícies sólidas como os implantes¹⁰⁴.

Devido à topografia da superfície dos implantes¹⁰⁵ e das espécies bacterianas envolvidas na colonização precoce de biofilmes periimplantares, *S. mutans* tem uma alta capacidade e afinidade de coagregar com bactérias patogênicas como *Porphyromonas gingivalis* e foi encontrado em um nível mais alto ao redor de implantes infectados do que implantes saudáveis⁹, podendo participar do processo de desenvolvimento da PI e consequente falha do implante¹⁰⁶.

Um estudo avaliou a influência das bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus* e *Actinomyces odontolyticus* na virulência e patogenicidade de biofilmes de *Candida*. Biofilmes mistos foram gerados em acrílico ou utilizados para colonizar um modelo de epitélio oral humano reconstituído (EOHR) e avaliados através da observação de hifas, expressão dos genes de virulência de *Candida*, atividade da lactato desidrogenase (LDH) e pela invasão da *Candida* no tecido. Os resultados demonstraram que as infecções mistas exibiram maiores proporções de hifas, aumento da regulação de IL-18 (codifica um gene pró-inflamatório), maior atividade de LDH e invasão de tecidos, sugerindo cuidados no tratamento de biofilmes de *Candida* associados a essas bactérias¹⁰⁷.

3.1.2 Fatores de risco

Vários fatores de risco potenciais relacionados ao paciente, incluindo histórico de Periodontite, má higiene oral, diabetes e tabagismo estão associados ao desenvolvimento da doença¹⁰⁸. Entretanto, há baixa evidência de que a idade do paciente, osteoporose, ausência de mucosa queratinizada, características da superfície do implante e edentulismo sejam fatores de risco para peri-implantite^{109,110}.

3.1.2.1 *Periodontite*

Inúmeros estudos sugerem que o histórico de periodontite pode ser considerado fator de risco à PI^{42,55,66,111-114}. Uma revisão sistemática mostrou uma incidência significativamente maior de PI e perda óssea periimplantar em indivíduos com perda dentária associada à periodontite¹¹⁵, e outra meta-análise demonstrou que portadores de periodontite apresentavam maior risco de falha do implante e maior perda óssea comparativamente àqueles com periodonto saudável¹¹⁶, sugerindo que a periodontite é um fator de risco para a PI e perda do implante, e que pacientes com histórico de periodontite têm maior perda de implante-osso⁷⁰.

Quanto à origem da colonização periimplantar por bactérias periodontopatogênicas, foi realizado um estudo que avaliou amostras de placa subgingival de dentes adjacentes a implantes. A detecção de bactérias periodontopatogênicas foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e foi constatado que os periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* e *F. nucleatum* podem ser transmitidos de dentes naturais aos implantes adjacentes¹¹⁷.

No entanto, novas evidências sugerem que os implantes osseointegrados criam microambientes únicos que forçam a adaptação e seleção microbiana, e que os ecossistemas periimplantares e periodontais diferem de muitas maneiras, sendo necessários novos estudos que reavaliem a hipótese de “reservatório microbiano” e identificação de espécies que desempenham um papel etiológico na doença periimplantar através da transmissão dos dentes¹¹⁸.

3.1.2.2 *Má higiene oral*

A avaliação local de risco relatou que os implantes em pacientes com deficiente higiene bucal apresentaram uma probabilidade de desenvolverem PI 3,8 vezes maior comparativamente àqueles com higiene oral adequada¹¹⁹, e modelos de regressão

logística mostraram que o acúmulo de placa aumentam as chances de ter mucosite periimplantar¹¹⁴. Ensaios clínicos também estabeleceram uma associação entre deficiente controle de placa e PI¹²⁰.

A administração de instruções personalizadas de higiene oral ao paciente é essencial para capacitá-lo na manutenção desses bons hábitos. Contudo, estudos demonstraram que a maioria dos pacientes têm dificuldade na remoção completa e consistente da placa, comprometendo as práticas eficazes de higiene oral ao longo do tempo. Os pacientes devem ser orientados pelos dentistas sobre as condições e a necessidade de adotar higiene oral específica adaptada às suas necessidades, com instruções de métodos de limpeza da prótese e da margem gengival^{121,122}.

3.1.2.3 Diabetes

A influência do diabetes na PI tem sido amplamente investigado. Um estudo de coorte retrospectivo de 21 anos avaliou 4.680 implantes em 1.140 pacientes, relatando uma taxa de sucesso significativamente menor (68,75%) entre os pacientes diabéticos em comparação com sujeitos não diabéticos (85%)¹²³.

Duas revisões sistemáticas relatadas sobre os efeitos de doenças sistêmicas na PI revelaram que pacientes diabéticos tinham maior risco de PI, apresentavam índice gengival, as sondagens de profundidades e a perda óssea maiores comparados aos pacientes com PI diabética bem controlada^{124,125}.

O estado hiperglicêmico desencadeia um aumento do estresse, inflamação oxidativa, apoptose e alteração da função dos polimorfonucleares na cavidade oral. Os mecanismos que promovem a destruição periodontal em diabéticos correspondem à resposta imune inflamatória no hospedeiro¹²⁶, associado ao acúmulo de resposta inflamatória provocada por biofilme bacteriano¹²⁷. Concomitante, há elevação dos níveis de glicose sanguínea com liberação de produtos finais de glicação avançada (PFGA), estimulando a expressão do receptor para PFGA (RPFGA) que são aderidos ao crescimento fibroblástico em tecidos periodontais¹²⁸, podendo ocorrer mecanismo semelhante na patogênese de destruição tecidual periimplantar¹²⁹.

Por outro lado, dados de estudos existentes revelam que o corpo de evidências ainda é imaturo, e a contribuição específica de doenças de saúde sistêmicas como o diabetes para a PI requer investigações epidemiológicas e clínicas adicionais^{125,130}, e que a terapia com implantes dentários em indivíduos com diabetes revelaram um

processo de reparação semelhante aos indivíduos saudáveis quando a condição metabólica estava controlada.

3.1.2.4 Tabagismo

Pacientes tabagistas, com má higienização oral e histórico de periodontite são mais propensos a desenvolverem PI e necessitam de avaliações contínuas de acompanhamento para eliminação de fatores de risco¹³¹. Evidências crescentes sugerem que o tabagismo é um fator de risco significativo para a perda do implante após o carregamento funcional^{109,130,132}, e aumentam a prevalência de PI⁴⁵. Como as bactérias desempenham um papel etiológico importante na patogênese da PI, uma investigação foi realizada para compreender o impacto do tabagismo no microbioma periimplantar visando melhorar os resultados terapêuticos, e os resultados sugeriram que o tabagismo molda os microbiomas periimplantares apresentando uma comunidade rica em patógenos, indicando a necessidade de uma terapêutica personalizada para controle e prevenção dessas doenças¹³³.

Uma meta-análise avaliou 40000 implantes dentários colocados em condições de risco, como tabagismo, radioterapia, osteoporose e diabetes. A influência da osteoporose no risco de falha do implante dentário foi direta, mas não significativa ($n = 4$; $RR = 1,09$; $IC\ 95\%, 0,79-1,52$), concluindo-se que o tabagismo e a radioterapia estavam associados ao aumento do risco de falha do implante dentário, e a relação entre diabetes, osteoporose e o risco de falha do implante necessitam de um estudo mais aprofundado¹³⁰.

3.1.2.5 Sobrecarga oclusal

A pesquisa sobre o efeito potencial das forças oclusais traumáticas na PI apresentam resultados contraditórios. Um dos primeiros relatos sobre sobrecarga oclusal veio do grupo de estudo de Isidor em um modelo animal. Em seu estudo, foi examinada a influência da sobrecarga oclusal e/ou acúmulo de placas, e após alguns meses de carregamento o resultado histológico mostrou que seis de oito implantes com sobrecarga perderam osseointegração após 4 e 5 meses e nenhum dos implantes com acúmulo de placa apresentaram perda óssea, concluindo-se que a sobrecarga oclusal pode ser o principal fator de perda óssea para um implante já osseointegrado¹³⁴. Resultados semelhantes foram relatados por estudos posteriores^{135,136}.

Em contrapartida, outro estudo avaliou pilares protéticos instalados em supra e infra-oclusão em cães Beagle, e não encontraram perda de osseointegração ou perda óssea marginal nas próteses sem inflamação e sobrecarregadas nos implantes dentários. Os autores demonstraram que houve aumento do osso periimplantar nas próteses sobrecarregadas na ausência de inflamação¹³⁷, corroborando com outro estudo que também avaliou o efeito dos contatos supraoclusais em implantes colocados em cães, e não se observou diferença na resposta óssea periimplantar após 8 meses em função¹³⁸.

Devido divergências nas metodologias de estudos anteriores, o papel da sobrecarga oclusal não está claramente definida. Evidências recentes sugerem que a magnitude da força pode influenciar a resposta óssea marginal, com forças de maior magnitude resultando em perda óssea marginal. No entanto, ainda faltam ensaios clínicos controlados randomizados bem desenhados, e ainda não há evidências de que a sobrecarga oclusal influenciaria o início ou progressão da PI¹³⁹.

Uma recente revisão sistemática realizou uma abrangente análise das revisões sistemáticas e meta-análises relativas à PI em humanos, apesar das limitações das revisões incluídas no estudo, os resultados sugeriram que (1) a ocorrência de PI foi maior em pacientes com periodontite, fumantes, e decorridos 5 anos de função do implante; (2) o perfil microbiano da PI foi diferente da periodontite; (3) o risco de PI foi maior em pacientes com diabetes descompensado e doenças cardiovasculares; (4) não houveram evidências de tratamento mais eficaz para PI, e (5) a manutenção pós-implantação é indispensável em pacientes com alto risco de PI¹⁴⁰.

3.1.3 Tratamento da peri-implantite

O tratamento das infecções periimplantares compreendem abordagens conservadoras (não cirúrgicas) e cirúrgicas, dependendo da gravidade da doença periimplantar (mucosite, peri-implantite moderada ou grave)¹³¹. O desenvolvimento da PI tem características similares à periodontite⁵⁵, entretanto não há consenso sobre uma terapia padronizada na PI. O tratamento consiste na resolução do processo inflamatório periimplantar por meio do controle do biofilme e preservação dos tecidos moles e duros, avaliando-se o sangramento à sondagem, diminuição de bolsas e estabilidade do nível ósseo¹⁴¹.

Um estudo sugeriu quatro etapas para garantir o sucesso do tratamento da PI: 1) pré-tratamento, onde preconiza-se a higiene oral; 2) acesso cirúrgico com a

utilização de substitutos ósseos e membranas regenerativas; 3) controle infeccioso pós-operatório com o uso de antibióticos e antissépticos bucais como a clorexidina; 4) Manutenções periódicas de controle de 3 a 6 meses dependendo dos fatores de risco¹⁴¹.

O gluconato de clorexidina (1,1'-hexametileno bi [5-(p-clorofenil) biguanida] di-D-gluconato) (CHX) é um sal de gluconato e um composto de biguanida que possui atividade antimicrobiana de amplo espectro e promove a interrupção das membranas celulares¹⁴², sendo considerada o padrão ouro para prevenir o acúmulo de biofilme bacteriano induzido por placa nas doenças do tecido mole oral como a periodontite.¹⁴³ Entretanto, a CHX tem ações diferentes sobre bactérias, vírus e fungos e possui efeitos colaterais como a alteração da coloração extrínseca dos dentes, do paladar, e a resistência antimicrobiana a esses agentes antissépticos¹⁴⁴.

A terapia periodontal de suporte é necessária para reduzir a probabilidade de progressão da doença periodontal e início da PI¹⁴⁵. A terapia pré-cirúrgica de PI deve preconizar medidas de higiene oral que resultem na redução da mucosite e do biofilme, podendo utilizar-se abrasivos de ar e a laserterapia¹⁴⁶. Técnicas de debridamento mecânico da superfície do implante devem ser realizadas¹⁴⁷ através de instrumentos que causem menor injúrias à superfície do implante (curetas de teflon, carbono, plástico e titânio, sistema de escala ultrassônico)¹⁴⁸, podendo utilizar-se antissépticos orais e antibioticoterapia⁴³. Entretanto, a resolução completa da PI usando terapia mecânica, laserterapia ou terapia fotodinâmica não têm um resultado previsível^{147,149}.

Outros métodos de descontaminação incluem materiais de revestimento, limpeza mecânica, terapia fotodinâmica, tratamento anodizador, radiação sônica, tratamento térmico, tratamento de ultrassom, tratamento químico, tratamento eletroquímico, fármacos antimicrobianos, tratamento de argônio e probióticos¹⁵⁰.

A terapia cirúrgica pode ser ressectiva ou reconstrutiva¹⁵¹ e permite o debridamento do tecido de granulação presente no defeito periimplantar. A realização de uma implantoplastia por brocas diamantadas possibilita o alisamento das roscas dos implantes para um estado polido modificando a energia de superfície, podendo desencadear diferenças na formação óssea pós-cirúrgica peri-implantar¹⁵². Conjuntamente à ressecção, uma etapa regenerativa com a aplicação de biomateriais de substituição óssea associados a membranas pode ser utilizado objetivando a regeneração do tecido ósseo periimplantar. No entanto, esta terapia regenerativa

pode ser influenciada pela morfologia do defeito periimplantar e a quantidade de mucosa queratinizada¹⁵³.

O local da cirurgia ressectiva também influencia o prognóstico e resultado. A Ostectomia e osteoplastia combinadas com implantoplastia podem representar uma terapia eficaz para reduzir ou mesmo parar a progressão da PI. No entanto, devido ao aumento das recessões pós-operatórias, este procedimento não é recomendado em áreas estéticas¹³¹.

Após a terapia cirúrgica, a manutenção da higienização oral pelo paciente é imprescindível para o sucesso do tratamento a longo prazo. A PI pode ocorrer cinco a 10 anos após a instalação do implante e pode recidivar após o tratamento. Uma profundidade de sondagem de 5 mm sem sangramento pode sugerir a estabilização da perda óssea e resultado satisfatório da terapia periimplantar¹⁵⁴.

Sangramento à sondagem pode indicar a cessação da perda óssea e o resultado bem-sucedido da terapia de PI^{141,155}. A mobilidade do implante é sugestiva de perda óssea resultando na sua remoção, com debridamento do defeito periimplantar e regeneração do tecido, que poderá receber novo implante posteriormente⁷.

Diversos estudos de revisão e consensos têm sido realizados com o objetivo de estabelecer um protocolo de tratamento para a PI. No entanto, em contraste com a periodontite, não há atualmente conceitos estabelecidos e previsíveis para o tratamento da PI, e a prevenção primária é de fundamental importância. O manejo da mucosite periimplante é considerado como medida preventiva para o aparecimento de PI¹²¹.

Novas investigações clínicas são necessárias para determinar a superioridade de um método de descontaminação¹⁵⁶. A prevenção da perimucosite, que é o precursor da PI, pode ser alcançada eliminando-se a placa bacteriana por meio de higiene oral meticulosa. Práticas de desbridamento mecânico profissional, a posição incorreta do implante, seleção inadequada do paciente e a presença de resíduos de cimentos ou profundidades de sondagem profundas devem ser corrigidas^{14,157,158}.

Uma revisão sistemática seguida de meta-análise avaliou os diferentes protocolos propostos na literatura para reduzir a carga bacteriana e remover o biofilme das superfícies dos implantes infectados, incluindo tratamentos mecânicos, químicos, fotodinâmicos e a laser. No entanto, nenhum desses métodos mostrou-se eficaz para alcançar a descontaminação satisfatória da superfície do implante, e não há consenso

sobre os tratamentos mais vantajosos na recuperação da saúde periimplantar. O uso adjunto de antibióticos sistêmicos teve pouco ou nenhum impacto no sucesso do tratamento e o uso generalizado dessa terapia pode levar a eventos adversos e selecionar bactérias resistentes a antibióticos. As condições patológicas que se desenvolvem na PI colocam implantes risco e podem afetar a saúde do paciente. Como não há uma abordagem terapêutica eficaz e definitiva para a PI, a conduta preconizada é prevenir a infecção dos tecidos periimplantares¹³⁹.

3.2 Óleos Essenciais

A utilização de produtos naturais como medicamentos é uma prática antiga, que já destacava a importância do uso de plantas na forma de óleos essenciais. No antigo Egito, de acordo com tratados datados de 3000 a.C, óleos de girassol, alho e açafrão eram indicados como uso terapêutico¹⁵⁹. Atualmente, muitas espécies vegetais medicinais vêm sendo estudadas visando o entendimento de seu mecanismo de ação e isolamento dos princípios ativos¹⁶⁰. Devido aos problemas atribuídos a diversos produtos sintéticos para uso humano e para o meio ambiente, observa-se aumento na demanda e na utilização de produtos naturais. Além disso, a incidência de doenças causadas por microrganismos multirresistentes devido ao uso inadequado de antimicrobianos tem incentivado a pesquisa de novas alternativas terapêuticas¹⁶¹.

Os óleos essenciais são compostos líquidos, voláteis, límpidos, geralmente incolores, lipossolúveis ou solúveis em solventes orgânicos. Podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta e são resultantes do seu metabolismo secundário, sendo caracterizados por um odor forte e marcante que dependem de alguns componentes característicos. A maioria dessas substâncias pertencem à classe dos terpenos¹⁶², que são hidrocarbonetos com estrutura baseada na molécula de isopreno (C_5H_8), e são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (ou unidades C_5). Os hemiterpenos são compostos por uma unidade de isopreno (C_5), seguido pelos monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos (unidades maiores que C_{40}).

Alguns metabólitos secundários de origem vegetal derivados dos terpenos são chamados de terpenóides. Esses compostos contêm um grupo funcional ligado à cadeia carbônica além da molécula de isopreno podendo ser um álcool ($-OH$), éter ($-OR$), aldeído ($-COH$), ácido ($-COOH$), entre outros. Uma característica desses

compostos é o odor agradável que os tornam atrativos para indústrias de alimentos e fragrâncias, principalmente mono e sesquiterpenóides que possuem alta qualidade sensorial, e são os principais compostos utilizados como flavorizantes na indústria em geral¹⁶³. Além disso, apresentam propriedades bactericidas, fungicidas e propriedades medicinais, podendo ser utilizados no acondicionamento e preservação de alimentos na forma de embalagens bioativas¹⁶⁴.

Os extratos vegetais e óleos essenciais são capazes de exercerem atividade antimicrobiana ou realizam sinergismo com fármacos de referência, levando ao desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica para tratamentos¹⁶⁵. Eles podem agir contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de leveduras e fungos filamentosos¹⁶⁶. Esses compostos são capazes de exercerem atividade antimicrobiana por possuírem atividade protetora contra doenças, e devido a presença de monoterpenos em sua composição, diversas atividades terapêuticas e efeitos farmacológicos têm sido reportados com a sua utilização^{164,167,168}.

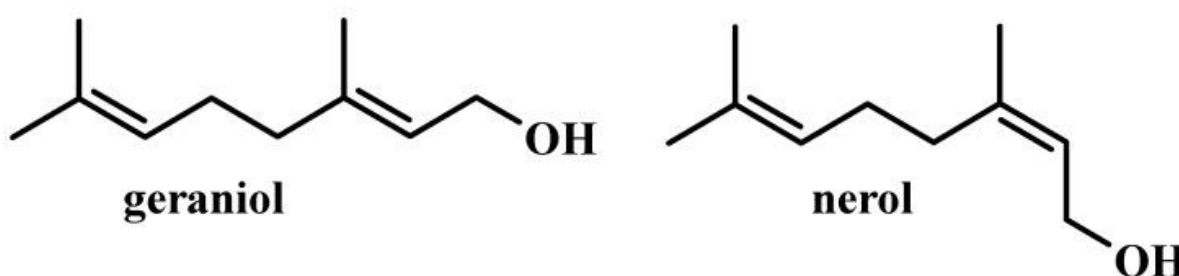
A ação antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída aos seus compostos fenólicos, que interagem com as proteínas das membranas celulares microbianas por meio de ligações de hidrogênio e interações iônicas ou hidrofóbicas causando uma deformação estrutural e funcional. Outro mecanismo pode ser evidenciado pela alteração da permeabilidade da membrana celular e mitocondrial ocasionando a perda de macromoléculas (glicídeos, lipídeos e proteínas), micronutrientes e a viabilidade celular^{165,169}. Além disso, a inibição da síntese de ácidos nucleicos e da atividade enzimática promovidas pelos óleos essenciais causam a inativação celular microbiana¹⁷⁰.

3.2.1 Geraniol

O geraniol (3,7-dimethilocta-trans-2,6-dien-1-ol) (Figura 1) é um monoterpeno alcoólico acíclico presente nos óleos essenciais, e isolado principalmente do óleo de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) (53,5 a 65%), óleo de bergamota selvagem (*Monarda fistulosa*), de rosas e de citronela¹⁸, onde convive com seu éster-isômero nerol e os produtos de oxidação geranial e neral. Geraniol (GE) puro é um óleo amarelo claro que se dissolve na maioria dos solventes orgânicos, mas possui baixa solubilidade em água, e é amplamente utilizado como um produto químico em fragrâncias cosméticas e para uso no lar¹⁷¹. Além de apresentar baixa toxicidade, suas propriedades efetivas como repelente e inseticida para o controle de pragas,

apresentaram boa atividade quimiopreventiva, e propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias^{19,20}.

Figura 1 - Estrutura química do geraniol e seu isômero nerol



Fonte: Elaboração própria.

O GE está presente em 76% dos desodorantes, e em 33% dos produtos cosméticos (shampoos, géis, cremes, loções e óleo de massagem) avaliados por uma pesquisa com produtos cosméticos de companhias da Europa e dos Estados Unidos¹⁷². O Conselho Europeu incluiu o GE na lista de substâncias que podem ser utilizadas em gêneros alimentícios com dose diária de 0,5 mg/kg de peso corporal/dia, e a *Food and Drug Administration* (FDA) reconheceram o GE como um produto seguro, não apresentando riscos ao empregá-lo como aromatizante¹⁷³.

Dados de estudos recentes demonstraram que o GE possui várias propriedades farmacológicas, incluindo antioxidante¹⁷⁴, anti-inflamatória¹⁷⁵, antimicrobiana¹⁷⁶, e atividades antitumorais^{177,178} através de múltiplas sinalizações de regulação de vias em diversos processos biológicos, sugerindo que o GE é um potencial candidato a fármaco e que as suas propriedades incentivam estudos a fim de explorar e viabilizar formulações de produtos contendo este composto²⁰.

3.2.1.1 Atividade anti-inflamatória

A inibição da resposta inflamatória e do estresse oxidativo previne danos aos órgãos, especialmente no cérebro. A peroxidação oxidativa e a reação inflamatória causada pelo 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetato (TPA) podem ser significativamente diminuídos pelo GE. Uma investigação demonstrou que o geraniol promove o metabolismo das células inflamatórias, aumenta o teor de glutathione e estimula atividades antioxidantes. Além disso, a GE exerce um efeito inibidor sobre a alteração da atividade p38MAPK e alivia a mudança de expressão de NF- κ B e COX-2 causada por TPA¹⁷⁹. Outros estudos exibiram que o GE poderia inibir inflamação através da inibição do COX-2^{180,181}, e ter um efeito inibidor na resposta inflamatória induzida por pamidronato, estimulando a produção de IL-10. Além disso, o GE não apresentou toxicidade nos monócitos e não impactou a produção de TNF- α ¹⁸¹.

3.2.1.2 Atividades antimicrobianas

Uma revisão recente de literatura revelou que as propriedades antimicrobianas do GE são consequências de seu caráter não polar, permitindo modificar a estrutura lipídica da membrana celular do microrganismo, tornando-a mais permeável a outros compostos como os antibióticos, permitindo sua penetração no interior da célula e limitando o crescimento do microrganismo, comprometendo sua sobrevivência¹⁸².

A *Escherichia coli* (EC) é um importante patógeno causador de diarreia e é considerada um problema de saúde para humanos, principalmente crianças menores de cinco anos residentes em países em desenvolvimento. A EC possui vários fatores de virulência para infectar seu hospedeiro, incluindo fatores de colonização e enterotoxinas. O GE mostrou inibir o crescimento da cepa de *E. coli*¹⁸³, entretanto, uma grande limitação de sua utilização na proteção de produtos alimentícios é a natureza hidrofóbica deste composto, dificultando a obtenção de uma dispersão uniforme em produtos alimentícios com alto teor de água, resultando em uma perda dramática da sua atividade.

Candida albicans é um patógeno fúngico responsável pela alta taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos^{184,185}. Uma recente pesquisa demonstrou que o tratamento com GE enfraquece as atividades de *Candida* spp., e que o uso oral de GE promove inibição na formação de biofilmes fúngicos e na formação de hifas. A ação do GE destruiu a função da parede celular, e reduziu a atividade da membrana plasmática (ATPase) e os níveis de ergosterol, suprimindo a

expansão fúngica. Além disso, GE afetou a função mitocondrial e a homeostase de ferro e mitigou a toxicidade genética^{21,186}.

Outro trabalho avaliou a atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), cujo maior constituinte é o GE, sobre cepas de *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus mutans* e *Candida spp.* em crescimento planctônico e em biofilme formado em corpos de prova de resina acrílica. Os resultados demonstraram que o *Cymbopogon citratus* apresentou atividade microbiostática e microbicida para todas as cepas analisadas, e as médias de UFC/mL isoladas e mistas dos biofilmes foram menores no grupo tratado em relação ao grupo controle¹⁸⁷.

A utilização do GE em aerossóis inibiu o desenvolvimento de patógenos como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*¹⁸⁸, e *Cryptococcus neoformans*, que é responsável pelo desenvolvimento de infecções resistentes a medicamentos em pacientes nos últimos estágios da AIDS. O Citronelol (concentração inibitória mínima, CIM = 64 µg/mL), nerol (CIM = 128 µg/mL) e GE (CIM = 64 µg/mL) também foram ativos *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* que causa tuberculose^{22,188}.

Apesar de todas as características benéficas do GE, ele é um composto instável podendo ser facilmente degradável devido à oxidação, volatilização, exposição à luz e ao aquecimento¹⁸⁹⁻¹⁹². Portanto, torna-se necessário contornar estas desvantagens, protegendo-o dos fatores externos, e aumentando a sua estabilidade. Deste modo, a nanotecnologia surge como uma alternativa para esta substância hidrofóbica, permitindo sua encapsulação por meio de uma nanoemulsão¹⁸⁹, e melhorando sua eficácia pela interação biológica.

3.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um ramo promissor da ciência que tem aplicação em diversas áreas como na agricultura, engenharias, química, farmácia, saúde, dentre outras. Inúmeros investimentos têm sido aplicados com resultados promissores como o desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos que permitem dosagem menores de fármacos com a mesma eficácia terapêutica, minimizando efeitos colaterais indesejados. O avanço e desenvolvimento de novas tecnologias de microscopia eletrônica permitiram o estudo desses sistemas nanoestruturados e sua utilização em diversas áreas da ciência¹⁹³.

Nano (do grego: “anão”) é um prefixo para designar uma parte em um bilhão e, assim, um nanômetro (1nm) corresponde a um bilionésimo de um metro. Um material ou dispositivo com suas dimensões compreendidas na escala nanométrica é constituído por um número reduzido de átomos e são observadas novas propriedades físicas e químicas que podem estar ausentes em sua escala macroscópica. Os materiais nanométricos apresentam um tamanho na faixa de 0,1 a 200 nm (campo da física) e até 1000 nm (área da saúde), com características e propriedades físico-químicas específicas comparadas aos materiais estruturados em escala macroscópica¹⁹³.

No campo da pesquisa médica e prática clínica, o conceito de nanotecnologia é conhecido como nanomedicina¹⁹³, e se tornou uma alternativa promissora no emprego e desenvolvimento de materiais ou substâncias carreadoras na escala nanométrica que podem servir como ferramentas de diagnóstico ou fornecer agentes terapêuticos a locais específicos de forma controlada, propiciando aumento da eficácia medicamentosa, redução da dose, toxicidade, e dos efeitos colaterais¹⁷.

Os nanocarreadores protegem as substâncias ativas contra mecanismos de inativação e degradação do organismo e possibilitam a incorporação de substâncias com polaridades distintas, promovendo a liberação prolongada e o direcionamento da ação do fármaco a determinado órgão ou tecido. Esses eventos ocorrem devido a diferentes fatores, como a maior superfície de contato das nanopartículas, permitindo maior absorção e distribuição do fármaco pelo tecido, além das propriedades físico-químicas do revestimento que possibilitam maior afinidade com o tecido alvo e maior proteção contra barreiras fisiológicas do organismo¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

Diferentes nanocarreadores têm sido desenvolvidos, como as nanopartículas poliméricas (NP), nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), lipossomas e micelas. Atualmente, recentes nanocarreadores como dendrímeros, nanoemulsões,¹⁹⁷ nanogéis, nanosuspensões, e nanotubos, têm demonstrado elevado potencial como sistema de entrega^{198,199}.

A seleção adequada da nanopartícula é imprescindível no sistema de liberação de fármacos, pois devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, possuir um tamanho, área e carga de superfície adequados. Os seus parâmetros físico-químicos devem ser ajustados para que sua funcionalidade possa ser alcançada e as substâncias ativas sejam incorporadas ao substrato e permaneçam estáveis permitindo uma liberação

controlada²⁰⁰. O Quadro 1 resume as características biofarmacêuticas e de segurança de algumas nanodrogas.

Apesar dos benefícios da nanotecnologia para várias áreas da ciência, alguns fatores negativos como alto custo, dificuldade de dimensionamento de processos e a fácil inalabilidade de nanopartículas, podem resultar em doenças pulmonares graves, e a outras doenças que ocasionam alterações na homeostase, podendo levar à morte.

