



**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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

**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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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 Roderer 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Lourenção Brighenti, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Cristina Cilense Zuanon, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josimeri Hebling Costa, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto, Prof. Dr. Fábio César Braga de Abreu e Lima e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Lourenção Brighenti (Coordenadora) e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Nara de Souza Rastelli (vice-coordenadora).

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, na pessoa da diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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

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

## 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 afetadas<sup>1</sup>.

A cárie dentária é a doença bucal biofilme-dependente mais comum do mundo<sup>2</sup>, tendo afetado, nos últimos 25 anos, cerca de 2,3 bilhões de adultos e 560 milhões de crianças e adolescentes<sup>3</sup>. 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 cariogênica<sup>4</sup>, sob a influência de fatores sociais, comportamentais e econômicos do indivíduo<sup>5</sup>.

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 população<sup>6</sup>. 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 odontológico<sup>7</sup>, falta de orientação dos cuidadores<sup>8</sup> e uso frequente de medicamentos, que possuem efeitos negativos para a saúde bucal<sup>9</sup>.

Assim, o controle químico por meio de substâncias antimicrobianas tem sido cada vez mais indicado quando o controle mecânico é ineficiente<sup>10,11</sup>, 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 odontologia<sup>12</sup>.

O digluconato de clorexidina destaca-se por sua eficácia no combate à diversos micro-organismos presentes na cavidade bucal<sup>13-16</sup>. 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 língua<sup>17</sup>, aumento da resistência microbiana<sup>18</sup>, aumento na formação de cálculo dentário<sup>19</sup>, além de não ser capaz de controlar biofilmes maduros<sup>20</sup>.

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 especiais<sup>21</sup>, 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 potenciais<sup>22</sup>. A eficácia desses produtos tem sido cada vez mais relatada na literatura médico-odontológica. Brighenti et al.<sup>23,24</sup> (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 folhas<sup>25</sup>. Estudos demonstram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, apontando para o potencial desse produto na prevenção da cárie dentária<sup>26,27</sup> 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 maduros<sup>28</sup>.

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<sup>29-31</sup>. A estrutura dos SLC possui ligações e rigidez próprias de um sólido, mas mantém regiões desordenadas e fluidez como os líquidos<sup>32</sup>. Esses sistemas alternativos protegem o princípio ativo contra a degradação e possibilitam uma liberação controlada no local de ação<sup>29</sup> podendo aumentar a eficácia dos fármacos. Recentemente, Aida et al.<sup>33</sup> 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 controlada<sup>32</sup>.

Bruschi et al.<sup>34</sup> 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. Calixto<sup>35</sup> 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.<sup>31</sup> 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.

## 2 PROPOSIÇÃO

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 biofilme polimicrobiano.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

Nessa seção são abordados aspectos da literatura que fundamentam este trabalho.

#### 3.1 Biofilmes Bucais

Os biofilmes são comunidades de micro-organismos altamente organizadas aderidas a uma superfície sólida e envoltas por uma matriz de polissacarídeos extracelulares<sup>36,37</sup>. Os micro-organismos presentes nessas estruturas são considerados mais resistentes a agentes antimicrobianos e às defesas do hospedeiro quando comparados a micro-organismos em estado planctônico<sup>37,38</sup>. Dessa forma, essa estrutura é reconhecida como um importante fator de virulência para diversas doenças bucais, tais como cárie dentária e doença periodontal<sup>39</sup>.

O início do processo de desenvolvimento do biofilme bucal se dá por meio da formação de uma película salivar na superfície dentária, denominada película adquirida<sup>40,41</sup>. As espécies bacterianas colonizadoras iniciais (predominantemente *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus oralis*) aderem a essa película, inicialmente com forças fracas de natureza físico-química. Posteriormente, ligações mais fortes são estabelecidas devido a interação entre adesinas presentes na membrana celular das bactérias e receptores de glicoproteínas na película adquirida<sup>41-43</sup>. A fase seguinte envolve o acúmulo de micro-organismos que não são capazes de interagir diretamente com componentes da película adquirida, mas interagem com a superfície dos colonizadores iniciais por meio de receptores de adesão específicos entre as bactérias. Nessa fase, as bactérias produzem uma matriz polimérica extracelular que contribui para a aderência de outras espécies na superfície dentária<sup>42</sup>.

A matriz de polissacarídeos extracelulares (PEC) é um fator de grande importância para formação, proteção e virulência do biofilme<sup>44,45</sup>. Bactérias colonizadoras produzem enzimas que catalisam a produção de polímeros de glicose ou frutose a partir da sacarose presente na dieta. Algumas espécies bacterianas, principalmente os estreptococos, são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares tendo a sacarose como substrato<sup>46</sup>. Algumas espécies bacterianas produzem PEC mais solúveis em água (*S. sanguinis*)<sup>47</sup>, enquanto outras espécies mais patogênicas produzem polissacarídeos ramificados e insolúveis em água (*S.*

*mutans*). Estes PEC insolúveis são mais estáveis e são considerados essenciais na patogenia da cárie dentária<sup>46</sup>.

A secreção de PEC é constante, garantindo a fixação segura de bactérias à superfície dentária dentro de uma camada espessa e complexa<sup>48,49</sup>. O biofilme maduro assume uma estrutura tridimensional e altamente complexa, uma vez que os polissacarídeos não são distribuídos de forma uniforme<sup>49</sup>. Esse fator favorece a formação de áreas do biofilme onde a saliva não consegue neutralizar o pH, criando microambientes ácidos protegidos pela barreira física da matriz de PEC<sup>47,49</sup>.

Estudos demonstram diferentes valores de pH distribuídos em um mesmo biofilme<sup>50,51</sup>. Além disso, Xiao et al.<sup>49</sup> demonstraram a presença de microambientes de pH baixo (< 5,5) no interior dos PEC formados em biofilmes incubados em tampão de pH neutro. Dessa forma, é possível afirmar que existe uma limitação substancial de difusão de substâncias no biofilme, a qual está associada à presença de uma matriz rica em PEC insolúveis, evidenciando que esta possui um papel importante na virulência dos biofilmes orais<sup>47</sup>.

Os biofilmes são parte da microbiota oral residente que, como regra geral, é benéfica para o hospedeiro, porquanto fornecem resistência à colonização por patógenos exógenos, além de contribuir para o desenvolvimento normal do tecido e do sistema imunológico<sup>41,52,53</sup>. Em caso de desequilíbrio nessa relação, podem ocorrer alterações na microbiota do biofilme que favorecem o desenvolvimento de doenças (disbioses)<sup>52,54</sup>. Assim, os biofilmes que se desenvolvem nas superfícies dentárias podem causar a cárie dentária, enquanto os biofilmes supra e subgengivais podem causar a doença periodontal.

### **3.2 Cárie Dentária**

O termo “cárie dentária” foi usado pela primeira vez por volta do século XVII, originalmente para descrever cavidades nos dentes, sem muito conhecimento a respeito da etiologia e patogênese da doença<sup>55</sup>. O aumento do consumo de açúcar pela população nos séculos XVII e XVIII, fez a cárie tornar-se frequente. Mas foi no século XIX, com a popularização do açúcar produzido a partir da cana-de-açúcar no mundo ocidental, que a cárie começou a interferir na qualidade de vida das populações<sup>56</sup>.

### 3.2.1 Epidemiologia

No tópico de saúde bucal do *Global Burden of Disease Study* em 2017, constatou-se que as doenças bucais eram altamente prevalentes, afetando aproximadamente 3,4 bilhões de pessoas em todo o mundo<sup>57</sup>. Nesse contexto, a lesão de cárie não tratada na dentição permanente foi a condição avaliada mais prevalente, atingindo cerca de 35% da população de todas as idades<sup>57,58</sup>. Nos últimos 25 anos, a cárie dentária acometeu cerca de 2,3 bilhões de adultos e 560 milhões de crianças e adolescentes em todo o mundo<sup>3</sup>.

A cárie é considerada a doença crônica infantil mais comum do mundo<sup>54</sup>. Nos Estados Unidos, nos anos de 2015 e 2016, 45,8% das crianças e adolescentes entre 2 e 19 anos tiveram os dentes afetados por cárie<sup>59</sup>. No Brasil, esse dado é ainda mais alarmante, informações de 2010 indicam uma prevalência de 48,2% de lesões de cárie não tratadas em crianças de 5 anos de idade<sup>60</sup>.

Apesar da doença cárie afetar severamente crianças muito jovens<sup>61</sup> é uma condição que acomete as diferentes faixas etárias, sendo muito comum na adolescência e na idade adulta<sup>1</sup>. Em 1990, a maior prevalência de cárie no mundo foi observada aos 25 anos de idade, enquanto em 2010, a maior prevalência ocorreu aos 70 anos de idade, provavelmente devido ao aumento da cárie radicular<sup>1</sup>. Dados mais recentes demonstram que o pico de prevalência de cárie dentária não tratada na dentição permanente foi observada na população de faixa etária entre 15 e 19 anos<sup>62</sup>

Pessoas com necessidades especiais possuem índices ainda mais altos de exposição à cárie dentária. Estudos demonstram que esses indivíduos são mais propensos a ter má higiene bucal, doença periodontal e lesões de cárie não tratadas quando comparados à população em geral<sup>63-65</sup>. Essa realidade pode estar relacionada a dois fatores: dificuldade em realizar tratamento curativo e dificuldade em realizar e manter a higiene bucal desses pacientes.

A *World Report on disability*<sup>66</sup> demonstrou que indivíduos com necessidades especiais estão duas vezes mais propensos a terem o tratamento de saúde negado e quatro vezes mais propensos a receberem um tratamento insatisfatório nos serviços de saúde<sup>66</sup>. Além disso, a necessidade de procedimentos curativos nesses pacientes é alta, quando comparada a população geral. Isso ocorre devido à dificuldade em realizar uma correta higienização bucal, que é extremamente dificultada devido aos movimentos involuntários apresentados por alguns pacientes.

Somado a dificuldade em realizar uma higienização bucal, esses pacientes possuem diversos fatores que os predispõe ao desenvolvimento de doenças bucais, como: presença de má-oclusões associadas a baixo desempenho mastigatório<sup>67</sup>; dieta pastosa, que dificulta a limpeza natural dos dentes gerada pela língua, bochechas e mastigação; uso de suplementos nutricionais com alta concentração de sacarose<sup>68</sup>; e o uso frequente de medicamentos, como anticonvulsivantes, antipsicóticos, ansiolíticos, antiepilépticos e antidepressivos, que diminuem a capacidade tampão da saliva, além de redução do fluxo e do pH salivar<sup>69</sup>.

Dessa forma, a cárie dentária se caracteriza como um grande problema de saúde pública mundial, por atingir diversas populações<sup>1,54</sup>. Estratégias para o controle da doença vem sendo estudadas ao longo dos anos, no entanto, essas estratégias devem ser baseadas na correta compreensão da etiopatogenia da doença.

### **3.2.2 Conceitos e etiologia**

A cárie dentária é classificada como uma doença dinâmica, multifatorial e mediada pelos fatores biofilme e dieta, resultante de um desequilíbrio dos processos de remineralização e desmineralização dos tecidos duros dentais<sup>54</sup>. É determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais<sup>70</sup>.

No entanto, os primeiros estudos que visavam explicar a etiologia da cárie e os fatores que determinavam seu início e progressão possuíam uma abordagem unicausal. Miller (1980 apud Lima<sup>71</sup>) desenvolveu a teoria químico parasitária, a qual defende que todas as espécies de bactérias da superfície dos dentes são capazes de colaborar com o ataque ácido sobre o esmalte dentário. Portanto, a quantidade de biofilme sobre as superfícies dentárias seria determinante para o desenvolvimento da cárie dentária<sup>71</sup>.

O conceito de cárie dentária como doença transmissível e infecciosa surgiu a partir de pesquisas da década de 1950, nos quais foi feito o isolamento de certas bactérias em lesões de cárie de dentes de hamsters<sup>72</sup>. Keys<sup>72</sup> sugeriu um modelo multifatorial para explicar a etiologia da cárie, conhecido como a Tríade de Keys. Esse modelo explica a etiologia da cárie pela associação dos fatores primários: hospedeiro susceptível, substrato cariogênico e microbiota. Em 1983, Ernest Newbrun modificou a Tríade de Keyes ao incluir o tempo como o quarto fator etiológico que deve agir simultaneamente com os outros fatores, determinando o desenvolvimento da cárie<sup>71</sup>.

Posteriormente, os estudos demonstraram que o desenvolvimento da cárie é complexo e requer além do alto e frequente consumo de carboidratos e do acúmulo de micro-organismos acidogênicos, a interação com outros fatores do hospedeiro. Então, evidenciou-se que a ocorrência e a progressão da cárie sofrem influência de uma complexa interação de fatores genéticos, ambientais e comportamentais, como hábitos alimentares, uso do flúor, higiene bucal, fluxo salivar, composição salivar e estrutura do dente<sup>73</sup>.

Atualmente, a cárie dentária é descrita como uma doença caracterizada pela disbiose no microbioma oral, diretamente associada a dieta do indivíduo (consumo de açúcares)<sup>74</sup>. A disbiose do biofilme ocorre quando a ingestão excessiva e frequente de carboidratos resulta na produção de ácido que ultrapassa a capacidade de tamponamento do microbioma saudável. Isso aumenta a desmineralização da superfície dentária e conseqüentemente a propensão à cárie dentária<sup>75</sup>. Dessa forma, a doença assume um padrão de não-transmissibilidade, uma vez que o responsável por seu desenvolvimento é o desequilíbrio da microflora residente associado a dieta.

### **3.3 Estratégias para o Controle do Biofilme**

O controle das doenças microbianas bucais é um grande desafio para a população mundial. Como a maioria dessas doenças têm como um dos fatores etiológicos, micro-organismos organizados em biofilme, as estratégias para o seu controle possuem grande enfoque na desorganização dessa estrutura. A técnica mais adotada consiste na remoção mecânica do biofilme, por meio da escovação e uso de fio dental. No entanto, em casos específicos, onde não é possível realizar uma higiene bucal eficaz, o controle químico por meio de substâncias antimicrobianas tem sido indicado<sup>10,11</sup>.

#### **3.3.1 Clorexidina**

A clorexidina (CLX) é um agente antimicrobiano com um amplo espectro de ação que abrange bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e até mesmo alguns vírus e leveduras<sup>76</sup>. Essa substância é caracterizada como um antisséptico, da classe das biguanidas, e apresenta-se nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato. É uma molécula estável, com afinidade por micro-organismos, agindo por meio de interação eletrostática. Sua carga positiva é atraída rapidamente pela carga

negativa da parede celular bacteriana, dessa forma, sua ação se dá por meio da ruptura da parede celular dos micro-organismos, extravasamento dos componentes intracelulares, e conseqüente morte celular<sup>77</sup>.

Davies<sup>78</sup> foi o primeiro a sintetizar a clorexidina e estudar seus efeitos antimicrobianos, evidenciando o seu amplo espectro contra diversos micro-organismos. A partir de então, esse potente agente antimicrobiano começou a ser utilizado em hospitais e clínicas para desinfecção de feridas, limpeza de mãos, pele e mucosa previamente às cirurgias<sup>79</sup>. Porém, somente em 1970 esse composto foi introduzido na odontologia para o controle do biofilme bucal.

Um dos primeiros estudos para avaliar o potencial da clorexidina em controlar biofilmes bucais foi realizado por Rindom Schiøtt et al.<sup>80</sup>. Este estudo consistiu em avaliar o efeito do digluconato de clorexidina 0,2% aplicado 2 vezes ao dia por 22 dias, na microbiota oral de indivíduos que permaneceram sem realizar higiene bucal durante esse período. Demonstrou uma redução de cerca de 95% no número de bactérias totais da saliva dos participantes do estudo durante os primeiros 15 dias. A partir do décimo quinto dia essa redução passou a ser de 85%.

No estudo seguinte, Løe e Rindom Schiøtt<sup>81</sup> testaram o digluconato de clorexidina em diferentes concentrações (0,2% e 2%), formas de utilização (enxaguatório ou aplicação tópica) e periodicidade (uma vez ao dia e duas vezes ao dia). O estudo constatou que a concentração de 0,2%, duas vezes ao dia, por 30 dias, na forma de enxaguatório foi capaz de controlar o biofilme, porém quando aplicado somente uma vez ao dia, não foi efetivo. Por outro lado, a aplicação tópica diária de clorexidina 2% por 15 dias foi efetiva em inibir a formação de biofilme sobre os dentes. Dessa forma, concluíram que a completa inibição de biofilme e a prevenção da gengivite podem ser alcançadas com aplicações diárias de clorexidina.

A partir de então diversos estudos se propuseram a avaliar os efeitos da clorexidina sobre o biofilme dental. Yamaguchi et al.<sup>82</sup> avaliaram, em estudo *in situ*, a influência de enxaguatórios a base de digluconato de clorexidina na formação do biofilme sobre tiras celulose fixadas na lingual dos incisivos inferiores. Os autores observaram uma redução significativa na formação de biofilme nos indivíduos que fizeram o uso de enxaguatório com clorexidina quando comparado ao grupo placebo (água mentolada). No entanto, 2 h depois das aplicações, que aconteciam após as refeições no primeiro dia, e somente após o café da manhã no segundo dia, não houve nenhuma diferença significativa no acúmulo de biofilme. Essa diferença só foi

observada 4 h e 24 h depois das aplicações. Assim os pesquisadores confirmaram o efeito anti-biofilme da clorexidina.

Os esforços científicos passaram então, a se concentrar em determinar a concentração ideal de uso da clorexidina. Bay et al.<sup>83</sup>, em um estudo do tipo *cross over*, avaliaram se o uso do enxaguatório contendo digluconato de clorexidina nas concentrações 0,1% e 0,2%, duas vezes ao dia por 1 minuto após a escovação, seria capaz de melhorar a saúde bucal de crianças de 7 a 14 anos com deficiência mental. O período de *washout* entre as duas concentrações do enxaguatório foi de 8 semanas. A comparação entre o grupo tratado com o digluconato de clorexidina e o grupo tratado com o placebo (solução de cloridrato de quinina) foi realizada por meio das análises do Índice Gengival, Índice de Placa Bacteriana e de fotografias clínicas, todas realizadas 21 dias e 45 dias após o início do uso de cada enxaguatório. Foi evidenciado que ambas as concentrações foram eficazes, no entanto, alguns efeitos colaterais, como úlceras, dores na mucosa oral e manchas na língua e nos dentes, foram relatados pelos participantes da pesquisa, e foram associados ao longo período de uso.

Lang e Ramseier-Grossmann<sup>84</sup>, por sua vez, avaliaram em um estudo duplo cego, a capacidade de enxaguatórios a base de digluconato de clorexidina em diferentes concentrações (0,005%, 0,0033%, 0,001%, 0,01%, 0,02%, 0,05 % e 0,1%) em inibir a formação de biofilme e prevenir a inflamação gengival. Estes foram usados uma ou duas vezes ao dia, durante um período de 10 dias e sem nenhum procedimento mecânico de higiene bucal. Os resultados sugeriram o uso da solução de clorexidina a 0,02%, uma vez ao dia como a mínima concentração necessária para a inibição completa do biofilme.

Apesar das evidências do potencial de inibição da formação de biofilme pela clorexidina, os pesquisadores começaram a avaliar o seu efeito sobre biofilmes já estabelecidos. Muitos estudos observaram pouco ou nenhum efeito da clorexidina sobre biofilmes maduros<sup>85,86</sup>. Pratten et al.<sup>87</sup> demonstraram que gluconato de clorexidina 0,2% tem pouco efeito na viabilidade de biofilmes estabelecidos *in vitro* após tratamento duas vezes ao dia por quatro dias.

Já Zanatta et al.<sup>88</sup> realizaram um estudo clínico randomizado controlado, incluindo 20 indivíduos que se abstiveram de todos os métodos de controle mecânico de biofilme por 25 dias. No dia zero (baseline) foram avaliados o índice de placa de Quigley e Hein (IP), o índice gengival (IG) e o volume de fluido gengival crevicular

(FGC), foi feita profilaxia e os participantes foram orientados a interromper o controle de biofilme. No quarto dia do estudo, dois quadrantes, um superior e um inferior de cada indivíduo, foram escolhidos de forma aleatorizada e receberam profilaxia para remoção de biofilme, enquanto nos outros dois quadrantes, os dentes se mantiveram com superfícies cobertas por biofilme. Nesse mesmo dia, os indivíduos começaram a usar clorexidina 0,12% (CLX) como enxaguatório bucal, duas vezes ao dia, por 21 dias. Os índices IP, IG e o FGC foram novamente avaliados. O estudo concluiu que a CLX 0,12%, duas vezes ao dia, teve pouco efeito antibiofilme e antigingivite em superfícies previamente cobertas por biofilme. Esses resultados confirmam o menor efeito da clorexidina em biofilme estruturado e reforçam a necessidade de desorganização deste antes do uso do enxaguatório bucal contendo clorexidina.

Além da dificuldade de ação em biofilmes maduros, alguns estudos relatam efeitos colaterais relacionados ao uso prolongado da clorexidina. McCoy et al.<sup>17</sup> apontaram alguns efeitos adversos associados ao uso de CLX a 0,12% para tratamento periodontal de pacientes diabéticos (n= 140). Os indivíduos fizeram uso do enxaguatório bucal duas vezes ao dia por quatro meses. Dentre os 140 voluntários, 31,4% apresentaram efeitos adversos, sendo o mais comum a alteração de paladar (19,3%), seguido de manchas nos dentes e na língua (18,6%). Além disso, os participantes também relataram dor na língua e/ou garganta (7,1%). O estudo sugeriu suspensão do uso da clorexidina em caso de aparecimento desses efeitos, além de monitoramento constante e orientação para pacientes que fazem seu uso.

Uma revisão sistemática realizada por James et al.<sup>89</sup> evidenciou que o uso de enxaguatórios a base de clorexidina por quatro semanas ou mais, resultou em manchas nos dentes que necessitaram de tratamento profissional para sua remoção. Além disso, outros efeitos colaterais foram relatados, como aumento na formação de cálculo dentário, alteração do paladar e dano a mucosa oral temporários.

