



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS -GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão

AVALIAÇÃO LABORATORIAL E CLÍNICA DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA
CONTENDO ÓLEO DE *Lippia sidoides* Cham PARA O CONTROLE DE
PERIODONTOPATIAS

João Pessoa, PB

2019

ISABEL CELESTE CAIRES PEREIRA GUSMÃO

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL E CLÍNICA DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA
CONTENDO ÓLEO DE *Lippia sidoides* Cham PARA O CONTROLE DE
PERIODONTOPATIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO, ponto focal Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências necessárias para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Correia Sampaio

João Pessoa, PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

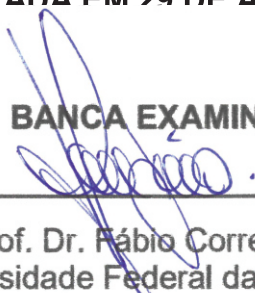
G982a	Gusmão, Isabel Celeste Caires Pereira. AVALIAÇÃO LABORATORIAL E CLÍNICA DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO ÓLEO DE <i>Lippia</i> <i>sidoide</i> Cham PARA O CONTROLE DE PERIODONTOPATIAS / Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão. - João Pessoa, 2019. 130f. Orientador: Fábio Correia Sampaio Tese (Doutorado em Biotecnologia) – UFPB/Renorbio. 1. óleos Essenciais. 2. Doenças Periodontais. 3. Verbenaceae. I. Fábio Correia Sampaio. II. Título. UFPB/BC
-------	---

ISABEL CELESTE CAIRES PEREIRA GUSMÃO

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL E CLÍNICA DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA
CONTENDO ÓLEO DE *Lippia sidoides* Cham PARA O CONTROLE DE
PERIODONTOPATIAS**

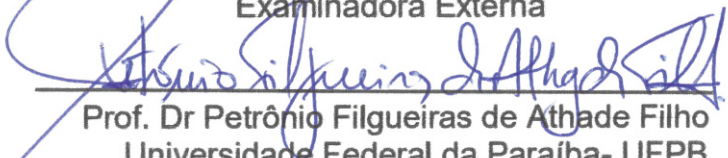
APROVADA EM 29 DE AGOSTO DE 2019

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Universidade Federal da Paraíba- UFPB
Orientador

Profa. Dra Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Universidade Federal de Campina Grande- UFCG
Examinadora Externa



Prof. Dr Petrólio Filgueiras de Athade Filho
Universidade Federal da Paraíba- UFPB
Examinador Externo

Profa. Dra. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima
Universidade Federal da Paraíba- UFPB
Examinadora Externa

Prof. Dr. Enéas Ricardo De Moraes Gomes
Universidade Federal da Paraíba- UFPB
Examinador Interno

Dedico este trabalho a Deus, que sempre
foi o autor da minha vida e do meu
destino. O meu maior apoio nos
momentos difíceis.

Fonte: A autora

AGRADECIMENTOS

AO MEU ORIENTADOR

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Diante de tantos “**Não**” que recebi, quando explicava minha situação de vida, você me disse “**SIM**” na Universidade Federal da Bahia. Nesse momento, acreditei que conseguiria realizar meu sonho profissional, pois **Deus** colocou na minha vida além de um orientador, uma pessoa humana. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

AOS PROFESSORES DA BANCA

Aos professores presentes na banca de qualificação **Dr. Enéas Gomes**, **Dr. Felipe Guerra** e **Dr^a. Caliandra Lima**, por aceitarem o convite e disponibilizarem seu tempo na avaliação do trabalho, além das enriquecedoras considerações.

Aos Professores da Defesa: **Enéas Gomes**, **Caliandra Lima**, **Gláucia Verissimo**, **Petrônio Filho Franklin Forte** que aceitaram ler e avaliar o meu trabalho, com objetivo de acrescentar e contribuir com meu amadurecimento científico.

À FAMÍLIA

Pais e irmãos, pelo incentivo e amor, por sempre acreditarem que seria possível a realização desse sonho.

Ao meu esposo **Márcio Gusmão** e **Giovanna Gusmão** (filha), por toda a paciência, compreensão, carinho e amor. E por dividir mais esse sonho comigo.

À Secretária da RENORBIO, **Francis**, por estar sempre à disposição nos esclarecimentos das dúvidas.

À Equipe do **Labial: Alessandra Estevam, Isabela, Jocianele, Lilia, Mariângela, Alexandre, Micheline, Bruna e Patrícia**, que estiverem sempre presentes na execução do projeto e sempre foram carinhosos e receptivos comigo. O meu muito obrigado e eterna gratidão!

À Equipe da **FOP, Simone Busato, Giovana Boni, Thais Oliveira, Felipe Jóia, Flávia e Janaína Barbosa**, que, no último ano do doutorado, tive a oportunidade de conhecê-los, os quais contribuíram de forma enriquecedora com o desenvolvimento deste trabalho. Além dos Professores. **Dr José Hoofling** e **Dr Rafael**

Stipp, que gentilmente abriram as portas do Laboratório de Microbiologia para a realização das técnicas de Microscopia. O meu agradecimento a todos!!

Ao meu querido aluno de Iniciação Científica, **Mateus Cardoso**, agora doutorando, que sempre esteve presente e muito contribuiu com o projeto.

Aos colegas e amigos da **FAINOR: Dilma, Rogério Vieira, Luísa Santino, Clarissa Teles, Jaqueline Ferraz** e tantos outros, que carinhosamente torceram por mim e com sabedoria me ouviram, quando eu demonstrava momentos de insegurança. Obrigada pelas palavras de incentivo e amizade sempre presente.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia da FAINOR: **Poliana, Luciana e Karine**, que também tinham uma palavra de incentivo e força nos momentos que eu me encontrava mais sensível.

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e a UFPB pela disponibilidade física.

GRATIDÃO A TODOS!

RESUMO

Os óleos essenciais têm sido considerados como uma opção terapêutica promissora nas periodontopatias. O objetivo desse estudo foi desenvolver formulação farmacêutica contendo óleo de *Lippia sidoides* Cham para controle de Doenças Periodontais. O material botânico (folhas) foi coletado do Herbário da Universidade Federal da Paraíba. O óleo foi extraído por arraste a vapor e caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Cepas ATCC de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) e *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) foram utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana do OELS e dos constituintes majoritários por técnica de microdiluição em caldo. A forma farmacêutica desenvolvida foi de pasta de orabase com duas concentrações de OELS: 0,15 e 0,25%. Previamente aos ensaios clínicos, realizou-se experimento de citotoxicidade e avaliação de dano celular por MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) e de biofilme em MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura). O ensaio clínico de fase I foi desenvolvido com 30 participantes que usaram três produtos: orabase placebo (P, n=10), orabase com 0,15% de OELS (A, n=10) e orabase com 0,25% de OELS (B, n=10). As avaliações foram no tempo zero (T0), antes do uso e após 6 horas de uso (T6), e pelas seguintes técnicas: citologia esfoliativa com coloração, contagem de células bacterianas na saliva e testes organolépticos. O RMN e CG-EM mostraram que o timol é o componente majoritário do OELS. Para *A. actinomycetemcomitans*, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OELS, TIM, CAR e CLX foi de 44,23, 48,25 e 28,45 e 0,042 mg/mL, respectivamente. Para *P. gingivalis*, esses valores foram: 39,30, 28,15 e 28,15 e 0,053 mg/mL. As associações com CLX indicaram efeito sinérgico. As imagens por MET mostraram dano de parede celular em ambos os microrganismos. As concentrações de OELS se mostraram citotóxicas no estudo clínico a partir de 0,15mgm/L e 0,25mg m/L. A formulação farmacêutica se mostrou estável em temperatura ambiente. Os resultados preliminares da pasta de orabase de 0,15% (A) indicam menor efeito antimicrobiano em T6, quando comparado com a pasta de 0,25% (B). Por outro lado, em T6 a pasta B resultou em alteração nas células da mucosa jugal, indicando possível efeito inflamatório. Conclui-se que OELS tem efeito antimicrobiano *in vitro* frente aos microrganismos relacionados com doenças do periodonto e tem efeito sinérgico com a CLX. Os experimentos indicam que o OELS possui atividade antimicrobiana *in vitro*, provavelmente relacionada ao componente majoritário (timol). A pasta de orabase com OELS tem potencial para uso clínico. A formulação de pasta orabase com OELS a 0,15% é segura para uso intraoral em curta duração e possui eficácia antimicrobiana *in vivo*. Em adição, a observação de efeito sinérgico do OELS permite inferir que é possível reduzir as concentrações de OELS, quando em associação com CLX, o que pode potencializar o efeito antimicrobiano e, simultaneamente, reduzir a citotoxicidade.

Palavras-chave: óleos Essenciais. Doenças Periodontais. Verbenaceae.

ABSTRACT

Essential oils have been considered as a promising therapeutic option in periodontal diseases. The objective of this study has been to develop pharmaceutical formulation containing *Lippia sidoides* Cham oil for control of periodontal diseases. The botanical material (leaves) was collected from the Herbarium of Federal University of Paraíba. The oil was extracted by steam drag and characterized by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). ATCC strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), and *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) were used to evaluate the antimicrobial activity of OELS and the major constituents by broth microdilution technique. The developed pharmaceutical form was orabase paste with two OELS concentrations: 0.15 and 0.25%. Prior to clinical trials, a cytotoxicity experiment and cell damage evaluation by TEM (Transmission Electron Microscopy) and SEM (Scanning Electron Microscopy) biofilm were performed. The phase I clinical trial was developed with 30 participants who used three products: placebo orabase (P, n = 10), orabase with 0.15% OELS (A, n = 10) and orabase with 0.25% OELS. (B, n = 10). The evaluations have been at time zero (T0) before use and after 6 hours of use (T6) and by following techniques: exfoliative cytology with staining, bacterial cell count in saliva and organoleptic tests. NMR and GC-MS have showed that thymol is the major component of OELS. For *A. actinomycetemcomitans*, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of OELS, TIM, CAR and CLX was 44.23, 48.25 and 28.45 and 0.042 mg / mL, respectively. For *P. gingivalis* those values were: 39.30, 28.15 and 28.15 and 0.053 mg / mL. Associations with CLX have indicated synergistic effect. MET images have showed cell wall damage in both microorganisms. OELS concentrations were cytotoxic from 0.15 to 0.25%. The pharmaceutical formulation was stable at room temperature. Preliminary results of 0.15% orabase paste (A) indicate lower antimicrobial effect on T6 when compared to 0.25% paste (B). On the other hand, in T6 paste B resulted in alteration in jugal mucosa cells indicating a possible inflammatory effect. It has concluded that OELS has antimicrobial effect in vitro against periodontal disease-related microorganisms and has synergistic effect with CLX. Experiments indicate that OELS has antimicrobial activity in vitro, probably related to the major component (thymol). OELS Orabase Paste has potential for clinical use. The 0.15% OELS orabase paste formulation is safe for short-term intraoral use and has *in vivo* antimicrobial efficacy. In addition, the observation of synergistic effect of OELS allows us to infer that it is possible to reduce OELS concentrations when in combination with CLX which may potentiate the antimicrobial effect and simultaneously reduce cytotoxicity.

Keywords: Essential Oils. Periodontal Diseases. Verbenacea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Complexos microbianos no biofilme subgengival.....	25
Figura 2 - Estágios na formação da placa dental	27
Figura 3 - Estrutura química do timol	42
Figura 4 - Estrutura química do Carvacrol.....	43
Figura 5 - Organograma: representação esquemática do delineamento experimental	48
Figura 6 - Microscopia Confocal para Monitorização de Biofilmes de <i>A. actinomycetecomitans</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i>	50
Figura 7 - A – Imagens do controle negativo em biofilme formado de <i>P. gingivalis</i> sem tratamento em microscopia confocal a laser. B-C-D – com os tratamentos do OELS nas concentrações de CIM,2xCIM e 10xCIM, E – controle positivo com a CLX.....	72
Figura 8 - A – Imagens do controle negativo em biofilme formado da <i>A. actinomycetecomitans</i> sem tratamento em microscopia confocal a laser. B-C-D – com os tratamentos do OELS nas concentrações de CIM,2xCIM e 10xCIM, E – controle positivo com a CLX.....	73
Figura 9 - Imagens de MEV de biofilme maduro de <i>P. gingivalis</i> (ATCC 0644). A- B referem-se ao controle do biofilme nos aumentos de 500x e 1000x. C-D biofilme tratado com clorexidina na concentração de 0,12%.	75
Figura 10 - Imagens de MEV, biofilme maduro da <i>P. gingivalis</i> ATCC 0644. E-F referem-se ao biofilme tratado na concentração de 39,30 mg/mL do OELS. G-H- biofilme tratado na concentração de 2XCIM do OELS. I-J- referem-se ao biofilme tratado na concentração de 10XCIM.	76
Figura 11 - Imagens de MEV de biofilme maduro de <i>Aggregatibacter actinomycetecomitans</i> ATCC 29522. A-B referem-se ao controle do biofilme nos aumentos de 500x e 1000x.C-D- biofilme tratado com clorexidina na concentração de 0,12% e E-F- biofilme tratado na concentração de 44,23mg/mL do OELS.....	77

- Figura 12 - Imagens de MEV de biofilme maduro de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522. G-H referem-se ao tratamento do biofilme na concentração de 2XCIM nos aumentos de 500x e 1000x. - referem-se ao tratamento do biofilme na concentração de 10XCIM I-J nos aumentos de 500x e 1000x..... 78
- Figura 13 - Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sob efeito do tratamento com OELS na concentração de 44,23mg/mL. A-B- controle- C-D ação da clorexidina mostrando completa lise. E-F-desintegração da membrana celular na concentração de 44,23mg/mL (seta). 79
- Figura 14 - Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão de *P.gingivalis* sob efeito do tratamento com OELS na concentração de 39,30 mg/mL. G-H- controle- I-J ação da clorexidina mostrando completa lise. K-L- desintegração da célula com extravasamento do conteúdo citoplasmático na concentração de 39,30mg/mL (seta). 81
- Figura 15 - Alterações Celulares Avaliadas em Aumento de 40x nas colorações de Papanicolau e Ácido Periódico- SCHIFF (PAS). M-Placebo no tempo de 1 hora, N- orabase 0,15% no tempo de 1 hora O-orabase a 0,25% no tempo de 6 horas..... 82

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do óleo da <i>L. sidoides</i> Cham e do timol na região de 0,0 a 9,5 MHz	67
Gráfico 2 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do óleo de <i>L. sidoides</i> Cham e timol	68
Gráfico 3 - Representação gráfica dos resultados obtidos após o ensaio de citotoxicidade referentes ao Controle, 0.15%, 0.25%, 0.5% e 1.0% ..	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos antissépticos comumente utilizados nos enxaguantes bucais, seu mecanismo de ação e efeitos colaterais33

Quadro 2 - Classificação dos antissépticos comumente utilizados nos enxaguantes bucais, seu mecanismo de ação e efeitos colaterais55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características Organolépticas do Placebo (P), Pasta 0,15% (A) e Pasta 0,25% (B)	58
Tabela 2 - Análise da Composição Química do óleo essencial ext raído da planta <i>Lippia sidoides</i> Cham	69
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/mL do óleo essencial da <i>Lippia sidoides</i> Cham (OELS) timol, carvacrol e CLX frente aos microrganismos testados	69
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) do OELS (mg/mL) e índice CIF para CLX, Timol e Carvacrol (mg/mL) frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i>	70
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) do OELS (mg/mL) e índice CIF para CLX, Timol e Carvacrol (mg/mL) frente a <i>A. actinomycetecomitans</i>	71
Tabela 6 - Efeito do OELS após diferentes concentrações frente a <i>A. actinomycetecomitans</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> com 5 min de tratamento.	74
Tabela 7 - Contagem de bactérias (UFC/mL) na saliva, de acordo com o grupo experimental no tempo T0- T1 hora- T 6 horas.	83
Tabela 8 - Características dos participantes do estudo	84
Tabela 9 - Percepção dos participantes do estudo, de acordo com o tratamento	85
Tabela 10 - Escores da escala analógica visual da percepção dos participantes do estudo, de acordo com o tratamento	86
Tabela 11 - Escores da escala analógica visual para percepção de reação durante a aplicação do tratamento	86
Tabela 12 - Escores da escala analógica visual para percepção de reação após a aplicação de 6 horas de tratamentoty	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCS	Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde
CG-DIC	Detector de Ionização de Chamas
CG-EM	Cromatografia Gasosa em Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLX	Clorexidina
CMC	Carboximetilcelulose
COX-2	Ciclo oxigenase 2
DEMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença Periodontal
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
FAINOR	Faculdade Independente do Nordeste
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
IL-17	Interleucina 17
IL-1b	Interleucina -1b
IL-1 β	interleucina 1Beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IPeFarM	Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos
LBCM	Laboratório de Cultivo Celular e Molecular
LPS	Lipopolissacarídeo
LtxA	Leucotoxina
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OELS	óleo essencial da <i>Lippia sidoides</i> Cham
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salino
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>

RAR	Raspagem e Alisamento Radicular
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TLRs	Receptores do Tipo Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UNICAL	Unidade de Caracterização e Análise
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1	Doença periodontal	24
2.2	Biofilmes microbianos	26
2.2.1	Periodontite e <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	28
2.2.2	Periodontite e <i>Porphyromonas gingivalis</i>	29
2.2.3	Receptores do tipo TOLL – TLRs em Doença Periodontal	30
2.3	Agentes antimicrobianos bucais	31
2.3.1	Clorexidina	33
2.3.2	Triclosan	34
2.3.3	Substâncias Químicas provenientes de fontes materiais (outros microrganismos, plantas, algas)	35
2.4	óleos essenciais e seus constituintes	35
2.4.1	Variação Sazonal dos óleos voláteis	38
2.4.2	Propriedades Farmacológicas dos óleos essenciais	39
2.4.3	<i>Lippia sidoides</i> Cham	39
2.4.4	Estudo clínico da <i>Lippia sidoides</i> Cham	40
2.4.5	Timol	41
2.4.6	Carvacrol	43
3	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo geral	46
3.2	Objetivos específicos	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	Desenho do estudo	48
4.2	Material Botânico	49
4.2.1	Coleta das Partes Aéreas do Material Botânico	49
4.2.2	Locais da pesquisa	49
4.2.3	Extração do óleo essencial da <i>Lippia sidoides</i> Cham (OELS)	49
4.2.4	Caracterização do OELS	50
4.2.4.1	Cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM)	50
4.2.4.2	Determinação da densidade do OELS, Timol e Carvacrol	51
4.2.4.3	Ressonância magnética nuclear (RMN)	51

4.3	Estudos Microbiológicos <i>in vitro</i>	52
4.3.1	Cepas bacterianas	52
4.3.2	Meios de cultivo.....	52
4.3.3	Inóculo.....	52
4.3.4	Preparação das soluções padrão de timol, carvacrol e óleo essencial .	53
4.3.5	Microdiluição em caldo para CIM	53
4.3.6	<i>Checkerboard</i>	54
4.3.7	Análise por Microscopia a Laser Confocal	55
4.3.8	Análise do Biofilme por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	56
4.4	Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão	57
4.5	Preparo da pasta de Orabase	58
4.5.1	Atividade Citotoxicidade.....	59
4.5.2	Avaliação da Redução do MTT	59
4.5.3	Metodologia experimental	60
4.6	Ensaio clínico de Fase I	60
4.6.1	Considerações éticas.....	60
4.6.2	Delineamento experimental	61
4.7	Coleta da saliva e avaliação antimicrobiana	61
4.7.1	Avaliação de dose (segurança)	62
4.7.2	Interferência na Microbiota.....	63
4.7.3	Avaliação organoléptica	63
4.7.4	Análise estatística	64
5	RESULTADOS.....	66
5.1	Resultados da caracterização do OELS	66
5.2	CIM de <i>P. gingivalis</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i>	69
5.3	Testes de concentração inibitória fracionada (<i>checkerboard</i>).....	70
5.4	Análises por Microscopia Confocal a Laser tratadas com OELS em Biofilme de <i>P. gingivalis</i>	71
5.5	Análises por Microscopia Confocal a Laser tratadas com OELS em Biofilme de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	73
5.6	Análise da Viabilidade Celular do Controle em biofilmes de <i>Porphyromonas gingivalis</i> e <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> pela Microscopia Varredura.....	74

5.7	Microscopia de Transmissão em <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	78
5.8	Análise por Microscopia de Transmissão em <i>P. gingivalis</i>	79
5.9	Avaliação citotóxica <i>in vivo</i> da Pasta de Orabase	82
5.10	Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i> do OELS	83
5.11	Resultados da Avaliação Citotóxica <i>in vivo</i> da pasta de orabase	84
6	DISCUSSÃO	89
6.1	Atividade Antimicrobiana	89
6.2	Citotoxicidade	93
6.3	Ensaio Clínico-Fase I	94
6.4	Ensaio Microscópico	96
7	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	102
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	113
	APÊNDICE B - Questionário: Características Organolépticas	115
	APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	117
	ANEXO A - Certidão do Comitê de Ética (Emenda)	120
	ANEXO B - Registro de Patente	126

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é definida como um processo patológico que afeta os tecidos de proteção e sustentação dos elementos dentais. Possui alta prevalência em adultos, caracterizando-se como uma infecção crônica, que tem como principal agente etiológico as bactérias Gram-negativas (JUIZ et al., 2016).

A Odontologia classifica as periodontites de diversas formas: crônica, agressiva, associada a fatores genéticos e até não especificadas. A forma mais comum é a periodontite crônica, cuja etiologia está relacionada predominantemente pela presença da bactéria *Porphyromonas gingivalis*, um coco-bacilo, Gram-negativo anaeróbio estrito, imóvel e não formador de esporos (JUIZ et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença periodontal apresenta elevada prevalência nas populações de todos os continentes. Ao longo dos últimos anos, foram realizados estudos epidemiológicos associando a prevalência de *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite (AL-GHUTAIMEL et al., 2014). Os fatores de risco relacionados à progressão da periodontite são: idade avançada, hábito de fumar, condição socioeconômica, etnia, doenças sistêmicas, patógenos periodontais tanto em grupos de jovens e adultos acima de 30 anos (HIGHFIELD, 2009).

A prevenção é a melhor maneira de evitar a instalação de uma doença periodontal. Nesses casos, os pacientes estarão mais receptivos às orientações e, com isso, há chance de maior sucesso na prevenção, minimizando os custos financeiros, haja vista a necessidade de retorno do paciente ao centro de saúde (DINELLI et al., 2000).

Dependendo da extensão da doença periodontal, o tratamento pode variar. Se a patologia for diagnosticada precocemente, procedimentos simples (técnicas como raspagem e alisamento radicular) podem ser realizados para remoção do biofilme dental (placa bacteriana) e, dessa forma, controlar a carga periodontopatogênica (ALVES, 2017). Entretanto, a terapia mecânica padrão, por si só, não tem sido capaz de eliminar completamente certos patógenos periodontais, podendo alguns indivíduos apresentarem progressão da doença ou recorrência logo após esse tipo de tratamento (ALMEIDA et al., 2014). Assim, antimicrobianos são necessários como adjuvantes no tratamento das periodontites.

O principal agente antimicrobiano para controle das periodontopatias é o digluconato de clorexidina (CLX) (SANCHEZ et al., 2017). A retenção da CLX na

cavidade bucal, propriedade conhecida como “substantividade” é a chave para a elevada eficácia da CLX como agente antimicrobiano. A retenção de agentes antimicrobianos na cavidade bucal depende de sítios de retenção (biofilmes, mucosa), concentração e duração de aplicação. Devido à elevada substantividade, o efeito satisfatório da CLX no biofilme dental pode ser alcançado em baixas concentrações (0,12%), duas vezes ao dia (JAMES P et al., 2017).

A CLX em altas concentrações é bactericida e causa dano letal à parede bacteriana, inibindo o transporte de açúcar e ação das enzimas responsáveis pela manutenção de um pH intracelular. Porém, seu uso tem sido restrito a poucos dias, devido aos efeitos indesejáveis, como perda de paladar, escurecimento do esmalte dos dentes, descamações na mucosa e, ainda, prejudica a cicatrização de feridas e alterações deletérias ao equilíbrio da microbiota da cavidade bucal (KSHITISH; LAXMAN, 2010).

Devido aos diversos efeitos adversos da CLX, novas formulações estão em processo de avaliação para que possam substituir a CLX. Dentre esses agentes antimicrobianos, podemos citar os óleos essenciais, sendo uma das vantagens atribuída à CLX por apresentar menor toxicidade celular, não apresentando efeitos indesejáveis aos pacientes (JUIZ et al., 2016).

Em estudo *in vivo* usando modelo em animais (rato), o óleo de *Lippia sidoides* Cham (*L. sidoides*) reduziu o edema agudo induzido em orelha com aplicação tópica de 2 mg/2x dia. Os pesquisadores concluíram que o timol é o constituinte presente na *L. sidoides*, sendo, provavelmente, o principal responsável pela atividade anti-inflamatória tópica (VERAS et al., 2016).

Os constituintes dos óleos essenciais, como timol, carvacrol, mentol, entre outros, são promissores agentes antimicrobianos, pois reduziram biofilmes dentais e gengivite em ensaios clínicos com *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella sp*, ocorrendo uma redução da viabilidade celular de 79,2% para 66,3% (FINE et al., 2007). Observou-se que o timol, na forma de um nanogel, inibiu de maneira significativa o crescimento de patógenos relacionados à doença periodontal (BOTELHO et al., 2016).

Diante do exposto, estudos com óleos essenciais e seus constituintes são importantes para a Odontologia e, mais especificamente, para a periodontia, uma vez que podem dar suporte científico para uso de agentes antimicrobianos de controle das periodontites com eficácia e segurança. Em adição, muitos compostos biologicamente

ativos já foram avaliados em estudos laboratoriais *in vitro* e poucos estudos na Odontologia evoluíram para avaliar o potencial biotecnológico dos óleos essenciais e seus constituintes em ensaios de fase I.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença periodontal

A doença periodontal (DP) é definida como uma infecção de natureza polimicrobiana, multifatorial, resultante de um processo inflamatório crônico que afeta os tecidos de proteção e sustentação dos dentes de indivíduos susceptíveis, o que pode resultar na perda do elemento dentário (ESPÍNDOLA, 2016). Sua ocorrência envolve uma complexa interação entre bactérias periodonto-patogênicas, e destas com o hospedeiro (ESPINDOLA, 2016).

Os elementos dentais humanos, assim como de diversos outros mamíferos, estão alojados em uma cavidade (alvéolo) ou processo alveolar. Esses dentes, por sua vez, estão fixados ao processo alveolar por diversos ligamentos periodontais que garantem sustentação dos mesmos na boca. Assim, o tecido do dente, chamado cemento, se liga ao processo alveolar de maneira forte e flexível ao mesmo tempo (HIGHFIELD, 2009).

A gengiva, estrutura que cobre o processo alveolar e parte dos dentes, é composta principalmente de colágeno. O espaço entre o dente e o epitélio gengival é denominado de sulco gengival, cuja profundidade é determinada pelo ligamento periodontal. O periodonto é formado pelo cemento radicular (dente), osso alveolar, gengiva (estrutura tecidual rica de colágeno e que cobre o processo alveolar e parte dos dentes) e ligamento periodontal. Com apoio do periodonto, os dentes ficam firmes no processo alveolar e conseguem suportar as forças mastigatórias de oclusão (ALVES et al., 2007).

A periodontite consiste em uma situação na qual há um dano irreversível ao periodonto, causando a destruição do ligamento periodontal e migração apical do epitélio juncional. Nesse caso, o acúmulo de microrganismos ocorre em camadas mais profundas dos tecidos, levando a uma perda de inserção, pois o tecido conjuntivo é destruído e o osso alveolar é reabsorvido. Além da possível perda de osso alveolar e do próprio elemento dental, a periodontite pode ter repercussões sistêmicas, como doenças respiratórias, cardíacas e eventos tromboembólicos (LUCAS et al., 2018).

Algumas espécies bacterianas da cavidade bucal e do biofilme subgengival estavam intimamente relacionadas entre si e agrupavam-se em complexos, e essas associações dentro desses complexos eram organizadas de forma hierárquica. Os

complexos azul, roxo, amarelo e verde correspondem aos microrganismos condizentes com a saúde bucal em equilíbrio. Entretanto, os complexos laranja e, notadamente, os microrganismos do complexo vermelho estão associados a sítios periodontais e/ou indivíduos portadores de doenças periodontais (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002) (Figura 1).

