

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO CINAMALDEÍDO A 1% EM
MODELOS DE BIOFILMES POLIMICROBIANOS ORIGINADOS A
PARTIR DA SALIVA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM
GENGIVITE SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO**

Sandson Cleyton Ferreira da Silva Oliveira

SAPIENTIA AEDIFICAT

SANDSON CLEYTON FERREIRA DA SILVA OLIVEIRA

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO CINAMALDEÍDO A 1% EM
MODELOS DE BIOFILMES POLIMICROBIANOS ORIGINADOS A
PARTIR DA SALIVA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM
GINGIVITE SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO**

**ANTIMICROBIAL EFFECT OF 1% CINAMALDEHYDE IN MODELS
OF POLYMICROBIAL BIOFILMS ORIGINATED FROM THE SALIVA
OF HEALTHY INDIVIDUALS WITH GINGIVITIS ON TITANIUM
SURFACES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr^a. Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida Cavalcanti

João Pessoa
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BIBLIOTECÁRIO:

O48e Oliveira, Sandson Cleyton Ferreira da Silva.
Efeito antimicrobiano do cinamaldeído a 1% em
modelos de biofilmes polimicrobianos originados a
partir da saliva de indivíduos saudáveis e com
gingivite sobre superfícies de titânio / Sandson
Cleyton Ferreira da Silva Oliveira. - João Pessoa,
2022.
53 f. : il.

Orientação: Leopoldina de F. D. de A. Cavalcanti.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Odontologia - Cinamaldeído. 2. Biofilme dental.
3. Produtos naturais. 4. Gingivite. 5. Titânio. I.
Cavalcanti, Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida. II.
Título.

UFPB/BC CDU 616.314:547.571(043)

Informações Complementares:

Título em outro idioma: Antimicrobial effect of 1% cinamaldehyde in models of polymicrobial biofilms originated from the saliva of healthy individuals with gingivitis on titanium surfaces.

Palavras-chave em outro idioma: Natural Products, Biofilms, Saliva, Titanium.

Área de concentração: Ciências Odontológicas

Linha de Pesquisa: Fisiopatologia dos tecidos buco-maxilo-faciais

Banca examinadora: Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida Cavalcanti (Orientador, UFPB); Yuri Wanderley Cavalcanti (UFPB); Francisco Humberto Xavier Júnior (UFPB).

Data de defesa: 30-06-2022

Informações acadêmicas e profissionais do(a) aluno(a)

- ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3493-9118>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6276976439941418>



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
(DOCUMENTO ANEXO – 2)

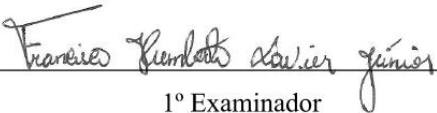
João Pessoa, 30 de junho de 2022.

CANDIDATO: SANDSON CLEYTON FERREIRA DA SILVA OLIVEIRA

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: “Efeito antibacteriano do cinamaldeído a 1% em modelos de biofilmes polimicrobianos originados a partir da saliva de indivíduos saudáveis e com gengivite sobre superfícies de titânio.”

1º EXAMINADOR: Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO XAVIER JÚNIOR

Parecer: (x)Aprovado () Insuficiente () Reprovado


1º Examinador

2º EXAMINADOR: Prof. Dr. YURI WANDERLEY CAVALCANTI

Parecer: (x)Aprovado () Insuficiente () Reprovado


Documento assinado digitalmente
YURI WANDERLEY CAVALCANTI
Data: 13/07/2022 16:41:44-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>
2º Examinador

3º EXAMINADOR: Prof. Dr. LEOPOLDINA DE F DANTAS DE ALMEIDA

Parecer: (x)Aprovado () Insuficiente () Reprovado


Documento assinado digitalmente
LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE ALMEIDA C.
Data: 04/07/2022 15:31:30-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>
3º Examinador

DEDICATÓRIA

A Deus, à minha família, à minha esposa e, em especial, à minha avó materna, Teresinha, por todo suporte, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por imenso amor! Que Tua vontade se cumpra em minha vida, meu Senhor. Guiai-me pelo caminho do bem, sempre me capacitando, de modo que eu possa fazer e dar o melhor de mim em ações, escolhas e decisões de vida. Amém!

À minha avó materna, Teresinha Rosa da Silva, merecedora de todo o amor e admiração deste mundo. Obrigado pelos seus ensinamentos! Dignamente, você criou seus filhos sempre acreditando que, através da educação, poderiam conquistar o mundo. E estava certa! Rogo a Deus, diariamente, pela sua saúde e que Ele lhe cubra de mais bênçãos. Que esta seja apenas mais uma conquista diante de muitas outras que estão por vir. Amo-te!

Ao meu pai, José Ivanixon Alves de Oliveira, pela força, paciência, cumplicidade, suporte e verdadeira amizade. Às vezes, faltam-me até palavras para descrever o tamanho do sentimento de gratidão e orgulho que sinto do ser humano que você representa, meu pai. Sou seu fã! Espero um dia, retribuir ao senhor e aos meus futuros filhos, todo o zelo e preocupação que você com a nossa família. Mesmo distante, sempre está nos ensinando sobre integridade, dedicação, compaixão e responsabilidade. Meus sinceros agradecimentos!

À minha mãe, Elza Ferreira da Silva, pelo amor, carinho e lealdade. Obrigado por ser tão resiliente e batalhadora. Obrigado por todo o suporte que me ofereceu durante esses anos fora de casa. E mais ainda, obrigado por acreditar e sonhar comigo. Amo-te!

À minha esposa, Juliana Ramille dos Santos Serafim, por compartilhar comigo todos os percalços necessários para que eu chegasse até aqui. Com você tudo fica mais leve, amor da minha vida. MUITÍSSIMO obrigado por todo zelo, amor e preocupação. Sou extremamente abençoado por ter você em minha vida. Amo-te!

Aos meus irmãos, tios, avós, primos e amigos...meus sinceros agradecimentos! Obrigado por saber que sempre poderei contar com cada um de vocês. Sem dúvidas, recebi um grande suporte de vocês. Obrigado por tudo!

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida Cavalcanti, pelo suporte e paciência que teve comigo durante a realização deste trabalho. MUITÍSSIMO obrigado, professora!