Sakaue et al.<sup>19</sup> avaliaram a formação de cálculo associada ao uso de clorexidina em um modelo de biofilme *in vitro*. Os biofilmes se desenvolveram por três dias e foram tratados com a solução de gluconato de clorexidina 0,12% por um minuto, duas vezes ao dia. Após incubação por mais dois dias em meio de cultura (Caldo BHI-*Brain-Heart Infusion*) contendo uma solução mineralizadora, foram avaliadas a quantidade de cálcio e de fosfato no biofilme. Os resultados apontaram um aumento na deposição de cálcio 5 vezes maior nos grupos tratados com clorexidina quando comparado com o grupo controle. Os níveis de fosfato também foram

significativamente mais elevados nos biofilmes tratados com gluconato de clorexidina do que no grupo controle. O estudo concluiu que o gluconato de clorexidina pode promover a incorporação de minerais no biofilme logo após seu uso. Por isso, é necessário desorganizar o biofilme antes do início do bochecho com gluconato de clorexidina, a fim de reduzir os efeitos colaterais associados.

Além dos efeitos colaterais, devido ao uso indiscriminado dessa substância, alguns estudos têm relatado resistência bacteriana a clorexidina. Saleem et al.<sup>18</sup> avaliaram a suscetibilidade do biofilme de cinco indivíduos à clorexidina e outros antibióticos. O estudo demonstrou, *in vitro*, a presença em biofilmes bucais, de bactérias resistentes a múltiplos medicamentos, incluindo a clorexidina. Também destacou a necessidade de aumentar a conscientização sobre a presença de bactérias resistentes no biofilme e ponderou sobre a possibilidade de o uso prolongado de produtos de higiene bucal antimicrobianos estar contribuindo para o desenvolvimento de resistência nessas bactérias.

Wang et al.<sup>90</sup> avaliaram os efeitos de novos monômeros antibacterianos na indução de resistência em oito espécies bacterianas cariogênicas, endodônticas e periodontopatogênicas (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *E. faecalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*). A concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada usando a CLX como controle. A concentração bactericida mínima, o crescimento bacteriano e a permeabilidade da membrana também foram avaliadas. Os monômeros antibacterianos induziram resistência apenas no *S. gordonii*, enquanto a CLX induziu resistência em quatro espécies (*Streptococcus gordonii*, *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, e *P. gingivalis*).

Diante dos efeitos colaterais já descritos, da incapacidade em controlar biofilmes maduros e da evidência de desenvolvimento de cepas resistentes à clorexidina, muitos estudos têm buscado novas propostas de agentes antimicrobianos com menores efeitos colaterais para controle do biofilme bucal.

### **3.3.2 Produtos naturais**

Produtos naturais são utilizados na medicina ao longo da história e são considerados a fonte mais promissora de fármacos potenciais para uso na saúde humana<sup>91</sup>. O termo "produtos naturais" é geralmente associado a metabólitos secundários produzidos por um organismo. Os metabólitos secundários de plantas e

fungos são amplamente utilizados, por possuírem diversos efeitos biológicos, como ação antimicrobiana, antioxidante e anticâncer<sup>92</sup>, além de apresentarem baixa toxicidade e serem economicamente viáveis<sup>93</sup>.

Diversas partes das plantas como frutos, folhas, caule, raízes, inflorescências e sementes, podem ser utilizadas para extração de compostos com diversos fins terapêuticos. Nucci et al.<sup>94</sup> avaliaram o efeito antinociceptivo do extrato de frutas de *Pterodon pubescens* em modelo animal no tratamento de dor crônica e constaram a redução de alodinia pós-operatória nos animais. Já Coelho et al.<sup>95</sup> observaram o mesmo efeito antinociceptivo, desta vez, por meio do tratamento com extrato e frações das sementes de *Pterodon pubescens*.

Brito et al.<sup>96</sup> observaram o efeito protetivo antiúlcera do extrato das raízes de *Croton campestris* em mucosa gástrica de ratos. Pré-tratamentos com o extrato foram realizados em regiões da mucosa gástrica dos ratos, em seguida, lesões ulcerativas foram induzidas na mucosa por diferentes agentes. O estudo evidenciou atividade antiulcerativa do extrato, semelhante a do omeprazol, fármaco com efeito protetivo reconhecido.

Sertié et al.<sup>97</sup> avaliaram o efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de *Cordia verbenacea*. Foi induzido edema na pata de ratos e o extrato foi aplicado topicamente. Após 8 h da aplicação do extrato, foi observado um efeito significativo de redução do edema, evidenciando que a folha dessa planta possui componentes com efeito anti-inflamatório.

Na odontologia, diversos compostos derivados de produtos naturais também têm sido estudados quanto aos seus efeitos biológicos de interesse para o controle de doenças bucais. Koo et al.<sup>98</sup> demonstraram o efeito anti-biofilme *in vitro* do extrato bruto do fruto de *Vaccinium macrocarpon* (*cranberry*, ou oxicoco no Brasil) sobre biofilme de *S. mutans*, por meio da redução de biomassa e da produção de polissacarídeos insolúveis. Já Brighenti et al.<sup>23</sup> e Brighenti et al.<sup>24</sup> demonstraram o potencial antimicrobiano de extratos de plantas provenientes do Pantanal contra micro-organismos de interesse médico-odontológico (*Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* e *Candida albicans*).

Antonio et al.<sup>99</sup> avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato dos grãos de *Coffea canephora* contra *S. mutans* e *S. sobrinus* e seu efeito na

desmineralização de dentes decíduos. A ação antimicrobiana contra as cepas foi avaliada por meio da Concentração Inibitória Mínima, sendo 7 mg/mL e 160 mg/mL para *S. mutans* e *S. sobrinus*, respectivamente. Para avaliação da desmineralização, o biofilme foi cultivado em fragmentos de primeiros molares decíduos a partir de um *pool* de saliva humana por 10 dias. Logo após o crescimento do biofilme, tratamentos de 1 minuto com o extrato de *C. canephora*, água Milli-Q e clorexidina 0,12%, foram realizados uma vez ao dia durante uma semana para posterior análise da microdureza. Os valores de microdureza do grupo tratado com o extrato, foram semelhantes ao grupo tratado com clorexidina, demonstrando alto potencial anticariogênico do extrato de *C. canephora*.

Antonio et al.<sup>100</sup> também avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato dos grãos de *Coffea canephora*, dessa vez contra biofilmes formados a partir de saliva humana. Os biofilmes cresceram em membranas sobre a superfície de ágar, e foram tratados por 30 minutos com extrato aquoso de café (20 mg/mL); extrato aquoso de café (20 mg/mL) com 10% de sacarose; clorexidina 0,05% (controle positivo); e água Milli-Q (controle negativo). Em seguida, os biofilmes foram suspensos em solução salina e cultivados em placas de BHI para contagem das células viáveis. Os resultados demonstraram uma redução na contagem de microrganismos em relação ao controle negativo, de 32,1% para a clorexidina, 12,4% e 15,2% para os extratos do grão de *C. canephora* com e sem adição de sacarose respectivamente, sugerindo que a concentração de sacarose no extrato pode influenciar a sua propriedade antimicrobiana.

Fani e Kohanteb<sup>101</sup> avaliaram o efeito do gel de *Aloe vera* na inibição de crescimento de *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides fragilis* isolados clinicamente, por meio dos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Tanto no teste de difusão em ágar, quanto na avaliação da CIM, o *S. mutans* foi o micro-organismo mais suscetível à *Aloe Vera*. Os valores de CIM do gel de *Aloe vera* para *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans*, *B. fragilis* e *P. gingivalis* foram 12,5, 25, 50, e 25 µg/ml, respectivamente. Dessa forma, o estudo sugere que a *Aloe vera*, em concentrações ótimas, pode ser usada em formulações farmacêuticas (cremes dentais ou enxaguantes bucais) para prevenção de doença periodontal e cárie dentária.

Khalid et al.<sup>102</sup> isolaram bactérias patogênicas de biofilmes de sete (07) voluntários e avaliaram o efeito antimicrobiano dos extratos de *Acacia arabica*, *Tamarix aphylla* L. e *Melia azadirachta* L. contra essas bactérias, por meio do método de difusão em ágar. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, tendo os extratos de *A. arabica* e *T. aphylla* apresentado as maiores zonas de inibição. Dessa forma, estes extratos foram escolhidos para o ensaio de inibição do biofilme, no qual as bactérias cresceram em placas de microtitulação pré-tratadas com os extratos (pré-tratamento) ou o tratamento foi feito após a formação do biofilme (pós-tratamento). Os resultados indicaram que quando foi feito o pré-tratamento, os extratos de *A. arabica* e de *T. aphylla* reduziram a formação de biofilme em, respectivamente, 73% 75%, quando comparados com o grupo controle. O pós-tratamento foi mais efetivo, eliminando até 85% do biofilme com apenas uma lavagem de 30 segundos, para o extrato de *A. arabica* e 78% para o de *T. aphylla*.

Uma revisão sistemática desenvolvida por Karygianni et al.<sup>103</sup> demonstrou uma forte interação entre terapias a base de produtos naturais e a redução de biofilmes multiespécie. Quatorze estudos que avaliaram o efeito antibiofilme de extratos e óleos essenciais de diferentes espécies de plantas contra biofilmes multiespécie foram selecionados. Os extratos de *V. vinifera*, *Pinus spp.*, *C. canephora*, *C. sinensis*, *V. macrocarpon*, *G. chinensis*, *C. ferrea* Martius e *P.estockianum*, se destacaram por demonstrarem eficácia na redução de biofilmes orais, quando testados *in vitro*, *ex vivo* e *in situ*. Dessa forma, a eficácia desses produtos desperta o interesse na introdução de fitoquímicos naturais no repertório terapêutico da odontologia.

### 3.3.2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são classificados como os metabólitos secundários voláteis que dão origem ao cheiro ou sabor característicos das plantas. São misturas muito complexas de compostos como terpenos, terpenóides e fenilpropanóides, podendo conter muitos outros compostos, como ácidos graxos, óxidos e derivados de enxofre<sup>104</sup>.

O uso de óleos essenciais na indústria farmacêutica é amplamente investigado, particularmente por sua ação como agentes anticâncer, antiviral e antimicrobianos<sup>105</sup>. Na área odontológica, alguns trabalhos têm investigado o potencial antimicrobiano

desses óleos contra micro-organismos relacionados ao desenvolvimento de doenças bucais.

Bersan et al.<sup>106</sup> avaliaram o efeito antimicrobiano de óleos essenciais derivados de vinte plantas contra diversos patógenos orais (*Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*) por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O estudo evidenciou que a maioria dos óleos essenciais apresentaram moderada a forte atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados (CIM com valores entre 0,007 mg/mL e 1,00 mg/mL). O óleo essencial de *Cyperus articulatus* se destacou na atividade antimicrobiana, e teve sua ação investigada no controle da formação de biofilmes. Esse óleo essencial inibiu 63,9% da formação de biofilme de *S. sanguis* quando comparado ao grupo controle. Os autores concluíram que os óleos essenciais são fontes promissoras como agentes antimicrobianos para doenças bucais.

Em uma revisão sistemática realizada por Freires et al.<sup>107</sup>, estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais contra bactérias cariogênicas foram reunidos a fim de evidenciar cientificamente o efeito dessas substâncias. Mais de 30 espécies de plantas possuem óleos essenciais com efeito antibacteriano contra bactérias em estado planctônico. Porém, para o controle da formação de biofilme, somente oito espécies foram estudadas e demonstraram redução significativa da formação de biofilme *in vitro*. Apenas três estudos clínicos randomizados foram encontrados, e avaliaram o efeito do óleo essencial de *L. sidoides* e uma formulação contendo óleo essencial de *M. alternifolia* e *L. scoparium* associados aos extratos de *C. officinalis* e *C. sinenses*, na redução do biofilme cariogênico, por meio da avaliação do índice de placa. Os resultados para o óleo essencial de *L. sidoides* foram bastante positivos, evidenciando seu efeito anti-biofilme *in vivo*.

Araújo et al.<sup>108</sup> realizaram uma meta-análise de estudos clínicos que avaliaram o efeito de enxaguatórios a base de óleos essenciais no controle de biofilme e sinais de gengivite. Vinte e nove estudos foram incluídos na análise, e demonstraram os benefícios do uso diário de enxaguatórios contendo óleos essenciais para redução de biofilme e gengivite *in vivo*. O estudo concluiu que a complementação da escovação com enxaguatório bucal diário é importante para promover uma higiene bucal mais eficaz, o que pode levar à prevenção da progressão da doença.

Tardugno et al.<sup>109</sup> avaliaram os óleos essenciais das plantas *Illicium verum*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllata*, *Leptospermum scoparium*, *Mentha arvensis*, *Mentha piperita*, *Myrtus communis*, *Salvia officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula intermedia*, *Thymus capitatus* e *Thymus vulgaris* quanto a sua atividade antimicrobiana contra as bactérias *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp. isoladas de pacientes. A análise foi feita por meio do teste de difusão em ágar e determinação da Concentração Inibitória Mínima. Os resultados obtidos demonstraram que os óleos essenciais de *E. caryophyllata*, *L. scoparium*, *R. officinales*, *T. capitatus* e *T. vulgaris* apresentaram melhor atividade antimicrobiana. Dessa forma foram selecionados para associação com o óleo essencial de *M. arvensis* e com a clorexidina. Algumas das combinações apresentaram efeito sinérgico entre os componentes dos óleos, o que potencializou o efeito antimicrobiano encontrado.

Daneshkazemi et al.<sup>110</sup> avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo essencial extraído das sementes e do óleo de goma resinosa de *Ferula Assa-Foetida* contra micro-organismos orais (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, and *Lactobacillus rhamnosus*), por meio do método de difusão em ágar. O estudo demonstrou que para todas as concentrações testadas (2,5, 5, 10, e 20 µg/ml), os dois óleos apresentaram atividade antimicrobiana significativa, comparável ao efeito exibido pela clorexidina.

### 3.3.2.2 Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

O *Cymbopogon citratus* (capim-limão) é um arbusto com caules de até dois metros de altura e folhas lineares de até um metro de comprimento e dois centímetros de largura. O capim-limão é nativo da Índia e da Indonésia e foi introduzido e cultivado na maioria das regiões tropicais, incluindo África (Argélia, Egito, Marrocos), América do Sul e Indochina. É uma planta amplamente utilizada no mundo devido aos efeitos terapêuticos dos constituintes de suas folhas<sup>25,111</sup>.

O óleo essencial dessa planta é um líquido transparente de cor amarelada ou laranja amarelada, com uma forte nota de limão, proveniente do citral, um dos principais componentes do óleo. Os componentes majoritários desse óleo são: geranial (50%), neral (40%), geraniol (7%), A-cariofileno (4%) e nerol (1%)<sup>111</sup>.

Devido as características aromáticas e a presença desses compostos no óleo essencial de *C. citratus*, a literatura descreve diversas utilidades para esse óleo como:

aromaterapia, conservante de alimentos, ação antidiabética, antimicrobiana, diurética, hipoglicêmica, hipotensiva, anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica, hematológica e neurofarmacológica. O componente responsável por grande parte dessas características do óleo é o citral (3,7- dimetil-2,6-octadienal) que consiste no isômero cis, geranial e o isômero trans, neral, componente majoritário do óleo<sup>112</sup>.

Boukhatem et al.<sup>113</sup> avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus in vitro* por meio do método de difusão em ágar, e a atividade anti-inflamatória *in vivo*. Dentre os achados do estudo, foi possível observar atividade antifúngica do óleo contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, e *Aspergillus niger*. Quanto aos resultados de atividade anti-inflamatória, os dados foram bastante promissores, com valores semelhantes ao diclofenaco de uso oral, substância de potencial anti-inflamatório altamente reconhecido pela literatura.

Oliveira et al.<sup>114</sup> avaliaram a suscetibilidade *in vitro* de cepas de *Staphylococcus* isoladas da pele de recém-nascidos ao óleo essencial de *C. citratus*, bem como a suscetibilidade *in vivo* do *S. aureus* em relação ao mesmo óleo. Os resultados obtidos indicam que as cepas isoladas no estudo *in vitro* eram sensíveis a ação do óleo essencial de *C. citratus* e o estudo *in vivo* demonstrou que o óleo *C. citratus* apresentou ação similar à vancomicina, antibiótico padrão para tratamento de pele em recém-nascidos.

Um estudo mais recente, desenvolvido por Sahal et al.<sup>115</sup> demonstrou o efeito antifúngico e de inibição de biofilme de *Candida tropicalis* exercido pelo óleo essencial de *C. citratus*. O óleo apresentou atividade antifúngica constatada por meio da análise da Concentração Inibitória Mínima, e determinou uma redução de 45% a 76% na formação de biofilme de diferentes cepas de *C. tropicalis*.

Na odontologia o óleo essencial de *C. citratus* também tem ganhado visibilidade devido seu potencial antimicrobiano. Estudos recentes demonstram a atividade antimicrobiana desse óleo essencial, apontando para o seu potencial na prevenção da cárie dentária<sup>27,116-118</sup>.

Khan et al.<sup>116</sup> avaliaram o efeito anti-biofilme dos óleos de *C. citratus* e *Syzygium aromaticum* contra biofilmes de *C. albicans* por meio do ensaio de redução da atividade metabólica, ensaio de morte e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os autores observaram que o óleo essencial de *C. citratus* apresentou um alto efeito de inibição do biofilme, além disso, os óleos foram considerados mais ativos quando comparados à anfotericina B e ao fluconazol. Foi possível observar por meio

da MEV que houve deformação estrutural do biofilme tratado com o óleo essencial de *C. citratus*, e as membranas celulares mostraram ser o principal alvo de ação dos constituintes deste óleo, o que pode explicar o seu mecanismo de ação antimicrobiana.

Perazzo et al.<sup>117</sup> analisaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus* contra cepas de referência de micro-organismos de reconhecida cariogenicidade (*S. mutans*, ATCC25175; *S. salivarius*, ATCC7073; e *S. oralis*, ATCC1055), pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC). Os resultados demonstraram melhor desempenho do *C. citratus* frente *S. mutans* (CIM=0,5626 mg/mL). Para *S. salivarius* e *S. oralis*, os resultados foram semelhantes (CIM=2,25 mg/ml). Portanto, todas as cepas foram sensíveis ao óleo nas concentrações de 0,0625%, 0,25%, e 0,625%, respectivamente.

Um estudo realizado por Ocheng et al.<sup>118</sup> avaliou o óleo essencial de diversas plantas características da medicina tradicional de Uganda, dentre elas o *C. citratus*, nas concentrações de 1%, 0,1% e 0,01%, quanto a sua capacidade de inibição de crescimento de algumas cepas de periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) e algumas cepas cariogênicas (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*). Os resultados demonstraram que a maioria dos óleos essenciais, inclusive o *C. citratus* nas concentrações de 1% e 0,1%, apresentaram efeito inibitório notável contra *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, além de um efeito inibitório moderado contra *S. mutans*. Baixa capacidade de inibição de crescimento foi observada em relação ao *L. acidophilus*.

Tofiño-Rivera et al.<sup>26</sup> avaliaram a capacidade dos óleos essenciais de *C. citratus* e *Lippia alba* em inibir o crescimento de biofilmes de *S. mutans*, bem como sua toxicidade sobre células eucarióticas (CHO). O estudo mostrou que o óleo de *L. alba* inibiu o crescimento do biofilme em 95,8%, na concentração de 0,01 mg/dL e o óleo de *C. citratus* inibiu o biofilme em 95,4%, nas concentrações de 0,1 mg/dL e 0,01 mg/dL e em 93,1% na concentração de 0,001 mg/dL. Além desse achado, o estudo demonstrou que os óleos essenciais nessas concentrações não apresentaram toxicidade às células CHO, num período de 24 horas.

Outro estudo recente, Oliveira et al.<sup>27</sup> avaliou os efeitos do óleo essencial de *C. citratus* e de seu componente majoritário, o citral, contra colonizadores iniciais e espécies relacionadas com a cárie (*A. naeslundii*, *L. acidophilus*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. sobrinus*). Foram determinadas a CIM e a CBM para

cepas de referência e para cepas clínicas e investigado o efeito do óleo essencial na adesão bacteriana e formação/desorganização do biofilme monoespécie e polimicrobiano. Para os testes em biofilme polimicrobiano, foi utilizada a saliva de um doador para formação de biofilme similar ao formado *in vivo*. Os biofilmes se formaram sobre espécimes confeccionados a partir de dentes humanos e foram expostos ao óleo em uma concentração dez vezes a sua CIM em regimes de curta duração (60 segundos) e longa duração (60 minutos). O efeito do citral sobre o biofilme pré-formado foi testado usando a mesma metodologia. Também foi avaliada a citotoxicidade do óleo em queratinócitos humanos pelo método do MTT. O citral reduziu significativamente o número de células viáveis no biofilme de estreptococos. O óleo apresentou efeito inibitório contra todos os micro-organismos estudados e reduziu significativamente o número de células viáveis nos biofilmes de lactobacilos e estreptococos, e inibiu a adesão do biofilme polimicrobiano relacionado com a cárie ao esmalte dentário, nos dois regimes de exposição, no entanto a exposição de longa duração obteve melhores resultados. Além disso, o óleo essencial mostrou baixa citotoxicidade aos queratinócitos humanos. Dessa forma, os autores sugeriram que a incorporação desse óleo em sistemas de liberação controlada, poderia ser uma estratégia eficaz para o controle da cárie dentária.

### **3.4 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos para Controle de Doenças Bucais**

O termo “sistema de liberação de fármacos” pode ser definido como um método de administração de uma substância com ação terapêutica, que foi desenvolvido com a finalidade de garantir que a substância atinja o local específico de ação, promovendo efeitos terapêuticos. Tal sistema não é farmacologicamente ativo, mas é capaz de melhorar a eficácia do agente terapêutico que ele incorpora<sup>119</sup>.

Várias formulações são comumente empregadas na odontologia para controlar a formação de biofilmes dentários como enxaguatórios, dentifrícios e pastilhas. No entanto, essas formulações possuem retenção limitada de fármacos e tendem a ser rapidamente diluídas ou removidas, o que pode alterar a eficácia dos princípios ativos presentes em sua composição<sup>120</sup>.

