

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/03/2022.



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



Raquel Souza Marques

**Sistemas mucoadesivos precursores de cristais líquidos para controle de
biofilme bucal**

Araraquara

2020



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



Raquel Souza Marques

**Sistemas mucoadesivos precursores de cristais líquidos para controle de
biofilme bucal**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara

2020

Marques, Raquel Souza

Sistemas mucoadesivos precursores de cristais líquidos para controle de biofilme bucal / Raquel Souza Marques. -- Araraquara: [s.n.], 2020

108 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

1. Biofilmes 2. Cristais líquidos 3. Óleos voláteis I. Título

Raquel Souza Marques

**Sistemas mucoadesivos precursores de cristais líquidos para controle de
biofilme bucal**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Presidente e orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti

3º Examinador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara, 05 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Raquel Souza Marques

NASCIMENTO: 15/03/1995 – Aracaju – Sergipe

FILIAÇÃO: Odevânia Souza Marques e Franklin Rodrigues Marques

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2009 – 2013: Técnico em Química pelo Instituto Federal de Sergipe

2013 – 2018: Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Sergipe

2018 – 2020: Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração: Odontopediatria – Curso de Mestrado pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por todo o auxílio que Ele me deu através das oportunidades que tive ao longo desses dois anos de mestrado, Deus é o único que deve ser louvado por essa conquista. Além disso, sem Ele nenhuma das pessoas as quais sou grata hoje estariam em meu caminho.

Sou muito grata à minha família, por todo suporte e amor. À minha mãe, Odevânia, por todo incentivo e carinho, e ao meu pai, Franklin, por todo sacrifício e cuidado comigo, sem vocês eu não chegaria na metade dessa jornada, obrigada por cuidarem tanto de mim apesar da distância. Aos meus amados irmãos Gabriel e Rebeca, que sempre me apoiaram, mesmo antes da odontologia tornar-se minha escolha de carreira, que privilégio foi crescer com vocês do meu lado!

A Danilo, meu noivo, agradeço por todo companheirismo e ajuda até aqui, obrigada por me consolar nos momentos de desânimo e se alegrar com as minhas conquistas. Eu não teria conseguido chegar até aqui sem você ao meu lado, obrigada por estar sempre aqui.

À minha orientadora, professora Elisa, a qual aprendi a admirar e respeitar, pela paciência, cuidado, incentivo e fundamentalmente por todo ensinamento e orientação ao longo desses dois anos. Tia Elisa, a você, a maravilhosa profissional e pessoa que é e sempre foi, à sua infinita paciência, ao seu carisma, à sua sabedoria, muito obrigado. Com você aprendi coisas que vão muito além da academia, ensinamentos que vou guardar para minha vida. Obrigada por ter acreditado e investido em mim, serei sempre grata!

À Professora Fernanda por todo auxílio na pós-graduação. Fer, muito obrigada pelas oportunidades de crescimento e por todos os conselhos, os guardarei sempre.

Ao Professor Marlus pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório em conjunto com seus alunos e pelas contribuições nesse trabalho.

À Analú e Lorena, companheiras de caminhada, agradeço por toda ajuda, suporte e amizade nesse tempo. Ter vocês por perto fez a pós-graduação muito mais leve.

À Aline por toda amizade e ensinamentos no laboratório, à Sarah pelas contribuições e à Camila Roderio por todo auxílio e paciência na realização de algumas etapas da minha pesquisa. Obrigada por sempre estarem prontas a me ajudar.

À Tarsila e Vanessa, minhas parceiras, que dividiram um lar comigo. Obrigada por me acolherem e me ajudarem na adaptação aqui, vocês são especiais demais para mim.

Aos demais colegas da pós-graduação Karina, Marina, Bianca, Isabela, Silas, Rafael, Luciana e Yasmin pelo companheirismo nesses dois anos.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti, Prof^a. Dr^a. Ângela Cristina Cilense Zuanon, Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling Costa, Prof^a. Dr^a. Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto, Prof. Dr. Fábio César Braga de Abreu e Lima e Prof^a. Dr^a. Rita Loiola Cordeiro por todo conhecimento transmitido.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti (Coordenadora) e Prof^a. Dr^a. Alessandra Nara de Souza Rastelli (vice-coordenadora).

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, na pessoa da diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato e do vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

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

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela prontidão em me auxiliar na organização desse trabalho.

Ao Laboratório de Pesquisas Bioquímicas e Microbiológicas da FOAr, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti, responsável pelo mesmo, onde foi desenvolvida a maior parte deste trabalho.

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

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Marlise Inêz Klein Furlan pelo suporte dado em algumas etapas desta pesquisa.

Ao CNPq pela concessão de Bolsa de Mestrado (Processo 133127/2018-4). O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Aos participantes da pesquisa por toda disposição em contribuir no desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos que de forma direta ou indireta, contribuíram com esse trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

“O homem que eu parti de casa se perdeu e a caminhada fabricou um novo eu.
[...] O caminho muda, e muda o caminhante. É um caminho incerto, não um caminho
errado. Eu, caminhante, quero o trajeto terminado. Mas, no caminho, mais importa o
durante. ”

Estevão Queiroga*

* Queiroga E. A partida e o Norte [Música]. Rio de Janeiro: Sony Music Brasil; 2016.