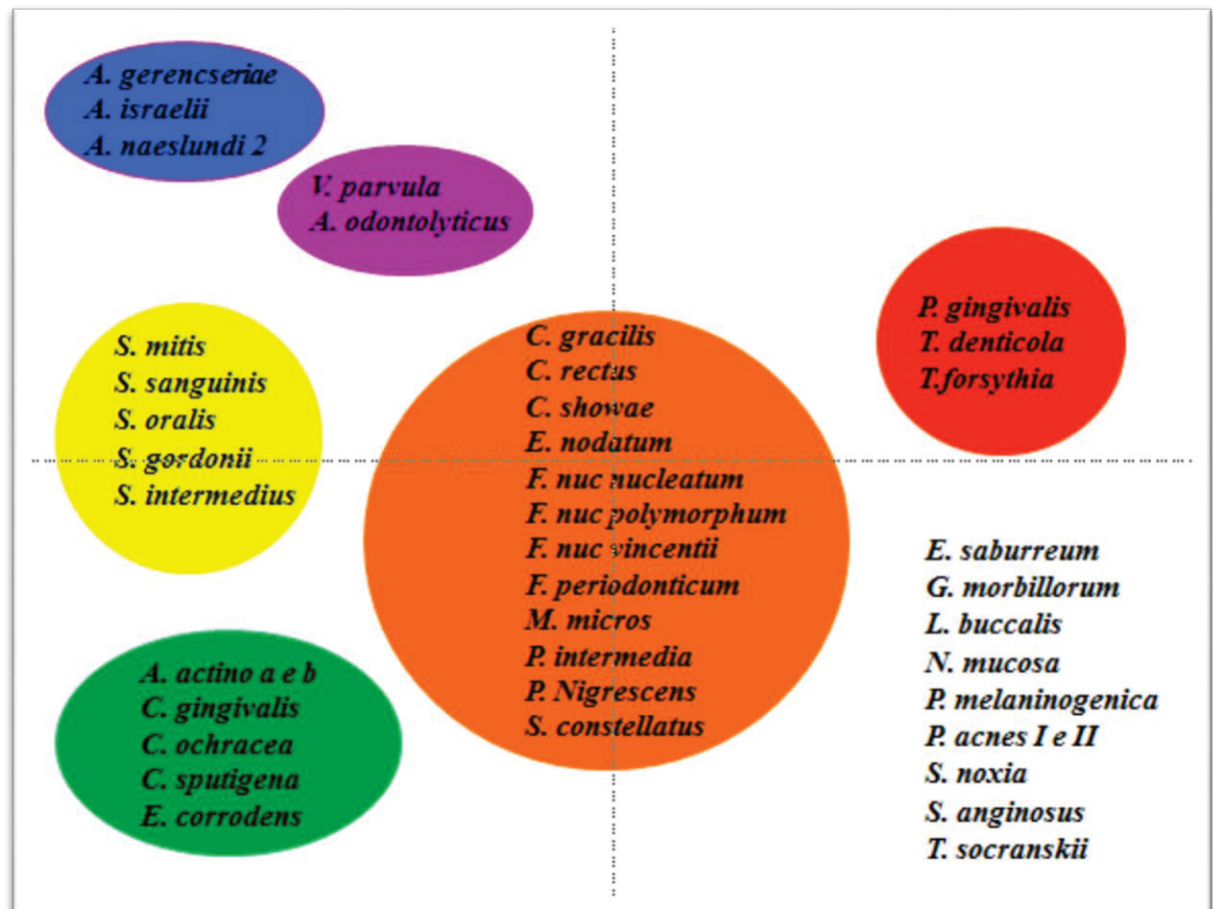


Figura 1 - Complexos microbianos no biofilme subgengival

Fonte: Socransky et al., 1998.

A gengivite não tratada pode progredir para os tecidos de suporte dos dentes, o que acarreta na periodontite em determinados indivíduos susceptíveis, como um resultado de “disbiose” entre esse biofilme e o sistema imune do hospedeiro (ROSIER; MARSH; MIRA, 2018). Na doença periodontal, a disbiose é definida como a interação entre hospedeiro e sistema imune que resulta no surgimento de eventos deletérios ao próprio hospedeiro. Na periodontite, os microrganismos predominantes da microbiota patogênica incluem os membros dos complexos microbianos laranja e vermelho

(*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*), bem como a espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

Atualmente, a saúde periodontal é considerada uma homeostase entre o hospedeiro e a comunidade microbiana, um equilíbrio entre microrganismos comensais e o sistema imune do paciente (LAMONT et al., 2018; MANJI et al., 2018). Portanto, a doença se manifesta a partir da quebra desse equilíbrio.

2.2 Biofilmes microbianos

O biofilme bacteriano é caracterizado como uma comunidade de bactérias, organizada dentro de uma matriz polimérica de glicocálix, que está aderida a uma superfície sólida viva ou inerte. A matriz polimérica do biofilme representa 80% do volume total e é composta principalmente por exopolissacarídeos, proteínas, sais e material celular. Os lipopolissacarídeos representam o maior componente (50-95%) do biofilme, e sua função principal é manter a integridade do biofilme e fornecer o ambiente apropriado para o crescimento das bactérias (SANTOS et al., 2010).

Bactérias em um biofilme são muito mais resistentes aos antibióticos do que as células planctônicas. O biofilme compreende uma série de espécies de organismos comensais na qual há um número indeterminado de microrganismos envolvidos cujas atividades metabólicas sustentam a vida. O mesmo biofilme dental não está em contato apenas com o tecido dental, mas também com o gengival. Alguns metabólitos do metabolismo microbiano estimulam a irritação do tecido gengival, outros são neutros e, talvez, outros estimulem a resposta imunológica no tecido, permitindo a reparação do tecido (MANJI et al., 2018).

A formação do biofilme é um fator de virulência, pois confere maior resistência a fatores nocivos ambientais, incluindo os mecanismos de defesa do hospedeiro, presença de microrganismos concorrentes, presença de substâncias potencialmente nocivas, como antimicrobianos, proporcionando maior chance de sobrevivência no hospedeiro e conferindo também uma maior resistência à ação mecânica (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

O biofilme é dividido em quatro etapas principais: (1) adesão à superfície, (2) produção da matriz extracelular, (3) formação de micro colônias e intensificação da produção da matriz extracelular, e (4) maturação e dispersão. O processo de formação do biofilme inicia-se na película adquirida, onde os colonizadores iniciais interagem

com os componentes glicoproteicos da película adquirida, que iniciam a colonização através de ligações de pontes de hidrogênio, Van der Waals, pontes iônicas e interações hidrofóbicas (JAKUBOVICS; KOLENBRANDER, 2010; HUANG; LI; GREGORY, 2011) (Figura 2).

Espécies de bactérias, tais como: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*, apresentam componentes proteicos em sua parede celular que permitem a adesão a outros microrganismos tardios do biofilme. Os colonizadores, iniciais e tardios, produzem uma matriz extracelular polimérica que facilita a coagregação e coadesão microbiana (KOLENBRANDER et al., 2002).

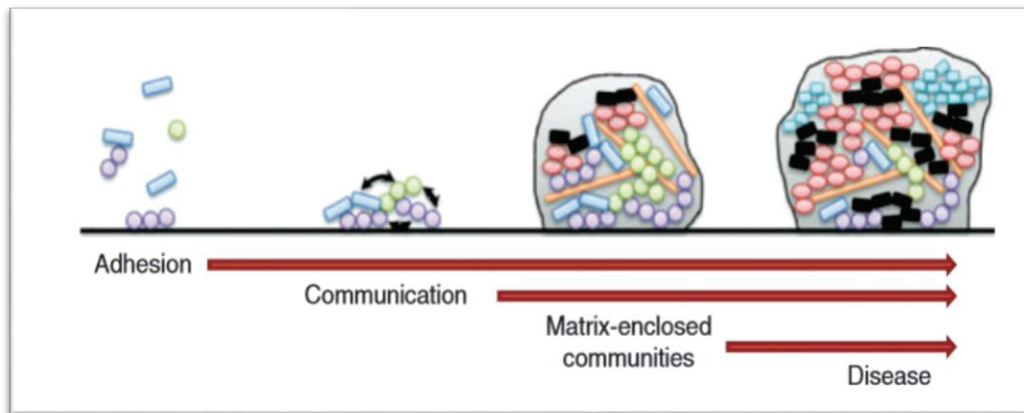


Figura 2 - Estágios na formação da placa dental

Fonte: Jakubovics e Kolenbrander, 2010

Segundo Lamont et al. (2018), microrganismos orais são necessários para formação da cárie, porém, a formação do biofilme patogênico é dependente do consumo frequente de uma dieta rica em açúcar pelo hospedeiro. Outros fatores como má higiene bucal e fluxo salivar também potencializam a formação do biofilme. Assim, a dieta pode modular a ecologia da microbiota oral e o sinergismo polimicrobiano, proporcionando um microambiente altamente estruturado.

Estima-se que mais de 700 espécies de bactérias podem colonizar a microbiota oral de humanos. Essas bactérias agregam e acumulam nas superfícies com tropismos específicos da cavidade oral com interações interbacterianas, resultando em uma estrutura tridimensional, caracterizando um biofilme organizado. Os biofilmes têm revelado uma alta persistência nas infecções e, dessa forma, sendo responsáveis por muitas infecções crônicas (EBERSOLE et al., 2017).

A adesão é o primeiro passo para se entender a formação do biofilme. Através da associação das bactérias, observa-se o progresso da doença no periodonto. Há dois aspectos mecânicos do biofilme que merece atenção: características da adesão e a viscoelasticidade do biofilme. A forma como as bactérias aderem a uma superfície determina a formação do biofilme, afetando o recrutamento de bactérias adicionais (STOODLEY et al., 1999; EBERSOLE et al., 2017).

Estudos microbiológicos investigam o uso de sistemas de cultura celular para explorar o uso e seus produtos na resposta imune celular do hospedeiro (EBERSOLE et al., 2017).

Recentemente, o termo resiliência foi aplicado na cavidade oral como a capacidade de recuperação de perturbações causadas pela gengivite em fumantes e não fumantes. Após o período de recuperação, os fumantes apresentam maiores níveis de espécies bacterianas associadas à periodontite e, consequentemente, uma maior resposta pró-inflamatória. Isso indica que os fumantes apresentam uma diminuição na recuperação em um processo de gengivite (ROSIER et al., 2018).

Através das adesinas, as bactérias desenvolvem um mecanismo de coagregação, que consiste na interação de bactérias que contribui para um complexo microbiano de biofilme de múltiplas bactérias na cavidade oral, tal como *P. gingivalis*, que coloniza esse microbioma coagregando com os colonizadores iniciais, tais como: *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *S. gordonii*, através das fimbrias, e na produção de gingipaina (KOLENBRANDER et al., 2006).

In vivo, na boca, as bactérias existem como biofilmes complexos de múltiplas espécies e, portanto, os estudos *in vitro* têm procurado cada vez mais reproduzir as complexidades dessas interações hospedeiro-biofilme (RAMAGE et al., 2017).

2.2.1 Periodontite e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é uma bactéria microaerófila, capnófila, fastidiosa, Gram negativa, coco-bacilo, e comensal oral em mais de 30%. É o agente etiológico primário da periodontite agressiva localizada, mas pode desenvolver também a periodontite crônica. Seu principal fator de virulência é a leucotoxina (LtxA), que tem seu mecanismo de ação nos leucócitos (CHOUHAN et al., 2017).

Os sorotipos e seus antígenos são importantes na etiologia da doença periodontal, apresenta formas severas da doença, inclusive a periodontite juvenil localizada, demonstrando um início precoce de periodontite rapidamente progressiva. No biofilme, *A. actynomicetecomitans* desenvolve diferentes mecanismos para se desenvolver em ambientes com escassez de nutrientes, utilizando ácido láctico para inibir a captação da glicose. Em culturas de biofilme *in vitro*, pode evitar a competição com *Streptococcus gordonii*, utilizando lactato, um produto da metabolização secundária realizada por *S. gordonii* (MALIK et al., 2018).

A presença de H_2O_2 (água oxigenada), metabólito produzido por *Streptococcus gordonii* na proximidade de *Aggregatibacter actinomycetecomitans*, induz a expressão da catalase, permitindo a *A. actynomicetecomitans* ser mais resistente à ação tóxica da H_2O_2 . A interação polimicrobiana entre essas duas bactérias orais influencia a resistência do biofilme à imunidade inata do hospedeiro (MALIK et al., 2018).

A etiologia da doença é complexa e sua cura é inexistente, embora existam terapias para amenizar sua gravidade. A colonização por *A. actynomicetecomitans* da cavidade bucal é dependente da sua capacidade de adesão aos tecidos orais ou de agregação a outros microrganismos que compõem o biofilme dental por *A. actynomicetecomitans*. Fimbria, Lipopolissacarídeo (LPS) e substâncias poliméricas extracelulares (EPS) contribuem para a formação do biofilme pelo patógeno (KIMUZUKA et al., 2009).

2.2.2 Periodontite e *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis é uma bactéria cocobacilo Gram negativa, anaeróbia estrita, não móvel, com cápsula, assacarolítica que adquire uma coloração preta/escura, característica em placas de gelose de sangue, devido à agregação do grupo heme na sua superfície celular (CASTRO et al., 2017). É um patógeno oportunista, que está ligado a diversas doenças crônicas, tais como diabetes, artrite reumatoide e câncer, e tem a capacidade de promover um ambiente favorável, conduzido por tais patologias (LEE et al., 2018). O progresso da doença periodontal se dá por conta das adesinas, fímbrias, cápsula, lipopolissacarídeos, ácidos lipoteicoicos, gingipaínas, hemaglutininas, proteínas da membrana externa e vesículas (AKITO et al., 2016).

No biofilme subgengival, *P. gingivalis* atua como um colonizador tardio, um processo facilitado por microrganismos como *Fusobacterium nucleatum* e outros colonizadores antecessores (AKITO et al., 2016). Inicialmente, a bactéria adere a uma superfície biótica ou abiótica, produzindo uma superfície inicial, em que o biofilme maduro, através do desenvolvimento de uma estrutura tridimensional, contém microcolônias com diferentes espécies que podem interagir com outras espécies, caracterizando o biofilme maduro. Novas estratégias para tratamento de infecções por *P. gingivalis* têm ocorrido através do entendimento do mecanismo de virulência na formação do biofilme. Aproximadamente, 18% do genoma da *P. gingivalis* é expresso diferentemente, quando está em formação do biofilme, demonstrando a complexidade do desenvolvimento deste (GERITS et al., 2017).

P. gingivalis possui a capacidade de elevar a virulência do biofilme periodontal, modular a resposta do hospedeiro, alterar a estrutura do biofilme e aumentar a carga bacteriana total, contribuindo para a patogenicidade do biofilme (AKITO et al., 2016).

Uma vez invadida, esse patógeno pode manipular a maquinaria do hospedeiro para facilitar sua sobrevivência, através da inibição de uma apoptose intrínseca, através da redução do citocromo “c” e caspase. Na mucosa oral, as células epiteliais têm sido consideradas um nicho intracelular importante para *P. gingivalis*, onde tem apresentado sucesso por invadir, replicar e sobreviver nas células epiteliais humanas e, mais tarde, pode espalhar-se intracelularmente através de estruturas formadas de actina (LEE et al., 2018).

Comparando-se inoculações únicas com *P. gingivalis* (membro do complexo vermelho) a *F. nucleatum* (membro do complexo laranja) e *A. actinomycetemcomitans* (membro dos colonizadores do complexo verde), observou-se a perda óssea mais severa após a inoculação com *P. gingivalis* (MEINOLF et al., 2018).

Nos últimos anos, um número significativo de novos compostos com atividade antibiofilme contra *P. gingivalis* tem sido identificado. Todavia, ainda existem alguns desafios para suas aplicações como potencial de toxicidade e alto custo (GERITS et al., 2017).

2.2.3 Receptores do tipo TOLL – TLRs em Doença Periodontal

Anaeróbios como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia*, estimulam TLRs (Receptores do Tipo Toll), resultando em uma grande

produção de mediadores pró-inflamatórios e, conseqüentemente, a homeostase é interrompida na doença periodontal. Os patógenos periodontais invadem as barreiras do tecido periodontal ativando TLRs e células como macrófago, fibroblastos, osteoblastos e células apresentadoras de antígenos, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (SANGEETHA et al., 2018).

A ativação de TLRs leva ao aumento de neutrófilo e produção de mediadores, como IL-1, IL-6 e TNF- α , desencadeando um papel vital na reabsorção óssea e destruição do tecido periodontal. O aumento da expressão de TLRs por células imunes e células do tecido periodontal é devido à presença de patógenos periodontais, reconhecidos por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (SANGEETHA et al., 2018).

A inibição de citocinas pró-inflamatórias contribui para o influxo dentro do tecido gengival e, como consequência, na prevenção do osso alveolar e reabsorção do cemento (FREIRES et al., 2018). estudo de (BOTELHO et al., 2007), a aplicação combinada do gel *Myracrodruon urundeuva* em 5% e *L. sidoides* 0,5%, durante o período de 11 dias, diminuiu a lesão no tecido periodontal em ratos, como também na diminuição da atividade da mieloperoxidase e inibição significativa do TNF- α e IL-1 β pelo tecido gengival.

Foi observado que os extratos e óleos contendo monoterpenos têm sido frequentemente estudados para melhorar a cicatrização. Timol, carvacrol e óleos essenciais são capazes de modular a produção de espécies reativas, como óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β (COSTA et al., 2018).

Carvacrol inibe a expressão IL-4, IL17 e IL-1b, e COX-2 e TNF- α promove o aumento da IL-10, uma importante citocina antiinflamatória, melhorando o reparo tecidual. Há muito tempo os pesquisadores têm estudado o uso do carvacrol e timol em ensaios *in vitro*. Esses compostos têm um alto potencial no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, sendo já testados em humanos (COSTA et al., 2018).

2.3 Agentes antimicrobianos bucais

O tratamento de pacientes com doença periodontal consiste essencialmente em terapia mecânica que envolve raspagem e alisamento radicular (RAR), diminuindo o biofilme e alterando a composição microbiana do sulco gengival, sendo responsáveis, assim, por eliminar a carga microbiana das bolsas periodontais e

remover fatores etiológicos locais. Entretanto, essa terapia mecânica padrão, por si só, não tem sido capaz de eliminar completamente certos patógenos periodontais, podendo alguns indivíduos apresentarem progressão da doença ou recorrência logo após esse tipo de tratamento (ALMEIDA et al., 2014).

Algumas alternativas como antimicrobianos sistêmicos e locais são utilizados, quando os tratamentos convencionais não respondem. Como exemplos desses fármacos, cita-se a clorexidina, tetraciclina, amoxicilina, penicilina, metronidazol. A associação aos sistêmicos está se tornando cada vez maior, oferecendo uma eliminação de microrganismos, inclusive aos periodontopatogênicos. Contudo, a antibiotecoterapia apresenta efeitos adversos ao paciente, em contrapartida, os óleos essenciais têm apresentado resultados favoráveis, com baixo efeito tóxico celular.

As diversas atividades biológicas dos óleos essenciais ricos em carvacrol e timol vêm sendo consideradas como uma fonte potencial de atividade antimicrobiana. Os estudos demonstram tal atividade para bactérias, como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, assim como para o fungo *Cândida albicans*, um patógeno oportunista, frequentemente encontrado na mucosa de indivíduos normais (OLIVEIRA et al., 2018).

Kadkhoda et al. (2012) observaram uma redução considerável no número de colônias para *P. gingivalis* de 6 a 12 semanas, quando se aplicou o gel de metronidazol a 25%, sendo uma descoberta clinicamente e estatisticamente significativa para inibição do crescimento de bactérias em bolsa periodontal.

Machado, Seixas e Pereira (2016) analisaram o óleo de andiroba frente às bactérias clínicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Salmonella entérica*, e não encontraram atividade antimicrobiana. Para os autores, o mal armazenamento do óleo ou oxidação, devido à presença da luz, contribuiu para a falta de resultado.

As células epiteliais têm secretado vários peptídeos antimicrobianos em resposta a infecções ao uso excessivo de antibióticos que são gerados em doenças periodontais, levando à resistência bacteriana e cepas mutantes. Alguns pacientes não respondem à terapia convencional, por isso, novas estratégias terapêuticas precisam ser desenvolvidas. Uma variedade de substâncias tem sido sugerida para reduzir a infecção bacteriana e, com isso, a cura e regeneração da doença periodontal, sugerindo o uso de compostos com as drogas já existentes (FILIPPIS et al., 2017).

Quadro 1 - Classificação dos antissépticos comumente utilizados nos enxaguantes bucais, seu mecanismo de ação e efeitos colaterais

Antisséptico	Classificação	Mecanismo de Ação	Efeitos Colaterais
Clorexidina	Bisbiguanida	Inibição do transporte de açúcar e produção de ácido, inibição da captação de aminoácidos, síntese de polissacarídeos e funções da membrana celular, inibição da atividade da protease.	Gosto amargo, manchamento de dentes, língua e restaurações, alteração no paladar.
Iodopovidona	Iodopovidona	Oxidação dos grupos amino, triol e hidroxilo fenólico.	Reações alérgicas, coceira, ardor, vermelhidão e bolhas.
Cloreto de Cetilpiridíneo	Quaternário de amônia	Alteração na membrana celular; inibição de crescimento e morte celular.	Alteração na cor dos dentes, restaurações e língua, irritação da mucosa oral
óleos Essenciais	óleos essenciais	Inibição da produção de ácido e crescimento bacteriano; inibição da síntese de polissacarídeos.	Ardor e descamação da mucosa oral.
Triclosan	Fenol	Inibição da produção de ácido e crescimento bacteriano; inibição da síntese de polissacarídeos.	Alergias, alteração hormonal, resistência antimicrobiana.

Fonte: Elaborado pela autora

2.3.1 Clorexidina

A clorexidina é um composto que, na sua estrutura, contém dois anéis clorofenólicos e dois grupos bis-biguanida, ligados simetricamente por cadeias de hexametilenica. Essa bis-biguanida é uma base forte, carregada positivamente, praticamente insolúvel em água. Por isso, seu uso em Odontologia é preconizado em forma de sal digluconato, proporcionando-se maior solubilidade à substância (HORTENSE et al., 2010).

A clorexidina é uma bisguanida carregada positivamente e, por possuir carga catiônica, une-se às paredes celulares microbianas e a outros complexos, alterando o

equilíbrio osmótico do microrganismo (BARBOSA et al., 2017).

A substantividade (retentividade) é a capacidade do produto permanecer retido no local de ação (superfície dental, gengiva e mucosa bucal) ativo, sendo liberado lentamente, evitando-se, assim, que seu efeito seja rapidamente neutralizado pelo fluxo salivar. No tratamento de infecções causadas pela placa dental, a substantividade do agente antimicrobiano é muito importante, uma vez que os agentes necessitam de certo tempo de contato para inibir ou matar um microrganismo. A clorexidina tem se mostrado um efetivo agente antimicrobiano no tratamento de gengivite, dispersor da placa já formada e inibidor da recolonização da placa bacteriana (HORTENSE et al., 2010).

2.3.2 Triclosan

O triclosan é um antimicrobiano químico usado como produto de consumo, como, por exemplo, creme dental, loções corporais, cosméticos. A partir dos anos 1990, o triclosan, cloreto de cetilpiridínio e óleos essenciais, aliados a produtos destinados ao controle da formação do cálculo e de dessensibilização dentinária com a ação de plantas medicinais, passaram a ser extensamente pesquisados (BARBOSA et al., 2017).

O triclosan, que é uma substância muito utilizada nos colutórios bucais, apresenta-se como um fenol sintético, antimicrobiano, aniônico, que possui baixa toxicidade, não tendo capacidade de provocar desequilíbrio na cavidade oral e consegue obter amplo espectro de ação contra Gram-positivos, Gram negativos, *Mycobacterium* e, principalmente, bactérias anaeróbicas. Seu sítio de atuação ocorre na membrana plasmática do microrganismo. Tem a capacidade de desorganizar a membrana celular bacteriana, inibindo sua função enzimática e, em baixas concentrações, modificam o transporte celular, impedindo o adequado metabolismo e reprodução celular da bactéria. Apesar de poder agir como um agente bacteriostático, sua natureza aniônica faz com que possua baixa substantividade, aproximadamente 5h (CASARIN et al., 2012).

2.3.3 Substâncias Químicas provenientes de fontes materiais (outros microrganismos, plantas, algas)

Os antibióticos são substâncias químicas, naturais, com capacidade de impedir a multiplicação de bactérias ou de destruí-las, usados com finalidade de prevenir ou tratar infecções causadas por microrganismos patógenos. Seu uso indiscriminado e indevido, muitas vezes, sem prescrição, sem dose e ou sem indicação, acarreta em uma exacerbada resistência microbiana, ocorrendo, assim, a ineficiência do medicamento. A OMS afirma que o uso indiscriminado de antibióticos pode levar a um retrocesso, pois a mortalidade se evidenciará, uma vez que não mais existirá antibióticos que combatam essas novas superbactérias (SANTOS et al., 2017).

Entretanto, a resistência adquirida é a maior dificuldade que a terapêutica antimicrobiana sofre, isto é, mudanças que se processaram na sensibilidade dos microrganismos que, de sensíveis, tornaram-se resistentes às drogas antimicrobianas (SANTOS et al., 2017).

Os antibióticos influenciam a curva de crescimento microbiano, por isso, são usados para matar os microrganismos. Os bactericidas matam diretamente, enquanto que os bacteriostáticos inibem o crescimento. Na microbiologia, um parâmetro frequentemente medido é a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração de uma droga que inibirá o crescimento visível de um organismo após a incubação, durante a noite. Sabe-se que o efeito dos antibióticos reflete na diminuição enzimática, podendo ser observado na integridade da membrana (FERRER et al., 2017).

2.4 óleos essenciais e seus constituintes

Os principais constituintes dos óleos essenciais são compostos de terpenos, terpenoides, derivados de fenilpropanos e alifáticos com diferentes constituintes, os quais dependem de muitas interações de sinergismos e antagonismos entre si (ZUZARTE; SALGUEIRO, 2015). Possuem, como característica, forte odor e são produzidos por plantas aromáticas a partir do metabolismo secundário, contendo de 20 a 60 constituintes em diversas concentrações. São conhecidos pela fragrância e por possuírem propriedades fungicidas, bactericidas, antivirais e medicinais, podendo

ser empregados como antimicrobianos, analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios (BRITO et al., 2015).

Os óleos essenciais possuem propriedade antimicrobiana, devido à presença de compostos fenólicos. Funciona agindo similarmente à clorexidina, lesando a parede celular do microrganismo, que resulta em morte celular; inibe a síntese enzimática, diminuindo os lipolissacarídeos e o conteúdo proteico da bactéria, podendo, inclusive, extrair endotoxinas de patógenos Gram negativo, diminuindo a patogenicidade do biofilme dental. Uma de suas desvantagens é causar desequilíbrio na microbiota oral e possuir baixa substantividade (CASARIN et al., 2012).

Segundo (OCHENG et al., 2015), os óleos são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, obtidas de plantas pelo sistema de destilação a vários solventes. São amplamente conhecidos por terem efeitos biológicos benéficos, tal como bactericida, fungicida, antiparasitária, viricida, antiseticida e efeitos antioxidantes, além disso, de servirem como alvos, impedindo a resistência dos microrganismos (VEL et al., 2017).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais depende muito de interações de sinergismo e antagonismo entre os compostos, de acordo (NAZARRO et al., 2013).

Os compostos dos óleos essenciais, com suas diferentes concentrações da planta, possibilitam interações sinérgicas e antagônicas entre eles (YUAN et al., 2016).

As técnicas mais utilizadas para extração de óleos essenciais são por hidrodestilação, extração por arraste a vapor, extração com solventes orgânicos, prensagem a frio e extração com fluido supercrítico (SIMÕES; SPITZER, 2003).

O arraste a vapor é o método mais comum na extração dos óleos essenciais. O material vegetal entra em contato com o vapor, passando por uma caldeira, chegando até o extrator. O calor rompe as paredes dos tricomas e o vapor arrasta o óleo para um condensador onde a mistura é resfriada, recolhida e separada (WOLFFENBÜTTEL, 2010).

Os óleos essenciais destroem, de maneira eficiente, os patógenos em vários mecanismos, como a destruição da parede celular com a inibição de enzimas que envolvem a replicação. Listerine contém timol, mentol e eucalipto, sendo o timol e eucalipto antimicrobianos, enquanto o mentol atua como agente de limpeza e anestésico. O óleo essencial presente no Listerine, através de estudos *in vivo* e *in vitro*, inibiram a placa supragengival em 56% e a gengivite em 36%, enquanto a

clorexidina diminuiu a placa em 61% e reduziu a gengivite em 80%, porém, existem efeitos adversos ao uso prolongado da clorexidina (ALLAKER; DOUGLAS, 2009).

Os óleos essenciais também impedem a agregação do biofilme na placa supragengival, impedindo também a liberação da endotoxina pelas bactérias Gram negativas, quando comparado à clorexidina, que atua na parede celular, causando perda do conteúdo celular (ALLAKER; DOUGLAS, 2009).