A tecnologia dos sistemas de liberação controlada para uso odontológico vem crescendo ao longo dos anos. As diversas vantagens da utilização desses sistemas

para carreamento de fármacos de interesse odontológico tem incentivado os estudos nessa área<sup>121</sup>. Um sistema de liberação ideal deve proteger o fármaco de degradação, permitir sua liberação em uma área específica de ação e promover a liberação de forma controlada, a fim de aumentar a sua biodisponibilidade no local de ação<sup>122</sup>.

Sistemas nanoestruturados de liberação como as microemulsões, sistemas líquido-cristalinos, nanopartículas poliméricas e carreadores lipídicos nanoestruturados são plataformas interessantes para liberação de fármacos na cavidade bucal. Dentre esses sistemas de liberação controlada, destacam-se os sistemas líquido-cristalinos, pois possuem a capacidade de proteger o princípio ativo da degradação e aumentar a permanência da formulação na cavidade bucal, possibilitando uma liberação controlada no local de ação<sup>29</sup>.

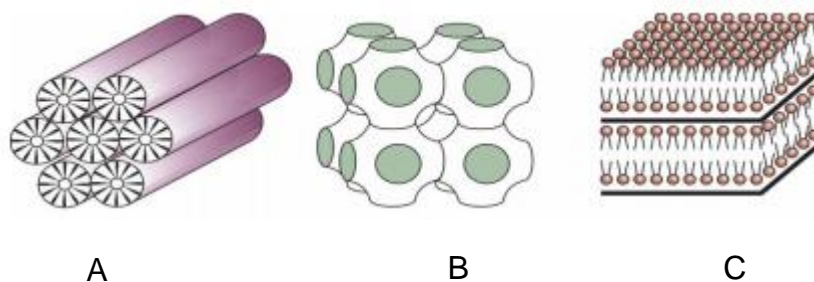
### **3.4.1 Sistemas líquido-cristalinos**

Os cristais líquidos (CLs) são descritos como um estado intermediário entre os estados sólido e líquido da matéria<sup>123</sup>. Dessa forma, os CLs exibem propriedades de fluxo como um líquido e, ao mesmo tempo, a organização característica de um sólido, ou seja, possuem ligações e rigidez próprias de um sólido, porém mantêm a mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos<sup>32</sup>.

Os CLs podem ser obtidos de duas formas, o que leva a duas categorias distintas: os termotrópicos e os liotrópicos. Os CLs termotrópicos são obtidos por meio da mudança de temperatura, esses são bastante conhecidos por estarem presentes nos monitores de computadores e telas de televisão. Já os liotrópicos são formados pela associação de compostos anfifílicos e um solvente isotrópico, geralmente a água, são mais estáveis e aplicáveis para liberação de fármacos<sup>32,123</sup>.

Os sistemas liotrópicos podem ser classificados de acordo com a sua estrutura. As fases lamelar, hexagonal e cúbica são as mais importantes e mais descritas para uso farmacêutico. Os sistemas lamelares são formados por camadas paralelas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma estrutura uni ou bidimensional. Os sistemas hexagonais são formados pela união de cilindros longos formando redes bi ou tridimensionais. E os sistemas cúbicos são estruturas mais complexas de simetria cúbica<sup>32,123</sup> (Figura 1).

**Figura 1** - Ilustração das principais fases de cristais líquido liotrópicos: (A) Hexagonal, (B) Cúbica e (C) Lamelar



Fonte: Souza<sup>124</sup>.

Dessa forma, as características vantajosas desses sistemas despertam o interesse para sua aplicação no controle de doenças bucais. Souza et al.<sup>125</sup> desenvolveram um sistema líquido cristalino mucoadesivo a base de monoleína e água para carreamento do antimicrobiano polihexanida para controle de infecções da cavidade bucal. O intuito do trabalho foi aumentar o tempo de permanência do fármaco no sítio de ação, pois a baixa retenção na mucosa diminuía a sua eficácia. Os resultados foram altamente promissores, uma vez que o sistema contendo o fármaco se mostrou bastante mucoadesivo e a atividade antimicrobiana *in vitro* do fármaco foi potencializada pelo sistema, indicando sinergia entre os dois.

Calixto<sup>126</sup> teve como objetivo desenvolver um sistema de liberação controlada de fármacos para controle da cárie dentária. Ao sistema foi incorporado o peptídeo p1025, com reconhecida atividade antimicrobiana. Em seguida, a formulação foi avaliada quanto a sua capacidade em interferir na formação de biofilmes de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita, usando um regime de aplicação por 1 min, 2 vezes ao dia durante 5 dias. A formulação desenvolvida apresentou características de um sistema líquido cristalino, com baixas taxas de liberação (em torno de 4,61% em 24 horas). Para a concentração de micro-organismos e de polissacarídeos extracelulares, não foi observada diferença significativa entre a formulação contendo o peptídeo e a formulação veículo. Dessa forma, foi sugerido um tempo maior de exposição dos biofilmes à formulação contendo o peptídeo, para atenuar os efeitos patogênicos causados pelo biofilme.

Calixto et al.<sup>120</sup>, avaliaram o efeito sobre a formação de biofilme de *S. mutans* da mesma formulação desenvolvida anteriormente, por meio da análise de biomassa. Em seguida, avaliaram sua citotoxicidade em células epiteliais *in vitro*. Os dados obtidos mostraram que o peptídeo p1025 incorporado ao sistema apresentou baixa

citotoxicidade (viabilidade celular de 70% ou superior) e reduziu efetivamente a biomassa do biofilme de *S. mutans*. Esses resultados sugerem que o peptídeo p1025 incorporado ao sistema mostra um efeito cumulativo, e representa uma alternativa promissora para a prevenção de biofilmes cariogênicos.

Jiang et al.<sup>127</sup> avaliaram a ação de um sistema líquido-cristalino contendo minociclina, um antibiótico da classe das tetraciclina, aplicado em bolsa periodontal para o tratamento da doença periodontal. O controle da doença foi feito *in vivo*, em ratos, por meio da avaliação do índice gengival, da profundidade de bolsa e perda óssea alveolar, por um período de quatro semanas de tratamento. Os resultados indicaram melhora significativa da saúde periodontal dos ratos, além de aplicabilidade do sistema para injeção na bolsa periodontal.

Toledo et al.<sup>128</sup> desenvolveram um sistema líquido-cristalino contendo nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para liberação controlada de extrato de própolis para o tratamento da doença periodontal. O sistema foi avaliado quanto a sua ação antimicrobiana contra diferentes espécies de *Candida*. Os resultados demonstram características reológicas que permitem a aplicação do sistema na bolsa periodontal. Além disso, o sistema apresentou atividade antifúngica para todas as espécies de *Candida* testadas, sendo esse efeito muito superior ao encontrado para o extrato de própolis livre.

### **3.4.2 Sistemas precursores de cristais líquidos**

A adição gradativa de água no sistema líquido-cristalino aumenta a sua estruturação, resultando em maior viscosidade da formulação. Sendo assim, sistemas precursores de cristais líquidos (SPCL) são sistemas geralmente microemulsionados que ao incorporarem líquido se tornam sistemas líquido-cristalinos mais estruturados. Esses consistem em uma estratégia interessante para administração bucal de fármacos, pois podem se apresentar mais fluidos, facilitando a administração da formulação em diferentes sítios. Ao entrar em contato com a cavidade bucal, os SPCL podem incorporar saliva, se tornando uma fase líquido-cristalina mais viscosa, promovendo liberação lenta e controlada dos fármacos incorporados<sup>32</sup>.

Mei et al.<sup>129</sup> desenvolveram um sistema precursor de cristal líquido contendo metronidazol para tratamento local da doença periodontal. Os ensaios *in vitro* demonstraram que o sistema obteve taxas de liberação controlada de metronidazol

ao longo de uma semana. Já nos ensaios *in vivo*, utilizando um modelo de periodontite em coelhos, o sistema foi capaz de manter concentrações do fármaco acima da Concentração Inibitória Mínima por mais de 10 dias, sem detecção deste no sangue dos animais, enquanto o metronidazol livre foi eficiente somente por 24h com níveis detectáveis no sangue dos animais a partir de 6 h. Logo, o sistema promoveu um tratamento efetivo da periodontite por um período de tempo prolongado, com redução dos efeitos colaterais.

Aida et al.<sup>33</sup> caracterizaram um sistema precursor de cristais líquidos e avaliaram sua citotoxicidade e ação contra biofilme de *S. mutans* quando foi incorporado o fragmento de peptídeo catiônico  $\beta$ -defensin-3 (D1-23). Os testes de microscopia de luz polarizada, reologia e bioadesão *in vitro* mostraram que tanto a viscosidade quanto a bioadesão do sistema aumentaram após a diluição com saliva artificial. O sistema contendo o peptídeo apresentou melhor atividade contra biofilme de *S. mutans* depois de 24 h quando comparado com 4 h de tratamento, mostrando um efeito cumulativo. Tanto o sistema como o sistema contendo o peptídeo não apresentaram toxicidade a células epiteliais humanas. Dessa forma, esse sistema se mostrou uma alternativa promissora para administração de peptídeos antimicrobianos na cavidade oral.

Fonseca-Santos<sup>31</sup> avaliaram um sistema precursor de cristais líquidos quanto ao seu potencial de carrear curcumina para o tratamento de candidíase oral. O sistema contendo curcumina apresentou propriedades mucoadesivas e reológicas favoráveis para administração bucal, além de ter demonstrado atividade antifúngica contra *C. albicans* de espécie padrão e de espécies obtidas de isolado bucal de pacientes com candidíase oral. Além disso, nenhuma das cepas apresentou resistência a seu uso, diferente do fluconazol, anti-fúngico amplamente utilizado. Dessa forma, o estudo conclui que o sistema potencializou o efeito da curcumina e foi considerado uma alternativa promissora para controle de candidíase oral.

Ainda não existem dados na literatura a respeito da incorporação da associação de clorexidina e óleos essenciais a esses sistemas. Diante da extensa literatura a respeito das propriedades antimicrobianas do óleo essencial de *C. citratus*, bem como da clorexidina, além da comprovada potencialização da ação dos fármacos quando incorporados a sistemas precursores de cristais líquidos, uma alternativa eficaz para controle de biofilmes orais pode estar baseada na incorporação destes componentes a esses sistemas.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Obtenção do Óleo Essencial e do Digluconato de Clorexidina

O presente estudo foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional associado – SisGen (Número do cadastro: A5E42CA) (Anexo A).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) foi adquirido na sua forma pura na empresa Quinari Aromaterapia Ltda. (Ponta Grossa, PR, Brasil - Lote: BSA). Essa empresa realiza o controle de qualidade do produto, garantindo a ausência de contaminantes. O óleo foi adquirido uma única vez, em volume suficiente para que o mesmo lote fosse utilizado em todas as análises, e armazenado em frasco de vidro âmbar a -20 °C. O digluconato de clorexidina a 20% foi adquirido na empresa Sigma-Aldrich Ltda. (São Paulo, SP, Brasil) e armazenado em frasco âmbar em geladeira (6 °C).

### 4.2 Obtenção do Inóculo Polimicrobiano de Saliva e Condições de Crescimento

Para os testes microbiológicos foi utilizado um inóculo polimicrobiano obtido a partir da saliva estimulada de um doador<sup>130</sup>. A coleta da saliva foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Anexo B; Parecer de Aprovação - CAEE: 97484718.1.0000.5416).

Para o crescimento do inóculo polimicrobiano, foi utilizado o meio de cultura idealizado por McBain<sup>131</sup> composto por mucina gástrica suína (2,5 g/L), peptona bacteriológica (2,0 g/L), triptona (2,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L), NaCl (0,35 g/L), KCl (0,2 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,2 g/L), cloridrato de cisteína (0,1 g/L), hemina (0,001 g/L) e vitamina K1 (0,0002 g/L), pH 7,0. O meio foi suplementado com 1% de sacarose.

### 4.3 Seleção do Doador de Saliva

O número de participantes para a fase de seleção do doador de saliva foi calculado utilizando o Programa *PS Power and Sample Size Calculation* versão 3.1.2, 2014, desenvolvido por Dupont e Plummer<sup>132</sup>. O presente estudo foi planejado

considerando um delineamento experimental de variáveis independentes com uma taxa grupo controle: grupo experimental de 1:1. Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados) demonstraram que a concentração de bactérias anaeróbias totais na saliva de participantes do estudo possuía distribuição normal com desvio padrão de  $5,9 \times 10^5$  UFC/mL e diferença entre eles de  $1,6 \times 10^6$  UFC/mL. Considerando um poder de 80% e o erro tipo 1 de 5%, o tamanho da amostra para seleção do doador de saliva deste estudo foi de seis indivíduos. Assim, a forma de amostragem adotada foi não probabilística, composta por seis indivíduos adultos jovens, homens ou mulheres.

Para inclusão no estudo, os participantes deveriam ter bom estado de saúde geral, não ter feito uso de antibióticos ou antifúngicos nos últimos seis meses<sup>133</sup> e abster-se do uso de bebidas alcoólicas 24 horas antes da coleta<sup>134</sup>. Não foram incluídos indivíduos com baixo fluxo salivar, fumantes, portadores de doenças sistêmicas ou que estivessem em terapia medicamentosa com fármacos que causam redução do fluxo salivar, como opióides, anti-histamínicos, antidepressivos, anti-epiléticos, ansiolíticos e anti-colinérgicos<sup>134</sup>, e usuários de aparelho ortodôntico.

Após leitura e esclarecimento das dúvidas sobre a sua participação na pesquisa, todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). A coleta da saliva foi realizada entre as 9 h e 10 h da manhã<sup>69</sup> com os indivíduos sem escovar os dentes por 24 h e em jejum por 2 h. A estimulação da saliva foi feita com a mastigação de parafina plástica sem sabor (Parafilm "M", American National Can, Chicago, USA). A coleta foi realizada em tubos Falcon estéreis, que foram mantidos em isopor com gelo por no máximo 1 hora. Inicialmente, os participantes faziam a coleta da saliva por um tempo pré-determinado de 5 minutos para o cálculo de fluxo salivar em mL/min, em seguida, continuaram a coleta até atingir cerca de 5 mL de saliva. Uma alíquota de 2 mL foi utilizada para medir o pH (pHmetro - Quimis, Diadema, SP, Brasil). O restante da saliva coletada foi usado para avaliar a concentração de micro-organismos, capacidade de formação de biofilme e sensibilidade à clorexidina.

#### **4.3.1 Avaliação da concentração de micro-organismos na saliva**

Uma alíquota de 200  $\mu$ L de saliva de cada participante foi usada para determinar a concentração inicial de micro-organismos. Foram quantificadas a

concentração de bactérias totais em ágar Wilkins-Chalgren<sup>131</sup>, de estreptococos do grupo mutans em ágar Mitis Salivarius suplementado com 15% de sacarose e 0,2 UI/mL de bacitracina (MSBS) como proposto por Gold et al.<sup>135</sup>, e de bactérias acidúricas em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) pH 4,7<sup>136</sup>. As placas contendo ágar Wilkins-Chalgren e ágar Mitis Salivarius foram incubadas em 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C por 48 h, enquanto as placas de BHI pH 4,7 foram incubadas nas mesmas condições, por 96 h. Para identificação das colônias de estreptococos do grupo mutans, foram consideradas colônias escuras, de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, convexas, com aspecto rugoso.

Para cada micro-organismo, a análise foi feita em triplicata. A contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi realizada com o auxílio de contador de colônias (Phoenix Luferco CP 600 Plus, Araraquara, SP, Brasil) e os resultados foram expressos em Log (UFC/mL). Foi calculado o intervalo de confiança dos dados dos 6 participantes e a saliva ideal para o experimento deveria apresentar valores médios de concentração de bactérias contidos nesse intervalo.

#### **4.3.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme da saliva**

A capacidade de formação de biofilme da saliva de cada participante foi avaliada por meio da análise da biomassa, realizada em triplicata. Lamínulas de vidro (Ø 13 mm) foram acopladas a placas de 24 poços contendo 0,4 mL da saliva coletada e 1,8 mL do meio de cultura McBain suplementado com 1% de sacarose, utilizando o modelo de aderência ativa, descrito por Exterkate et. al.<sup>137</sup> com modificações de Albuquerque et al.<sup>138</sup>. Nesse modelo, as lamínulas de vidro foram fixadas em um varal confeccionado em fio ortodôntico e posicionadas verticalmente nos poços da placa de cultura, sem tocar as paredes laterais e do fundo, evitando, assim, a formação de biofilme pela deposição dos micro-organismos devido a força da gravidade (APÊNDICE B). Após 24 h de crescimento dos biofilmes, as lamínulas foram removidas do meio de cultura, imersas em solução salina (NaCl 0,9%) por 10 minutos e, em seguida, os biofilmes foram fixados com etanol por 15 minutos. Após secarem à temperatura ambiente, as lamínulas foram imersas em solução de cristal violeta 1% por 5 minutos, lavadas em solução salina, secas em temperatura ambiente, e, finalmente, imersas em ácido acético 33% para dissolução do cristal violeta. O conteúdo dos poços foi transferido em triplicata (200 µL cada) para placas de 96 poços

e a absorvância foi lida a 570 nm. Com os dados obtidos dos seis participantes, foi calculado o intervalo de confiança, e a média da biomassa da saliva selecionada deveria obrigatoriamente estar contida nesse intervalo.

#### **4.3.3 Avaliação da sensibilidade da saliva à clorexidina**

Para esta avaliação foi utilizada a técnica de microdiluição baseada no *Clinical and Laboratory Standards Institute*<sup>139</sup>, com substituição do meio de cultura tradicional (caldo Mueller-Hinton) por caldo McBain. Em placas de 96 poços, o digluconato de clorexidina foi diluído seriadamente em caldo de McBain com a finalidade de obter concentrações entre 0,0006 µL/ml e 0,6 µL/ml. Como controle foi utilizado somente o caldo. Foram adicionados em cada poço 20 µL de saliva dos participantes.

As placas foram incubadas a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Então, o conteúdo dos poços foi submetido a uma subcultura em ágar Wilkins-Chalgren por 48 h a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> para avaliação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e da CBM (Concentração bactericida mínima). A CIM foi avaliada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento e a CBM como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento de micro-organismos. Os experimentos foram realizados em triplicata. Por motivos de interesse do estudo, a saliva do doador selecionado deveria ser sensível à clorexidina.

Dessa maneira, feita a seleção do doador de saliva, os demais experimentos foram realizados apenas com a saliva deste.

#### **4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Óleo Essencial e da Clorexidina**

A CIM e a CBM foram obtidas por meio da metodologia descrita no item 4.3.3, usando a saliva fresca do doador selecionado. Para a determinação da CIM e CBM do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OE), este foi diluído em Tween 80 (Synth, Diadema, SP) e caldo McBain na proporção 1:1:8 (v/v/v). Como controle negativo, foi utilizado água destilada, Tween 80, e caldo McBain na mesma proporção (1:1:8). A partir de então, diluições seriadas de razão dois foram obtidas de modo a serem testadas concentrações entre 0,1 µL/ml e 100 µL/ml (v/v) do óleo. Para os testes com digluconato de clorexidina (CLX), este foi diluído no próprio meio de cultura e foram

testadas concentrações entre 0,0006 µL/ml e 0,6 µL/ml (v/v). Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.5 Preparo do Sistema Precursor de Cristal líquido (SPCL) e Incorporação de Digluconato de Clorexidina e/ou do Óleo Essencial de *C. citratus***

O preparo do sistema foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Marlus Chorilli, do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. O sistema escolhido para incorporação das substâncias ativas foi desenvolvido por Calixto<sup>35</sup> e é composto por ácido oleico como fase oleosa (40%), álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl® AWS) como tensoativo (40%), e na fase aquosa (20%) foi utilizada dispersão de quitosana 0,5%.

##### **4.5.1 Preparação da dispersão de quitosana 5%**

Foram pesadas 5 gramas de quitosana, baixo peso molecular (50 - 190 kDa) (Sigma-Aldrich, USA) (QS) e suspensas em 95 gramas de solução de ácido acético 8,75% (m/m) com agitação mecânica a 150 rotações por minuto (rpm) por 24 horas<sup>35</sup>. O pH da dispersão foi ajustado para seis (pH=6) com a adição de NaOH 1M.

##### **4.5.2 Incorporação das substâncias ativas no sistema**

O óleo essencial foi adicionado à fase oleosa do SPCL em concentração equivalente a 10 x a sua CIM e o digluconato de clorexidina foi adicionado à fase aquosa em sua concentração de uso clínico (0,12%), de acordo com Brighenti et al.<sup>28</sup>

#### **4.6 Caracterização Físico-Química do Sistema Mucoadesivo Precursor de Cristal Líquido Contendo as Substâncias Ativas**

Para a caracterização do sistema nanoestruturado foram realizados testes de microscopia de luz polarizada, análises reológicas, avaliação *in vitro* da força mucoadesiva e análise de perfil de liberação.

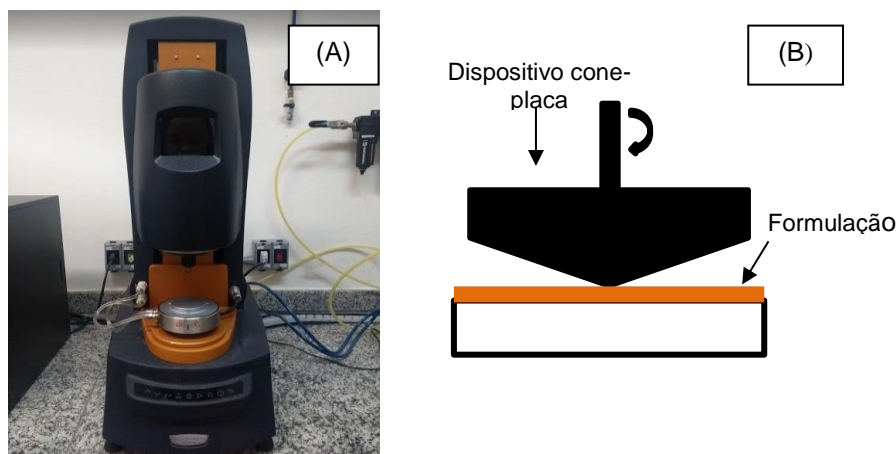
#### **4.6.1 Microscopia de luz polarizada**

O sistema antes e após a incorporação das substâncias ativas (CLX, OE e CLX+OE), foi analisado por microscópio de Luz Polarizada (Olympus BX41, Olympus, Japão). Uma alíquota de cada sistema foi colocada em uma lâmina de vidro, a qual foi coberta com uma lamínula e analisada no microscópio com um aumento de 10 vezes. A microscopia de luz polarizada permite a classificação dos sistemas de acordo com o desvio ou não de luz. Assim, quando ocorre o desvio da luz (anisotropia), formando diferentes estruturas (cruzes de malta ou estrias), sugere-se a formação de sistemas líquido-cristalinos lamelares e hexagonais respectivamente, e, quando sob plano de luz polarizada não ocorre o desvio de luz (isotropia), assumindo um aspecto de “campo escuro”, tem-se a formação de microemulsão (ME) ou sistema líquido-cristalino de fase cúbica<sup>35</sup>.