Quadro 1 - Características biofarmacêuticas e de segurança de nanofármacos

Propriedades biofarmacêuticas		Segurança	
Vantagens	Desvantagens	Vantagens	Desvantagens
NP nanoprojeadas Melhor distribuição sistêmica; Alta retenção na camada mucosa; Várias rotas de dosagem disponíveis	Baixa potência de liberação sustentada	Diminuição da irritação gástrica dos AINEs	Risco tóxico devido à alta C_{max} potencial citotóxico
NP lipídicas Biodegradável; Entrega de fármacos específicos; Exposição sistêmica prolongada	Liberação rápida devido à rota de dosagem limitada da RES	Baixa toxicidade; Baixa antigenicidade	Citotoxicidade dependendo do surfactante usado
NP poliméricas Liberação estável de medicamentos <i>in vivo</i> ; Longa duração da ação	Necessidade de evitar explosão inicial; Rota de	Baixa imunogenicidade	Precisa ser removido cirurgicamente para polímeros não degradáveis
Dendrímeros Liberação controlada; Alta solubilidade; Entrega específica do tapete	Rota de dosagem limitada	Baixa imunogenicidade	Hemototoxicidade
Micelas Alta permeabilidade da membrana; Alta potência solubilizadora; Melhora da exposição sistêmica	Baixa potência de liberação sustentada	Baixa imunogenicidade	Risco tóxico devido à alta C_{max} potencial citotóxico; Citotoxicidade dependendo do surfactante usado
Nanoemulsões Biodegradável; Biodisponibilidade oral melhorada Solubilidade	Perda da atividade biológica da droga	Proteção contra toxicidade; Estabilidade cinética	Degradação por hidrólise; Risco de contaminação microbiológica

Abreviaturas: C_{max} , concentração máxima; AINEs, antiinflamatório não esteróide.

Fonte: Elaboração própria com dados de outros estudos^{26,28,201}.

3.3.1 Nanoemulsões

As nanoemulsões (NE) também conhecidas na literatura como emulsões ultrafinas, miniemulsões e emulsões submicrônicas são sistemas coloidais heterogêneos em que um líquido (fase dispersa) é disperso em gotículas de tamanho nanométrico em outro líquido (fase dispersante)²⁰². Podem ser misturas de óleo em água (O/A) ou água-em-óleo (A/O) ou dispersões múltiplas (O-A-O ou A-O-A)²⁰³ compostos por óleos comestíveis, surfactantes e água, com uma faixa de tamanho que difere entre vários autores: de 100-500 nm²⁰⁴⁻²⁰⁶; 20-200 nm²⁰⁷⁻²⁰⁹; 1-100 nm^{201,210-212}.

As NEs são os veículos ideais para o transporte de fármacos via parenteral, tópica, ocular, oral, pois têm a capacidade de solubilizar substâncias hidrofóbicas e proteger os fármacos da hidrólise e degradação enzimática. Além disso, possibilitam a liberação prolongada e controlada dos fármacos, reduzindo a frequência das aplicações. A menor possibilidade de floculação, sedimentação e cremação, associada com elevada área de superfície e energia livre as tornam mais vantajosas que as emulsões de partículas maiores^{213,214}, possibilitando uma maior capacidade de absorção da droga pelas membranas biológicas como a pele e mucosa intestinal²¹⁵.

As NEs são termodinamicamente instáveis e cineticamente estáveis e necessitam de alta ou baixa energia para sua formação²¹⁶. Os surfactantes ou emulsificantes e co-surfactantes são utilizados para garantir a estabilidade do sistema coloidal, diminuindo o estresse gerado podendo ser utilizados lipídeos ou proteínas/peptídeos biocompatíveis. Os emulsificantes diminuem a tensão interfacial interna e a energia superficial entre as fases dispersas e dispersantes, garantindo estabilidade ao longo do tempo²¹⁷.

As gotículas dispersas em uma NE são estabilizadas pelos surfactantes, e suas propriedades dependem das condições termodinâmicas, método de preparo e a sequência que são adicionados. A quantidade de emulsificantes varia de 3 a 10% (peso/volume) e podem ser não iônicos, anfifílicos, catiônicos ou aniônicos²¹⁵.

Atualmente, os surfactantes não iônicos como os poliméricos prevalecem nas formulações de novos sistemas carreadores de medicamentos, pois têm maior compatibilidade, estabilidade e menor toxicidade comparadas aos demais emulsificantes²¹⁵. Os Fosfolipídios são exemplos de surfactantes anfifílicos e também possuem ótima biocompatibilidade, e o hexadeciltrimetil brometo de amônio e o

dodecil sulfato de sódio são exemplos de emulsificantes catiônicos e aniônicos, respectivamente²¹⁸.

As NEs são cineticamente estáveis, entretanto, uma das fases pode separar-se após certo tempo de armazenamento devido a mecanismos de instabilidade²¹⁹. Os mecanismos de desestabilização são: 1) *floculação*, processo em que duas ou mais gotas se associam, mantendo sua integridade individual e aumentando o tamanho das gotículas. Ocorre quando as forças de atração de Van der Waals dominam as interações repulsivas eletrostáticas e estéricas; 2) *coalescência*, influenciada pelo tamanho das NEs e ocorrem quando duas gotas colidem e finalmente fundem²²⁰; 3) *amadurecimento de Ostwald*, principal fenômeno que altera a estabilidade das Gotículas das nanoemulsões, e consiste na diferença de solubilidade ou potenciais químicos entre as gotas menores e maiores da emulsão com intuito de diminuir a energia total do sistema. O uso de óleos insolúveis ou a adição de polímero lipossolúvel como surfactantes inibem esse amadurecimento²¹⁶; 4) *sedimentação*, é o movimento descendente das gotículas devido à sua maior densidade que o líquido circundante influenciadas pela força gravitacional. Emulsões de gotículas minúsculas têm maior movimento browniano que promove ação menor da gravidade, prevenindo a sedimentação. Outros fatores como composição do sistema, técnicas de emulsificação e temperatura de armazenamento contribuem para a sedimentação^{216,219}.

A utilização de sistemas de distribuição à base de NEs como um método para encapsular extratos naturais ativos lipofílicos dispersos em meio aquoso, tem surgido como uma excelente ferramenta para conceber novas terapêuticas antimicrobianas. Várias pesquisas recentes relatam a formação de NEs contendo óleos essenciais como uma estratégia para melhorar sua funcionalidade. Óleos essenciais incorporados em NEs promovem um aumento da permeabilidade nas membranas microbianas devido ao aumento da área por unidade de peso²²¹, reduzindo a concentração necessária para obter um efeito antimicrobiano comparada às emulsões convencionais.²²²

Um recente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de NEs preparadas com lecitina como surfactante e incorporadas com diferentes concentrações de óleo de anis contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Escherichia coli*), levedura (*Candida albicans*) e fungo (*Aspergillus niger*). Os resultados demonstraram que a NE à base de óleo de anis apresentou melhores

resultados contra *S. aureus* e *C. albicans*, através da ruptura das membranas externas e internas e interação com proteínas de membrana e alvos intercelulares²²³.

As NEs são sistemas heterogêneos de líquidos estruturados que necessitam de energia ou surfactantes para entrarem em equilíbrio. Portanto, a sua preparação envolve diversas técnicas de alta e baixa energia.

Os métodos de emulsificação de baixa energia utilizam energia química interna dos sistemas, e requerem apenas agitação suave para a produção das nanoemulsões²²⁴. Esses métodos envolvem a emulsificação de inversão de fase e a auto emulsificação, e não são utilizados na formulação de NEs de gêneros alimentícios pois utilizam elevadas concentrações de surfactantes comprometendo o sabor e a segurança desses ingredientes alimentares²²⁵.

Os métodos de alta energia mecânica geram elevadas forças disruptivas que rompem as gotículas maiores da emulsão em tamanhos nanométricos, produzindo as NEs²²⁶. Os dispositivos empregados são ultrassonicadores, microfluidizadores e homogeneizadores de alta pressão. Através dessa tecnologia, é possível controlar o tamanho das partículas, a estabilidade, reologia e cor da emulsão.

No método ultrassônico são produzidas ondas ultrassônicas que promovem um cisalhamento físico através da cavitação acústica levando à formação de microbolhas que sofrem colapso e provocam elevada turbulência, rompendo a estrutura das macroemulsões e se formando as NEs^{226,227}. Com este método, a variação da quantidade e tempo de energia ultrassônica dispensada permitem a formulação de nanopartículas de tamanho e estabilidade almejados²²⁷. Além disso, possibilitam a produção de NEs sem surfactantes, e novas formações de interface quando se irradia uma emulsão de óleo e água²²⁶.

3.3.2 Micelas

Micelas são nanoestruturas formadas em solução aquosa compostas por surfactantes anfifílicos (micelas não poliméricas) ou copolímeros anfifílicos (micelas poliméricas) utilizadas como sistema de carreamento de fármacos. A formação de micelas em solução aquosa ocorre quando a concentração do copolímero do bloco eleva-se acima de uma certa concentração chamada de concentração crítica de agregação (CAC) ou concentração micelar crítica (CMC). No CAC ou CMC, segmentos hidrofóbicos de copolímeros de blocos começam a associar-se para

minimizar o contato com moléculas de água, levando à formação de uma estrutura micelar vesicular ou de conchas centrais²²⁸.

Esse sistema de estrutura de conchas centrais ou núcleo hidrofóbico tem boa biocompatibilidade, alta taxa de carregamento de medicamentos, e elevado tempo de circulação *in vivo*. Fármacos com baixa solubilidade em água são encapsulados dentro do reservatório ou núcleo e estabilizados por surfactantes ou conchas poliméricas evitando sua difusão²²⁹.

As micelas poliméricas são mais estáveis, têm boa biodistribuição e ação prolongada comparadas às não poliméricas. Elas têm uma estrutura de concha central com tamanho que varia de 10 a 100 nm consistindo do ambiente hidrofílico externo composto principalmente de polietileno glicol (PEG) e núcleo hidrofóbico interno sintetizado por meio de moléculas como policaprolactona, polipropilenoglicóis, fosfolipídios e ácidos graxos, permitindo a incorporação de fármacos hidrofóbicos²³⁰. A concha hidrofílica externa proporciona estabilidade às micelas em ambiente aquoso e aumenta seu tempo de circulação na corrente sanguínea, protegendo-a do sistema retículo-endotelial (SRE) e favorecendo seu acúmulo em sítio específico²³⁰.

O pequeno tamanho das micelas também contribui para um maior tempo de circulação sanguínea, evitando a captura pelo sistema fagocítico mononuclear no fígado e contornando a filtração de células endoteliais no baço. Em última análise, o tempo de circulação mais longo leva a um melhor acúmulo em locais de tecido com anormalidades vasculares. Esta última característica particular fornece um dos argumentos mais fortes para o uso de micelas poliméricas como carreadoras de medicamentos anticancerígenos que também têm solubilidade muito baixa²²⁹.

As técnicas utilizadas para estudar as dimensões das micelas são a dispersão dinâmica de luz (DLS), dispersão de luz estática (DLE), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (MFA). A MET e a MFA fornecem imagens diretas de micelas e sobre a sua forma, que geralmente é esférica²²⁹.

O núcleo hidrofóbico é um componente fundamental na determinação da capacidade da micela de solubilizar um composto pouco solúvel em água. A capacidade do núcleo de encapsular o fármaco depende em grande parte da compatibilidade entre o núcleo hidrofóbico e a molécula do fármaco. Geralmente, uma boa indicação da compatibilidade é a semelhança estrutural entre a molécula do fármaco e a parte hidrofóbica ou cadeia lateral hidrofóbica do polímero anfifílico formador de núcleos. A compatibilidade também pode ser estimada comparando a

polaridade do composto de fármacos pouco solúveis em água e o segmento hidrofóbico do polímero²²⁹.

O equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) de copolímeros de blocos e polímeros e a razão de drogas (razão P/D) também são importantes para avaliar o encapsulamento de fármacos dentro do núcleo micelar. A relação P/D relativamente baixa permite a solubilização de fármacos, mas quando a compatibilidade entre a droga e o polímero do núcleo é baixa, a razão P/D geralmente deve ser aumentada para alcançar solubilização suficiente²³¹.

A escolha, proporção e a característica do tensoativo utilizado na preparação são baseadas na verificação dos valores do EHL das substâncias envolvidas. EHL significa o balanço entre as duas porções moleculares com características opostas de uma substância. É ele que permite predizer o tipo de comportamento esperado do composto frente a substâncias polares ou apolares²³¹.

Os tensoativos devem apresentar valor de EHL equivalente ao da fase dispersa para mantê-la estabilizada frente à fase dispersante. Para determinar o valor de EHL pode-se recorrer a dados da literatura ou equações baseadas na fórmula molecular do composto. Entretanto, quando o EHL de uma substância é desconhecido, o preparo de emulsões deve ser realizado utilizando-se tensoativos de EHL conhecidos²³².

Este sistema foi introduzido por Griffin em 1949 como uma escala numérica adimensional de valores entre 1 e 20 que é usada para descrever a natureza do agente tensoativo, sendo que os valores de EHL aumentam de acordo com a hidrofília da molécula. O equilíbrio hidrófilo/lipófilo de um tensoativo é uma propriedade importante no processo de emulsificação, pois determina o tipo de emulsão que será produzida. Agentes emulsivos de EHL baixo tendem a formar emulsões água/óleo, ao passo que aqueles com EHL alto formam emulsões óleo/água. Portanto, o conhecimento dos valores de EHL permite predizer o tipo de comportamento esperado do composto, fornecendo orientação para suas aplicações práticas²³².

Um recente trabalho avaliou a atividade antifúngica do extrato comestível de *piper* incorporado numa micela polimérica de Poloxamer (MPP) sobre *Candida albicans* presentes em portadores de prótese dentária e os resultados demonstraram que o efeito da MPP contra os albicanos foi significativamente maior do que o extrato simples, com uma concentração fungicida mínima (CFM) de 1,5 mg/mL. Em seguida foi desenvolvida uma solução com MPP para imersão de dentadura e realizado um

estudo clínico com voluntários obtendo-se uma redução de $86,1 \pm 9,2\%$ das cepas após a imersão diária das dentaduras em MPPs por 14 dias. A dureza e a rugosidade das próteses não foram afetadas, sugerindo que MPPs podem servir como uma solução natural contra a candidíase em portadores de próteses dentárias²³³.

Outra pesquisa avaliou nanopartículas micelares de o-palmitoyl chitosana (NPs) como carreadores de clotrimazol (CLT) para o tratamento tópico da candidíase vulvo-vaginal (VVC). O nanosistema apresentou liberação sustentada de pH até 24 horas, afetando tanto a atividade anti-*Candida* in vitro quanto a citotoxicidade. A plataforma nanoestruturada carregada (CLT) produziu valores favoráveis de índice de seletividade para um painel de cepas padrão e isolados clínicos de *Candida* spp. e linhas de células do trato genital feminino comparados com a droga livre. As NPs-CLT melhoraram a permeabilidade de fármacos *in vitro*, sugerindo que o nanocarreador pode fornecer níveis mais elevados do composto ativo ao tecido da mucosa²³⁴.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização da fase experimental do presente estudo, foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentos e equipamentos.

4.1 Material

Materiais de consumo

1. Acetona P.A.-A.C.S. (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
2. Ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS- Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA).
3. Ácido Acético (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
4. Água destilada;
5. Água mili-Q;
6. Alça de inoculação 10 µL, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil);
7. Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
8. Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
9. Cultura de *C. albicans* (ATCC 90028 - American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA);
10. Cultura de *S. aureus* methicillin-susceptible (MSSA - ATCC 25923 - American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA);
11. Etanol PA (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
12. Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL (Cral, Cotia, SP, Brasil);
13. Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
14. Meio de cultura Mannitol Salt Agar (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
15. Meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
16. Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com clorofenicol (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
17. Meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB - Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
18. Menadiona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
19. Metanol (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
20. Microtubos tipo Eppendorfs Graduado (Axygen, Curitiba, PR, Brasil);
21. Óleo de montagem (Vectashield - Vector Laboratories, Peterborough, Reino Unido);

22. Parafilme (Laboratory Film, Chicago, IL, EUA);
23. Paraformaldeído (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
24. Placas de 24 poços de fundo chato e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
25. Placas de 96 poços de fundo chato e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
26. Placas de 96 poços específica para testes de fluorescência (Greiner Bio ONE, Frickenhausen, Germany);
27. Placas de Petri 90X15 mm descartáveis e estéreis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
28. Pó de Cristal Violeta (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
29. Ponteiras brancas para micropipeta 10 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
30. Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
31. Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
32. Ponteiras para micropipeta 5 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
33. Ponteiras para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
34. Sal de Tetrazólium (XTT - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
35. Sistema de filtração a vácuo estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
36. Solução de lisozima (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
37. Trizma® hydrochloride (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
38. Tubos tipo Falcon de 50 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).

Instrumentos

1. Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
2. Bico de Bunsen (J.Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
3. Bisturi (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
4. Erlenmeyer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
5. Micropipeta de 0,1-10 μ L (Boeco, Hamburgo, Alemanha);

6. Micropipeta de 20-200 μ L (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
7. Micropipeta de 100-1000 μ L (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
8. Micropipeta de 1-5 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
9. Micropipeta de 1-10 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
10. Micropipeta Multicanal Discovery Comfort, 12 Canais, 50-300 μ L (HTL, Warsaw, Polônia);
11. Pinça clínica (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
12. Proveta graduada (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).

Equipamentos

1. Agitador de tubos Modelo: AP 56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
2. Agitador magnético Modelo: 78HW-1 (Andrade's Comércio e materiais Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
3. Autoclave vertical Modelo: AV 60 No 6614 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
4. Balança de precisão Modelo: BG 400 No 016450 (Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil);
5. Bomba a vácuo (Fanen, São Paulo, SP, Brasil);
6. Câmara de fluxo laminar vertical, Modelo: PA 115. No. 12898 (Pachane Ind. e Com. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil);
7. Centrífuga de microtubos Modelo: 2410 (Fanem, São Paulo, SP, Brasil);
8. Centrífuga de tubos Falcons Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha);
9. Contador de colônias Modelo: CP 600 Plus (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
10. Espectrofotômetro – (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha).
11. Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);
12. Estufa de CO₂ Modelo: L212 (Laboven, Qingdao, China);
13. Estufa para secagem e esterilização Modelo: MA 033 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);
14. Freezer -80°C (Thermo Scientific, EUA);
15. Incubadora de bancada shaker Modelo: Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);

16. Leitor de Microplacas Fluoroskan Ascent™ microplate fluorometer (Thermo Scientific, EUA);
17. Leitora de Microplacas TP Reader-Basic (ThermoPlate, São Paulo, SP, Brasil);
18. Micro-ondas Brastemp Crisp 27 (Brastemp, Manaus, AM, Brasil);
19. Microscópio - Tablelap Scanning Electron Microscope Modelo: TM-300 (Hitachi, Tokyo, Japan);
20. Microscópio de fluorescência Modelo: BX51 (Olympus, Tóquio, Japão);
21. Mini-Beadbeater-8 (Stratech Scientific, Soham, Reino Unido);
22. NanoDrop 1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific (Detroit, MI, EUA);
23. pHmetro (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil);

4.2 Método

Inicialmente realizou-se o desenvolvimento da NE e micela, sua caracterização, seguido de análise microbiológica e de viabilidade celular.

4.2.1 Desenvolvimento das nanoemulsões

Para o desenvolvimento da nanoemulsão (NE) e micelas foi utilizada metodologia baseada no trabalho de Formariz et al. (2010)²³⁵ e Bonifácio et al. (2015)²³⁶, com adaptações. Os experimentos de formulação da NE lipídica/micela e incorporação das concentrações de GE foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marlus Chorilli (Departamento de Fármacos e Medicamentos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

A NE lipídica foi composta de colesterol (CO, 10%) como fase oleosa, tampão fosfato (TP, 80%) como fase aquosa, e 10% dos tensoativos (2:1) polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58®, Sigma-Aldrich, EUA) e fosfatidilcolina de soja (FS, Epikuron® 200).

Para o preparo da NE, Brij 58® foi adicionado na fase aquosa (TP) à temperatura de 50°C; em seguida, acrescentou-se a FS misturando-se adequadamente para garantir uma completa homogeneização com auxílio de agitador magnético. Foi adicionado o CO e a mistura final foi homogeneizada durante 30 minutos.

Em seguida, a mistura foi sonicada utilizando-se aparelho Q700 da QSonica® com potência de 700 watts, amplitude de 13% em modo descontínuo durante 10 minutos com intervalo de 30 segundos a cada dois minutos e banho de gelo durante todo o processo. Após sonicação, as NEs foram centrifugadas a 4000 RPM por 15

minutos, para eliminar os resíduos de titânio liberados pela haste do sonificador. Todas as regiões dos sistemas foram classificadas visualmente como sistemas viscosos ou líquidos opticamente transparentes, translúcidos ou opacos, viscosos semitransparentes ou ainda separação de fases.

4.2.1.1 Incorporação dos compostos na NE lipídica

O geraniol foi incorporado nas mesmas condições descritas para a síntese da NE, mas com amplitude de 17%, obtendo-se a concentração final de 3000 µg/mL (determinada em estudo piloto).

4.2.2 Desenvolvimento e caracterização da micela de geraniol

Estudos prévios da citotoxicidade das GE-NEs demonstraram uma tendência de sedimentação da fase oleosa no fundo das placas de 96 poços após a diluição das NEs em meio de cultura DMEM, acarretando a obliteração da monocamada de células e consequente prejuízo da respiração celular. Portanto, este estudo teve como objetivo modificar a composição do sistema com a remoção do colesterol, e o desenvolvimento de uma micela de geraniol (GE-NM).

A determinação do EHL requerido para sintetização da micela (GE-NM; EHL=9,0) foi realizada a partir do EHL de 6,5 (tensoativo lipofílico fosfatidilcolina de soja) e do EHL de 15,2 (tensoativo hidrofílico Brij 58).

Para o cálculo das quantidades de tensoativos hidrofílicos e lipofílicos necessários para a obtenção do valor EHL final da GE-NM, utilizou-se a seguinte equação (1):

$$\text{EHL}_{\text{Final}} = \text{EHL}_A \times (\%) A + \text{EHL}_B \times (\%) B$$

Onde EHL_A é o valor do EHL da substância A e EHL_B é o valor de EHL da substância B.

A proporção dos surfactantes foi mantida constante 5% (p/p) enquanto a concentração de GE variou de 1% a 5% (p/p), conforme dados demonstrados na Tabela 1. O objetivo foi investigar a capacidade de emulsificação dos surfactantes de acordo com seus respectivos EHLs e determinar a quantidade de GE na formação das GE-NMs.

Tabela 1 - Valores de EHL utilizados na formulação das micelas de geraniol

Composição	(%)	Brij® 58 (%)	Fosfatidilcolina (%)	Fase aquosa
GE-NM ₁	1	1,09	3,91	94
GE-NM ₂	2,5	1,09	3,91	92,5
GE-NM ₃	5	1,09	3,91	90,0
EHL	9,0	15,7	6,5	----

Fonte: Elaboração própria.

As formulações resultantes foram caracterizadas e avaliadas similarmente às GE-NEs, como descrito anteriormente.

4.2.3 Caracterização estrutural dos sistemas

A estabilidade preliminar das formulações foi analisada por meio das características organolépticas (aspecto, odor, opacidade/translucidez), valor de pH, teste de centrifugação, tamanho dos glóbulos, índice de polidispersidade, e potencial zeta, e a avaliação morfológica foi avaliada pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Para avaliação organoléptica, foram analisados sinais de instabilidade após vinte e quatro horas de realização do preparo das formulações por meio da observação de sinais de cremeação ou de separação de fases, além de aspectos físicos como translucência, fluidez, reflexo azulado, e odor. Para a avaliação das modificações utilizaram-se as seguintes siglas:

- SA: sem alterações e homogêneo;
- LM: levemente modificado, porém sem separação de fases;
- SF: não homogêneo, com separação de fases.

A observação visual da variação das cores das formulações foi avaliada durante todo o experimento e classificadas quanto ao aspecto de cor em opacas ou translúcidas.

A determinação do valor do pH foi realizada em duplicata, após diluição em água das amostras na proporção de 1:10, utilizando um medidor de pH de bancada. A avaliação foi efetuada às temperaturas de 25 e 40°C.

O teste de centrifugação foi realizado em duplicata com controle de temperatura (Eppendorf, modelo 5810R, Hamburgo, Alemanha). As amostras foram armazenadas em tubos eppendorfs (1mL) e então submetidas à centrifugação. As determinações foram realizadas a 800, 1800 e 3000 G permanecendo 30 minutos em cada uma das velocidades, sob a condição de temperatura de 25°C.

Avaliação da estabilidade estrutural e homogeneidade do sistema: a nanoemulsão e micela incorporada com o geraniol foram avaliadas no período de 6 meses a 1 ano após a sua formulação. A determinação do diâmetro, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta das gotículas foi realizada pela técnica do espalhamento dinâmico de radiação laser usando equipamento Zetasizer Nano NS – Malvern Instruments®, no Laboratório de Farmacotécnica da FCFAR- Unesp, Araraquara. Trata-se de um equipamento com elevada sensibilidade na determinação de pequenas mudanças no diâmetro médio, que podem acontecer devido às camadas adsorvidas na superfície da partícula ou às pequenas variações no processo de manufatura. Quando um feixe de luz é lançado através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas são capazes de espalhar a luz em todas as direções, permitindo que flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento sejam observadas através de um detector responsável por processar os dados e enviar a um computador. A partir dessa técnica, é possível calcular o raio hidrodinâmico das partículas coloidais da equação de Stokes-Einstein (equação 1):

$$D = KT/6\pi\eta R_h \text{ (equação 1) onde,}$$

D: coeficiente de difusão das partículas;

K: constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$);

T: temperatura absoluta (293,15 K); π : 3,141592;

η : viscosidade ($1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2}\text{s}$); R_h : raio hidrodinâmico.

A análise das NEs e micelas foram realizadas em um analisador de gotículas, onde a amostra foi colocada em uma câmara de análise (20°C) de uma maneira que o feixe de laser (532 nm) atravessasse a dispersão em toda sua extensão. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro médio e índice de polidispersidade (PDI) das gotículas de cada amostra (n = 3).

As análises morfológicas e estruturais das NEs e micelas foram analisadas através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)²³⁷. Alíquotas diluídas (1:20) em água deionizada das nanoemulsões de geraniol e micelas foram colocadas em grades MET de cobre e contrastadas com solução de acetato de uranila 2% em água destilada durante 5 a 30 minutos, e o excesso da amostra foi cuidadosamente removido com papel filtro. Em seguida, as amostras foram secas em temperatura ambiente durante 15 minutos antes das análises. Micrografias eletrônicas de transmissão das amostras foram realizadas no Instituto de Química da Unesp de Araraquara (IQ-Unesp) usando um Microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM200, operando a 200 kV, com filamento de LaB6 (hexaboreto de lantânio).

4.2.4 Atividade Antimicrobiana

Foi avaliada a atividade antimicrobiana do GE, GE-NE e GE-NM sobre Cepas de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Staphylococcus aureus*.

4.2.4.1 *Candida albicans*

Foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028- *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA). As leveduras foram reativadas em placas de Petri contendo ágar sabouraud dextrose com 5% de cloranfenicol e mantidas em estufa à temperatura de 37°C durante 24 horas.

Após esse período, colônias foram transferidas para tubos Falcon contendo 5mL de caldo sabouraud dextrose (CSD) e mantidas durante 24 horas à 37°C. Em seguida, 500 µL da suspensão fúngica foi inoculada em 9,5 mL de meio RPMI 1640 e incubadas a 37°C durante 18 horas, seguido de centrifugação e ajustada em tampão fosfato (PBS, pH=7,2) estéril até a concentração correspondente de 5×10^6 UFC/mL ajustada em espectrofotômetro a 600 nm (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Posteriormente, a suspensão fúngica foi diluída 1:100, seguida de outra diluição 1:20 em PBS, obtendo-se uma suspensão de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL para utilização nos ensaios.²³⁸

Para obtenção dos extratos, o geraniol (98% de pureza) foi obtido da Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), e o dimetilsulfóxido (DMSO) da Labsynth Ltda. (Diadema, SP, Brasil). As emulsões dos produtos utilizados nos ensaios antifúngicos

foram preparadas no momento da execução dos testes. O fármaco foi dissolvido em DMSO (0,5%)²³⁹ e água destilada, de forma a se obter uma concentração inicial de 1200 µg/mL. A mistura foi agitada durante 3 minutos em um aparelho Vortex.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição em placas de 96 orifícios de acordo com as metodologias descritas segundo a norma do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).²³⁸ Os orifícios das microplacas foram preenchidos com 100 µL de RPMI-1640 tamponado com MOP's. Em seguida, acrescentou-se 100 µL do GE diluído em DMSO 0,5% em diluição seriada perfazendo concentrações de 1200 a 0,5 µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para as GE-NE e GE-NM, as quais foram diluídas em meio RPMI 1640 e acrescentadas em concentrações decrescentes de 1200 a 0,5 µg/mL nos poços das microplacas.

Adicionalmente, foram distribuídos 5 µL da suspensão de levedura perfazendo concentração aproximada de $2,5 \times 10^3$ células em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizada a nistatina em concentrações decrescentes de 64 a 0,5 µg/mL. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle do solvente DMSO e o controle negativo (suspensão das leveduras). As microplacas foram incubadas a 37°C sob agitação de 75 rpm por 24 horas, e posteriormente foram submetidas à leitura de absorbância a 492 nm em leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Reader – BioTek, Winooski, VT). A CIM foi definida como a menor concentração das soluções testadas capazes de reduzir o crescimento das cepas. Os testes foram realizados em triplicatas e em três momentos diferentes.

Após a leitura espectrofotométrica, foram retirados 10 µL dos orifícios que não mostraram crescimento visível, os quais foram semeados em meio de cultura ágar sabouraud dextrose (SD) e mantidos a 37°C em estufa durante 48 horas. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a $\geq 99.9\%$.

4.2.4.2 *Streptococcus mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (JP2) foi reativada em placas de ágar Brucella suplementado com sangue de carneiro desfibrinado a 0,5%, extrato de levedura a 0,6%, heminina (5 mg/L) e menadiona (1 mg/L) a 37°C por 48 horas sob condições de microaerofilia. Em seguida, foram inoculadas 3 a 5 colônias em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA)

suplementado com extrato de levedura e incubadas a 37°C sob condições de microaerofilia sob agitação a 120 rpm até atingir a fase exponencial de crescimento previamente ajustada em espectrofotômetro (DO de 0.08 – 0.13) correspondente à $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Cepas de *S. mutans* (ATCC 25175) foram mantidas congeladas até o momento de sua utilização. As cepas foram reativadas em ágar BHI durante 48 horas e mantidas em ambiente de microaerofilia em incubadora a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, com auxílio de uma alça bacteriológica, as colônias foram inoculadas em tubos Falcon contendo caldo BHI suplementado com extrato de levedura e permaneceram em incubadora a 37°C até alcançarem a fase exponencial de crescimento. Posteriormente, foram ajustadas em solução salina estéril (0,85%) (NaCl, Sigma-Aldrich, EUA) para obtenção de concentração de 10^8 UFC/mL utilizando-se um espectrofotômetro (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) no comprimento de onda de 600 nm.