Aos meus colegas do grupo de pesquisa: Helô, Naldo, Iasmim, Camila, Verônica, Mariana, Ísis e Arella. Obrigado pelos momentos no laboratório e também pela ajuda que me foi dada durante os experimentos. Vocês são dez!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba (PPGO-UFPB). Em especial, ao professor e coordenador do PPGO, prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti. Obrigado, professor, pela disponibilidade e suporte que me foi prestado em todas as vezes que lhe pedi ajuda. Aos demais professores, agradeço grandemente pelo compartilhamento do conhecimento e troca de experiências em cada encontro que tivemos durante esse tempo de mestrado.

Ao Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP), pelo espaço e disponibilidade para execução deste trabalho. Sem dúvidas, esse espaço ficará marcado na minha história.

Aos meus colegas de turma de mestrado, pela convivência e também processo intenso de viver a pós-graduação. Desejo muito sucesso e perseverança a todos!

Aos funcionários da Universidade Federal da Paraíba, por todo zelo e mantimento do bom funcionamento da instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela oportunidade de bolsa para a realização deste estudo.

E, por fim, a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho.

RESUMO

O cinamaldeído é um fitoconstituente derivado da canela e possui propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano do cinamaldeído a 1% em modelos de biofilme polimicrobianos, obtidos a partir da saliva de indivíduos saudáveis e diagnosticados com gengivite, semeados sobre superfícies de titânio. Tratou-se de um estudo laboratorial, no qual amostras salivares de 12 indivíduos, sendo 6 deles com condições orais saudáveis e 6 com diagnóstico de gengivite foram coletadas por meio de estimulação com filme de parafina por 5 minutos. Uma parte das amostras de saliva foi filtrada e reservada para a formação da película salivar e a outra – saliva não filtrada – foi destinada para os modelos de biofilmes de microcosmos. Para tanto, discos de titânio ($n=8/\text{grupo}$), com dimensões $1,3 \times 1,3 \times 0,2\text{cm}$, foram selecionados (Rugosidade de área de superfície $> 0,20 \mu\text{m} < 1 \mu\text{m}$) e esterilizados. Os modelos de biofilme originados a partir da saliva de indivíduos saudáveis (HB) e com gengivite (GB) simularam uma transição das condições clínicas de peri-implante mucosite. Os espécimes de titânio foram submetidos a formação de película salivar por 60 minutos, a 37°C . Em seguida, foi realizado o modelo em aerobiose por 72h, em meio BHI com 1% de sacarose. Posteriormente, as amostras foram expostas as substâncias avaliadas: Clorexidina 0,12% (CHX - controle terapêutico), Solução Salina (SS - controle negativo) e Cinamaldeído 1% (CIN - grupo experimental). Estas exposições foram realizadas durante 1 minuto a cada 24 horas, por 3 dias consecutivos. Após a última exposição, os biofilmes foram cultivados por 24 horas adicionais, totalizando 7 dias de cultivo. Os biofilmes foram avaliados quanto a viabilidade celular, metabolismo celular e produção de polissacarídeos extracelulares solúveis (PecS) e insolúveis (PecI). As variáveis foram analisadas estatisticamente utilizando ANOVA complementado por Tukey ou Kruskal Wallis complementado por Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). Os resultados demonstraram que na quantificação de microrganismos viáveis, com exceção do meio ASD ($p>0,05$), todos os meios do modelo de biofilme HB apresentaram diferenças estatísticas, sendo as menores médias apresentadas entre as substâncias destacadas a seguir: BHI (CIN $10,28 \pm 0,50$), MSA (CIN $10,28 \pm 0,45$ e CHX $10,69 \pm 0,13$), ASM (CIN $2,54 \pm 4,34$ e CHX $4,69 \pm 5,14$). Não foi verificada diferenças estatísticas para a viabilidade celular entre as substâncias avaliadas em

biofilme GB ($p>0,05$). Para o ensaio de MTT também não foi verificado diferença estatística entre nenhuma das substâncias estudadas nos modelos de biofilme HB e GB ($p>0,05$). Foi verificado diferença estatística para os PecS do grupo HB, no qual demonstraram as menores concentrações para CIN ($8,94\pm 10,80$) e CHX ($30,55\pm 21,99$), respectivamente, e também para os PecI do grupo GB, no qual a menor concentração foi observada para o CIN ($-7,08\pm 8,73$). A eficácia antimicrobiana do cinamaldeído a 1% variou de acordo com o tipo de biofilme polimicrobiano envolvido.

Palavras-chave: Produtos Naturais; Biofilmes; Saliva; Titânio; Canela.

ABSTRACT

Cinnamaldehyde is a phytoconstituent derived from cinnamon and has antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory properties. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of 1% cinnamaldehyde in polymicrobial biofilm models, obtained from the saliva of healthy and gingivitis-affected individuals, measured on infection surfaces. It was a laboratory study, in which salivary samples from 12 individuals, 6 of them with healthy oral conditions and 6 with a diagnosis of gingivitis, were collected through stimulation with paraffin film for 5 minutes. A part of the saliva sample was filtered and reserved for the formation of the salivary pellicle and the other part – unfiltered saliva – was destined to the models of microcosm biofilms. For this purpose, lever discs ($n=8/\text{group}$), measuring $1.3 \times 1.3 \times 0.2\text{cm}$, were selected (Surface area roughness $> 0.20 \mu\text{m} < 1 \mu\text{m}$) and sterilized. Biofilm models originated from the saliva of healthy (HB) and gingivitis (GB) individuals simulated a transition from peri-implant mucositis conditions. Membrane specimens were tolerated for salivary pellicle formation for 60 minutes at 37°C . Then, the model was performed in aerobic conditions for 72 hours, in BHI medium with 1% sucrose. Subsequently, the exposures were exposed to the evaluated substances: Chlorhexidine 0.12% (CHX - therapeutic control), Saline Solution (SS - negative control) and Cinnamaldehyde 1% (CIN - experimental group). These exposures were performed for 1 minute every 24 hours, for 3 consecutive days. After the last exposure, the biofilms were cultured for an additional 24 hours, totaling 7 days of culture. Biofilms were evaluated for cell viability, cell metabolism and production of soluble (PecS) and insoluble (PecI) extracellular polysaccharides. Variables were statistically evaluated using Tukey-complemented ANOVA or Mann-Whitney-complemented Kruskal Wallis ($\alpha=5\%$). The pathogenic results that in the quantification of viable microorganisms, with the exception of the ASD medium ($p>0.05$), all the media of the HB biofilm model influenced statistics, with the lowest averages developed among the substances highlighted below: BHI (CIN 10.28 ± 0.50), MSA (CIN 10.28 ± 0.45 and CHX 10.69 ± 0.13), ASM (CIN 2.54 ± 4.34 and CHX 4.69 ± 5.14). Statistics for cell viability between assessments on GB biofilm ($p>0.05$) were not verified. For the MTT assay, no statistical difference was found between any of the substances tested in the HB and GB biofilm models ($p>0.05$). A statistical difference was verified for the PecS of