Marques RS. Sistemas mucoadesivos precursores de cristais líquidos para controle de biofilme bucal [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

A clorexidina destaca-se por sua eficácia no combate à diversos micro-organismos de interesse cariogênico. No entanto, sua forma de utilização mais conhecida é o enxaguatório bucal, que não possui aplicação universal para pacientes com necessidades especiais. Desse modo, um desafio para a indústria farmacêutica é o desenvolvimento de um sistema para substituir os enxaguatórios bucais. O objetivo desse estudo foi incorporar digluconato de clorexidina, óleo essencial de *Cymbopogon citratus* ou a associação dessas substâncias a um sistema precursor de cristal líquido mucoadesivo, realizar a caracterização físico-química desse sistema e avaliar in vitro seu potencial antimicrobiano em biofilmes polimicrobianos. As formulações foram caracterizadas por meio de microscopia de luz polarizada, análises reológicas, mucoadesão e perfil de liberação. Posteriormente, foi avaliada a capacidade de redução da acidogenicidade, composição microbiana e dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água dos biofilmes formados a partir da saliva de um doador. Os dados da seleção do doador de saliva, dos testes de CIM e CBM do óleo essencial de *C. citratus* e do digluconato de clorexidina, as análises reológicas do sistema e o perfil de liberação in vitro foram analisados descritivamente. Enquanto, para os testes de mucoadesão, contagem de micro-organismos do biofilme, pH, peso seco dos biofilmes e dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água, dependendo da normalidade e homocedasticidade dos dados, foram aplicados os testes ANOVA ou Kruskal-Wallis, complementados por testes de comparações múltiplas. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Os testes de caracterização evidenciaram que todas as formulações têm potencial mucoadesivo e agiram como SPCL, pois formaram cristais líquidos quando foi adicionada saliva artificial. As formulações liberaram entre 13,19 e 15,45% da clorexidina e entre 9,48 e 10,73% do óleo essencial de *C. citratus* em 24 horas, agindo como sistema de liberação controlada. As formulações apresentaram ação antimicrobiana independente da substância incorporada, e foram capazes de manter o pH próximo a neutralidade por 48 h. Além disso, determinaram redução significativa da dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água. Sendo assim, o sistema avaliado se apresentou como uma alternativa para tratamento de doenças microbianas da cavidade bucal, devido as suas características mucodesivas e de liberação controlada.

Palavras – chave: Biofilmes. Cristais líquidos. Óleos voláteis.

Marques RS. Liquid Crystal Precursor Mucoadhesive Systems for Oral Biofilm Control [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Chlorhexidine stands out for its effectiveness in combating several microorganisms of cariogenic interest. However, its best-known form of use is the mouthwash, which has no universal application for patients with special needs. Thus, a challenge for pharmaceutical industry is the development of a system to replace mouthwashes. The objective of this study was to incorporate chlorhexidine digluconate, essential oil of *Cymbopogon citratus* or the association of these substances with a mucoadhesive liquid crystal precursor system, to carry out the physico-chemical characterization of this system and to evaluate in vitro its antimicrobial potential in polymicrobial biofilms. The evaluated formulations were characterized by means of polarized light microscopy, rheological analysis, mucoadhesion and release profile. Subsequently, the formulations were evaluated for their ability to reduce acidogenicity, microbial composition and dosage of water-insoluble extracellular polysaccharides from the biofilms formed from the saliva of a donor. The data from the selection of the saliva donor, the MIC and MBC tests of the essential oil of *C. citratus* and the chlorhexidine digluconate, the rheological analyzes of the formulations and the in vitro release profile were analyzed descriptively. While, for mucoadhesion, biofilm microorganisms count, pH, dry weight of biofilms and dosage of water-insoluble extracellular polysaccharides, depending on the normality and homoscedasticity of the data, ANOVA or Kruskal-Wallis, complemented by the corresponding multiple comparisons tests were applied. The level of significance was set at 5%. Characterization tests showed that all formulations have mucoadhesive potential and behave like liquid crystal precursors, since they formed liquid crystals when artificial saliva was added. The formulations released between 13.19 and 15.45% of chlorhexidine and between 9.48 and 10.73% of the essential oil of *C. citratus* in 24 hours, acting as controlled releasing system. Formulations showed antimicrobial action independent of the incorporated substance, and were able to maintain the pH close to neutrality for 48 hours. In addition, they determined a significant reduction in the dosage of extracellular water-insoluble polysaccharides. Therefore, the system is presented as an alternative for the treatment of microbial diseases of the oral cavity, due to their mucoadhesive and controlled release characteristics.

Keywords: Biofilms. Liquid Crystals. Oils, Volatile.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	PROPOSIÇÃO	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	Biofilmes Bucais.....	19
3.2	Cárie Dentária	20
3.2.1	Epidemiologia	21
3.2.2	Conceitos e etiologia.....	22
3.3	Estratégias para o Controle do Biofilme	23
3.3.1	Clorexidina	23
3.3.2	Produtos naturais	27
3.3.2.1	Óleos essenciais.....	30
3.3.2.2	Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	32
3.4	Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos para Controle de Doenças Bucais.....	35
3.4.1	Sistemas líquido-cristalinos	36
3.4.2	Sistemas precursores de cristais líquidos	38
4	MATERIAL E MÉTODO	40
4.1	Obtenção do Óleo Essencial e do Digluconato de Clorexidina.....	40
4.2	Obtenção do Inóculo Polimicrobiano de Saliva e Condições de Crescimento.....	40
4.3	Seleção do Doador de Saliva.....	40
4.3.1	Avaliação da concentração de micro-organismos na saliva	41
4.3.2	Avaliação da capacidade de formação de biofilme da saliva	42
4.3.3	Avaliação da sensibilidade da saliva à clorexidina	43
4.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Óleo Essencial e da Clorexidina.....	43
4.5	Preparo do Sistema Precursor de Cristal líquido (SPCL) e Incorporação de Digluconato de Clorexidina e/ou do Óleo Essencial de <i>C. citratus</i>	44
4.5.1	Preparação da dispersão de quitosana 5%.....	44
4.5.2	Incorporação das substâncias ativas no sistema	44
4.6	Caracterização Físico-Química do Sistema Mucoadesivo Precursor de Cristal Líquido Contendo as Substâncias Ativas	44