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo CLSI e consiste na aplicação de 10 µL da solução do agente antimicrobiano em discos de papel de filtro estéreis de 6 mm de diâmetro, nas diferentes concentrações a serem testadas.²⁴⁰

A metodologia consiste na introdução dos discos sobre o meio de cultura sólido previamente inoculado em placas de Petri com as respectivas concentrações microbianas aconselhadas, 10^8 UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia/mL) para bactérias, 10^6 UFC/mL para leveduras e 10^4 UFC/mL para esporulados. A disposição dos discos deve ser equidistante das laterais da placa, com distância >15 mm, evitando sobrepor as zonas de inibição.²⁴⁰

Após ajustadas, as suspensões bacterianas de *S. mutans* e *A. actinomycetemcomitans* (100 µL) foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura Mueller Hinton (Kasvi, Brasil) e ágar Brucella, respectivamente, e com o auxílio de alça de *drigalski* foi realizada a semeadura em três direções para garantir a total deposição do mesmo sobre o meio de cultura. Discos de papel filtro (6mm) secos e estéreis foram dispostos euidistantes nas placas e inoculado 10 µL de cada solução teste.

O controle negativo foi o meio utilizado para diluir as soluções testadas, e o controle positivo foi a CLX a 0,12%. As placas de petri foram incubadas em estufas a 37°C por 24 horas, e decorrido este período foi mensurado o halo de inibição de

crescimento microbiano com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo 500-196, EUA).

A CIM e a CBM dos microrganismos sensíveis ao teste de difusão em ágar (*S. mutans*) foram realizadas pelo método de microdiluição em caldo²⁴¹ utilizando-se placas de cultura celular de 96 poços que receberam 100 µL das diluições do GE (1200 a 0,5 µg/mL) e das NEs de geraniol (2000 a 3 µg/mL). Após a reativação e crescimento das espécies como descrito anteriormente, uma suspensão individual de 5 µL dos microrganismos (10^8 UFC/mL) foram adicionadas em cada poço, e as placas foram incubadas a 37°C, sob agitação de 75 rpm por 24 horas, e após esse período foram submetidas ao leitor de microplacas (Sinergy H1) à DO de 492 nm. A CIM foi definida como a menor concentração das soluções testadas sem crescimento das bactérias. A CBM foi determinada como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a $\geq 99,9\%$.

4.2.4.3 *Staphylococcus aureus*

Obtenção e preparo dos inóculos: Foi utilizada cepa bacteriana de referência *S. aureus* sensível à metilicina (MSSA - ATCC 25923). Previamente à sua utilização, os microrganismos foram descongelados, semeados em placas de Petri contendo meios de cultura Mannitol Salt Agar (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA), e incubados a 37°C por 48 horas. Em seguida, cinco colônias foram inoculadas em meio de cultura BHI (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA), e incubadas “overnight” a 37°C sob agitação de 75rpm. As culturas resultantes foram lavadas duas vezes com PBS, centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos, lavadas e ressuspensas em meio BHI (biofilme simples) e RPMI 1640 (biofilme misto). As suspensões foram padronizadas a uma concentração final de 10^7 UFC/mL com auxílio de espectrofotômetro (DO=0,1; 600 nm), e foram utilizadas em todos os testes antimicrobianos e de quantificação dos biofilmes, tanto simples quanto mistos.

Para avaliar a atividade antibacteriana do GE e NEs de geraniol sobre culturas isoladas de *S. aureus* foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), por meio do método de microdiluição em placa. Em placas estéreis de poliestireno de 96 poços foram adicionados 100 µL das concentrações de GE (1200 a 0,5 µg/mL) e das NEs de geraniol (2000 a 3 µg/mL). Após a reativação e crescimento das espécies como descrito anteriormente, uma suspensão individual de 5 µL dos microrganismos (10^7 UFC/mL) foram adicionadas em cada poço, e as placas foram incubadas a 37°C,

sob agitação de 75 rpm por 24 horas, e após esse período foram submetidas ao leitor de microplacas (Sinergy H1, Biotec) à DO de 492 nm. Foram realizados os controles do meio de cultura e a clorexidina a 0,12% utilizada como controle positivo

A CIM foi definida como a menor concentração das soluções testadas sem crescimento das bactérias. A CBM foi determinada como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a $\geq 99,9\%$.

4.2.5 Atividade antibiofilme

Biofilmes simples e mistos foram formados para avaliar a atividade antibiofilme do GE e das NEs de geraniol.

4.2.5.1 Biofilme de *Candida albicans*

A metodologia da formação do biofilme foi a descrita por Thein et al. (2007)²⁴² e Sardi et al.²⁴³ (2017) com modificações.

Coleta de Saliva: Previamente, foi realizado coleta de saliva a partir de voluntários masculinos escolhidos segundo os critérios de exclusão: ausência de doenças sistêmicas, uso de antibióticos nos últimos 6 meses, presença de cárie ativa e/ou doença periodontal. Essa coleta foi realizada com a devida apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CAAE:46795821.6.0000.5416). A coleta da saliva foi estimulada por meio da mastigação de pedaços de Parafilm® e armazenada em tubos Falcon, centrifugada (3800 g, 4°C, 10 minutos), e o sobrenadante foi filtrado utilizando-se membrana de 0,22 μm . As alíquotas de saliva foram mantidas a -20°C e utilizadas em todos os testes antibiofilme deste estudo.

Preparo do Inóculo: Culturas de cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028) foram reativadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, MO, USA), pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS (ácido 3-N-morfolino propanosulfônico), acrescido com 2% de glicose e mantidos a 37°C durante 18 horas. Após o crescimento, a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos e as células lavadas 2 vezes com PBS estéril. A seguir, o material resultante foi ajustado com auxílio de espectrofotômetro (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Alemanha) a 600 nm até atingir absorbância determinada previamente ao experimento ($\text{Abs}=0,8<1,0$), correspondendo a uma suspensão de 1×10^7 UFC/mL.

Formação: Após a reativação, 100 µL da suspensão foram transferidas para placas de 96 poços, e incubadas a 37°C por 1 hora e 30 minutos, em agitador orbital a 75 rpm, tempo que correspondeu à fase de adesão dos microrganismos à superfície dos orifícios. Após este período, a suspensão foi aspirada e os poços lavados com PBS para remover os microrganismos não aderidos. Posteriormente, 100 µL da suspensão de *C. albicans* em meio RPMI 1640 foram adicionados em cada poço para promover o crescimento do biofilme e mantidos a 37°C por 48 horas sob agitação a 75 rpm.

Tratamento: Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 100 µL das soluções testes de geraniol e NEs (Tabela). A nistatina (256 e 512 µg/mL) foi usada como controle positivo e poços sem medicamentos como controle negativo.

4.2.5.1.1 Quantificação do biofilme (UFC/mL)

Quantificação: Após a incubação a 37°C por 24 horas, os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina estéril, raspados com auxílio de ponteira, transferidos para 5 ml de solução salina estéril e submetidos à sonicação com três pulsos de 15 segundos e 7 W de potência (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator modelo 100; EUA). Em seguida, foram feitas diluições seriadas da suspensão homogeneizada, semeadas em placas de ágar sabouraud dextrose e incubadas por 48 horas a 37°C. Após esse período, o biofilme foi quantificado pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões distintas.

4.2.5.1.2 Caracterização morfológica pela técnica de Microscopia eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

As análises morfológicas e estruturais dos biofilmes de *C. albicans* foram realizadas no Instituto de Química da Unesp de Araraquara (IQ-Unesp) por meio do microscópio eletrônico de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG) marca JEOL, modelo JSM-7500, com software de operação PC-SEM v 2,1,0,3, equipado com detectores de elétrons secundário, retroespalhados e análise química (energy dispersive spectroscopy - EDS) da marca Thermo Scientific, modelo Ultra Dry, com software de operação NSS 2.3. Biofilmes de *C. albicans* foram incubados e tratados com as soluções testes sobre a superfície de lamínulas em placas de 24 poços similarmente ao teste de UFC/mL até o momento da lavagem com PBS.

Posteriormente, as lamínulas foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% durante 1 hora, lavadas 3 vezes com PBS e desidratadas gradualmente com soluções crescentes de álcoois (70%, 90%, 60 minutos cada; álcool absoluto, cinco lavagens de 15 minutos), e armazenadas em dessecador a vácuo durante 7 dias com sílica gel.

Para serem observadas em MEV, as lamínulas foram posicionadas em suportes metálicos de amostras (*stubs*), fixadas com fitas dupla-faces de carbono com cola condutora de silício para melhorar a condutividade e metalizadas com ouro.

4.2.5.1.3 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

Para ilustrar o efeito das soluções testes nos biofilmes de espécies únicas, foi realizada a MCVL. Após o tratamento dos biofilmes formados em placas de 24 poços, estes foram suavemente lavados com solução salina estéril e coradas com o kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability (L7012, Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Preparou-se uma solução estoque em PBS estéril contendo 12 µL da solução SYTO 9 e 12 µL da solução de Iodeto de Propídio. Em seguida, adicionou-se 750 µL da solução homogeneizada em cada poço, permanecendo em contato durante 15 minutos a 37°C, protegido da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% durante 30 minutos e encaminhadas à microscopia. A obtenção das imagens foi realizada por meio do Microscópio de Fluorescência Confocal Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan, com auxílio do Software ZenBlue versão 2.3, com uma resolução de 1.024 por 1.024 pixels. Os comprimentos de onda de excitação/emissão foram de 488/500nm para SYTO 9 e 488/635nm para Iodeto de Propídio, e as imagens de um único plano focal do biofilme foram capturadas pelo sistema com uma lente de ampliação de 20x.

4.2.5.2 Biofilme de *Streptococcus mutans*

Preparo dos Inóculos: Utilizou-se neste estudo cepa de referência de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). O microrganismo foi reativado em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, Acumedia, Lansing, MI, USA) suplementado com extrato de levedura (Yeast Extract Powder, Himedia, Vadhani, MB, IND) e mantido em jarra de microaerofilia por 18 horas a 37°C. As suspensões bacterianas tiveram sua turbidez ajustada com o auxílio de espectrofotômetro (Eppendorf AG, 22331 Hamburg,

Germany) a uma densidade óptica de 600 nm que correspondeu a uma suspensão para solução de trabalho de 1×10^7 UFC/mL.

As soluções de GE, GE-NE e GE-NM foram diluídas em meio BHI nas concentrações de 1000 µg, 600 µg e 300 µg, respectivamente. A Clorexidina foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,12 % e o meio de cultura BHI foi utilizado como controle negativo.

Quantificação do biofilme (UFC/mL): Biofilmes simples de *S. mutans* foram formados em placas de microtitulação de 96 poços estéreis (n=9). Para formar a película adquirida, foi utilizada saliva como descrito anteriormente, e em seguida foram adicionados 200 µL da suspensão bacteriana padronizada. As placas de cultura foram mantidas em microaerofilia à 37°C durante 48 horas, e o meio foi renovado após 24h. Finalmente, após 48h, cada poço foi lavado duas vezes com PBS estéril, e foram adicionados 200 µL das concentrações testes de GE, GE-NE e GE-NM. Após a incubação à 37°C durante 24 horas, os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina estéril, raspados com auxílio de ponteira e transferidos para 5 mL de solução salina estéril e submetidos à sonicação com três pulsos de 15 segundos e 7W de potência (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator modelo 100; EUA). Em seguida, foram feitas diluições seriadas da suspensão homogeneizada, semeadas em placas de ágar BHI suplementadas e incubadas por 48 horas a 37°C. Após esse período, o biofilme foi quantificado pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões distintas.

4.2.5.3 Biofilmes mistos de *S. aureus* e *C. albicans* em corpos de prova de Titânio

Obtenção e Preparo dos corpos de prova de Titânio: Discos de titânio estéreis foram adquiridos da empresa Neodent (Curitiba, PR). Os discos apresentavam dimensões de 6 mm de diâmetro por 2 mm de espessura, com aproximadamente 86 mm² de área total.

4.2.5.3.1 Quantificação do biofilme (UFC/mL)

A suspensão padronizada de *C. albicans* e *S. aureus* foram preparadas e ajustadas conforme descrito anteriormente, a concentrações finais de 10^6 UFC/mL e 10^7 UFC/mL, respectivamente. A formação do biofilme em corpos de prova de titânio foi descrita por de Avila et al. ²⁴⁴ (2016) e Maquera-Huacho et al. ²⁴⁵ (2018), com modificações. Os discos de titânio foram posicionados em placas de 24 poços e

imersos em 1 mL de saliva para formação da película adquirida sobre as superfícies conforme descrito para os biofilmes simples. Em seguida, os discos foram lavados com PBS estéril, transferidos para uma nova placa, e 500 µL de cada suspensão microbiana foi inoculada para a formação do biofilme duplo e mantidos a 37°C por 24 horas em incubadora, que correspondeu a fase de adesão. Após este intervalo, a suspensão foi removida e os discos lavados duas vezes em PBS estéril para remoção dos microrganismos não aderidos. Em seguida, as amostras foram colocadas em poços contendo 1 mL de RPMI 1640 suplementado com 2% de glicose e incubados por 24 horas a 37°C.

Posteriormente, os discos foram transferidos para novos poços contendo 1 mL de cada grupo experimental conforme descrito na Tabela 2, que foram concentrações limiares de citotoxicidade testadas previamente e que indicaram eficácia antimicrobiana e prevenção de biofilmes simples de *C. albicans*. Os discos foram incubados a 37°C por 24h, lavado com PBS e transferido para tubos Eppendorfs estéreis com 1 mL de PBS. Em seguida, os discos foram sonicados por 30s, com uma saída de 7W (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator modelo 100; EUA) e raspados cuidadosamente durante 1 minuto. Em seguida foram realizadas diluições seriadas da suspensão homogeneizada, plaqueadas em placas de Petri contendo BHI ágar e incubadas por 24 horas a 37°C para posterior contagem das unidades formadoras de colônia, MCVL e MEV.

Tabela 2 - Grupos e tratamentos testados sobre os biofilmes em corpos de prova de titânio

Grupo	Concentração	Biofilme	UFC	MCVL	MEV
C. Negativo	-----	Misto	9 discos	2 discos	2 discos
GE	600 µg/mL	Misto	9 discos	2 discos	2 discos
GE-NE	600 µg/mL	Misto	9 discos	2 discos	2 discos
GE-NM	600 µg/mL	Misto	9 discos	2 discos	2 discos
CHX	0,12%	Misto	9 discos	2 discos	2 discos

C. Negativo: controle negativo

Fonte: Elaboração própria.

4.2.5.3.2 Microscopia confocal de varredura laser (MCVL)

Após o período de incubação, os corpos de prova de titânio foram lavados suavemente duas vezes com PBS para a remoção de microrganismos não aderidos, e as amostras foram transferidas para poços de nova placa de cultura de células e submetidas à MCVL conforme descrito no item 4.2.8.1.3.

4.2.5.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a relação entre os microrganismos *C. albicans* e MSSA sobre os corpos de prova de titânio foi realizado MEV. Para este teste, biofilmes mistos foram formados e avaliados em placas de 24 poços seguindo a mesma metodologia conforme descrito no item 4.2.8.1.2.

4.2.6 Citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade foram realizados os ensaios de viabilidade celular Alamar Blue e microscopia de fluorescência.

Para a realização dos ensaios *in vitro* foram utilizados queratinócitos orais normais espontaneamente imortalizados (Normal Oral Keratinocytes spontaneously immortalized - NOK-si), gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Carlos Rossa Junior, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP).

As células foram descongeladas e cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado com 2,0 mmol/L de glutamina; 10% de soro de bovino fetal, 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina G - 10 000 µg/mL, estreptomicina - 10 000 µg/mL e anfotericina B - 25 µg/mL). O cultivo das células foi realizado em garrafas

para culturas de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO₂ (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). Essas garrafas foram incubadas em estufa para cultura de células (Thermo Scientific) com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C e ambiente com umidade controlada.

O crescimento celular foi monitorado diariamente com o auxílio de um microscópio de bancada invertido. As células foram cultivadas até atingirem 90% de confluência, lavadas com tampão PBS, retiradas da placa com solução de tripsina 0,005%/EDTA (0,53 mmol/L) e então submetidas à centrifugação a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 3 mL de DMEM com 10% de SFB. Dessa suspensão de células, 1 mL foi colocado em nova garrafa, e acrescidos com 14 mL de meio de cultura suplementado e levada à estufa para a formação de nova confluência de células. Para todos os experimentos foram utilizadas células entre a 3ª e a 12ª passagem.

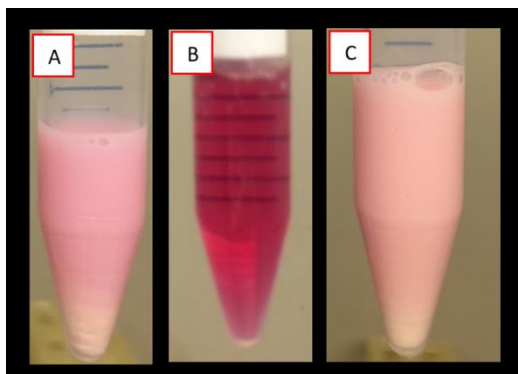
Para a realização do teste de citotoxicidade, uma suspensão de 10⁵ células/mL em meio de cultura foi preparada. Efetuou-se os procedimentos descritos anteriormente para obtenção do pellet, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 5 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina - Gibco, NY, EUA). Posteriormente, 50 µL foram retirados e adicionados a 50 µL de corante azul de Tripan (Merck - Indústrias Químicas Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Dessa solução, 10 µL foram introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburg, Alemanha) para contagem das células viáveis e ajuste da suspensão à concentração de interesse.

4.2.6.1 Obtenção dos extratos e soluções testadas

Foi realizada a diluição do GE em meio de cultura DMEM com suplementação de 1% de soro fetal bovino (SFB) nas concentrações finais de 0,075 a 1,2 mg/mL. As NEs foram diluídas em meio DMEM com suplementação de 1% de SFB na proporção de 1:10 (v/v) para obtenção dos seus extratos e incubadas à 37°C por um período de 24 horas conforme Norma ISO 10993-12:2009²⁴⁶ (Figura 2). Após esse período, os extratos foram esterilizados por filtração com membranas contendo um filtro especial de acetato de celulose com porosidade inferior a 0,22 µm², e as soluções obtidas foram diluídas em DMEM suplementado com 1% de SFB para se obter concentrações

decrecentes dos extratos de Blank-NEs (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%) e da GE-NE (1200 µg/mL, 600 µg/mL, 300 µg/mL, 150 µg/mL e 75 µg/mL). As GE-NM foram diluídas em DMEM com 1% de SFB nas mesmas concentrações da GE-NE.

Figura 2 - Extratos obtidos pelas diluições das soluções testadas



A: extrato da NE; B: extrato da micela de geraniol; C: extrato da NE de geraniol.

Fonte: Elaboração própria.

4.2.6.2 Ensaio de viabilidade celular (Alamar Blue)

Para análise da viabilidade celular foi utilizado o ensaio de Alamar Blue. Este método é baseado na reação da resazurina, um corante não fluorescente azul arroxeado, solúvel em água, estável em meio de cultura, não tóxico, que é reduzido em resorufina, substância rosa e altamente fluorescente pela ação da atividade metabólica das mitocôndrias de células viáveis.

Para a realização do teste, 100 µL da suspensão composta de 10^5 células/mL foram introduzidos em poços de uma placa com 96 orifícios e incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa, e 100 µL dos extratos contendo as substâncias liberadas pelas soluções testadas foram adicionados à placa, sendo incubados por 24 horas. Para cada repetição do teste, foram destinados três compartimentos da placa contendo meio de cultura novo suplementado com 1% de soro fetal bovino (controle negativo), e três poços receberam 100 µL de H₂O₂ a 3% (controle positivo). Após o período de incubação de 24 horas, removeram-se as soluções dos grupos experimentais, e 100 µL da solução de Alamar Blue foram

adicionados a cada orifício da placa, que permaneceu incubada por um período de 4 horas a 37°C.

Em seguida, a leitura da emissão de fluorescência foi realizada com o auxílio de um leitor de placas (Synergy H1 Multi-Mode Reader – BioTek, Winooski, VT) com filtros de excitação em 560 nm e emissão de 590 nm. Para cada condição experimental, realizou-se um branco correspondente na ausência de células. Este experimento foi realizado em triplicata e em três momentos distintos.

A viabilidade celular foi obtida pela divisão dos valores das densidades ópticas dos poços experimentais por aqueles do controle negativo e multiplicando-se por 100. As soluções testadas foram classificadas de acordo com a ISO 10993-5²⁴⁶: 0 - não citotóxico (viabilidade celular superior a 75%), 1 - ligeiramente citotóxica (entre 75% e 50% de viabilidade celular), 2 - moderadamente citotóxica (entre 50% e 25% de viabilidade) e 3 - fortemente citotóxica (viabilidade celular inferior a 25%).

4.2.6.3 Microscopia de fluorescência

Com o objetivo de se avaliar a viabilidade celular das concentrações testadas e a ocorrência da diminuição do crescimento e morte dos queratinócitos orais (NOK-SI), foi realizada a microscopia de fluorescência. Para obtenção das imagens em microscópio de fluorescência, as células foram incubadas juntamente com os grupos testes conforme descrito anteriormente.

Após o período de incubação com as células, os poços foram aspirados e se acrescentou 4 µM ethyl 1 (Eth-1-células mortas = fluorescência vermelha) e 2 µM Calcein AM (CA-células viáveis = fluorescência verde) acrescidos em meio DMEM sem soro fetal bovino e mantidos em incubadora durante 30 minutos (Live / Dead® Viability /Kit de citotoxicidade; Invitrogen). Após esse período, avaliou-se a presença de células vivas e mortas com a utilização de um microscópio de fluorescência Leica DM 5500B (Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). Esse experimento fora realizado em duplicata e em uma única ocasião.

4.3 Análise Estatística

Foram analisados a variável contagem de colônias (UFC/mL) em biofilmes simples (*S. mutans*) e misto (*C. albicans* e *S. aureus*) em meios de cultura seletivos para cada micro-organismo e ensaio Alamar Blue. Os dados de contagens de colônias foram transformados de acordo com a fórmula $\log (\text{UFC}+1) / \text{mL}$. Os dados foram

analisados estatisticamente, após agrupamento, por meio do software SPSS for Windows (versão 15.0; SPSS Inc.). Todas as análises foram realizadas utilizando-se $\alpha = 0,05$. A aderência dos dados à distribuição normal e a homogeneidade de variância foram testadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, onde foi constatada distribuição normal ($p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias ($p > 0,05$) para as variáveis avaliadas, portanto os dados cumpriram os pressupostos para aplicar um teste paramétrico para amostras independentes. Dessa forma, os valores correspondentes às médias dos espécimes dos grupos foram submetidos ao Teste de ANOVA e pós-teste de Tukey.

Para a variável biofilme (UFC/mL) de *C. albicans*, os dados foram analisados utilizando-se ANOVA 1-fator com correção de Welch e pós-teste de Games Howell ($p < 0,05$) para identificação das diferenças entre os grupos por meio de comparações múltiplas.

Os ensaios de caracterização, MCVL, MEV, microscopia de fluorescência, microscopia de força atômica e atividade antimicrobiana foram analisados descritivamente.

5 RESULTADO

Os resultados obtidos são apresentados em sequência.

5.1 Desenvolvimento e Caracterização da GE-NE

Diagrama de fases e caracterização da nanoemulsão: Dos estudos iniciais com formulações de NE, o sistema mais transparente contendo colesterol (CHO), Fosfatidilcolina de soja (SPC / Brij® 58) e tampão aquoso foi obtido a partir de uma mistura de surfactante com um valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) de 12,47; que corresponde a uma razão SPC / Brij® 58 de aproximadamente 1: 2. Assim, esta composição surfactante com um valor de EHL de 12,47 foi usada ao longo do restante do estudo.

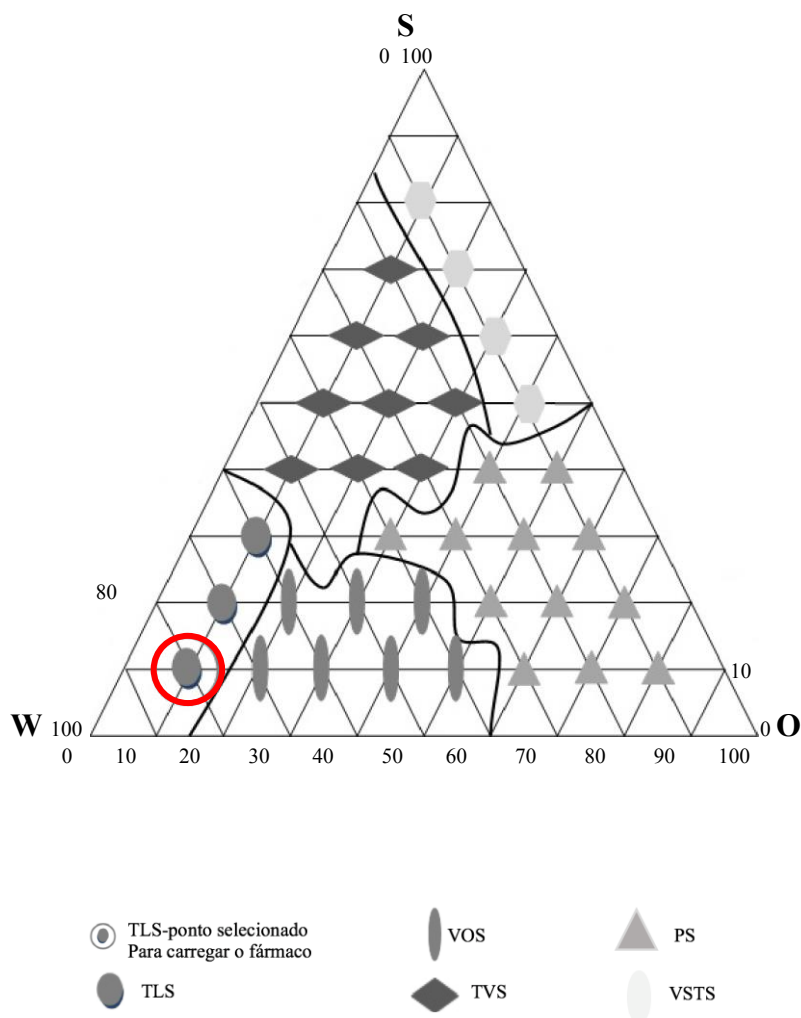
Para caracterizar adequadamente os sistemas NE, utilizou-se o diagrama de fases pseudoternário desenvolvido anteriormente²³⁶ que descreve as condições experimentais e razões ideais para combinar os componentes para obter uma preparação translúcida. Para SPC / Brij® 58 estabilizar a NE, o diagrama de fase pseudoternário (Figura 3) demonstra que uma ampla gama de possibilidades pode ser obtida com sistemas claros nas regiões do diagrama de fase em que o óleo-em-água da NE prevalece.

A formulação NE foi selecionada para obter um sistema óleo-em-água quando diluída com tampão aquoso. O ponto circulado no diagrama de fases da Figura 3 representa a composição da formulação utilizada para incorporar o geraniol no presente estudo. Os pontos foram obtidos com diferentes características estruturais de acordo com a variação das relações óleo e água.

O diagrama de fases mostra as características dos pontos classificados como sistema líquido transparente (TLS), sistema viscoso e opaco (VOS), separação de fases (PS), sistema viscoso transparente (TVS) e sistema viscoso semitransparente (VSTS). As regiões conhecidas como TLS foram observadas onde havia baixa concentração de óleo (10%) e concentração de surfactante (10% -30%). O VOS foi encontrado na região interior e no centro do diagrama com uma baixa concentração de óleo (20% -50%) e concentração de surfactante (10% -20%). PS ocorreu com baixa concentração de água (10% -40%) e concentração de surfactante (10% -40%). TVS tinha uma concentração de fase oleosa entre 20% e 50% e uma concentração de surfactante entre 40% e 70%, e VSTS (sistema semitransparente viscoso) tinha

uma baixa concentração de água (10%) e alta concentração de surfactante (50% - 80%).

Figura 3 - Diagrama de fases contendo SPC/Brij® 58 (S), Colesterol (O), e tampão aquoso (W)



Abreviaturas: TLS, sistema líquido transparente; VOS, sistema opaco e viscoso; PS, separação de fases; TVS, sistema transparente viscoso; VSTS, sistema semi viscoso-transparente.

Fonte: Bonifácio et al.²³⁶ (2015).

Testes preliminares de estabilidade físico-química das nanoemulsões: O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. Os testes de estabilidade são considerados um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos

armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Como em todo procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso.

A sequência sugerida de estudos (preliminares, acelerados e de prateleira) tem por objetivo avaliar a formulação em etapas, buscando indícios que levem a conclusões sobre sua estabilidade. O chamado teste de estabilidade preliminar tem como objetivo auxiliar e orientar na escolha das formulações, o desenvolvimento e inovação do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições em que é conduzido, este tipo de teste não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações ao longo da produção, antes de atingir o produto final.²⁴⁷

Nesta perspectiva a estabilidade preliminar das formulações foi analisada por meio das características organolépticas (aspecto, odor, opacidade/translucidez), valor de pH e teste de centrifugação. O tamanho dos glóbulos, índice de polidispersidade, e potencial zeta das NEs foram testadas no período de 6 meses e 1 ano após sua formulação.

Avaliação organoléptica: Os resultados da avaliação organoléptica encontram-se disponibilizados na Tabela 3. Foram avaliados sinais de instabilidade após 24 horas de realização do preparo das formulações por meio da observação de sinais de cremeação ou de separação de fases, floculação, sedimentação, além de aspectos físicos como translucência, fluidez e odor. Para a avaliação das modificações utilizaram-se as seguintes siglas:

- SA: sem alterações e homogêneo;
- LM: levemente modificado, porém sem separação de fases;
- NH: não homogêneo, com separação de fases.