the HB group, in which declaration of minors for CIN (8.94 ± 10.80) and CHX (30.55 ± 21.99), respectively, and also for the Pecl of the group GB , not which the lowest concentration was observed for NIC (-7.08 ± 8.73). The antimicrobial efficacy of 1% cinnamaldehyde varies according to the type of polymicrobial biofilm involved.

Keywords: Natural products; Biofilms; Salive; Titanium; Cinnamon.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Associação Americana de Periodontia
ASD	Ágar Saburaud Dextrose
BHI	Brain Heart Infusion
BHIA	Brain Heart Infusion Ágar
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CPI	Community Periodontal Index <i>traduzido como</i> Índice Periodontal Comunitário
MSA	Mitis Salivarius Agar
MTT	Metiltetrazolium
PIP	Perda de Inserção Periodontal
Ra	Rugosidade de Superfície
SDH	Desidrogenase Succínica
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Biofilmes Orais	
2.2 Classificação das doenças periimplantares e estratégias de tratamento	
2.3 Uso de produtos naturais na Odontologia	
2.4 Cinamaldeído: considerações e aplicações na Odontologia	
3. OBJETIVOS	12
4. Artigo 1	13
5. CONSIDERAÇÃO GERAIS	36
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

Os implantes dentários são considerados excelentes opções para a reabilitação oral, uma vez que substituem dentes perdidos e propiciam uma melhor qualidade de vida para as pessoas quanto à saúde bucal (DAUBERT; WESTEIN, 2019) quando comparado a outras formas de reabilitação, a exemplo de próteses removíveis (EMAMI et al., 2014). Entretanto, a má higienização oral (CIEPLIK et al., 2018), seguida da falta de consultas periódicas ao cirurgião-dentista podem desencadear inflamação ou perda de suporte dentário (SCHUWARZ et al., 2018), conduzindo a perda do implante dentário (CARINCI et al., 2019).

Apesar de serem superfícies biocompatíveis com os tecidos gengivais, são passíveis de adesão celular, representando nichos para o biofilme dentário e deposição de matriz extracelular (ROEHLING et al., 2016). Assim, *Streptococcus spp*, *Lactobacillus sp*, *Staphylococcus sp*, juntamente com alguns outros tipos de microrganismos anaeróbios, incluindo espécies de bacteroides, como *Tannarella forsythia* (XU et al., 2015), *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides ovatus* (REYNOLDS-CAMPBELL et al., 2017) podem se transformar em complexos patológicos, a exemplo de comunidades microbianas disbióticas, aumentando os fatores de virulência como secreção de polissacarídeos e adesão aos tecidos do hospedeiro (XU et al., 2015; BEZERRA et al., 2019), possivelmente, implicando no surgimento de infecções bacterianas (BELIBASAKIS, 2018; HUSSAIN et al., 2020).

Na mucosite peri-implantar, doença semelhante à gengivite, a remoção do biofilme (agente etiológico) é suficiente para a devida regressão da doença. Contudo, é sabido que as estratégias de tratamento para as doenças gengivais e peri-implantares englobam: o uso de substâncias químicas, terapias mecânicas através da utilização de curetas manuais e também ultrassônicas, além da terapia fotodinâmica, sob uso de LASER (WANG et al., 2018; HAN et al., 2019; POLYZOIS, 2019).

Apesar da ampla diversidade terapêutica, alternativas frente aos métodos já existentes se tornam necessárias, uma vez que substâncias antimicrobianas utilizadas por longos períodos de tempo podem desenvolver resistência dos microrganismos, além de predispor o indivíduo a efeitos colaterais (WANG et al., 2018), como ressecamento de mucosa, manchamento dos dentes e alterações no paladar (FERREIRA et al., 2018). Assim, surge o interesse de estudos que

preenchem essa lacuna literária. Um deles é a utilização de moléculas isoladas de extratos naturais que têm demonstrado resultados promissores quanto a suas propriedades biológicas (RIBEIRO et al., 2018; BAKHTIARI et al., 2019; HE et al., 2019; MAIOR et al., 2019).

A literatura descreve o cinamaldeído como um fitoconstituente derivado da canela, com ampla atividade antimicrobiana, definindo que suas propriedades biológicas são capazes de atingir diferentes alvos (SHEREAZ, 2016; DOYLE; STEPHENS, 2019; BALASUBRAMANIAN et al., 2020).

Embora seu uso na Odontologia já tenha sido observado em alguns estudos (ALBANO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018; HE et al. 2019; BALASUBRAMANIAN et al., 2020; ALI et al., 2021), sendo este fitoconstituente utilizado em alguns modelos de biofilmes mono ou duo-espécie, ainda não há registros na literatura sobre a eficácia antimicrobiana desta molécula a 1% sobre modelos de biofilmes de polimicrobianos desenvolvidos a partir da saliva de indivíduos saudáveis e diagnosticados com gengivite, simultaneamente.

Uma vez que o biofilme dentário apresenta diversidade de microrganismos na saliva, se faz necessário a proposição de modelos *in vitro* de biofilmes polimicrobianos, em virtude de sua maior semelhança quanto ao biofilme oral real (CIEPLIK et al., 2018). Além disso, este estudo propõe um modelo experimental sobre superfícies de titânio, de modo que seja simulada uma condição de peri-implante mucosite.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito do cinamaldeído a 1% sobre biofilmes desenvolvidos a partir da saliva coletada de indivíduos saudáveis e diagnosticados com gengivite sobre superfícies de titânio.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOFILMES ORAIS

A boca é um ambiente complexo colonizado por comunidades de biofilmes (MASKE et al., 2016). Biofilmes são estruturas organizadas e imersas em uma matriz extracelular tridimensional, na qual há transporte de água e nutrientes que permitem o processo de proliferação celular. Além disto, a matriz extracelular favorece a proteção do biofilme a agentes antimicrobianos presentes na própria saliva, a exemplo das lactoferrinas e lactoperoxidases (NAKANO et al., 2017) e também do meio externo (FERNANDEZ Y MOSTAJO et al., 2017; BRAGA et al., 2018; COSTA et al., 2020).