#### **4.6.2 Análises reológicas**

A reologia é uma análise muito utilizada na caracterização de sistemas de liberação e busca prever a deformação ou fluxo resultante da aplicação de um dado sistema de forças ao corpo<sup>140</sup>. Neste estudo, as propriedades reológicas do sistema foram avaliadas pelas análises reológicas de fluxo contínuo e oscilatório, realizadas com o auxílio do Reômetro AR 2000ex (TA Instruments, New Castle, Delaware, EUA), conforme apresentado na Figura 2.

**Figura 2 - Reologia de fluxo contínuo e oscilatório**



(A) Reômetro AR 2000ex (TA Instruments, New Castle, Delaware, EUA) utilizado para as análises. (B) Esquema de análise de reologia das formulações com dispositivo cone-placa.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.6.2.1 Análise reológica de fluxo contínuo

Para essa análise foi utilizado um dispositivo cone-placa de 40 mm e temperatura constante de 37° C. Para a realização do teste, 2 g da amostra foi depositada na placa inferior do aparelho, onde permaneceu em repouso por 5 minutos antes de cada determinação. A taxa de cisalhamento utilizada foi de 0 a 100 s<sup>-1</sup> para a curva ascendente e de 100 a 0 s<sup>-1</sup> para a curva descendente, durante 120 segundos cada. As análises foram realizadas em triplicata para cada formulação.

Os resultados da análise reológica contínua são expressos em um gráfico que correlaciona a tensão de cisalhamento (Pa) com a taxa de cisalhamento (1/s), que é a razão na qual uma partícula se desloca em relação à outra considerando a distância entre elas<sup>140</sup>. O gráfico é formado por duas curvas distintas, uma ascendente que demonstra o comportamento de fluxo do material quando se aumenta a taxa de cisalhamento, e uma descendente que indica o comportamento desse material quando se remove gradativamente a taxa de cisalhamento<sup>141</sup>.

Por meio da curva ascendente, é possível classificar o comportamento de fluxo em Newtoniano ou não Newtoniano, sendo o último classificado ainda como pseudoplástico, plástico ou dilatante. O fluxo Newtoniano é caracterizado pela linearidade entre taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento. O fluxo não Newtoniano plástico é caracterizado por apresentar a necessidade de uma força

prévia para iniciar o processo de tensão de cedência<sup>142</sup>. No fluxo pseudoplástico a tensão de cisalhamento aumenta menos com a taxa de cisalhamento e ocorre a diminuição da viscosidade do fluido com o aumento da taxa de cisalhamento. Já no fluxo dilatante a tensão de cisalhamento aumenta mais comparada à taxa de cisalhamento e ocorre o aumento da viscosidade do fluido com o aumento da taxa de cisalhamento<sup>33</sup>.

A partir da curva descendente, os materiais podem ser classificados como tixotrópicos ou reopéticos<sup>141</sup>. Materiais com comportamento de fluxo tixotrópico são caracterizados pela diminuição da viscosidade durante o aumento da taxa de cisalhamento, e aumento da viscosidade quando essa taxa é diminuída. Graficamente, a curva descendente pode se sobrepor à curva ascendente, mostrando que o material se recupera rapidamente (tixotrópico tempo independente), ou se posicionar abaixo da curva ascendente, formando uma área de histerese, que indica que a viscosidade do material aumenta de forma mais lenta (tixotrópico tempo dependente)<sup>33,35</sup>.

Os materiais com comportamento de fluxo reopético são caracterizados por demonstrarem aumento da viscosidade durante o cisalhamento, e quando esse cisalhamento diminui, o material recupera sua forma original, ou seja, de baixa viscosidade. Na curva de fluxo de um sistema com reopexia a curva descendente volta acima da curva ascendente, no sentido anti-horário da curva<sup>35</sup>.

A partir dos reogramas obtidos, foi utilizada a Equação (1) para calcular o valor de  $n$  (comportamento de fluxo) e  $K$  (índice de consistência) para caracterizar o comportamento e viscosidade do material<sup>126</sup>.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

Sendo:

$\tau$  = taxa de cisalhamento,

$K$  = índice de consistência,

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

$n$  = comportamento de fluxo.

Neste modelo,  $n < 1$  representa um fluido pseudoplástico,  $n > 1$  representa um fluido dilatante e  $n = 1$  representa um fluido Newtoniano<sup>33</sup>. Já a viscosidade dinâmica das formulações pode ser avaliada com o índice de consistência ( $K$ ) que aumenta com a viscosidade da formulação.

#### 4.6.2.2 Análise reológica de fluxo oscilatório

Tem como objetivo avaliar as propriedades viscoelásticas das formulações, ou seja, avaliar se a formulação tem tendência a ser mais viscosa ou mais elástica. Isso é avaliado por meio da aplicação de uma tensão de cisalhamento que varia como uma onda senoidal, e a relação entre ela e a deformação resultante oferece informações sobre a viscoelasticidade da formulação e implica diretamente na sua estabilidade<sup>35</sup>.

Na análise reológica oscilatória de frequência, primeiramente foi realizado um teste de varredura de tensão para determinação da região viscoelástica. Após a determinação da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, realizou-se o teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico ( $G'$ ) e módulo viscoso ( $G''$ ). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 10 Hz (1Hz = 6,28 rad/s), à tensão de 1 Pa<sup>126</sup>. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os dados de viscoelasticidade são obtidos pela análise dos módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ). O módulo elástico ( $G'$ ) é o módulo de armazenagem, representando tanto a energia armazenada durante a deformação quando a tensão aumenta, quanto a energia liberada quando a tensão é relaxada. Já o módulo viscoso  $G''$ , ou módulo de perda, não pode armazenar energia e a tensão aplicada se dissipa na forma de deformação irreversível. Altos valores para o módulo de armazenagem refletem em uma amostra predominantemente elástica e altamente estruturada ( $G' > G''$ ), enquanto, altos valores para o modo de perda indicam que a amostra é predominantemente viscosa ( $G'' > G'$ )<sup>31,35</sup>.

A fim de se estabelecer uma análise mais específica do comportamento das formulações foi determinado o valor de "r" a partir da regressão linear dos dados obtidos. Além disso, foi calculado o expoente viscoelástico (n) através da equação da lei da potência, que indica o nível de estruturação dos sistemas<sup>33,126</sup> (Equação 2).

$$G' = S \cdot \omega^n \quad (2)$$

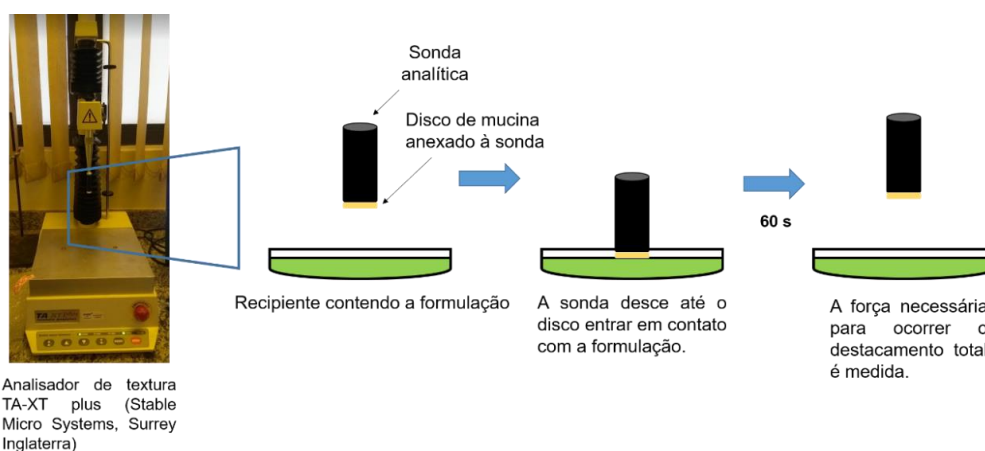
$G'$  = módulo de armazenamento;  
 $\omega$  = frequência oscilatória;  
 $S$  = resistência do gel;  
 $n$  = expoente viscoelástico.

Os parâmetros S e n são indicativos da densidade de reticulação no interior do sistema, quanto mais alto for o valor de S, mais reticulada e forte será a estrutura da formulação. No entanto, o valor de n diminui com o aumento da densidade de reticulação. Assim, valores de n altos indicam formulações com estruturas mais fracas, característica de microemulsões<sup>33</sup>.

#### 4.6.3 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

Para a avaliação da força mucoadesiva das formulações, primeiramente, foram confeccionados discos de mucina de diâmetro similar ao diâmetro da sonda analítica no analisador de textura (10 mm) e espessura igual a 2 mm<sup>143</sup>. Esses discos de mucina foram acoplados à parte inferior da sonda analítica do analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra). As formulações foram mantidas em pequenos recipientes de plástico sob a sonda à 37 °C. O teste foi iniciado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mm/s) até que os discos de mucina entrassem em contato com a amostra. O disco e a amostra foram mantidos em contato durante 60 segundos sem aplicação de força. Em seguida, a sonda subiu em velocidade constante (0,5 mm/s) até ocorrer o destacamento entre o disco de mucina e a amostra. A força máxima necessária para o destacamento entre os discos e as formulações foi medida em Newtons (mN). Os testes foram realizados em triplicata para cada formulação (Figura 3).

**Figura 3** - Esquema ilustrativo da análise de mucoadesão *in vitro*



Fonte: Elaboração própria.

#### 4.6.4 Análise do perfil de liberação *in vitro*

O estudo de liberação do óleo essencial de *C. citratus* e do digluconato de clorexidina incorporados nas formulações foi realizado no equipamento Microette Hanson (Teledyne Hanson, Califórnia, EUA) constituído por células de difusão de Franz. Foi utilizada membrana sintética Poliestersulfônica (PES) com poro de 0,47 $\mu$ m (Perfecta, São Paulo, Brasil) hidratada por 20 minutos na solução receptora tampão salino-fosfato com lauril sulfato de sódio PBS/LSS (1%) (0,7 g de fosfato de sódio dibásico, 0,6 g de fosfato de sódio monobásico e 1,0 g de lauril sulfato de sódio) pH 6,8,<sup>144</sup> a 37 °C e sob agitação de 300 rpm.

As amostras (2 g) foram colocadas sob anel dosador disposto no compartimento doador da célula de difusão de Franz. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas do compartimento receptor em tempos pré-determinados (1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 10 h, 14 h, 16 h, 20 h e 24 h). O óleo essencial e o digluconato de clorexidina liberados das amostras foram quantificados em espectrofotômetro com comprimento de onda de 230 nm e 265 nm, respectivamente. A concentração (%) das substâncias na solução receptora foi calculada com base nas curvas padrão confeccionadas para estas substâncias (Apêndices C e D). Em seguida, foram transformadas em porcentagem de liberação, considerando a quantidade incorporada na formulação como 100%.

#### 4.6.5 Efeito dos componentes da saliva artificial na estrutura do SPCL selecionado

Foram acrescentados 30% de saliva artificial em relação à massa inicial dos SPCLs, e esses foram caracterizados por microscopia de luz polarizada com o objetivo de avaliar se o aumento de líquido proporcionava a transição de sistema líquido para sistema viscoso, demonstrando a sua estruturação. Em seguida, foi realizada a análise de mucoadesão, a fim de avaliar a influência dessa estruturação sobre a propriedade mucoadesiva dos sistemas.

A composição da saliva artificial utilizada foi de 8 g/L de cloreto de sódio (NaCl), 0,19 g/L de fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 2,38 g/L de fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) com pH 6,8<sup>140</sup>.

#### 4.7 Avaliação da Ação do Sistema Precursor de Cristal Líquido sobre Biofilmes Polimicrobianos

Os grupos de estudo utilizados estão descritos no Quadro 1.

**Quadro 1** - Descrição dos grupos avaliados no estudo da ação do sistema mucoadesivo precursor de cristal líquido sobre biofilmes polimicrobianos

GRUPO	DESCRIÇÃO
CN	Controle negativo, no qual não foi aplicado nenhum tratamento aos biofilmes.
CLX	Tratamento dos biofilmes com o digluconato de clorexidina (0,12%) durante 1 minuto todos os dias do experimento.
OE	Tratamento dos biofilmes com o óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> 10 x CIM durante 1 minuto todos os dias do experimento.
CLX + OE	Tratamento dos biofilmes com o digluconato de clorexidina (0,12%) + óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> 10 x CIM durante 1 minuto todos os dias do experimento.
SPCL	Tratamento dos biofilmes com o sistema mucoadesivo sem as substâncias ativas, durante 5 minutos nos dias 1 e 3 do experimento.
SPCL + CLX	Tratamento dos biofilmes com o sistema mucoadesivo contendo o digluconato de clorexidina (0,12%) durante 5 minutos nos dias 1 e 3 do experimento.
SPCL + OE	Tratamento dos biofilmes com o sistema mucoadesivo contendo o óleo essencial de <i>C. citratus</i> 10 x CIM por 5 minutos nos dias 1 e 3 do experimento.
SPCL + CLX + OE	Tratamento dos biofilmes com o sistema mucoadesivo contendo a associação de digluconato de clorexidina (0,12%) e óleo essencial de <i>C. citratus</i> 10 x CIM por 5 minutos nos dias 1 e 3 do experimento.

Fonte: Elaboração própria.

O número de lamínulas utilizado para cada condição experimental foi calculado após estudo piloto segundo as recomendações de Cochran<sup>145</sup>. O cálculo amostral foi feito com auxílio do Programa PS Power and Sample Size Calculation versão 3.1.2, 2014, desenvolvido por Dupont e Plummer<sup>132</sup>. A análise foi planejada considerando um delineamento experimental de variáveis independentes com uma taxa grupo controle: grupo experimental de 1:1. Considerando um poder de 80% e o erro tipo 1 de 5%, foi determinado um tamanho amostral de quinze lamínulas por grupos (n=15) para avaliação da ação do sistema precursor de cristal líquido sobre biofilmes polimicrobianos. Portanto, o experimento foi realizado em 4 ocasiões diferentes, sendo três ocasiões com n=4 e uma ocasião com n=3.

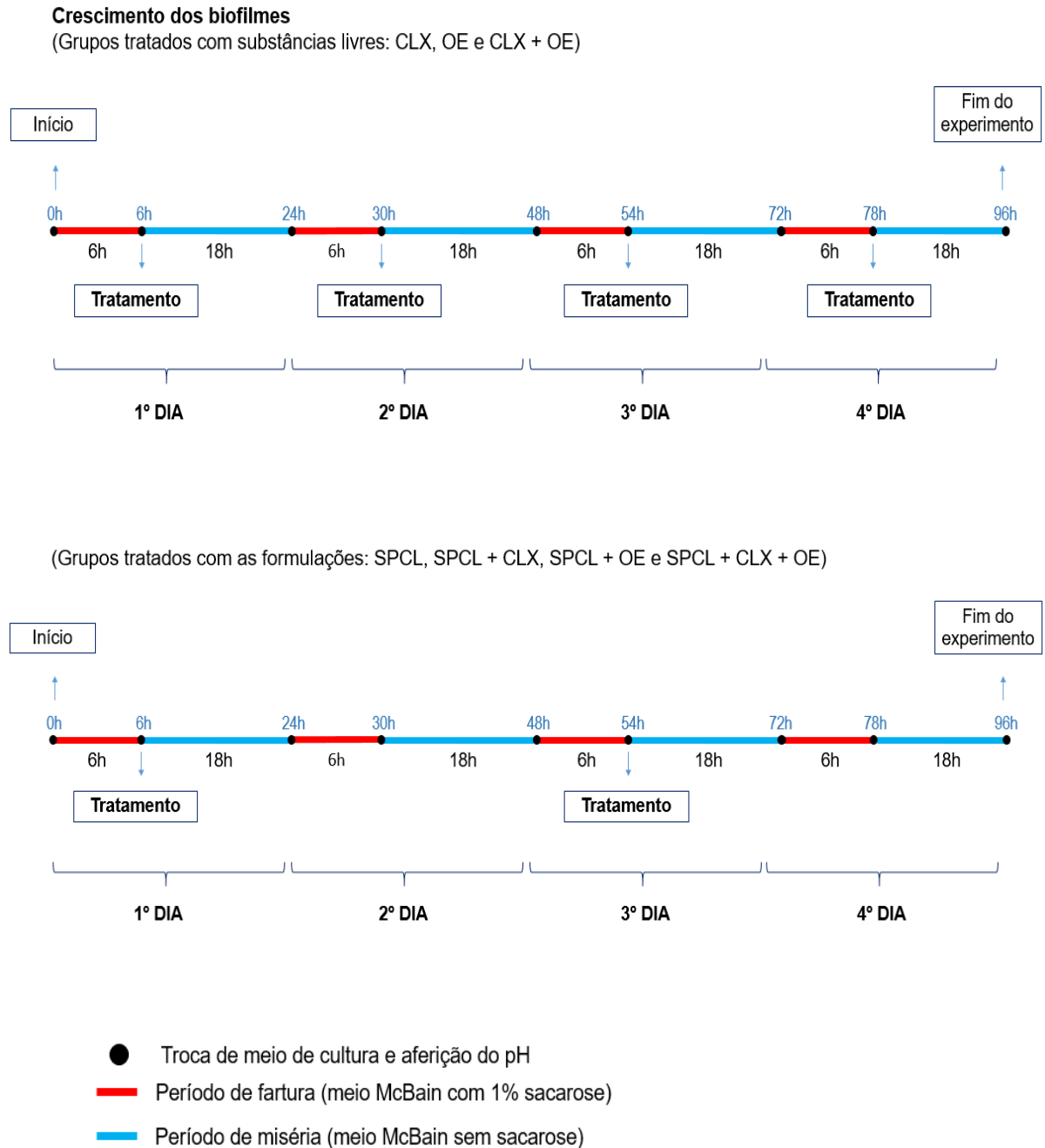
#### 4.7.1 Composição microbiana e acidogenicidade do biofilme

O experimento seguiu o modelo de fatura e miséria proposto por van de Sande et al.<sup>133</sup> e o modelo de aderência ativa descrita por Exterkate et. al.<sup>137</sup>, com modificações de Albuquerque et al.<sup>138</sup>. (Apêndice D) No primeiro dia, varais confeccionados com fio ortodôntico nos quais foram fixadas lamínulas estéreis, foram posicionados de forma que as lamínulas ficassem submersas nos poços de placas de 24 poços contendo 1,8 mL de caldo McBain com sacarose 1%<sup>131</sup> e um volume de 400 µL da saliva do doador selecionado, sem tocar as paredes e o fundo do poço. As placas foram incubadas a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub> durante 6 horas. Depois desse período, as placas foram retiradas da estufa, e as lamínulas transferidas para uma placa contendo 2 mL de solução salina estéril por 10 segundos e, posteriormente, foram tratadas conforme descrito no Quadro 1.

Após os tratamentos as lamínulas foram lavadas (10 s) em placas de 24 poços contendo 2 mL de solução salina estéril. A seguir, foram transferidas para placas de 24 poços contendo caldo McBain sem sacarose e incubadas em estufa, nas mesmas condições realizadas anteriormente, durante um período de 18 horas. Esses procedimentos foram realizados por um período de quatro dias.

O tratamento das lamínulas foi feito de acordo com os diferentes grupos de estudo. No grupo CN não foi feito nenhum tratamento, e foram feitas apenas as trocas do meio. Nos grupos CLX, OE e CLX + OE, os tratamentos foram realizados diariamente após o período de fatura. Nos grupos cujo tratamento consistia nas formulações, os tratamentos foram realizados nos dias 1 e 3 do experimento, uma única vez ao dia (Figura 4).

**Figura 4** – Esquema de crescimento dos biofilmes sob os diferentes regimes de tratamento



Fonte: Elaboração própria.

No final do quarto dia de crescimento dos biofilmes, para todos os grupos, as placas de 24 poços foram removidas da estufa, as lamínulas com os biofilmes formados foram desprendidas dos “varais” com o auxílio de uma pinça clínica estéril e transferidas para tubos de vidro contendo 2 mL de solução salina estéril. A seguir, foram agitadas em vórtex (Phoenix Lufarco, São Paulo, Brasil), levadas em cuba

ultrassônica (Cristófoli, Paraná, Brasil) durante 1 minuto e 30 segundos e novamente agitadas em vórtex para obter uma suspensão com os micro-organismos do biofilme.

Após esse procedimento, alíquotas de 200 µL dessa suspensão foram transferidas para microtubos estéreis e foi realizada a diluição seriada das amostras na razão 1/10 até  $10^{-6}$ . Alíquotas de 15 µL foram semeadas (em triplicata) em placas de ágar Wilkins-Chalgren, ágar Mitis Salivarius suplementado com 15% de sacarose e 0,2 UI/mL bacitracina (MSBS) e BHI pH 4,7. Finalizado esse procedimento, as placas de ágar contendo as amostras foram incubadas por 48 horas para ágar Wilkins-Chalgren e MSBS e por 96 horas para ágar BHI pH 4,7, em 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Posteriormente, foi feita a contagem das colônias com o auxílio de um contador de colônias (Phoenix Luferto CP 600 Plus, Araraquara, SP, Brasil) e realizado o cálculo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

Durante o experimento, a acidogenicidade dos biofilmes foi aferida pela leitura do pH no meio de cultura antigo, utilizando um pHmetro (Quimis, Diadema, SP, Brasil) devidamente calibrado com soluções padrão de pH 7,00 e 4,00. A variação no pH ( $\Delta$ pH) para cada tratamento em cada dia analisado foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:  $\Delta$ pH = pH<sub>meio sem sacarose</sub> – pH<sub>meio com sacarose</sub>. Além disso, os dados de pH foram avaliados por meio da determinação da área total sob as curvas determinadas pelos valores pH no meio sem sacarose e com sacarose durante todo o período do experimento.