4.6.1	Microscopia de luz polarizada.....	45
4.6.2	Análises reológicas	45
4.6.2.1	Análise reológica de fluxo contínuo	46
4.6.2.2	Análise reológica de fluxo oscilatório	48
4.6.3	Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva	49
4.6.4	Análise do perfil de liberação <i>in vitro</i>	50
4.6.5	Efeito dos componentes da saliva artificial na estrutura do SPCL selecionado.....	50
4.7	Avaliação da Ação do Sistema Precursor de Cristal Líquido sobre Biofilmes Polimicrobianos	51
4.7.1	Composição microbiana e acidogenicidade do biofilme	52
4.7.2	Dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água	54
4.8	Análise de Resultados	56
5	RESULTADOS	58
5.1	Seleção do Doador de Saliva.....	58
5.2	Obtenção da CIM e CBM do Óleo Essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> e Digluconato de Clorexidina.....	59
5.3	Caracterização Físico-Química do Sistema Mucoadesivo Precursor de Cristal Líquido Contendo as Substâncias Ativas	60
5.3.1	Microscopia de luz polarizada.....	60
5.3.2	Análise reológica de fluxo contínuo	62
5.3.3	Análise reológica oscilatória	64
5.3.4	Análise de mucoadesão.....	66
5.3.5	Análise de perfil de liberação <i>in vitro</i>	67
5.4	Avaliação da Ação do Sistema Precursor de Cristal Líquido sobre Biofilmes Polimicrobianos	69
5.4.1	Composição microbiana e acidogenicidade dos biofilmes	69
5.4.2	Dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água	74
6	DISCUSSÃO	76
7	CONCLUSÃO.....	84
	REFERÊNCIAS.....	85
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	100

APÊNDICE B: Esquema de Aderência Ativa para Crescimento dos Biofilmes.	101
APÊNDICE C – Curva Padrão do Digluconato de Clorexidina em PBS/LSS (1%), Equação da Reta e Coeficiente de Correlação Linear (R^2).....	102
APÊNDICE D – Curva padrão do Óleo Essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> em PBS/LSS (1%), Equação da Reta e Coeficiente de Correlação Linear (R^2).....	103
APÊNDICE E - Curvas Padrão de Glicose Usadas para Dosagem de Polissacarídeos Extracelulares.....	104
ANEXO A – Cadastro do Projeto no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen	105
ANEXO B - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	106

1 INTRODUÇÃO

As doenças bucais estão entre as doenças mais prevalentes em todo o mundo, gerando impacto negativo na economia e saúde da população, e menor qualidade de vida das pessoas afetadas¹.

A cárie dentária é a doença bucal biofilme-dependente mais comum do mundo², tendo afetado, nos últimos 25 anos, cerca de 2,3 bilhões de adultos e 560 milhões de crianças e adolescentes³. É uma doença multifatorial, caracterizada pelo desequilíbrio nos processos de remineralização e desmineralização da superfície dentária. Esse desequilíbrio decorre da interação de fatores como dieta rica em açúcares, hospedeiro e microbiota cariogênica⁴, sob a influência de fatores sociais, comportamentais e econômicos do indivíduo⁵.

Dentro desse contexto, a saúde bucal de pessoas com necessidades especiais se destaca de forma ainda mais preocupante. Esse grupo se encontra mais propenso a contrair doenças biofilme dependentes, quando comparado ao restante da população⁶. Isso se deve, principalmente, à dificuldade em realizar uma higiene bucal eficaz nesses indivíduos devido ao seu grau de limitação física e mental, falta de acesso a atendimento odontológico⁷, falta de orientação dos cuidadores⁸ e uso frequente de medicamentos, que possuem efeitos negativos para a saúde bucal⁹.

Assim, o controle químico por meio de substâncias antimicrobianas tem sido cada vez mais indicado quando o controle mecânico é ineficiente^{10,11}, como em alguns casos de pessoas com necessidades especiais. Diversas substâncias são utilizadas e estudadas para fins antimicrobianos, como o digluconato de clorexidina, amplamente utilizado na odontologia¹².

O digluconato de clorexidina destaca-se por sua eficácia no combate à diversos micro-organismos presentes na cavidade bucal¹³⁻¹⁶. No entanto, seu uso tem sido questionado devido aos efeitos adversos apresentados durante o uso prolongado, como pigmentação dos dentes, alteração do paladar, irritação da língua¹⁷, aumento da resistência microbiana¹⁸, aumento na formação de cálculo dentário¹⁹, além de não ser capaz de controlar biofilmes maduros²⁰.

A clorexidina conta ainda com outro desafio, sua forma de utilização mais conhecida, por meio de enxaguatórios, não tem aplicação universal para pessoas com necessidades especiais²¹, devido as dificuldades neurológicas e motoras para realizar bochechos. Uma alternativa é a aplicação do produto com uso de gaze ou hastes

flexíveis. Entretanto, existe dúvida se esta forma de aplicação apresenta a eficácia esperada, pelo pouco tempo de contato entre a substância e os tecidos dentários.

Como alternativa ao uso da clorexidina, produtos naturais de origem vegetal têm sido estudados quanto aos seus diversos potenciais²². A eficácia desses produtos tem sido cada vez mais relatada na literatura médico-odontológica. Brighenti et al.^{23,24} (2014, 2017) demonstraram o potencial antimicrobiano de plantas provenientes do Pantanal contra micro-organismos de interesse médico-odontológico.

O *Cymbopogon citratus*, comumente conhecido por “capim-cidreira”, “capim-limão” ou “capim santo” é uma planta nativa da Ásia, amplamente utilizada mundialmente devido ao efeito terapêutico dos constituintes de suas folhas²⁵. Estudos demonstram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, apontando para o potencial desse produto na prevenção da cárie dentária^{26,27} e, um estudo recente demonstrou a potencialização da ação da clorexidina por meio da sua associação com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* melhorando a ação da clorexidina sobre biofilmes maduros²⁸.