Conforme a hipótese ecológica do biofilme, o déficit da higienização oral seguido pelo acúmulo de microrganismos, conduz uma resposta inflamatória no hospedeiro, onde patógenos ou seus produtos encontram leucócitos no epitélio ou no tecido conjuntivo subjacente (GRAVES et al., 2018), ocasionando mudanças substanciais, como diminuição do pH, que favorecem a proliferação bacteriana (CIEPLIK et al., 2018). Os complexos microbianos podem exibir sinergismos patogênicos, no qual determinantes de virulência, como a secreção de polissacarídeos extracelulares e adesão aos tecidos do hospedeiro (BEZERRA et al., 2019), podem apresentar-se supra regulados quando comparados a culturas planctônicas, favorecendo a disbiose (SOUSA et al. 2016a).

A composição das comunidades microbianas varia de acordo com seus sítios de colonização, tal como ocorre nas superfícies dentárias, mucosa, gengiva, língua (FERNANDEZ Y MOSTAJO et al., 2017), próteses (De MORAES et al., 2012) e implantes dentários (KOTSAKIS et al., 2016). O acúmulo do biofilme sobre superfícies de implantes pode favorecer a colonização e proliferação de bactérias periodontopatogênicas do complexo vermelho como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, na região dos tecidos peri-implantares, conduzindo a inflamação, falha da osteointegração, e podendo haver também perda do implante (CARINCI et al., 2019).

É sabido que a adesão bacteriana e o acúmulo de biofilme são considerados como os principais agentes etiológicos das doenças gengivais (CIEPLIK et al., 2018) e peri-implantares (VERARDI et al., 2016). A formação do biofilme é compreendida em três etapas: 1) formação da película adquirida; 2) colonização

primária bacteriana (biofilme não maduro é originado); e, finalmente, 3) colonização secundária (formação final de biofilme maduro contemplando diversos tipos de microrganismos) (ENGEL et al., 2020).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS PERIIMPLANTARES E ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO

De acordo com a Academia Americana de Periodontia (AAP), as doenças peri-implantares podem se apresentar de duas formas. A primeira, conhecida por peri-implante mucosite, é caracterizada por um processo inflamatório confinado aos tecidos em torno do implante dentário, sem o comprometimento do suporte ósseo (SCHUWARZ et al., 2018).

O grupo de bactérias pertencentes a esta doença é similar ao das bactérias que provocam a gengivite (ROSEN et al., 2013), tais como cocos, bacilos móveis e espiroquetas (CHARALAMPAKIS; BELIBASAKIS, 2015). Do ponto de vista dos complexos microbiológicos, os microrganismos envolvidos neste tipo de doença são os do tipo amarelo e roxo, a exemplo dos *Streptococcus spp* e *Actinomyces spp*, respectivamente (SANCHEZ et al., 2014).

Clinicamente, o diagnóstico da peri-implante mucosite se dá mediante a observação de inflamação na mucosa periimplantar, identificando-se eritema, edema e supuração (HEITZ-MAYFIELD; SALVI, 2018), por meio do sangramento à sondagem (HUSSAIN et al., 2021) sem comprometimento do suporte ósseo (HEITZ-MAYFIELD; SALVI, 2018). O plano de tratamento para esse tipo de doença deve englobar ações que visem cessar a inflamação nos tecidos gengivais.

Assim, a observação de indicadores como: higiene bucal inadequada, falta de visitas periódicas para controle e terapia de manutenção, a presença de cálculos, o tabagismo, a presença de doenças sistêmicas, além da falta de tecido queratinizado podem contribuir na inflamação e progressão da peri-implante mucosite, devendo o profissional estar atento aos indicadores e inserir as necessidades observadas no plano de tratamento individualizado dos pacientes (POLYZOIS et al., 2019).

Já a peri-implantite, também é caracterizada por um processo inflamatório nos tecidos em torno do implante, comprometendo o suporte ósseo, de modo a prejudicar o processo de osteointegração (SCHUWARZ et al., 2018). De forma distinta da peri mucosite, bactérias presentes neste tipo de biofilme são

caracterizadas por bacilos gram-negativos aeróbios, anaeróbios facultativos, espécies anaeróbias, *Staphylococcus* spp., *Candida* spp., *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium necrophorum*, *Campylobacter rectus* (CHARALAMPAKIS; BELIBASAKIS, 2015; EICK et al., 2016; SOUSA et al. 2016b).

Clinicamente, o diagnóstico da periimplantite é determinado quando há presença de sangramento e/ou supuração na sondagem suave; observação de profundidade de sondagem aumentada em comparação com exames anteriores; e, presença de perda óssea além das alterações do nível da crista óssea resultantes da remodelação óssea (POLYZOIS et al., 2019). Além disso, a doença pode ser compreendida em estágios de infecção precoce e também tardia.

Na infecção precoce, a contaminação pode ocorrer imediatamente após a colocação do implante ou durante as primeiras semanas que está acontecendo o processo de osseointegração (fase de cicatrização). Por outro lado, as infecções tardias ocorrem após a osseointegração e cicatrização dos implantes (POLYZOIS et al., 2019).

As estratégias de tratamento englobam o uso de substâncias químicas como Peróxido de Hidrogênio, Ácido Cítrico e Clorexidina. Métodos mecânicos como o desbridamento pelo uso de instrumentos manuais e a terapia com uso do LASER, a exemplo da terapia fotodinâmica (HAN et al., 2019) também estão incluídos como tratamentos.

Atualmente, o digluconato de clorexidina é considerado a substância padrão ouro para administração nos casos de doença peri-implantar, devido a sua eficácia antimicrobiana. Geralmente, a terapia com agentes químicos é associada a mecânica. Entretanto, essa substância apresenta algumas limitações, que incluem alteração de cor dos elementos dentários, alterações de paladar e também desequilíbrio microbiano (FERREIRA et al., 2018).