#### **4.7.2 Dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água**

A suspensão de biofilme de cada lamínula, já retirados os 200 µL para a contagem bacteriana, foi centrifugada (4.500 xg, 15 minutos, 4 °C) (Centrífuga 5804R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O pellet foi lavado com água milli-Q, homogeneizado em vortex e centrifugado três vezes (4.500 xg, 15 minutos, 4 °C), para obtenção de um precipitado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco por 2 horas e meia em um concentrador de amostras (Modelo RVC 2-18C D, Maruin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) e pesado em balança de alta precisão (Balança de alta precisão AUX320 - Shimadzu, Kyoto, Japão) para se obter o peso seco do biofilme.

Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado adicionando-se, em cada tubo, 300 µL de NaOH 1M por mg de peso seco. O conteúdo foi cuidadosamente

homogeneizado em vortex por 1 min e incubado a 37°C por 10 min em incubadora orbital. As amostras foram novamente homogeneizadas em vortex por 1 min, incubadas por 30 min em incubadora orbital, e, agitadas no vórtex por mais 1 min. Em seguida, permaneceram na incubadora por 2 horas e foram centrifugadas a 20.817 *xg* por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL. Todo o procedimento de extração dos polissacarídeos insolúveis em água foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, no tubo Falcon contendo todo sobrenadante armazenado após as três extrações, foi adicionado etanol 95% em volume correspondente a 3 vezes o volume do NaOH usado, foi realizada homogeneização em vórtex e o tubo foi armazenado em freezer -20°C por no mínimo 18 horas para precipitação dos polissacarídeos extracelulares insolúveis em água.

Posteriormente, os tubos Falcon foram novamente agitados no vórtex e centrifugados a 4.300 *xg* por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em etanol 70%, agitado em vortex e centrifugado (4.300 *xg* por 20 min a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido por mais duas vezes. Os tubos contendo o precipitado, foram deixados abertos em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora, para a completa evaporação do etanol. Em seguida, o precipitado foi ressuspense com NaOH 1 N (300 µL por peso seco) e congelado em freezer a -80 °C até a realização do ensaio colorimétrico pelo método fenol-sulfúrico de Dubois et al.<sup>146</sup>, para quantificação dos polissacarídeos insolúveis.

Primeiramente foi preparada a solução de fenol 5%. Curvas padrão de glicose (0, 0,75, 1,25, 2,5, 5,0, 10, 15, 20 e 25 µg) foram realizadas em duplicata, utilizando água milli-Q, glicose 0,001% e NaOH 1N em tubos de vidro (somatória dos volumes igual a 200 µL) (Apêndice E). Uma alíquota de 200 µL de fenol (50 g/L, Synth, Diadema, São Paulo, SP, Brasil) e 1 mL de ácido sulfúrico (95-97%, Qhemis, Indaiatuba, SP, Brasil) foram adicionados em cada tubo de vidro. A leitura da densidade ótica foi feita com auxílio de espectrofotômetro (DO 490 nm), 20 minutos após a adição de ácido sulfúrico no primeiro tubo (tempo necessário para a finalização da reação bioquímica). O processamento das amostras foi realizado, quando os dados da curva padrão apresentaram inclinação: 0,048- 0,051 e R<sup>2</sup> próximo de 1.

As análises das amostras foram realizadas usando tubos de vidro contendo 200 µL da amostra, sendo o fenol e o ácido sulfúrico adicionados semelhantemente ao processo de obtenção da curva padrão. As leituras da densidade ótica (DO 490

nm) foram realizadas em triplicata e os valores de absorvância para cada amostra foram obtidos pela média das três leituras e convertidos em concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis, utilizando a equação da reta gerada na curva padrão realizada.

#### 4.8 Análise de Resultados

Os dados da seleção do doador de saliva dos testes de CIM e CBM do óleo essencial de *C. citratus* e digluconato de clorexidina, e as análises de reologia e liberação *in vitro* foram analisados descritivamente com auxílio do programa Microsoft Excel 2013 (Microsoft ®). Os demais dados foram avaliados por meio de testes estatísticos efetuados pelo software *PASW Statistics* (v.22, SPSS Inc, Chicago, IL - EUA). O nível de significância adotado foi de 5%.

Os resultados do teste de mucoadesão foram avaliados pelo teste Mann-Whitney por não apresentarem distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk;  $p \leq 0,0001$ ).

Os dados de contagem de micro-organismos do biofilme foram transformados em logaritmo na base 10 e, como nenhum dos grupos bacterianos respeitou os pré-requisitos de normalidade (Shapiro-Wilk;  $p \leq 0,05$ ) e homogeneidade de variâncias (Levene;  $p \leq 0,003$ ), optou-se pela aplicação do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis complementado pelo pós-teste de Dunn.

Para a análise do pH do meio foi calculada a área total sob a curva e o  $\Delta$ pH. Para área total sob a curva foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn, porque os grupos SPCL+CLX e SPCL+OE não apresentaram distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk;  $p \leq 0,012$ ), e não houve homogeneidade de variâncias (Levene;  $p \leq 0,0001$ ). Para o  $\Delta$ pH, os dados da maioria dos grupos apresentaram distribuição normal em todos os períodos ( $p \geq 0,056$ ). Sendo assim, foi considerada uma tendência a normalidade e aplicado o teste de ANOVA a um fator, complementado pelo pós-teste de Tukey para os dias 1 e 2 cujos dados apresentaram homogeneidade de variâncias (Levene;  $p \geq 0,304$ ). Para os dias 3 e 4, não foi observada homogeneidade de variâncias (Levene;  $p \leq 0,001$ ), portanto foi aplicado o teste de ANOVA a um fator com correção de Welch, seguida pelo pós-teste de Games-Howell.

Para o peso seco dos biofilmes, devido à ausência de normalidade dos dados (Shapiro-Wilk;  $p \leq 0,011$ ) foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Já para a dosagem de polissacarídeos extracelulares (PEC) insolúveis em água, uma vez que os dados foram considerados normais (Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,190$ ) e não houve homogeneidade de variâncias (Levene;  $p = 0,016$ ), foi utilizado o teste ANOVA com correção de Welch seguida pelo pós-teste de Games-Howell.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Seleção do Doador de Saliva

A Tabela 1 apresenta os resultados dos parâmetros avaliados para a saliva de cada participante.

**Tabela 1** - Avaliação da concentração bacteriana (Log 1+UFC/mL) da saliva, sensibilidade a clorexidina (CIM e CBM; %), capacidade de formação de biofilme (biomassa;  $A_{570nm}$ ), fluxo salivar (mL/min) e pH da saliva para seleção do doador de saliva para o experimento

Voluntário		Log 1 + UFC/mL [média (dp)]	CIM/ CBM (%)	Biomassa [média (dp)]	Fluxo Salivar (mL/min)	pH
1	Bac Tot	6,41 (0,07)	0,060/0,120	1,07 (0,1611)	0,6	7,53
	EGM	5,23 (0,07)				
	Bac Acd	5,60 (0,04)				
2	Bac Tot	7,55 (0,03)	0,008/0,008	1,30 (0,0601)	0,9	7,30
	EGM	5,50 (0,02)				
	Bac Acd	7,45 (0,21)				
3	Bac Tot	10,40 (0,03)	0,030/0,030	1,23 (0,1055)	2,0	7,33
	EGM	8,27 (0,03)				
	Bac Acd	10,22 (0,06)				
4	Bac Tot	7,17 (0,08)	0,030/0,030	1,44 (0,0478)	2,8	7,46
	EGM	3,54 (0,11)				
	Bac Acd	4,33 (0,25)				
5	Bac Tot	6,61 (0,04)	0,004/0,008	1,63 (0,6594)	0,7	7,47
	EGM	4,75 (0,15)				
	Bac Acd	5,54 (0,05)				
6	Bac Tot	7,57 (0,07)	0,004/0,060	1,44 (0,5459)	0,5	6,72
	EGM	4,22 (0,03)				
	Bac Acd	6,72 (0,06)				
Int. de confiança	Bac Tot	6,56 - 8,67	N/A	1,21-1,49	N/A	N/A
	EGM	4,05 - 6,65				
	Bac Acd	5,14 - 8,14				

Bac Tot (Bactérias Totais); EGM (Estreptococcus do grupo mutans); Bac Acd (Bactérias acidúricas); N/A (Não analisado); CIM (concentração inibitória mínima); CBM (concentração bactericida mínima).

Fonte: Elaboração própria.

Todos os participantes apresentaram saliva sensível a clorexidina, pH salivar com valores próximos da neutralidade, e fluxo salivar dentro da normalidade. Os participantes 3 e 4 apresentaram os valores de concentração microbiana fora do

intervalo de confiança, e os participantes 1 e 5 não apresentaram valores de biomassa no intervalo de confiança calculado. Por esses motivos os participantes 1, 3, 4 e 5 foram eliminados. A saliva dos participantes 2 e 6 obedeceu a todos os critérios de inclusão estabelecidos, contudo o participante 6 não apresentou disponibilidade para doação de saliva em todos os momentos do estudo, ficando o participante 2 selecionado como doador de saliva para dar continuidade aos experimentos.

## 5.2 Obtenção da CIM e CBM do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* e Digluconato de Clorexidina

Tanto o óleo essencial quanto a clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana contra o biofilme polimicrobiano produzido a partir da saliva do doador selecionado. A Tabela 2 apresenta os valores de CIM e CBM para o óleo de *C. citratus* e para o digluconato de clorexidina.

**Tabela 2** - Valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e do digluconato de clorexidina (%) para inóculo polimicrobiano

	CIM (%)	CBM (%)
Óleo essencial <i>C. citratus</i>	0,078	0,156
Digluconato de clorexidina	0,008	0,008

Fonte: Elaboração própria.

Assim, como inicialmente foi determinado que a concentração de óleo essencial a ser incorporada no sistema seria 10 vezes a CIM, neste estudo, foi incorporado 0,78% ou 7,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de óleo essencial. Quanto ao digluconato de clorexidina, foi incorporado na concentração de uso clínico, 0,12% (1,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), que equivaleu a 15 vezes a CIM encontrada neste estudo (Quadro 2).

**Quadro 2** - Sistema precursor de cristal líquido após definida a quantidade ( $\mu\text{L}/\text{mL}$  e %) de óleo essencial de *C. citratus* a ser incorporada, de acordo com a Concentração Inibitória Mínima

Formulação	Componentes
SPCL	Formulação sem substâncias ativas.
SPCL + OE	Formulação com óleo essencial de <i>C. citratus</i> 10 x CIM (7,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ou 0,78%)
SPCL + CLX	Formulação com digluconato de clorexidina (1,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ou 0,12%) 15 x CIM
SPCL + CLX + OE	Formulação com óleo essencial de <i>C. citratus</i> 10 x CIM (7,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ou 0,78%) e digluconato de clorexidina (1,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ou 0,12%) 15 x CIM

Fonte: Elaboração própria.

### 5.3 Caracterização Físico-Química do Sistema Mucoadesivo Precursor de Cristal Líquido Contendo as Substâncias Ativas

#### 5.3.1 Microscopia de luz polarizada

Na Figura 5 estão dispostas as fotomicrografias obtidas por microscópio de luz polarizada (MLP) das formulações SPCL e SPCL30 (formulação com adição de 30% de saliva artificial em relação à massa inicial).

**Figura 5** – Transição de fase do sistema. Aspecto macroscópico e microscópico das Formulações SPCL (A) e SPCL30 (B). Fotomicrografias em microscópio de luz polarizada, aumento de 10x

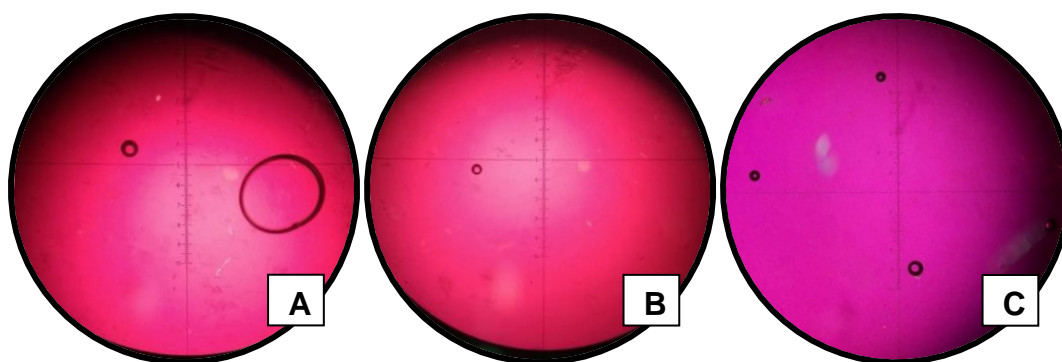


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A Formulação SPCL mostrou um comportamento isotrópico, pois sob plano de luz polarizada não desviou luz, apresentando o aspecto de “campo escuro”. Isso sugere a formação de uma microemulsão<sup>147</sup>, compatível com seu aspecto mais fluído. Já na formulação SPCL30 ocorreu a formação de estruturas estriadas características de mesofase líquido cristalina hexagonal, sugerindo o aumento da organização estrutural do sistema. Portanto, esses resultados confirmam que a formulação escolhida (SPCL) se comporta como sistema precursor de cristais líquidos, pois, quando foi adicionado um líquido (saliva artificial), ocorreu a formação de um sistema líquido-cristalino.

A Figura 6 apresenta as fotomicrografias das Formulações SPCL após a incorporação do óleo essencial de *C. citratus* e do digluconato de clorexidina.

**Figura 6** - Fotomicrografias das formulações após incorporação do óleo essencial de *C. citratus* e do digluconato de clorexidina. (A) SPCL + CLX; (B) SPCL + OE; (C) SPCL + CLX + OE. Microscópio de luz polarizada, aumento de 10x

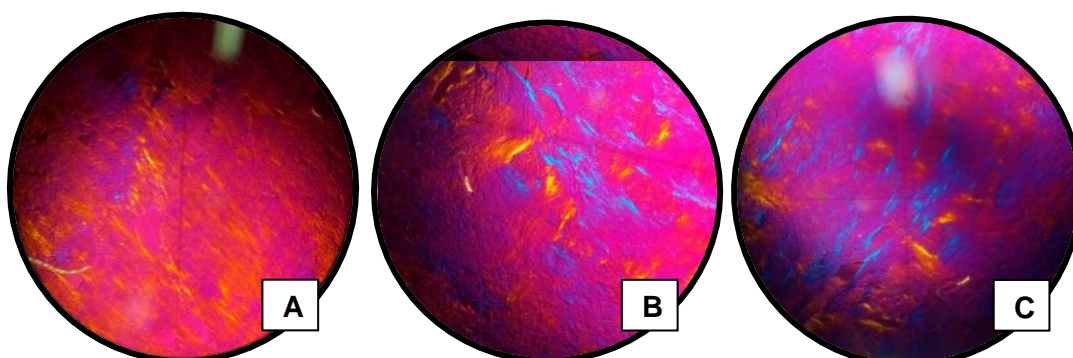


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

De acordo com a Figura 6, todas as formulações, após a incorporação do óleo essencial de *C. citratus* e do digluconato de clorexidina, nas concentrações apresentadas no Quadro 2, mantiveram o comportamento isotrópico, evidenciando que as substâncias incorporadas não alteraram o comportamento do sistema.

A Figura 7 demonstra a influência da adição de 30% de saliva artificial ao sistema contendo as substâncias ativas.

**Figura 7** - Fotomicrografias das formulações com as substâncias ativas incorporadas, com a adição de 30% de saliva artificial. (A) SPCL30 + CLX; (B) SPCL30 + OE; (C) SPCL30 + CLX + OE. Microscópio de luz polarizada, aumento de 10x



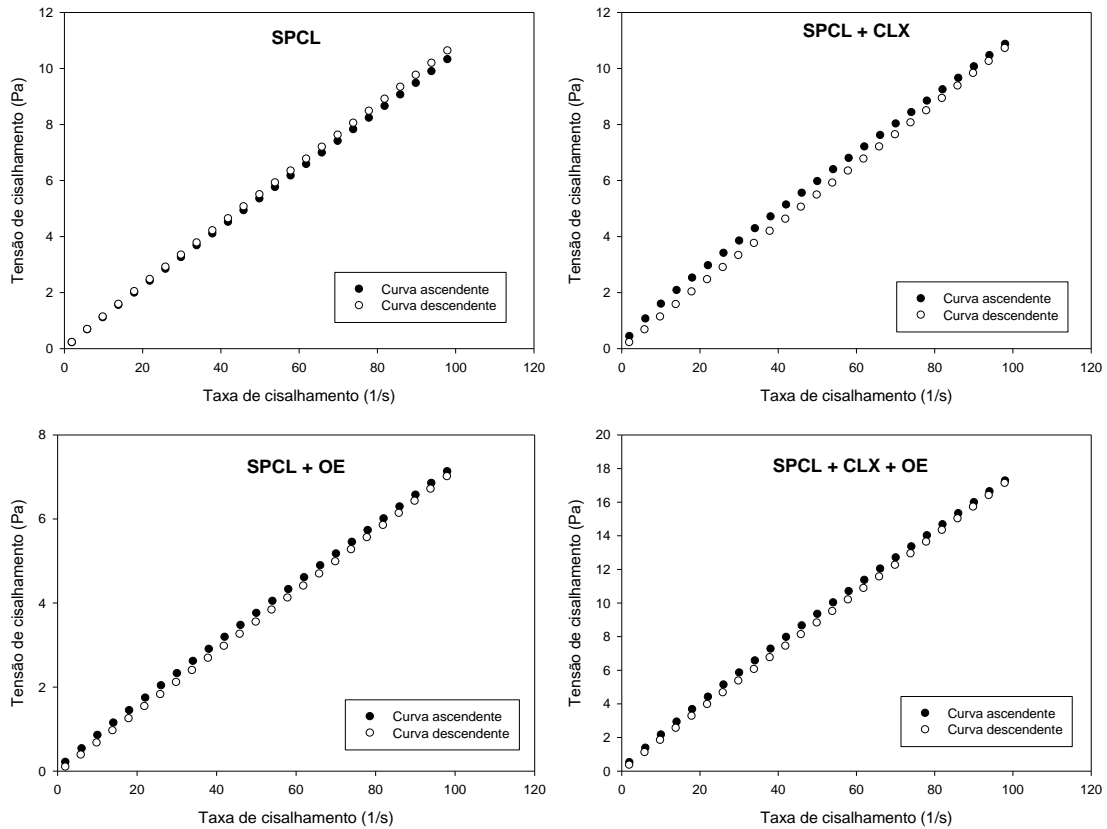
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

De acordo com a Figura 7, as três formulações transicionaram de uma fase menos estruturada (microemulsão), para uma fase mais estruturada (mesofase líquido cristalina hexagonal), isso é demonstrado pela mudança do aspecto “campo escuro” para o aspecto “estriado”. Dessa forma, a incorporação das substâncias ativas ao SPCL não alterou a sua propriedade de transição de fases em contato com um líquido.

### 5.3.2 Análise reológica de fluxo contínuo

A Figura 8 mostra os reogramas obtidos na análise das formulações do sistema precursor de cristal líquido usadas neste estudo, e a Tabela 3 mostra os valores de comportamento de fluxo ( $n$ ) e índice de consistência ( $K$ ).

**Figura 8** - Reogramas das formulações SPCL; SPCL + CLX; SPCL + OE e SPCL + CLX + OE. Símbolos cheios representam a curva ascendente e símbolos vazios representam a curva descendente



Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 3** - Média e desvios padrões dos valores de Comportamento de fluxo ( $n$ ) e Índice de consistência ( $K$ ) das formulações

Formulação	$n$	$K$
SPCL	$0,9719 \pm 0,0009$	$0,1195 \pm 0,0005$
SPCL + CLX	$0,8719 \pm 0,0042$	$0,1980 \pm 0,0036$
SPCL + OE	$0,9469 \pm 0,0016$	$0,0925 \pm 0,0006$
SPCL + CLX + OE	$0,9162 \pm 0,0002$	$0,2585 \pm 0,0003$

Fonte: Elaboração própria.

Todas as formulações testadas apresentaram características de fluidos não-newtonianos, pseudoplásticos de acordo com as características dos gráficos (Figura 8) e o valor de  $n$  apresentado na Tabela 3. Nos reogramas é possível observar relação não-linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento (característica de

um fluxo não-Newtoniano), porém com forte tendência a linearidade. Somado as características dos reogramas, na Tabela 3 observa-se que todos os valores de comportamento de fluxo ( $n$ ) foram menores que 1, confirmando que todas as formulações testadas apresentaram características de fluídos não - newtonianos, pseudoplásticos. Outro fator importante a ser destacado é que na presença da CLX (SPCL+CLX e SPCL+OE+CLX) os valores de  $n$  foram ainda menores, demonstrando que a incorporação da CLX à fase aquosa do sistema altera o comportamento de fluxo da formulação.