Um novo desafio para as formulações farmacêuticas é o desenvolvimento de um sistema que retarde a remoção de substâncias pela ação do fluxo salivar. Vários estudos destacam a ação de sistemas líquido-cristalinos (SLC) como alternativa para o problema da administração de substâncias antimicrobianas na cavidade bucal^{29–31}. A estrutura dos SLC possui ligações e rigidez próprias de um sólido, mas mantém regiões desordenadas e fluidez como os líquidos³². Esses sistemas alternativos protegem o princípio ativo contra a degradação e possibilitam uma liberação controlada no local de ação²⁹ podendo aumentar a eficácia dos fármacos. Recentemente, Aida et al.³³ avaliaram a ação antimicrobiana de peptídeos catiônicos e a ação do SLC como carreador e agente de liberação lenta. Concluíram que o SLC contendo fragmento de peptídeo D1–23 reduziu o crescimento de *S. mutans*, e por isso se constitui um sistema promissor de administração de medicamentos para a prevenção da cárie dentária.

A adição gradativa de água no SLC aumenta a sua estruturação, resultando no aumento da viscosidade. Sendo assim, sistemas precursores de cristais líquidos (SPCL) são alternativas relevantes para administração bucal de fármacos, pois podem se apresentar mais fluidos, facilitando a administração da formulação. E ao entrar em contato com a cavidade bucal, esses sistemas tem a capacidade de incorporar a

saliva, se tornando uma fase mais viscosa compatível com um cristal-líquido, promovendo liberação lenta e controlada³².

Bruschi et al.³⁴ incorporaram micropartículas de própolis a sistemas precursores de cristais líquidos para tratamento de doença periodontal e observaram que as taxas de liberação da própolis foram compatíveis a sistemas de liberação controlada. Calixto³⁵ desenvolveu um SPCL para a incorporação do peptídeo antigelatinolítico CTT1 e do azul de metileno, para uso em terapia fotodinâmica e concluiu que esse sistema aumentava sua estruturação em contato com a saliva, além de conferir liberação controlada dos fármacos. Fonseca-Santos et al.³¹ estudaram a possibilidade de incorporação da curcumina em sistemas mucoadesivos precursores de cristais líquidos visando a otimização do tratamento de candidíase oral. Como resultado, esse estudo sugeriu que os SPCLs são uma plataforma interessante para a aplicação na via bucal, já que apresentaram característica mucoadesiva, fator que aumenta o tempo de permanência da droga no sítio bucal.

Não há dados na literatura a respeito da incorporação da associação da clorexidina e óleos essenciais a esses sistemas. Fundamentado na possibilidade de prolongar a permanência de substâncias antimicrobianas na cavidade bucal, o presente estudo se propõe a desenvolver um sistema mucoadesivo precursor de cristal líquido contendo digluconato de clorexidina e/ou óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Com essa estratégia, se busca aumentar a efetividade das substâncias antimicrobianas e diminuir a frequência de aplicação do produto, o que reduziria o custo do tratamento e aumentaria a possibilidade de adesão do paciente.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, as formulações avaliadas neste estudo apresentaram características compatíveis com um sistema precursor de cristal líquido, com boa atividade antibacteriana e redução significativa da acidogenicidade de biofilmes polimicrobianos. Portanto, constituem uma alternativa viável para administração de fármacos para tratamento de doenças microbianas da cavidade bucal. No entanto, precisam ser mais estudadas a fim de definir a melhor concentração das substâncias ativas incorporadas, bem como, o melhor protocolo de aplicação.

REFERÊNCIAS*

1. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019; 394: 249–60.
2. Cheng L, Li J, He L, Zhou X. Natural products and caries prevention. *Caries Res*. 2015; 49 Suppl 1: 38–45.
3. World Health Organization. Sugars and dental caries. Who [Internet]. 2017; 78(4): 1–4. Available from: <http://www.who.int/sugarsanddentalcaries>
4. Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Duque C, Peres RCR, Rodrigues LKA, Nobre-dos-Santos M. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2010; 55(5): 365–73.
5. van der Tas JT, Kragt L, Elfrink MEC, Bertens LCM, Jaddoe VWV, Moll HA, et al. Social inequalities and dental caries in six-year-old children from the Netherlands. *J Dent*. 2017; 62: 18–24.
6. Dolan TA. Professional education to meet the oral health needs of older adults and persons with disabilities. *Spec Care Dent*. 2013; 33(4): 190–7.
7. Queiroz F de S, Rodrigues MML de F, Cordeiro Junior GA, Oliveira A de B, Oliveira JD de, Almeida ER de. Avaliação das condições de saúde bucal de Portadores de Necessidades Especiais. *Rev Odontol da UNESP*. 2014; 43(6): 396–401.
8. Adyanthaya A, Sreelakshmi N, Ismail S, Raheema M, Dentistry P, Ismail S, et al. Barriers to dental care for children with special needs : General dentists ' perception in. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2017; 35(3): 216–22.
9. American Academy of Developmental Medicine and Dentistry. Generic and Trade Name Medication Dental Watch List [Internet]. 2017. Available from: http://aadmd.org/sites/default/files/Medication_Dental_Side_Effect_Watch_List_07-29-10.pdf
10. Addy M, Moran JM. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: Chlorhexidine formulations. *Periodontol 2000*. 1997; 15(1): 52–4.
11. Slot D, Wiggelinkhuizen L, Rosema N, Van der Weijden G. The efficacy of manual toothbrushes following a brushing exercise: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2012; 10(3): 187–97.