Tabela 3 - Análise das características organolépticas das nanoemulsões 24 horas após sua formulação

Temperatura	NE	GE-NE	GE-NM
25°	SA*	SA*	SA*

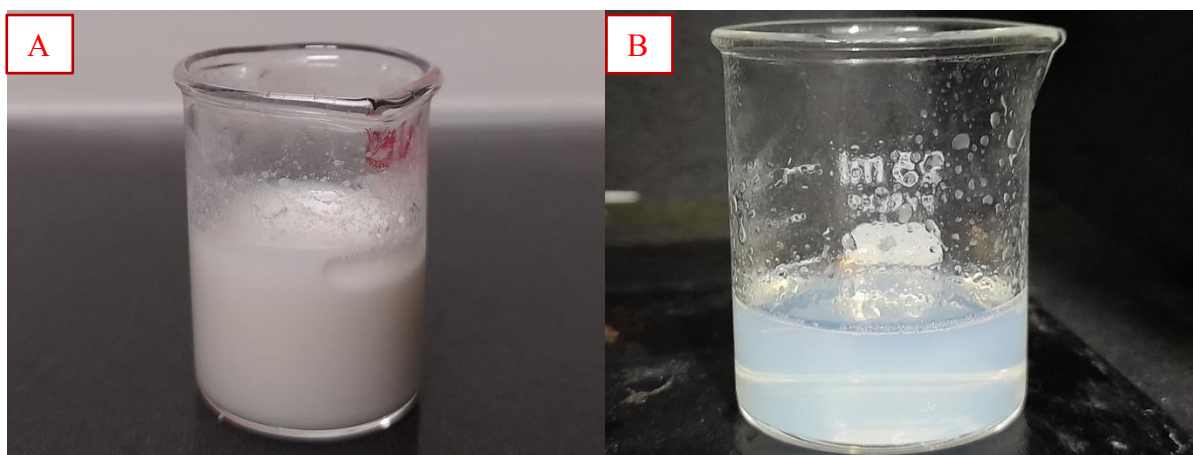
*SA, sem alterações.

Fonte: Elaboração própria.

Análise macroscópica e cor: Todas as formulações apresentaram as mesmas características nos testes preliminares de estabilidade: emulsão fluida e ausência de cremação ou separação de fases. Devido à instabilidade intrínseca das emulsões, a análise macroscópica foi realizada após 24 horas da preparação, sendo imprescindível aguardar um período inicial de estabilização das NEs após o seu desenvolvimento para favorecer sua homogeneidade²⁴⁸.

As NEs (Blank e GE-NE) apresentaram uma característica leitosa e as GE-NM transparentes ou translúcidas (Figura 4). Há uma relação entre o tamanho das partículas e sua cor, e quanto menor o tamanho das gotículas, mais clara ou transparente é seu aspecto. As cores brancas ou leitosas indicam tamanho maior de glóbulos²³².

Figura 4 - Aspecto macroscópico da GE-NE (A) e da GE-NM (B) após sua sintetização



NE=nanoemulsão; GE= geraniol.

Fonte: Elaboração própria.

Teste de Centrifugação: Ao iniciar-se qualquer estudo de estabilidade, recomenda-se submeter o produto ao teste de centrifugação, que consiste em centrifugar uma amostra a 800, 1800 e 3.000 G durante 30 minutos. O produto deve

permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. A amostra é centrifugada em temperatura, tempo e velocidade padronizados e posteriormente avalia-se visualmente a amostra, observando-se sinais de precipitação ou sedimentação, separação de fases, formação de *cakin* (sedimento não redispersível), coalescência.²⁴⁷ O teste de centrifugação aumenta a colisão entre os glóbulos, permitindo prever de forma rápida a estabilidade da emulsão.²⁴⁹

O resultado da análise visual das amostras está expresso na Tabela 4, e as formulações das nanoemulsões e da micela estão apropriadas conforme os parâmetros determinados pela ANVISA (2004), e permaneceram estáveis após o teste de centrifugação.

Tabela 4 – Análise do teste de centrifugação de cada formulação de nanoemulsão e micela.

FORMULAÇÕES			
RPM*	NE	GE-NE	GE-NM
2673	SA	SA	AS
4009	SA	SA	AS
5175	SA**	SA	AS

Abreviaturas: *RPM, rotações por minuto; **SA, sem alterações.

Fonte: Elaboração própria.

Avaliação do pH: Os valores médios do pH das formulações estão disponibilizados na Tabela 5. Os valores de pH permaneceram entre 6,8 e 7,5 como na medição inicial, entretanto, o aumento da temperatura ocasionou diminuição nos valores de pH da nanoemulsão de geraniol, sugerindo uma diminuição da sua estabilidade.

As alterações no valor do pH podem ser decorrentes de processos oxidativos dos componentes da formulação, principalmente da fase oleosa, como os óleos vegetais, que são passíveis de auto oxidação quando expostos ao oxigênio atmosférico ou a altas temperaturas formando hidroperóxidos ou mesmo ocorrendo a

hidrólise de triglicerídeos levando à formação de ácidos graxos, sendo que os ácidos graxos livres reduzem o pH da formulação²⁵⁰.

Tabela 5 - Determinação do pH da nanoemulsão de geraniol após estresse térmico.

Formulação	pH (25°C)	pH (40°C)
Nanoemulsão + geraniol	7,4 ± 0,1*	6,9 ± 0,2*

* desvio-padrão

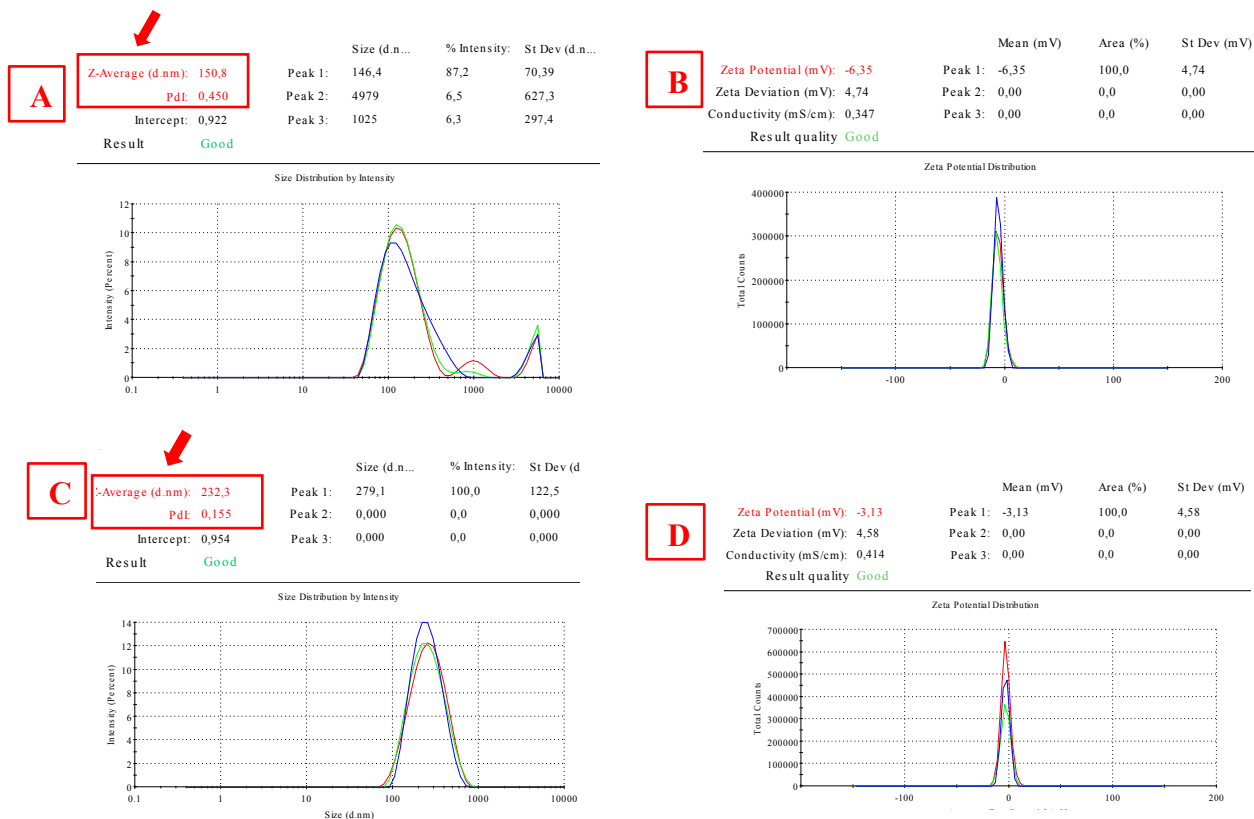
Fonte: Elaboração própria.

Diâmetro hidrodinâmico médio, Índice de Polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta (PZ): A dispersão de luz foi utilizada para determinar o diâmetro da fase interna das NEs formuladas, que foram diluídas com água deionizada para detectar erros experimentais.

A Figura 5 mostra o diâmetro hidrodinâmico, PDI e PZ da NE e GE-NE formuladas, onde observa-se que o diâmetro das partículas de NEs puras (blank) foi de $150,8 \pm 1,7$ nm; e de $232,3 \pm 2,7$ para as NEs após incorporação do geraniol, corroborando com outro estudo que considera que o tamanho das NEs deve estar compreendido entre 10 e 250 nm²³⁵.

O PDI é um índice que avalia a homogeneidade relativa dos tamanhos de partículas distribuídos na amostra²⁵¹ e foi calculado pela divisão do tamanho médio das gotículas pelo número médio das gotículas medidas. Para a GE-NE, a análise de espalhamento de luz mostrou valor médio de PDI de 0,155 após a formulação, indicando uma boa distribuição de tamanho das gotículas e de estabilidade do sistema NE. Este parâmetro reflete diretamente a homogeneidade do tamanho das gotículas na NE total. A NE (blank) apresentou $P_z = -6,35$ mV (Figura 5, A e B), e após a incorporação do geraniol houve decréscimo para $P_z = -3,3$ mV (Figura 5, C e D).

Figura 5 - Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial Zeta da NE (A e B) e NE incorporada com geraniol (C e D) após a formulação. As setas mostram aumento do diâmetro das partículas indicando que houve incorporação do geraniol na NE. Observar que houve melhoria da normalização da curva após a incorporação do GE (A e C)



Fonte: Elaboração própria.

5.2 Avaliação da Estabilidade da GE-NE no Decorrer de 6 a 12 Meses Após a Formulação

A nanoemulsão incorporada com o geraniol foi avaliada no período de 6 meses a 1 ano após a sua formulação (Figura 6). A determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta das gotículas foi realizada pela técnica do espalhamento dinâmico de luz, como descrito anteriormente. A Figura 6 mostra os valores do diâmetro hidrodinâmico, PDI e PZ das GE-NEs no momento da formulação (6, A e B), após 6 meses (6, C e D) e 1 ano (6, E e F). As setas mostram discreta variação do diâmetro das partículas e do PDI indicando que as NEs permaneceram estáveis e homogêneas no decorrer do tempo.

Figura 6 - Diâmetro médio do tamanho, PDI e potencial Zeta da NE incorporada com geraniol no momento da formulação (A e B), e após 6 (C e D) e 12 meses da síntese (E e F)



Fonte: Elaboração própria.

A faixa correspondente ao potencial zeta (Figura 6; B, D, F) das nanoemulsões de GE no momento da formulação ($P_z = -3,3$ mV), após 6 meses ($P_z = -4,60$ mV) e 12 meses ($P_z = -7,38$ mV) apresentaram pequeno aumento, indicando uma estabilidade do sistema após o armazenamento prolongado de 12 meses. Não foram observadas alterações significativas no decorrer do tempo em relação ao diâmetro das partículas, PDI e potencial zeta, sugerindo a homogeneidade das NEs.

5.3 Caracterização da Micela de Geraniol (GE-NM)

Diversas concentrações de GE foram incorporadas nas NMs e avaliadas através do DLS. As GE-NMs que apresentaram $PDI \leq 0,3$ foram selecionadas para dar continuidade ao estudo.

A Figura 7 mostra os valores médios dos tamanhos das partículas, do PDI e potencial Zeta das formulações selecionadas da GE-NM nas concentrações de 0,5; 1; e 2,5%.

Figura 7 – Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial Zeta das GE-NEs formuladas



Letras A e B, GE-NM com 2,5% de geraniol (p/p); C e D, GE-NM com 1% de geraniol (p/p); E e F, GE-NM com 0,5% de geraniol (p/p). As setas mostram diminuição do diâmetro e PDI das partículas com a menor quantidade incorporada de GE. Houve melhora do pico da curva normal com a diminuição das concentrações de geraniol.

Fonte: Elaboração própria.

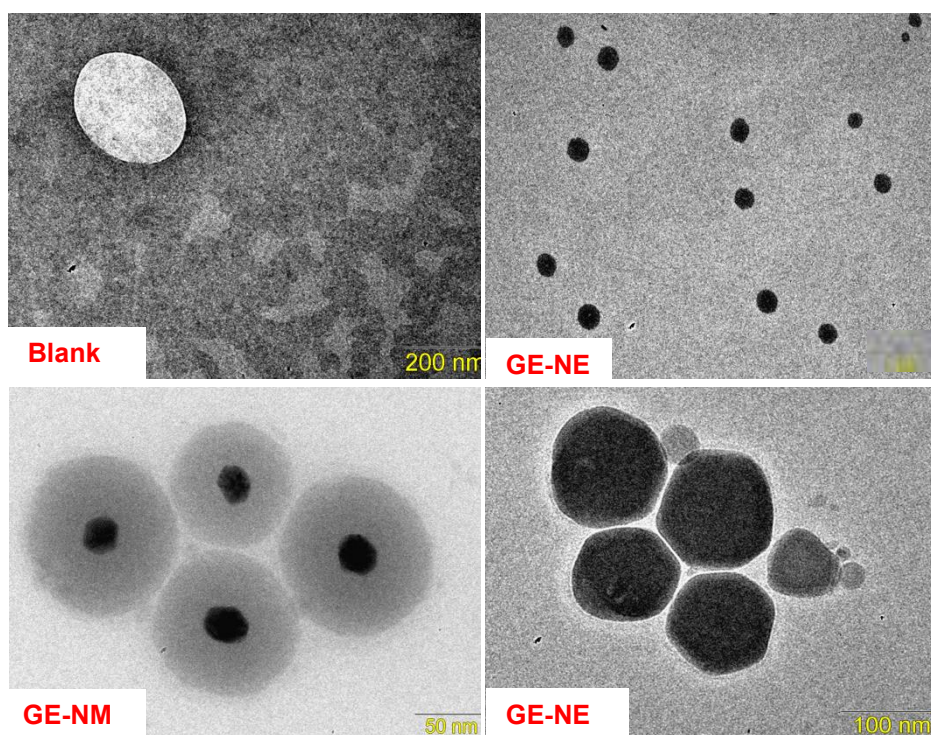
De acordo com a Figura 7, o diâmetro médio das partículas das GE-NMs formadas foi de 90,55 a 102,9 nm. A incorporação de maior quantidade de geraniol causou uma variação no tamanho do diâmetro das partículas. Os diâmetros das NMs incorporadas com 0,5%, 1% e 2,5% de geraniol ficaram compreendidos na faixa de 10-200 nm (100-2.000 Å), que é a faixa ideal para NE e micelas^{34,252}. O PDI foi calculado dividindo-se o tamanho médio das gotículas pelo número médio das gotículas medidas. A análise de dispersão de luz mostrou valores de PDI de 0,151; 0,241; e 0,291 nas micelas incorporadas com 1; 0,5; e 2,5% de GE, respectivamente, indicando uma melhor distribuição e homogeneidade do tamanho das gotículas nas micelas com 1% de GE.

O potencial zeta das NMs variaram de $-5,89 \pm 0,68$ a $-6,83 \pm 0,87$ mV. De acordo com os resultados acima, a GE-NM a 1% foi selecionada para dar prosseguimento nas próximas etapas experimentais devido o menor valor de PDI.

5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Figura 8 mostra fotomicrografias de MET das nanoemulsões formadas, onde pode observar-se o formato esférico das gotículas.

Figura 8 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanoemulsões formadas



Fonte: Elaboração própria.

5.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana *in vitro* do Geraniol Incorporado a uma Nanoemulsão Sob Cepas de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Para *Candida albicans*, como visto na Tabela 6, a CIM do geraniol foi de 300 µg/mL e CFM de 600 µg/mL, da GE-NE foi de 18,75 µg/mL (CIM) e 37,5 µg/mL (CFM), e da GE-NM 150 µg/mL (CIM) e 300 µg/mL (CFM), onde se observou inibição do crescimento de $\geq 99\%$ das cepas testadas. Uma substância possui forte atividade antimicrobiana quando possui CIM inferior a 500 µg/mL, atividade moderada com CIM entre 600 e 1500 µg/mL e fraca atividade com valores acima de 1500 µg/mL^{253,254}. De acordo com esta classificação, o geraniol e a GE-NE demonstraram forte atividade antifúngica, e a razão entre a CFM/CIM (2:1) demonstrou natureza fungicida para a cepa testada. A GE-NE e a GE-NM reduziram a CIM e a CBM contra cepas de *C. albicans*, comparado ao extrato puro de GE. O resultado para o grupo controle não apresentou inibição do crescimento fúngico (Figura 9).

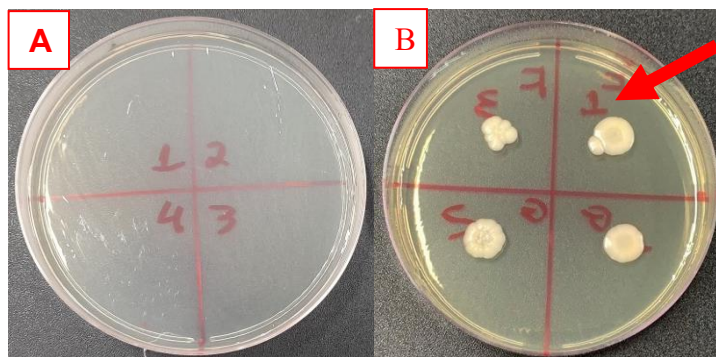
Altas concentrações de GE, consideradas citotóxicas no presente estudo, foram necessárias para CIM de *S. mutans* e *S. aureus*.

Tabela 6 - CIM, CFM ou CBM, CFM ou CBM/CIM do GE, GE-NE E GE-NM sob cepa de *Candida albicans*, *S. mutans* e *S. aureus*

		CIM (µg/mL)	CFM ou CBM (µg/mL)	CFM ou CBM / CIM	Efeito
<i>C. albicans</i>	GE	300	600	2:1	Fungicida
	GE-NE	18,75	37,5	2:1	Fungicida
	GE-NM	150	300	2:1	Fungicida
	Nistatina	8	16	2:1	Fungicida
<i>S. mutans</i>	GE	600	1200	2:1	Bacteriostático
<i>S. aureus</i>	GE	750	750	1:1	Bacteriostático

Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Imagem ilustrativa das placas de cultura após CIM/CFM das soluções testes de GE-NE para *C. albicans*. A, concentrações de GE-NE que impediram crescimento fúngico; B, controle negativo do experimento-seta



Fonte: Elaboração própria.

Os halos de inibição obtidos para diferentes concentrações de geraniol testados sob cepas de *S. mutans* e *A. actinomycetemcomitans* estão compiladas na Tabela 7, e Figuras 10 e 11 (A e B). Os halos de inibição foram diretamente proporcionais às concentrações de geraniol testados. Nenhuma zona de inibição foi observada em torno dos discos de controle do meio, confirmando que o mesmo estava inerte e sem atividade antibacteriana própria. As concentrações acima de 1 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ de geraniol tiveram maior atividade contra *S. mutans* e *A. actinomycetemcomitans*, respectivamente.

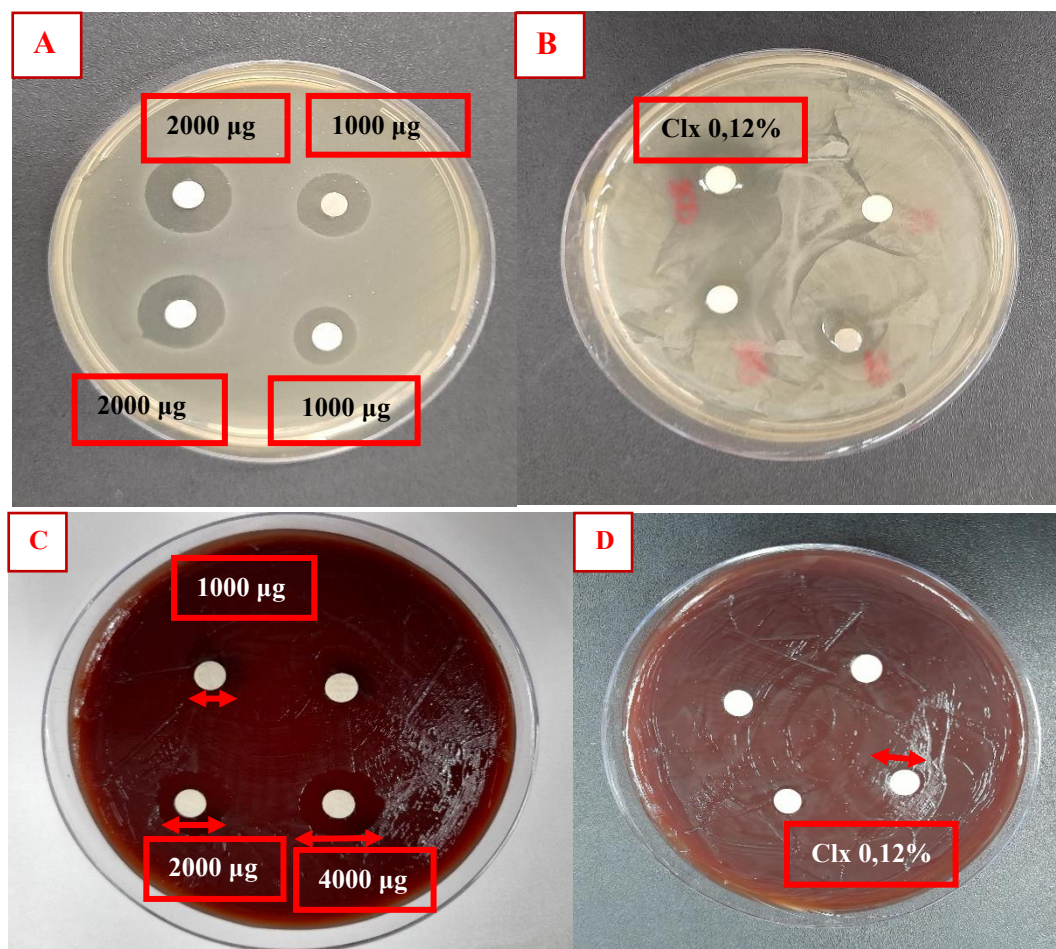
Tabela 7 - Valores de média e desvio-padrão (mm) do diâmetro dos halos de inibição das soluções testes de geraniol pela técnica de difusão em ágar para os *S. mutans* e *A. actinomycetemcomitans*

	Geraniol			CHX* 0,12%
	4000 $\mu\text{g/mL}$	2000 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	
<i>S. mutans</i>	-	14,92 $\pm$ 1,03	12,43 $\pm$ 1,32	13,25 $\pm$ 1,61
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	14,49 $\pm$ 1,2	12,67 $\pm$ 1,40	10,44 $\pm$ 1,1	10,95 $\pm$ 1,48

*CHX=clorexidina.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 – Imagens das placas de Petri após o teste de difusão em ágar do *S. mutans* (A, Geraniol; B, Clx (Clorexidina 0,12%) e *A. actinomycetemcomitans* (C, Geraniol; D, Clorexidina 0,12%)



Fonte: Elaboração própria.

O método de difusão em ágar foi utilizado neste estudo pois é o método mais comumente utilizado para determinação da atividade antimicrobiana de substâncias novas, como extratos vegetais, novas formulações de medicamentos. Além disso, pode ser empregada nas comparações do efeito antibacteriano de diferentes materiais dentários²⁵⁵.

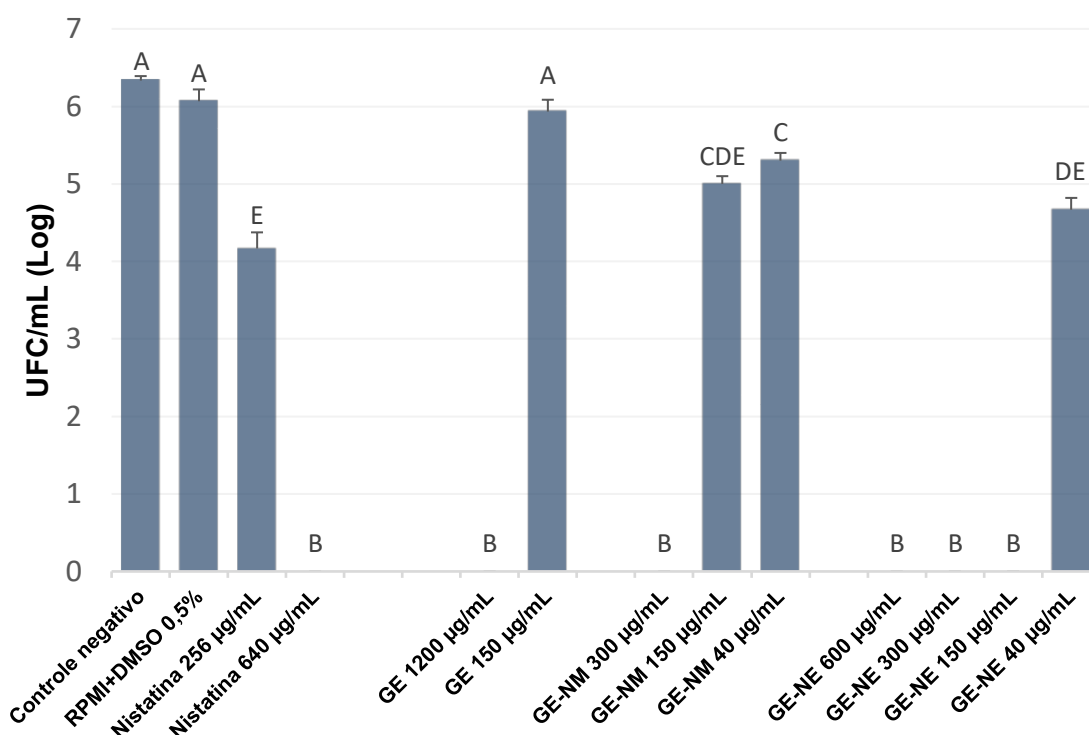
5.6 Análise da Atividade Antibiofilme

Os resultados obtidos na análise antibiofilme para os biofilmes simples de *C. albicans*, *S. mutans* e misto de *S. aureus* e *C. albicans* apresentam-se a seguir.

5.6.1 *Candida albicans*

O geraniol incorporado à nanoemulsão (concentrações de 150 e 300 µg/mL) e à micela (concentração de 300 µg/mL) apresentaram redução significativa ($p=0,000$) de UFC/mL (redução de 6,3 Logs) comparados ao controle negativo e similar à concentração de 1200 µg/mL do extrato puro de geraniol e à nistatina 640 µg/mL (Figura 11). Portanto, a nanoemulsão e a micela de geraniol potencializaram a ação antifúngica do geraniol (8 e 4 vezes, respectivamente).

Figura 11 – Quantificação de biofilme simples de *C. albicans* após tratamento com os grupos avaliados (UFC/mL)

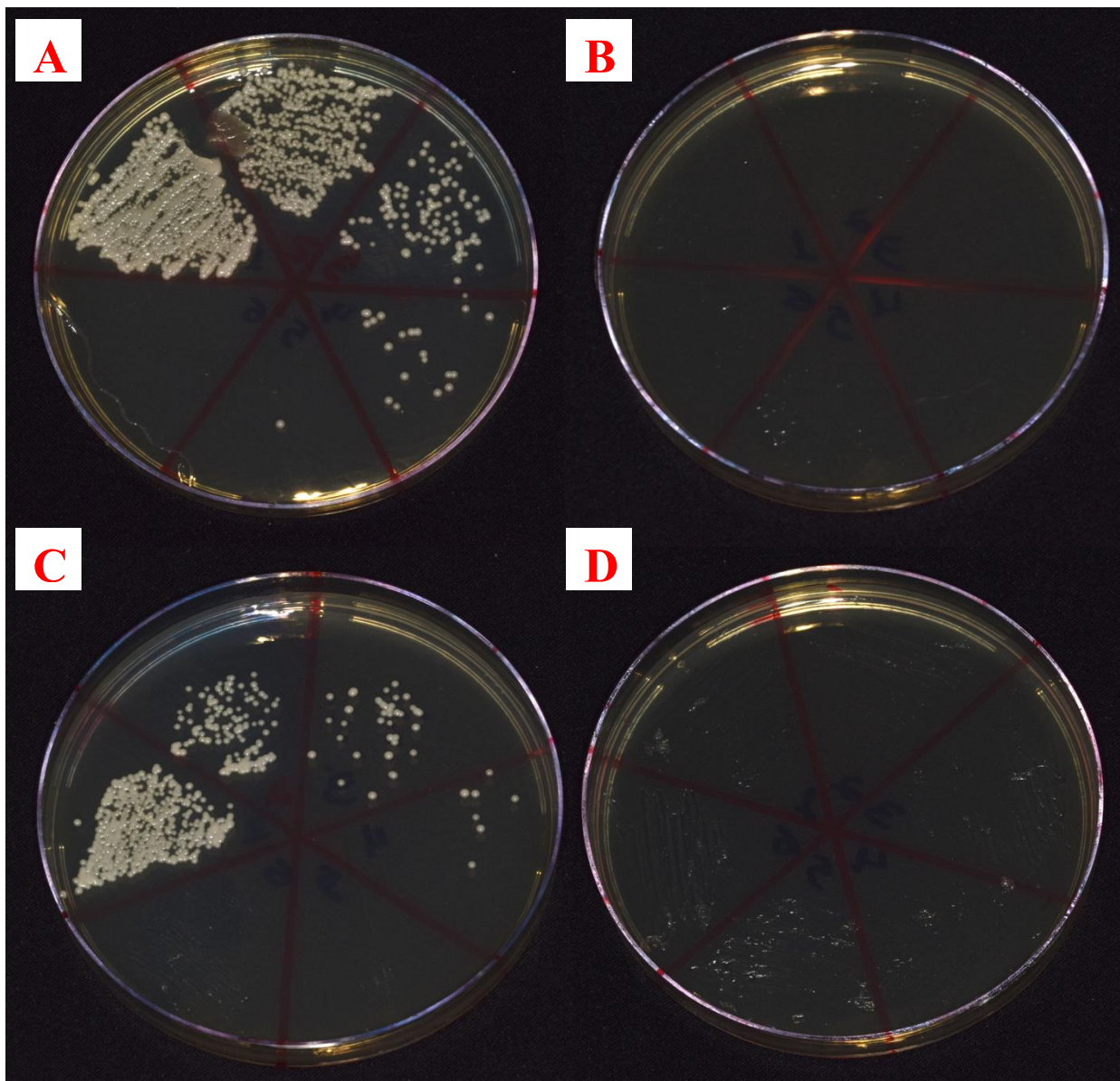


*Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (Teste de Anova 1-fator com correção de Welch, pós-teste de Games Howell, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 12, pode-se observar placas de Petri após 24h de incubação e o efeito das substâncias testadas sobre o biofilme de *Candida albicans* analisado pelo método de unidades formadoras de colônias viáveis (UFC/mL). Observa-se que não houve formação de colônias para os compostos geraniol 1200 µg (B) e nanoemulsão (GE-NE) contendo 150 µg de geraniol (D).