A forte atividade inibitória do óleo da citronela, nas concentrações de 0,1%, 0,01% e 1%, frente à *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, no uso de repelente de insetos e, para *P. gingivalis*, nas concentrações de 1% e 0,1%, foi observado um efeito moderado, enquanto para bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans*, nas concentrações 0,1%, 0,01% e 1%, também foi observado uma pequena atividade inibitória (OCHENG et al., 2015).

Os estudos com o óleo *Cymbopogon nardus* exibiu uma forte atividade inibitória frente à *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, nas concentrações de 1%, 0,1% e 0,01%, enquanto que o óleo da *Teclea nobilis* da família Rutaceae inibiu o crescimento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, também nas três concentrações do óleo *C. nardus* ($p < 0.0001$), evidenciando uma atividade inibitória, assim como para o óleo *Zanthoxylum chlybeum*, nas concentrações de 1% e 0,1% com ($p < 0.0001$). Esse estudo concluiu que os óleos essenciais mostraram um efeito inibitório para as bactérias periodontopatogênicas, sendo importantes como alternativas para o desenvolvimento de medicamentos para periodontia (OCHENG et al., 2015).

As atividades antimicrobianas dos óleos dependem de um ou dois dos maiores constituintes dos óleos. O maior constituinte de um óleo pode não ser o principal responsável pela atividade antimicrobiana e sim as interações que ele faz com os menores constituintes, apresentando efeitos sinérgicos de atividade antimicrobiana (CHOUHAN et al., 2017).

Avaliando a atividade antimicrobiana de cinco óleos essenciais, compostos de eugenol, carvacrol, timol, p-cimeno, e γ -terpeno, sozinhos ou em combinação com a tetraciclina, na formação de biofilme com *Staphylococcus aureus* ATCC2592 e 12 bactérias isoladas da cavidade bucal de crianças, tais como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, (MILADI et al., 2017) verificaram que, em todos os resultados, ficou evidenciada a atividade antimicrobiana dos óleos, com valores de CIMs variando

de 32 a 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para eugenol e carvacrol; o terpeno foi o menos ativo para os microrganismos testados com CIMs, nos valores de 128 a 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Já o timol foi sensível para os agentes biológicos testados com CIM de 32 a 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Quando associava-se à droga convencional, no caso a tetraciclina com os fitoquímicos, como, por exemplo, p-cimeno e terpeno, houve uma diminuição de 2 a 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no valor da CIM. Portanto, conclui-se que os compostos sinérgicos aumentaram a atividade antimicrobiana da tetraciclina, inibindo o biofilme na superfície do dente, sendo uma boa alternativa na eficácia de medicamentos para microrganismos resistentes (MILADI et al., 2017).

A atividade antimicrobiana dos isolados químicos depende da estrutura química. Grupos fenólicos ou alcoólicos, tais como timol e carvacrol, aumentam o número de conexões, permitindo um grande efeito inibitório no crescimento microbiano. A estrutura lipofílica facilita a penetração do óleo através da membrana, desestabilizando o transporte de íons e solutos, reduzindo o potencial de membrana (VERAS et al., 2016).

De acordo com Lima et al. (2006), as características citotóxicas dos óleos essenciais têm sido objeto de estudo para compreensão dos efeitos frente às bactérias. As citotoxicidades dos óleos essenciais parecem estar relacionadas com a sua capacidade de provocar danos à parede celular, pois, como compostos lipofílicos típicos, passam através da parede e membrana citoplasmática, podendo afetar a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios, permeabilizando as, cuja permeabilização estará associada à perda de íons e à redução do potencial de membrana, ao colapso da bomba de prótons e esgotamento de ATP.

2.4.1 Variação Sazonal dos óleos voláteis

A composição química e o teor de óleo volátil de uma planta são determinados geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão, como característica para seu desenvolvimento. Em uma determinada espécie, o ciclo vegetativo influencia na concentração dos constituintes do óleo, que pode variar significativamente, de acordo com a época da coleta, condições climáticas e solo. A quantidade de metabólitos secundários que são produzidos durante o

desenvolvimento de um vegetal pode ser afetada pela radiação solar, temperatura, solo, ventos fortes e outras formas de stress (BRITO, 2009).

2.4.2 Propriedades Farmacológicas dos óleos essenciais

As propriedades farmacêuticas de plantas aromáticas são parcialmente atribuídas aos óleos essenciais, termo que foi usado pela primeira vez no século XVI por Paracelsus, nomeando o componente efetivo de uma droga com o nome de “quinta essencial”. Em meados do século 20, o papel dos óleos essenciais foi reduzido ao uso em perfumaria, cosméticos e aromas alimentares, enquanto houve declínio na utilização em preparações farmacêuticas. Os óleos essenciais, além de serem produtos utilizados na área de aromas, cosméticos e alimentos, têm despertado o interesse farmacológico de alguns setores da indústria farmacêutica. Isso porque esse produto natural pode estar em abundância na natureza e apresenta diversos efeitos farmacológicos, desde atividade repelente, anti-inflamatória, passando por atividade antiasmática, ansiolítica e atividade anticâncer. Os óleos essenciais têm sido conhecidos por possuir atividade antioxidante e antimicrobiana, servindo, assim, como aditivos naturais em alimentos e produtos alimentares, além disso, alguns óleos essenciais são utilizados na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias (MENEZES et al., 2017).

As propriedades farmacológicas de plantas aromáticas estão bastante difundidas, especialmente no tratamento de infecções microbianas, inflamações, dores, atividades antifúngicas, analgésicas e anti-inflamatórias. A atividade farmacológica dos óleos essenciais é resultante da interação dos diferentes componentes do óleo essencial (BRITO, 2009).

2.4.3 *Lippia sidoides* Cham

Lippia sidoides Cham é uma planta da família *Verbeneaceae*, conhecida como alecrim-pimenta; é um arbusto com um tronco frágil e folhas odoríferas, tipicamente encontrado no Nordeste do Brasil, sendo usado no tratamento de infecções; suas folhas são aromáticas, com flores pequenas e esbranquiçadas, e com frutos pequenos. Os maiores constituintes do óleo da *L. sidoides* Cham são o timol (50 a 59%) e carvacrol (7 a 16%). Outros constituintes do óleo essencial, como myceno,

caryofileno e p-cimeno, também apresentam atividade antimicrobiana (BARBOSA, et al., 2017). O timol também já foi testado sobre o crescimento e viabilidade da *Leishmania amazonenses*, verificando ser o timol de baixa toxicidade para as células do mamífero, podendo ser utilizado no tratamento de leishmaniose cutânea (MORÃO et al., 2016).

As pesquisas têm sido direcionadas na investigação de produtos naturais como fonte de novas moléculas bioativas, devido à disponibilidade dos antimicrobianos para tratar de infecções e doenças, pois os produtos naturais podem afetar o efeito dos antibióticos, aumentando ou reduzindo sua atividade (VERAS et al., 2016). A associação entre produtos naturais e drogas tem apresentado resultados relevantes e promissores, devido, provavelmente, a sua capacidade de interferir na síntese proteica e na parede celular bacteriana, como exemplo, cita-se os flavonoides lipofílicos, que causam a ruptura da membrana dos microrganismos (ALMEIDA et al., 2014).

Foi analisado a atividade antimicrobiana do óleo da *Lippia sidoides* Cham, na concentração de 217,5 mg/mL, e seus compostos fenólicos timol, na concentração de 50 mg/mL e carvacrol 50 mg/mL, através do método de disco de difusão em ágar com as cepas de *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, e *S. mitis* e de *Candida albicans*. Os três compostos testados apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica. A zona de inibição para bactérias cariogênicas variou de 8,5 a 8,7 mm para o óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham; 7,7 a 16 mm para timol; e 7,5 a 15 mm para carvacrol. A zona de inibição para *Candida albicans* foi de 10,6 e 9 mm para o timol e carvacrol, respectivamente. O óleo essencial da *Lippia sidoides* não foi efetivo para inibir o crescimento fúngico e bacteriano na mesma concentração que os monoterpenos fenólicos (BOTELHO et al., 2016).

O timol e carvacrol apresentaram maiores valores de CIM, com valores de 2,5 a 5,0 mg/mL, comparado ao óleo da *Lippia sidoides*, com 5-10 mg/mL, mostrando um efeito inibitório, e o carvacrol de 2,5 mg/mL (KSHITISH; LAXMAN, 2010).

2.4.4 Estudo clínico da *Lippia sidoides* Cham

A *L. sidoides* Cham é indicada como agente antisséptico para pele e superfície de mucosa e infecções de garganta (RODRIGUES et al., 2009). Em um estudo clínico

de fase I realizado em humanos, o óleo essencial da *L. sidoides* Cham reduziu a placa bacteriana e infecção gengival (BOTELHO et al., 2007).

Rodrigues et al. (2009) realizaram em humanos um estudo clinico randomizado duplo cego, que foi conduzido para avaliar o efeito do gel da *L. sidoides* Cham, a 10%, na ação de antigingivite e antiplaca. Esse estudo foi realizado com 02 grupos de estudantes de Odontologia, realizado em duas fases experimentais, em um intervalo de 21 dias. Os participantes foram instruídos a usarem o gel com forma de dentifrício. O gel teve uma boa aceitação, não apresentando nenhum efeito adverso, como reações alérgicas, contudo, não apresentou um bom agente antiplaca, mas foi efetivo no controle da gengivite.

Os estudos de Botelho et al. (2007) mostraram um efeito antiplaca em gel a 1% da *L. sidoides* Cham, baseado em um enxaguatório bucal semelhante à clorexidina, durante 7 dias de tratamento.

Já Lobo et al. (2014) analisaram um estudo duplo-cego em paralelo com um estudo controle, que avaliou três formulações do óleo da *L. sidoides* Cham na redução de *Streptococcus mutans* na saliva de crianças com cárie. As formulações consistiram de: 1,4% de OELS, como forma de dentifrício; 1,4% em forma de gel; 0,8% como enxaguante bucal; 1% de gel de clorexidina ou 0,12% de clorexidina como enxaguante bucal. Nesse estudo, o enxaguante bucal e o gel não demonstraram um efeito significativo na redução de *S. mutans*, provavelmente devido à falta da ação mecânica, além do mais a combinação de agentes químicos, como flúor e produtos naturais, pode potencializar a ação dos agentes antimicrobianos, através do efeito sinérgico na redução e controle da cárie.

A adição de produtos naturais nos dentifrícios pode atuar como coadjuvante no controle mecânico do biofilme dental. No estudo realizado por Lobo et al. (2014), todas as formulações de clorexidina reduziram significativamente *S. mutans* na saliva das crianças, depois de 05 dias de tratamento.

2.4.5 Timol

Os terpenos são compostos hidrogenados de cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas, originados a partir da condensação de unidades do hidrocarboneto isopreno (2-metil-1,3- butadieno). Possui uma estrutura química geral de $C_{10}H_{16}O$ e eles ocorrem como diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (C_{20} , C_{30} e C_{40}), bem como

hemiterpenos (C_5) e sesquiterpenos (C_{15}). Quando os compostos contêm elementos adicionais, geralmente oxigênio é chamado terpenoides. O timol e o carvacrol são efetivos contra os microrganismos, através da ação característica lipofílica na membrana celular, causando a dispersão da cadeia de polipeptídios e, conseqüentemente, a desestabilização da membrana celular (COWAN, 1999).

O timol é um pó cristalino, branco de aroma forte, altamente solúvel em álcool e outros solventes orgânicos. É um importante agente de origem natural e tem gerado um grande interesse na comunidade científica em estudos farmacológicos com seu potencial terapêutico para diferentes doenças (BOTELHO et al., 2007).

Em estudo realizado por Oliveira et al. (2017), foi observado 68,45% do timol, *p*-cymene (10,66%) e caryophyllene (7,28%) na *L. sidoides* Cham, quando se analisou a nanoformulação do óleo da *Lippia sidoides* e timol, que foi o composto majoritário em uma população de *Coleoptera*. Os outros compostos estiveram abaixo de 3% no total do óleo da *Lippia sidoides* Cham.

As baixas concentrações dos compostos timol e carvacrol 3 e 5 mg mL⁻¹ respectivamente do óleo da *Lippia sidoides* Cham, apresentaram reações de sinérgimo (TAK et al., 2016).

Marchese et al. (2016), analisando a atividade antimicrobiana do timol e carvacrol para *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, observaram que o timol foi mais efetivo, apresentando um valor de CIM de 1,0 mmol/L, para *S. typhimurium*; e 1,2 mmol/L, para *E. coli*. O timol é muito utilizado devido as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cicatrizantes, antissépticas, antibacterianas, antifúngicas. Mais recentemente, o timol também foi isolado como maior componente no óleo da *Lippia gracilis*, apresentando um alto poder anti-inflamatório em edemas e peritonites.

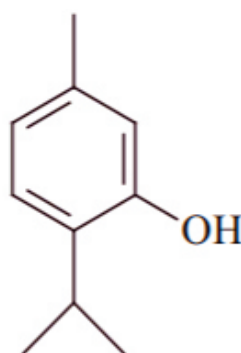


Figura 3 - Estrutura química do timol

Fonte: Souza, Ferraz-Freitas, Oliveira, 2016

2.4.6 Carvacrol

O carvacrol 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol e seu isômero timol 5-metil-2-(1-metiletil) - fenol são monoterpenos encontrados em diversas plantas aromáticas, sendo biossintetizados a partir do γ -terpineno e do p-cimeno. O carvacrol também é conhecido como isopropil-o-cresol, p-cimeno-2-ol, 5-isopropil-2-timol ou iso-timol. Ambos possuem fórmulas moleculares iguais a $C_{10}H_{14}O$ e pesos moleculares de $150,22 \text{ g mol}^{-1}$. Na forma líquida, o carvacrol apresenta uma solubilidade de 830 ± 10 ppm (NOSTRO et al., 2013).

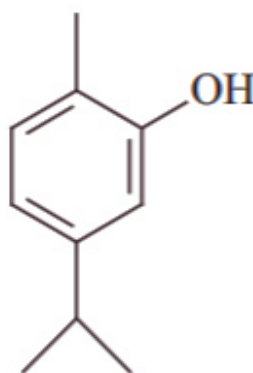


Figura 4 - Estrutura química do Carvacrol

Fonte: Souza, Ferraz-Freitas, Oliveira, 2016

Vários estudos descreveram que o timol e o carvacrol interferiram na formação do biofilme, bem como em células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 com uma MIC de 0,02 a 0,05 mg.mL^{-1} , respectivamente, confirmando o potencial antimicrobiano (SOUMAYA et al., 2011), descrito por vários autores (LAMBERT et al., 2001; COX; MARKHAN, 2007).

O timol, orégano e carvacrol apresentaram um efeito inibitório com as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, observando a desintegração das bactérias (NOSTRO et al., 2013).

O timol e o carvacrol são agentes antimicrobianos promissores na formação de antibiofilme. Diversas estruturas estão envolvidas na formação do biofilme, como: fimbrias, LPS e cápsulas, que são liberadas pelas bactérias, inclusive *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (SOUMAYA et al., 2011). Através desses mecanismos, o crescimento do biofilme envolverá adesão, coagregação,

comunicação pelo sistema de quorum sensing, formação e diferenciação de micro colônias dentro da matriz de expolissacarídeo (GERITS et al., 2017).

Caso ocorra uma desregulação das subunidades da fimbria fimA, a *P. gingivalis*, não consegue formar microcolônias com outros microrganismos, devido à hidrólise da arginina para citrulina, pois a FimA é a fimbria que desempenha o papel de adesão nas células hospedeiras (GERITS et al., 2017).

A atividade anti-inflamatória de extratos e óleos essenciais inibe a formação da proteína gingipaina na *P. gingivalis* e, com isso, afeta a formação do biofilme nas células epiteliais (SOUMAYA et al., 2011).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver formulação farmacêutica contendo óleo de *Lippia sidoides* Cham para controle de Doenças Periodontais.

3.2 Objetivos específicos

- a) Extrair e caracterizar o óleo essencial obtido das partes aéreas da *Lippia sidoides* Cham (OELS);
- b) Investigar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham (OELS), do timol e carvacrol, de forma isolada e em associação com clorexidina (CLX), frente a microrganismos periodontopatogênicos;
- c) Verificar o efeito do OELS sobre o biofilme de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 0644) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522);
- d) Desenvolver a forma farmacêutica, contendo OELS com potencial de uso clínico para controle de doenças periodontais;
- e) Avaliar a citotoxicidade do OELS;
- f) Realizar ensaio clínico de fase I (participantes saudáveis) para avaliação de segurança de uso de produtos odontológicos contendo OELS.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de uma investigação clínica-laboratorial de óleo essencial isolado e incorporado em forma farmacêutica. A parte laboratorial tem apoio em técnicas da microbiologia e o estudo clínico se caracteriza como sendo um estudo de fase I, que é desenvolvido em indivíduos saudáveis. O desenvolvimento deste estudo está condicionado à aprovação prévia do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

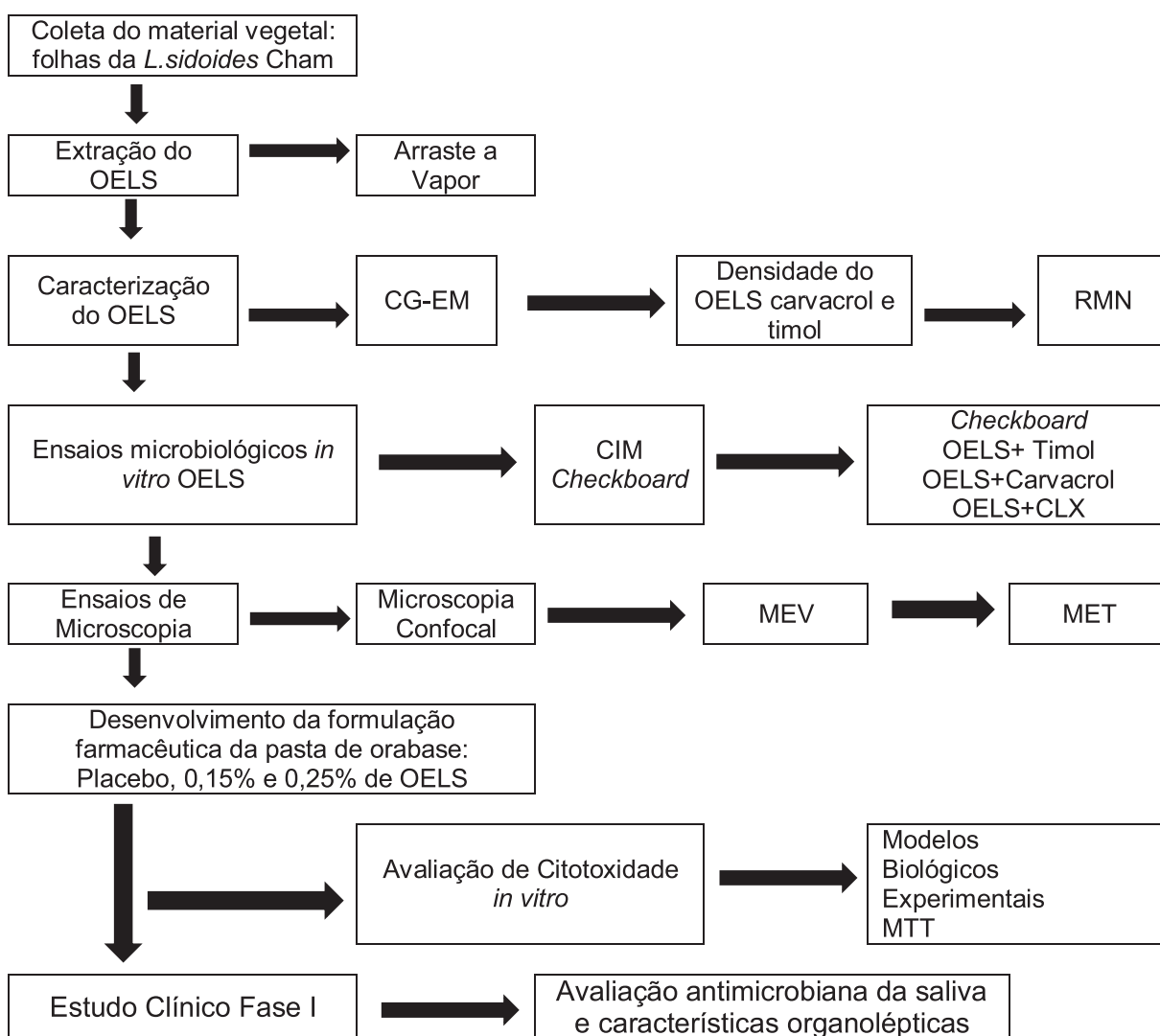


Figura 5 - Organograma: representação esquemática do delineamento experimental

Fonte: Elaborado pela autora

4.2 Material Botânico

4.2.1 Coleta das Partes Aéreas do Material Botânico

O material botânico utilizado para a realização deste trabalho foi coletado sob a supervisão do Engenheiro agrônomo Fernando Viana, no Horto de Plantas Medicinais da UFPB, no Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), sempre que se fizer necessário, obedecendo a época do ano e cronograma definido. A identificação botânica *Lippia sidoides* Cham foi realizada pela Prof.^a Dr.^a Rita B. Lima, e a exsicata foi incorporada sob o número JPB 47237, ao acervo do Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) (UFPB).

4.2.2 Locais da pesquisa

A extração do óleo foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do IPeFarM, no Campus I da UFPB, e a pesquisa microbiológica foi realizada no Laboratório de Biologia Bucal da UFPB. O projeto teve uma base experimental, quantitativo e qualitativo, sendo desenvolvida no período de 2015 a 2019.

O Estudo Clínico foi desenvolvido na cidade de Vitória da Conquista, Bahia. A aplicação do produto (pasta de orabase) e as coletas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Bucal da Faculdade Independente do Nordeste (FAINOR).

4.2.3 Extração do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham (OELS)

A extração do óleo essencial *L. sidoides* Cham foi realizada no laboratório de Fotoquímica, no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB, através de arraste a vapor, utilizando o equipamento Mini destilador de óleos essenciais (Modelo D2-v5.2- Linax) (Figura 6). O óleo foi coletado dia 21/07/2016, às 8h, a partir de 1.197g (peso úmido) das partes aéreas da planta. Ao final, obteve-se 12 mL de óleo essencial.



Figura 6 - Mini destilador de óleos essenciais – Linax (Modelo D2 – v5.2 – Linax)

Fonte: Linax, 2017

4.2.4 Caracterização do OELS

4.2.4.1 Cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM)

Através da análise realizada por cromatografia gasosa, acoplada a espectrometria de massa, a composição química do óleo essencial foi determinada no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), na Unidade de Caracterização e Análise (UNICAL) da Universidade Federal da Paraíba. A análise foi realizada no aparelho CGMS-QP2010 Ultra, da marca Shimadzu, utilizando coluna capilar RTX-5MS (5% Difenil, 95% dimetil polisiloxano), com 30 cm de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 μm . A fase móvel foi composta de hélio e bombeada na vazão de 1,6 mL/min. As condições cromatográficas foram as seguintes: a temperatura do injetor foi de 250°C, iniciando com 60°C, aumentando até 90°C na razão de 5°C/minuto, permanecendo nessa temperatura por 15 minutos, em seguida, aumentando na razão de 20°C/minuto até 280°C. A temperatura do detector e da interface do sistema CG-EM foi de 260°C. O tempo total da corrida foi de 30 minutos. A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por comparação dos espectros de massas do banco de dados do aparelho interligado ao CG-EM, com dados da literatura e com injeção de amostras de substâncias padrão. A quantificação do componente majoritário foi realizada em Cromatógrafo Gasoso

(CG) da Shimadzu, modelo GC17A, com sistema equipado com um injetor automático e Detector de Ionização de Chama (DIC). A coleta de dados e integração foi realizada com o software Class5000. O nitrogênio foi utilizado como fase móvel, sendo bombeado na vazão de 1,6 mL/min. Foi utilizada uma coluna capilar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e a temperatura do forno foi programada para passar de uma temperatura inicial de 60°C, aumentando até 90°C na razão de 5°C/minuto, permanecendo nessa temperatura por 15 minutos e, em seguida, aumentando na razão de 20°C/minuto até 280°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260°C e 280°C, respectivamente. O tempo total da corrida foi de 30 minutos e o volume de injeção foi 1,0 μ L.

4.2.4.2 Determinação da densidade do OELS, Timol e Carvacrol

Utilizando um picnômetro de 5,0 mL, foi determinada a densidade do óleo, onde se adicionou a amostra a 25°C, pesando-a e, em seguida, foi calculada a diferença de peso do picnômetro vazio e do picnômetro contendo a amostra. A partir do valor da massa obtido, a densidade foi calculada, usando a fórmula: densidade é $d=m/V$, em que d é a densidade, m a massa (g) e V o volume (mL):

Densidade do óleo: 0,9432 g/mL, Carvacrol: 0,976 g/mL, Timol: 0,965 g/mL (1)

4.2.4.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Logo após sua obtenção e, antes de ser fornecido para o presente trabalho, o óleo essencial foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) de ^1H e ^{13}C e Cromatografia Gasosa Acoplada a espectrometria de Massa (CG-EM), e quantificado por cromatografia gasosa usando o detector de ionização de chamas (CG-DIC).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos por espectrômetros de Bruker Avance DRX 500, operando para hidrogênio (RMN de ^1H) a 500 MHz e, para carbono (RMN de ^{13}C), a 125 MHz, com a utilização de clorofórmio d_3 (7,24 ppm / 77,0 ppm). Todas as medidas de RMN foram adquiridas a 298K (25°C). Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm com referência aos sinais de solvente residual. As constantes de acoplamento escalar (J) são dadas em Hertz. As seguintes condições foram utilizadas para a gravação de espectros de RMN de ^1H : experiência

de pulso de 30°C; tempo de aquisição de 1 segundo; atraso de relaxamento de 1,0 segundo; largura de varredura 15,1 ppm (8012 Hz); pontos de dados 65536 e varredura falsa. Os dados foram processados usando linha de ampliação de 0,1 Hz. Para cada amostra, 16 varreduras foram registradas. Os decadentes de indução gratuitos foram transformados por Fourier, com o fator de ampliação da linha ajustado em 0,1 Hz, para o aprimoramento da resolução.

4.3 Estudos Microbiológicos *in vitro*

4.3.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas as cepas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), tipo padrão ATCC 29522, e *Porphyromonas gingivalis* (Pg) ATCC 0644 para os ensaios de atividade antimicrobiana, microscopia confocal, varredura e transmissão. Os microrganismos foram adquiridos através da Coleção de Microrganismos de Referência, Instituto Nacional de Controle de Qualidade, Fio Cruz, Rio de Janeiro, Brasil e fazem parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Biologia Bucal da UFPB. Todas as cepas estavam armazenadas em -80°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) da Sigma Aldrich, SP, Brasil, e com 20% de glicerol padrão microbiologia (SP, Brasil).

4.3.2 Meios de cultivo

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliar atividade antimicrobiana foi o caldo BHI suplementado com solução de Hemina 5 mg/mL (Sigma®), extrato de levedura 0,005 mg/mL (Acumedia®) e solução de menadiona 1 mg/mL (Sigma®), adquiridos da Sigma Laboratories, USA, que foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C, por 15 minutos.

4.3.3 Inóculo

Os inóculos das cepas bacterianas, utilizados nos ensaios antimicrobianos, foram obtidos através da preparação de suspensão de tais cepas, com solução salina NaCl (0,85% p/v), estéril, a partir de culturas *overnight*, cultivadas em caldo BHI

suplementado com solução de Hemina 5 mg/mL (Sigma®), extrato de levedura 0,005 mg/mL (Acumedia®) e solução de menadiona 1 mg/mL (Sigma®) a 37°C, por 48h. O inóculo de cada bactéria foi centrifugado por 15 minutos separadamente. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se ao tubo Falcon 5 mL de solução salina estéril para dar início à padronização do inóculo. O inóculo foi padronizado através da leitura de absorbância (Fluor Star OPTIMA, BMG Lab Tech Alemanha) para corresponder a 0,5 da escala de McFarland $\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para a leitura da absorbância, 100 microlitros de cada inóculo foi colocado em placas de 96 poços de fundo chato de microdiluição, com comprimento de onda de 530 nm, sendo o valor de absorbância que corresponde a 0,5 da escala McFarland $\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

4.3.4 Preparação das soluções padrão de timol, carvacrol e óleo essencial

A solução estoque do padrão timol foi preparada, dissolvendo 3mg de timol (SIGMA ALDRISCH) em uma solução de 1mL de Tween 80 a 5% e 1m L de DMSO (dimetilsulfóxido) acrescido de 18 mL água deionizada estéril para uma obtenção de uma solução na concentração de 0,965 g.mL⁻¹ (densidade do timol).