12. Takenaka S, Ohsumi T, Noiri Y. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019; 55(1): 33–40.
13. Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent.* 2010; 38: 16–20.
14. Van Strydonck DAC, Slot DE, Van der Velden U V der WF. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol Periodontol.* 2012; 39(11): 1042–55.
15. Lakade LS, Shah P, Shirol D. Comparison of antimicrobial efficacy of chlorhexidine and combination mouth rinse in reducing the Mutans streptococcus count in plaque. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2014; 32(2): 91–6.
16. Dias AP, Paschoal MAB, Diniz RS, Lage LM, Gonçalves LM. Antimicrobial action of chlorhexidine digluconate in self-ligating and conventional metal brackets infected with *Streptococcus mutans* biofilm. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2018; 10: 69–74.
17. McCoy LC, Wehler CJ, Rich SE, Garcia RI, Miller DR, Jones JA. Adverse events associated with chlorhexidine use: Results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139(2): 178–83.
18. Saleem HGM, Seers CA, Sabri AN, Reynolds EC. Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. *BMC Microbiol.* 2016; 16(1): 1–9.
19. Sakaue Y, Takenaka S, Ohsumi T, Domon H, Terao Y, Noiri Y. The effect of chlorhexidine on dental calculus formation: An in vitro study. *BMC Oral Health.* 2018; 18(1): 1–7.
20. Petti S, Hausen H. Caries-preventive effect of chlorhexidine gel applications among high-risk children. *Caries Res.* 2006; 40(6): 514–21.
21. Chibinski ACR, , M.T. Pochapski , P.V. Farago FAS and GDC. Clinical evaluation of chlorhexidine for the control of dental biofilm in children with special needs. *Community Dent Health.* 2011; 28(1): 222–6.
22. Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore G, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules.* 2017; 22(1): 70–125.

23. Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem ACB, Delbem ÁCB, Oliveira MAC, Soares CP, et al. Systematic screening of plant extracts from the Brazilian pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. *Caries Res.* 2014; 48(5): 353–60.
24. Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Delbem ACB, Delbem ÁCB, Soares CP, et al. Plant extracts: Initial screening, identification of bioactive compounds and effect against *Candida albicans* biofilms. *Future Microbiol.* 2017; 12(1): 15–27.
25. Avoseh O, Oyedele O, Rungqu P, Nkeh-Chungag B, Oyedele A. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules.* 2015; 20(5): 7438–53.
26. Tofiño-Rivera A, Ortega-Cuadros M, Galvis-Pareja D, Jiménez-Rios H, Merini LJ, Martínez-Pabón MC. 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.
27. Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: Effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res.* 2017; 31: 1–12.
28. Brighenti F, Mouta L, Koga-Ito C, Salvador M. *Formulação farmacêutica e usos da mesma.* Brazil; BR10201900657, 2019.
29. Kang ML, Cho CS, Yoo HS. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnol Adv.* 2009; 27(6): 857–65.
30. Kadhum WR, Hada T, Hijikuro I, Todo H, Sugibayashi K. Development and optimization of orally and topically applied liquid crystal drug formulations. *J Oleo Sci.* 2017; 66(9): 939–50.
31. Fonseca-Santos B, Bonifácio BV, Baub TM, Gremião MPD, Chorilli M, B. F-S, et al. In-situ gelling liquid crystal mucoadhesive vehicle for curcumin buccal administration and its potential application in the treatment of oral candidiasis. *J Biomed Nanotechnol.* 2019; 15(6): 1334–44.
32. Chorilli M, Prestes PS, Rigon RB, Leonardi GR, Chiavacci LA, Scarpa MV. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. *Quim Nova.* 2009; 32(4): 1036–40.
33. Aida KL, Kreling PF, Caiaffa KS, Calixto GMF, Chorilli M, Spolidorio DMP, et al. Antimicrobial peptide-loaded liquid crystalline precursor bioadhesive system for the prevention of dental caries. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13: 3081–91.

34. Bruschi ML, de Freitas O, Lara EHG es, Panzeri H, Gremião MPD, Jones DS. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: development and characterization. *Drug Dev Ind Pharm*. 2008; 34(3): 267–78.
35. Calixto GMF. Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de peptídeo antigelatinolítico associados à terapia fotodinâmica no tratamento do câncer bucal. [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2017.
36. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2(2): 114–22.
37. Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Chaieb K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microb Pathog*. 2015; 80: 39–49.
38. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*. 1997; 11(1): 160–7.
39. Neto CC, Penndorf KA, Feldman M, Meron-Sudai S, Zakay-Rones Z, Steinberg D, et al. Characterization of non-dialyzable constituents from cranberry juice that inhibit adhesion, co-aggregation and biofilm formation by oral bacteria. *Food Funct*. 2017; 8(5): 1955–65.
40. Busscher, H. J., Van Der Mei HC. Physico-Chemical Interactions in Initial Microbial Adhesion and Relevance for Biofilm Formation. *Adv Dent Res*. 1997; 11(1): 24–32.
41. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections – an update. *Apmis*. 2017; 125(4): 376–84.
42. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol*. 1993; 175(11): 3247–52.
43. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009; 73(3): 407–50.
44. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14(9): 563–75.
45. Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005; 13(1): 20–6.

46. Bowen WH, Koo H. Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research*. 2011; 45: 69–86.
47. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide Matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013; 92(12): 1065–73.
48. Lappin-Scott HM, William Costerton J. Bacterial biofilms and surface fouling. *Biofouling*. 1989; 1(4): 323–42.
49. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog*. 2012; 8(4): 7–9.
50. Werner E, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Heydorn A, Pitts B, et al. Stratified Growth in. 2004; 70(10): 6188–96.
51. Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM, et al. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol*. 2007; 189(11): 4223–33.
52. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16(12): 745–59.
53. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of Pathogens by Gut Microbiota. *Nat Immunol*. 2013; 14(7): 685–90.
54. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim*. 2017; 3(1).
55. Bowen WH. Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol*. 2016; 31(3): 228–33.
56. Moore WJ & Corbett ME. The distribution of dental caries in ancient British populations- the 19th century. *Caries Res*. 1976; 10: 401–14.
57. Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, Bailey J, Abreu LG, Alipour V, et al. Global, regional, and national levels and trends in burden of oral conditions from 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease 2017 study. *J Dent Res*. 2020; 99(4): 362–73.
58. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*. 2013; 92(7): 592–7.