Figura 12 – Imagens das placas de Petri de UFC após 24 horas de exposição ao tratamento com as GE-NE e GE-NM em biofilme de *Candida albicans*



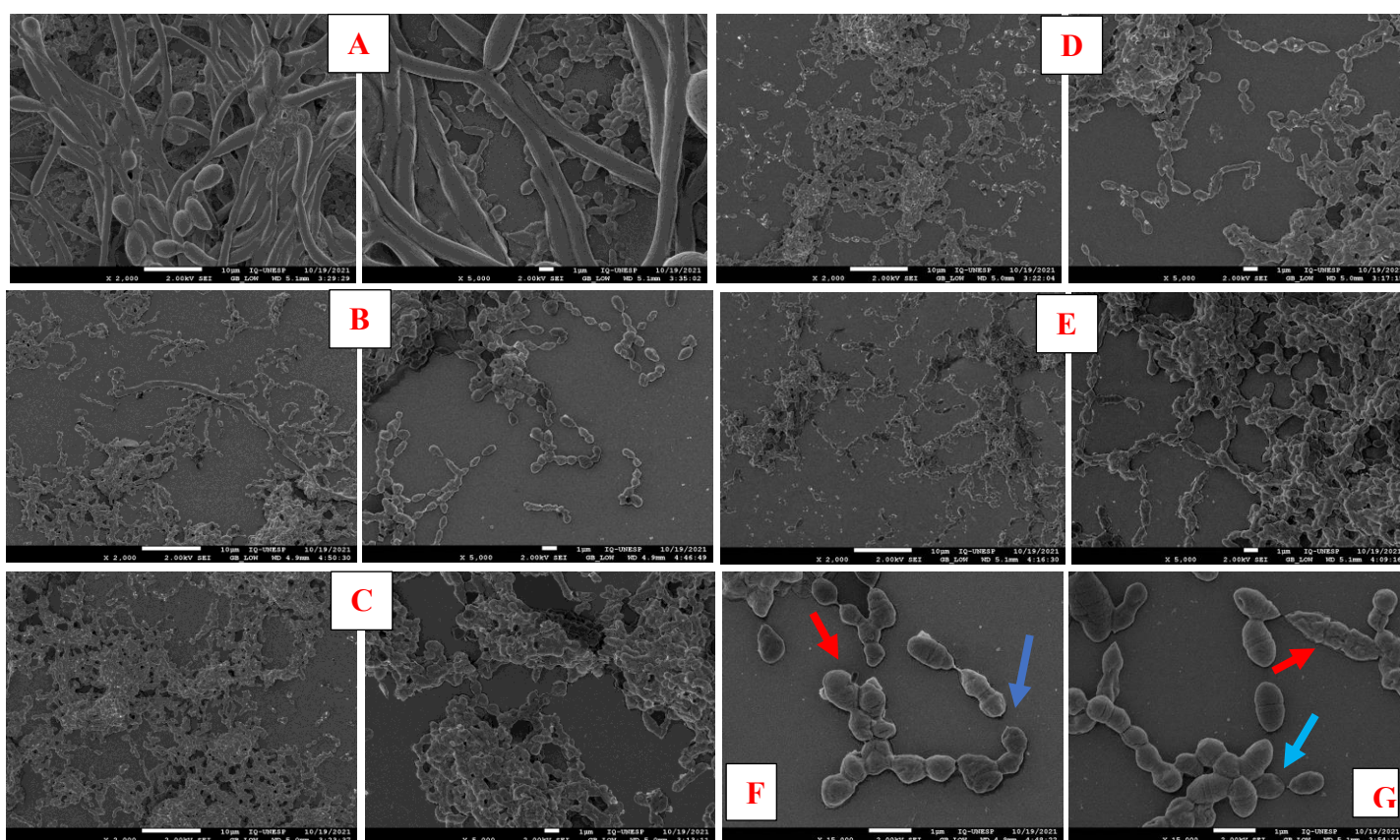
A: Controle negativo; B: Geraniol 1200 µg/mL; C: Geraniol 150 µg/mL; D: Nanoemulsão de Geraniol 150 µg/mL.

Fonte: Elaboração própria.

Para avaliação da morfologia de *C. albicans* após os tratamentos com as NEs, utilizou-se MEV. Biofilmes simples foram formados sobre lamínulas depositadas no fundo de placas de 24 poços e avaliados após o tratamento com as concentrações mais efetivas das nanoemulsões definidas previamente. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 13, A) mostraram a morfologia normal das leveduras (ovais) do grupo controle sem alterações aparentes, mostrando um aglomerado de

células bem preservadas, com presença de hifas e caracterizadas por paredes celulares intactas com uma camada externa fibrilar clara e lisa. As células tratadas com extrato puro do GE 600 µg/mL (2xMIC) apresentaram superfícies alteradas e uma menor desintegração do biofilme comparadas às nanoemulsões carregadas (Figura 13, C). O tratamento com GE-NE 75 µg/mL (4xMIC) e GE-NM 300 µg/mL (2xMIC) apresentaram extensa e significativa desintegração do biofilme, células com morfologia alterada da parede celular (Figura 13, F e G, setas vermelhas) sem a camada fibrilar e interrupção na transição de levedura para hifa, com ruptura das células fúngicas (Figura F e G, setas azuis) semelhantes à Nistatina 640 µg/ml (80xMIC; Figura 13, B).

Figura 13 - Microscopia eletrônica de biofilmes simples de *C. albicans* após o tratamento com o geraniol e as nanoemulsões

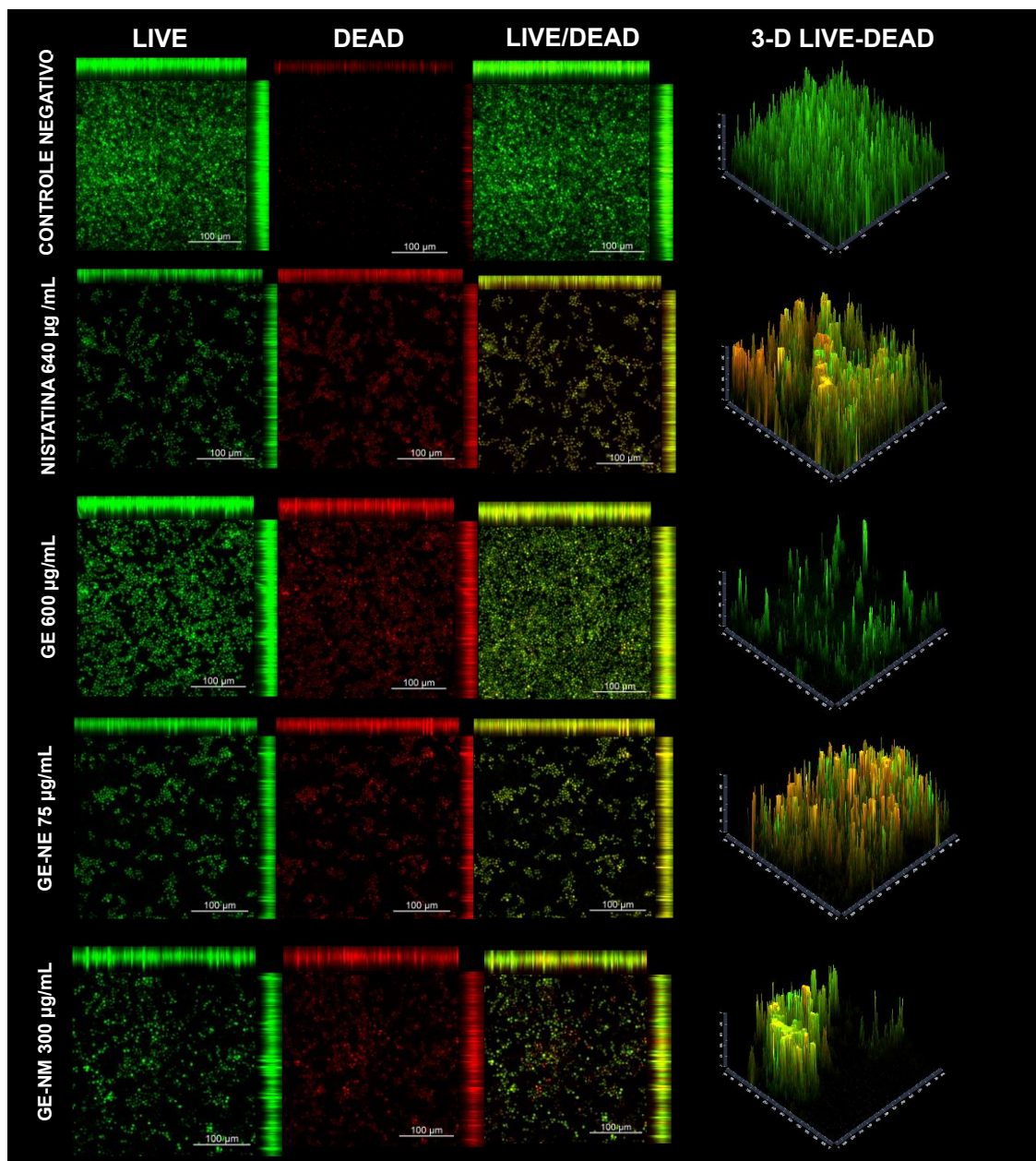


A barra nas imagens corresponde a 10 µm de *C. albicans* (ampliação de 2000x) e 1 µm (5000x e 15000x). (A) controle negativo; (B) Nistatina (640 µg/mL); (C) GE (600 µg/mL) (D e F) GE-NM (300 µg/mL); (E e G) GE-NE (75 µg/mL).

Fonte: Elaboração própria.

Quatro grupos foram escolhidos para a análise MCVL e ilustrar a viabilidade de *C. albicans* em comparação com o controle negativo. Nas imagens, as células vivas nos biofilmes foram coradas e emitiram um sinal de fluorescência verde, enquanto as células mortas foram coradas e produziram fluorescência vermelha (Figura 14).

Figura 14 - Imagens representativas da MCVL ilustrando o efeito do GE, GE-NE e GE-NM sobre biofilmes de *Candida albicans*



Fluorescência verde significa células viáveis; fluorescência vermelha significa células não viáveis.

Fonte: Elaboração própria

Tabela 8 - Espessuras de biofilme de *Candida albicans* obtidos por meio de MCVL após tratamento

	C. negativo	NI 640 µg/mL	GE 600 µg/mL	GE-NE 75 µg/mL	GE-NM 300 µg/mL
Espessura (µm)	160,3 (±11,3)	113,9 (±15,8)	132,4 (±0,5)	60,1 (±10,2)	107,1 (±25,3)
%	100,0	71,1	82,6	37,5	66,8

Dados apresentados como médias (desvio-padrão).

Abreviaturas: C. Negativo: controle negativo; NI: nistatina.

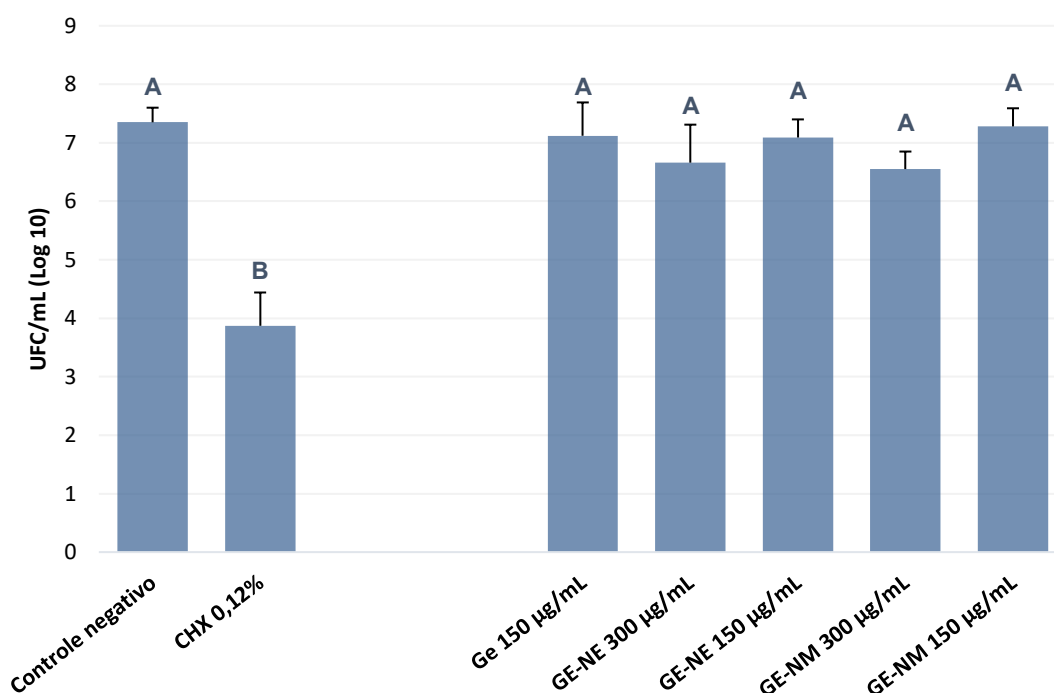
Fonte: Elaboração própria.

As imagens mostram um grande número de células mortas (em vermelho) após o tratamento dos biofilmes com as NEs de geraniol, evidenciando que a incorporação do GE em nanoemulsões contribuiu para a desorganização de todos os biofilmes avaliados. A Tabela 8 mostra a espessura dos biofilmes tratados de *C. albicans* em relação àqueles sem tratamentos confirmando os resultados obtidos pelo ensaio de UFC e MEV e comprovando que o extrato puro do GE foi menos eficaz na redução dos biofilmes comparado a GE-NE e GE-NM.

5.6.2 Streptococcus mutans

As concentrações de GE-NE e GE-NM não acarretaram a diminuição significativa ($p>0,05$) de UFC nas concentrações testadas comparado ao controle positivo (clorexidina 0,12%), sendo similar ao controle negativo, sugerindo que as concentrações não citotóxicas das nanoemulsões incorporadas com geraniol não exerceram efeito significativo no ensaio antibiofilme de *S. mutans* (Figura 15).

Figura 15 - Quantificação (Log10 UFC/mL) em biofilme simples de *S. Mutans*



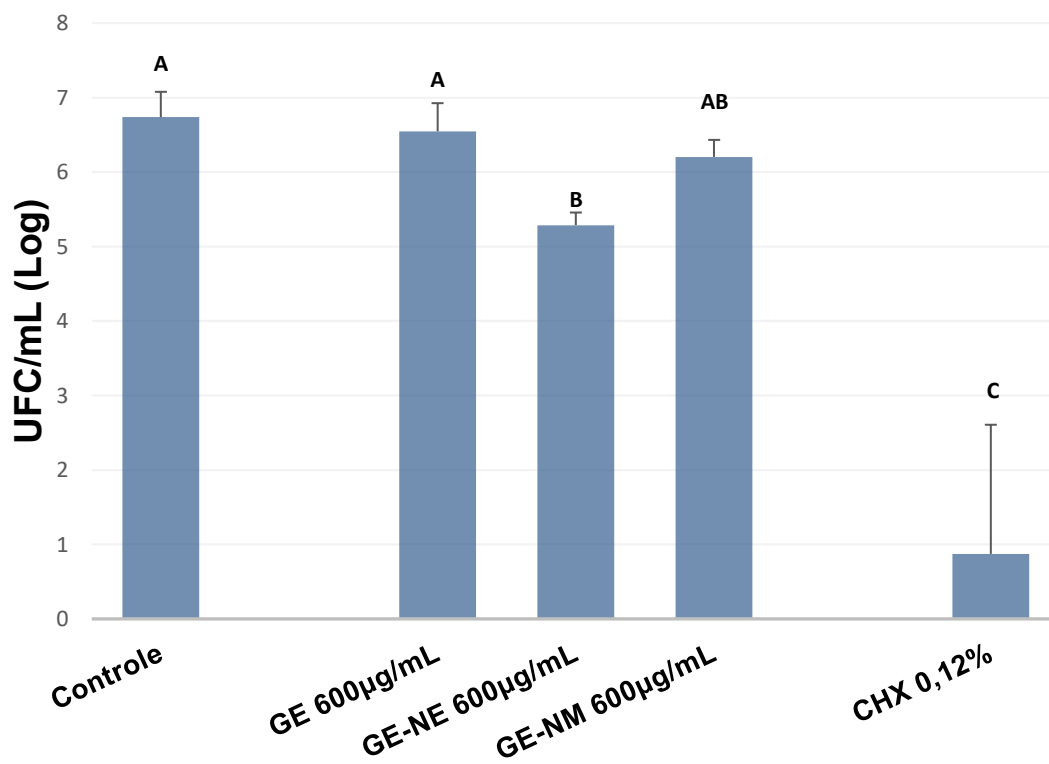
*Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 1-fator, Pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.6.3 Biofilme misto de *C. albicans* e *S. aureus* sobre corpos de prova de Titânio

Pode-se observar na Figura 16, que os grupos de estudo avaliados exerceram pouco efeito na redução do biofilme misto de *C. albicans* e *S. aureus* em meio seletivo para o *S. aureus*. Nota-se que apenas o grupo GE-NE 600µg/mL apresentou resultado significativo, porém não tão efetivo quanto ao controle positivo CHX 0,12%.

Figura 16 - Valores médios e desvios-padrão de UFC/mL (Log 10) em biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus* de acordo com o meio de cultura seletivo para o microrganismo *S. aureus*

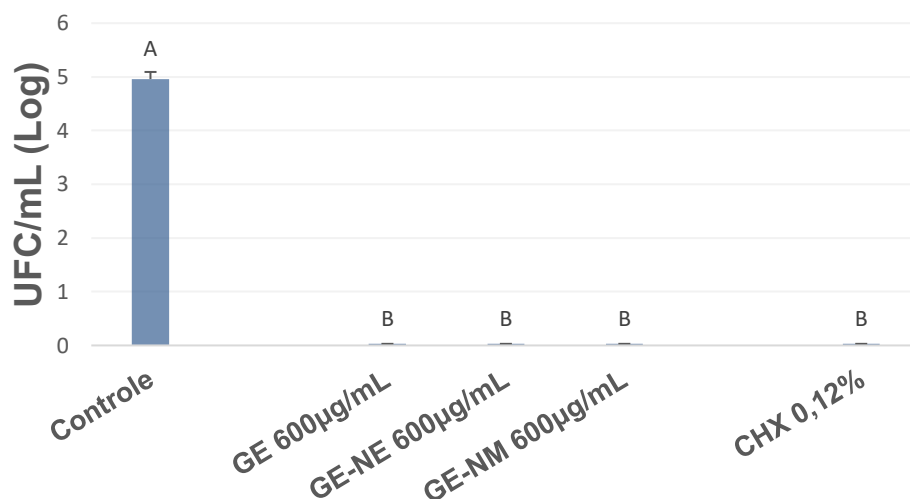


*Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (Teste de Anova One-Way, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Para o meio seletivo de *C. albicans*, observa-se na Figura 17 que os grupos de estudo avaliados impediram o crescimento do biofilme misto, apresentando resultados semelhantes ao controle CHX 0,12%.

Figura 17 - Valores médios e desvios-padrão de UFC/mL (Log) em biofilmes misto de *C. albicans* e *S. aureus* de acordo com o meio de cultura seletivo para o microrganismo *C. albicans*

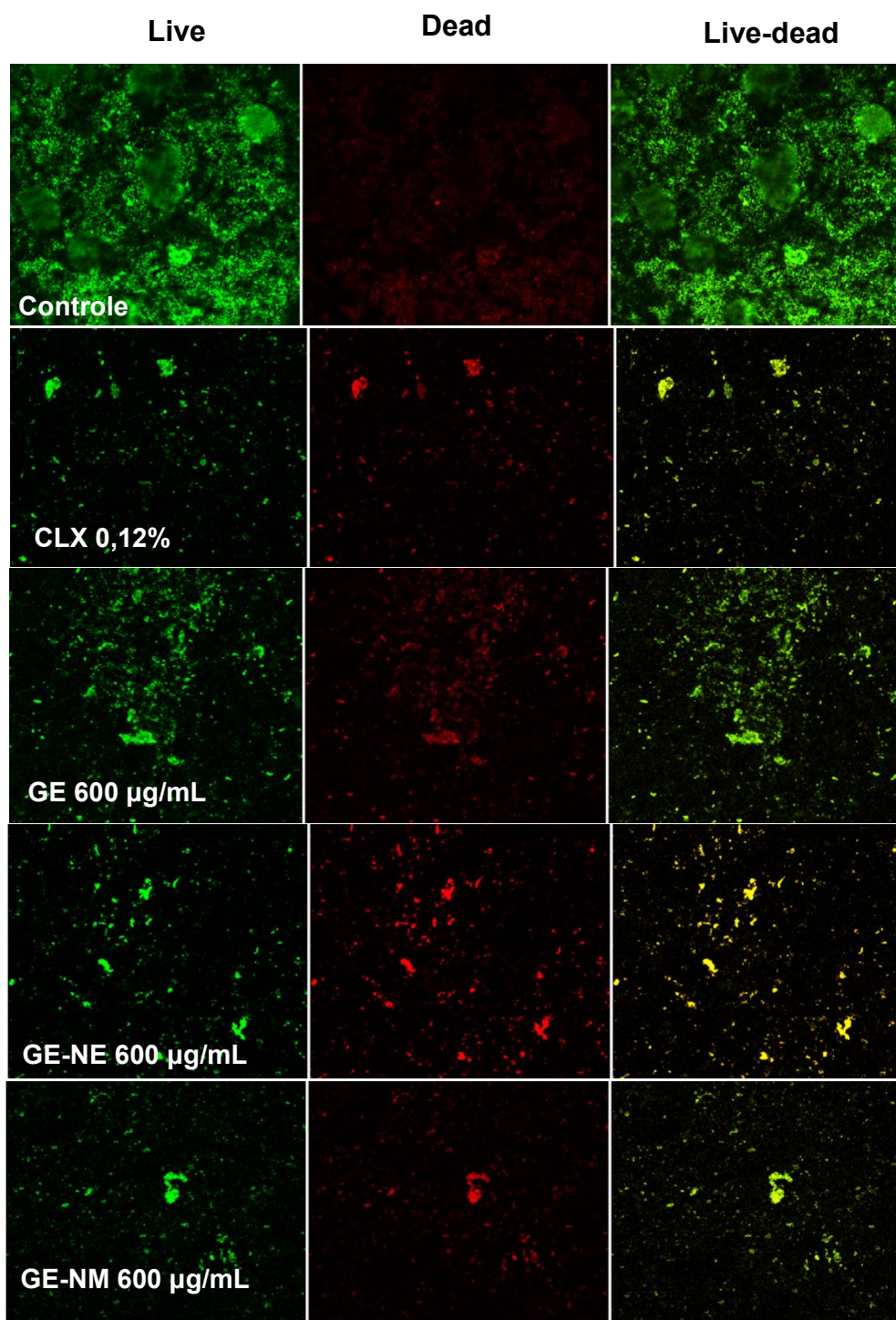


*Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (Teste de Anova One-Way, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Quatro grupos foram escolhidos para a análise MCVL e MEV para ilustrar a viabilidade de biofilme misto de *C. albicans* e *S. aureus* sobre corpos de prova de titânio em comparação com o controle negativo (Figura 18; Figura 19, respectivamente).

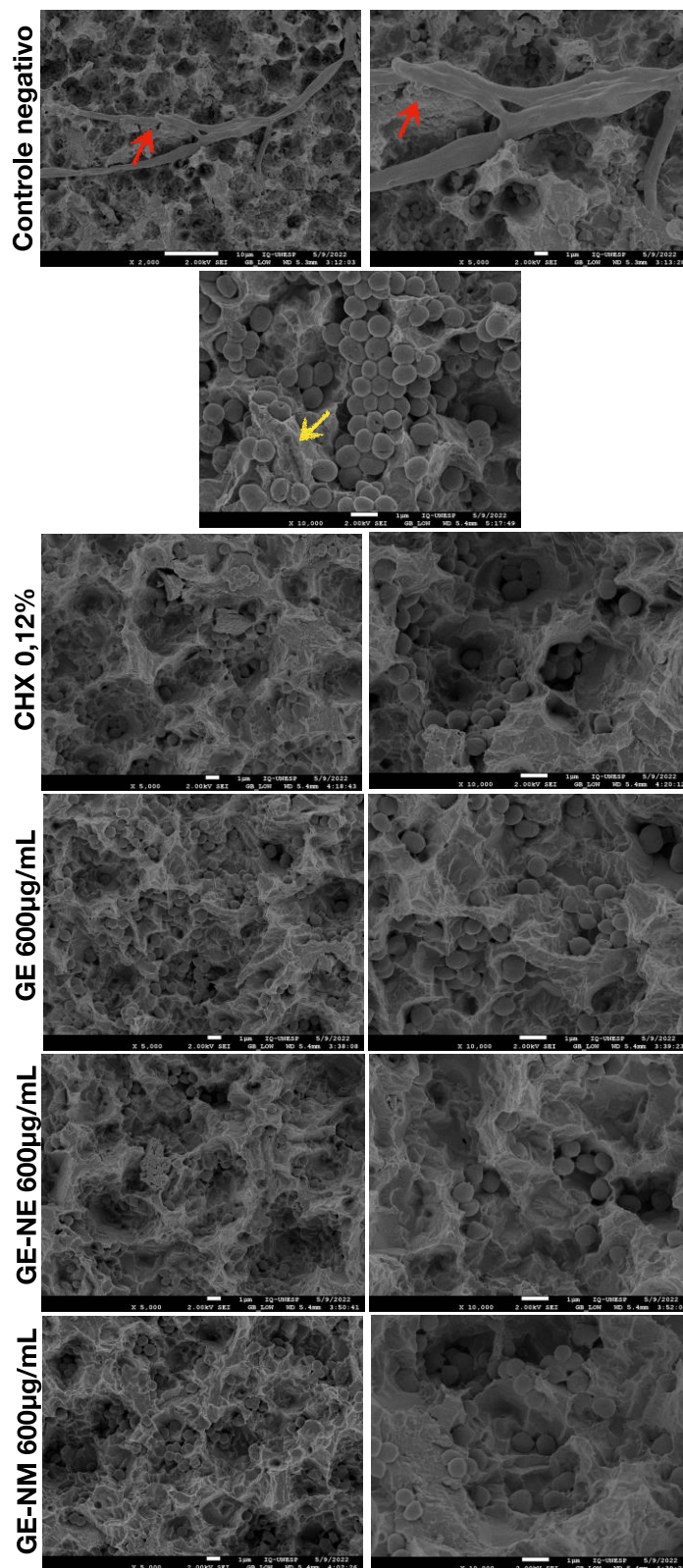
Figura 18 - Imagens representativas MCVL ilustrando o efeito do geraniol e nanoemulsões de geraniol sobre biofilmes de *C. Albicans* e *S. aureus* formados sobre superfícies de titânio



Fluorescência verde significa células viáveis; fluorescência vermelha significa células não viáveis.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes misto de *C. albicans* e *S. aureus* após o tratamento



*Seta vermelha: afinidade de *S. aureus* pela hifa de *C. albicans*; Seta amarela: matriz polimérica extracelular.

Fonte: Elaboração própria.

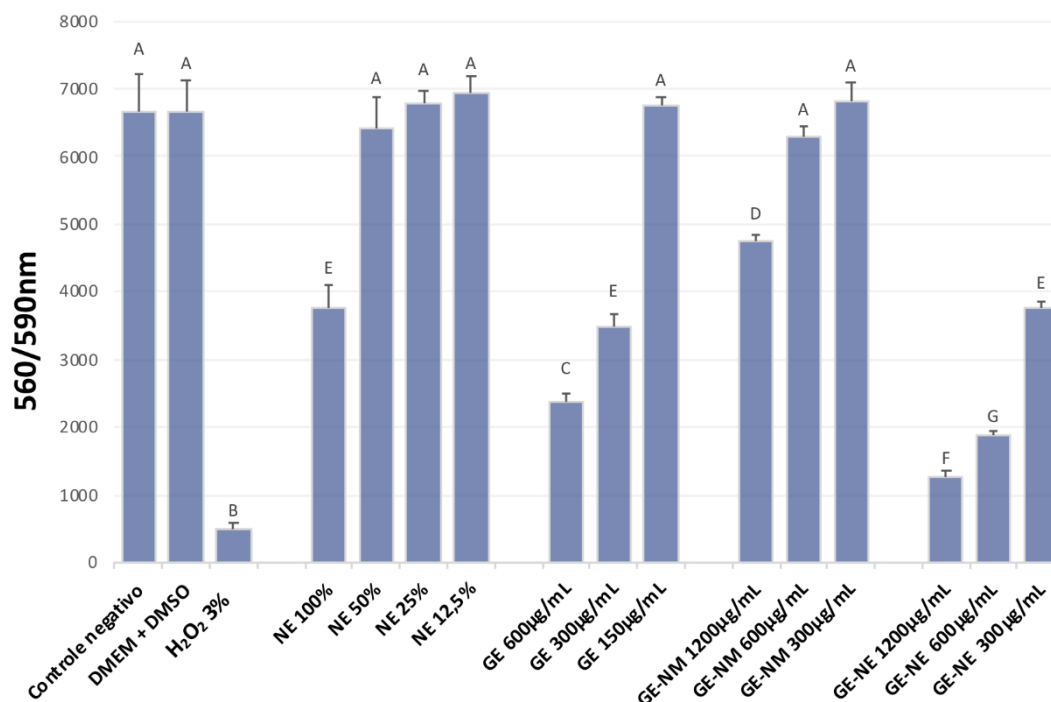
Nas imagens de MCVL, as células vivas nos biofilmes foram coradas e emitiram um sinal de fluorescência verde, enquanto as células mortas foram coradas e produziram fluorescência vermelha.