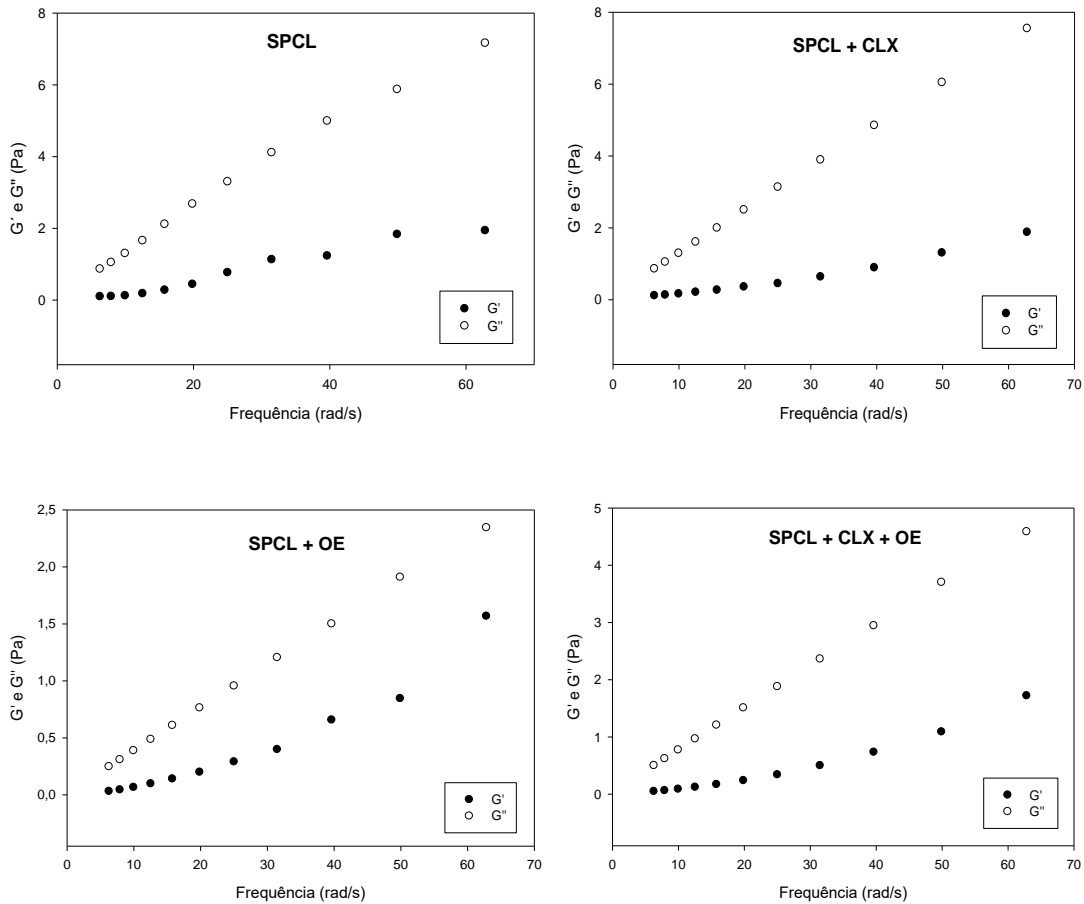
Ainda de acordo com os reogramas, as formulações SPCL, SPCL+OE e SPCL+CLX+OE foram classificadas como sistemas tixotrópicos tempo-independentes, devido a sobreposição da curva descendente à curva ascendente. Por outro lado, a formulação SPCL+CLX foi classificada como um sistema tixotrópico tempo-dependente, devido a curva descendente se posicionar abaixo da curva ascendente, criando uma pequena região de histerese (Figura 8).

Além disso, todas as formulações apresentaram índice de consistência ( $K$ ) muito baixos ( $<1$ ) (Tabela 3), isso pode ser explicado pela baixa organização estrutural desse tipo de sistema.

### **5.3.3 Análise reológica oscilatória**

A Figura 9 mostra os gráficos obtidos pelos testes de reologia oscilatória das formulações.

**Figura 9** - Variação do módulo de armazenagem ( $G'$ ) e módulo de perda ( $G''$ ) em função da frequência para as formulações SPCL; SPCL + CLX; SPCL + OE e SPCL + CLX + OE



Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os gráficos representados na Figura 9 todas as formulações, independente da substância incorporada, apresentaram o módulo de perda maior que o módulo de armazenagem ( $G'' > G'$ ), demonstrando o caráter mais viscoso dessas formulações, característica típica de sistemas pouco organizados<sup>31</sup>.

A Tabela 4 mostram comportamento das formulações por meio dos valores da regressão linear ( $r$ ), resistência do gel ( $S$ ) e do expoente viscoelástico ( $n$ ).

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

Formulação	r	S	n
SPCL	0,9803 ± 0,1447	0,0142 ± 0,0062	1,2113 ± 0,1136
SPCL + CLX	1,0000 ± 0,066	0,1440 ± 0,0841	0,9561 ± 0,3325
SPCL + OE	0,9943 ± 0,0529	0,0060 ± 0,0002	1,8917 ± 0,1049
SPCL + CLX + OE	1,0000 ± 0,0012	0,0845 ± 0,0032	0,9654 ± 0,2962

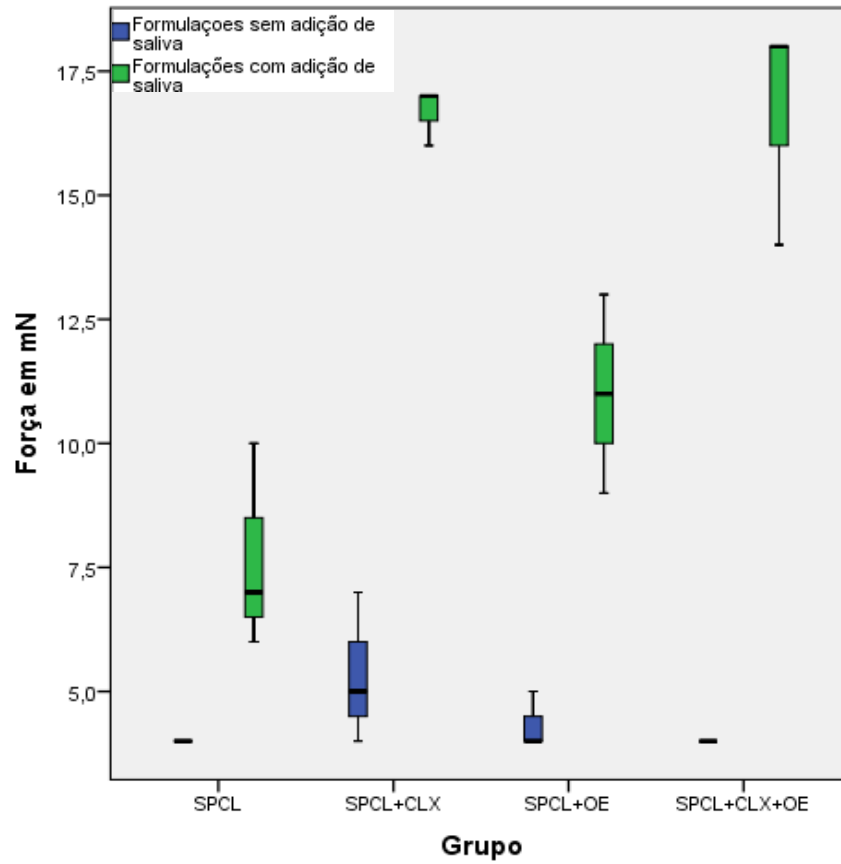
Fonte: Elaboração própria.

Como os valores do expoente viscoelástico (n) de todas as formulações foram baixos ( $n < 2$ ), conclui-se que estas apresentaram características de estruturação mais fraca, típica de microemulsões. As formulações contendo a CLX na fase aquosa obtiveram os maiores valores de S, e, conseqüentemente, os menores valores de n, quando comparados ao sistema sem nenhuma substância incorporada e ao sistema contendo somente o óleo essencial. Isso pode indicar que a incorporação da CLX, aumentou a estruturação do sistema, como demonstrado pela análise de fluxo contínuo (Item 5.3.2).

#### 5.3.4 Análise de mucoadesão

Os dados de força necessária para o destacamento das formulações dos discos de mucina estão expressos na Figura 10. Nesta figura é possível observar o aumento significativo da força necessária (mN) para o destacamento de cada uma das formulações do disco de mucina, com a adição de líquido no sistema (30% de saliva artificial) (Mann-Whitney;  $p \leq 0,046$ ). Isso demonstra que ao entrar em contato com a saliva, o sistema se torna mais mucoadesivo.

**Figura 10** – Box-plot apresentando força máxima de destacamento (mN) das formulações estudadas dos discos de mucina

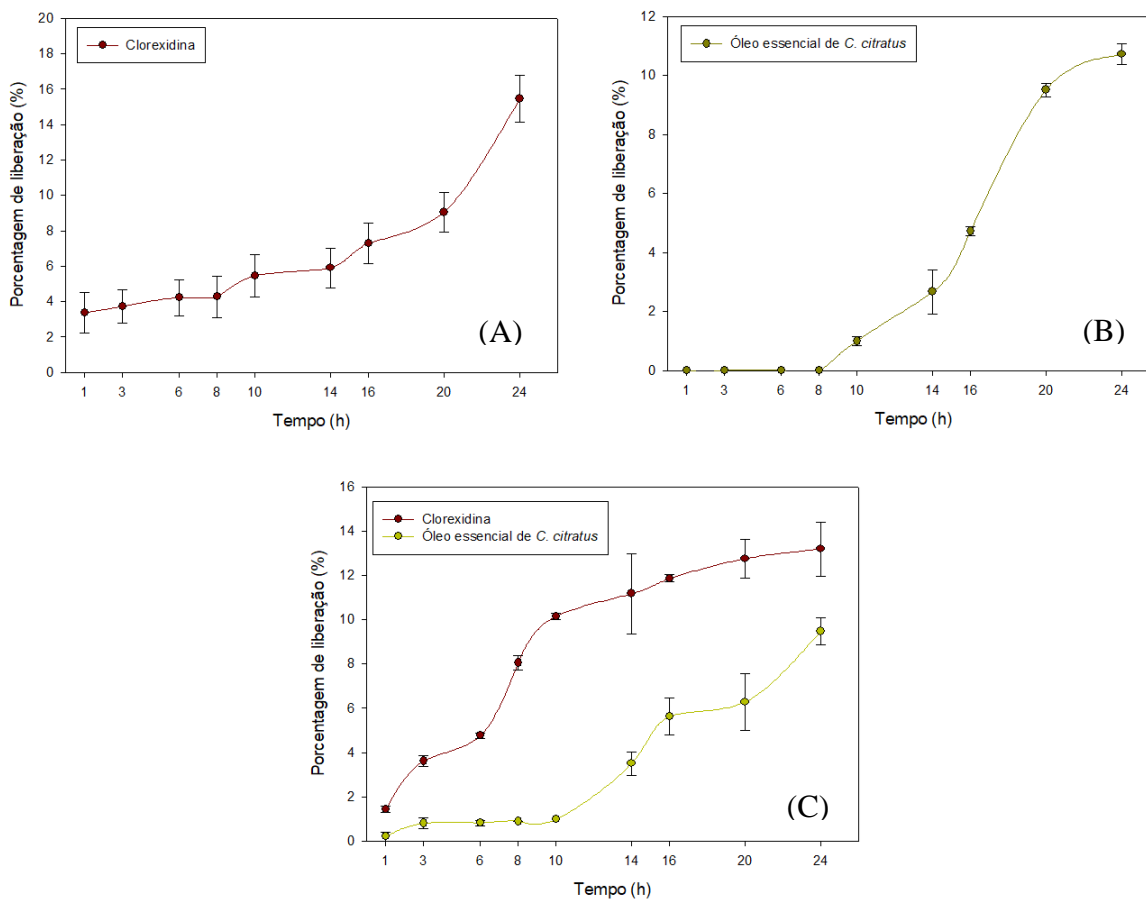


Fonte: Elaboração própria.

### 5.3.5 Análise de perfil de liberação *in vitro*

Os perfis de liberação das formulações em 24 horas estão descritos na Figura 11.

**Figura 11** - Perfil de liberação das Formulações. (A) SPCL + CLX; (B) SPCL + OE; (C) SPCL + CLX + OE



Fonte: Elaboração própria.

É possível observar na Figura 11 que para a formulação SPCL+CLX, houve a liberação de 15,45% da CLX incorporada, em 24 horas. Já para o óleo essencial de *C. citratus* (formulação SPCL+OE), a taxa de liberação foi ligeiramente menor, 10,73% da quantidade incorporada, nas primeiras 24 h. Esses resultados mostram que ambas as formulações se comportaram como um sistema de liberação controlada de fármacos.

A formulação SPCL+CLX+OE também apresentou taxas de liberação controlada das substâncias incorporadas, sendo 13,19% para a clorexidina e 9,48% para o óleo essencial.

## 5.4 Avaliação da Ação do Sistema Precursor de Cristal Líquido sobre Biofilmes Polimicrobianos

Nesta sessão estão descritos os resultados de composição microbiana, acidogenicidade, peso seco e concentração de polissacarídeos insolúveis em água dos biofilmes de acordo com os grupos de tratamento.

### 5.4.1 Composição microbiana e acidogenicidade dos biofilmes

Na Tabela 5 está apresentado um resumo dos resultados da concentração de micro-organismos nos biofilmes.

**Tabela 5** - Concentração de micro-organismos presentes nos biofilmes (Log UFC/mL) de acordo com os grupos de tratamento

Tratamento	Concentração de micro-organismos (Log UFC/mL)		
	Bactérias Totais Med (min-max)	Bactérias Acidúricas Med (min-max)	Estreptococos do grupo mutans Med (min-max)
Controle Negativo	9,31 (9,05-9,65) <sup>a</sup>	8,32 (7,97-8,65) <sup>a</sup>	7,94 (6,38-8,75) <sup>a</sup>
CLX	6,87 (6,33-7,48) <sup>b</sup>	4,42 (4,24-4,71) <sup>c</sup>	4,01 (3,09-4,48) <sup>c</sup>
OE	8,45 (8,09-9,44) <sup>a</sup>	7,69 (7,06-8,44) <sup>a</sup>	7,27 (6,04-8,14) <sup>a</sup>
CLX + OE	6,28 (5,94-7,29) <sup>c</sup>	4,23 (3,78-5,32) <sup>c</sup>	4,18 (3,98-5,29) <sup>c</sup>
SPCL	6,47 (6,17-6,74) <sup>bc</sup>	6,22 (5,54-6,63) <sup>b</sup>	5,77 (4,87-6,62) <sup>b</sup>
SPCL + CLX	6,39 (5,28-7,27) <sup>c</sup>	6,20 (5,25-7,18) <sup>b</sup>	6,20 (5,25-6,46) <sup>b</sup>
SPCL + OE	6,38 (5,53-7,28) <sup>c</sup>	5,65 (5,05-7,40) <sup>b</sup>	6,05 (4,30-6,42) <sup>b</sup>
SPCL + CLX + OE	6,39 (5,28-6,90) <sup>c</sup>	5,31 (4,04-6,38) <sup>bc</sup>	6,05 (3,83-6,43) <sup>b</sup>

(Med: mediana; min: valor mínimo; max: valor máximo).

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os tipos de tratamento dos biofilmes (Dunn;  $p \leq 0,05$ )

Fonte: Elaboração própria.

Para todas as espécies bacterianas estudadas foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Kruskal-Wallis;  $p \leq 0,0001$ ). O óleo essencial livre (OE) foi o menos efetivo e não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo (Dunn;  $p \geq 0,332$ ), demonstrando sua baixa atividade antibacteriana dentro das condições de tratamento adotadas.

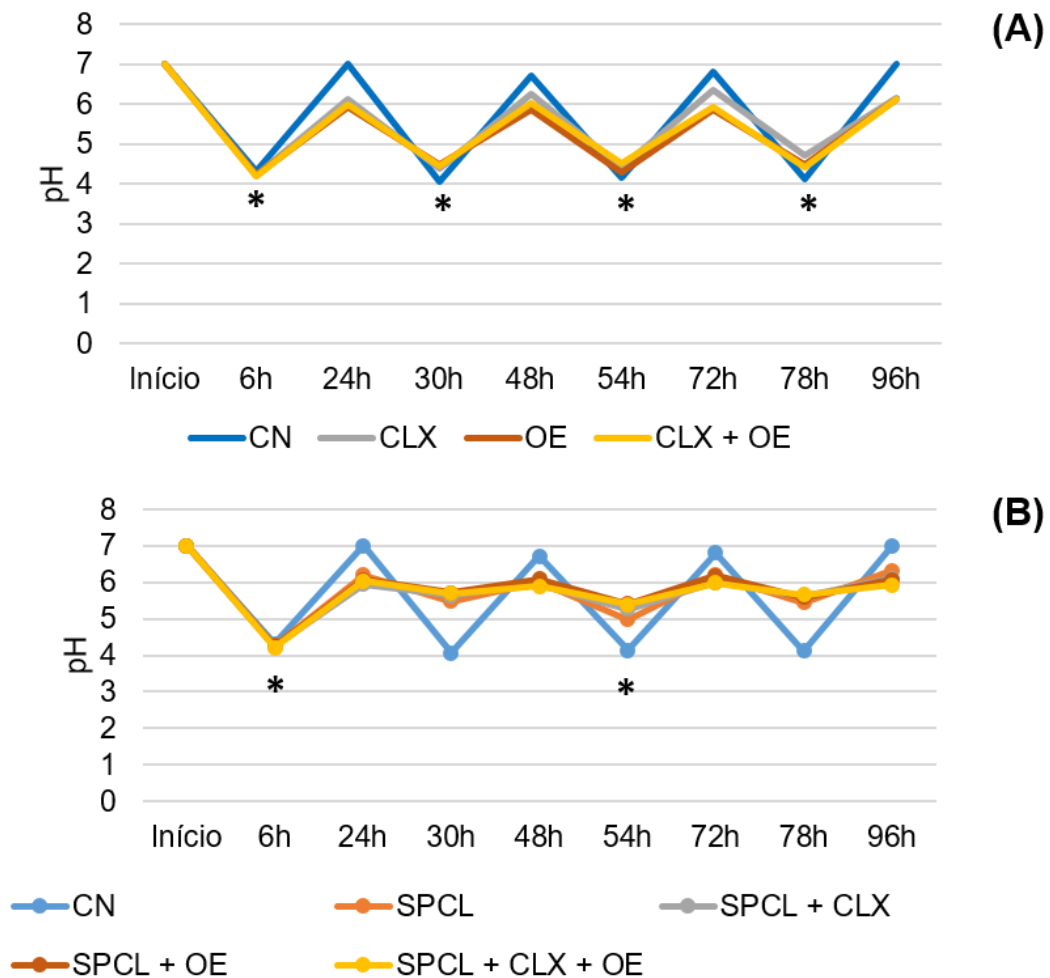
No grupo bactérias totais, as formulações estudadas, foram semelhantes entre si (Dunn,  $p \geq 0,433$ ) e semelhantes com a associação CLX+OE (Dunn,  $p \geq 0,583$ ). Além disso, quando as substâncias ativas foram incorporadas, as formulações determinaram maior redução de bactérias totais do que a clorexidina livre ( $p \leq 0,040$ ).

Para bactérias acidúricas, a CLX teve um comportamento semelhante ao da associação CLX+OE (Dunn;  $p=0,699$ ), e, ambos foram mais efetivos na redução desses micro-organismos do que os demais grupos ( $p \leq 0,023$ ). As formulações se comportaram de forma semelhante entre si independentemente da substância ativa incorporada ( $p \geq 0,074$ ). Entretanto, apenas a formulação contendo a combinação dos componentes ativos (SPCL+CLX+OE) promoveu uma redução bacteriana comparável àquela determinada pela CLX livre ( $p=0,058$ ).

Para os estreptococos do grupo mutans, a CLX livre e a associação CLX+OE também se comportaram de forma semelhante (Dunn,  $p=0,431$ ), e ambas foram mais efetivas na redução bacteriana do que as formulações (Dunn,  $p \leq 0,017$ ), as quais se comportaram de forma semelhante entre si (Dunn,  $p \geq 0,183$ ).

A Figura 12 apresenta as curvas com os valores médios de pH dos meios sem e com sacarose medidos a cada troca de meio de cultura, durante todo o período de crescimento dos biofilmes. Fica evidente pelo perfil apresentado que as formulações conseguiram manter o pH mais elevado do que as substâncias livres, permanecendo este acima de 5,5 mesmo com menor frequência de aplicação.

**Figura 12** – Perfil de comportamento do pH ao longo do experimento de acordo com os grupos de tratamento (A) Substâncias livres e controle negativo e (B) Formulações (SPCLs)



\* Momentos do tratamento dos biofilmes, exceto para o controle negativo. Fonte: Autoria própria.

Fonte: Elaboração própria.

Ainda com relação ao pH, a Tabela 6 mostra a mediana e os valores mínimo e máximo referentes a área total sob as curvas de pH dos meios de cultura durante o período de crescimento dos biofilmes (pH x tempo).

**Tabela 6** – Área total sob as curvas de pH dos biofilmes em função do tempo e de acordo com o grupo de tratamento

Grupo de tratamento	Área Total sob a Curva – pH x tempo Med (min-max)
Controle	531,63 (508,41-550,29) <sup>a</sup>
CLX	510,72 (498,03-542,13) <sup>a</sup>
OE	497,04 (481,41-516,30) <sup>a</sup>
CLX + OE	503,70 (492,84-510,24) <sup>a</sup>
SPCL	537,21 (517,93-574,14) <sup>b</sup>
SPCL + CLX	534,18 (516,54-567,90) <sup>b</sup>
SPCL + OE	539,94 (529,50-586,23) <sup>b</sup>
SPCL + CLX + OE	540,39 (526,29-557,82) <sup>b</sup>

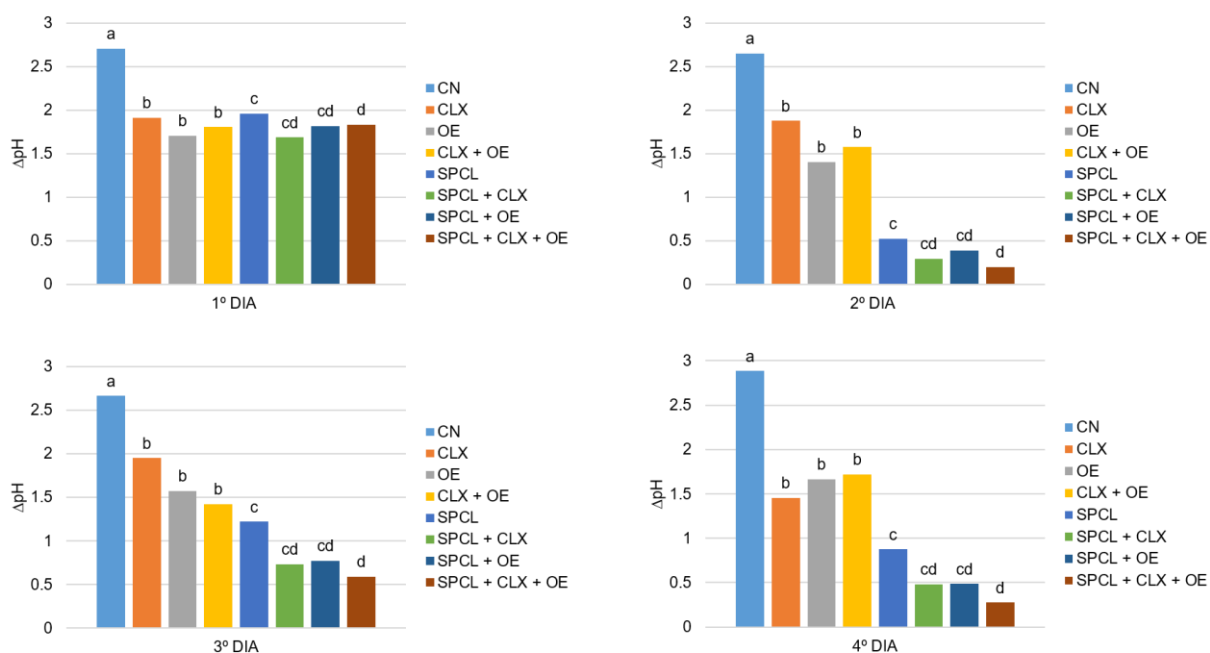
(Med: Mediana; min: valor mínimo; max: valor máximo). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento. Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn;  $p \leq 0,003$ ).