59. Fleming E, Afful J. National Center for Health Statistics. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES): 2015-2016. NCHS Data Brief. 2018; (307): 1–8.
60. Ardenghi TM, Piovesan C, Antunes JLF. Inequalities in untreated dental caries prevalence in preschool children in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2014; 47 Suppl 3: 129–37.
61. Wright JT. The burden and management of dental caries in older children. *Pediatr Clin North Am*. 2018; 65(5): 955–63.
62. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *J Dent Res*. 2017; 96(4): 380–7.
63. Anders PL, Davis EL. Oral health of patients with intellectual disabilities: a systematic review. *Spec Care Dent*. 2010; 30(3): 110–7.
64. Morgan JP, Minihan PM, Stark PC, Finkelman MO, Yantsides KE, Park A, et al. The oral health status of 4,732 adults with intellectual and developmental disabilities. *J Am Dent Assoc*. 2012; 143(8): 838–46.
65. Seirawan H, Schneiderman J, Greene V, Mulligan R. Interdisciplinary approach to oral health for persons with developmental disabilities. *Spec Care Dent*. 2008; 28(2): 43–52.
66. World Health Organization. Summary world report on disability. World Health. 2011; 1–24.
67. Sajith Vellappally SJG, Kheraif A-AA Al, Krishna M, Babu S, Hashem M, Anil VJ and S. The prevalence of malocclusion and its association with dental caries among 12-18-year-old disabled adolescents. *BMC Oral Health*. 2014; 14: 123.
68. Amr M. Moursi Jill B. Fernandez, Marcia Daronch, Lena Zee CLJ. Nutrition and Oral Health Considerations in Children with Special Health Care Needs: Implications for Oral Health Care Providers. 2016; 32(4): 333–42.
69. Siqueira WL, Santos MTBR, Elangovan S, Simoes A, Nicolau J. The influence of valproic acid on salivary pH in children with cerebral palsy. *Spec Care Dent*. 2007; 27(2): 64–6.

70. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and cariology research group of IADR. *Caries Res.* 2019; 1–8.
71. Lima JE de O. Cárie dentária: um novo conceito. *Rev Dent Press Ortod e Ortop Facial.* 2007; 12(6): 119–30.
72. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol.* 1960; 1(4).
73. Costa S. Modelos explicativos da cárie dentária: do organicista ao ecossistêmico. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2012; 12(2): 285–91.
74. Zhan L. Rebalancing the caries microbiome dysbiosis: targeted treatment and sugar alcohols. *Adv Dent Res.* 2018; 29(1): 110–6.
75. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Adv Dent Res.* 2018; 29(1): 78–85.
76. Rolla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res.* 1975; 54: 57–62.
77. Kuyyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 100(1–3): 211–5.
78. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane): laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother.* 1954; 9(2): 192–6.
79. Bailey RR, Stuckey DR, Norman BA, Duggan AP, Bacon KM, Connor DL, et al. Economic value of dispensing home-based preoperative chlorhexidine bathing cloths to prevent surgical site infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011; 32(5): 465–71.
80. Rindom Schiøtt C, Løe H, Børglum Jensen S, Kilian M, Davies RM, Glavind K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Periodontal Res.* 1970; 5(2): 84–9.
81. Løe H, Rindom Schiøtt C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res.* 1970; 5(2): 79–83.

82. Yamaguchi H, Hirasawa K, Tanaka T, Shioiri T, Matsue I. The inhibitory effect of chlorhexidine digluconate on dental plaque formation: a scanning and transmission electron microscope study. *J Periodontol.* 1981; 52(10): 630–8.
83. Bay LM, Russell BG. Effect of chlorhexidine on dental plaque and gingivitis in mentally retarded children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1975; 3(6): 267–70.
84. Lang NP, Ramseier-Grossmann K. Optimal dosage of chlorhexidine digluconate in chemical plaque control when applied by the oral irrigator. *J Clin Periodontol.* 1981; 8(3): 189–202.
85. Zaura-Arite E, Van Marle J, Ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res.* 2001; 80(5): 1436–40.
86. Decker EM, Weiger R, von Ohle C, Wiech I, Brex M. Susceptibility of planktonic versus attached *Streptococcus sanguinis* cells to chlorhexidine. *Clin Oral Investig.* 2003; 7(2): 98–102.
87. Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(9): 3515–9.
88. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. The Effect of 0.12% Chlorhexidine Gluconate Rinsing on Previously Plaque-Free and Plaque-Covered Surfaces: a Randomized, Controlled Clinical Trial. *J Periodontol.* 2007; 78(11): 2127–34.
89. James P, Worthington H V., Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 2017(3).
90. Wang S, Wang H, Ren B, Li H, Weir MD, Zhou X, et al. Do quaternary ammonium monomers induce drug resistance in cariogenic, endodontic and periodontal bacterial species? *Dent Mater.* 2017; 33(10): 1127–38.
91. Dias DA, Urban S, Roessner U. A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.* 2012; 2(2): 303–36.
92. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011; 45(3): 243–63.
93. Sonam C, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines.* 2017; 4(3): 58.