A solução estoque do padrão carvacrol (SIGMA ALDRISCH) foi preparada dissolvendo 3mL do carvacrol em uma solução de 1mL de Tween 80 a 5% e 1m L de DMSO (dimetilsulfóxido) acrescido de 18 mL água deionizada estéril para uma obtenção de uma solução na concentração 0,976 g.mL⁻¹ (densidade do carvacrol).

Para o óleo essencial, foi preparada uma solução estoque através da diluição de 3mL do óleo com 1mL de Tween 80 a 5% e 1m L de DMSO (dimetilsulfóxido) acrescido de 18 mL água deionizada estéril para uma obtenção de uma solução na concentração de 0,9432 g.mL⁻¹(densidade do óleo).

4.3.5 Microdiluição em caldo para CIM

As placas com 96 orifícios com fundo em “U” estéreis (TPP, Brasil) foram preparadas de forma que cada poço tivesse volume final de 100 microlitros, descritas por (ANDREWS, 2001). Nos poços foram distribuídas as soluções de forma a conter as diferentes concentrações dos produtos-teste. O sistema de diluição foi controlado,

por conseguinte, pelo volume da solução-mãe, de forma que obtivesse diferentes concentrações que variassem de 188,6 a 7 mg/mL. Realizou-se o controle de esterilidade do meio e o controle do crescimento do inóculo bacteriano.

As análises foram realizadas em triplicata e incubadas a 37°C, durante 48 horas. Posteriormente, foi realizada a leitura dos resultados e, em seguida, adicionado 20 µL de uma solução 0,01% (p/v) de resazurina sódica (SIGMA, Steinheim, Alemanha), preparada com a água destilada estéril. Nova incubação foi feita a 35-37°C, por uma hora da droga-teste, que promoveu a inibição do crescimento bacteriano, verificado por uma não mudança na coloração.

Para determinar a CBM, alíquotas de 1 µL da cavidade correspondente a CIM, assim como dos três poços anteriores e dois poços posteriores a CIM, para placas com BHI ágar, utilizando o método da gota, incubando as placas a $\pm$ 37°C, durante 48 horas. Após esse período, o crescimento microbiano foi avaliado e a CBM foi determinada como a menor concentração do óleo essencial, para o qual não foi observado crescimento microbiano. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética dos valores de CBM, obtidos nos ensaios (KLEPSEK et al., 1998).

4.3.6 Checkerboard

O teste de diluição *Checkerboard* foi conduzido para avaliar a atividade combinada entre óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham e clorexidina; timol e clorexidina; e carvacrol e clorexidina. Inicialmente, cada poço da placa de 96 poços (Kasvi®, Brasil) recebeu 100 µL de caldo BHI. Em seguida, a primeira linha da placa recebeu 100 µL do óleo essencial ou timol ou carvacrol, na concentração de 2 x CIM, e procedeu-se a diluição seriada no sentido vertical. Na primeira coluna, foram dispensados 100 µL de clorexidina, seguindo a diluição no sentido horizontal até a coluna 10.

A coluna 11 serviu para diluição seriada do óleo, timol e carvacrol, enquanto a coluna 12 recebeu diluição da clorexidina, iniciando em concentração 2 x CIM. Antes de incubar na estufa microbiológica, a 37°C, por 24-48h, os poços receberam 10 µL de inóculo de *P. gingivalis* ou *A. actinomycetemcomitans*, padronizadas na escala 0,5 de Mc Farland. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi visualizada pela adição de 35 µL do corante indicador resazurina a 0,01%. Considerou-se a CIM

combinada e confirmou-se a CIM isolada como sendo a menor concentração das soluções na qual o corante permaneceu azul.

Diante dos valores de CIM, calculou-se o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) pela relação entre CIM de cada droga em combinação e a CIM da mesma droga isolada. A soma dos ICIFs das duas drogas testadas na interação gerou valor interpretado, conforme o Quadro 2 a seguir (LEWIS et al., 2002; BERDITSCH et al., 2015).

Quadro 2 - Classificação dos antissépticos comumente utilizados nos enxaguantes bucais, seu mecanismo de ação e efeitos colaterais

Interpretação para CIF	Conceito	Resultados do CIF
Sinergismo	Ação combinada de dois ou mais substâncias que melhoram o resultado de um processo.	$\leq 0,5$
Aditividade	Quando uma substância é adicionada para melhorar o rendimento de uma propriedade.	$>0,5$ e < 1
Indiferença	Quando uma substância é adicionada e não interfere no rendimento do processo	≥ 1 e < 4
Antagonismo	Quando uma substância inibe a ação de uma outra substância.	≥ 4

Fonte: Elaborado pela autora

4.3.7 Análise por Microscopia a Laser Confocal

A técnica da Microscopia Confocal a Laser foi realizada de acordo com o protocolo de Jóia, 2017. Para análise do efeito do óleo essencial da *L. sidoides* Cham no biofilme de *P. gingivalis* W83 e *A. actinomycetecomitans* ATCC 29522 por Microscopia Confocal a Laser, o inóculo foi ajustado, resultando em uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, padronizado na absorbância de (530 nm) por 48hs, os quais foram cultivados sob condições de anaerobiose em BHI-TSB, suplementado com hemina e vitamina K, a 37°C (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂), por 24h (MiniMacs Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Shipley, UK).

A estrutura do biofilme foi analisada por Microscopia de varredura Laser Confocal, usando lâminas de vidro (Lab-Tek Chamber Slide™ 177399; Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), revestido com CaCl₂ (0,8 mg/cm²) para sensibilizar as placas de Chambers, por 24hs. Em seguida, as Chambers foram incubadas com caldo BHI-TSB com o inóculo da *P. gingivalis* e *A. actinomycetecomitans*, separadamente (A_{530nm} = 0.5), por 24h, e lavados com NaCl a 0.9%, após o período de incubação.

Após a lavagem, foi depositado o óleo até cobrir totalmente o biofilme no tempo de 5 min. Foi adotado esse tempo, pois não seria conveniente que a pasta de orabase, proveniente do óleo da *L. sidoides* Cham que será utilizado em doença periodontal e gengivite, ficasse mais tempo na mucosa do paciente. Os grupos que foram analisados para análise do óleo da *L. sidoides* na Microscopia Confocal e de Varredura foram:

- a) 1° Grupo de Tratamento: CIM;
- b) 2° Grupo de Tratamento: 2X CIM;
- c) 3° Grupo de Tratamento: 10X CIM;
- d) Clorexidina a 0,2% como controle positivo;
- e) Sem tratamento: Meio mais inóculo.

Esses grupos foram escolhidos com base nos trabalhos de Sardi (2017), nos quais foi necessária que a concentração da substância-teste fosse superior ao valor da CIM, para que o antimicrobiano penetrasse no biofilme.

Em seguida, os biofilmes foram corados com Live/Dead BacLight (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), que consiste em dois nucleotídeos, o SYTO 9 (cora as bactérias viáveis em verde) e o iodeto de propídio (cora bactérias não viáveis em vermelho), cobrindo todo o biofilme de cada amostra. Os corantes foram excitados a 488 nm e as imagens Z-stack foram capturadas com incrementos de 1 µm (espessura média da bactéria), sob uma objetiva de 20x (Microscópio LEICA TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). A reconstrução tridimensional, a cobertura e a viabilidade foram avaliadas com o software Fiji, versão 2.0.0-rc-54 / 1.51i (Fiji, Image J, Wayne Rasband Institutos Nacionais de Saúde) (JÓIA, 2017).

4.3.8 Análise do Biofilme por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Para análise do efeito do OELS no biofilme de *P. gingivalis* e *A. actinomycetecomitans* por MEV, o inóculo foi ajustado igualmente ao descrito anteriormente no ensaio de biofilme, para Microscopia Confocal a Laser.

- a) Em uma placa de biofilme estéril de 24 poços de poliestireno, foi acrescentado em cada poço uma lamínula estéril de vidro circular (10x10 mm). Foi adicionado o inóculo de *P. gingivalis* e *A. actinomycetecomitans*, ambos padronizados na escala de MacFarland (0.5), para que cobrisse a lamínula e, posteriormente, acrescido de 1,5 mL de meio de cultura BHI-

TSB. O inóculo estava em overnight por 24h, pois foi analisado o biofilme maduro de 24h, por tratar-se de bactérias periodontopatogênicas, que não são colonizadores iniciais da superfície do elemento dentário;

- b) Incubou a placa em condições de anaerobiose, a 37°C (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂), por 24h (MiniMacs Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Shipley, UK);
- c) Em seguida, foi retirado o meio de cultura, deixando a lamínula com o biofilme formado (Biofilme maduro de 24h);
- d) Posteriormente, foi adicionado o tratamento (óleo da *L. sidoides* Cham) nas concentrações de (CIM), (2 X CIM) e (10 X CIM) em triplicata, por 5 min;
- e) Em seguida, as amostras foram fixadas com Glutaldeído a 2% (Sigma-Aldrich), de modo que cobrisse todo o biofilme por 30min, seguido de secagem em temperatura ambiente;
- f) Os espécimes foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e 100%) por 10 minutos. As lamínulas são coladas sobre *stubs* (3x3cm) para serem metalizadas com ouro;
- g) Os espécimes foram armazenados em dessecador para subsequente observação em MEV (JEOL, JSM 5600LV, Japão). Para o controle, foram adicionadas apenas amostras de clorexidina a 2% com o inóculo (DUQUE et al., 2011) e sem tratamento.

4.4 Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão

Visando examinar os efeitos dos compostos nas estruturas externas das células bacterianas foi realizada a Microscopia Eletrônica de Transmissão que permite a visualização dos possíveis danos que o óleo pode causar nas bactérias. Após o crescimento em meio de cultura TSB+BHI *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* por 48hs em anaerobiose, as amostras foram incubadas juntamente com o óleo essencial na concentração da CIM 39,3mg/ mL para *P. gingivalis* e 44,23 mg/mL por 5 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 6 minutos a 13.000 rpm para a formação dos pellets e incubados com fixador de Karnovsky por 36 horas. Após o período de fixação, a amostra foi lavada com solução salina 0,9% para remover o fixador e lavadas com tampão fosfato de Sorensen 0,1M. Em seguida, as amostras foram tratadas com tetróxido de ósmio 1% por 4 horas, seguido de 3 lavagens de 5

minutos de tampão Sorensen 0,1 M e posteriormente a desidratação com acetona (Merck) 30%,50%,70%,90% e 100% com 5 minutos cada.Em seguida, as amostras foram infiltradas gradativamente em resina Dr Spurr até a inclusão em resina e secagem estufa 60-70°C.Após esse período as amostras foram cortadas em ultramicrotomo, contrastadas com chumbo e uranila e lidas em microscópio eletrônico de transmissão, JEM 1400 JEOL. As amostras foram levadas para o centro de aquisição e processamento de imagens CENTRO DE MICROSCOPIA E IMAGEM – CMI – FOP – UNICAMP sendo analisadas através da microscopia eletrônica de transmissão - Jeol a 80 kV JEOL, Tokyo, Japan (JÓIA, 2017 ; SPÍNOLA et al., 2018).

4.5 Preparo da pasta de Orabase

As três pastas preparadas foram primeiramente identificadas pelas suas características organolépticas, as quais estão descritas na tabela 1.

No presente estudo, foram preparadas pastas de orabase com vaselina e carboximetilcelulose (CMC) e, ainda, com e sem OELS (0%, 0,15% e 0,25%). No caso do placebo, foi utilizado óleo mineral. O detalhamento da preparação e concentração desses e de demais constituintes não será apresentado, por questões de sigilo de pedido de patente (ANEXO B). Após a formação de uma mistura homogênea, as pastas foram armazenados em tubos de plástico de 5 e 10g, e armazenados na geladeira a 6-8°C.

Tabela 1 - Características Organolépticas do Placebo (P), Pasta 0,15% (A) e Pasta 0,25% (B)

Características Organolépticas	Código e Concentração de OELS		
	P	A	B
	0% (Placebo)	0,15%	0,25%
Cor	Branco	Branco	Branco
Odor	-	Alecrim	Alecrim
Aspecto	Viscoso	Viscoso	Viscoso
Consistência	Oleosa	Oleosa	Oleosa

Fonte: Elaborado pela autora

4.5.1 Atividade Citotoxicidade

O cultivo celular foi realizado conforme protocolo padrão do Laboratório de Cultivo Celular e Molecular (LBCM), do Centro de Biotecnologia da UFPB, coordenado pelo Professor Doutor Demetrius Antonio Machado de Araújo. Foi utilizada a linhagem L929 (fibroblasto murino), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Essas células foram cultivadas em frascos estéreis (25 cm²), contendo meio DEMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium) (Life Technologies, Gibco-BRL), de acordo com as especificidades de cada cultura, acrescido dos antibióticos: penicilina 100U/ml e estreptomicina 100µg/ml (Sigma), e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA). Os frascos foram mantidos em estufa de células, a uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e temperatura controlada de 37°C.

O crescimento celular foi monitorado, diariamente, em microscópio óptico de inversão. A troca do meio de cultura foi realizada a cada dois dias. Quando as células atingiam uma confluência de 90%, realizava-se uma subcultura ou armazenamento das células em freezer -80°C e nitrogênio líquido, para as linhagens aderentes, as mesmas foram dispersas, utilizando uma solução de tripsina – EDTA (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, EUA) (0,25% /0,02%) para ressuspender as células das garrafas de cultura.

Todos os procedimentos do cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo-se os protocolos para assegurar ausência de contaminação dos materiais. Antes da realização dos experimentos, as células foram contadas em hemacitômetro, utilizando-se o reagente azul de tripan, o qual tem a capacidade de penetrar nas células, cujas membranas encontram-se danificadas, corando, assim, de azul as células inviáveis, e os experimentos só foram realizados quando as células em análise atingiram uma viabilidade superior ou igual a 90%.

4.5.2 Avaliação da Redução do MTT

O brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) é um ensaio colorimétrico utilizado para mensurar, de forma indireta, a citotoxicidade, a proliferação e/ou viabilidade celular. O MTT permite avaliar a capacidade das células metabolicamente ativas converterem o sal de tetrazólio, que tem cor amarela e é

solúvel em meio aquoso, em cristais de formazana, que tem cor púrpura e é insolúvel em meio aquoso, uma reação de redução intermediada pela enzima succinato desidrogenase. A intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

4.5.3 Metodologia experimental

As células de fibroblastos gengivais humanas foram semeadas em placas com 96 poços, nas concentrações de 3×10^4 células/mL, utilizando-se meio *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Life Technologies, Gibco-BRL). Os óleos foram diluídos com Tween 80® 5% para atingir as concentrações do estudo (OELS 0,15% e 0,25%), que foram adicionados aos poços. Foi realizado o controle negativo (200 µL de células e meio/poço), o branco (200 µL de Dodecil Sulfato de Sódio, SDS/poço). As células foram incubadas com os óleos em estufa a 5% de CO₂ e 37°C, por 24h horas. Após esse período, as células foram centrifugadas (5 min) e o sobrenadante foi retirado, os poços foram lavados com PBS e colocou-se o MTT a 5 mg.mL⁻¹. Após 3 horas, o sobrenadante foi removido e uma solução contendo 10% SDS foi acrescentada para solubilizar os cristais de formazana. Posteriormente, aguardou-se o formazana ser dissolvido, e registrou-se a absorbância em espectrofotômetro de placa tipo ELISA, com um filtro de 570 nm (SILVA et al., 2016).

4.6 Ensaio clínico de Fase I

4.6.1 Considerações éticas

Esse projeto foi executado de acordo com os preceitos determinados pela Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, e pela Resolução CFO 179/1993 do Código de Ética Profissional Odontológico. O protocolo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob o número CAAE: 83179618.8.0000.5188 (APÊNDICE A). Os resultados encontrados tem interesse estritamente científico, sem exposição de qualquer indivíduo inserido na população estudada. O registro do ensaio clinico (WHO) com a pasta de orabase é **The Universal Trial Number (UTN) is U1111-1238-2958.**

4.6.2 Delineamento experimental

Trata-se de um estudo descritivo clínico, randomizado intervencionista, duplo-cego, envolvendo indivíduos saudáveis. Os critérios de inclusão foram: voluntários saudáveis, que não apresentassem nenhuma patologia bucal, maiores de 18 que desejassem participar do estudo. Os critérios de exclusão foram: voluntários com alterações sistêmicas, apresentando lesões em cavidade oral em tratamento com antibiótico, fazendo uso de colutórios com substâncias antimicrobianas. Essa análise foi realizada por um Odontólogo da Faculdade Independente do Nordeste (FAINOR).

4.7 Coleta da saliva e avaliação antimicrobiana

A população do estudo foi composta de 30 indivíduos, divididos em 3 grupos (P, A, B), os quais foram submetidos à utilização do produto teste (Placebo, Pasta de Orabase) à base de *L. sidoides* Cham, nas concentrações de 0,15% 0,25%, associado ao óleo essencial da *L. sidoides*. Os grupos receberam o placebo, ou seja, uma preparação sem adição de óleo essencial de *L. sidoides* Cham. Os participantes do estudo foram alocados de forma aleatória, sendo necessária à coleta da saliva e do esfregaço da mucosa bucal nos tempos de 1 hora e 6 horas da utilização do produto-teste. Os voluntários saudáveis assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e, ao final da coleta, responderam ao questionário sobre as características organolépticas dos produtos (APÊNDICE A).

A aplicação do produto e as coletas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Bucal da FAINOR/BA. O produto teste foi aplicado com o auxílio do swab estéril, em toda a mucosa jugal do paciente.

Para coleta da saliva, foi utilizado o método da expectoração ou “método do cuspe”, que é utilizado para medição do fluxo salivar, através da saliva que é expelida e coletada em um tubo graduado. Para isso, após secagem da boca com gaze estéril, o voluntário permaneceu durante três minutos sem deglutir e, ao final, expeliu toda a saliva armazenada na boca em um tubo coletor estéril. A saliva coletada, antes e após a utilização do produto, foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm, e o sobrenadante foi diluído com solução salina 0,9% estéril. As soluções foram diluídas a 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} e plaqueadas em BHI Ágar suplementadas e então incubadas a 37°C, por 24h, para

verificação do crescimento bacteriano através da contagem das colônias expressas em UFC/mL.

4.7.1 Avaliação de dose (segurança)

Para avaliação de segurança do produto, observou-se o efeito da pasta, quando aplicada na mucosa jugal do participante. A análise citomorfológica foi realizada na coleta do esfregaço da mucosa bucal, onde cada participante foi instruído a lavar a boca com água destilada esterilizada, e a mucosa bucal foi seca com gaze esterilizada para remover detritos superficiais e excesso de saliva. Os esfregaços foram obtidos da mucosa bucal clinicamente saudável dos voluntários, usando o método de esfoliação mecânica. Nesse procedimento, uma espátula de madeira com ponta estendida e umedecida em água destilada foi introduzida na boca dos participantes, sob visão direta e, em seguida, a espátula foi girada na superfície da área da mucosa bucal, selecionada sob pressão, por 2 a 3 vezes. As raspagens obtidas foram transferidas para lâminas de vidro limpas e secas, previamente rotuladas com o número de referência do participante e do grupo experimental. Cada raspagem foi colocada no meio da lâmina, espalhando por toda a área, formando uma camada fina e uniforme para evitar aglomeração de células. As lâminas foram imediatamente fixadas, usando álcool etílico 70%. Todos os esfregaços preparados foram corados com Papanicolau (Pap), usando o protocolo de rotina. A coleta do esfregaço da mucosa bucal foi realizada antes e após 6 horas depois do uso do produto-teste.

Os esfregaços foram preparados seguindo a seguinte ordem: Etanol 80% de 5-10 mergulhos, etanol 70% de 5 a 10 mergulhos, etanol de 50% de 5 a 10 mergulhos, água destilada de 5 a 10 mergulhos, Hematoxilina de Harris de 1 a 5 minutos, Água destilada de 5-10 mergulhos, Diferenciar em álcool-ácido com 3 mergulhos, água destilada de 5 a 10 minutos, Banho de Água amoniacal com 5 mergulhos, água destilada de 5 a 10 mergulhos, etanol 50% de 5 a 10 mergulhos, etanol 70% e 95 % de 5 a 10 mergulhos, Orange por 1 minuto, etanol a 95% de 5 a 10 mergulhos, eosina EA 65 com 5 minutos, etanol 100% I, II, III de 5 a 10 mergulhos, Xilol I, II, III de 5 a 10 mergulhos.

Para avaliações citomorfológicas, os esfregaços corados foram fotografados independentemente por uma câmera acoplada sob um microscópio de luz comum,

por um citologista. As lâminas foram examinadas microscopicamente, de maneira escalonada. Foram selecionadas 50 células desdobradas de contagem manual e claramente definidas, com coloração adequada, por amostragem sistemática, movendo o estágio do microscópio da esquerda para a direita, seguida para baixo para evitar a repetição de células de diferentes campos em um aumento de 40x. Foram observadas alterações nucleares como células discarióticas, aumento nuclear com ou sem hiperchromasia, cromatina nuclear irregular, aumento da relação núcleo/citoplasma, binucleação ou multinucleação, fragmentação nuclear, micronúcleo e halo perinuclear e alterações nos citoplasmas como presença de glicogênio citoplasmático e vacuolização citoplasmática (SALIR et al., 2017).

4.7.2 Interferência na Microbiota

A eficácia do produto foi mensurada na capacidade da pasta em reduzir carga bacteriana total em amostra de saliva. Para coleta da saliva, foi utilizado o método da expectoração ou “método do cuspe”, que é um método geralmente utilizado para medição do fluxo salivar, através da saliva que é expelida por uma cuspe e coletada em um tubo graduado. Foi padronizado da seguinte forma: após secagem da boca com gaze estéril, o indivíduo permaneceu durante três minutos sem deglutir e, ao final, cuspiu toda a saliva armazenada na boca em um tubo coletor estéril. A saliva coletada antes e após a utilização do produto foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm e o sobrenadante foi diluído com solução salina 0,9% e incubadas a 37°C, por 24h, para verificação do crescimento bacteriano e contagem das colônias expressas em UFC m/L (SALIR et al., 2017).

4.7.3 Avaliação organoléptica

Os participantes da pesquisa foram instruídos a preencher um questionário sobre as características organolépticas do produto testado (APENDICE B). Foram avaliados a aparência, consistência, aplicação, sabor e odor do produto, se ele causa aumento de salivação e efeitos durante ou após o uso do produto.

4.7.4 Análise estatística

Utilizaram-se procedimentos da estatística descritiva para expressar os resultados como medidas de tendência central (média ou mediana) e dispersão (desvios padrão ou amplitude interquartil). A normalidade dos dados foi testada por meio do teste Shapiro-Wilk, enquanto que a homocedasticidade foi verificada por meio do teste de Levene. As comparações entre os grupos foram testadas por análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguida pelo teste de Tukey, para comparações múltiplas, ou pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Mann-Whitney, para comparações entre pares. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$) e as análises foram realizadas no IBM SPSS *Statistics* para *Windows* (IBM SPSS. 21.0, 2012, Armonk, NY: IBM Corp.).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da caracterização do OELS

A análise do óleo essencial extraído das partes aéreas da *L. sidoides* Cham, através do CG-EM, resultou na identificação de diversos compostos (Tabela 2), sendo o timol (70,77%) o composto majoritário, seguido de p-cimeno (5,52%), γ -terpineno (2,38%) e β -mirceno (1,64%). A presença de timol no óleo essencial foi confirmada através da análise do RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) dos padrões e das amostras, uma vez que os sinais característicos dessa substância foram observados nos espectros do óleo, sendo esses três sinais na região de prótons aromáticos, um duplo dubleto em δ_{H} 7,13 (1H, $J = 1,6$ e $7,6$ Hz; H-6); um dubleto em δ_{H} 6,78 (1H, $J = 7,6$ Hz; H-5) e um singleto em δ_{H} 6,60 (1H; H-2); um sinal em δ_{H} 4,72 (1H, s; OH), característico de hidrogênio de hidroxila; dois multipletos em δ_{H} 3,22 (1H; H-8) e δ_{H} 1,29 (6H, H-9 e H-10), característicos de grupo isopropil; e um singleto em δ_{H} 2,31 (3H; H-7), característico de metila ligada ao anel aromático. O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) também corroborou a presença do timol, ao apresentar seis sinais característicos de carbonos aromáticos, sendo três metínicos (δ_{C} 126,44; 121,88; 116,24) e três não hidrogenados (δ_{C} 152,71; 136,80; 131,55); dois sinais em δ_{C} 26,92, para um carbono; e em δ_{C} 22,88, para 2 carbonos, atribuídos ao grupo isopropil; e um sinal em δ_{C} 21,06, atribuído a metila ligada ao anel aromático.