2.3 USO DE PRODUTOS NATURAIS NA ODONTOLOGIA

A literatura relata sobre o efeito *in vivo* e *in vitro* de outras substâncias com ação antimicrobiana, cujas composições diferem das substâncias químicas que já são conhecidas e utilizadas na clínica odontológica, no qual apresentam resultados satisfatórios para a terapia peri-implantar (GOSAU et al., 2010; VERARDI et al., 2016; MARTORANO-FERNANDES et al., 2020). Este conjunto de resultados

englobam o uso de substâncias oriundas de extratos de origem natural e moléculas isoladas, tal como os fitoconstituintes.

Gosau et al. (2010), realizaram um estudo de formação de biofilme *in vivo*, no qual foi avaliado a eficácia de seis agentes antimicrobianos na descontaminação da superfície de um biofilme oral aderido a implantes de titânio, a qual incluía a utilização do ácido cítrico 40%. Após análise das substâncias, os autores concluíram que todos os antissépticos testados parecem ser capazes de reduzir a quantidade total de microrganismos acumulados nas superfícies de titânio, sendo que substâncias como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, clorexidina e Listerine mostraram um efeito bactericida significativo contra bactérias aderentes.

Verardi et al. (2016), avaliaram, *in vitro*, o efeito de quatro substâncias antissépticas (clorexidina, triclosan, cloramina T e óleos essenciais) sobre a adesão e formação de biofilmes sobre superfícies de titânio. Os autores concluíram que embora não tenha sido identificado diferenças estatísticas entre os tratamentos antissépticos empregados, o atual padrão ouro (clorexidina), demonstrou que não superou a cloramina T, nem a utilização dos óleos essenciais, uma vez que se mostraram eficientes na redução da biomassa do biofilme em comparação com a solução salina (controle negativo).

Martorano-Fernandes et al. (2020), por sua vez, avaliaram o efeito inibitório da própolis vermelha brasileira em biofilmes monoespécie de *C. albicans* e biofilmes mistos (*C. albicans* e *C. glabrata*), desenvolvidos sobre superfícies de titânio. Para isso, os pesquisadores pre-condicionaram espécimes de titânio com saliva artificial para formação de biofilme. Posteriormente, os biofilmes foram expostos por 10 minutos a cada 24 horas, a três tipos de tratamento: solução salina estéril (controle de crescimento), clorexidina 0,12% e extrato de própolis vermelha 3%. As exposições aconteceram por 3 dias consecutivos e a análise dessas exposições, foram realizadas 96h após a adesão inicial dos biofilmes. Os autores concluíram que a própolis vermelha a 3% apresentou potencial atividade antifúngica, sugerindo ser uma alternativa viável ao tratamento empregado na periimplantite.

A utilização de produtos naturais e seus fitoconstituintes têm crescido, principalmente, devido aos seus efeitos antimicrobianos, podendo se tornar uma opção àqueles já utilizados (HE et al., 2019) e também por apresentar vantagens, como baixo custo de aquisição, fontes em abundância (folhas, frutos, caule e

sementes) (ZHU et al., 2017), baixos níveis de citotoxicidade (OLIVEIRA et al., 2014; de ARAÚJO et al., 2021), alta diversidade química e especificidade bioquímica, além de serem menos propensas a causar resistência bacteriana (HE et al., 2019).

Contudo, apesar de resultados promissores, mais estudos precisam ser realizados com a utilização destes produtos e moléculas, uma vez que elas se mostram como alternativas em potencial, capazes de causar efeitos adversos de menor magnitude (WANG et al., 2018) e estarem mais propensas a aceitação das pessoas por se tratarem de produtos de origem natural (OLIVEIRA et al., 2014).

2.4 CINAMALDEÍDO: CONSIDERAÇÕES E APLICAÇÕES NA ODONTOLOGIA

O cinamaldeído é o principal fitoconstituente extraído da casca da canela e pode ser encontrado em diversas regiões do mundo, sendo as espécies mais conhecidas a *Cinnamon cassia* (canela chinesa) e a *Cinnamon verum*, também chamada de *Cinnamon zeylanicum*, identificada como canela verdadeira (DOYLE; STEPHENS, 2018). O cinamaldeído está associado a seguimentos do mercado alimentício, medicinal e cosmético (FRIEDMAN, 2017). Entretanto, a principal atividade biológica relatada para este fitoconstituente é a de inibição da proliferação bacteriana (SHEREAZ et al., 2016).

Alguns autores relatam que as evidências experimentais disponíveis sobre a utilização do Cinamaldeído reportam que sua atividade antimicrobiana está ligada a inibição da parede celular, alteração de função da membrana, bem como atividade enzimática específica (SHEREAZ et al., 2016). Além disso, essas mudanças, sugerem que ele altere até mesmo a incorporação de outros componentes intersticiais celulares, a exemplo do mecanismo de entrada de outros agentes antimicrobianos para o interior das células, por meio de sinergismo (FRIEDMAN, 2017).

Apesar da atividade antimicrobiana ser a mais relatada para o cinamaldeído, a literatura também aponta outras propriedades para este fitoquímico, como propriedades anti-inflamatórias, anti-canceres, anti-diabéticas, anti-oxidante, anti-obesidade, anti-depressão, anti-úlceras e anti-viral (SHEREAZ et al., 2016; FRIEDMAN, 2017; DOYLE; STEPHENS, 2018).

Na área odontológica, já existem estudos disponíveis investigando as propriedades biológicas do cinamaldeído e seus potenciais efeitos biológicos (RIBEIRO et al., 2018; BAKHTIARI et al., 2019; HE et al., 2019; de SOUTO MAIOR et al., 2019; BALASUBRAMANIAN et al., 2020; MARTORANO-FERNANDES et al., 2021).

Ribeiro et al. (2018) avaliaram a ação antimicrobiana e citotóxica do eugenol, citronelal, hidrato de sabineno, trans-cinamaldeído, terpineol e ácido cinâmico contra *Streptococcus mutans*, em estados planctônicos e também de biofilme. A atividade antibacteriana dos compostos foi avaliada pela determinação da concentração bactericida mínima. Entre os fitoquímicos testados, o citronelol, ácido cinâmico e trans cinamaldeído foram os mais efetivos contra *S. mutans* planctônicos e sésseis. Assim, os autores consideraram que esses resultados propõem atividade antimicrobiana significativa e baixa citotoxicidade (caráter hidrofóbico), propondo seu potencial como um novo grupo de compostos terapêuticos para o controle de doenças infecciosas orais.