94. Nucci C, Mazzardo-Martins L, Stramosk J, Brethanha LC, Pizzolatti MG, Santos ARS, et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. *J Ethnopharmacol.* 2012; 143(1): 170–8.
95. Coelho LP, Reis PA, De Castro FL, Machado Gayer CR, Da Silva Lopes C, Da Costa E Silva MC, et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J Ethnopharmacol.* 2005; 98(1–2): 109–16.
96. Júnior FEB, De Oliveira DR, Boligon AA, Athayde ML, Kamdem JP, Macedo GE, et al. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. *J Ethnopharmacol.* 2014; 153(2): 469–77.
97. Sertié JAA, Woisky RG, Wiezel G, Rodrigues M. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: Oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. *Phytomedicine.* 2005; 12(5): 338–44.
98. Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE, et al. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo. *Caries Res.* 2010; 44(2): 116–26.
99. Antonio AG, Iorio NLP, Pierro VSS, Candreva MS, Farah A, Dos Santos KRN, et al. Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(6): 556–64.
100. Antonio A, Iorio NP, Farah A, Santos KN, Maia L. Effect of *Coffea canephora* aqueous extract on microbial counts in ex vivo oral biofilms: a case study. *Planta Med.* 2012; 78(8): 755–60.
101. Fani M, Kohanteb J. Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *J Oral Sci.* 2012; 54(1): 15–21.
102. Khalid M, Hassani D, Bilal M, Butt ZA, Hamayun M, Ahmad A, et al. Identification of oral cavity biofilm forming bacteria and determination of their growth inhibition by *Acacia arabica*, *Tamarix aphylla* L. and *Melia azedarach* L. medicinal plants. *Arch Oral Biol.* 2017; 81: 175–85.
103. Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL. Natural antimicrobials and oral microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. *Front Microbiol.* 2016; 6: 1–17.

104. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? *Molecules*. 2019; 24(11): 1–21.
105. Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, et al. Essential Oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. *Curr Drug Metab*. 2018; 19(13): 1100–10.
106. Bersan SM, Galvão LC, Goes VF, Sartoratto A, Figueira GM, Rehder VL, et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14(1): 451-463.
107. Freires IA, Denny C, Benso B, De Alencar SM, Rosalen PL. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. *Molecules*. 2015; 20(4): 7329–58.
108. Araujo MWB, Charles CA, Weinstein RB, McGuire JA, Parikh-Das AM, Du Q, et al. Meta-analysis of the effect of an essential oil-containing mouthrinse on gingivitis and plaque. *J Am Dent Assoc*. 2015; 146(8): 610–22.
109. Tardugno R, Pellati F, Iseppi R, Bondi M, Bruzzesi G, Benvenuti S. Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. *Nat Prod Res*. 2018; 32(5): 544–51.
110. Daneshkazemi A, Zandi H, Davari A, Vakili M, Emtiazi M, Lotfi R, et al. Antimicrobial activity of the essential oil obtained from the seed and oleo-gum-resin of *Ferula assa-foetida* against oral pathogens. *Front Dent*. 2019; 16(2): 113–20.
111. De Groot A, Schmidt E. Essential oils, part V: Peppermint oil, lavender oil, and lemongrass oil. *Dermatitis*. 2016; 27(6): 325–32.
112. Ekpenyong CE, Akpan E, Nyoh A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extracts. *Chin J Nat Med*. 2015; 13(5): 321–37.
113. Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kebir HT. Lemon grass (*cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J Med*. 2014; 9: 1–10.
114. Oliveira JB, Teixeira MA, Paiva LF de, Oliveira RF de, Mendonça AR dos A, Brito MJA de. In vitro and in vivo antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. against *Staphylococcus* spp. isolated from newborn babies in an intensive care unit. *Microb Drug Resist*. 2019; 1–7.

115. Sahal G, Woerdenbag HJ, Hinrichs WLJ, Visser A, Tepper PG, Quax WJ, et al. Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an in vitro study. *J Ethnopharmacol.* 2020; 246.
116. Khan MSA, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol.* 2012; 140(2): 416–23.
117. Perazzo M, Costa Neta M, Cavalcanti Y, Xavier A, Cavalcanti A. Efeito antimicrobiano do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. *Rev Bras Ciências da Saúde.* 2012; 16(4): 553–8.
118. Ocheng F, Bwanga F, Joloba M, Softrata A, Azeem M, Pütsep K, et al. Essential oils from ugandan aromatic medicinal plants: chemical composition and growth inhibitory effects on oral pathogens. *Evid-Based Complement Altern Med.* 2015; 2015: 1-10.
119. Kiryukhin M V. Active drug release systems: Current status, applications and perspectives. *Curr Opin Pharmacol.* 2014; 18: 69–75.
120. Calixto GMF, Duque C, Aida KL, dos Santos VR, Massunari L, Chorilli M. Development and characterization of p1025-loaded bioadhesive liquid-crystalline system for the prevention of *Streptococcus mutans* biofilms. *Int J Nanomedicine.* 2017; 13: 31–41.
121. Steinberg D, Friedman M. Sustained-release drug delivery of antimicrobials in controlling of supragingival oral biofilms. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017; 14(4): 571–81.
122. De Robertis S, Bonferoni MC, Elviri L, Sandri G, Caramella C, Bettini R. Advances in oral controlled drug delivery: The role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015; 12(3): 441–53.
123. Dierking I, Al-Zangana S. Lyotropic liquid crystal phases from anisotropic nanomaterials. *Nanomaterials.* 2017; 7(10): 305.
124. Souza C. Sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água para veiculação de antimicrobianos com aplicabilidade bucal sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água para veiculação de antimicrobianos com aplicabilidade bucal. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2013.