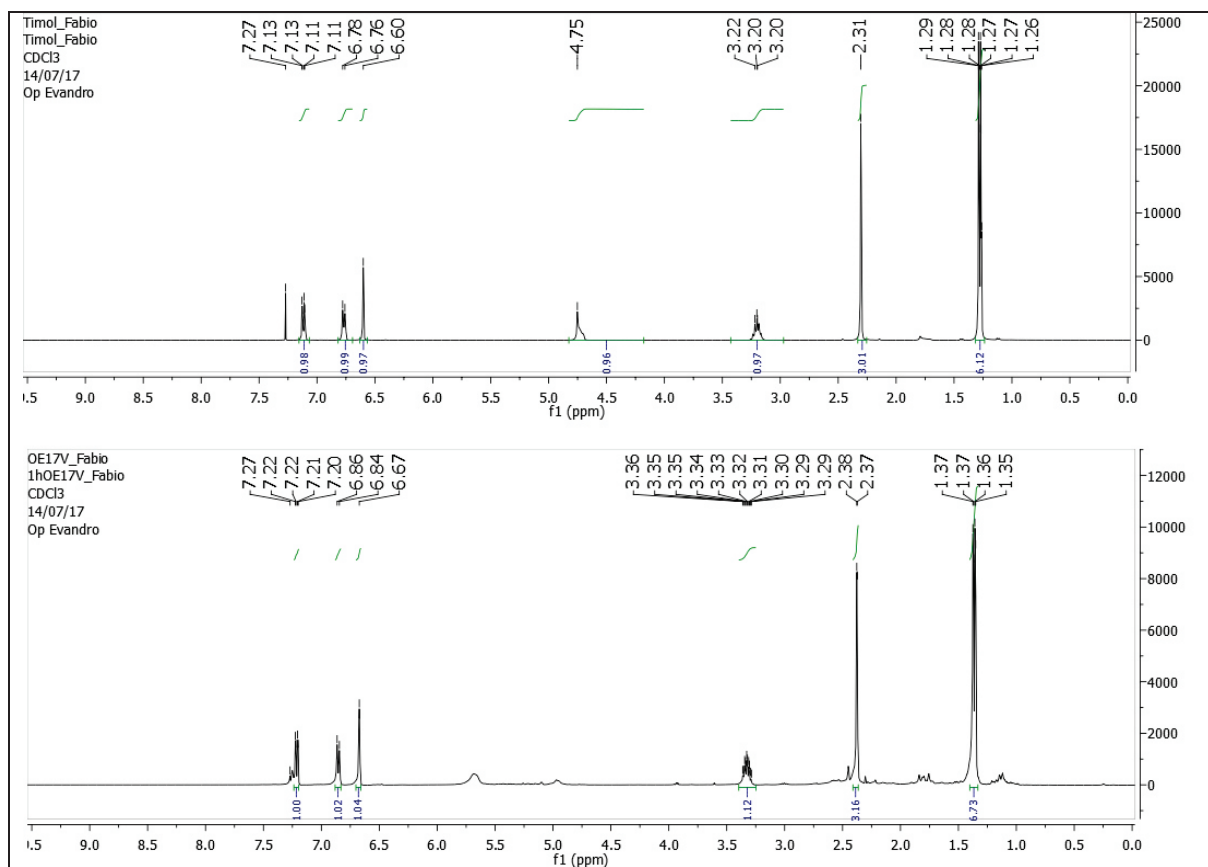


Gráfico 1 - Espectro de RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz) do óleo da *L.sidoides* Cham e do timol na região de 0,0 a 9,5 MHz

Fonte: Elaborado pela autora

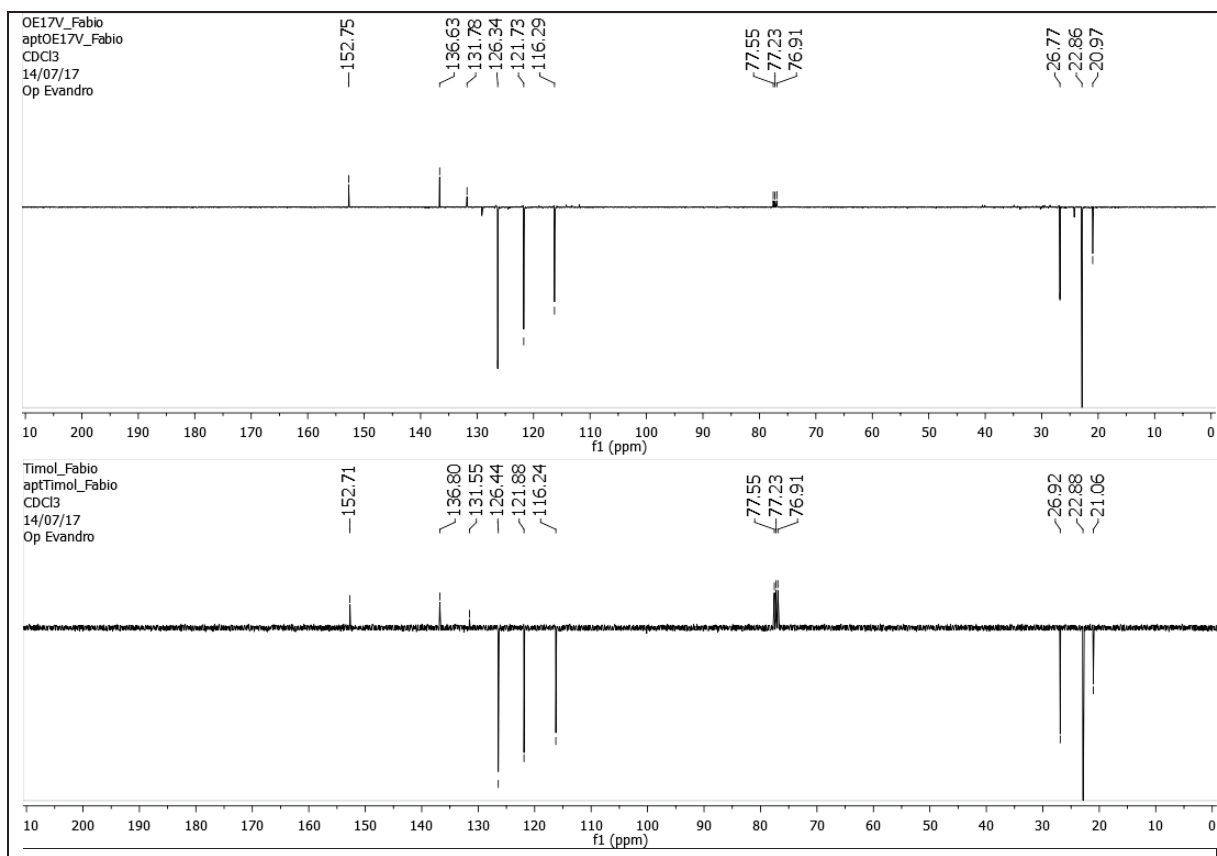


Gráfico 2 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do óleo de *L. sidoides* Cham e timol

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 2 - Análise da Composição Química do óleo essencial extraído da planta *Lippia sidoides* Cham

Componente	Tempo de Retenção (min.)	Concentração (%)
α -Tujeno	4226	1,03
α -Pineno	4373	0,33
β -Mirceno	5430	1,64
Terpinoleno	6045	0,88
p-Cimeno	6233	5,52
D-Limoneno	6336	0,30
Eucaliptol	6416	0,60
β -Ocimeno	6785	0,41
γ -Terpineno	7131	2,37
Cis-beta-Terpineol	7392	0,35
β -Linalol	8421	0,34
Ipsidienol	10362	1,03
Terpinen-4-ol	12059	0,48
Timol metil éter	16069	0,47
Timol	22031	70,77
Carvacrol	23839	0,38
E-Cariofileno	25014	6,29
α -Humuleno	25510	0,35
Germacreno B	26050	1,14
β -Bisaboleno	26142	0,49
óxido de Cariofileno	26954	0,30

Fonte: Elaborado pela autora

5.2 CIM de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*

Os óleos essenciais da *L. sidoides* Cham, os compostos timol e carvacrol, foram testados contra cepas de referência *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, a fim de determinar seu efeito inibitório pela técnica de microdiluição em caldo, apresentando atividade inibitória (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/mL do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham (OELS) timol, carvacrol e CLX frente aos microrganismos testados

Produtos	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Oels	44,23	39,30
Timol	48,25	28,15
Carvacrol	28,45	28,15
Clorexidina	0,042	0,053

CLX = Clorexidina

Fonte: Elaborado pela autora

O timol e carvacrol apresentaram, respectivamente, as CIMs de 48,25 mg/mL e 28,15 mg/mL para *Porphyromonas gingivalis* e 44,23 mg/mL do OELS para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, enquanto, para *Porphyromonas gingivalis*, as CIMs foram de 28,15 mg/mL para timol e carvacrol; e 39,15 mg/mL para o óleo essencial. A clorexidina apresentou uma CIM de 0,042 mg/mL, para *A. actinomycetemcomitans*, e de 0,053 mg/mL, para *Porphyromonas gingivalis*.

5.3 Testes de concentração inibitória fracionada (*checkerboard*)

Na Tabela 4 é demonstrado o resultado da CIF frente *Porphyromonas gingivalis*. O valor 0,25 mg/mL do óleo mais a clorexidina (Grupo 01), 0,25 mg/mL do carvacrol mais clorexidina (Grupo 02) e 0,12 mg/mL do timol com a clorexidina (Grupo 03). Todos os grupos apresentaram efeito sinérgico.

Enquanto para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, com os mesmos grupos analisados anteriormente, foi de 0,015 mg/mL do óleo mais clorexidina, 0,03 mg/mL do carvacrol mais clorexidina e 0,014 mg/mL do timol mais clorexidina, apresentando efeitos sinérgicos em todos os ensaios (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) do OELS (mg/mL) e índice CIF para CLX, Timol e Carvacrol (mg/mL) frente a *Porphyromonas gingivalis*

Ensaio	CIM	CIF	Efeito
OELS	39,30		
Timol	28,15		
Carvacrol	28,15		
Clorexidina	0,053		
CIM da combinação (CIF)	óleo +CLX	0,25	sinérgico
	Carvacrol+CLX	0,25	sinérgico
	Timol+CLX	0,12	sinérgico

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) do OELS (mg/mL) e índice CIF para CLX, Timol e Carvacrol (mg/mL) frente a *A. actinomycetecomitans*

Ensaio	CIM	CIF	Efeito
OELS	44,23		
Timol	48,25		
Carvacrol	28,15		
Clorexidina	0,042		
CIM da combinação (CIF)	óleo +CLX	0,015	Sinérgico
	Carvacrol+CLX	0,003	sinérgico
	Timol+CLX	0,014	Sinérgico

Fonte: Elaborado pela autora

5.4 Análises por Microscopia Confocal a Laser tratadas com OELS em Biofilme de *P. gingivalis*

As análises feitas através da microscopia confocal a laser corroboram os seguintes dados. As imagens obtidas por essa técnica demonstraram que o controle positivo foi 91% de viabilidade celular e 9% de morte celular, enquanto que o tratamento no valor da CIM foi de viabilidade celular de 49,70% e a morte celular foi de 50,30%, o tratamento de 2XCIM foi de 62,41% de morte celular (células em vermelho) e 37,55% de viabilidade celular (células em verde) e no tratamento de 10xMIC com 62,45% de morte celular e 37,55% de células viáveis (Figura 7), enquanto que a clorexidina apresentou 70,19% de mortalidade celular e 29,81% de inviabilidade celular. Portanto, conclui-se que, para o óleo da *L. sidoides* Cham, o melhor tratamento foi de 2XCIM, sendo bastante favorável, haja vista que o valor de 2XCIM é de 78,6mg mL.

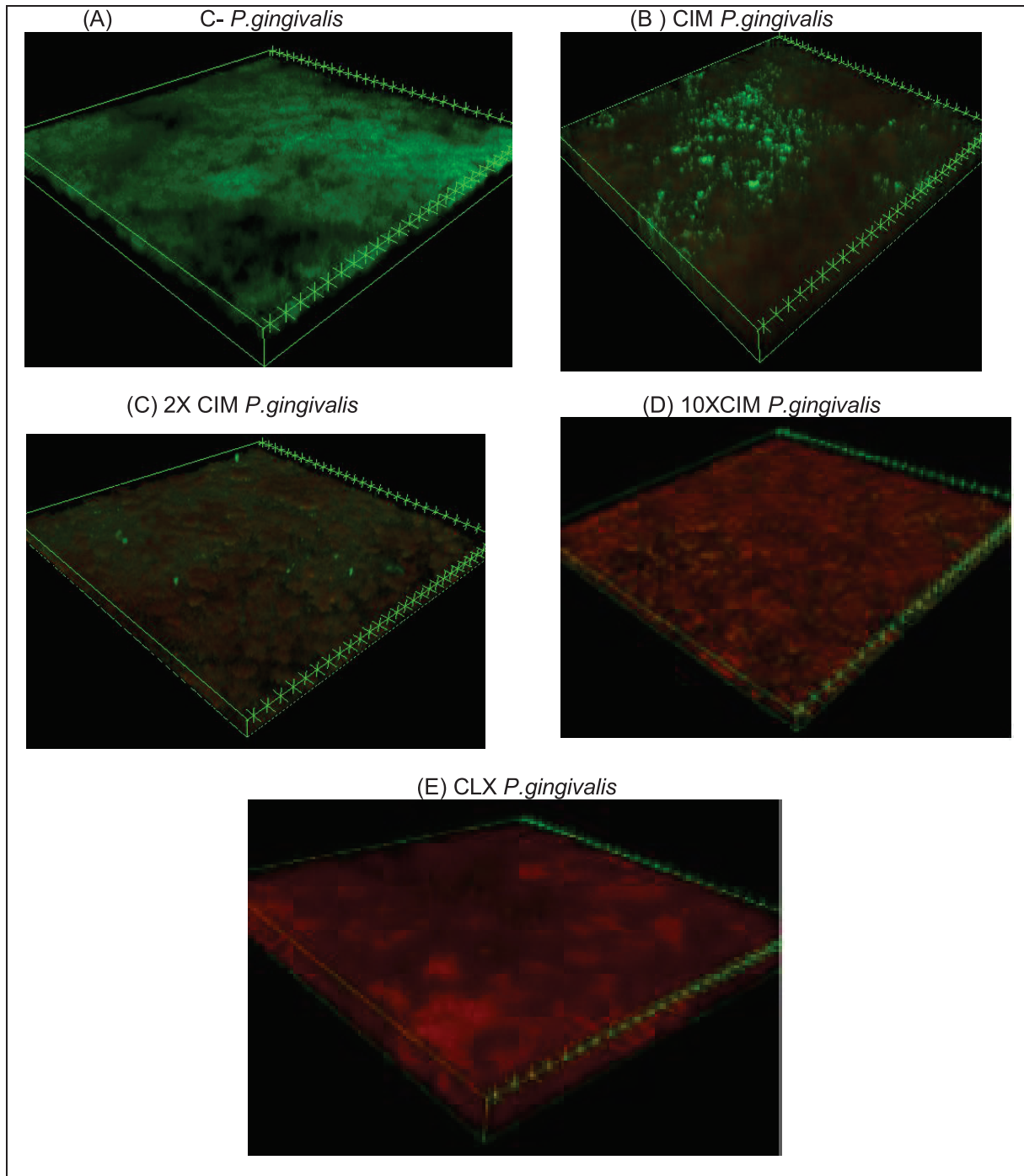


Figura 7 - A – Imagens do controle negativo em biofilme formado de *P. gingivalis* sem tratamento em microscopia confocal a laser. B-C-D – com os tratamentos do OELS nas concentrações de CIM,2xCIM e 10xCIM, E – controle positivo com a CLX.

Fonte: Elaborado pela Autora

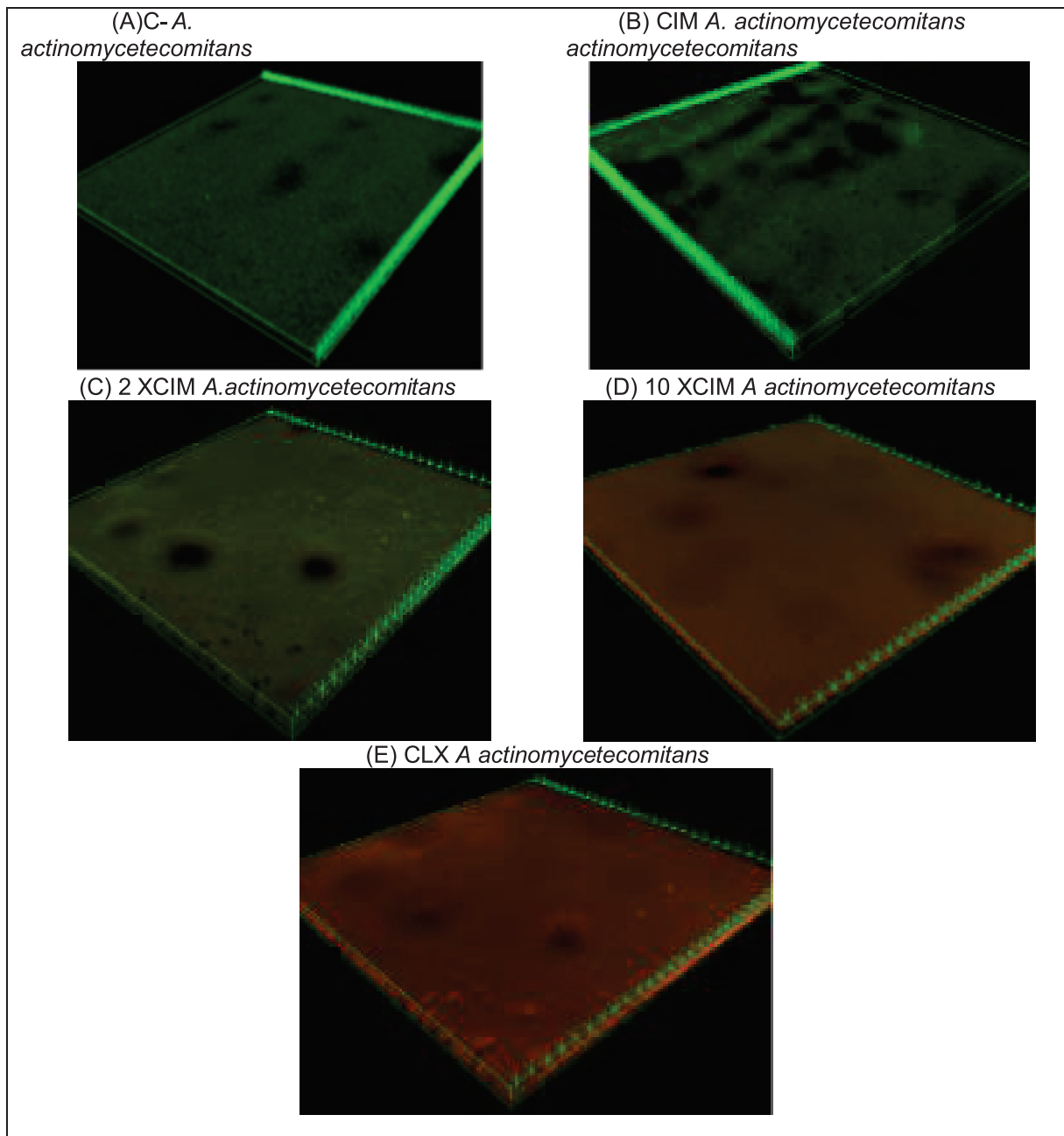


Figura 8 – A – Imagens do controle negativo em biofilme formado da *A. actinomycetecomitans* sem tratamento em microscopia confocal a laser. B-C-D – com os tratamentos do OELS nas concentrações de CIM, 2xCIM e 10xCIM, E – controle positivo com a CLX.

Fonte: Elaborado pela Autora

5.5 Análises por Microscopia Confocal a Laser tratadas com OELS em Biofilme de *A. actinomycetecomitans*

As células foram tratadas com OELS nas concentrações da CIM, 2XCIM e 10XCIM. Comparado ao grupo controle (não-tratado), 21,60% representou o número

de células mortas e 78,40% de células vivas; enquanto que o tratamento no valor da CIM foi de 68,04% de células vivas e 31,96% de células mortas; e a concentração com 2XCIM apresentou 43,78% de células mortas e 56,22% de células vivas; e no tratamento de 10XCIM ocorreu 62,24% de células mortas (vermelho) e 37,76% de células vivas (verde). A clorexidina apresentou 72,36% de células mortas e 27,64% de células vivas. Diferentemente da *P. gingivalis*, cujo melhor tratamento do OELS ocorreu em 10XCIM, demonstrando um pouco mais de resistência, quando comparado ao outro microrganismo (Tabela 6).

Tabela 6 - Microscopia Confocal para Monitorização de Biofilmes de *A. actinomycetecomitans* e *Porphyromonas gingivalis*.

Tratamentos	Células vivas (%)	Células mortas (%)	Espessura do biofilme
A.a C -	78,40	21,60	32µm
A.a CIM	68,04	31,96	36µm
A.a CIM 2x	56,22	43,78	43µm
A.a CIM 10x	37,76	62,24	41µm
A.a CLX	27,64	72,36	42µm
P.g C -	91,0	9,0	85µm
P.g CIM	50,30	49,70	83µm
P.g CIM 2x	37,59	62,41	48µm
P.g CIM 10x	37,55	62,45	48µm
P.g CLX	29,81	70,19	78µm

Fonte:Elaborado pela autora

A espessura do biofilme ocorreu devido à quantidade de fotos tiradas no valor de 1µm. É normal ocorrer variações na espessura do biofilme, por tratar-se de um ambiente heterogêneo.

5.6 Análise da Viabilidade Celular do Controle em biofilmes de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetecomitans* pela Microscopia Varredura

As análises em microscopia eletrônica de varredura de 500X e 10.000X evidenciaram um biofilme denso e organizado no controle (**A-B**) e com a clorexidina (**C-D**) (Figura 9).

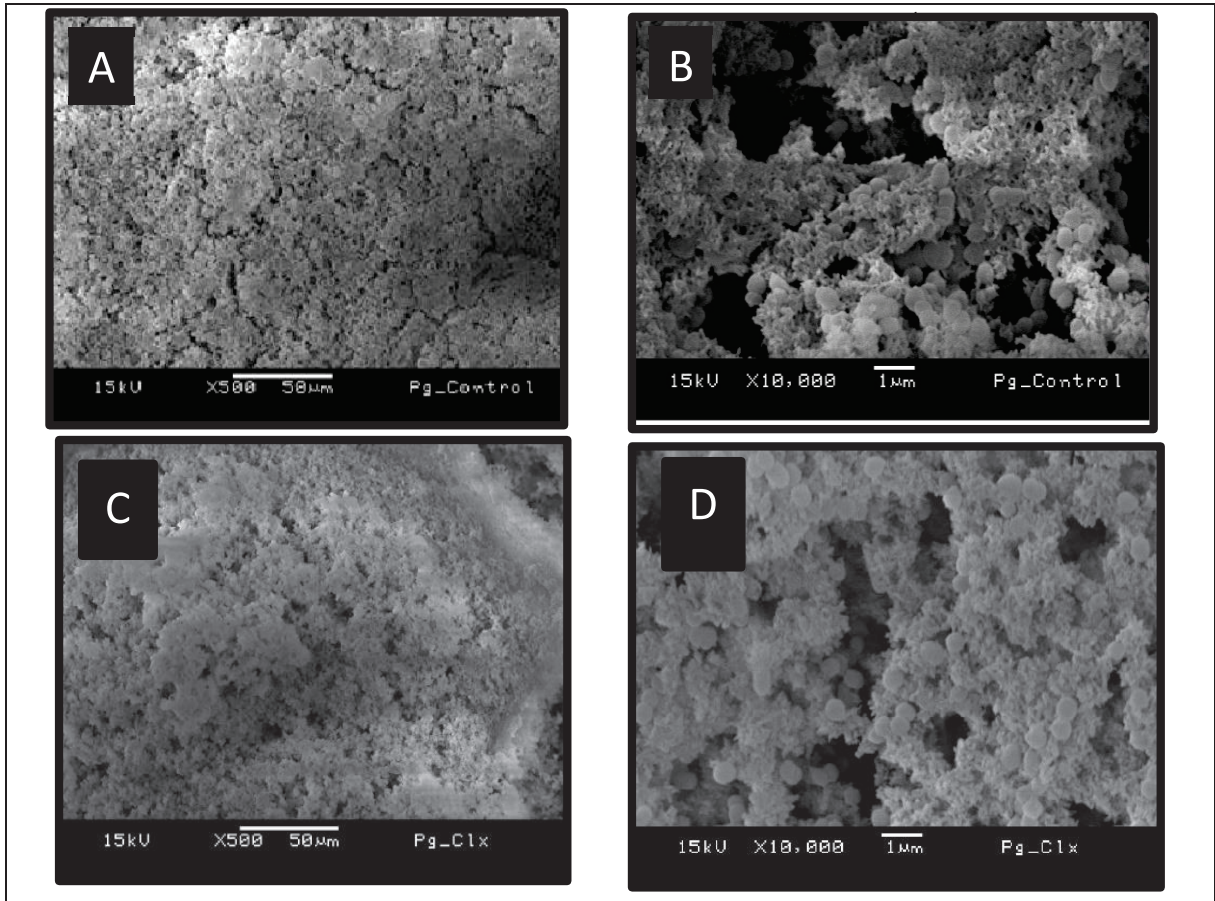


Figura 9 - Imagens de MEV de biofilme maduro de *P. gingivalis* (ATCC 0644). A-B referem-se ao controle do biofilme nos aumentos de 500x e 1000x. C-D biofilme tratado com clorexidina na concentração de 0,12%.

Fonte: Elaborado pela autora

Não foi observada diferença na diminuição celular, quando tratados com CIM e 2 x CIM (**E-F**) e (**G-H**), enquanto que na concentração de 10xCIM (**I-J**), foi observada uma desorganização no biofilme, assim como um extravasamento celular, quando comparado aos demais controles. As modificações provocadas na parede celular da *P. gingivalis* foram visualizados através da Microscopia Eletrônica de Varredura e, comparando com as imagens tratadas com as imagens do controle (morfologia, parede celular regular e contínua), os resultados demonstraram que o óleo da *Lippia sidoides* Cham provocou alterações na morfologia das células da *P. gingivalis* (Figura 10).

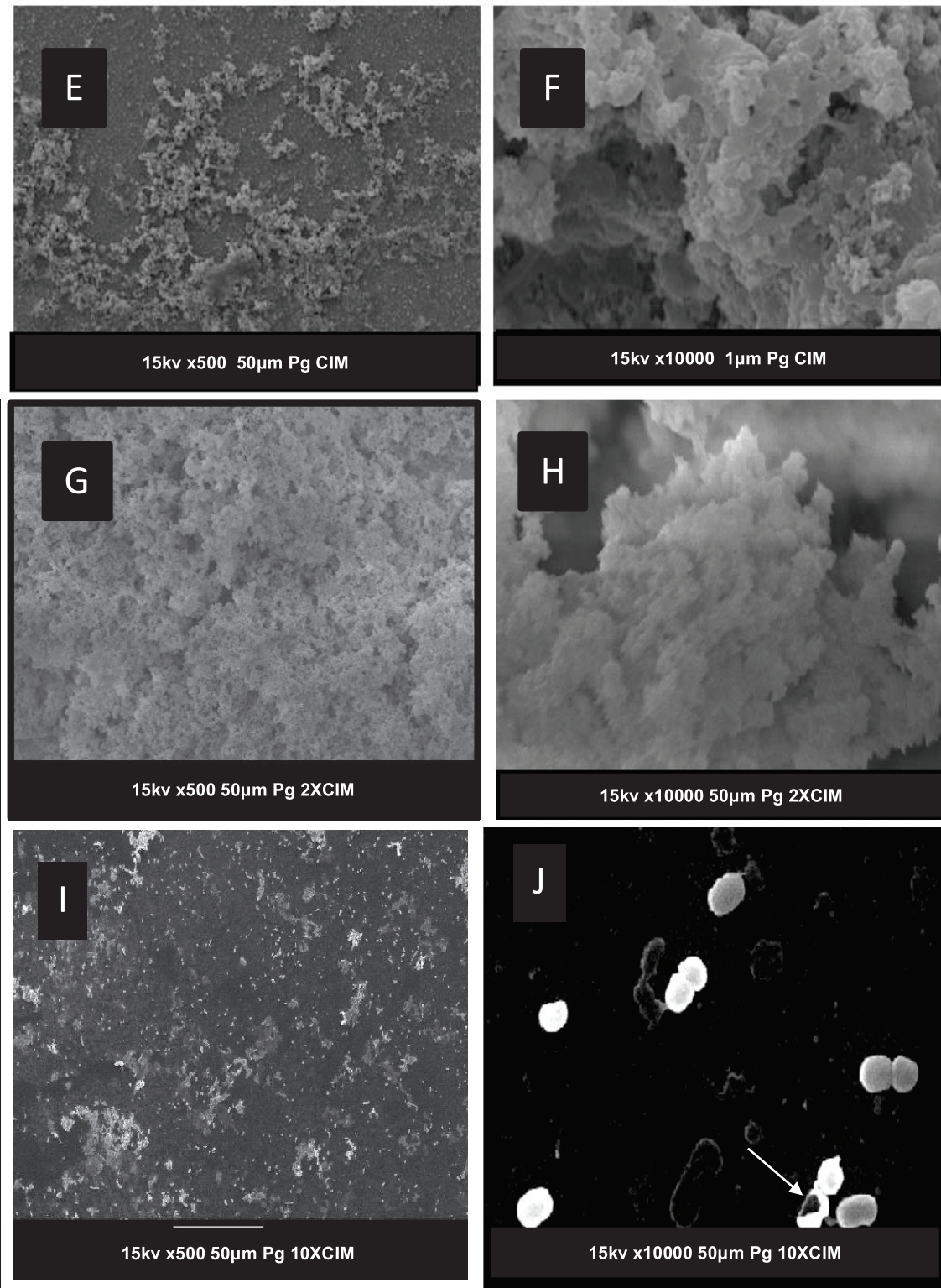


Figura 10 - Imagens de MEV, biofilme maduro da *P. gingivalis* ATCC 0644. E-F referem-se ao biofilme tratado na concentração de 39,30 mg/mL do OELS. G-H- biofilme tratado na concentração de 2XCIM do OELS. I-J- referem-se ao biofilme tratado na concentração de 10XCIM.

Fonte: Elaborado pela autora

No biofilme maduro da *A. actinomycetecomitans*, em relação ao controle (**A-B**

e C-D), não foi observada uma diminuição celular, fenômeno igual foi observado com *P.gingivalis*, nas mesmas concentrações. Nos tratamentos da CIM (E-F), nota-se células firmes aglomeradas à matriz extracelular (Figura 10), enquanto que, no tratamento de 2xCIM, observa-se irregularidade de algumas células, evidenciando pouco efeito do OELS (G-H), e na concentração de 10xCIM, observa-se diminuição no volume celular, deformações e descontinuidade na parede celular (I-J) (Figura 11).