Bakhtiari et al. (2019), investigaram a eficácia do cinamaldeído sobre as espécies *Candida albicans* e *Candida glabrata* e comparar com a nistatina. Os autores analisaram a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) para cada substância estudada, pelo método de microdiluição. O extrato de cinamaldeído na concentração de 62,5 µl/ml foi capaz de prevenir o crescimento de *Candida albicans*. Em concentrações maiores, inibiu o aparecimento de *Candida albicans* completamente. Para casos de *Candida glabrata*, concentrações acima de 62,5 µl/ml, inibiram completamente o aparecimento desse tipo de *Candida*. Em comparação, a nistatina na concentração 1 µg/ml inibiu completamente *Candida albicans*, já na concentração de 8 µg/ml inibiu completamente a *Candida glabrata*. Os autores do estudo concluíram que apesar do cinamaldeído apresentar efeito inibitório sobre o crescimento de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, o efeito nessas duas espécies ainda se mostrava inferior ao que foi observado pelo uso de nistatina.

HE et al. (2019), avaliaram a atividade antimicrobiana do cinamaldeído em biofilmes de *S. mutans*. Para tanto, foram analisadas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), determinação de biomassa, avaliação metabólica, inspeção dos biofilmes por meio de Microscopia Confocal de Varredura a Laser, e expressão gênica de fatores relacionados à

virulência dos biofilmes. Os resultados mostraram que o cinamaldeído pode diminuir a biomassa do biofilme e o metabolismo em concentrações sub-CIM. As imagens de microscopia revelaram que as áreas de superfície cobertas por biofilme diminuíram com o aumento das concentrações de cinamaldeído. O cinamaldeído aumentou a hidrofobicidade da superfície celular, reduziu a agregação de *S. mutans*, inibiu a produção de ácido e a tolerância a ácidos. As expressões gênicas nos biofilmes foram reguladas negativamente na presença de cinamaldeído. Os autores concluíram que o cinamaldeído em nível sub-CIM suprimiu a atividade microbiana no biofilme de *S. mutans* modulando a hidrofobicidade, agregação, produção de ácido, tolerância a ácido e expressão gênica de virulência.

Souto Maior et al. (2019) investigaram a atividade antifúngica e a dureza Shore A de um condicionador de tecido (Softone™), modificado pela incorporação dos fitoquímicos terpinen-4-ol e cinamaldeído. Foram realizados métodos de difusão em ágar, microdiluição para determinar e avaliar a atividade antifúngica de fitoconstituintes. Os resultados do estudo mostraram que os fitoconstituintes incorporados ao Softone inibiram completamente o crescimento fúngico em concentrações que variassem de 20–40% e não apresentaram atividade antifúngica significativa em concentrações menores que 5%. Os autores pontuaram também que observou-se diferenças entre Softone não modificado e modificado. Os grupos contendo 10-40% de cinamaldeído incorporados ao Softone foram capazes de inibir completamente o biofilme. Concentrações abaixo de 40% de terpinen-4-ol mostraram inibição insatisfatória do biofilme. O cinamaldeído incorporado ao Softone inibiu a formação do biofilme de *Candida* em concentrações de 10 a 40%, sendo mais eficaz do que a modificação do terpinen-4-ol, apesar da inibição do halo observada por ambos os produtos.

Balasubramanian et al. (2020) investigaram os efeitos do trans-cinamaldeído (TC) e sua atividade sinérgica com clorexidina (CHX) e flúor contra *Streptococcus mutans*. Como método, os autores utilizaram a formação de biofilme do *Streptococcus mutans* (UA159), tratando-o de forma isolada com o TC, bem como em combinação com CHX ou fluoreto de sódio, com determinação do perfil sinérgico através do modelo de Potência de Interação Zero. Os resultados mostraram que TC mostrou forte sinergismo com CHX, mas obteve efeito aditivo com a utilização do fluoreto de sódio. O TC inibiu significativamente a formação de biofilme dependente de sacarose e a produção de ácido por *S. mutans*. Os autores

concluíram que o TC atua prejudicando genes relacionados ao metabolismo, detecção de quorum, expressão de bacteriocina, tolerância ao estresse e formação de biofilme.

Martorano-Fernandes et al. (2021) investigaram a atividade antifúngica dos fitoconstituintes cinamaldeído e α -terpineol como potenciais limpadores de prótese dentária, bem como o efeito dos tratamentos na mudança de cor de espécimes confeccionados a base de poli(metil)metacrilato (PMMA). Para avaliação, os autores utilizaram biofilmes de *Candida albicans* formados sobre espécimes de PMMA e expostos a um tratamento diário por 10 minutos com cinamaldeído (10 mg/ mL), α -terpineol (10 mg/ mL), NaCl 0,9%, e NaClO 1%. Análises de viabilidade celular (UFC/ mL), metabolismo celular (MTT) e rugosidade do biofilme foram realizadas. Os resultados do estudo mostraram que o cinamaldeído e α -terpineol foram capazes de diminuir o número de células viáveis, quando comparado ao uso da solução salina (controle de crescimento). Além disso, a utilização dos fitoconstituintes isolados também reduziram o metabolismo do biofilme em aproximadamente 70%. Ao que concerne à rugosidade de superfície, os fitoconstituintes utilizados demonstraram um biofilme pouco rugoso, similar ao uso do NaClO, sem aletrar a coloração dos espécimes de resina acrílica. Logo, os autores puderam concluir que ambos os fitoconstituintes, nas concentrações estudadas, apresentaram atividade antifúngica em biofilmes de *C. albicans* sem alterar a cor da resina acrílica e que, do ponto de vista clínico, as substâncias estudadas apresentam forte potencial para serem incorporadas em soluções para limpeza de próteses dentárias

Nessa perspectiva, apesar da disponibilidade de alguns estudos com utilização do cinamaldeído estarem disponíveis e avaliarem cepas e biofilmes menos complexos quando comparados ao biofilme oral, demonstra-se que ainda há a necessidade de estudos avaliando o efeito antimicrobiano em biofilmes polimicrobianos, a exemplo dos chamados microcosmos, considerando a origem biofilme dependente das doenças que acometem a cavidade bucal.