Nas imagens de MEV é possível observar a afinidade de *S. aureus* pela hifa de *C. albicans* (seta vermelha) e a presença de matriz polimérica extracelular (seta amarela) protegendo os cocos de *S. aureus* no grupo controle negativo. Nos demais grupos, não é possível verificar a presença de *C. albicans* confirmando o resultado obtido pelo ensaio UFC/mL.

5.7 Citotoxicidade

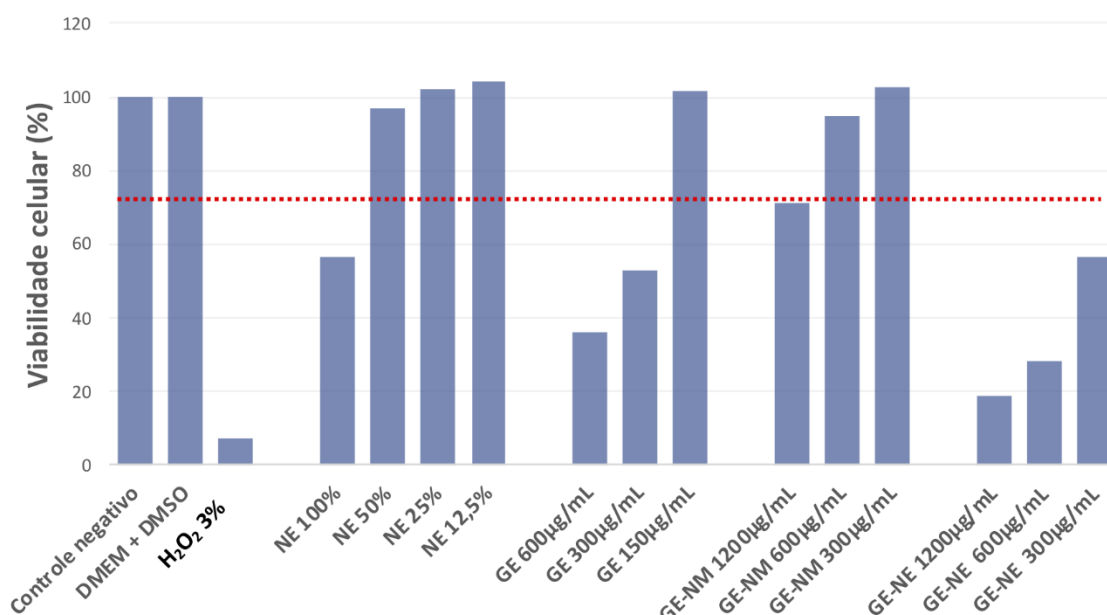
Considerando a eficácia do geraniol sobre cepas de *C. albicans*, testou-se a toxicidade desses compostos em células de queratinócitos orais NOK-SI. A estatística descritiva do ensaio Alamar Blue dos grupos testados está descrita na Figura 20 e foram consideradas viáveis as concentrações com resultados de viabilidade celular $\geq 70\%$ (Figura 21). Os resultados mostraram que concentrações de Geraniol iguais ou abaixo de 150 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram mais de 90% de células viáveis. No entanto, ocorreu uma redução drástica e repentina na viabilidade celular a partir da concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$, cujo número de células viáveis foi de 52,61%, seguido de percentuais menores para as demais concentrações, ocorrendo morte completa em concentrações superiores a 1200 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, foi possível selecionar as concentrações $\leq 300 \mu\text{g/mL}$ para serem estudadas nos testes antibiofilme.

Entretanto, quando avaliamos o efeito de diferentes concentrações da GE-NE sobre células NOK-SI, houve diminuição no percentual de células viáveis em concentrações maiores que 150 $\mu\text{g/mL}$ seguido de percentuais menores para as demais concentrações, ocorrendo morte completa nas concentrações acima de 600 $\mu\text{g/mL}$. A maior toxicidade da GE-NE sobre células NOK-SI comparada com o extrato simples possivelmente ocorreu pelas diferenças na absorção celular, pois o sistema de nanoemulsão provavelmente foi melhor absorvido pelas células devido à sua composição. Além disso, a diluição das NEs em meio de cultura DMEM ocasionou a sedimentação do colesterol no fundo das placas de 96 poços, acarretando em obliteração da monocamada de células e consequente prejuízo na respiração celular. Portanto, foi necessário modificar a estrutura da NE com o desenvolvimento e formulação de novo carreador objetivando a obtenção de uma micela de geraniol, que apresentou viabilidade celular com concentrações de 600 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 20 – Ensaio Alamar Blue de GE-NE e GE-NM em células NOK-Si

*Letras iguais representam semelhança estatística entre os grupos.
DO= densidade ótica; NE, nanoemulsão pura (Blank).

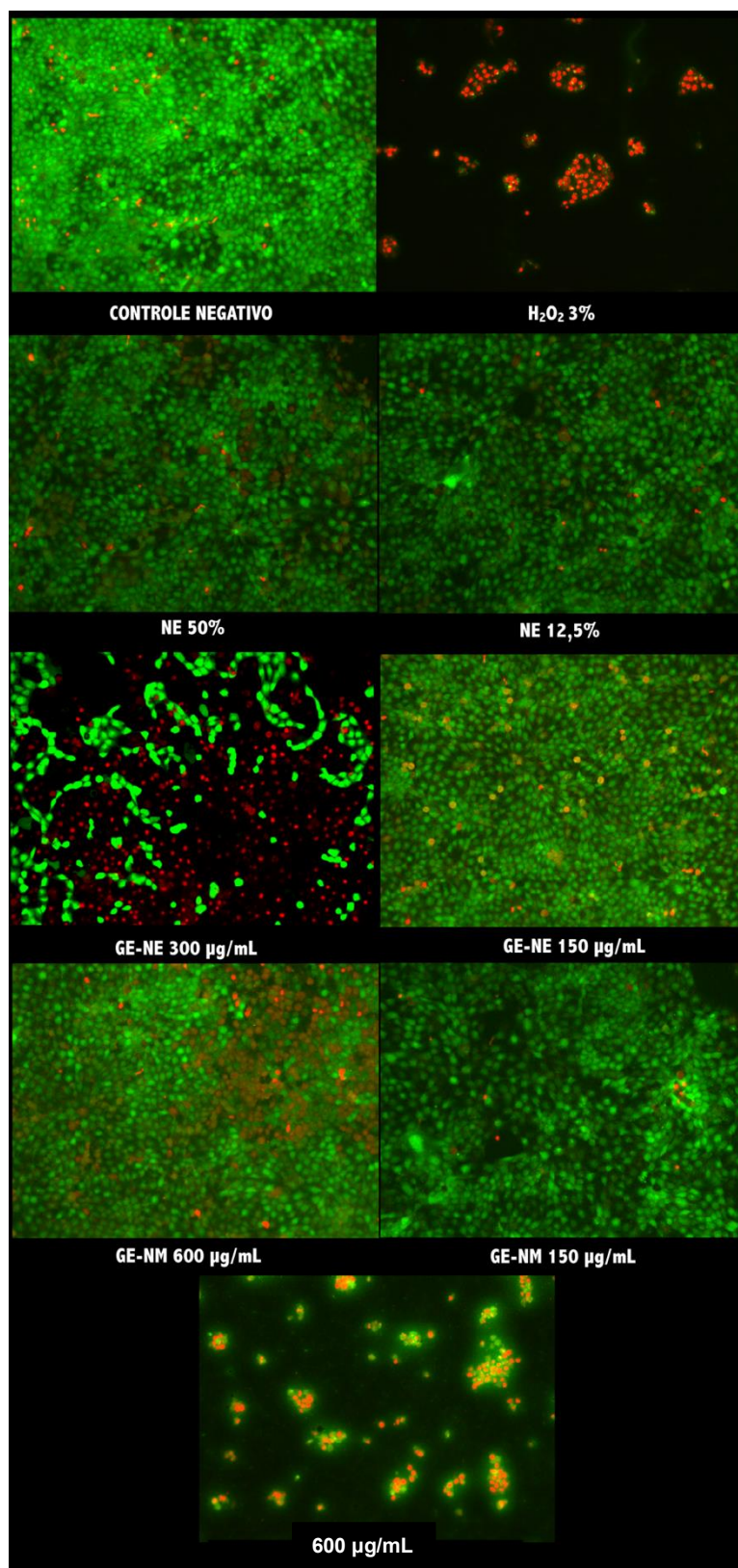
Fonte: Elaboração própria.

Figura 21 – Viabilidade celular de células NOK-Si detectadas pelo ensaio Alamar Blue após incubação com GE-NE e GE-NM

*A linha pontilhada representa a viabilidade de 70%, considerada segura para células.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 22 - Imagem representativa do ensaio live/dead dos grupos experimentais



*Fluorescência verde indica células viáveis. Fluorescência vermelha indica células mortas.

Fonte: Elaboração própria.

As imagens comprovam os resultados obtidos pelo teste Alamar Blue (Figura 22), onde observou-se viabilidade celular das concentrações de geraniol (<150 µg/mL), da NE pura, NE de geraniol (<150 µg/mL). A incorporação do geraniol na nanoemulsão micelar melhorou a viabilidade celular comparado ao extrato simples do geraniol.

6 DISCUSSÃO

As limitações e heterogeneidade dos tratamentos convencionais das doenças periimplantares utilizados atualmente proporcionaram novas perspectivas quanto ao uso de terapias alternativas com produtos naturais. No presente estudo, uma nanoemulsão carregada com geraniol foi desenvolvida para avaliar sua atividade antifúngica e antibiofilme em cepas de *C. albicans* e bactérias envolvidas na patogênese da PI. O GE tem imenso potencial como agente antimicrobiano e pode contribuir para a redução da resistência medicamentosa dos microrganismos presentes em biofilmes bucais. No entanto, o GE é altamente instável, tem baixa solubilidade em água, alta volatilidade e é propenso à oxidação em temperaturas normais. Portanto, sua incorporação em nanoemulsão possibilita melhorar sua estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade²⁵⁶.

Neste estudo, foram desenvolvidas nanoemulsões e examinados os principais parâmetros físico-químicos. As nanoformulações formadas foram cineticamente estáveis, pois não apresentaram separação gravitacional²⁵⁶. O método de sonicação foi utilizado por ser eficaz, permitir melhor controle da granulometria e ampla escolha de constituintes da formulação²⁵⁷. A fosfatidilcolina de soja é um surfactante anfótero atóxico com alta eficiência na entrega de fármacos e bem tolerado pelo organismo, pois faz parte das membranas celulares e pode ser totalmente metabolizado²⁵⁸. Foi classificado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como um produto seguro para consumo humano e foi utilizado como surfactante para a produção de NEs, pois este composto consiste em uma mistura de fosfolipídios de origem animal ou vegetal, biocompatível e biodegradável e que não possuem carga em pH fisiológico²⁵⁹. Além disso, contêm lipídios polares carregados negativamente que são de grande importância na estabilidade a longo prazo das emulsões, pois conferem um potencial zeta negativo na interface, permitindo a repulsão eletrostática entre as gotas²⁶⁰.

O Brij 58 foi utilizado neste estudo devido à sua natureza não iônica, alto valor de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) e baixas concentrações micelares críticas (CMC) que diminui a instabilidade de óleo e água²⁶¹, potencializando a interação entre a membrana celular e o fármaco²⁶². Além disso, os sistemas de nanoemulsão formados com surfactantes mistos oferecem propriedades superiores aos componentes puros²⁶³, e surfactantes (especialmente os não iônicos) reduzem os danos do sistema interfacial²⁶⁴, e são menos irritantes do que os compostos iônicos²⁶⁵.

As nanoemulsões apresentaram tamanhos médios de partículas de $150,8 \pm 1,7$ nm (blank-NE), $232,3 \pm 2,7$ nm (GE-NE), e $93,08 \pm 0,87$ nm (GE-NM) corroborando outros estudos que consideram que o tamanho das NEs deve estar entre 10 e 250 nm²⁶⁶; e que uma menor distribuição de tamanho é geralmente considerada estável contra os processos de floculação, cremeação, sedimentação e coalescência²⁶⁷. Ao comparar as formulações descarregadas (Blank) e carregadas (GE-NE), observou-se um aumento no tamanho das partículas após a incorporação, indicando que houve eficácia de encapsulamento do GE no sistema lipídico.

O PDI é um índice que avalia a relativa homogeneidade dos tamanhos das partículas distribuídas na amostra²⁶⁸ e valores estreitos são condições necessárias para sua alta estabilidade e homogeneidade. Portanto, quanto menor o seu valor, menor é o intervalo do tamanho da gota²⁶⁹. Para as formulações carregadas e descarregadas, a análise de espalhamento de luz mostrou valores médios de PDI na faixa de 0,1 a 0,5 após a formulação, indicando a homogeneidade do tamanho das gotas e estabilidade do sistema²⁷⁰, e corroborando outros achados, estudos que obtiveram a mesma correlação^{271,272}.

O potencial Zeta (PZ) é uma ferramenta útil para estimar a estabilidade de nanoemulsões porque determina a repulsão eletrostática entre os glóbulos. Os valores de PZ obtidos das NEs descarregadas apresentaram carga negativa pela presença de fosfatidilcolina de soja que pode fornecer cargas negativas às partículas devido aos seus grupos ésteres e à hidroxila livre do colesterol²⁷³. Após a incorporação, houve uma pequena diminuição do PZ na GE-NE e na GE-NM, que pode estar relacionado ao fenômeno de adsorção do GE na interface da nanoemulsão²⁷⁴, e à remoção do colesterol da formulação, respectivamente.

A estabilidade das nanoemulsões é um requisito essencial para sua aplicação como sistema de liberação de fármacos. O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto submetido às condições ambientais, desde a fabricação até a data de validade. Os testes de estabilidade são considerados um procedimento preditivo para condições que aceleram mudanças que podem ocorrer nas condições de mercado. Devido às condições em que é realizado, esse tipo de teste não tem o objetivo de estimar a vida útil do produto, mas sim auxiliar na triagem das formulações ao longo da produção, antes de chegar ao produto final²⁷⁵. A estabilidade do GE-NE foi avaliada no período de 6 a 12 meses, não sendo observadas alterações significativas em relação ao diâmetro das partículas, PDI e PZ,

que pode ser decorrente do método de preparação, constituintes da formulação e ambiente de armazenamento²⁷⁶, contribuindo para a boa estabilidade físico-química demonstrada pelas NEs.

O ensaio de concentração inibitória mínima fornece informações sobre a menor concentração útil que exerce atividade contra a cepa microbiana testada, e valores mais baixos correspondem ao maior potencial na produção de dispositivos médicos. Uma substância tem forte atividade antimicrobiana quando possui CIM inferior a 500 µg/mL, atividade moderada com CIM entre 600 e 1500 µg/mL e atividade fraca com valores acima de 1500 µg/mL^{254,277}.

Ainda neste estudo, resultados de CIM e CFM de GE em culturas planctônicas de *C. albicans* demonstraram a sua eficácia contra os fungos em suspensão. As concentrações encontradas são semelhantes às descritas na literatura²⁷⁸ e mais eficazes do que outros relatos²⁷⁹. No entanto, nossos resultados diferem dos resultados obtidos em outros estudos onde o GE inibiu cepas de *C. albicans* e não *albicans* com CIM entre 16-130 µg /mL^{280,281}. A variabilidade dos valores de CIM e CFM na literatura pode ser devido às variações das cepas e solventes utilizados. A incorporação nos sistemas nanoestruturados melhoraram a atividade antifúngica do GE, apresentando CIM de 18,75 µg/mL e CFM de 37,5 µg/mL (GE-NE) e 150 e 300 µg/mL (GE-NM) tendo seus efeitos antifúngicos potencializados cerca de dezesseis (16xCIM) a duas vezes (2xCIM) em relação ao extrato simples do GE, respectivamente, corroborando com outro estudo que avaliou a atividade antifúngica de extratos de caules e folhas de *Astronium* sp incorporados em um sistema lipídico nanoestruturado.²³⁶

A menor CIM da GE-NE comparada à GE-NM está relacionada à presença do colesterol na composição²⁸², permitindo a interação com o ergosterol presente na membrana celular do fungo, induzindo a liberação do GE diretamente no alvo. Em relação ao extrato puro do GE, as NEs possuem surfactantes que podem ocasionar a ruptura dos lipídios da membrana biológica levando a uma redução na estrutura dessa barreira e causando um aumento da permeação dos compostos ativos^{283,284}.

A natureza do efeito antimicrobiano produzido por uma substância contra um microrganismo específico pode ser classificada de acordo com a relação entre sua CFM e CIM, onde uma relação CFM/CIM $\leq$ 2:1 indica uma característica fungicida do produto e uma CFM/CIM razão $>$ 2:1 sugere que este produto é fungistático²⁸⁵. A razão CFM/CIM (2:1) de geraniol, GE-NE e GE-NM mostrou forte atividade antifúngica para

a cepa testada, e nosso resultado confirma outros estudos realizados onde o GE teve ação fungicida contra cepas de *C. albicans*²⁸⁰. O resultado para o grupo controle não mostrou inibição do crescimento fúngico. As pesquisas com substâncias fungicidas são importantes para serem implementadas na prática clínica, pois proporcionam menores riscos à aquisição de resistência por microrganismos e permite melhor efeito terapêutico em indivíduos imunossuprimidos^{286,287}.

Biofilmes polimicrobianos são uma comunidade tridimensional complexa que consiste em um aglomerado heterogêneo de microrganismos (fungos, bactérias e vírus) ligados a superfícies bióticas e abióticas, encapsulados em uma matriz polimérica extracelular, que também pode ser resistente a tratamentos convencionais com antibióticos²⁸⁸.

Sabe-se que a microbiota na PI é uma infecção polimicrobiana anaeróbica, onde há a presença de bactérias do complexo vermelho (*Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*) e do complexo laranja (*Staphylococcus aureus*, gênero *Eubacterium*, *Filifactor alocis*)^{62,289-291}. Maior prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia* foi detectada em biofilmes de peri-implantite em comparação com implantes saudáveis²⁹². Além disso, *C. albicans* associada com *Streptococcus mutans* aumenta sua virulência na candidíase invasiva, cárie precoce da infância e PI.²⁹³

Vários estudos têm investigado a atividade antimicrobiana de produtos naturais contra microrganismos causadores de doenças bucais^{294,295}, entretanto há poucos relatos referentes à ação antimicrobiana do GE contra *S. mutans* e bactérias anaeróbicas. Neste estudo, o teste de difusão em ágar foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana do GE. Este é um teste de fácil execução e frequentemente usado para rastrear a atividade antimicrobiana de produtos naturais.²⁹⁵ Os resultados mostraram atividade positiva e dose dependente contra cepas de *S. mutans* e Aa, porém em concentrações citotóxicas do GE, como observadas neste mesmo estudo. Por este motivo, outros testes com maior sensibilidade foram realizados somente para *S. mutans*.

Os valores de CIM (600 µg/mL) e CBM (1200 µg/mL) do GE sobre *S. mutans* foram diferentes aos obtidos em estudo anterior que mostraram valores de CIM dos extratos do óleo essencial do *C. citratus* variando de 2,5 mg/mL a 10 mg/ml para espécies de estreptococos²⁹⁵, e similares aos resultados encontrados em outra investigação com óleo essencial de *Litsea cubeba* (CIM= 750 ug/mL)²⁹⁶. A maioria das

investigações das atividades antimicrobianas dos produtos naturais contra *S. mutans* são referentes aos óleos essenciais, que são constituídos de outros componentes, que mesmo em pequenas concentrações, agem sinergicamente contribuindo para o efeito antimicrobiano do óleo, dificultando comparações com os nossos resultados.

Além de avaliar a atividade antimicrobiana em suspensão, este estudo verificou se o GE, GE-NE e GE-NM (concentrações de 1xCIM) promovem atividade antimicrobiana contra bactérias cariogênicas em biofilmes. Apesar de discreta diminuição de UFC/mL, os resultados sugeriram que os grupos testados não inibiram significativamente a formação do biofilme de *S. mutans* em relação ao grupo controle.

Streptococcus mutans é uma espécie acidúrica que codifica exoenzimas glicosiltransferases (GTFS) capazes de organizarem o acúmulo de biofilme cariogênico através da sintetização de uma matriz extracelular tridimensional (3D) rica em exopolídiossacarídeos (EPS) criando microambientes com acúmulo de metabólitos ácidos que se acumulam nos biofilmes dentários. Além disso, GTFS estão presentes na película salivar e fomentam a adesão e aumento de vários microrganismos como *C. albicans*.²⁹⁷

No presente estudo não ocorreu a eliminação do biofilme de *S. mutans* pelo GE e sua incorporação nas NEs possivelmente devido à dificuldade de difusão através da matriz EPS sintetizada no biofilme^{298,299}. A matriz polimérica de exopolissacarídeos (EPS) atua como uma cola mantendo as bactérias unidas e criando uma proteção contra o sistema imunológico hospedeiro e os antimicrobianos devido a acidez do biofilme e às altas cargas negativas da superfície das bactérias³⁰⁰. As GE-NE e GE-NM sintetizadas neste estudo apresentaram caráter aniônico e o efeito da sua carga superficial na penetração dos biofilmes de *S. mutans* podem ter dificultado sua captura e liberação dentro da matriz aniônica do EPS como foi demonstrado em outro experimento que utilizou nanopartículas carregadas positivamente²⁹⁹. Além disso, o curto tempo de exposição³⁰¹ (24 h) associado à adsorção de proteínas do meio de cultura pelas nanoemulsões criando uma coroa biomolecular (corona proteica) podem ter alterado suas propriedades superficiais afetando sua especificidade e eficácia^{302,303}.

Entretanto, biofilmes de *C. albicans* também apresentam ambiente ácido e aniônico, e a maior atividade das nanoemulsões de geraniol contra *C. albicans* pode estar relacionada à sua capacidade de modificar as propriedades de superfícies e membranas celulares desses microrganismos devido a presença dos surfactantes,

reduzindo a hidrofobicidade de sua membrana, a tensão superficial e o aumento da sua molhabilidade²⁸⁸, comprometendo a adesão e processos patogênicos de *C. albicans*³⁰⁴. Mais trabalhos devem ser realizados para investigar os mecanismos das interações entre emulsões, células em suspensão e biofilmes e melhorar a eficácia das NEs de geraniol contra biofilmes dentários.

Os biofilmes simples de *Candida albicans* foram escolhidos neste estudo devido à sua afinidade pelo titânio e ao seu papel oportunista no desenvolvimento da PI e participação na composição da microflora periimplantar³⁰⁵. Embora seja frequentemente isolado na doença periimplantar, o seu papel etiológico ainda é desconhecido e necessita de investigações adicionais.

Microrganismos planctônicos são mais sensíveis a antimicrobianos do que associados a biofilmes. Eliminar patógenos associados a biofilmes pode exigir doses até 1000 vezes superiores de antibióticos comparadas àquelas que geralmente matam bactérias nas suas formas livres, e grande parte das infecções resistentes aos antimicrobianos são causadas pelas bactérias patogênicas associadas em biofilmes^{288,306}.

O presente estudo avaliou a ação de GE, GE-NE e GE-NM sobre biofilmes de *C. albicans*, e uma grande atividade antifúngica foi observada em concentrações de 1200 µg/mL (4xCIM), 75 µg/mL (4xCIM), e 300 µg/mL (2xCIM), respectivamente, causando redução completa dos biofilmes maduros. Ao comparar com a Nistatina utilizada como controle positivo, foi necessária uma concentração de 80xCIM para eliminar o biofilme. Estudos mostram que a concentração terapêutica efetiva antibiofilme pode ser 10-1000 vezes maior do que a de culturas planctônicas (CIM)^{243,307,308}. No presente estudo, biofilmes de *C. albicans* sofreram redução significativa (6,3 Log 10) nas concentrações não-citotóxicas da GE-NE (< 300 µg/mL) e GE-NM (< 600 µg/mL). Portanto, nossos achados sugerem um potencial uso de GE-NE e GE-NM como antifúngicos para pacientes acometidos por candidíase crônica. Embora existam estudos na literatura sobre o efeito antimicrobiano do GE, nenhum estudo avaliou sua ação incorporada em uma NE sobre biofilmes de *Candida albicans*.

A partir da análise das imagens obtidas por microscopia confocal a laser, foi possível verificar que GE, GE-NE e GE-NM influenciaram na viabilidade de biofilmes simples de *C. albicans*, corroborando os resultados de outras análises microbiológicas. A marcação em vermelho mostrou a morte celular, e consequente

inibição da formação de biofilmes maduros simples de *C. albicans* após 24 horas de tratamento.

Na análise da MCVL, a espessura do biofilme tratado com a GE-NE 75 µg/mL foi 62% menor que a do biofilme de *C. albicans* não tratado (controle negativo), indicando que a formação de biofilme foi inibida pela GE-NE. Isso pode significar que o tratamento com NE pós maturação do biofilme danificou as células fúngicas dentro do biofilme³⁰⁹. A espessura do biofilme tratado com GE 600 µg/mL representou 82% do biofilme não tratado. Achados semelhantes já foram observados anteriormente quando substâncias antimicrobianas foram incorporadas em nanoemulsões e seu efeito foi potencializado³¹⁰.

Estudar o mecanismo de ação dos antifúngicos é uma estratégia relevante para limitar o surgimento de resistência aos fármacos atualmente disponíveis, bem como para o desenvolvimento de medicamentos mais potentes e seguros contra a infecção^{311,312}. Pesquisas recentes mostraram que o tratamento com GE enfraquece a atividade de *Candida spp.*, e que o uso oral de GE promove a inibição da formação de biofilme fúngico e formação de hifas. A ação do GE destruiu a função da parede celular e reduziu a atividade da membrana plasmática (ATPase) e os níveis de ergosterol, suprimindo a expansão fúngica. Além disso, o GE afetou a função mitocondrial e a homeostase do ferro e mitigou a toxicidade genética^{21,186}.

Outro estudo concluiu que o GE alterou o esterol de espécies de *Candida* em concentrações sub-MIC e bloqueou completamente a biossíntese de ergosterol em valores de MIC na cepa estudada de forma semelhante ao modo de ação do fluconazol (FLC). FLC e outros azólicos inibem a enzima citocromo P450-14a-desmetilase que impede a formação de ergosterol a partir do lanosterol. Portanto, a inibição do crescimento de células de *Candida* pelo GE sugere a redução dos níveis de ergosterol, que é um componente essencial da membrana citoplasmática do fungo, interrompendo a integridade desta membrana e sua homeostase. A membrana plasmática contém uma proteína que bombeia H⁺ para fora da célula gerando uma força motriz de prótons que auxilia na importação de nutrientes. A acidificação induzida por glicose do meio extracelular por células fúngicas é uma medida do bombeamento de H⁺ mediado por PM-ATPase²⁸¹ e foi observado o efeito de GE na PM-ATPase e no bombeamento de H⁺ mediado por ATPase, que é essencial para a sobrevivência do fungo em alguns estudos. Além disso, fármacos como FLC e anfotericina B não têm efeitos significativos na H⁺-ATPase^{281,313}.

Um estudo observou que biofilmes de *Candida spp.* sofreram maiores danos causados por nanoemulsões de óleo de eucalipto comparados ao óleo bruto devido ao aumento da área de contato das gotículas antimicrobianas³¹⁰. Além disso, imagens de microscopia de força atômica mostraram que as gotículas antimicrobianas do óleo de eucalipto foram protegidas e entregues por nanoencapsulação³¹⁰ e que as nanopartículas inibem efetivamente a biomassa penetrando no biofilme, matando as células fúngicas internas, e inibindo a produção da matriz de polissacarídeos extracelulares³¹⁰. A matriz do biofilme pode dificultar a aplicação do fármaco e aumentar sua resistência, o que, por sua vez, torna a resistência do biofilme a materiais antimicrobianos superior à das bactérias planctônicas³⁰⁹. Neste presente estudo, os resultados confirmaram que a incorporação do GE em nanoemulsões facilitaram a sua penetração nos biofilmes de *C. albicans*, causando a morte das cepas.

A utilização dos implantes dentários é uma prática rotineira na reabilitação protética, com uma alta taxa de sobrevivência a longo prazo. No entanto, após sua instalação na cavidade bucal, ele é rapidamente revestido com um filme de saliva rico em proteínas que favorece a adesão de microrganismos da microbiota oral e formando biofilmes polimicrobianos que podem desencadear processos inflamatórios caso haja um desequilíbrio dos fatores ambientais e imunológicos dos hospedeiros²⁸⁸. A PI é uma doença inflamatória com etiologia bacteriana que pode levar à perda do implante. Além das bactérias periodontopatogênicas do complexo vermelho, a superfície do titânio pode ser facilmente colonizada por patógenos oportunistas como *S. aureus* e *C. albicans*³⁰⁵.

Devido ao seu potencial piogênico, já conhecido na dermatologia, acredita-se que o *S. aureus* desempenha um papel importante na patologia da PI, uma vez que a supuração é um achado clínico característico^{62,290}. Além disso, esses cocos gram-positivos aeróbicos também podem ser encontrados na saliva oral de adultos saudáveis e posteriormente se transformar em patógenos oportunistas, tornando-se a principal causa de muitas doenças do hospedeiro, desde pequenas infecções de pele até pneumonia, sepse, síndrome do choque tóxico e endocardite infecciosa³¹⁴.