Fonte: Elaboração própria.

A estatística aplicada aos valores de área total sob a curva apontou diferença significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis;  $p \leq 0,001$ ). As áreas totais sob as curvas referentes aos grupos de tratamento com as formulações foram semelhantes entre si (Dunn;  $p \geq 0,307$ ) e maiores em comparação aos grupos de tratamento com as substâncias livres (Dunn;  $p \leq 0,003$ ), as quais demonstraram áreas integradas semelhantes entre si (Dunn;  $p \geq 0,56$ ). Em resumo, as formulações impediram grandes quedas de pH na presença do meio com sacarose, mantendo-se este, mais estável e acima do pH crítico para desmineralização do esmalte, durante todo o experimento.

Já a Figura 13 apresenta os dados de variação de pH ( $\Delta$ pH) no meio de cultura quando os biofilmes foram mantidos em meio sem sacarose e com sacarose, de acordo com os grupos de tratamento e com o dia de formação dos biofilmes.

**Figura 13** – Variação de pH ( $\Delta$ pH) dos meios sem sacarose e com sacarose, de acordo com os grupos de estudo e com o dia do experimento



Letras distintas demonstram diferença significativa entre os grupos. (ANOVA a um fator, seguido de pós-teste de Tukey (dias 1 e 2) e Games-Howell (dias 3 e 4);  $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaboração própria.

No primeiro dia do experimento, apesar de terem sido apontadas algumas diferenças estatísticas, os biofilmes apresentaram um comportamento bastante parecido em relação ao  $\Delta$ pH, visto que ainda não haviam sofrido influência dos tratamentos estudados. A partir do segundo dia, no entanto, já é possível notar alterações mais importantes (ANOVA;  $p \leq 0,0001$ ).

Os menores valores de variação do pH ( $\Delta$ pH) foram obtidos com os biofilmes tratados com as formulações contendo as substâncias ativas ( $p \leq 0,002$ ), nos dias 2 a 4. É possível notar também que essa variação de pH se torna ainda menor no dia seguinte ao tratamento com as formulações (Dias 2 e 4) ( $p \leq 0,001$ ), evidenciando a possível interferência do tratamento sobre a acidogenicidade dos biofilmes. As substâncias livres apresentaram variações de pH ( $\Delta$ pH) maiores quando comparadas às formulações, porém significativamente menores do que o grupo controle, em todas as ocasiões ( $p \leq 0,028$ ).

#### 5.4.2 Dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água

Na Tabela 7 estão representados os resultados referentes ao peso seco dos biofilmes de cada grupo de tratamento.

**Tabela 7 – Mediana, mínimo e máximo do peso seco (mg) do biofilme**

Grupo de tratamento	Peso seco (mg) Med (min-max)
Controle	1,20 (1,0-1,50) <sup>ab</sup>
CLX	0,20 (0,20-0,40) <sup>c</sup>
OE	1,20 (1,20-2,0) <sup>a</sup>
CLX + OE	0,20 (0,10-0,40) <sup>c</sup>
SPCL	0,80 (0,70-0,90) <sup>b</sup>
SPCL + CLX	0,20 (0,10-0,50) <sup>c</sup>
SPCL + OE	0,20 (0,10-0,60) <sup>c</sup>
SPCL + CLX + OE	0,20 (0,10-0,30) <sup>c</sup>

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento dos biofilmes (Dunn;  $p < 0,049$ ).

Fonte: Elaboração própria.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis;  $p \leq 0,0001$ ). As formulações contendo as substâncias ativas apresentaram valores de peso seco do biofilme estatisticamente menores que o controle (Dunn;  $p \leq 0,0001$ ) e não apresentaram diferença significativa entre si (Dunn;  $p \geq 0,801$ ) e com os grupos CLX e CLX+OE (Dunn;  $p \geq 0,326$ ). Para o óleo essencial e a formulação SPCL sem as substâncias ativas, o peso seco do biofilme foi semelhante ao grupo controle (Dunn;  $p \geq 0,107$ ).

Na Tabela 8 estão representadas as médias dos valores de concentração de polissacarídeos insolúveis por peso seco de biofilme de cada grupo de tratamento.

**Tabela 8** – Média (desvio padrão) da concentração de polissacarídeos insolúveis em água ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  peso seco) presente no biofilme

Grupo de tratamento	PEC insolúveis em água ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco)
Controle	4,20 (0,88) <sup>a</sup>
CLX	0,88 (0,47) <sup>c</sup>
OE	3,11 (0,82) <sup>b</sup>
CLX + OE	0,74 (0,40) <sup>c</sup>
SPCL	2,73 (0,58) <sup>b</sup>
SPCL + CLX	2,81 (0,37) <sup>b</sup>
SPCL + OE	2,60 (0,57) <sup>b</sup>
SPCL + CLX + OE	2,54 (0,80) <sup>b</sup>

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento dos biofilmes (Games-Howell;  $p < 0,029$ ).

Fonte: Elaboração própria.

Foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento e o controle (Games-Howell;  $p \leq 0,029$ ). A CLX livre e a associação CLX+OE se comportaram de forma semelhante (Games-Howell,  $p = 0,985$ ), e ambas foram mais efetivas na redução de PEC insolúveis em água por miligrama de peso seco do biofilme do que todas as formulações (Games-Howell,  $p \leq 0,0001$ ). Por sua vez, as formulações apresentaram um comportamento semelhante entre si (Games-Howell,  $p \geq 0,931$ ), e semelhante ao óleo essencial livre (Games-Howell;  $p \geq 0,510$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Esse estudo é o primeiro que se propôs a investigar a aplicabilidade de um sistema precursor de cristal líquido contendo a associação de óleo essencial de *C. citratus* e clorexidina para controle de biofilme bucal. Essa proposta está baseada nas evidências das vantagens do uso desse tipo de sistema para administração bucal<sup>31,32,148</sup> e, a escolha pelo uso de um produto natural (óleo essencial de *C. citratus*) está em concordância com a estratégia da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre Medicina Tradicional (2014-2023)<sup>149</sup>, na qual um dos principais objetivos é estimular a pesquisa estratégica visando determinar a segurança e eficácia do uso de produtos naturais.

Os modelos de biofilmes de microcosmo formados a partir de inóculo salivar são bastante utilizados como uma alternativa aos modelos monoespécies, pelo fato de apresentarem uma versão mais próxima das condições bucais reais. Assim, a relevância do uso de um sistema experimental de microcosmo é mimetizar a complexidade ecológica da microbiota bucal, que é intrinsecamente diferente entre indivíduos<sup>150</sup>, determinando diferenças na resposta do biofilme às distintas formas de tratamento<sup>151,152</sup>, o que geralmente não pode ser observado *in vitro* quando usados biofilmes monoespécies.

O inóculo polimicrobiano utilizado nesse estudo foi obtido a partir da saliva de um doador previamente selecionado. A sistemática de seleção do doador de saliva é um processo importante para o desenvolvimento do estudo, uma vez que existe variação na composição salivar entre diferentes indivíduos, o que reflete na composição do biofilme formado a partir da saliva<sup>131</sup>. Além disso, diferentes indivíduos apresentam variação na capacidade de formação de biofilme, bem como na resposta a substâncias antibacterianas<sup>151,152</sup>. Assim, os fatores avaliados na saliva (composição microbiana, capacidade de formação de biofilme e suscetibilidade à clorexidina) são essenciais para o desenvolvimento satisfatório do biofilme e para que esse responda aos objetivos traçados no presente estudo.

Os resultados para Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima indicaram suscetibilidade do inóculo polimicrobiano ao óleo essencial de *C. citratus* e ao digluconato de clorexidina. Esses dados corroboram com os achados de diversos estudos que demonstram a ação antimicrobiana da clorexidina<sup>13,20,21,87,153</sup> e do óleo essencial de *C. citratus*<sup>26,27,116–118</sup>.

Sistemas precursores de cristais líquidos (SPCL) são interessantes para aplicação de fármacos na cavidade bucal. Por se apresentarem na forma líquida, facilitam a administração da formulação, e ao entrarem em contato com o ambiente bucal, incorporam água da saliva, tornando-se uma mesofase líquido-cristalina mais viscosa, que promove uma liberação lenta e controlada dos fármacos incorporados<sup>32</sup>.

A Microscopia de Luz Polarizada é bastante utilizada para caracterização de formulações pela praticidade do método e rapidez na obtenção dos resultados<sup>154</sup>. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, todas as formulações (SPCL; SPCL+CLX; SPCL+OE; SPCL+CLX+OE) apresentaram isotropia, sendo a princípio, caracterizados como microemulsões (Figura 5A e Figura 6). No entanto, ao adicionar-se 30% de saliva foi possível observar anisotropia (desvio da luz) e aspecto estriado, indicando transição de fase para sistema líquido-cristalino hexagonal (Figura 5B e Figura 7). Os resultados dos demais testes de caracterização também indicaram que, a adição de saliva ao sistema promoveu uma maior estruturação do mesmo, aumentando a viscosidade e conseqüentemente, o poder mucoadesivo. Isso, transportado para situações clínicas pode resultar em aumento do tempo de ação do óleo essencial e da clorexidina na cavidade bucal e melhorar o desempenho do tratamento.

Outros autores que desenvolveram sistemas microemulsionados para liberação controlada de fármacos contendo PPG-5-CETETH-20 (Procetyl) na sua composição (Salmazi et al.<sup>155</sup>, Calixto et al.<sup>156</sup>), também mostraram a transição de fase destes para sistemas líquido-cristalinos hexagonais, na presença de água.

Essa transição de fase pode ocorrer devido à polarização da cabeça polar do PPG-5-CETETH-20 (Procetyl) no momento da adição de água ao sistema, que provoca aumento na curvatura e volume da região polar, e leva a geração de estruturas hexagonais<sup>156</sup>. Esses dados mostram, portanto, uma característica desejável e são compatíveis com o objetivo proposto, uma vez que neste estudo, as formulações se comportaram como precursores de cristais líquidos.

Os dados de reologia de fluxo contínuo indicaram características de fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos para as formulações contendo ou não as substâncias ativas (Figura 8 e Tabela 3). A pseudoplasticidade é uma característica pertinente para formulações de uso bucal, pois durante a aplicação, em altas taxas de cisalhamento (aplicação com seringas, por exemplo), ocorre desestruturação das cadeias poliméricas e conseqüente afinamento do fluxo, o que facilita a sua administração. No

entanto, após a remoção dessa tensão, a formulação recupera a sua viscosidade, permanecendo por mais tempo na mucosa, o que aumenta a biodisponibilidade do fármaco e conseqüentemente seu efeito no sítio de ação<sup>35,157</sup>.

Bruschi et al.<sup>34</sup> desenvolveram sistemas precursores de cristais líquidos compostos por PPG-5-CETETH-20 (Procetyl), Miristato de isopropila e micropartículas de própolis para tratamento de doença periodontal. Estes também apresentaram características de fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos, o que foi destacado como um ponto positivo para aplicação em bolsa periodontal, por facilitar a aplicação da formulação no local de interesse.

A análise de reologia oscilatória, também realizada neste estudo, determina as propriedades viscoelásticas, fornecendo informações sobre a natureza estrutural do sistema, que tem influência direta sobre o seu desempenho<sup>147</sup>. De acordo com os resultados obtidos, as formulações estudadas apresentaram características de estruturação mais fraca, típica de microemulsões (Figura 9 e Tabela 4).

No entanto, estudos anteriores<sup>155,156,158</sup> demonstraram que a incorporação de líquidos influencia o comportamento viscoelástico dessas formulações. Salmazi et al.<sup>155</sup> ao desenvolverem sistemas precursores de cristais líquidos, observaram um comportamento mais viscoso, ou seja, módulo de perda ( $G''$ ) maior que o módulo de armazenagem ( $G'$ ). Porém, quando adicionaram muco nas concentrações de 30% e 100%, o comportamento da formulação passou a ser mais elástico ( $G' > G''$ ). Calixto et al.<sup>156</sup>, também observaram, que a adição de saliva artificial aos sistemas teve influência significativa sobre o módulo de armazenagem ( $G'$ ) que se tornou maior que o módulo de perda ( $G''$ ), conferindo característica elástica as formulações. A elasticidade é uma propriedade importante para garantir resistência à deformação e, portanto, boa estabilidade da formulação, dentro da cavidade bucal<sup>156</sup>.

A adição de saliva artificial também influenciou aumentando significativamente as propriedades mucoadesivas das formulações, como demonstrado na Figura 10. Formulações com melhores propriedades mucoadesivas são de grande interesse no campo farmacêutico<sup>156</sup>, pois possuem a grande vantagem de a medida que se ligam a mucosa, mantém o fármaco no local de ação por períodos mais longos, aumentando a sua absorção e biodisponibilidade e, portanto, a sua eficácia terapêutica. Essa característica é muito interessante em fármacos para controle de doenças bucais em pacientes com necessidades especiais, uma vez que existe a dificuldade de realizar a higiene bucal adequada nesses indivíduos. Assim, um maior tempo de permanência

do fármaco na boca implicaria numa redução da frequência de aplicação do produto, aumentando a adesão do paciente ao tratamento<sup>120</sup> e, por consequência, aumentaria as chances de controle das doenças nesses indivíduos.

Os resultados de liberação (Figura 11), por sua vez, comprovaram que as formulações apresentaram liberação controlada de fármacos (13,19% a 15,45% para a CLX e 9,48% a 10,73% para o óleo essencial de *C. citratus*). Isso pode ser atribuído à formação de uma estrutura mais compacta e de elevada densidade de reticulação quando o sistema entra em contato com líquidos, reduzindo a capacidade de liberação do fármaco para o meio de dissolução e promovendo maior controle da liberação<sup>156</sup>. Resultados semelhantes foram observados por Bruschi et al.<sup>34</sup> quando analisaram o perfil de liberação de micropartículas de própolis incorporadas a um SPCL. Num período de 24 h ocorreu uma liberação de cerca de 15% e somente com 7 dias de ensaio foi possível notar cerca de 75% de liberação. Segundo os autores, esse foi um achado interessante, visando aplicação na bolsa periodontal, uma vez que o sistema permanece por mais de uma semana liberando o fármaco no local de interesse. Dessa forma, torna-se interessante avaliar a liberação das formulações contendo óleo essencial de *C. citratus* e clorexidina por períodos mais longos de tempo e estudar a sua aplicabilidade em sítios com doença periodontal.

Mei et al.<sup>129</sup> também desenvolveram um sistema precursor de cristais líquidos contendo metronidazol para tratamento local da doença periodontal. Nos ensaios *in vivo* em coelhos, esse sistema foi capaz de manter concentrações do fármaco acima da Concentração Inibitória Mínima por mais de 10 dias, sem detecção deste no sangue dos animais, enquanto o metronidazol livre foi eficiente somente por 24h com níveis detectáveis no sangue dos animais a partir de 6 h. Isso demonstra a aplicabilidade do sistema para tratamento local de doenças em sítios específicos.

Os dados dos testes microbiológicos realizados em biofilmes formados sobre lamínulas de vidro usando um modelo de aderência ativa<sup>137</sup> demonstraram a ação antimicrobiana das substâncias livres, bem como das formulações com as substâncias ativas incorporadas, por meio da redução da concentração de bactérias totais, bactérias acidúricas e estreptococos do grupo mutans, em relação ao grupo controle negativo (sem tratamento dos biofilmes), (Tabela 5). O óleo essencial de *C. citratus* não mostrou redução significativa de micro-organismos nos três grupos bacterianos estudados. Oliveira et al.<sup>27</sup> avaliando a ação antibiofilme desse óleo sob diferentes tempos de exposição dos biofilmes (60 segundos e 60 minutos), observaram uma

redução mais expressiva de micro-organismos com o maior tempo de exposição e sugeriram a sua incorporação em sistemas de liberação controlada. Em vista disso, os resultados do presente estudo indicam que o protocolo utilizado (aplicação por 1 minuto, 1 vez ao dia) não foi suficiente para promover redução significativa de micro-organismos no biofilme, quando o óleo essencial de *C. citratus* foi usado. A associação CLX+OE, no entanto, reduziu a concentração de bactérias acidúricas e bactérias do grupo mutans de forma similar à clorexidina sozinha e, a redução da concentração de bactérias totais foi superior àquela determinada pela CLX. Esses dados fortalecem os resultados do trabalho de Brighenti et al.<sup>28</sup>, que relataram pela primeira vez na literatura a eficácia dessa associação.

As formulações desenvolvidas neste estudo determinaram redução de micro-organismos estatisticamente significativa para os três grupos bacterianos avaliados. Para que um tratamento seja considerado bactericida é necessária uma inibição total de crescimento de micro-organismos ou redução maior ou igual a 99,9% em relação ao inóculo inicial (redução de 3 log 10 UFC/mL)<sup>159</sup>. Para os grupos bactérias totais e bactérias acidúricas, as formulações contendo o óleo essencial (SPCL+OE) e a associação do óleo com a clorexidina (SPCL+CLX+OE) apresentaram uma redução da concentração de micro-organismos no biofilme em torno de 3 logs (2,93 e 2,92 para bactérias totais e; 2,67 e 3,01 para bactérias acidúricas, respectivamente), em relação ao controle negativo. Para estreptococos do grupo mutans, essa redução foi em torno de 2 log, redução significativa, considerando se tratar de bactérias altamente cariogênicas estruturadas em biofilme.

As formulações se comportaram de maneira semelhante, demonstrando não haver diferença estatística na concentração de micro-organismos do biofilme entre os grupos tratados com a formulação veículo (SPCL) e aquelas com as substâncias ativas incorporadas (redução de aproximadamente 2 a 3 log 10 UFC/mL em relação ao controle negativo). Resultados semelhantes foram descritos por Calixto et al.<sup>120</sup> em relação à biomassa de biofilmes de *S. mutans*, quando o peptídeo p1025 foi incorporado a um sistema precursor de cristais líquidos. Assim, os autores<sup>120</sup> observaram que quando não foi realizado o pré-tratamento da superfície onde os biofilmes se desenvolviam, a aplicação do sistema com o peptídeo não determinou diferença significativa na biomassa entre as formulações, inclusive para a formulação veículo que não continha o peptídeo.

Calixto<sup>126</sup> avaliou ainda, a ação antimicrobiana do mesmo peptídeo (p1025) incorporado a um SPLC, dessa vez pela concentração de micro-organismos em biofilmes de *S. mutans* e dosagem de polissacarídeos extracelulares. Também não observaram diferença significativa entre os grupos controle e experimental. Por se tratar de um sistema de liberação controlada e a porcentagem de liberação do peptídeo em 24 h ser muito baixa (4,61%), foi sugerido um tempo maior de exposição dos biofilmes à formulação contendo o peptídeo, para atenuar os fatores de virulência. Da mesma forma, no presente estudo, a porcentagem de liberação das substâncias incorporadas no sistema foi muito baixa (menos de 16%), o que pode corroborar com a ausência de diferença na redução da concentração microbiana no biofilme, quando a formulação veículo foi comparada com as formulações contendo as substâncias ativas. Portanto, estudos com um tempo maior de exposição, bem como avaliações a longo prazo são necessários para comprovar a ação das substâncias incorporadas no sistema e liberadas de forma controlada.

Além disso, neste estudo, foi possível notar a ação antimicrobiana da formulação veículo (SPCL). Bernegossi et al.<sup>160</sup> trabalhando com biofilmes polimicrobianos, também verificaram que após a aplicação de uma formulação líquido cristalina contendo carbopol, sem a incorporação de substâncias ativas, houve um crescimento microbiano de apenas 14,37%, comprovando a sua ação antimicrobiana.

No presente estudo, o SPCL utilizado contém quitosana de baixo peso molecular na sua composição, que se trata de um polímero com potencial antimicrobiano já reconhecido pela literatura<sup>161,162</sup>. Alguns fatores como peso molecular, pH e grau de desacetilação influenciam o potencial antimicrobiano desse composto. Quitosana de peso molecular superior a 60 KDa apresenta capacidade de inibir o crescimento de diversos grupos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em pH variando de 5,5 a 6,0 <sup>161</sup>.

Aliasghari et al.<sup>163</sup> avaliaram a atividade antimicrobiana da quitosana e de nanopartículas de quitosana contra quatro cepas de estreptococos de reconhecida cariogenicidade (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis* e *S. salivarius*). Os resultados mostraram efeito bacteriostático e bactericida (em concentração de 5 mg/mL), além da redução de formação de biofilme de *S. mutans in vitro*, tendo as nanopartículas de quitosana determinado redução do biofilme semelhante àquela determinada pela quitosana. de Paz et al.<sup>164</sup> observaram que formulações a base de quitosana de baixo

peso molecular ( $\leq 150$  KDa) interferem na integridade da membrana celular de *S. mutans* de maneira homogênea em todo o biofilme.