2.5 BIOFILMES MICROCOSMOS

As características físicas da cavidade oral, a variabilidade inerente da composição microbiana e as questões éticas associadas aos estudos clínicos, dificultam as investigações de experimentos *in vivo* (MASKE et al., 2016). Assim,

em decorrência dessas limitações, modelos de estudos *in vitro* tornam-se necessários para compreender tal complexidade, uma vez que são capazes de estimar menores fatores de confusão, tal como controle e confiabilidade dos participantes, além da coleta de amostras (CIEPLIK et al., 2018).

Os Biofilmes microcosmos podem ser definidos como ecossistemas artificiais e simplificados, que são usados para simular o comportamento de ecossistemas naturais sob condições controladas. Eles podem ser utilizados para determinar o papel ecológico de espécies-chave e também estudar os efeitos de disrupção dos biofilmes (FERNANDEZ Y MOSTAJO et al., 2017).

Frente a isso, é válido entender que modelos de biofilme de microcosmos apresentam semelhanças aos biofilmes orais reais, pois além de apresentar maior proximidade com o complexo *in vivo*, apresentam facilidade de manuseio e também demonstram menor dependência dos participantes quando comparado à modelos de cultivos *in situ* (KIM et al., 2016; CIEPLIK et al., 2018; SANTOS et al., 2019).

Portanto, a realização de estudos sob utilização de produtos naturais, tal como os fitoconstituintes, apresenta-se como uma alternativa promissora, frente a necessidade de se investigar suas aplicações e demais propriedades biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar o efeito antimicrobiano do cinamaldeído a 1% em modelos de biofilmes polimicrobianos formados a partir da coleta de saliva de indivíduos saudáveis e com gengivite sobre superfícies de titânio.

3.2 Objetivos específicos:

- Quantificar as células viáveis presentes no modelo exposto ao fitoconstituente;
- Determinar a atividade metabólica dos biofilmes expostos ao cinamaldeído, por meio do teste do sal de metiltetrazolium (MTT);
- Determinar a dosagem de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis presentes nos modelos de biofilmes.

4. ARTIGO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Natural Product Research” (Qualis A3, ISSN 1478-6419).

Efeito do cinamaldeído a 1% sobre biofilmes polimicrobianos, isolados de diferentes composições salivares, semeados sobre superfícies de titânio

Oliveira SCFS¹; Borges MHS¹; Almeida LFD².

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.
Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária
CEP: 58051-900, João Pessoa-Brasil.

²Professora Adjunta da Universidade Federal da Paraíba
Departamento de Clínica e Odontologia Social.
Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa-Brasil.

Avaliou-se o efeito do cinamaldeído a 1% em modelos de biofilmes polimicrobianos desenvolvidos a partir da saliva de indivíduos saudáveis e com gengivite sobre superfícies de titânio. Amostras salivares de 12 indivíduos (n=6 saudáveis e n=6 gengivite) foram coletadas. Parte da amostra foi filtrada e utilizada para formação da película salivar (n=8/grupo), enquanto a saliva não filtrada foi utilizada para o preparo dos inóculos microbianos, conforme os grupos HB (biofilme saudável) e GB (biofilme gengivite). Após o período de maturação dos biofilmes, os espécimes de titânio foram expostos ao cinamaldeído 1%, clorexidina 0,12% e solução salina por 1 minuto, por 3 dias consecutivos. Após a última exposição, os biofilmes foram cultivados por 24 horas adicionais. As análises foram realizadas por meio do teste ANOVA one-way, complementada pelo *post-hoc* de Tukey ou Kruskal-Wallis, complementado pelo Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). A viabilidade celular do grupo HB inferiu diferença estatística entre as médias dos meios BHI, ASM e MSA, apontando o cinamaldeído 1% como substância de maior capacidade para redução de UFC/mL. Na viabilidade celular do modelo GB, não foi observado diferença estatística ($p>0,05$) para nenhuma das substâncias testes. Também não foi verificado diferenças estatísticas para as análises metabólicas dos grupos HB e GB. Para a dosagem de PecS e Peci, verificou-se diferenças estatísticas entre as médias do cinamaldeído 1% e clorexidina 0,12% para os PecS do grupo HB e para os Peci do grupo GB. O cinamaldeído a 1% apresentou atividade antimicrobiana semelhante à clorexidina 0,12% frente aos biofilmes polimicrobianos sobre superfícies de titânio.

Palavras-Chaves: Produtos Naturais, Biofilme, Saliva, Titânio.

INTRODUÇÃO

O uso de implantes dentários tem se difundido na clínica odontológica possibilitando a reabilitações de casos complexos (LOSENICKÁ et al., 2021). Entretanto, o sucesso da técnica é acompanhado pela frequência de problemas associados ao acúmulo de biofilmes na superfície de implantes dentários e nos tecidos adjacentes, promovendo o surgimento de doenças peri-implantares, a exemplo da peri-implante mucosite e peri-implantite (SANCHEZ et al., 2014).

A característica polimicrobiana destas patologias requer planejamento criterioso para escolha do tratamento (POLYZOIS, 2019). Assim, a terapia deve envolver métodos de desbridamento mecânico, com uso de curetas plásticas ou titânio, e utilização de ultrassom. Métodos de ação antimicrobiana devem ser implementados, como a terapia fotodinâmica, além da medicação anti-séptica local utilizando digluconato de clorexidina, peróxido de hidrogênio, ou iodopovidona (SMEETS et al., 2014; RENVERT; POLYZOIS, 2018; WANG et al., 2019; POLYZOIS, 2019).

Estudos *in vivo*, assim como *in vitro* têm utilizado novas substâncias com efeito antimicrobiano, apresentando bons resultados na terapia peri-implantar (GOSAU et al., 2010; VERARDI et al., 2016; MARTORANO-FERNANDES et al., 2020). Nessa perspectiva, a utilização de produtos de origem natural tem crescido consideravelmente, a exemplo dos fitoconstituintes.