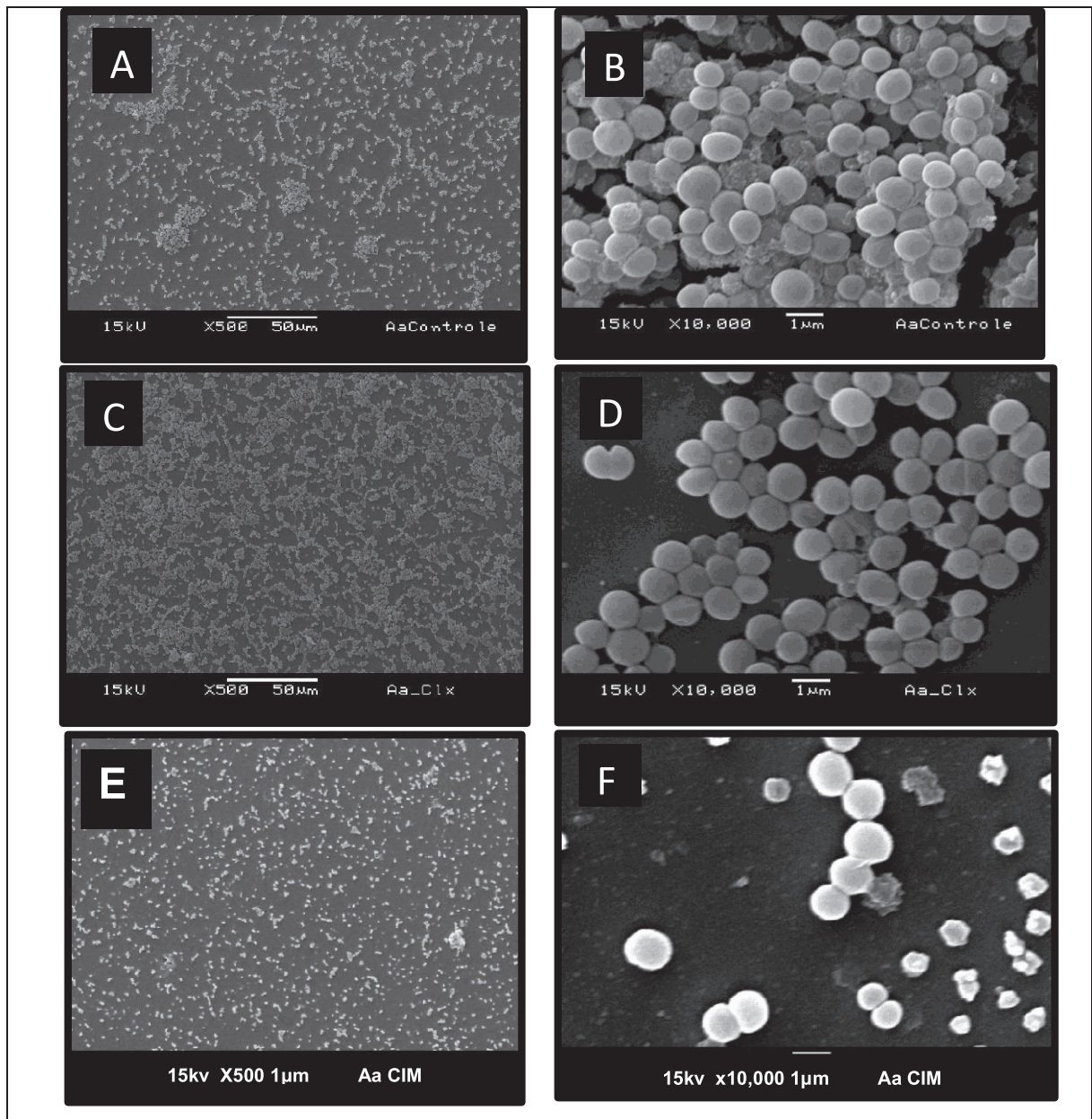


Figura 11 – Imagens de MEV de biofilme maduro de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522. A-B referem-se ao controle do biofilme nos aumentos de 500x e 1000x. C-D-biofilme tratado com clorexidina na concentração de 0,12% e E-F- biofilme tratado na concentração de 44,23mg/mL do OELS.

Fonte: Elaborado pela autora

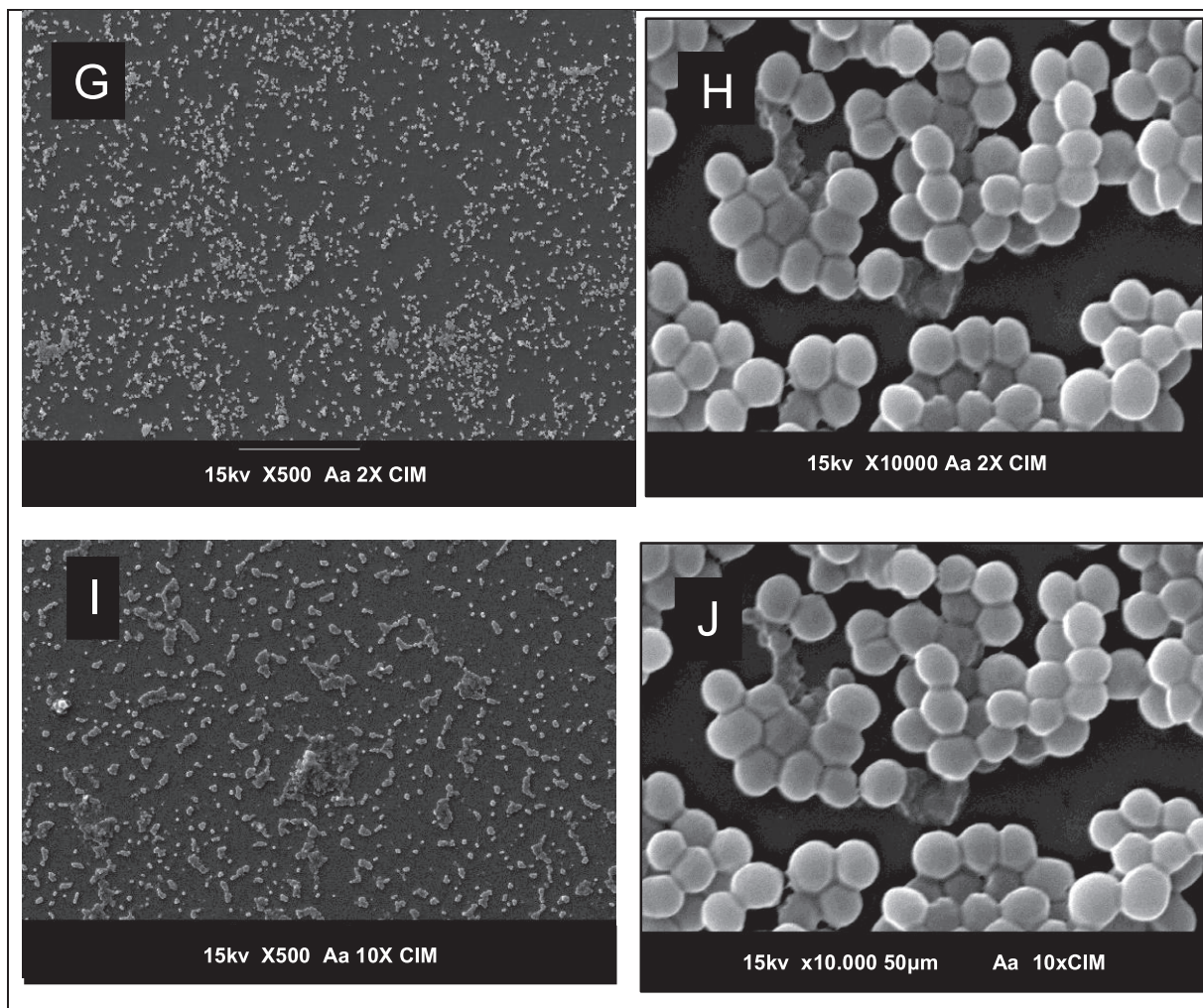


Figura 12 - Imagens de MEV de biofilme maduro de *Aggregatibacter actinomycetecomitans* ATCC 29522. G-H referem-se ao tratamento do biofilme na concentração de 2XCIM nos aumentos de 500x e 1000x. - referem-se ao tratamento do biofilme na concentração de 10XCIM I-J nos aumentos de 500x e 1000x

Fonte: Elaborado pela autora

5.7 Microscopia de Transmissão em *Aggregatibacter actinomycetecomitans*

A Técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi realizada sobre células de *A. actinomycetecomitans*, tratadas com o valor da CIM do OELS (44,23 mg/mL), por 5 min, e os controles sem adição do OELS e com a clorexidina. Na Figura 13 são observadas as imagens obtidas. As células não tratadas apresentam parede celular normal (**A-B**); com a clorexidina a 0,12%, ocorreu um rompimento na parede celular e membrana celular, apresentando um efeito bactericida (**C-D**), enquanto que as que receberam tratamento apresentaram separação entre a membrana plasmática e parede celular com extravasamento do conteúdo citoplasmático (**E-F**).

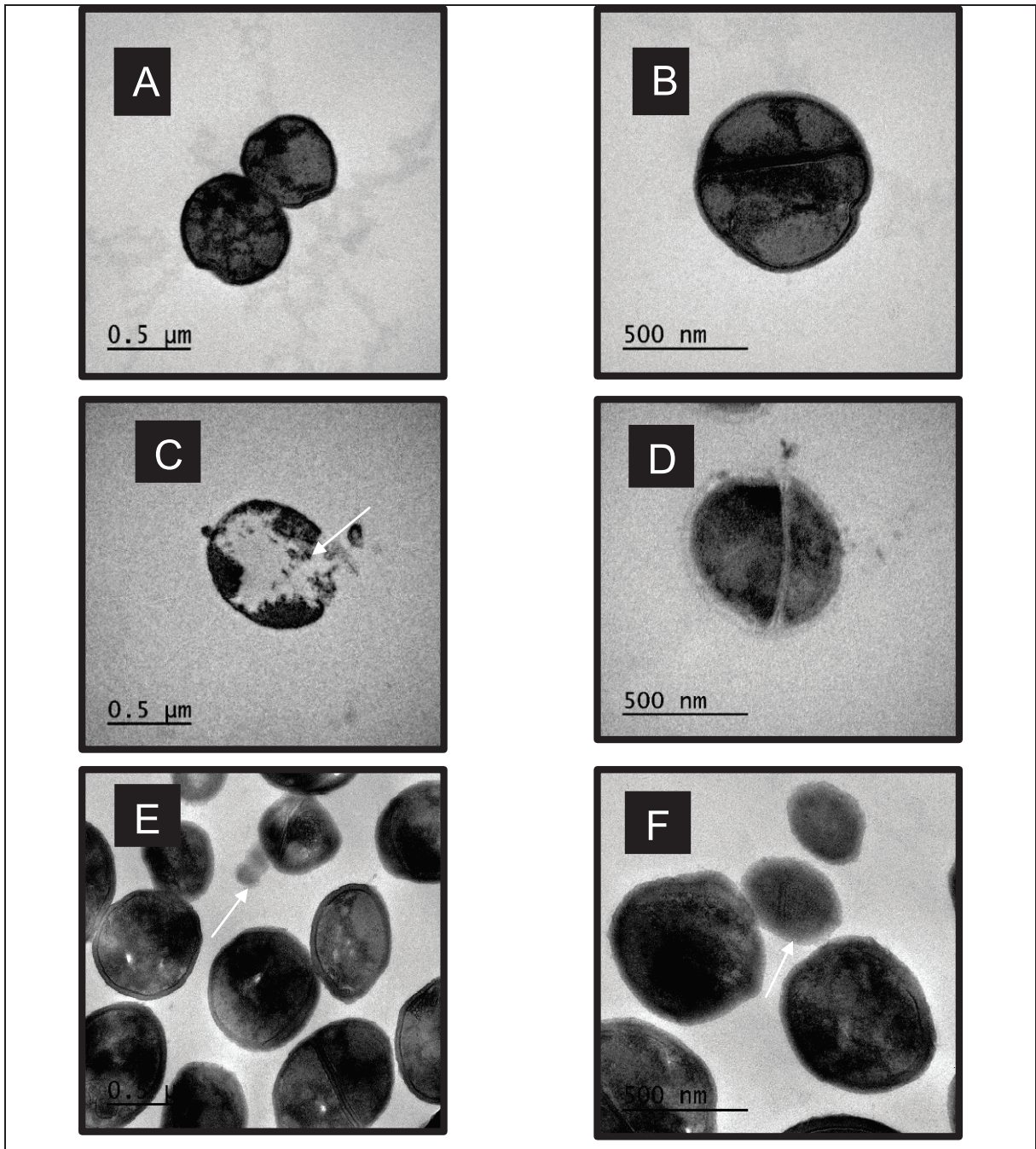


Figura 13 - Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sob efeito do tratamento com OELS na concentração de 44,23mg/mL. A-B- controle- C-D ação da clorexidina mostrando completa lise. E-F-desintegração da membrana celular na concentração de 44,23mg/mL (seta).

Fonte: Elaborado pela autora

5.8 Análise por Microscopia de Transmissão em *P. gingivalis*

A Técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi realizada sobre células de *P. gingivalis*, tratadas com o valor da CIM do OELS (39,3 mg/mL), por 5

min, e os controles sem adição do OELS e clorexidina. Na Figura 13 (**G-H**) são observadas imagens do controle do microrganismo sem tratamento. Observa-se uma membrana celular firme, assim como uma parede celular intacta. Em (**I-J**) tem-se a clorexidina a 0,12%, apresentando irregularidades na membrana e parede celular, enquanto que nas que receberam tratamento, observa-se a presença de vesículas e irregularidade na membrana celular e parede celular, devido à ação do OELS e, consequentemente, um extravasamento do conteúdo citoplasmático (**K-L**).

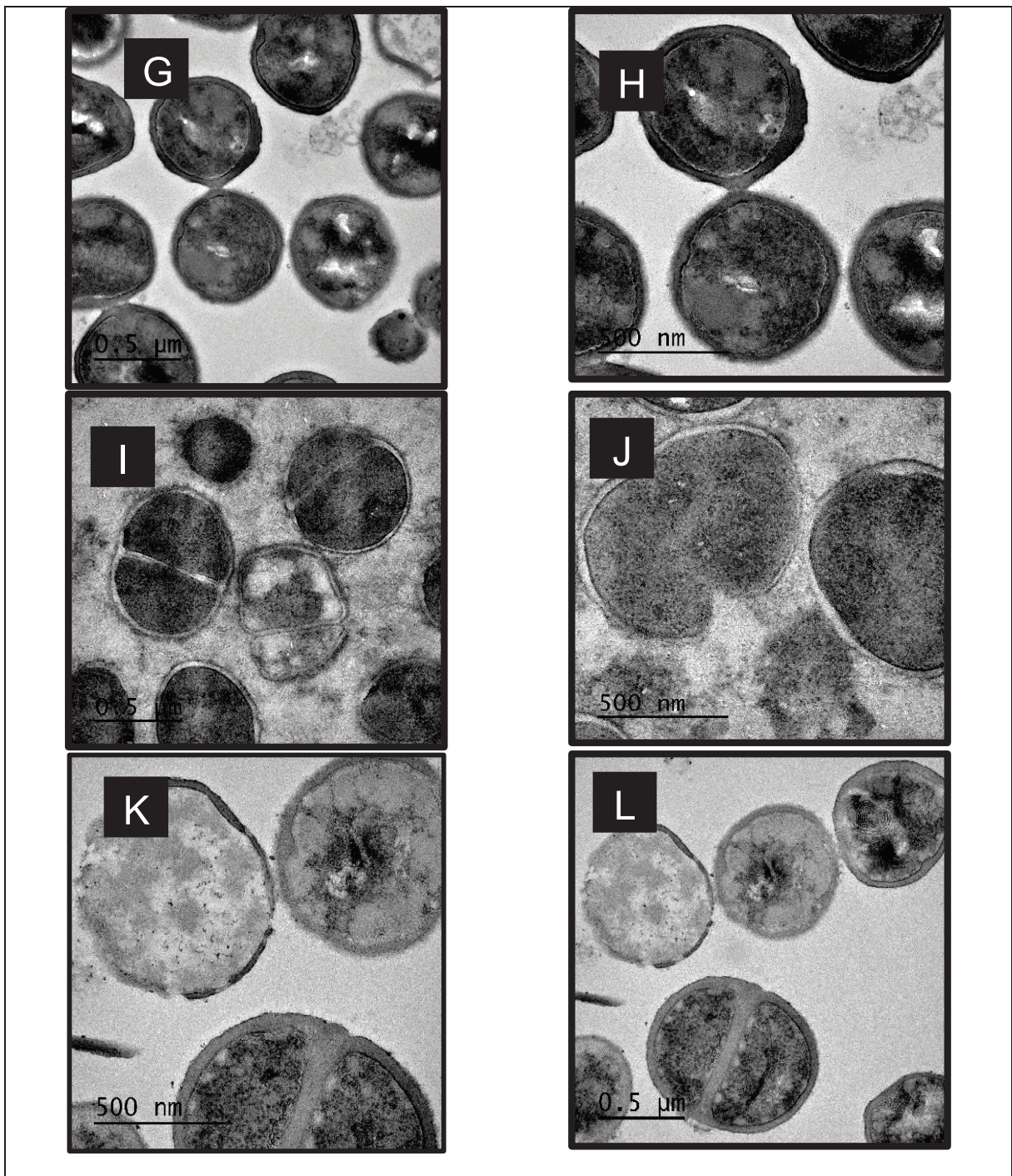


Figura 14 – Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão de *P.gingivalis* sob efeito do tratamento com OELS na concentração de 39,30 mg/mL. G-H- controle- I-J ação da clorexidina mostrando completa lise. K-L- desintegração da célula com extravasamento do conteúdo citoplasmático na concentração de 39,30mg/mL (seta).

Fonte: Elaborado pela autora

5.9 Avaliação citotóxica *in vivo* da Pasta de Orabase

Em relação à análise citológica dos esfregaços da mucosa, não foi observada nenhuma alteração na concentração de 0,15%, nos tempos de 1h e 6 horas (Figura 14-N), enquanto que na concentração 0,25%, no tempo de 6h, evidenciou-se a presença de células binucleadas, caracterizando anofilia (Figura 14-O). Anofilia caracteriza-se **de coloração de estruturas microscópicas que reagem tanto com corantes ácidos como básicos, ocasionando uma mistura das duas colorações, fenômeno observado na concentração de 0,25%** podendo indicar um possível processo inflamatório. Além disso, na concentração de 0,25%, foram observados núcleos maiores. Quanto à concentração de 0,15%, não foi observada anormalidade celular. Para confirmação de um efeito citotóxico desencadeado pelo agente-teste (óleo da *L. sidoides*) na concentração de 0,25%, foi realizado o teste de citotoxicidade.

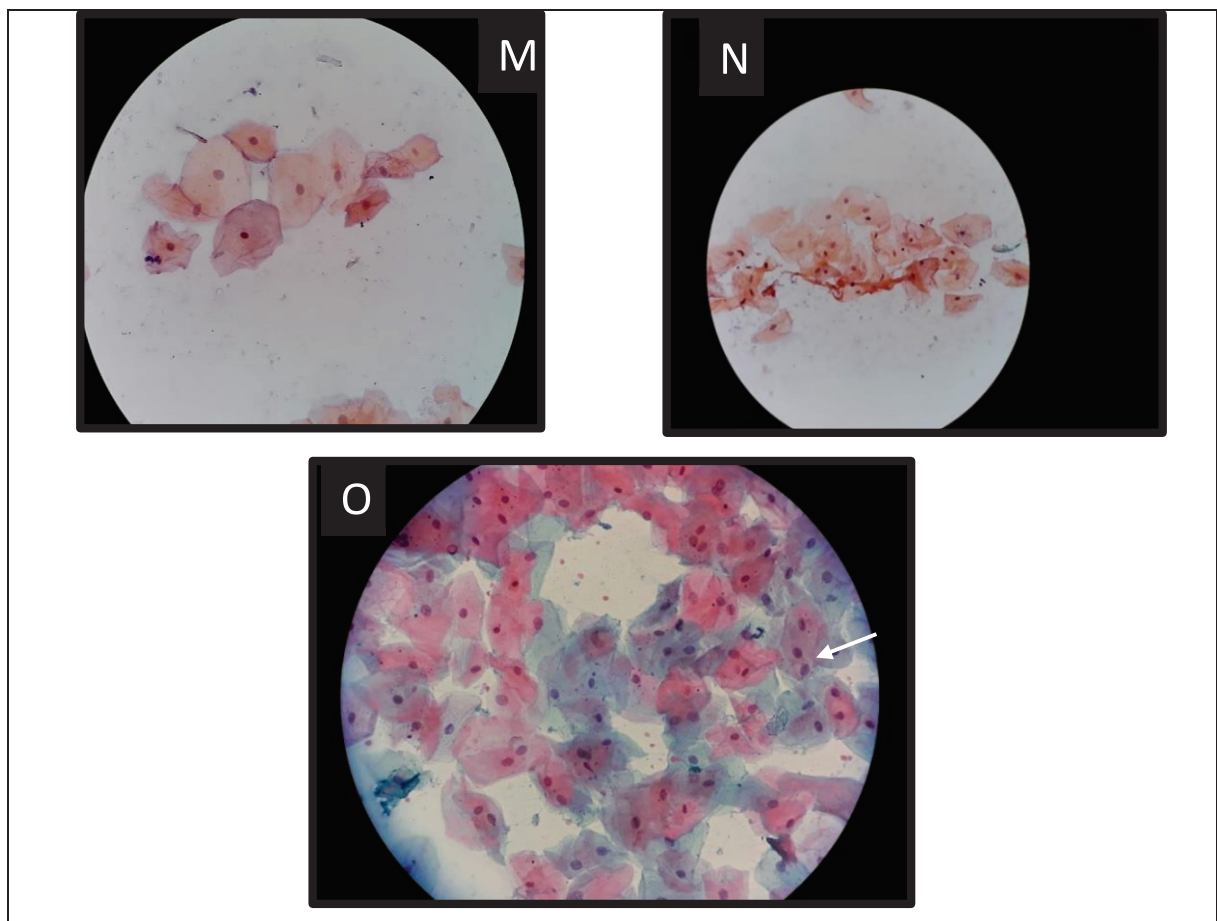


Figura 15 - Alterações Celulares Avaliadas em Aumento de 40x nas colorações de Papanicolau e Ácido Periódico- SCHIFF (PAS). M-Placebo no tempo de 1 hora, N- orabase 0,15% no tempo de 1 hora O-orobase a 0,25% no tempo de 6 horas.

Fonte: Elaborado pela autora

Foi observada também uma diminuição de UFC m/L (Unidade Formadora de Colônia por m/L) entre os grupos-teste analisados (Placebo, teste de orabase 0,15% e 0,25%), evidenciando uma diferença significativa ($p < 5\%$, ANOVA) Tabela 6.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, observa-se que, nas amostras de saliva diluída a 10^{-1} , apenas a pasta na concentração 0,25% apresentou efeito antimicrobiano. Já nas amostras de saliva diluída a 10^{-3} , ambas as concentrações testadas (*i.e.*, 0,15% e 0,25%) foram eficazes em diminuir a quantidade de bactérias nas amostras. Não foi observado efeito dos tratamentos ($p = 0,072$) nas amostras de saliva diluídas a 10^{-5} .

Tabela 7 - Contagem de bactérias (UFC/mL) na saliva, de acordo com o grupo experimental no tempo T0- T1 hora- T 6 horas.

Variável	Grupo (n = 10/grupo)			p-valor
	Placebo	Orabase 0, 15%	Orabase 0,25%	
Saliva 10^{-1}	65,90 $\pm$ 14,40 ^a	560 $\pm$ 14,04 ^a	24,20 $\pm$ 10,79 ^b	< 0,001
Saliva 10^{-3}	30,50 $\pm$ 17,00 ^a	21,00 $\pm$ 7,00 ^b	21,50 $\pm$ 11,00 ^b	0,001
Saliva 10^{-5}	18,50 $\pm$ 7,00	14,00 $\pm$ 10,00	11,00 $\pm$ 8,00	0,072

Os valores são expressos como mediana $\pm$ amplitude interquartil, exceto para saliva 10^{-1} que foi expressa em média $\pm$ desvio padrão.

* ANOVA *one-way* (saliva 10^{-1}) e teste Kruskal-Wallis (saliva 10^{-3} e saliva 10^{-5}): ^{a,b} letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos pelos testes de Tukey (saliva 10^{-1}) e Mann-Whitney (saliva 10^{-3}).

Fonte: Elaborado pela autora

5.10 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro* do OELS

Os resultados da sobrevivência celular dos fibroblastos, nas concentrações de 0,15% e 0,25% e 5% no tempo de tratamento de 24h, apresentaram uma elevada citotoxicidade reduzindo a viabilidade celular para aproximadamente 5%. Comparado com o controle (sem tratamento), todas as células estavam viáveis, quando expostas ao OELS nas concentrações de 0.15%, 0.25%, 0,5% e 1%. Além disso, a toxicidade aumenta de acordo com a concentração do OELS. Isso significa que o OELS, na menor concentração, já apresentava citotoxicidade.

A citotoxicidade de um produto depende da via de administração, bem como do tempo de exposição. A pasta de orabase ficará na mucosa do paciente por um período inferior a 24h, como, por exemplo, de 1 hora, haja vista que o ensaio citológico *in vivo*, nesse período, não apresentou alterações citológicas na concentração de 0,15%.

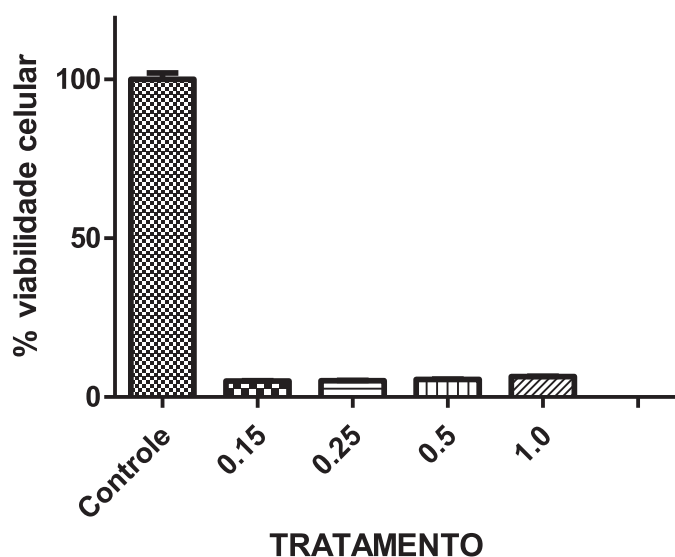


Gráfico 3 - Representação gráfica dos resultados obtidos após o ensaio de citotoxicidade referentes ao Controle, 0.15%, 0.25%, 0.5% e 1.0%

5.11 Resultados da Avaliação Citotóxica *in vivo* da pasta de orabase

As características dos participantes do estudo estão descritas na Tabela 8. A idade dos 10 indivíduos incluídos na pesquisa variou de 20 a 30 anos, e a distribuição entre os sexos foi igual.

Tabela 8 - Características dos participantes do estudo

Variável	Geral (n=10)	
	Média ou n	Desvio padrão ou %
Idade (anos)	24,0	3,37
Sexo		
Feminino	5	50,0
Masculino	5	50,0

Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, observa-se que todos os participantes indicaram que os três tratamentos aplicados apresentaram boa aparência, boa consistência, facilidade de aplicação, odor agradável, além de não promoverem aumento de salivação durante e após a aplicação. Verificou-se diferença significativa ($p < 0,001$) entre os tratamentos apenas para a percepção do sabor, sendo que todos os participantes indicaram que os dois tratamentos orabase (0,15%

e 0,25%) apresentaram sabor agradável e que o placebo não apresentou sabor agradável.

Tabela 9 - Percepção dos participantes do estudo, de acordo com o tratamento

Percepção	Resposta	Tratamento			*p-valor
		Placebo	Orabase 0,15%	Orabase 0,25%	
Boa aparência	Sim	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	—
	Não	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Boa consistência	Sim	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	—
	Não	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Fácil aplicação	Sim	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	—
	Não	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Odor agradável	Sim	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	—
	Não	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Sabor agradável	Sim	0 (0%)	10 (100%)	10 (100%)	<0,001
	Não	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Aumento da salivação durante o uso	Sim	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—
	Não	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	
Aumento da salivação após o uso	Sim	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—
	Não	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	

* Teste exato de Fisher; —, não foi possível calcular a estatística porque as respostas foram constantes nos três grupos.

Fonte: Elaborado pela autora

Os escores da escala analógica visual, em relação à aparência, consistência, aplicabilidade e aumento da salivação, não foram estatisticamente diferentes entre os três tratamentos. No entanto, verificou-se diferença significativa nos escores de odor e palatabilidade, com os dois tratamentos orabase (0,15% e 0,25%), apresentando melhor avaliação nesses quesitos, comparados ao placebo (Tabela 10).

Tabela 10 - Escores da escala analógica visual da percepção dos participantes do estudo, de acordo com o tratamento

Percepção	Tratamento			*p-valor
	Placebo	Orabase 0,15%	Orabase 0,25%	
Boa aparência	9,90 ± 0,32	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	0,368
Boa consistência	9,90 ± 0,32	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	0,368
Fácil aplicação	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	1,000
Odor agradável	9,70 ± 0,48 ^a	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b	0,040
Sabor agradável	0,00 ± 0,00 ^a	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b	< 0,001
Aumento da salivação durante o uso	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000
Aumento da salivação após o uso	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

* Teste Kruskal-Wallis (^{a,b} letras distintas indicam diferença estatística pelo teste Mann-Whitney).

Fonte: Elaborado pela autora

Os escores da escala analógica visual, para percepção de reações durante a aplicação dos tratamentos, estão apresentados na Tabela 11. De acordo com os resultados, os participantes do estudo não indicaram sensação de dor, dormência ou náusea durante a aplicação dos três tratamentos. Entretanto, foi verificado que o tratamento orabase 0,25% resultou em leve sensação de ardência, comparado ao placebo e ao tratamento orabase 0,15%. Por outro lado, ambos os tratamentos com orabase apresentaram maior sensação de refrescância, em relação ao placebo.

Tabela 11 - Escores da escala analógica visual para percepção de reação durante a aplicação do tratamento

Reação	Tratamento			*p-valor
	Placebo	Orabase 0,15%	Orabase 0,25%	
Ardência	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	2,00 ± 0,00 ^b	< 0,001
Dor	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000
Dormência	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000
Refrescância	0,00 ± 0,00 ^a	8,50 ± 0,71 ^b	9,10 ± 0,57 ^b	< 0,001
Náusea	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

* Teste Kruskal-Wallis (^{a,b} letras distintas indicam diferença estatística pelo teste Mann-Whitney).