125. Souza C, Watanabe E, Borgheti-Cardoso LN, De Abreu Fantini MC, Lara MG. Mucoadhesive system formed by liquid crystals for buccal administration of poly(Hexamethylene Biguanide) hydrochloride. *J Pharm Sci.* 2014; 103(12): 3914–23.
126. Calixto GMF. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do *Streptococcus mutans*. [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2013.
127. Jiang X, Liang X, Wang S, Guo J, Tao Y, Gui S. An injectable in situ hexagonal mesophase system for local delivery of minocycline hydrochloride: Preparation and pharmacodynamics in rats. *Pharmazie.* 2017; 72(5): 249–56.
128. de Alcântara Sica de Toledo L, Rosseto HC, dos Santos RS, Spizzo F, Del Bianco L, Montanha MC, et al. Thermal magnetic field activated propolis release from liquid crystalline system based on magnetic nanoparticles. *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19(7): 3258–71.
129. Mei L, Huang X, Xie Y, Chen J, Huang Y, Wang B, et al. An injectable in situ gel with cubic and hexagonal nanostructures for local treatment of chronic periodontitis. *Drug Deliv.* 2017; 24(1): 1148–58.
130. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res.* 1997; 11(1): 110–26.
131. McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol.* 2005; 98(3): 624–34.
132. Dupont WD, Plummer WD. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Control Clin Trials.* 1998; 19(6): 589–601.
133. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2011; 27(9): 1057–63.
134. Feio M, Sapeta P. Xerostomia in palliative care. *Acta Med Port.* 2005; 18(6): 459–66.
135. Gold OG, Jordan HV, van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973; 18(11): 1357–64.
136. Azevedo MS, van de Sande FH, Maske TT, Signori C, Romano AR, Cenci MS. Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. *Biofouling.* 2014; 30(8): 903–9.

137. Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM. Different Response to Amine Fluoride by *Streptococcus mutans* and Polymicrobial Biofilms in a Novel High-Throughput Active Attachment Model. *Caries Res.* 2010; 44(4): 372–9.
138. Albuquerque YE, Danelon M, Salvador MJ, Koga-Ito CY, Botazzo Delbem AC, Ramirez-Rueda RY, et al. Mouthwash containing *Croton doctoris* essential oil: in vitro study using a validated model of caries induction. *Future Microbiol.* 2018; 13(6): 631–43.
139. Patel J.B., Cockerill R.F., Bradford A.P., Eliopoulos M.G., Hindler A.J., Jenkins G.S., Lewis S.J., Limbago B., Miller A.L., Nicolau P.D., Pwell M., Swenson M.J., Traczewski M.M., Turnidge J.D. WPMZLB. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical Lab Stand Institute). 2015; 35(2).
140. Badin CM. Análise Físico-Química e Reológica de um óleo parafínico. [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas; 2012.
141. Isaac VLB, Cefali LC, Chiari BG, Oliveira CCLG, Salgado HRN, Corrêa MA. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2008; 29(1): 81–96.
142. Bennergossi J, Calixto G, Fonseca-Santos B, Aida K, Negrini T, Duque C, et al. Highlights in peptide nanoparticle carriers intended to oral diseases. *Curr Top Med Chem.* 2015; 15(4): 345–55.
143. Carvalho FC, Chorilli M, Gremião MPD. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. *Polimeros.* 2014; 24(2): 203–13.
144. Almeida KB, Ramos AS, Nunes JBB, Silva BO, Ferraz ERA, Fernandes AS, et al. PLGA nanoparticles optimized by box-behnken for efficient encapsulation of therapeutic *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2019; 181: 935–42.
145. Cochran WG. *Sampling Techniques*, 3rd Edition. 1977.
146. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28(3): 350–6.
147. Aida K, Kreling P, Caiaffa K, Calixto G, Chorilli M, Spolidorio D, et al. Antimicrobial peptide-loaded liquid crystalline precursor bioadhesive system for the prevention of dental caries. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13: 3081–91.

148. Rajabalaya R, Musa MN, Kifli N, David SR. Oral and transdermal drug delivery systems: Role of lipid-based lyotropic liquid crystals. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11: 393–406.
149. World Health Organization (WHO). WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023. *World Heal Organ.* 2013; 1–76.
150. Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(2): 73–9.
151. Filoche SK, Soma D, Van Bekkum M, Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 54(1): 27–36.
152. Fernandez y Mostajo M, Exterkate RAM, Buijs MJ, Crielaard W, Zaura E. Effect of mouthwashes on the composition and metabolic activity of oral biofilms grown in vitro. *Clin Oral Investig.* 2017; 21(4): 1221–30.
153. Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(5): 1031–6.
154. Chorilli M. Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2007.
155. Salmazi R, Calixto G, Bernegossi J, Ramos MA dos S, Bauab TM, Chorilli M. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10: 4815–24.
156. Calixto GMF, Victorelli FD, Dovigo LN, Chorilli M. Polyethyleneimine and chitosan polymer-based mucoadhesive liquid crystalline systems intended for buccal drug delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19(2): 820–36.
157. Franzini CM, Pestana KC, Molina EF, Scarpa MV, Do Egito EST, De Oliveira AG. Structural properties induced by the composition of biocompatible phospholipid-based microemulsion and amphotericin B association. *J Biomed Nanotechnol.* 2012; 8(2): 350–9.
158. Carvalho FC, Campos ML, Peccinini RG, Gremião MPD. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013; 84(1): 219–27.

159. Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram- positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(6): 864–70.
160. Bernegossi J, Calixto GMF, Da Silva Sanches PR, Fontana CR, Cilli EM, Garrido SS, et al. Peptide KSL-W-loaded mucoadhesive liquid crystalline vehicle as an alternative treatment for multispecies oral biofilm. *Molecules*. 2016; 21(1): 1–14.
161. Sahariah P, Másson M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules*. 2017; 18(11): 3846–68.
162. Perinelli DR, Fagioli L, Campana R, Lam JKW, Baffone W, Palmieri GF, et al. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *Eur J Pharm Sci*. 2018; 117: 8–20.
163. Aliasghari A, Khorasgani MR, Vaezifar S, Rahimi F, Younesi H, Khoroushi M. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic streptococci: An in vitro study. *Iran J Microbiol*. 2016; 8(2): 93–100.
164. Paz LEC, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(11): 3892–5.
165. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2017; 15(12): 740–55.
166. Koo H, Jeon JG. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. *Adv Dent Res*. 2009; 21(1): 63–8.