Alguns mecanismos de ação foram propostos para explicar a ação antimicrobiana da quitosana. Um desses mecanismos baseia-se na interação entre as moléculas de quitosana com carga positiva e a membrana celular de micro-organismos que possui carga negativa, levando a ruptura dessa membrana e posterior extravasamento de constituintes intracelulares<sup>164</sup>. Dessa forma, a ação antimicrobiana das formulações do presente estudo pode ser atribuída em parte ao caráter antimicrobiano da quitosana utilizada (peso molecular entre 50 e 190 KDa), uma vez que a liberação das substâncias incorporadas foi muito baixa no protocolo de aplicação utilizado (1 aplicação de 5 minutos a cada 48 h) e o período de observação do estudo foi muito curto.

A capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos cariogênicos não deve ser o único fator a ser explorado na tentativa de reduzir a instalação e o desenvolvimento da cárie dentária<sup>165</sup>. Sabe-se que a produção de polissacarídeos extracelulares e a acidogenicidade dos biofilmes são fatores de virulência essencialmente associados a cárie dentária. Assim, uma estratégia promissora para combater essa doença é agir sobre esses fatores<sup>47,166</sup>.

Calixto<sup>126</sup> demonstrou que o SPLC com o peptídeo p1025 incorporado conseguiu retardar a queda de pH, tendo este demorado 45 minutos para atingir o valor de 5,5, pH crítico para desmineralização do esmalte dentário, enquanto no grupo controle (SPLC sem peptídeo), essa queda de pH ocorria nos primeiros 15 minutos. No entanto, quando foram avaliadas as concentrações de polissacarídeos do biofilme não houve diferença significativa entre esses dois grupos.

No presente estudo foi avaliada a acidogenicidade do biofilme e a influência das formulações sobre a formação de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água. Por meio dos resultados obtidos, foi possível verificar uma menor acidogenicidade dos biofilmes tratados com as formulações, os quais mantiveram o pH entre 5,5 e 6,0, em meio com e sem sacarose (Figura 12B), apesar do regime com menor frequência de aplicações (1 aplicação a cada 48 horas). Já os grupos tratados com as soluções livres, mesmo com aplicações diárias, apresentaram maiores variações de pH, atingindo valores em torno de 4,5 ou até inferiores quando em meio rico em sacarose (Figuras 12A e 13). Essa diferença de comportamento dos biofilmes pode ser observada também pela área integrada sob a curva de pH x tempo (Tabela

6), onde todas as formulações mostraram valores significativamente maiores do que o controle e as substâncias ativas livres, indicando valores de pH mais altos e uma menor variação do pH com o uso das formulações. Esse comportamento pode ser explicado baseado nas propriedades mucoadesivas do sistema, que permitem a sua aderência ao biofilme por mais tempo, diferente das soluções livres, cuja ação é imediata após o tratamento e elas são rapidamente eliminadas do local de aplicação com a lavagem nos estudos *in vitro*, ou pela ação de autolimpeza exercida pela saliva, no ambiente bucal.

O peso seco do biofilme (biomassa) também sofreu influência dos tratamentos realizados nesse estudo. As formulações contendo as substâncias ativas obtiveram valores semelhantes entre si e aos grupos CLX e CLX+OE, porém estatisticamente inferiores ao peso seco dos biofilmes referentes aos grupos: formulação veículo (SPCL), óleo essencial (OE) e controle negativo (Tabela 7). A concentração de polissacarídeos extracelulares também apresentou-se estatisticamente menor para as formulações em relação ao controle (Tabela 8), evidenciando que estas foram capazes reduzir a biomassa e diminuir a cariogenicidade do biofilme, uma vez que polissacarídeos produzidos por exoenzimas de *S. mutans* são os principais constituintes da matriz dos biofilmes cariogênicos<sup>47</sup>. Porém, ressalta-se que no período do estudo, as formulações apresentaram significativamente menor capacidade de redução da concentração de polissacarídeos insolúveis do que a CLX livre e a associação CLX+OE.

Dessa forma, as formulações desenvolvidas mostraram potencial para uso na cavidade bucal, uma vez que apresentaram possibilidade de transição de fase, facilidade de aplicação e propriedade de mucoadesão. Além disso, apresentaram propriedades antimicrobianas interessantes, diminuindo consideravelmente a concentração de micro-organismos organizados em biofilmes e reduzindo os fatores de virulência associados a esses biofilmes. No entanto, esse estudo se trata de uma pesquisa inicial e alterações podem ser apontadas para melhorar o desempenho das formulações, tais como, realização de testes usando formulações com concentrações maiores do óleo essencial de *C. citratus*, maior tempo de exposição dos biofilmes ao sistema, bem como, realização de estudos *in situ* com acompanhamento por períodos maiores, visando sua posterior aplicação *in vivo*.

## **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, Nobredos-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 VVW, 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](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, Oyedeji O, Rungqu P, Nkeh-Chungag B, Oyedeji 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 AI, 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, Børghlum 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, Wiesel 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. Benergossi 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.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



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



#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa: **“Sistema líquido-cristalino bioadesivo para controle de biofilme bucal”** de responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro, da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. O objetivo do estudo será avaliar a atividade de uma formulação farmacêutica contra micro-organismos de interesse odontológico. A sua participação na pesquisa será apenas com o fornecimento de saliva. Os procedimentos para coleta de saliva serão:

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

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

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

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

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

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

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

Araraquara, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

---

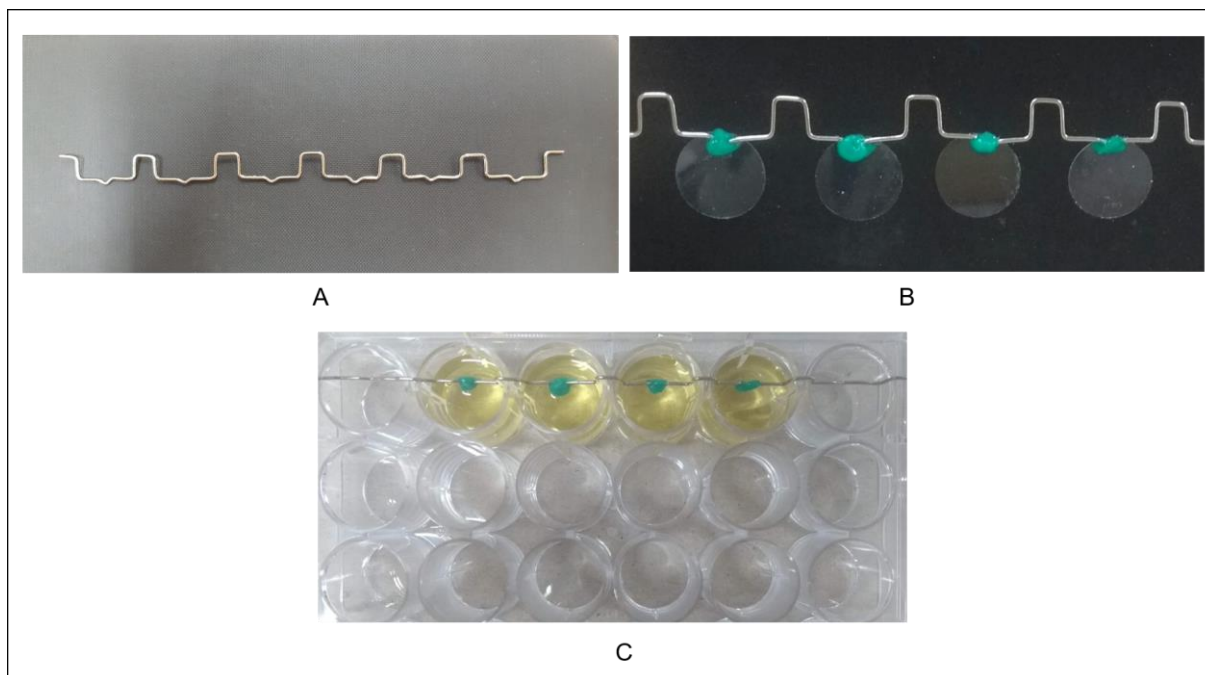
Pesquisadora

---

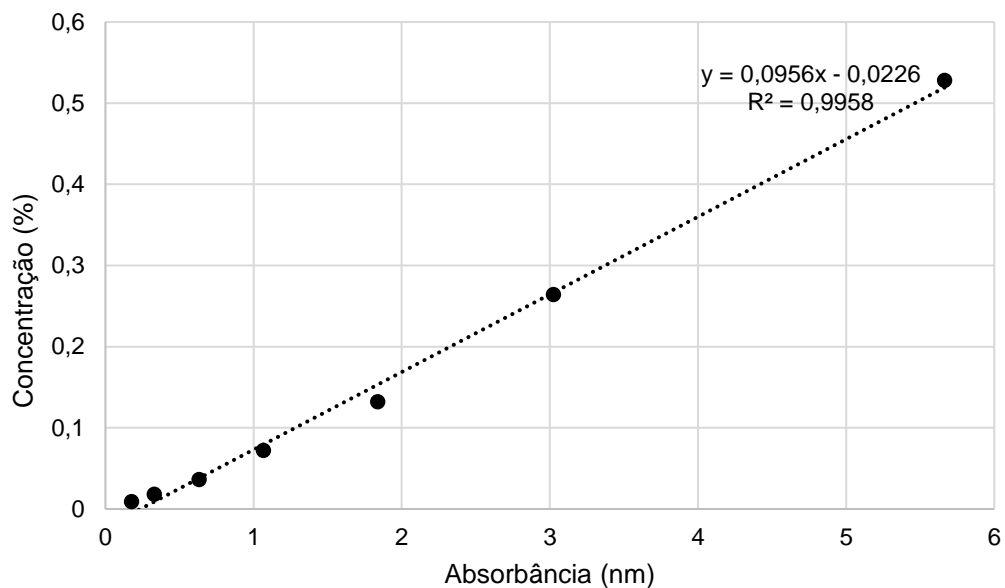
Participante da Pesquisa

**APÊNDICE B: Esquema de Aderência Ativa para Crescimento dos Biofilmes.**

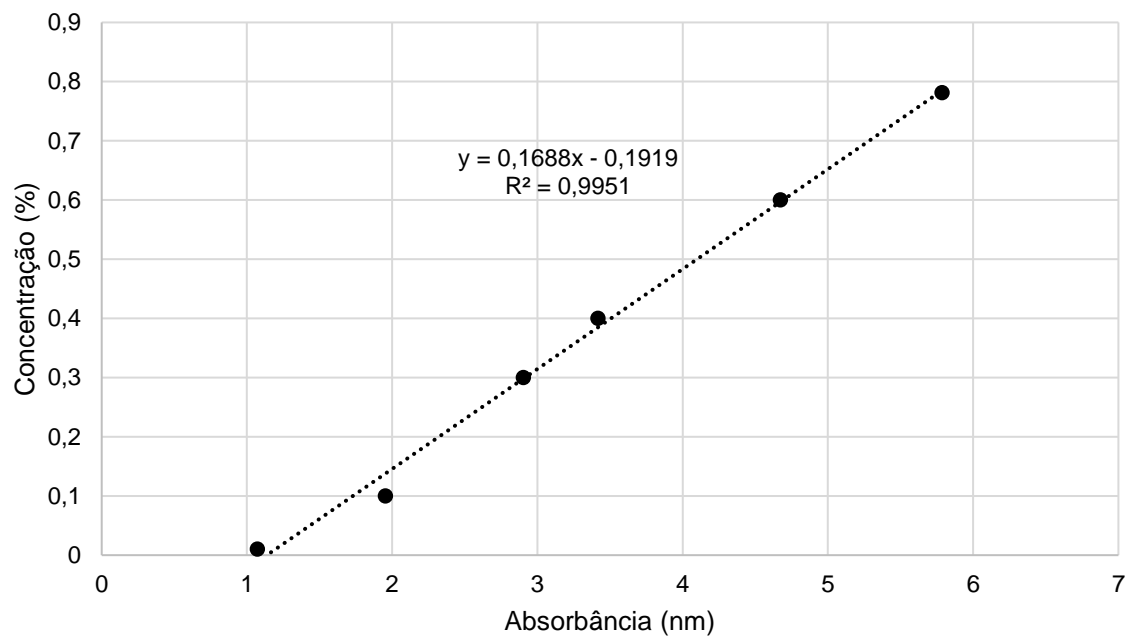
**Figura A-** Dispositivo confeccionado com fio ortodôntico 0,5 para receber as lamínulas de vidro. **B –** Lamínulas de vidro fixadas com silicona de condensação e suspensas verticalmente. **C –** Imersão das lamínulas em placas de 24 poços.



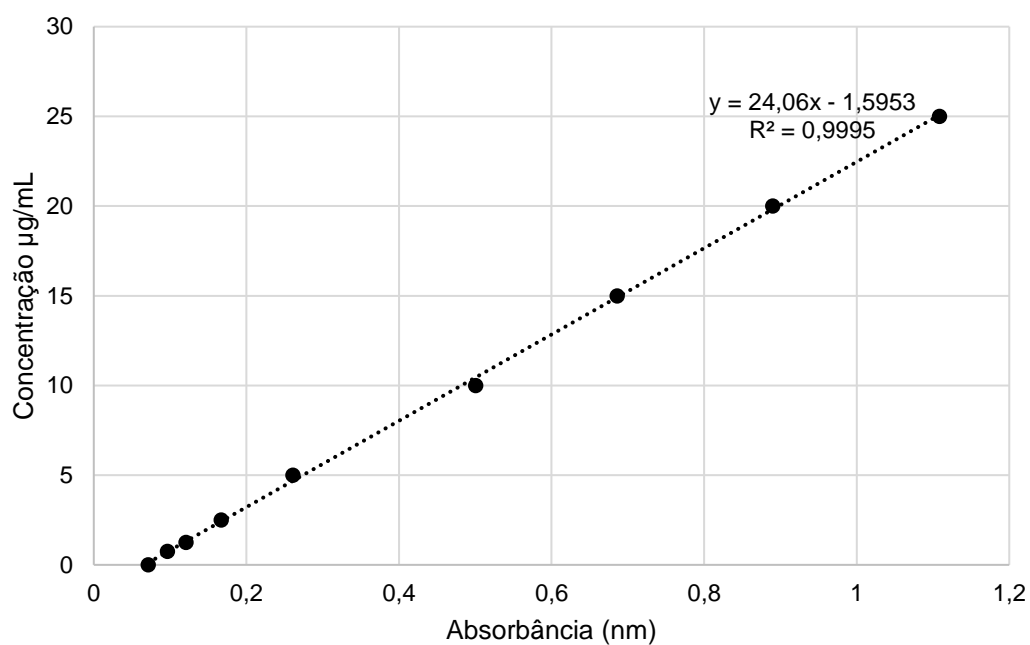
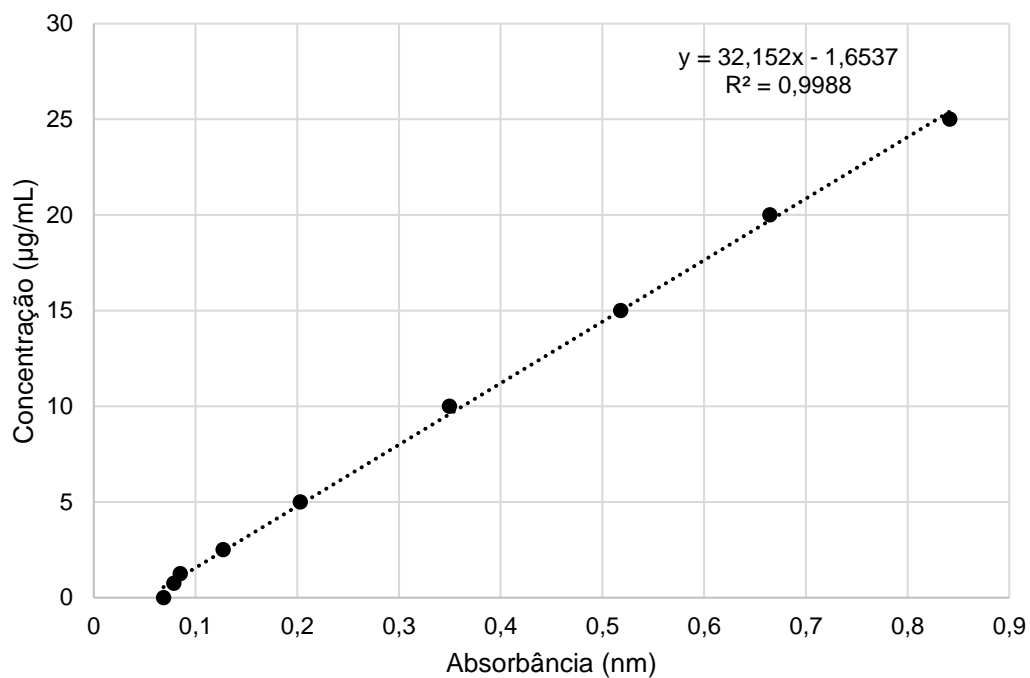
**APÊNDICE C – Curva Padrão do Digluconato de Clorexidina em PBS/LSS (1%),  
Equação da Reta e Coeficiente de Correlação Linear ( $R^2$ ).**



**APÊNDICE D – Curva padrão do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* em PBS/LSS (1%), Equação da Reta e Coeficiente de Correlação Linear (R<sup>2</sup>).**



## APÊNDICE E - Curvas Padrão de Glicose Usadas para Dosagem de Polissacarídeos Extracelulares



<sup>1</sup> Foram utilizadas duas curvas padrões porque os ensaios colorimétricos foram realizados em dois dias distintos, dessa forma, foi confeccionada uma curva para cada dia experimental.

## ANEXO A – Cadastro do Projeto no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A5E42CA**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A5E42CA**  
 Usuário: **UNESP**  
 CPF/CNPJ: **48.031.918/0001-24**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

### Espécie

**Cymbopogon citratus**

Título da Atividade: **Sistema líquido-cristalino para controle de biofilme bucal**

### Equipe

<b>Elisa Maria Aparecida Giro</b>	<b>UNESP</b>
<b>Raquel Souza Marques</b>	<b>UNESP</b>
<b>Fernanda Lourenção Brighenti</b>	<b>UNESP</b>
<b>Marlus Chorilli</b>	<b>UNESP</b>

Data do Cadastro: **25/04/2019 10:49:51**

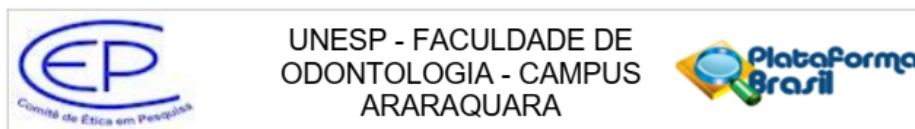
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:28** de **13/01/2020**.



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

## ANEXO B - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Sistema líquido-cristalino bioadesivo para controle de biofilme bucal.

**Pesquisador:** Elisa Maria Aparecida Giro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 97484718.1.0000.5416

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.928.807

#### Apresentação do Projeto:

Estudo do tipo experimental in vitro com uso de saliva humana para formação de biofilme para testes de atividade antimicrobiana e de citotoxicidade de um sistema líquido-cristalino bioadesivo contendo digluconato de clorexidina e óleo essencial de Cymbopogon citratus.

#### Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver e caracterizar sistemas líquido-cristalinos bioadesivos, avaliar in vitro seu potencial antimicrobiano em biofilme polimicrobiano e sua citotoxicidade.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

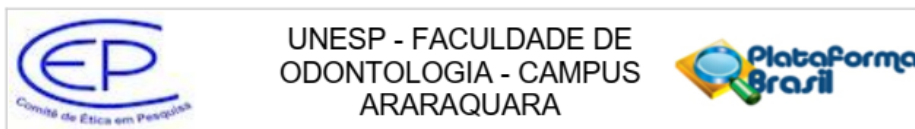
**Riscos:** Os riscos são considerados mínimos e incluem o desconforto de permanecer em jejum por 2 horas e sem escovação por 24h. Para minimizar tais riscos, após a coleta, será servido um desjejum e o voluntário receberá uma limpeza profissional dos dentes. Serão asseguradas as normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

**Benefícios:** Esta pesquisa não trará nenhum benefício imediato aos voluntários da pesquisa, porém, poderá contribuir para avanços no desenvolvimento de um material para prevenção da cárie dentária.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto importante pois visa o desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos bioadesivos contendo digluconato de clorexidina e óleo essencial de Cymbopogon citratus na tentativa de prolongar a permanência de substâncias antimicrobianas na cavidade bucal. Com essa estratégia,

**Endereço:** HUMAITA 1680  
**Bairro:** CENTRO  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (18)3301-6459 **CEP:** 14.801-903  
**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.928.807

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.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos obrigatórios foram apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as solicitações foram devidamente atendidas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Atendidas pendências de reunião, considero APROVADO o protocolo.

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1192701.pdf	17/09/2018 20:36:22		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_RAQUEL_CORRIGIDO.pdf	17/09/2018 20:32:03	RAQUEL SOUZA MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RAQUEL_CORRIGIDO.pdf	17/09/2018 20:31:46	RAQUEL SOUZA MARQUES	Aceito
Outros	TERMO_.pdf	30/08/2018 20:05:58	RAQUEL SOUZA MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_LAB.pdf	30/08/2018 20:02:23	RAQUEL SOUZA MARQUES	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_.pdf	08/08/2018 19:05:57	RAQUEL SOUZA MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_CHEFE_DE_DEPART.pdf	08/08/2018 19:03:07	RAQUEL SOUZA MARQUES	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	08/08/2018 12:18:59	RAQUEL SOUZA MARQUES	Aceito
Outros	ressarcimento.pdf	08/08/2018 12:09:48	RAQUEL SOUZA MARQUES	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	08/08/2018 11:50:32	RAQUEL SOUZA MARQUES	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

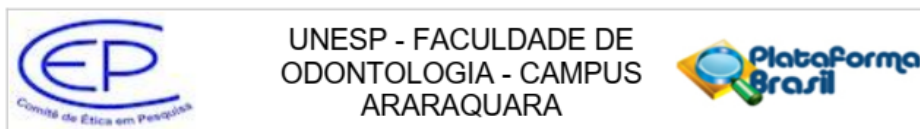
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (18)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.928.807

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ARARAQUARA, 01 de Outubro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Andréa Gonçalves**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** HUMAITA 1680  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 14.801-903  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (18)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br

**Não autorizo a publicação deste trabalho até 05 de março de 2022.**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 05 de março de 2020.**

**Raquel Souza Marques**