As espécies de *Candida* são os microrganismos mais frequentemente obtidos do microbioma oral³¹⁵ e têm elevada capacidade de formação de biofilmes em superfícies abióticas como próteses e implantes dentários, e juntamente com bactérias orais como o *S. aureus*, formam biofilmes multiespécies podendo causar

estomatite, doenças periodontais e PI^{288,316}. Apesar de serem frequentemente ignorados nos estudos das doenças periimplantares, *C. albicans* foram isoladas de biofilmes associados à PI e promovem o crescimento bacteriano e o aumento da virulência causando maiores danos mucosos³¹⁷.

Portanto, este estudo investigou a atividade antibiofilme do GE e sua incorporação nas NEs em co-culturas de biofilmes de *S. aureus* e *C. albicans* sobre corpos de prova de titânio. O tratamento com as GE-NEs foi capaz de reduzir significativamente a adesão ao longo do tempo, mostrando um efeito notável em 24 h com uma inibição do biofilme de *Candida* de cerca de 100%. Ambas as espécies dentro da cultura mista, mas principalmente *C. albicans*, foram afetadas pelas soluções testes. Nesse sentido, deve-se considerar que a atividade antibiofilme observada contra *C. albicans* está relacionada a uma dupla ação do GE e das nanoemulsões de GE, sendo tanto antiadesiva, devido à sua ação na inibição da produção de hifas e pseudo-hifas, quanto antifúngica, devido à sua atividade na alteração da membrana desses fungos.

Estes dados quantitativos foram confirmados nas imagens espaciais e ensaio de viabilidade de *C. albicans* e *S. aureus* observadas através da MEV e MCVL, respectivamente. Os achados revelaram que os grupos que sofreram tratamento evidenciaram diminuição das cepas bacterianas e ausência das cepas fúngicas, e se observou um íntimo contato entre as células de *S. aureus* e as hifas de *C. albicans* nas fotomicrografias do grupo sem tratamento. *S. aureus* além de apresentar colônias na superfície do biofilme, apresentou também uma associação preferencial às hifas, sugerindo que a bactéria pode ter sido coberta pela matriz secretada por *C. albicans*, conferindo-lhe resistência reforçada ao tratamento com o GE e as NEs³¹⁸. Essa afinidade de *S. aureus* pode desempenhar um papel crucial no aumento da virulência da infecção sustentada por este biofilme fúngico-bacteriano, levando à disseminação desse microrganismo da cavidade oral para a corrente sanguínea, ocasionando em infecção sistêmica em pacientes imunocomprometidos³⁰⁵.

Um estudo mostrou que superfícies ásperas de implantes de titânio podem promover a adesão fúngica e, eventualmente dificultar o resultado de um tratamento de descontaminação, sendo a técnica fisioquímica mais eficiente independentemente das características da superfície³⁰⁵. Nossos resultados demonstraram que a incorporação do GE em nanoemulsões propicia uma rápida penetração na membrana celular microbiana, devido ao aumento da área superficial, sendo possível reduzir a

concentração para atingir um efeito bactericida equivalente ou até maior em relação às emulsões convencionais e ao composto livre³¹⁰. A aplicação de produtos naturais como terapias químicas na peri-implantite pode ajudar a melhorar a eficácia dos materiais sintéticos e contribuir para o desenvolvimento de novos recursos farmacológicos para a saúde bucal³⁰⁹.

A citotoxicidade do GE, GE-NE e GE-NM nos tecidos hospedeiros foi avaliada usando um modelo de cultura celular *in vitro* de queratinócitos humanos (Nok-Si). As avaliações citotóxicas fornecem a compreensão adequada da dose efetiva e não tóxica e ajudam na concepção do regime de dose. Além disso, há poucos dados publicados sobre estudos citotóxicos do GE^{319,320} e o presente estudo preenche essa deficiência. As concentrações máximas testadas neste estudo foram de 1200 µg/ml (4xMIC), e os resultados mostraram que concentrações de GE inferiores à 150 µg/mL (MIC/2) apresentaram mais de 90% de células viáveis e na concentração de 300 µg/mL (MIC) a porcentagem de células viáveis foi de 52,61%. Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo que avaliou viabilidade celular em células mononucleares do sangue periférico humano, onde concentrações menores ou iguais a 100 µg/mL apresentaram mais de 90% de células viáveis, e houve uma redução drástica na viabilidade celular a partir da concentração de 250 µg/mL, com morte completa em 1000 µg/mL.³²⁰

Entretanto, quando avaliamos o efeito de diferentes concentrações de GE-NE sobre células Nok-si, houve diminuição no percentual de células viáveis em concentrações maiores que 150 µg/mL (MIC/2) seguido de percentuais menores para as demais concentrações, ocorrendo morte completa nas concentrações acima de 600 µg/mL. A maior citotoxicidade da GE-NE sobre células Nok-si comparada com o extrato simples do GE possivelmente foi causada pelo tamanho reduzido das nanopartículas acarretando um aumento da área de superfície e maior atividade celular do GE causando uma redução da proliferação celular e modificação da expressão genética das macromoléculas orgânicas que constituem a matriz extracelular da mucosa oral³²¹⁻³²³. Importante salientar que a NE (blank) não exibiu efeito antimicrobiano e antibiofilme e apresentou um menor efeito citotóxico quando submetido ao teste contra as células NOK-Si, sugerindo que a atividade foi manifestada apenas pelo GE e descartando a possibilidade de distúrbio dos outros componentes que formam o sistema nanoestruturado.

Curiosamente, as micelas carregadas de geraniol apresentaram menores efeitos citotóxicos às células NOK-si comparadas à GE-NE provavelmente pela ausência do colesterol. Além disso, o complexo de nanoinclusão micelar possivelmente aumentou a estabilidade física das substâncias ativas ou metabólitos secundários do geraniol, possibilitando a retenção de suas interações com outros ingredientes e melhorando sua bioatividade³²⁴. Ponderando os limites de um estudo *in vitro*, e ressaltando que a citotoxicidade da clorexidina reduziu significativamente o número de fibroblastos e queratinócitos em um curto período de tempo³²¹, os resultados obtidos e os limites metodológicos permitem concluir que a GE-NE apresentou maior citotoxicidade contra células NOK-si comparada à GE-NM.

No entanto, o modelo utilizado neste estudo possuía células organizadas em monocamadas, diferentemente da organização tridimensional do tecido presente na mucosa oral. Novos estudos com a utilização de modelos de distribuição tecidual 3D e testes *in vivo* darão mais informações sobre os mecanismos envolvidos na toxicidade do geraniol.

Por conseguinte, as nanoemulsões desenvolvidas apresentaram resultados promissores para os testes preliminares de estabilidade e para as caracterizações físico-químicas realizadas, indicando que a escolha dos tensoativos foi correta. A incorporação do GE nas NEs melhorou sua atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre cepas de *C. albicans*, sugerindo a possibilidade deste sistema se tornar uma alternativa terapêutica para infecções por *Candida*. A nanotecnologia aplicada à saúde está em ascensão, e com base nos resultados deste estudo sugere-se mais pesquisas sobre as nanoemulsões de geraniol em uma ampla gama de fungos e bactérias patogênicas, além de estudos toxicológicos *in vivo* confirmando assim a eficácia e segurança do composto para posterior aplicação clínica. Estudos de ensaio de encapsulamento e perfil de liberação do geraniol nas NEs estão sendo realizados e irão complementar este estudo.

7 CONCLUSÃO

- O geraniol incorporado à nanoemulsão (GE-NE) e à nanoemulsão micelar (GE-NM) apresentaram tamanhos médios de 230 nm e 93 nm, PDI de 0,155 e 0,151, respectivamente, com boa estabilidade e homogeneidade após 6 meses a 1 ano de formulação;
- Os resultados indicaram uma atividade antimicrobiana do geraniol contra *S. mutans* e *A. actinomycetemcomitans*, mas em concentrações citotóxicas;
- Apenas biofilmes de *C. albicans* sofreram redução significativa (6,3 Log₁₀) nas concentrações não-citotóxicas da GE-NE (< 300 µg/mL) e GE-NM (< 600 µg/mL);
- A utilização do GE, GE-NE e GE-NM em biofilmes mistos de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em corpos de prova de Titânio diminuíram significativamente a quantidade das leveduras e sua transição para a forma de hifas;
- A incorporação do geraniol em nanoemulsões GE-NE (> 300 µg/mL) e GE-NM (> 1200 µg/mL) foram consideradas citotóxicas sobre células de queratinócitos orais humanos (NOK-SI);
- A incorporação do geraniol nas nanoemulsões como sistemas de entrega de fármacos melhoraram sua atividade antimicrobiana em comparação com seu extrato simples. Baseados nos resultados desse estudo e nas atividades biológicas das formulações desenvolvidas, novos estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para a sua utilização na prática clínica.

REFERÊNCIAS*

1. Moraschini V, Poubel L, Ferreira V, Barboza E, S. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015; 44(3): 377-88.
2. Rokaya D, Srimaneepong V, Wisitrasameewon W, Humagain M, Thunyakitpisal P. Peri-implantitis update: risk indicators, diagnosis, and treatment. *Eur J Dent*. 2020; 14(4): 672-82.
3. Lee C, Huang Y, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2017; 62: 1-12.
4. Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*. 2013; 48(3): 416-27.
5. Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol*. 201; 38(Suppl11): 203-13.
6. Dabdoub SM, Tsigarida AA, Kumar PS. Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes. *J Dent Res*. 2013; 92(12 Suppl): 168S-75S.
7. Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol*. 2014; 59(1): 66-72.
8. Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, Rincon MV, Gomez LA, Lesmes YA et al. Microbiome and microbial biofilm profiles of peri-implantitis: a systematic review. *J Periodontol*. 2017; 88(10): 1066-89.
9. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol*. 2012;39(5): 425-33.
10. Ammann TW, Belibasakis GN, Thurnheer T. Impact of early colonizers on in vitro subgingival biofilm formation. *PloS One*. 2013; 8(12): e83090.
11. Louropoulou A, Slot DE, Van der Weijden FA. Titanium surface alterations following the use of different mechanical instruments: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(6): 643-58.
12. Khairnar MR, Karibasappa GN, Dodamani AS, Vishwakarma P, Naik RG, Deshmukh MA. Comparative assessment of cranberry and chlorhexidine mouthwash on streptococcal colonization among dental students: A randomized parallel clinical trial. *Contemp Clin Dent*. 2015; 6(1): 35-9.

* 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. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(8 Suppl): 282-5.
14. Fu JH, Wang HL. Can periimplantitis be treated? *Dent Clin North Am*. 2015; 59(4): 951-80.
15. Mahato N, Wu X, Wang L. Management of peri-implantitis: a systematic review, 2010-2015. *Springerplus*. 2016; 1(5): 105.
16. Dimech GS, Soares LA, Ferreira MA, de Oliveira AG, Carvalho Mda C, Ximenes EA. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *ScientificWorldJournal*. 2013; 14: 862763.
17. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MdP, Acosta-Torres LS et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology*. 2018; 16(1): 1-33.
18. Sharma PK, Sangwan NS, Bose SK, Sangwan RS. Biochemical characteristics of a novel vegetative tissue geraniol acetyltransferase from a monoterpene oil grass (*Palmarosa*, *Cymbopogon martinii* var. *Motia*) leaf. *Plant Sci*. 2013; 203-204: 63-73.
19. Govindarajan M, Rajeswary M, Arivoli S, Tennyson S, Benelli G. Larvicidal and repellent potential of *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (*Zingiberaceae*) essential oil: an eco-friendly tool against malaria, dengue, and lymphatic filariasis mosquito vectors? *Parasitol Res*. 2016; 115(5): 1807-16.
20. Misni N, Nor ZM, Ahmad R. New Candidates for plant-based repellents against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc*. 2016; 32(2): 117-23.
21. Lei Y, Fu P, Jun X, Cheng P. Pharmacological properties of geraniol - a Review. *Planta Med*. 2019; 85(1): 48-55.
22. Mączka W, Wińska K, Grabarczyk M. One hundred faces of geraniol. *Molecules*. 2020; 25(14): 3303.
23. Baveloni FG, Riccio BVF, Di Filippo LD, Fernandes MA, Meneguim AB, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems as potential for skin application: a review. *Curr Med Chem*. 2021; 28(16): 3216-48.
24. de Matos SP, Teixeira HF, de Lima AAN, Veiga-Junior VF, Koester LS. Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: a review. *Biomolecules*. 2019; 9(4): 138.
25. Fernandez-Campos F, Clares Naveros B, Lopez Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses*. 2013; 56(1): 70-81.

26. Morais AR, Alencar ÉN, Xavier FH, de Oliveira CM, Marcelino HR, Barratt G et al. Freeze-drying of emulsified systems: a review. *Int J Pharm.* 2016; 503(1-2): 102-14.
27. Wang L, Li X, Zhang G, Dong J, Eastoe J. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. *J Colloid Interface Sci.* 2007; 314(1): 230-5.
28. Campos VE, Ricci-Junior E, Mansur CR. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic drugs. *Journal Nanosci Nanotechnol.* 2012; 12(3): 2881-90.
29. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal Control Release.* 2017; 252: 28-49.
30. Zhang Z, Sun Q, Zhong J, Yang Q, Li H, Du C et al. Magnetic resonance imaging-visible and pH-sensitive polymeric micelles for tumor targeted drug delivery. *J Biomedical Nanotechnol.* 2014; 10(2): 216-26.
31. Torchilin VP. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54(2): 235-52.
32. Kahraman E, Karagöz A, Dinçer S, özsoy Y. Polyethylenimine modified and non-modified polymeric micelles used for nasal administration of carvedilol. *J Biomedical Nanotechnol.* 2015; 11(5): 890-99.
33. Moretton MA, Hocht C, Taira C, Sosnik A. Rifampicin-loaded 'flower-like' polymeric micelles for enhanced oral bioavailability in an extemporaneous liquid fixed-dose combination with isoniazid. *Nanomedicine.* 2014; 9(11): 1635-50.
34. Chiappetta DA, Sosnik A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 66(3): 303-17.
35. Tavares M, da Silva MRM, de Oliveira de Siqueira LB, Rodrigues RAS, Bodjolle-d'Almeida L, Dos Santos EP et al. Trends in insect repellent formulations: a review. *Int J Pharm.* 2018; 539(1-2): 190-209.
36. Yukuyama MN, Kato ET, Lobenberg R, Bou-Chacra NA. Challenges and future prospects of nanoemulsion as a drug delivery system. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(3): 495-508.
37. De Bruyn H, Raes S, Matthys C, Cosyn J. The current use of patient-centered/reported outcomes in implant dentistry: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(Suppl 11): 45-56.
38. Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease: a systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol.* 2015; 42 (Suppl 16): S158-71.
39. Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 1994; 5(4): 254-9.

40. Renvert S, Roos-Jansåker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(Suppl 8): 305-15.
41. Renvert S, Polyzois IN. Clinical approaches to treat peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 2015; 68(1): 369-404.
42. Lang NP, Berglundh T. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(Suppl11): 178-81.
43. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM et al. Peri-implant diseases and conditions: consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the classification of periodontal and peri-Implant diseases and conditions. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(Suppl 20): S286-S91.
44. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(8 Suppl): 286-91.
45. Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(Suppl 6): 67-76.
46. Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017; 62: 1-12.
47. Rams TE, Link CC. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. *J Oral Implantol.* 1983; 11(1): 93-100.
48. Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, Stadlinger B. Peri-implant infections of oral biofilm etiology. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 830: 69-84.
49. Ericsson I, Lindhe J. Probing depth at implants and teeth. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 1993; 20(9): 623-7.
50. Zitzmann NU, Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(5): 456-61.
51. Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992; 3(1): 1-8.
52. Altman DG, Schulz KF, Moher D, Egger M, Davidoff F, Elbourne D et al. The revised CONSORT statement for reporting randomized trials: explanation and elaboration. *Ann Intern Med.* 2001; 134(8): 663-94.
53. Rams TE, Roberts TW, Tatum H, Keyes PH. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. *J Prosthet Dent.* 1984;51(4):529-34.
54. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol.* 1987; 2(4): 145-51.

55. Heitz-Mayfield LJA, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2010; 53: 167-81.
56. Nakasato S, Okamura S, Osaka H, Mizuma K, Fujioka Y, Wakusawa R. Management of dental surgery problems for outpatients with cardiovascular diseases. *Anesth Prog*. 1989; 36(4-5): -9.
57. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol*. 2004; 97(6): 1311-8.
58. Hannig M. Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci*. 1997; 105(5Pt1): 422-33.
59. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (11): 5721-32.
60. Edgerton M, Lo SE, Scannapieco FA. Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of streptococci. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; 11(4): 443-49.
61. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontal Res*. 1989; 24(2): 96-105.
62. Salvi GE, Furst MM, Lang NP, Persson GR. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(3): 242-8.
63. Botero JE, González AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol*. 2005; 76(9): 1490-5.
64. Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson LA, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13(4): 349-58.
65. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(10): 975-82.
66. Rosenberg ES, Cho SC, Elian N, Jalbout ZN, Froum S, Evian CI. A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally compromised and periodontally healthy patients: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19(6): 873-9.
67. Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res*. 1999; 10(5): 339-45.

68. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence*. 2015; 6(3): 183-7.
69. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol*. 2010; 2: 10.3402.
70. Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R, Monaco A. Periodontitis, implant loss and peri-implantitis. A meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2015; 26(4): e8-e16.
71. Albertini M, López-Cerero L, O'Sullivan MG, Chereguini CF, Ballesta S, Ríos V et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2015; 26(8): 937-41.
72. Renvert S, Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Rutger Persson G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(4): 509-16.
73. Leonhardt A, Bergström C, Lekholm U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003; 5(4): 226-32.
74. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014; 16(6): 783-93.
75. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater*. 2010; 6(6): 2307-13.
76. Dahlén G, Wikström M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*. 1995; 10(1): 42-6.
77. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013; 4(2): 119-28.
78. Berman J, Sudbery PE. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(12): 918-30.
79. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(2): 109-18.
80. Koo H, Andes D, Krysan D. *Candida-streptococcal* interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathog*. 2018; 14(12): e1007342.
81. Souza J, S, Bertolini M, Thompson A, Barão V, Dongari-Bagtzoglou A. Biofilm interactions of *Candida albicans* and *Mitis* group *Streptococci* in a titanium-mucosal interface model. *Appl Environ Microbiol*. 2020; 86(9): e02950-19.
82. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003; 36(4): 223-8.

83. O'Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology*. 2000; 146(Pt 1): 41-8.
84. Oliveira MA, Carvalho LP, Gomes MdS, Bacellar O, Barros TF, Carvalho EM. Microbiological and immunological features of oral candidiasis. *Microbiol Immunol*. 2007; 51(8): 713-9.
85. Vieira Colombo A, Magalhães C, Hartenbach F, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: a reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog*. 2016; 94: 27-34.
86. Albertini M, López-Cerero L, O'Sullivan MG, Chereguini CF, Ballesta S, Ríos V et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2015; 26(8): 937-41.
87. Lafuente-Ibáñez M, Cayero-Garay A, Quindós-Andrés G, Aguirre-Urizar JM. A systematic review on the implication of *Candida* in peri-implantitis. *Int J Implant Dent*. 2021; 7(1): 73.
88. Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *Int J Implant Dent*. 2015; 1(1): 9.
89. Bertone AM, Rosa AC, Nastri N, Santillan HD, Ariza Y, Iovannitti CA et al. Genetic-relatedness of peri-implants and buccal *Candida albicans* isolates determined by RAPD-PCR. *Acta Odontol Latinoam*. 2016; 29(3): 197-205.
90. Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and *Enterobacteriaceae*. *Eur J Orthod*. 2004; 26(6): 623-9.
91. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 98(1): 53-9.
92. Ramage G, López-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Methods Mol Med*. 2005; 118: 71-9.
93. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*. 2008; 3(12): 1909-24.
94. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80(3): 903-8.
95. Lazarin A, Machado A, Zamperini C, Wady A, Spolidorio D, Vergani C. Effect of experimental photopolymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *Candida albicans* adhesion. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(1): 1-9.

96. Mouhat M, Moorehead R, Murdoch C. In vitro *Candida albicans* biofilm formation on different titanium surface topographies. *Biomater Investig Dent*. 2020; 7(1): 146-57.
97. Cavalcanti Y, Wilson M, Lewis M, Del-Bel-Cury A, da Silva W, Williams D. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling*. 2016; 32(2): 123-34.
98. Fox EP, Cowley ES, Nobile CJ, Hartooni N, Newman DK, Johnson AD. Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Curr Biol*. 2014; 24(20): 2411-16.
99. Janus M, Crielaard W, Volgenant C, van der Veen M, Brandt B, Krom B. *Candida albicans* alters the bacterial microbiome of early in vitro oral biofilms. *J Oral Microbiol*. 2017; 9(1): 1270613.
100. Bartnicka D, Gonzalez-Gonzalez M, Sykut J, Koziel J, Ciaston I, Adamowicz K et al. *Candida albicans* shields the periodontal killer *Porphyromonas gingivalis* from recognition by the host immune system and supports the bacterial infection of gingival tissue. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(6): 1984.
101. Bor B, Cen L, Agnello M, Shi W, He X. Morphological and physiological changes induced by contact-dependent interaction between *Candida albicans* and *Fusobacterium nucleatum*. *Sci Rep*. 2016; 6: 27956.
102. Kolenbrander P, Andersen R, Blehert D, Eglund P, Foster J, Palmer R. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66(3): 486-505.
103. Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H et al. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(2): 152-61.
104. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013; 92(12): 1065-73.
105. Pita PP, Rodrigues JA, Ota-Tsuzuki C, Miato T, Zenobio E, Giro G, et al. Oral *Streptococci* biofilm formation on different implant surface topographies. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 159625.
106. Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M. In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989; 4(4): 321-6.
107. Cavalcanti Y, Morse D, da Silva W, Del-Bel-Cury A, Wei X, Wilson M et al. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling*. 2015; 31(1): 27-38.
108. Busenlechner D, Fürhauser R, Haas R, Watzek G, Mailath G, B P. Long-term implant success at the Academy for Oral Implantology: 8-year follow-up and risk factor analysis. *J Periodontal Implant Sci*. 2014; 44(3): 102-8.

109. Clementini M, Rossetti PH, Penarrocha D, Micarelli C, Bonachela WC, Canullo L. Systemic risk factors for peri-implant bone loss: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43(3): 323-34.
110. Dreyer H, Grischke J, Tiede C, Eberhard J, Schweitzer A, Toikkanen SE, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: a systematic review. *J Period Res*. 2018; 53(5): 657-81.
111. Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Bragger U, Hämmerle CH, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res*. 2003; 14(3): 329-39.
112. Roos-Jansåker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *J Clin Periodontol*. 2006; 33(4): 296-301.
113. Evian CI, Emling R, Rosenberg ES, Waasdorp JA, Halpern W, Shah S et al. Retrospective analysis of implant survival and the influence of periodontal disease and immediate placement on long-term results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19(3): 393-8.
114. Konstantinidis IK, Kotsakis GA, Gerdes S, Walter MH. Cross-sectional study on the prevalence and risk indicators of peri-implant diseases. *Eur J Oral Implantol*. 2015; 8(1): 75-88.
115. Schou S, Holmstrup P, Worthington HV, Esposito M. Outcome of implant therapy in patients with previous tooth loss due to periodontitis. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(Suppl 2): 104-23.
116. Safii SH, Palmer RM, Wilson RF. Risk of implant failure and marginal bone loss in subjects with a history of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2010; 12(3): 165-74.
117. Aoki M, Takanashi K, Matsukubo T, Yajima Y, Okuda K, Sato T, et al. Transmission of periodontopathic bacteria from natural teeth to implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012; 14(3): 406-11.
118. Robitaille N, Reed DN, Walters JD, Kumar PS. Periodontal and peri-implant diseases: identical or fraternal infections? *Mol Oral Microbiol*. 2016; 31(4): 285-301.
119. Serino G, Ström C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(2): 169-74.
120. Schwarz F, Becker K, Sager M. Efficacy of professionally administered plaque removal with or without adjunctive measures for the treatment of peri-implant mucositis. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2015; 42(Suppl 16): 202-13.

121. Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass A, Demirel K, Derks J, et al. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*. 2015; 42(16): 152-7.
122. Rösing C, Fiorini T, Haas A, Muniz F, Oppermann R, Susin C. The impact of maintenance on peri-implant health. *Braz Oral Res*. 2019; 33(suppl 1): e074.
123. Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005; 20(4): 569-77.
124. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014; 16(2): 155-65.
125. Turri A, Rossetti PH, Canullo L, Grusovin MG, Dahlin C. Prevalence of Peri-implantitis in Medically Compromised Patients and Smokers: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016; 31(1): 111-8.
126. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol*. 2001; 6(1): 125-37.
127. Naguib G, Al-Mashat H, Desta T, Graves D. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. *J Invest Dermatol*. 2004; 123(1): 87-92.
128. Chiu H, Fu M, Yang T, Fu E, Chiang C, Tu H, et al. Effect of high glucose, *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide and advanced glycation end-products on production of interleukin-6/-8 by gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2017; 52(2): 268-76.
129. Alrabiah M, Al-Aali KA, Al-Sowygh ZH, Binmahfooz AM, Mokeem SA, Abduljabbar T. Association of advanced glycation end products with peri-implant inflammation in prediabetes and type 2 diabetes mellitus patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018; 20(4): 535-40.
130. Chen H, Liu N, Xu X, Qu X, Lu E. Smoking, radiotherapy, diabetes and osteoporosis as risk factors for dental implant failure: a meta-analysis. *PloS One*. 2013; 8(8): e71955.
131. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head Face Med*. 2014; 10: 10-34.
132. Twito D, Sade P. The effect of cigarette smoking habits on the outcome of dental implant treatment. *PeerJ*. 2014; 2: e546.
133. Tsigarida AA, Dabdoub SM, Nagaraja HN, Kumar PS. The Influence of Smoking on the Peri-Implant Microbiome. *J Dent Res*. 2015; 94(9): 1202-17.
134. Isidor F. Loss of osseointegration caused by occlusal load of oral implants. A clinical and radiographic study in monkeys. *Clin Oral Implants Res*. 1996; 7(2): 143-52.

135. Miyata T, Kobayashi Y, Araki H, Ohto T, Shin K. The influence of controlled occlusal overload on peri-implant tissue. Part 3: a histologic study in monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15(3): 425-31.
136. Miyata T, Kobayashi Y, Araki H, Ohto T, Shin K. The influence of controlled occlusal overload on peri-implant tissue. part 4: a histologic study in monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002; 17(3): 384-90.
137. Kozlovsky A, Tal H, Laufer B, Leshem R, Rohrer M, Weinreb M et al. Impact of implant overloading on the peri-implant bone in inflamed and non-inflamed peri-implant mucosa. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(5): 601-10.
138. Heitz-Mayfield L, Schmid B, Weigel C, Gerber S, Bosshard tD, Jönsson J et al. Does excessive occlusal load affect osseointegration? An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15(3): 259-68.
139. Sadowsky SJ. Occlusal overload with dental implants: a review. *Int J Implant Dent*. 2019; 5(1): 1-5.
140. Ting M, Craig J, Balkin BE, Suzuki JB. Peri-implantitis: a comprehensive overview of systematic reviews. *J Oral Implant*. 2018; 44(3): 225-47.
141. Heitz-Mayfield LJ, Mombelli A. The therapy of peri-implantitis: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014; 29 Suppl: 325-45.
142. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol*. 2005; 99(4): 703-15.
143. Janakiram C, Venkitachalam R, Fontelo P, Iafolla T, Dye B. Effectiveness of herbal oral care products in reducing dental plaque & gingivitis - a systematic review and meta-analysis. *BMC Complement Med Ther*. 2020; 20(1): 43.
144. Brookes Z, Bescos R, Belfield L, Ali K, A. R. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent*. 2020; 103: 103497.
145. Salvi GE, Ramseier CA. Efficacy of patient-administered mechanical and/or chemical plaque control protocols in the management of peri-implant mucositis. A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2015; 42(Suppl 16): 187-201.
146. Mishler OP, Shiao HJ. Management of peri-implant disease: a current appraisal. *J Evid Based Dent Pract*. 2014; 14 Suppl: 53-9.
147. Renvert S, Polyzois I, Persson GR. Treatment modalities for peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Am J Dent*. 2013; 26(6): 313-8.
148. Unursaikhan O, Lee JS, Cha JK, Park JC, Jung UW, Kim CS, et al. Comparative evaluation of roughness of titanium surfaces treated by different hygiene instruments. *J Periodontal Implant Sci*. 2012; 42(3): 88-94.
149. Chambrone L, Wang HL, Romanos GE. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of periodontitis and peri-implantitis: An American Academy of Periodontology best evidence review. *J Periodontol*. 2018; 89(7): 783-803.

150. Dhaliwal JS, Abd Rahman NA, Ming LC, Dhaliwal SKS, Knights J, Albuquerque Junior RF. Microbial biofilm decontamination on dental implant surfaces: a mini review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11: 736186.
151. Wiltfang J, Zernial O, Behrens E, Schlegel A, Warnke PH, Becker ST. Regenerative treatment of peri-implantitis bone defects with a combination of autologous bone and a demineralized xenogenic bone graft: a series of 36 defects. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012; 14(3): 421-7.
152. Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Implant surface characteristics influence the outcome of treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(1): 58-64.
153. Schwarz F, Sahm N, Schwarz K, Becker J. Impact of defect configuration on the clinical outcome following surgical regenerative therapy of peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 2010; 37(5): 449-55.
154. Serino G, Turri A, Lang NP. Maintenance therapy in patients following the surgical treatment of peri-implantitis: a 5-year follow-up study. *Clin Oral Implants Res*. 2015; 26(8): 950-6.
155. Klinge B, Meyle J. Peri-implant tissue destruction. The Third EAO Consensus Conference 2012. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(Suppl 6): 108-10.
156. Khoury F, Keeve PL, Ramanauskaite A, Schwarz F, Koo KT, Sculean A et al. Surgical treatment of peri-implantitis - Consensus report of working group 4. *Int Dent J*. 2019; 69(Suppl 2): 18-22.
157. Fu JH, Wang HL. Breaking the wave of peri-implantitis. *Periodontol 2000*. 2020; 84(1): 145-60.
158. Renvert S, Polyzois I. Treatment of pathologic peri-implant pockets. *Periodontol 2000*. 2018; 76(1): 180-90.
159. Nogueira LJ, Montanari CA, Donnici CL. The History, Evolution and Importance of Lipophilicity in Medicinal Chemistry: from Hippocrates and Galeno to Paracelsus and the Contributions of Overton and Hansch. *Rev Virtual Quim*. 2009; 1(3): 227-40.
160. Viegas C, Bolzani VS, Barreiro EJ. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim Nova*. 2006; 29: 326-37.
161. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect*. 2015; 6: 22-9.
162. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. revisada e ampliada. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2017. 1102p.

163. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *medicines (Basel)*. 2016; 3(4).
164. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2): 446-75.
165. Lyra LPS. Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes* [Dissertação de mestrado]: Universidade Estadual Paulista (Unesp); 2019.
166. Prashar A, Hili P, Veness RG, Evans CS. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*. 2003; 63(5): 569-75.
167. Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. Anticancer activity of essential oils: a review. *J Sci Food Agric*. 2013; 93(15): 3643-53.
168. Tiwari M, Kakkar P. Plant derived antioxidants - Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23(2): 295-301.
169. Griffin SG, Wyllie SG, Markham JL, Leach DN. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Frag J*. 1999; 14(5): 322-32.
170. Bajpai VK, Rahman A, Dung NT, Huh MK, Kang SC. In vitro inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J Food Sci*. 2008; 73(6): 14-20.
171. Crespo R, M VS, Abba MC, Bravo MG, Polo MP. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of HMGCR and PC biosynthesis by geraniol in 2 Hep-G2 cell proliferation linked pathways. *Biochem Cell Biol*. 2013; 91(3).
172. Rastogi SC, Heydorn S, Johansen JD, Basketter DA. Fragrance chemicals in domestic and occupational products. *Contact dermatitis*. 2001; 45(4): 221-5.
173. Lapczynski A, Bhatia S, Foxenberg R, Letizia C, Api A. Fragrance material review on geraniol. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(Suppl11): 160-70.
174. Andrade B, Braga C, Dos Santos K, Barbosa L, Rall V, Sforcin J, et al. Effect of inhaling *Cymbopogon martinii* essential oil and geraniol on serum biochemistry parameters and oxidative stress in rats. *Biochem Res Int*. 2014; 2014: 493183.
175. Sá RCS, Andrade LN, Sousa DP. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*. 2013; 18(1): 1227-54.
176. Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*. 2012; 23(2): 136-41.

177. Carnesecchi S, Bras-Gonçalves R, Bradaia A, Zeisel M, Gossé F, Poupon MF et al. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.* 2004; 215(1): 53-9.
178. Lee S, Park YR, Kim SH, Park EJ, Kang MJ, So I et al. Geraniol suppresses prostate cancer growth through down-regulation of E2F8. *Cancer Med.* 2016; 5(10): 2899-908.
179. Khan AQ, Khan R, Qamar W, Lateef A, Rehman MU, Tahir M et al. Geraniol attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced oxidative stress and inflammation in mouse skin: possible role of p38 MAP Kinase and NF- κ B. *Exp Mol Pathol.* 2013; 94(3): 419-29.
180. Su YW, Chao SH, Lee MH, Ou TY, Tsai YC. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E₂ production in macrophages. *Planta Med.* 2010; 76(15): 1666-71.
181. Andrade BFMT, Conti BJ, Santiago KB, Fernandes JA, Sforcin JM. Cymbopogon martinii essential oil and geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory/anti-inflammatory effects in human monocytes. *J Pharm Pharmacol.* 2014; 66(10): 1491-6.
182. Lira MHPd, Júnior FPdA, Moraes GFQ, Macena GdS, Pereira FdO, Lima IO. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. *J Essen Oil Res.* 2020; 32(3): 187-97.
183. Dubreuil J. Antibacterial and antidiarrheal activities of plant products against enterotoxinogenic *Escherichia coli*. *Toxins.* 2013; 5(11): 2009-41.
184. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62(Pt 1): 10-24.
185. Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *Int Microbiol.* 2018; 21(3):107-19.
186. Singh S, Fatima Z, Hameed S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. *Arch Microbiol.* 2016; 198(5): 459-72.
187. Almeida R, Akisue G, Cardoso L, Junqueira J, Jorge A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. *Rev Bras Plantas Med.* 2013; 15(4): 474-82.
188. Chen W, Viljoen AM. Geraniol — a review of a commercially important fragrance material. *S African J Bot.* 2010; 76(4): 643-51.

189. Sagiri SS, Anis A, Pal K. Review on encapsulation of vegetable oils: strategies, Preparation Methods, and Applications. *Polym Plast Tec Eng.* 2016;55(3):291-311.
190. Lammari N, Louaer O, Meniai AH, Fessi H, Elaissari A. Plant oils: from chemical composition to encapsulated form use. *Int J Pharm.* 2021;f601:f120538.
191. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Aït Addi EH, Casabianca H et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int J Pharm.* 2015; 483(1-2): 220-43.
192. Sherry M, Charcosset C, Fessi H, Greige-Gerges H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *J Liposome Res.* 2013; 23(4): 268-75.
193. Sandhiya S, Dkhar SA, Surendiran A. Emerging trends of nanomedicine--an overview. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009; 23(3): 263-9.
194. Rossi-Bergmann B. A nanotecnologia: Da saúde para além do determinismo tecnológico. *Ciênc Cult.* 2008; 60(2): 54-7.
195. Craparo EF, Bondi ML, Pitarresi G, Cavallaro G. Nanoparticulate systems for drug delivery and targeting to the central nervous system. *CNS Neurosci Ther.* 2011; 17(6): 670–7.
196. Echeverría J, Duarte RDGA. Nanoemulsions of essential oils: new tool for control of vector-borne diseases and In vitro effects on some parasitic agents. *Medicines (Basel).* 2019; 6(2): 42.
197. Bonferoni MC, Ferraro L, Pavan B, Beggiato S, Cavalieri E, Giunchedi P, Dalpiaz A. Uptake in the central nervous system of geraniol oil encapsulated in chitosan oleate following nasal and oral administration. *Pharmaceutics.* 2019; 11(3): 106.
198. Rajadhyaksha M, Boyden T, Liras J, El-Kattan A, Brodfuehrer J. Current advances in delivery of biotherapeutics across the blood-brain barrier. *Curr Drug Discov Technol.* 2011; 8(2): 87-101.
199. Alexander A, Agrawal M, Uddin A, Siddique S, Shehata AM, Shaker MA et al. Recent expansions of novel strategies towards the drug targeting into the brain. *Int J Nanomedicine.* 2019; 14: 5895–909.
200. Chakraborty S, Dhakshinamurthy G, Misra S. Tailoring of physicochemical properties of nanocarriers for effective anti-cancer applications. *J Biomed Mater Res A.* 2017; 105(10): 2906-28.
201. Onoue S, Yamada S, Chan HK. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int J Nanomedicine.* 2014; 9: 1025-37.
202. Lu Y, Qi J, Wu W. Absorption, disposition and pharmacokinetics of nanoemulsions. *Current Drug Metabolism.* 2012; 13(4): 396-417.
203. Naqvi S, Panghal A, Flora S. Nanotechnology: a promising approach for delivery of neuroprotective drugs. *Front Neurosci.* 2020; 14: 494.

204. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm.* 2004; 280(1-2): 241-51.
205. Gupta A, Eral H, Hatton T, Doyle P. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter.* 2016; 12(11): 2826-41.
206. Charles L, Anthony AA. Current state of nanoemulsions in drug delivery. *Scientific Research Publishing.* 2011; 2(5): 626.
207. Wang L, Li X, Zhang G, Dong J, Eastoe J. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. *J Colloid Interface Sci.* 2007; 314(1): 230-5.
208. Gutiérrez J, González C, Maestro A, Solè I, Pey C, Nolla j. Nano-emulsions: new applications and optimization of their preparation. *Colloid Interface Sci.* 2008; 13(4): 245-51.
209. Norouzi P, Rastegari A, Mottaghitalab F, Farokhi M, Zarrintaj P, Saeb MR. Nanoemulsions for intravenous drug delivery. In: Mozafari M, editor. *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*: Elsevier; 2020. p. 581-601.
210. Chiesa M, Garg J, Kang YT, Chen G. Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2008; 326(1): 67-72.
211. Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties - IOPscience. *J Phys: Condens Matter.* 2006; 18(41): R635.
212. Barkat MA, Harshita, Rizwanullah M, Potttoo FH, Beg S, Akhter S et al. Therapeutic nanoemulsion: concept to delivery. *Curr Pharm Des.* 2020; 26(11): 1145-66.
213. Anton N, Vandamme T. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int J Pharm.* 2009; 377(1-2): 142-7.
214. Charles L, Anthony AA. Current state of nanoemulsions in drug delivery. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2011; 2(5): 626.
215. de Campos VE, Ricci-Júnior E, Mansur CR. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic drugs. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012; 12(3): 2881-90.
216. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004; 108-109: 109-303.
217. Singh Y, Meher J, Raval K, Khan F, Chaurasia M, Jain N, et al. Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release.* 2017; 252: 28-49.

218. Brüsewitz C, Schendler A, Funke A, Wagner T, Lipp R. Novel poloxamer-based nanoemulsions to enhance the intestinal absorption of active compounds. *Int J Pharm.* 2007; 329(1-2): 173-81.
219. Karthik P, Ezhilarasi P, Anandharamakrishnan C. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Crit Rev Food Sci NutR.* 2017; 57(7): 1435-50.
220. Delmas T, Piraux H, Couffin A, Texier I, Vinet F, Poulin P, et al. How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir.* 2011; 27(5): 1683-92.
221. Donsì F, Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J Biotechnol.* 2016; 233: 106-20.
222. Falleh H, Jemaa MB, Neves MA, Isoda H, Nakajima M, Ksouri R. Formulation, physicochemical characterization, and anti- *E. coli* activity of food-grade nanoemulsions incorporating clove, cinnamon, and lavender essential oils. *Food Chem.* 2021; 359: 129963.
223. Abu Ali OA, El-Naggar ME, Abdel-Aziz MS, Saleh DI, Abu-Saied MA, El-Sayed WA. Facile synthesis of natural anise-based nanoemulsions and their antimicrobial activity. *Polymers (Basel).* 2021; 13(12): 2009.
224. Solè I, Pey C, Maestro A, González C, Porras M, Solans C, et al. Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up. *J Colloid Interface Sci.* 2010; 344(2): 417-23.
225. Komaiko JS, McClements DJ. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: a review of available methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2016; 15(2): 331-52.
226. Jafari SM, He Y, Bhandari B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization—a comparison. *International J Food Properties.* 2006; 9(3): 475-85.
227. Leong T, Wooster T, Kentish S, Ashokkumar M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason Sonochem.* 2009; 16(6): 721-7.
228. Kwon GS. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2003; 20(5): 357-403.
229. Lu Y, Park K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *Int J Pharm.* 2013; 453(1): 198-214.
230. Torchilin VP. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res.* 2007; 24(1): 1-16.
231. Elhasi S, Astaneh R, Lavasanifar A. Solubilization of an amphiphilic drug by poly(ethylene oxide)-block-poly(ester) micelles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 65(3): 406-13.

232. Zanin SMW, Miguel MD, Chimelli MC, Oliveira AB. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (ehl) de óleos de origem vegetal. *Visão Acadêmica*. 2002; 3(1): 13-8.
233. Okonogi S, Phumat P, Khongkhunthian S, Suttiat K, Chaijareenont P. Denture-soaking solution containing piper betle extract-loaded polymeric micelles; inhibition of *Candida albicans*, clinical study, and effects on denture base resin. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10(4): 440.
234. Facchinatto W, Galante J, Mesquita L, Silva D, Martins DSD, Moraes T et al. Clotrimazole-loaded N-(2-hydroxy)-propyl-3-trimethylammonium, O-palmitoyl chitosan nanoparticles for topical treatment of vulvovaginal candidiasis. *Acta Biomater*. 2021; 125: 312-21.
235. Formariz TP, Chiavacci LA, Scarpa MV, Silva-Junior AA, Egito ES, Terrugi CH et al. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010; 77(1): 47-53.
236. Bonifácio B, Ramos M, da Silva P, Negri K, de Oliveira Lopes É, de Souza L et al. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. *Int J Nanomedicine*. 2015; 10: 5081-92.
237. Abdou E, Mohamed E, Galhoum G. Curcumin loaded nanoemulsions/pectin coatings for refrigerated chicken fillets. *Food Hydrocolloids*. 2018; 83: 445-53.
238. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard - 4th ed. CLSI document M27-A4 (ISBN 1-56238-827-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2017.
239. Nogueira M, Aquino S, Rossa Junior C, Spolidorio D. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflammation Res*. 2014; 63(9): 769-78.
240. Ostrosky EA, Paulo UdS, Mizumoto MK, Paulo UdS, Lima MEL, Paulo UdS et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacog*. 2008; 18: 301-7.
241. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 32nd ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-134-5). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2022.
242. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(8): 761-7.
243. Sardi JC, Freires IA, Lazarini JG, Infante J, de Alencar SM, Rosalen PL. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. *Microb Pathog*. 2017; 105: 280-7.

244. de Avila E, Avila-Campos M, Vergani C, Spolidório D, Mollo F. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces. *J Prost Dent*. 2016; 115(4): 428-36.
245. Maquera-Huacho P, Tonon C, Correia M, Francisconi R, Bordini E, Marcantonio É et al. In vitro antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces. *Biofouling*. 2018; 34(6): 699-709.
246. International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.
247. Anvisa. Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 2004.
248. Rocha-Filho P, Camargo M, Ferrari M, Maruno M. Influence of lavender essential oil addition on passion fruit oil nanoemulsions: stability and In vivo study. *J Nanomed Nanotechnol*. 2014; 5(2): 198.
249. Becher P. Emulsions: theory and practice. *J Chem Educ*. 1965; 42(12): 692.
250. Masmoudi H, Dréau Y, Piccerelle P, Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int J Pharm*. 2005; 289(1-2): 117-31.
251. Jantrawut P, Boonsermsukcharoen K, Thipnan K, Chaiwarit T, Hwang K-M, Park E-S. Enhancement of Antibacterial Activity of Orange Oil in Pectin Thin Film by Microemulsion. *Nanomaterials (Basel)*. 2018; 8(7): 545.
252. Formariz TP, Urban MCC, Silva Júnior AAd, Gremião MPD, Oliveira AG. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005; 41(3): 301-13.
253. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agri Food Chem*. 2001; 49(9): 4168-70.
254. Duarte M, Figueira G, Sartoratto A, Rehder V, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2005; 97(2): 305-11.
255. Martina LP, Ebenezar AV, Ghani M, Narayanan A, Sundaram M, Mohan AG. An in vitro comparative antibacterial study of different concentrations of green tea extracts and 2% chlorhexidine on *E. faecalis*. *Saudi Endod*. 2013; 3(3): 120-24.
256. Yan H, Bao C, Chen X, Yu C, Kong D, Shi J et al. Preparation of biodiesel oil-in-water nanoemulsions by mixed surfactants for bifenthrin formulation. *RSC Adv*. 2019; 9(21): 11649-58.
257. Howe A, Pitt A. Rheology and stability of oil-in-water nanoemulsions stabilised by anionic surfactant and gelatin 1) addition of nonionic, cationic and ethoxylated-cationic co-surfactants. *Adv Colloid Interface Sci*. 2008; 144(1-2): 24-9.

258. Marena G, Ramos M, Lima L, Chorilli M, Bauab T. Galleria mellonella for systemic assessment of anti-Candida auris using amphotericin B loaded in nanoemulsion. *Sci Total Environ*. 2022; 807(Pt 3): 151023.
259. Schuh R, Bruxel F, Teixeira H. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. *Qui Nova*. 2022; 37(7): 1193-8.
260. Strickley R. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res*. 2004; 21(2): 201-30.
261. Thakare M, Israel B, Garner S, Ahmed H, Elder D, Capomacchia A. Nonionic surfactant structure on the drug release, formulation and physical properties of ethylcellulose microspheres. *Pharm Dev Technol*. 2017; 22(3): 418-25.
262. Bonifácio B, Silva P, Ramos M, Negri K, Bauab T, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 1-15.
263. Yue L, Yan Z, Li H, Liu X, Sun P. Brij-58, a potential injectable protein-stabilizer used in therapeutic protein formulation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020; 146: 73-83.
264. Katz J, Chou D, Christian T, Das T, Patel M, Singh S et al. Emerging challenges and innovations in surfactant-mediated stabilization of biologic formulations. *J Pharm Sci*. 2022; 111(4): 919-32.
265. Jones M, Mahler H, Yadav S, Bindra D, Corvari V, Fesinmeyer R et al. Considerations for the Use of Polysorbates in Biopharmaceuticals. *Pharm Res*. 2018; 35(8): 148.
266. Formariz T, Chiavacci L, Scarpa M, Silva-Júnior A, Egito E, Terrugi C et al. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; 77(1): 47-53.
267. Zheng H, Li J, Ning F, Wijaya W, Chen Y, Xiao J, et al. Improving in vitro bioaccessibility and bioactivity of carnosic acid using a lecithin-based nanoemulsion system. *Food Func*. 2021; 12(4): 1558-68.
268. Jantrawut P, Boonsermsukcharoen K, Thipnan K, Chaiwarit T, Hwang K, Park E. Enhancement of antibacterial activity of orange oil in pectin thin film by microemulsion. *Nanomaterials (Basel)*. 2018; 8(7): 545.
269. Gurpreet K, Singh S. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. *Indian J Pharm Sci*. 2018; 80(5): 781-9.
270. Kumar M, Bishnoi R, Shukla A, Jain C. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: a review. *Prev Nutr Food Sci*. 2019; 24(3): 225-34.

271. Zorzi G, Caregnato F, Moreira J, Teixeira H, Carvalho E. Antioxidant effect of nanoemulsions containing extract of *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C.-Asteraceae. *AAPS PharmSciTech*. 2016; 17(4): 844-50.
272. Dos Santos Ramos M, da Silva P, de Toledo L, Oda F, da Silva I, Dos Santos L, et al. Intravaginal delivery of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland fraction based on a nanoemulsion system applied to vulvovaginal candidiasis treatment. *J Biom Nanotechnol*. 2019; 15(5): 1072-89.
273. Marena G, Ramos M, Lima L, Chorilli M, Bauab T. *Galleria mellonella* for systemic assessment of anti-*Candida auris* using amphotericin B loaded in nanoemulsion. *Sci Total Environ*. 2022; 807(Pt 3): 151023.
274. Michels L, Maciel T, Nakama K, Teixeira F, de Carvalho F, Gundel A et al. Effects of surface characteristics of polymeric nanocapsules on the pharmacokinetics and efficacy of antimalarial quinine. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14: 10165-78.
275. Chavda H. In-use stability studies: guidelines and challenges. *Drug Dev Ind Pharm*. 2021; 47(9): 1373-91.
276. Koroleva M, Nagovitsina T, Yurtov E. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms. *Phys Chem Chem Phys*. 2018; 20(15): 10369-77.
277. Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, Figueira G, Duarte M, Rehder V. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol*. 2004; 35(4): 275-80.
278. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindos G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med*. 2011; 11: 119.
279. Zore GB, Thakre AD, Rathod V, Karuppayil SM. Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. *Mycoses*. 2011; 54(4): e99-109.
280. Leite MC, de Brito Bezerra AP, de Sousa JP, de Oliveira Lima E. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Med Mycol*. 2015; 53(3): 275-84.
281. Sharma Y, Khan LA, Manzoor N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. *J Mycol Med*. 2016; 26(3): 244-54.
282. Bonifácio BV, Ramos MS, da Silva PB, Negri KMS, de Oliveira Lopes É, de Souza LP, et al. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. *Int J Nanomedicine*. 2015; 10: 5081-92.
283. Rai V, Tan HS, Michniak-Kohn B. Effect of surfactants and pH on naltrexone (NTX) permeation across buccal mucosa. *Int J Pharm*. 2011; 411(1-2): 92-7.

284. Buyukozturk F, Benneyan JC, Carrier RL. Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *J Control Release*. 2010; 142(1): 22-30.
285. Hafidh RR, Abdulamir AS, Vern LS, Abu Bakar F, Abas F, Jahanshiri F et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J*. 2011; 5: 96-106.
286. Trindade-Suedam IK, Lima TF, Campos LD, Yaedu RYF, Filho HN, Trindade IEK. Tomographic pharyngeal dimensions in individuals with unilateral cleft lip/palate and class III malocclusion are reduced when compared with controls. *Cleft Palate Craniofacial J*. 2017; 54(5): 502-8.
287. Monk BC, Goffeau A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science*. 2008; 321(5887): 367-9.
288. Tambone E, Marchetti A, Ceresa C, Piccoli F, Anesi A, Nollo G et al. Counter-acting *Candida albicans*- *Staphylococcus aureus* mixed biofilm on titanium implants using microbial biosurfactants. *Polymers*. 2021; 13(15): 2420.
289. Nastych O, Goncharuk-Khomyn M, Foros A, Cavalcanti A, Yavuz I, Tsaryk V. Comparison of bacterial load parameters in subgingival plaque during peri-implantitis and periodontitis using the RT-PCR method. *Acta Stomatol Croat*. 2020; 54(1): 32-43.
290. Renvert S, Lindahl C, Renvert H, Persson GR. Clinical and microbiological analysis of subjects treated with Branemark or AstraTech implants: a 7-year follow-up study. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(4): 342-7.
291. Belibasakis GN, Manoil D. Microbial community-driven etiopathogenesis of peri-Implantitis. *J Dent Res*. 2021; 100(1): 21-8.
292. Sahrmann P, Gilli F, Wiedemeier DB, Attin T, Schmidlin PR, Karygianni L. The microbiome of peri-Implantitis: a systematic review and meta-analysis. *Microorganisms*. 2020; 8(5): 661.
293. Chevalier M, Ranque S, Precheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. *Med Mycol*. 2018; 56(6): 653-67.
294. Tofiño-Rivera A, Ortega-Cuadros M, Galvis-Pareja D, Jiménez-Rios H, Merini L, Martínez-Pabón M. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *J Ethnopharmacol*. 2016; 194: 749-54.
295. Oliveira M, Borges A, Brighenti F, Salvador M, Gontijo A, Koga-Ito C. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res*. 2017; 31: e89.
296. Yang T, Liou M, Hu T, Peng C, Liu T. Antimicrobial activity of the essential oil of *Litsea cubeba* on cariogenic bacteria. *J Essential Oil Res*. 2013; 25(2): 120-8.

297. Roncari Rocha G, Sims K, Xiao B, Klein M, Benoit D. Nanoparticle carrier co-delivery of complementary antibiofilm drugs abrogates dual species cariogenic biofilm formation in vitro. *J Oral Microbiol.* 2021; 14(1): 1997230.
298. Liu Y, Shi L, Su L, van der Mei H, Jutte P, Ren Y et al. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chem Soc Rev.* 2019; 48(2): 428-46.
299. Benoit D, Sims K, Fraser D. Nanoparticles for oral biofilm treatments. *ACS nano.* 2019; 13(5): 4869-75.
300. Flemming H, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(9): 563-75.
301. Ramalingam K, Amaechi B, Ralph R, Lee V. Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic planktonic and biofilm organisms. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(1): 15-22.
302. Tonigold M, Simon J, Estupiñán D, Kokkinopoulou M, Reinholz J, Kintzel U et al. Pre-adsorption of antibodies enables targeting of nanocarriers despite a biomolecular corona. *Nat Nanotechnol.* 2018; 13(9): 862-9.
303. Mejía S, Sánchez A, Vásquez V, Orozco J. Functional nanocarriers for delivering itraconazole against fungal intracellular infections. *Front Pharmacol* 2021; 12: 685391.
304. Biniarz P, Baranowska G, Feder-Kubis J, Krasowska A. The lipopeptides pseudofactin II and surfactin effectively decrease *Candida albicans* adhesion and hydrophobicity. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2015; 108(2): 343-53.
305. Passarelli P, De Leonardis M, Piccirillo G, Desantis V, Papa R, Rella E et al. The effectiveness of chlorhexidine and air polishing system in the treatment of *Candida albicans* infected dental implants: an experimental in vitro study. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9(4): 179.
306. Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Høiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12(10): 791-808.
307. Brilhante RSN, Lima RAC, Marques FJF, Silva NF, Caetano EP, Castelo-Branco D et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *J Med Microbiol.* 2015; 64(Pt 4): 394-9.
308. Sardi CJ, Pitangui NS, Rodriguez-Arellanes G, Taylor ML, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Rev Iberoam Micol.* 2014; 31(1): 22-9.
309. Cho MY, Kang SM, Lee ES, Kim BI. Antimicrobial activity of *Curcuma xanthorrhiza* nanoemulsions on *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling.* 2020; 36(7): 825-33.

310. Quatrin PM, Verdi CM, de Souza ME, de Godoi SN, Klein B, Gundel A et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing Eucalyptus globulus oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. *Microb Pathog*. 2017; 112: 230-42.
311. Rangel ML, de Aquino SG, de Lima JM, Castellano LR, de Castro RD. In Vitro effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on *Candida* spp. Involved in oral infections. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018; 2018: 4045013.
312. Lopes G, Pinto E, Andrade PB, Valentao P. Antifungal activity of phlorotannins against dermatophytes and yeasts: approaches to the mechanism of action and influence on *Candida albicans* virulence factor. *PloS One*. 2013; 8(8): e72203.
313. Ahmad A, Khan A, Yousuf S, Khan LA, Manzoor N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*. 2010; 81(8): 1157-62.
314. Oliveira D, Borges A, Simoes M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins (Basel)*. 2018; 10(6).
315. Ghannoum M, Jurevic R, Mukherjee P, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog*. 2010; 6(1): e1000713.
316. Pereira C, Toledo B, Santos C, Pereira C, AC, Back-Brito G, Kaminagakura E et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76(4): 419-24.
317. Souza J, Costa R, Sampaio A, Abdo V, Nagay B, Castro N et al. Cross-kingdom microbial interactions in dental implant-related infections: is *Candida albicans* a new villain? *iScience*. 2022; 25(4): 103994.
318. Harriott M, Noverr M. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(9): 3914-22.
319. Hagvall L, Bäcktorp C, Svensson S, Nyman G, Börje A, Karlberg A. Fragrance compound geraniol forms contact allergens on air exposure. Identification and quantification of oxidation products and effect on skin sensitization. *Chem Res Toxicol*. 2007; 20(5): 807-14.
320. Queiroz T, Santos G, Ventura S, Hiruma-Lima C, Gaivão I, Maistro E. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). *Genet Mol Res*. 2017; 16(3).
321. Balloni S, Locci P, Lumare A, Marinucci L. Cytotoxicity of three commercial mouthrinses on extracellular matrix metabolism and human gingival cell behaviour. *Toxicol In Vitro*. 2016; 34: 88-96.
322. Donsì F, Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J Biotechnol*. 2016; 233: 106-20.

323. Cunha Júnior A, Fialho S, Carneiro L, Oréface F. microemulsions as drug delivery systems for topical ocular administration. *Arq Bras Oftalmo*. 2003; 66(3): 385-91.
324. Maleki M, Hadian Z, Abdi K, Koohy-Kamaly P, Bahmanyar F. Study of the physicochemical properties and antimicrobial activities of nanoparticles containing β -Cyclodextrin and geranial. *J of Nanost*. 2021; 11(1): 189-201.

ANEXO A – COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA

14/05/22, 00:46

Plataforma Brasil

Portal do Governo Brasileiro

 principal  sair

Denise Madalena Palomari Spolidorio - Pesquisador | V3.3

Cadastros

Sua sessão expira em: 38min 43

DETALHAR NOTIFICAÇÃO



DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da incorporação de geraniol em nanoemulsões: caracterização, atividade antibiofilme e citotoxicidade.
Pesquisador Responsável: Denise Madalena Palomari Spolidorio
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 46795821.6.0000.5416
Submetido em: 14/05/2021
Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1748980

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final
Detalhe:
Justificativa: Boa tarde! Não houveram certificados após a aprovação do comitê em ética, pois o discente participante do projeto de pesquisa foi acometido pela forma grave do Covid 19 em junho de 2021 com internação em UTI durante 30 dias e alta condicionada à utilização de O2 domiciliar. Obteve alta em janeiro de 2022, e por isso, teve suas atividades prejudicadas, necessitando de prorrogação de prazo para conclusão de seu trabalho.
Data do Envio: 12/04/2022
Situação da Notificação: Aprovado

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 1
 - Pendência Documental (PO) - Versão 1
 - Notificação (N2) - UNESP - Faculdade de
 - Notificação (N1) - UNESP - Faculdade de C
 - Currículo dos Assistentes
 - Documentos do Projeto
 - Comprovante de Recepção - Submissã
 - Cronograma - Submissão 3

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações
-------------------	----------	---------	----------	-------

 Chat

https://plataformabrasil.saude.gov.br/visao/administrador/4x4Novo/detalharProjetoAgrupadorApreciacao.jsf

1/3

14/05/22, 00:46

Plataforma Brasil

Folha de Rosto - Submissão 3

Informações Básicas do Projeto - Subm

Orçamento - Submissão 3

Outros - Submissão 3

Projeto Detalhado / Brochura Investigac

TCLE / Termos de Assentimento / Justif

Apreciação 3 - UNESP - Faculdade de Odo

Projeto Completo



HISTÓRICO DE TRÂMITES							
Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
N2	13/05/2022 14:20:38	Parecer liberado	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	PESQUISADOR	
N2	13/05/2022 14:19:50	Parecer do colegiado emitido	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	
N2	21/04/2022 13:59:27	Parecer do relator emitido	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	
N2	21/04/2022 13:56:06	Aceitação de Elaboração de Relatoria	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	
N2	12/04/2022 13:30:26	Confirmação de Indicação de Relatoria	1	Coordenador	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	
N2	12/04/2022 13:28:01	Indicação de Relatoria	1	Secretária	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	
N2	12/04/2022 13:27:46	Aceitação do PP	1	Secretária	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	
N2	12/04/2022 12:46:40	Notificação enviada	1	Pesquisador	PESQUISADOR	UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara	Boa tarde! Não houveram certificados após a aprovaçãoVer mais >>



Não autorizo a reprodução desse trabalho até 20/06/2024.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 20/06/2022.

Cristiano Silva Pontes