Fonte: Elaborado pela autora

Os escores da escala analógica visual para percepção de reações após a aplicação dos tratamentos estão apresentados na Tabela 12. De acordo com os resultados, os participantes do estudo não indicaram sensação de ardência, dor, dormência ou náusea, após a aplicação dos três tratamentos. Por outro lado, ambos

os tratamentos com orabase apresentaram maior sensação de refrescância, comparados ao placebo.

Tabela 12 - Escores da escala analógica visual para percepção de reação após a aplicação de 6 horas de tratamentoty

Reação	Tratamento			*p-valor
	Placebo	Orabase 0,15%	Orabase 0,25%	
Ardência	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000
Dor	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000
Dormência	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000
Refrescância	0,22 ± 0,67 ^a	8,50 ± 0,71 ^b	9,10 ± 0,57 ^b	< 0,001
Náusea	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

* Teste Kruskal-Wallis (^{a,b} letras distintas indicam diferença estatística pelo teste Mann-Whitney).

Fonte: Elaborado pela autora

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Atividade Antimicrobiana

Este trabalho demonstrou que o óleo essencial da *Lippia Sidoides* Cham e seu principal constituinte o timol (70,77%) e carvacrol foram eficientes na atividade antimicrobiana frente as bactérias *A.actinomycescomitans* e *P. gingivalis*. Este efeito foi demonstrado pela análise da CIM. Também foi verificado através do *checkboard* que o óleo e seus constituintes timol e carvacrol quando comparados a clorexidina, apresentaram efeitos sinérgicos.

A composição do óleo essencial de *L. sidoides* Cham é bastante variável, dependendo da localidade onde foi plantada, época do ano e hora da coleta, assim como as condições de cultivo. Dentre diversos estudos, pode-se constatar que o timol foi o componente majoritário na maioria dos casos, sendo que sua concentração variou de 34 a 95% (BOTELHO et al., 2016).

Dos vinte e quatro compostos no óleo essencial de *L. sidoides* Cham, sendo o timol o componente majoritário (30,24%), além de trans-beta-cariofileno (11,82%), borneol (11,38%), metil timil éter (8,32%), gama-terpineno (8,05%), dentre outros, foram isolados timol (56,67%), além de carvacrol (16,73%), p-cimeno (7,13%), timol metil éter (5,06%), entre outros. Comparando os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que há uma semelhança qualitativa na composição do óleo essencial em estudo com o da literatura (BOTELHO et al., 2016).

Veras et al. (2016) analisaram a composição química do óleo da *Lippia sidoides* e encontraram como principais constituintes o timol (84,9%) e p-cimeno (5,33%), analisados por Cromatografia gasosa. O timol influencia a atividade dos aminoglicosídeos e pode ser usado como adjuvante em terapia antibiótica contra patógenos do trato respiratório.

A análise química do óleo da *L. sidoides* Cham por cromatografia gasosa e Ressonância Magnética Nuclear revelou a presença marcante de compostos terpenoides, tendo o timol como composto majoritário, seguido do carvacrol. Os estudos de Ultee, Bennink e Moezelaar (2002) com bactérias *Bacillus cereus* mostraram que o efeito antibacteriano do timol e do carvacrol é devido, em grande parte, ao seu grupo hidroxila, que funciona como um transportador transmembranar de cátions monovalentes, responsáveis pelo crescimento das células.

Alguns estudos mostraram que o timol e carvacrol demonstram atividade antimicrobiana contra bactérias positivas e Gram-negativas, de maneira igual, o que significa que a posição do grupo hidroxila tem efeito sobre a atividade das composições (BOTELHO et al., 2007).

Os valores de CIM do OELS ou de seus constituintes isolados, frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, variaram de 12 µg/mL a 10,0 mg/mL, dependendo da técnica ou do tipo de cepa (BOTELHO et al., 2007; VERAS et al., 2016; MILADI et al., 2017).

A atividade antibacteriana foi classificada segundo os métodos de classificação de (SARTORATTO et al., 2004), nos quais a droga-teste é considerada com forte atividade antibacteriana, quando apresentar CIM até 500 mg/ml, moderada com CIM entre 600 e 1500 mg/ml, e fraca atividade antibacteriana com CIM >1500 µg/ml. A clorexidina a 0,12% foi utilizada como controle positivo, quando ocorreu uma diluição seriada.

Uma observação interessante no estudo de Veras et al. (2016) foi que os valores de CIM do OELS e do timol variaram de 128 a 516 µg/mL para todos os microrganismos testados: *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Providencia rettigeri*.

Os resultados observados no nosso estudo foram muito mais baixos, contudo, similares às observações de Veras et al. (2016), uma vez que houve certa similaridade entre os valores de OELS, TIM e CAR (Tabela 3).

Para comprovar a enorme variação nos valores de CIM, em pesquisa recente, a CIM do timol, frente ao bacilo Gram-negativo *Salmonella typhimurium*, foi de 750 mg/L. O resultado dessa investigação confirmou o timol como principal mecanismo de ação na interrupção da membrana microbiana, comprometendo, assim, sua integridade e funcionamento (CHAUHAN; KANG, 2014).

Ciandrini et al. (2014) analisaram a atividade antimicrobiana do carvacrol frente à *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *P. gingivalis* ATCC 33277 e *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 em culturas planctônicas e em sistemas de biofilme. A CIM, para todos os patógenos analisados, foi de 0,25% (v/v) e a CBM de 0,50% (v/v), indicando uma boa ação antimicrobiana. Os ensaios também mostraram que o carvacrol remove bactéria organizada em biofilme de discos de titânio. Portanto, o carvacrol também pode ser usado na prevenção e tratamento de doenças

periodontais, reduzindo o crescimento bacteriano em implantes de superfície de titânio.

Bhatia et al. (2014) estudaram a ação de 1% de gel de curcumina nas bactérias periodontopatogênicas, como: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *Capnocytophaga*, quando, após 6 meses, observaram uma redução nos parâmetros clínicos e na contagem do número de bactérias.

Palaniappan e Holley (2010) estudaram a ação do timol frente a bactérias que eram resistentes a alguns antibióticos, como *Salmonella typhimurium*, resistente à tetraciclina; *Staphylococcus aureus*, resistente à penicilina; e *Streptococcus pyogenes*, resistente à eritromicina. Para determinar a atividade antimicrobiana, os autores usaram o método de diluição de *checkboard*. Nesse estudo, os antibióticos utilizados foram: penicilina, ampicilina, tetraciclina, eritromicina, bacitracina e novobiocina, associados ao componente timol, observando-se um efeito sinérgico de todos os fármacos, exceto com a bacitracina, constatando que o timol tem uma grande atividade antimicrobiana.

Para Lobo et al. (2014), existe um efeito sinérgico entre o flúor e os constituintes do óleo da *L. sidoides* Cham, enfatizando a importância do biofilme dental contra *S. mutans*. Alves et al. (2016) demonstraram um efeito de sinergismo da Nisina, quando combinado com compostos fenólicos carvacrol, timol e eugenol frente à *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*, assim como Pallaniapan e Holley (2010) demonstrou sinergismo com penicilina, ampicilina e bacitracina, frente à *S. aureus* resistentes a esses antibióticos. O mecanismo de resistência aos antibióticos deve-se à estrutura da bactéria, facilitando a penetração dos compostos.

Jesus et al. (2015) estudaram algumas combinações do timol e carvacrol com azitromicina, claritromicina e alguns agentes antifúngicos, como anfotremicina B, itraconazol, frente a 23 isolados de *Pythium insidiosum*, responsável pela Ptiose em humanos e animais. O método utilizado foi de *Checkboard*, sendo observado um efeito sinérgico na combinação do timol e carvacrol com os agentes antimicrobianos. O principal sinergismo foi de 96% do carvacrol mais itraconozol, e timol e itraconozol também de 96%, seguido de timol e claritromicina de 92%, carvacrol e claritromicina com 88%. Dessa forma, os autores sugeriram o uso do timol como agente antimicrobiano no tratamento da Ptiose, atuando como bactericida.

Alves et al. (2016) demonstraram um efeito de sinergismo da Nisina, quando combinado com compostos fenólicos carvacrol, timol e eugenol, frente à *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Wang et al. (2018) investigaram o efeito antimicrobiano do óleo *Cinnamomum zeylanicum* contra *P. gingivalis* para elucidar o mecanismo antimicrobiano do óleo. Através da microscopia de transmissão, foi observado um dano na membrana da célula, ocorrendo a despolarização da membrana celular que levaria a uma atividade metabólica irregular e, conseqüentemente, à morte. Segundo Sharma (2013), muitos estudos demonstram que os óleos essenciais afetam a estrutura do envelope celular, já que os principais componentes dos óleos penetram através da parede da célula e, conseqüentemente, levam à destruição da membrana celular, sendo esta membrana o maior componente de proteção do microrganismo. Assim, tais conclusões corroboram este estudo.

Todavia, Veras et al. (2016), em modelos de ratos usando 2mg do timol, observaram que o timol como maior constituinte do OELS é o responsável pelo processo inflamatório.

Já Freires et al. (2015) abordaram a eficiência em relação à atividade antimicrobiana em ensaios *in vitro* e para ensaios clínicos, na forma de colutório bucal contendo o óleo da *L. sidoides* Cham, sendo considerado promissor para redução da placa dental e gengivite. Através de outras análises, observou-se que o timol e carvacrol, presentes na *L. sidoides* Cham, foram eficazes na redução do biofilme e gengivite em adultos, destacando o potencial terapêutico da *L. sidoides* Cham.

Lobo et al. (2014) demonstraram que adição do óleo da *L. sidoides* Cham nos dentifrícios promoveu a redução de *Streptococcus mutans* na saliva, em um período de 5 dias, e os baixos níveis de *S. mutans* foram mantidos durante a análise subsequente, de 30, 60, 180 e 365 dias. Os autores concluíram que a *L. sidoides* Cham contém constituintes voláteis relacionados a fatores biológicos intrínsecos e, assim, pode ser empregada nas formulações de dentifrícios, sendo usada na eficiência contra *S. mutans*.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans e *Porphyromonas gingivalis* vivem em uma complexa comunidade dentro de uma matriz de glicocálix, organizadas como biofilme e aderidas na estrutura do dente, que confere a essas comunidades fenótipos específicos, incluindo a redução da susceptibilidade aos antimicrobianos (MÍNGUEZ et al., 2018).

De modo geral, os resultados apresentados nesta pesquisa corroboram outros estudos nessa linha de investigação, demonstrando os efeitos antimicrobianos do óleo essencial da *L. sidoides* Cham.

6.2 Citotoxicidade

Para cultura de células utilizou-se a linhagem de fibroblastos para testes de citotoxicidade. Fibroblastos são as células mais abundantes em tecido conjuntivo, o que torna a sua manipulação mais viável e favorece estabilidade adequada. Todaro e Green (1963), proporcionando resultados mais confiáveis em testes com produtos de aplicação tópica.

Nas análises de citotoxicidade do OELS realizado pelo MTT em 24h foi observado que o óleo causou diminuição da viabilidade celular de fibroblastos nas concentrações de 0.15% e 0.25% em relação ao grupo controle, apresentando somente 5% de viabilidade celular, e portanto, apresentando efeito citotóxico. Sendo assim, faz-se necessária a realização de outros estudos investigando os efeitos do OELS em um menor tempo de exposição.

Segundo Borges et al. (2012), o OELS foi considerado de baixa toxicidade frente a células de mamíferos, nas concentrações de 15,6 a 250 µg/ mL, no ensaio de MTT, não inibindo o crescimento dessa linhagem celular em concentrações abaixo de 0,5 mg/ mL. O OELS também foi avaliado em outros estudos com células de carcinoma cervical humano, observando um efeito moderadamente tóxico, mesmo apresentando uma viabilidade celular de 57,8% (REIS, 2010).

Lima et al. (2011) avaliaram a citotoxicidade do óleo essencial da *Lippia sidoides* e os compostos de carvacrol, 1,8 cineol e timol, utilizando a larva *Tenebrio monitor* (larva-de farinha) e constataram que a citotoxicidade foi maior com carvacrol, seguido do 1,8 cineol e timol. O teste de citotoxicidade dos óleos foi realizado em células de fibroblastos gengivais humanos, por serem as células mais predominantes nos tecidos bucais e, portanto, propensos a entrar em contato direto com os óleos, especialmente, em periodontite.

Apesar do timol e carvacrol serem isômeros, apresentam diferentes níveis de atividade citotóxica contra células normais. O carvacrol é menos tóxico que o timol e, com isso, o óleo que apresenta como componente majoritário o timol desencadeia uma atividade citotóxica maior, quando comparado a outros constituintes, conforme

relatada na literatura (STAMMATI et al., 1999; CHANG et al., 2000; HERMANN; WINK, 2011). Esses dados corroboram a presente pesquisa, haja vista que o OELS apresenta como constituinte majoritário o timol.

Melo et al. (2014) afirmam que a *Lippia gracilis* tem como componente majoritário o timol, com 40,52%, apresentando efeito citotóxico em células HeLa, sugerindo que o efeito citotóxico pode estar associado a vários compostos químicos associados ao timol.

Mercan et al. (2019) compararam a clorexidina, dicloridrato e ácido clorídrico em fibroblastos de células humanas e os resultados mostraram que todos os agentes apresentaram efeitos similares em relação à viabilidade celular, apoptose e proliferação celular. Em ambos os grupos, houve diferenças estatisticamente significativas quanto à viabilidade celular, após 48h e 72h ($p = 0,049$). Não houve diferenças estatisticamente significativas em termos de viabilidade celular entre os grupos CLX, dicloridrato e ácido clorídrico, após 72h.

6.3 Ensaio Clínico-Fase I

O tratamento clínico da pasta de orabase extraído do óleo com o tempo de 1 hora foi bastante significativo na redução de unidades de formadoras de colônias (UFC). Nesse contexto, a aplicação do óleo essencial pode ser promissor na redução do biofilme e na elaboração de um gel do OELS para patologias periodontopatogênicas.

Botelho et al. (2007) testou o OELS em ratos, sob a forma de gel na concentração de 0,5%, para o tratamento da periodontite, no período de 11 dias, durante 3 vezes ao dia. O gel inibiu o grupo de bactérias periodontopatogênicas e promoveu um aumento de massa corpórea.

Lobo et al. (2011) avaliaram um enxaguatório bucal nas concentrações de 0,6%, 0,8%, 1% e 1,2% de OELS em humanos e observaram uma redução no número de UFC de *Streptococcus mutans*, apresentando uma maior redução do crescimento bacteriano com o uso da concentração de 0,8%. Também foi avaliado o gel extraído das folhas da *L. sidoides* Cham, nas concentrações 0,6%; 0,8%; 1%; 1,2% e 1,4%. A concentração de 1,4% apresentou uma maior redução de UFC, frente à *S. mutans*. Esse estudo corrobora a presente pesquisa, sendo que também entre as

concentrações de 0.15% e 0.25% foi observada uma redução significativa de UFC de *P. gingivalis* e *A. actinomycetecomitans*.

Santos (2019), em relação à citotoxicidade do OELS, nas concentrações de 0,5%, 1% , 2,5%,1,4% e 0,25% com Het-Cam, notou uma condição menos irritante, enquanto que , para o teste de hemólise, a concentração de 1% apresentou um alto grau de hemólise. Liu et al. (2018) observou, *in vitro*, uma redução significativa de fibroblastos, nos tempos de 2 e 3 minutos ($p < 0,01$), com a CLX a 0,002%, mas não para como segundo Chen et al. (2016) afirmaram que a CLX afeta a proliferação dos fibroblastos, impedindo a adesão celular. O ensaio de viabilidade celular é um passo essencial na toxicologia, que explica a resposta celular a um agente tóxico, fornecendo informações sobre a morte, sobrevivência e atividade metabólica da célula.

Lima et al. (2011) avaliaram a citotoxicidade do óleo essencial da *Lippia sidoides* e os compostos de carvacrol, 1,8 cineol e timol, utilizando a larva *Tenebrio monitor* (larva-de farinha) e constataram que a citotoxicidade foi maior com carvacrol, seguido do 1,8 cineol e timol. O teste de citotoxicidade dos óleos foi realizado em células de fibroblastos gengivais humanos, por serem as células mais predominantes nos tecidos bucais e, portanto, propensos a entrar em contato direto com os óleos, especialmente, em periodontite.

Apesar do timol e carvacrol serem isômeros, apresentam diferentes níveis de atividade citotóxica contra células normais. O carvacrol é menos tóxico que o timol e, com isso, o óleo que apresenta como componente majoritário o timol desencadeia uma atividade citotóxica maior, quando comparado a outros constituintes, conforme relatada na literatura (STAMMATI et al., 1999; CHANG et al., 2000; HERMANN; WINK, 2011). Esses dados corroboram a presente pesquisa, haja vista que o OELS apresenta como constituinte majoritário o timol.

Vários compostos são sintetizados de plantas medicinais que são biologicamente ativas, sendo produtos do metabolismo secundário, relacionados com a interação da planta e o meio ambiente. De uma única espécie ou mistura obtêm-se extratos que são registrados e disponíveis comercialmente, como drogas botânicas (PAGANOTTI, 2013).

6.4 Ensaio Microscópico

Através das análises das micrografias, pode-se observar a formação de um rompimento na parede celular e conseqüentemente um extravasamento citoplasmático. Através das análises da microscopia confocal foi observado uma ação do OELS no valor de 2XCIM e 10XCIM para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* respectivamente. As imagens obtidas por MET confirmaram o efeito dos compostos sobre a estrutura celular bacteriana, com perda da integridade estrutural e da habilidade da membrana de atuar como uma barreira permeável, devido aos danos provocados na parede celular e membrana citoplasmática, corroborando os resultados deste trabalho.

O óleo essencial *Zanthoxylum chalybeum* e outros membros da família *Rutaceae* inibiram o crescimento de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* nas concentrações de 0.1% e 1%. Uma importante característica dos óleos essenciais e/ou de seus componentes é sua hidrofobicidade, ao reagir com os lipídeos da membrana celular dos microrganismos, destruindo as estruturas celulares, tornando-os mais permeáveis, e levando à morte celular (OCHENG et al., 2015).

Segundo Albano et al. (2016), os óleos essenciais apresentam constituintes químicos que são capazes de interagir com membranas celulares, devido à sua natureza hidrofóbica e, assim, se acumulam em estruturas ricas em lipídeos, causando danos estruturais e funcionais na célula.

Arfa et al. (2006) analisou a relação da estrutura química e atividade antimicrobiana do carvacrol, eugenol e mentol, frente aos seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, e observando que os óleos essenciais que possuem a capacidade de danificarem a membrana celular são mais efetivos, devido ao rompimento da barreira efetiva entre o citoplasma e o meio externo. Isso se explica devido à importação e exportação de metabólitos e íons essenciais para todas as atividades que ocorrem na célula microbiana, através da membrana celular. A presença do grupo hidroxila é essencial para atividade antimicrobiana. Esses dados confirmam os resultados observados neste estudo, através da microscopia de transmissão.

Segundo Silva (2018), o óleo de *Melaleuca leucadendron* apresentou um dano na parede celular de *Staphylococcus aureus*, sendo observado através de imagens de

microscopia de transmissão. Geralmente, as substâncias antimicrobianas utilizam proteínas como canais na membrana da bactéria, inibindo a formação de ligações cruzadas, importantes na síntese da parede celular e, conseqüentemente, na formação da substância do peptidoglicano, levando a bactéria à morte celular.

Burt (2007) afirma que o carvacrol e timol ligam a membrana externa das bactérias Gram negativas e aumentam a permeabilidade da membrana citoplasmática, levando à morte celular. A pesquisa com óleos essenciais tem despertado interesse de diversos pesquisadores, devido ao problema crescente de microrganismos resistentes, como também pelos efeitos deletérios de agentes como triclosan e clorexidina. Em bactérias Gram-negativas, a resistência aos efeitos antimicrobianos pode estar relacionada com a hidrofobicidade da membrana externa, que é rica em lipossacarídeos. Dessa forma, é de se esperar que óleos essenciais sejam mais efetivos em bactérias Gram-positivas, quando comparados com bactérias Gram-negativas (BURT, 2004).

Todavia, Veras et al. (2016), em modelos de ratos usando 2mg do timol, observaram que o timol como maior constituinte do OELS é o responsável pelo processo inflamatório.

Já Freires et al. (2015) abordaram a eficiência em relação à atividade antimicrobiana em ensaios *in vitro* e para ensaios clínicos, na forma de colutório bucal contendo o óleo da *L. sidoides* Cham, sendo considerado promissor para redução da placa dental e gengivite. Através de outras análises, observou-se que o timol e carvacrol, presentes na *L. sidoides* Cham, foram eficazes na redução do biofilme e gengivite em adultos, destacando o potencial terapêutico da *L. sidoides* Cham.

Lobo et al. (2014) demonstraram que adição do óleo da *L. sidoides* Cham nos dentífricos promoveu a redução de *Streptococcus mutans* na saliva, em um período de 5 dias, e os baixos níveis de *S. mutans* foram mantidos durante a análise subsequente, de 30, 60, 180 e 365 dias. Os autores concluíram que a *L. sidoides* Cham contém constituintes voláteis relacionados a fatores biológicos intrínsecos e, assim, pode ser empregada nas formulações de dentífricos, sendo usada na eficiência contra *S. mutans*.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans e *Porphyromonas gingivalis* vivem em uma complexa comunidade dentro de uma matriz de glicocálix, organizadas como biofilme e aderidas na estrutura do dente, que confere a essas comunidades fenótipos

específicos, incluindo a redução da susceptibilidade aos antimicrobianos (MÍNGUEZ et al., 2018).

De modo geral, os resultados apresentados nesta pesquisa corroboram outros estudos nessa linha de investigação, demonstrando os efeitos antimicrobianos do óleo essencial da *L. sidoides* Cham.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, os compostos testados apresentam ação antimicrobiana *in vitro*, o que os habilita para potencial agente na elaboração da pasta de orabase com a finalidade de uso terapêutico para periodontia.

- O timol é o composto majoritário do OELS;
- O OELS e seus compostos isolados, timol e carvacrol, são biologicamente ativos, apresentando efeito antimicrobiano inibitório contra cepas de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*;
- *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* apresentaram irregularidades na membrana celular e parede celular, observando extravasamento do conteúdo citoplasmático;
- O OELS apresentou citotoxicidade em células de fibroblastos em concentrações acima de 0,15%;
- A formulação farmacêutica de pasta de orabase com OELS se mostrou estável e viável para uso clínico;
- Concentrações menores que o OELS (< 0,15%) podem ser preparadas em associação com digluconato de clorexidina;
- A concentração de 0.15% de OELS se mostrou eficaz para redução de carga bacteriana Gram negativa e segura para uso intra oral em curtos períodos de tempo.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALBANO, M.; ALVES, F. C. B.; ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; PEREIRA, A. F. M.; CUNHA, M. de L. R. de S. da; RALL, V. L. M.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 83-90, 2016.
- AL-GHUTAIMEL, H. et al. Common Periodontal Diseases of Children and Adolescents. **International Journal of Dentistry**, v. 2014, n.1, p. 850674, 2014.
- ALLAKER, R.P.; DOUGLAS, C.W.I. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, n.1, p. 8-13, Jan. 2009.
- ALMEIDA, R.M. et al. Uso de antimicrobianos sistêmicos e locais no tratamento da Periodontite Agressiva. **Oral Sciences**, v.6, n.1, p. 4-9, Jan./Jun. 2014.
- ALVES, C. et al. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao Diabetes Melito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.51, n.7, p. 1050-1057, out. 2007.
- ALVES, C.C. Tratamento periodontal – sua racionalização. **Dentistry Clinica**, p. 12-14, 2011. Disponível em: <http://www.manuelneves.com/artigos/2011/CA06.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2017.
- ALVES, F. C. B.; BARBOSA, L. N.; ANDRADE, B. F.; ALBANO, M.; FURTADO, F. B.; PEREIRA, A. F. M.; FERNANDES JÚNIOR, A. Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1831-1836, 2016.
- ANDREWS, J. Determination of minium inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy**, v.48, Suppl.1, p. 5-16, July 2001.
- ARFA, A.; BEM S.; COMBES, L.; PREZIOSI-BELLOY, N.; GONTARD, P. C. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. The Society for Applied Microbiology, **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 149-154, 2006.
- BARBOSA, R. et al. Effects of *Lippia sidoides* essential oil, thymol, p-cymene, myrcene and caryophyllene on rat sciatic nerve excitability. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n.12, p. e-6351, Oct. 2017.
- BERDITSCH, M. et al. Synergistic effect of membrane active peptides polymixin B and gradicidins on multidrug resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemoteraph**, v.59, n.9, p. 5288-5296, Sept. 2015.
- BHATIA, M.; UROLAGIN, S. S.; PENTYALA, K. B.; UROLAGIN, S. B.; B, M. K.; BHOI, S. Novel Therapeutic Approach for the Treatment of Periodontitis by Curcumin **Journal**

of **Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 12, p. ZC65-9, 2014. Doi: 10.7860/JCDR/2014/8231.5343

BORGES, A. R.; AIRES, J.R.D.A.; HIGINO, T.M.M.; MEDEIROS, M.D.G.F.D.; CITÓ, A.M.D.G.L.; LOPES, J.A.D. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Exp Parasitol**. v. 132, n. 2, p. 123-8, 2012.

BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.40, n.3, p. 349-356, Mar. 2007.

BOTELHO, M.A. et al. Nanotechnology in Phytotherapy: antiinflammatory effect of a Nanostructured thymol gel from *Lippia sidoides* Cham in acute periodontitis in rats. **Phytotherapy Research**, v.30, n.1, p. 152-159, Jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 466**, de 2012.

BRITO, A. F. R. **Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *ocotea porosa*(nees) Barroso e *Nectandra megapotâmica***. 2009. 123 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química, 2009.

BRITO, D.I.V. et al. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, n.4, Supl.2, p. 836-844, 2015.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p. 223-253, Aug. 2004.

BURT, S.A.; ZEE, R. van der; KOETS, A.P.; GRAAFF, A.; M. de; KNAPEN, F. van; GAASTRA, W.; HAAGSMAN, H.P.; VELDHUIZEN, E.J. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 14, p. 4484-90, Jul. 2007.

CASARIN, M. et al. **Ação da solução de clorexidina 0,12%, óleos essenciais e triclosan em biofilme bucal formado por diferentes concentrações de oxigênio** – um estudo piloto. 2012. Disponível em: <http://www.unifra.br/eventos/sepe2012/Trabalhos/5673.pdf>. Acesso em: 21 maio 2017.

CASTRO, S.A. et al. *Porphyromonas gingivalis* gingipains cause defective macrophage migration towards apoptotic cells and inhibit phagocytosis of primary apoptotic neutrophils. **Cell Death & Disease**, v.8, n.3, p. e2644, Mar. 2017.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA (CFO). **Resolução 179**, de 1993. Código de Ética Profissional Odontológico.

CHANG, Y.C.; TAI, K.W.; HUANG, F.M.; HUANG, M.F. Cytotoxic and nongenotoxic effects of phenolic compounds in human pulp cell cultures. **J. Endod.**, v. 26, p. 440-443, 2000.

CHAUHAN, A.K.; KANG, S.C. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* serovar thymurium in vitro and reverts infected and macrophages and oxidative stress in an ex vivo model. **Research in Microbiology**, v.165, n.7, p. 559-565, Sept. 2014.

CHEN, H.; SHI, Q.; QING, Y.; YAO, Y.; CAO, Y. Cytotoxicity of Modified Nonequilibrium Plasma with Chlorhexidine Digluconate on Primary Cultured Human Gingival Fibroblasts. **J Huazhong University Sci Technology**, v. 36, n. 1, p. 137-141, 2016.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some Essential Oils - Present status and future perspectives- review. **Medicines**, v.4, n.3, pii: E58, Aug. 2017.

CIANDRINI, E. et al. In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. **Clinical Oral Investigations**, v.18, n.8, p. 2001-2013, Nov. 2014.

COSTA, M.F. et al. Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: a systematic review. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.71, n.2, p. 141-155, Feb. 2018.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 563-582, Oct. 1999.

COX, S.D.; MARKHAN, J.L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.4, p. 930-936, Oct. 2007.

DINELLI, W. et al. Desenvolvimento, aplicação e avaliação de um programa de orientação sobre higiene bucal junto a pré-escolares. **Stoma**, v.13, n.57, p. 27-30, 2000.

DUQUE, C. et al. Downregulation of GbpB, a component of the vicRK regulon, affects biofilm formation and cell surface characteristics of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v.79, n.2, p. 786-796, Feb. 2011.

EBBERS, M.; LÜBCKE, P. M.; VOLZKE, J.; KRIEBEL, K.; HIEKE, C.; ENGELMANN, R.; LANG, H.; KREIKEMEYER, B.; MÜLLER-HILKE, B. Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. **Scientific Reports**, v. 8, n. 15129, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33129-z>

EBERSOLE, J.L. et al. The periodontal war: microbes and immunity. **Periodontology** **2000**, v.75, n.1, p. 52-115, Oct. 2017.

ESPINDOLA, L.C.P. **Efeito Ajunto da Solução de hipoclorito de sódio a 0,1% no controle do biofilme dental, gengivite e microbiota oral**: estudo clinico randomizado, duplo cego e controlado. 2016. 111f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

FERRER, M. et al. Antibiotic use and microbiome function. **Biochemical Pharmacology**, v.134, n.15, p. 114-126, Jun. 2017.

FILIPPIS, A.D. et al. Vitamin D reduces the inflammatory response by Porphyromonas gingivalis infection by modulating human β -defensin-3 in human gingival epithelium and periodontal ligament cells. **International Immunopharmacology**, v.47, n.1, p. 106-117, Jun. 2017.

FINE, D.H. et al. Effect of rinsing with an essential oil-containing mouthrinse on subgingival periodontopathogens. **Journal Periodontology**, v.78, n.10, p. 1935-1942, Oct. 2007.

FREIRES, I.A. et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review molecules. **Molecules**, v.20, n.4, p. 7329-7358, Apr. 2015.

FREIRES, I.A. et al. The alveolar bone protective e effects of natural products: A systematic review. **Archives of Oral Biology**, v.87, p. 193-203, Mar. 2018.

GERITS, E.; VERSTRAETEN, N.; MICHIELS, J. New approaches to combat Porphyromonas gingivalis biofilms. **Journal of Oral Microbiology**, v.9, n.1, p. 1-11, Mar. 2017.

HAMOUD, R. et al. Synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol, EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including E. coli. **Phytomedicine**, v.21, n.4, p. 443-447, Mar. 2014.

HERRMANN, F.; WINK, M. Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1191-1196, 2011.

HIGHFIELD, J. Diagnosis and classification of periodontal disease. **Australian Dental Journal**, v.54, Suppl.1, p. S11-26, Sept. 2009.

HORTENSE, S.R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v.22, n.2, p. 178-184, maio/ago. 2010.

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R.L. Bacterial interactions in dental biofilm. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 435-444, Sept./Oct. 2011.

IZUI, S.; SEKINE, S.; MAEDA, K.; KUBONIWA, M.; TAKADA, A.; AMANO, A.; NAGATA, H. Antibacterial Activity of Curcumin Against Periodontopathic Bacteria. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 1, p. 83-90, 2016.

JAKUBOVICS, N.S.; KOLENBRANDER, PE. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. **Oral Diseases**, v.16, n.8, p. 729-739, Nov. 2010.

JAMES, P. et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.3, p. CD008676, Mar. 2017.

JEOL. Tokyo, Japan Jóia, 2017.

JESUS, F.P. et al. In vitro activity of Carvacrol and Thimol combined and antifungals or antibacterials against Pythium insidiosum. **Journal de Mycologie Medicale**, v.25, n.2, p. e89-93, June 2015.

JÓIA, F. **Cálcio favorece a formação de biofilme por *Porphyromonas gingivalis* = Calcium increases *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation.** 2017. 34f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Buco-Dental, Faculdade de Odontologia, Universidade de Campinas Piracicaba, Piracicaba, 2017.

JUIZ, P.J.L. et al. Atividade Antimicrobiana do óleo essencial de *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum* sobre periodontopatógenos. **Brazilian Journal Periodontology**, v.26, n.4, p. 7-14, 2016.

KADKHODA, Z. et al. Comparison of 1-periodontal indices and cultural *Porphyromonas gingivalis* colony count in aggressive periodontitis patients treated by scaling and root planning with or without metronidazole gel. **Journal of Dentistry**, v.9, n.1, p. 50-58, 2012.

KIMUZUKA, R. et al. Congo red-binding protein in rough -phenotype *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is amploid like fiber. **Bulletin of Tokyo Dental College**, v.50, n.1, p. 23-29, 2009.

KLEPSE, M.E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.5, p. 1207-1212, May 1998.

KOLENBRANDER, P.E. et al. Communication among Oral Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p. 486-505, Sept. 2002.

KOLENBRANDER P.E. et al. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontology 2000**, v.42, p. 47-79, 2006.

KSHITISH, D.; LAXMAN, V.K. The use of ozonated water and 0.2% chlorhexidine in the treatment of periodontitis patients: a clinical and microbiologic study. **Indian Journal of Dental Research**, v.21, n.3, p. 341-348, July/Sept. 2010.

LAMBERT, R.J. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.3, p. 453-462, Sept. 2001.

LAMONT, R.J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, n.12, p. 745-759, Dec. 2018.

LEE, K. et al. *Porphyromonas gingivalis* traffics into endoplasmic reticulum-rich autophagosomes for successful survival in human gingival epithelial cells. **Virulence**, v.9, n.1, p. 845-859, Dec. 2018.

LEWIS, R.E. et al. Comparison of E test, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, n.2, p. 345-351, Feb. 2002.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p.197-201, 2006.

LIMA, R. V. et al. Pulp repair after pulpotomy using different pulp capping agents: a comparative histologic analysis. *Pediatr. Dent*, v. 33, n. 1, p. 14-18, 2011.

LINAX. **Mini destilador de óleos essenciais**. Modelo D2 – v5.2 – Linax. Disponível em: www.linax.com.br. Acesso em: 21 maio 2017.

LOBO, P.L.D.; FONTELES, C.S.R.; CARVALHO, C.B.M.; NASCIMENTO, D.F.; FONSECA, S.G.C.; JAMACARU, F.V.F. Dose-response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci* in vivo. *Phytomed*, v. 18, n. 7, p. 551-6, 2011.

LOBO, P.L. et al. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides Cham* essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. *Phytomedicine*, v.21, n.8-9, p. 1043-1047, July/Aug. 2014.

LUCAS, V.G.M. et al. Interreação entre doença periodontal crônica e disfunção erétil - Revisão de literatura. *Revista da Academia Brasileira de Odontologia*, v. 27, n.1, p. 42-47, 2018.

MACHADO, C.A.; SEIXAS, F.R.F.; PEREIRA, K.O. Ação antibacteriana em óleos essenciais. *Jornada Científica da UNESC-2016*, n.1, 2016.

MALIK, R. et al. Virulence factors of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* **Journal of the International Clinical Dental Research Organization**, v.7, n.2, p. 137-145, 2018.

MANJI, F.; GUNNAR, D.; FEJERSKOV, O. Caries and periodontitis: contesting the conventional wisdom on their aetiology- review. *Caries Research*, v.52, n.6, p. 548-564, 2018.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, v.210, p. 402-414, Nov. 2016.

MEDEIROS, M. G. C. **Contribuições tecnológicas para formas farmacêuticas a partir de óleos essenciais de *Lippia sidoides Cham*. e *Lippia organoides H.B.K.* para tratamento das leishmanioses**. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual do Ceará, 2011.

MELO, J.O.; FACHIN, A.L.; RIZO, W.F.; JESUS, H.C.R.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; ALVES, P.B.; MARINS, M.A.; FRANÇA, S.C.; BLANK, A.F. Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 2, p. 2691-2697, 2014.

MENEZES, P, M, N.; BRITO, LUCHESE, M. C.; A. M.; LIMA, J. T. de; RIBEIRO, L. A. de A.; SILVA, F. S. Atividade farmacológica de óleos essenciais no sistema respiratório: uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 14, n. 3, p. 16-31, 2017.

MERCAN, U.; GONEN, Z. B.; SALKIN, H.; YALCIN-ULKER, G. M.; MERAL, D. G. Comparison of the effect of postoperative care agents on human gingival fibroblasts: a preliminary study. *Eur Oral Research*, v. 53, n. 2, p. 67-73, 2019.

MILADI, H. et al. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and g-terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v.112, n.1, p. 156-163, Nov. 2017.

MÍNGUEZ, M. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* strains from periodontitis patients in Morocco. **Clinical Oral Investigations**, July 2018. doi: 10.1007/s00784-018-2539-2.

MORÃO, R.P. et al. Constituintes químicos e princípios farmacológicos do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia Origanoides*). **Revista Unimontes Científica**, v.18, n.1, p. 1-8, jan./jun. 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v, 65, p.55–63. 1983

NAZARRO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.6, n.12, p. 1451-1474, Dec. 2013.

NOSTRO, A. et al. Development and characterization of essential oil component-based polymer films: a potential approach to reduce bacterial biofilm. **Applied Microbial and Biothechnology**, v.97, n.21, p. 9515- 9523, Nov. 2013.

OCHENG, F. et al. Essential oils from ugandan aromatic medicinal plants: chemical composition and growth inhibitory effects on oral pathogens. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 4, p. 230832, 2015.

OLIVEIRA, A.P. et al. Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham and thymol to population management of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Industrial Crops and Products**, v.107, n.15, p. 198-205, Nov. 2017.

OLIVEIRA, T.B. et al. The use of *Lippia* in the treatment of periodontal diseases. **Journal of Dentistry & Public Health**, v.9, n.3, p. 227-237, 2018.

PALANIANPP, K.; HOLLEY, R.A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.140, n.2-3, p. 164-168, June 2010.

RAMAGE, G. et al. The epithelial cell response to health and disease associated oral biofilm models. **Journal of Periodontal Research**, v.52, n.3, p. 325-333, June 2017.

REIS, F.B. **Bioconservação de pescado surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) com utilização da bactéria láctica bacteriocinogênica (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) e de extratos vegetais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.).** 2010. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

RODRIGUES, Í.S.C. et al. Antiplaque and antigingivitis effect of *lippia sidoides*. a double-blind clinical study in humans. **Journal of Applied Oral Science**, v.17, n.5, p. 404-407, Sept./Oct. 2009.

ROQUE, F. P. **Atividade antimicrobiana *in vitro* da fração obtida do óleo de pterodon pubescens contra *Candida* spp., *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e biofilme de *Candida albicans*.** 2013. 93p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2013.

ROSATO, A. et al. Elucidation of the synergistic action of *Mentha Piperita* essential oil with common antimicrobials. **PloS One**, v.13, n.8, p. 1-13, Aug. 2018.

ROSIER, B.T.; MARSH, P.D.; MIRA, A. Resilience of the oral microbiota in health: mechanisms that prevent dysbiosis. **Journal of Dental Research**, v.97, n.4, p. 371-380, Apr. 2018.

SAKANAKA, A.; TAKEUCHI, H.; KUBONIWA, M.; AMANO, A. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells. **Microb Pathog**, v. 94, p. 42-7, May 2016. Doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.003. Epub 2015 Oct 9.

SALIH, M.M. et al. Cytomorphologic patterns of Pap and PAS-stained oral exfoliative cytology smears in adult Saudi diabetic patients as compared to healthy controls. **Diagnostic Cytopathology**, v.46, n.6, p. 501-506, June 2017.

SANCHEZ, M.C. et al. Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. **Dental Materials**, v.33, n.4, p. 446-453, Apr. 2017.

SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, p.1-24, 2011.

SANTOS, D.M. et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino Acids**, v.39, n.1, p. 135-144, Jun. 2010.

SANTOS, S. et al. O papel do farmacêutico enquanto promotor da Saúde no uso racional de antibióticos. **Revista Saúde & Ciência**, v.6, n.1, p. 79-88, 2017.

SANTOS, A. E. dos. **Desenvolvimento e avaliação de espuma dental, contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.** Para prevenção e tratamento de lesões bucais. 2019. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2019.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p. 275-280, Oct./Dec. 2004.

SHARMA, A.J.A.Y.; VIVEK, K.; BAJPAI; KWANG-HYUN, B.A.E.K. Determination of Antibacterial Mode of Action of *Allium sativum* Essential Oil against Foodborne Pathogens Using Membrane Permeability and Surface Characteristic Parameters. **Journal of Food Safety**, v. 33, p. 197-208, 2013.

SILVA, A.F.B. et al. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella*

infection. **International immunopharmacology**, v. 31, p. 233-238, 2016.

SILVA, J. P. B. **Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos de própolis e do óleo essencial de Melaleuca leucadendron (L.) e proposição de um mecanismo de ação**. 2018. 63p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2018.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora UFSC, 2003. 834p.

SOCRANSKY, S.S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, n.2, p. 134-144, Feb. 1998.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, v.28, p. 12-55, 2002.

SOUMAYA, E.A. et al. Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n.20, p. 3229-3232, Sept. 2011.

SOUZA, C.R.F.; FERRAZ-FREITAS, P.N.; OLIVEIRA, W.P. Complexos de inclusão de binários, ternários e quaternários contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. **Química Nova**, v.39, n.8, p. 979-986, 2016.

SPÍNOLA, M. S.; NÓBREGA, D. F.; Del Bel CURY, A. A.; RICOMINI FILHO, A. P.; CURY, J. A.; TENUA, L. M. A. Fluoride Penetration and Clearance Are Higher in Exopolysaccharide-Containing Bacterial Pellets. **Caries Res**, v. 53, n. 1, p. 16-23, 2019. Doi: 10.1159/000488596.

STAMMATI, A. et al. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food Chem. **Toxicol**, v. 37, p. 813-823, 1999.

STOODLEY, P. et al. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, n.1, p. 83-92, Oct. 1999.

TAK, J.H.; JOVEL, E.; ISMAN, M.B. Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v.72, n.3, p. 474-480, Mar. 2016.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1561-1568, 2002.

VEL, E.; SAMPRES, I.; RAES, K. A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.30, p. 1-22, Aug. 2017.

VERAS, H.N. et al. Topical antinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. **Phytoterapy Research**, v.27, n.2, p. 179-185, Feb. 2016.

WANG, Y.; ZHANG, Y.; SHIA, Y.; PANA, X.; LUB, Y.; CAO, P. Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essentialoil on *Porphyromonas gingivalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 26-32, 2018.

WOLFFENBÜTTEL, A.N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica**. São Paulo: Roca, 2010. 466p.

YUAN, Y. et al. Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times. **Molecules**, v.21, n.8, p. E1024, Aug. 2016.

ZUZARTE, E.M.; SALGUEIRO, L. Essential oils chemistry. **Bioactive Essential Oils and Cancer**, v.1, p. 19-61, Sept. 2015.

Apêndices

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PPGDITM - DOUTORADO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Etapa clínica - Ensaio Clínico Fase I)

Título: AVALIAÇÃO LABORATORIAL E CLÍNICA DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO ÓLEO DE *Lippia sidoides* Cham PARA O CONTROLE DE PERIODONTOPATIAS

Pesquisador responsável: Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão

Prezado(a) Senhor(a),

Esta pesquisa faz parte do Programa de Pós-graduação da RENORBIO – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – Centro de Biotecnologia, desenvolvido pela doutoranda Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão, sob orientação do Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio.

Os objetivos da pesquisa são: Investigar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham (OELS), por diferentes técnicas; e desenvolver e avaliar a formulação farmacêutica com potencial de uso clínico para contribuir no controle de doenças periodontais.

Solicitamos a sua colaboração para permitir a aplicação do produto na cavidade oral, contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham; a coleta da saliva e do esfregaço da mucosa bucal, antes e após a utilização do produto, para posterior avaliação da atividade antimicrobiana e análise citomorfológica; além do preenchimento de questionário a respeito das características organolépticas do produto em questão.

Os riscos são mínimos, podendo ocorrer, em alguns casos, ardência e aumento da salivagem e desconforto no momento das coletas.

Solicitamos também a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Será garantida a privacidade dos dados coletados e, por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo.

Esclarecemos que sua participação na pesquisa é voluntária. Caso decida não participar da pesquisa, ou resolver a qualquer momento desistir de participar, não haverá dano e/ou prejuízo. Caso necessite de mais informações, contate a responsável pela pesquisa, Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão, pelo telefone (77) 991004740, e-mail: gusmao.isabel@yahoo.com.br, ou Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB – 1º andar –

Campus I – Cidade Universitária – Bairro Castelo Branco – CEP: 58059-900 – João Pessoa – PB.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa, autorizando também a publicação dos resultados, desde que seja preservada a minha integridade e anonimato. Estou ciente que receberei uma cópia deste documento.

Vitória da Conquista, ____/____/____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável



Espaço para impressão
dactiloscópica

APÊNDICE B - Questionário: Características Organolépticas**AVALIAÇÃO LABORATORIAL E CLÍNICA DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA
CONTENDO ÓLEO DE *Lippia sidoides* Cham PARA O CONTROLE DE
PERIODONTOPATIAS****1. Identificação**

1.1. Data: ____/____/____ N° de registro: _____ Telefone: _____

1.2. Nome: _____

1.3. Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____

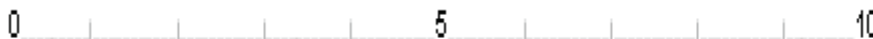
1.4. Sexo: () Feminino () Masculino

1.5. Código do produto: _____

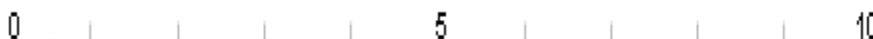
Assinatura do participante da pesquisa

2. Questionário - Uso da Visual Analogue Scale (VAS)**2.1 O produto apresenta boa aparência?**

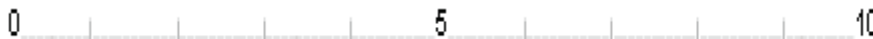
() Sim () Não

**2.2 O produto apresenta boa consistência?**

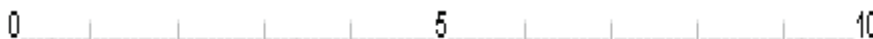
() Sim () Não

**2.3 O produto é de fácil aplicação?**

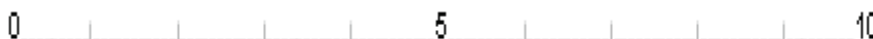
() Sim () Não

**2.4 O produto apresenta odor agradável?**

() Sim () Não

**2.5 O produto apresenta sabor agradável?**

() Sim () Não



2.6 Durante o uso do produto, houve aumento da salivação?

() Sim () Não

**2.7 Após o uso do produto, houve aumento da salivação?**

() Sim () Não

**2.8 Foi verificada alguma reação durante o uso do produto?**

() Ardência 0 5 10

() Dor 0 5 10

() Dormência 0 5 10

() Refrescância 0 5 10

() Náusea 0 5 10

() Outros _____

2.9 Foi verificada alguma reação após o uso do produto?

() Ardência 0 5 10

() Dor 0 5 10

() Dormência 0 5 10

() Refrescância 0 5 10

() Náusea 0 5 10

() Outros _____

APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PPGDITM - DOUTORADO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Etapa clínica - Ensaio Clínico Fase I)

Título: Avaliação laboratorial e clínica de formulação farmacêutica contendo óleo de *Lippia sidoides* Cham para o controle de periodontopatias

Pesquisador responsável: Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão

Prezado(a) Senhor(a),

Esta pesquisa faz parte do Programa de Pós-graduação Programa da RENORBIO – Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, sendo realizada e supervisionada pela doutoranda Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão, sob orientação do Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio.

O Objetivo dessa pesquisa é desenvolver e avaliar *in vitro* e *in vivo* a eficácia de uma Formulação Farmacêutica, contendo óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham para o Controle de Periodontopatias.

Solicitamos a sua colaboração para permitir a aplicação, na cavidade oral, de produto contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham; a coleta da saliva e do esfregaço da mucosa bucal, antes e após a utilização do produto, para posterior avaliação da atividade antimicrobiana e análise citomorfológica; além do preenchimento de questionário a respeito das características organolépticas do produto em questão.

Os riscos são mínimos, podendo ocorrer, em alguns casos, ardência e aumento da salivação, e desconforto no momento das coletas.

Solicitamos também a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Será garantida a privacidade dos dados coletados e, por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo.

Esclarecemos que sua participação na pesquisa é voluntária. Caso decida não participar da pesquisa, ou resolver a qualquer momento desistir de participar, não haverá dano e/ou prejuízo. Caso necessite de mais informações, contate a responsável pela pesquisa, Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão, pelo telefone (77) 99100-4740, e-mail: gusmao.isabel@yahoo.com.br, ou Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB – 1º andar – Campus I – Cidade Universitária – Bairro Castelo Branco – CEP: 58059-900 – João Pessoa – PB.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa, autorizando também a publicação dos resultados, desde que seja preservada a minha integridade e anonimato. Estou ciente que receberei uma cópia deste documento.

João Pessoa, ____/____/____.

Assinatura do Pesquisador Responsável



Espaço para impressão
dactiloscópica

Anexos

ANEXO A - Certidão do Comitê de Ética (Emenda)

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROENCAPSULADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE L. SIDOIDES CHAM. PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE MUCOSITE ORAL.

Pesquisador: ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 83179618.8.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.753.593

Apresentação do Projeto:

Projeto de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Desenvolvimento de produtos e processos da aluna ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS com a orientação do Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Desenvolver e avaliar in vitro e in vivo a eficácia das microcápsulas, contendo óleo essencial de Lippia sidoides Cham. no manejo terapêutico da mucosite oral radioinduzida em graus 2 e 3 (OMS).

Objetivos Específicos

Extrair o óleo essencial de L. sidoides Cham. Avaliar a relação concentração de timol X período de coleta, através de um estudo de sazonalidade.

Microencapsular o OELs e incorporar em uma forma farmacêutica para manejo terapêutico da mucosite oral radioinduzida.

Realizar testes pré-clínicos e verificar a estabilidade do óleo essencial de L. sidoides Cham., do produto intermediário microencapsulado e do produto final.

Verificar atividade antifúngica e antimicrobiana do óleo essencial de L. sidoides Cham., do produto intermediário microencapsulado e do produto final.

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROENCAPSULADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE L. SIDOIDES CHAM. PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE MUCOSITE ORAL.

Pesquisador: ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 83179618.8.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.753.593

Apresentação do Projeto:

Projeto de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Desenvolvimento de produtos e processos da aluna ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS com a orientação do Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Desenvolver e avaliar in vitro e in vivo a eficácia das microcápsulas, contendo óleo essencial de Lippia sidoides Cham. no manejo terapêutico da mucosite oral radioinduzida em graus 2 e 3 (OMS).

Objetivos Específicos

Extrair o óleo essencial de L. sidoides Cham. Avaliar a relação concentração de timol X período de coleta, através de um estudo de sazonalidade.

Microencapsular o OELs e incorporar em uma forma farmacêutica para manejo terapêutico da mucosite oral radioinduzida.

Realizar testes pré-clínicos e verificar a estabilidade do óleo essencial de L. sidoides Cham., do produto intermediário microencapsulado e do produto final.

Verificar atividade antifúngica e antimicrobiana do óleo essencial de L. sidoides Cham., do produto intermediário microencapsulado e do produto final.

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROENCAPSULADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE L. SIDOIDES CHAM. PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE MUCOSITE ORAL.

Pesquisador: ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 83179618.8.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.753.593

Apresentação do Projeto:

Projeto de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Desenvolvimento de produtos e processos da aluna ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS com a orientação do Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Desenvolver e avaliar in vitro e in vivo a eficácia das microcápsulas, contendo óleo essencial de Lippia sidoides Cham. no manejo terapêutico da mucosite oral radioinduzida em graus 2 e 3 (OMS).

Objetivos Específicos

Extrair o óleo essencial de L. sidoides Cham. Avaliar a relação concentração de timol X período de coleta, através de um estudo de sazonalidade.

Microencapsular o OELs e incorporar em uma forma farmacêutica para manejo terapêutico da mucosite oral radioinduzida.

Realizar testes pré-clínicos e verificar a estabilidade do óleo essencial de L. sidoides Cham., do produto intermediário microencapsulado e do produto final.

Verificar atividade antifúngica e antimicrobiana do óleo essencial de L. sidoides Cham., do produto intermediário microencapsulado e do produto final.

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 2.753.593

Realizar ensaio clínico randomizado para avaliação da eficácia terapêutica em pacientes portadores de mucosite oral graus 2 e 3 (OMS) radioinduzidas.

Avaliar comparativamente o uso de lasers de baixa potência com o produto obtido no manejo da mucosite oral radioinduzida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Espera-se que os riscos sejam mínimos, uma vez que os testes de toxicidade estão de acordo com o recomendado para segurança do paciente. Para coleta da saliva, o voluntário pode se sentir constrangido em cuspir diante do pesquisador. Quanto à utilização do produto, pode ocorrer em alguns casos, ardência e/ou aumento da salivação.

Benefícios: Melhora significativa do quadro clínico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo descritivo clínico, randomizado intervencionista, longitudinal e microscópico envolvendo indivíduos submetidos a tratamento radioterápico cérvico-facial exclusivo no Hospital Napoleão Laureano, em João Pessoa - PB. A população do estudo será composta de 60 indivíduos divididos em 3 grupos sendo: A- 20 indivíduos com mucosite oral graus 2 e 3 (OMS) que serão submetidos à laserterapia de baixa potência (aplicações por ponto por 3 dias), as aplicações serão realizadas com um aparelho de laser TWIN LASER – Reg. ANVISA/MS nº80051420007 – MM OPTICS LTDA; B - 20 indivíduos com mucosite oral grau 2 e 3 (OMS) que serão submetidos a utilização do produto à base de L. sidoides Cham. e C- 20 indivíduos com mucosite oral graus 2 e 3 (OMS) que serão submetidos ao protocolo clínico-farmacológico empregado pelo Hospital Napoleão Laureano.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Anexados.

Recomendações:

Todos os resultados de uma pesquisa deverão ser divulgados junto aos participantes da mesma, assim como na(s) instituição(ões) onde os dados foram obtidos. ACONSELHAMOS A TODOS OS PESQUISADORES (RESPONSÁVEL/ASSOCIADO/ASSISTENTE) QUE ANTES DO ENVIO DE QUALQUER PROTOCOLO DE PESQUISA, VIA PLATAFORMA BRASIL, SEJA FEITA UMA LEITURA DA 466/12, ASSIM COMO DA NORMA OPERACIONAL N. 001/13, AMBAS DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora cumpriu todas as pendências. Portanto considero este projeto APROVADO.

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA**



Continuação do Parecer: 2.753.593

Este é o meu parecer, salvo melhor juízo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1068107.pdf	03/06/2018 21:54:44		Aceito
Outros	CartadeAnuenciaLaureano.pdf	03/06/2018 21:51:10	ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDITMComitedeEticaCorrigido.pdf	24/04/2018 22:50:23	ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoAlessandraEstevam.pdf	24/04/2018 22:45:29	ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFaseClinicaIICorrigido.pdf	24/04/2018 22:44:40	ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 7ª Reunião realizada no dia 23/08/2018, o Projeto de pesquisa intitulado: **“DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROENCAPSULADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE L. SIDOIDES CHAM. PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE MUCOSITE ORAL”**, da pesquisadora Alessandra Estevam dos Santos. Prot. nº 036/18. CAAE: 83179618.8.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do relatório final do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andréa Márcia de C. Lima
Rég. SIAPE 1117810
Secretária do CEP-CCS-UFPB

ANEXO B - Registro de Patente



18/09/2018 870180131557
12:38

29409161809708140

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 068924 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 18/09/2018 às 12:38, Petição 870180131557

Inventor 1 de 4

Nome: ISABEL CELESTE CAIRES PEREIRA GUSMÃO

CPF: 60348798504

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: CCS, Cidade Universitária.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 998 21111

Fax:

Email: gusmao.isabel@yahoo.com.br

Nome: FÁBIO CORREIA SAMPAIO

CPF: 52697096434

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: CCS, Cidade Universitária.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 998 21111

Fax:

Email: fcsampa@uol.com.br

Nome: ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS

CPF: 00964753405

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Major Salustiano Ribeiro, 125 Ed Sandalos, Apto 301,
Tambauzinho.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58042-090

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 514188

Fax:

Email: alessandra_estevam@hotmail.com

Nome: RAIMUNDO APRÍGIO DE MENEZES JÚNIOR

CPF: 56922760387

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: CEAR, Cidade Universitária.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 987 297668

Fax:

Email: jrmenezes@cear.ufpb.br



**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 ABDE352

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

Número do cadastro: **ABDE352**
 Usuário: **FABIO SAMPAIO**
 CPF/CNPJ: **526.970.964-34**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Lippia sidoides
lippia para higiene bucal

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Pesquisas com oleos de Lippia sidoides**

Equipe

FABIO SAMPAIO **Universidade Federal da Paraíba**

Resultados Obtidos

Requerimento de propriedade intelectual

Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2018 010699 6**
Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2017 018692 0**
Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2018 012597 4**
Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2018 0689240**
Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2018 012597 4**

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Teses, dissertações e revistas científicas**

Data do Cadastro: **05/11/2018 21:37:09**
Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **21:39** de **05/11/2018**.



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