O cinamaldeído é um fitoconstituente extraído da canela, utilizado no ramo alimentício e cosmético (SHEREAZ, 2016). Alguns estudos sugerem que este fitoquímico desempenha atividade antimicrobiana a partir da capacidade de inibição da biossíntese da parede celular, permeabilização de membrana, além também da inibição de ATPase, justificando seu potencial para atingir vários alvos (SHEREAZ, 2016; DOYLE; STEPHENS, 2019; BALASUBRAMANIAN et al., 2020).

Entretanto, a literatura apresenta lacunas em relação aos tipos de biofilmes empregados nos ensaios *in vitro* que avaliam os efeitos antimicrobianos de fitoconstituintes, dentre estes o cinamaldeído. É importante salientar que a composição microbiana presente na saliva de indivíduos saudáveis é diferente da saliva de indivíduos diagnosticados com gengivite, uma vez que componentes salivares, tais como proteínas, enzimas salivares, imunoglobulina A (IgA), interleucina 1B (IL-1B) e metaloproteinases mostram-se como importantes fatores para o controle da composição microbiana (RANGBULLA et al., 2017). Nesse

sentido, a realização de experimentos *in vitro* podem fornecer descobertas relevantes quanto ao potencial antimicrobiano com uso de agentes químicos sobre biofilmes em superfícies de titânio.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito antibacteriano do cinamaldeído a 1% em modelos de biofilmes polimicrobianos originados a partir da saliva de indivíduos saudáveis e com gengivite sobre superfícies de titânio.

MATERIAL E MÉTODO

Considerações Éticas

Este estudo atendeu os parâmetros da declaração de Helsinki (1964) e suas demais alterações posteriores, bem como seguiu a legislação brasileira, adotando a Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde do Brasil. O comitê de ética institucional da Universidade Federal da Paraíba aprovou a realização deste estudo.

Todos participantes que concordaram em participar deste estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A partir dele, os voluntários foram informados sobre objetivo, riscos e benefícios da realização da pesquisa, bem como também da possibilidade de desistência de participação, em qualquer momento de sua execução, sem nenhum dano ou prejuízo.

Preparação dos Espécimes de Titânio

Foram utilizados espécimes de titânio (n=8 /grupo) comercialmente puro tipo IV, nas dimensões de 1,3 x 1,3 x 0,2 cm. Os mesmos foram adquiridos mediante compra já com polimento realizado por pasta abrasiva. Os espécimes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos para uso nos testes propostos.

A medição da rugosidade de superfície (Ra), anterior a adesão celular, foi determinada a partir da leitura em Perfilômetro Óptico 3D (Perfilômetro CCI MP Taylor Hobson). A análise foi determinada em 20x de aumento, na área total do espécime, considerando-se os padrões de medição xy (1024x1024 pixel), xyz (512x512 pixel) e z (256x256 pixel). A velocidade foi estabelecida em 3x e os valores de rugosidade medidos em µm. Os dados foram utilizados para alocação aleatória dos espécimes quanto a sua rugosidade (JANUS et al., 2010), no qual

foram selecionados os espécimes em que os valores de rugosidade de superfície fossem $>0,20\ \mu\text{m}$ e $<1\ \mu\text{m}$.

Coleta das amostras salivares

Todos os doadores de amostras salivares foram submetidos a avaliação do Índice Periodontal Comunitário modificado (CPI); avaliação da condição dentária; e, a Perda de Inserção Periodontal (PIP). Os exames clínicos para seleção dos participantes foram realizados segundo manual de instruções da 5ª edição de pesquisa em saúde bucal da Organização Mundial da Saúde (2013). As avaliações clínicas foram realizadas por um único examinador, previamente calibrado.

A calibração do examinador foi realizada em uma semana, sob condução de um especialista da área de Periodontia. Dessa forma, para garantir a reprodutibilidade do estudo, a análise de concordância intra-observadores se deu por meio do teste kappa. O resultado foi positivo, com valor acima de 0,80 (alto grau concordância) (LANDIS; KOCH, 1977). Após, a avaliação propriamente dita foi dada início.

Amostras salivares foram coletadas de 12 indivíduos ($n=06$ saudáveis e $n=06$ com gengivite), por meio do método da saliva estimulada com uso de parafilm, com tamanho padronizado pré-determinado (4cm x 4cm). Os doadores foram convidados a mascar uma amostra de parafilm durante 5 minutos e, em seguida, a coleta da saliva foi realizada em tubos de 50 mL, durante 5 minutos adicionais. Os doadores não poderiam apresentar comprometimento sistêmico, ter feito uso de antimicrobianos nos dois últimos meses (Costa et al., 2020), nem apresentar lesões de cárie dentária ativas. A coleta de amostras salivares de indivíduos saudáveis – foi realizada com pesquisadores deste grupo de estudo.

Após a coleta, foi realizado um *pool* salivar das amostras, e parte do volume foi esterilizado por meio de sistema filtrante $0,22\ \mu\text{m}$ (KASVI, Curitiba-Paraná, Brasil) e armazenado a -20°C . O volume filtrado (esterilizado) foi utilizado para a formação da película salivar sobre os espécimes de titânio do estudo, bem como também para suplementação do meio de cultura. O volume de saliva não filtrado se destinou ao preparo do inóculo dos biofilmes propostos.

Formação de Biofilme por modelo de Microcosmo

O modelo de biofilme de microcosmo seguiu a metodologia reproduzida por Costa et al. (2020), com adaptações. A preparação do inóculo foi realizada a partir do *pool* salivar não filtrado, considerando cada origem da amostra salivar. Assim, foram preparados inóculos provenientes da amostra do pool salivar de pacientes com saúde bucal (Biofilme Saudável - HB) e com diagnóstico de gengivite (Biofilme Gengivite - GB), sendo realizada a semeadura de dois biofilmes distintos, considerando a densidade celular de 10^7 células/mL.

Inicialmente, cada amostra salivar foi diluída (10^0 a 10^{-6}) e semeada em meio BHI caldo (Brain Heart Infusion) para contagem dos microrganismos totais e cálculo da concentração de microrganismos. Os inóculos foram preparados em meio BHI suplementado com 1% de sacarose, adicionados de 10% de saliva filtrada, em volume.

Os espécimes foram submetidos a formação da película salivar, com a adição de 500uL de saliva filtrada sobre as superfícies de titânio, por 60 minutos, a 37°C para promover a adsorção de proteínas aos espécimes, em placa de 24 poços. Após formação da película salivar, os biofilmes foram semeados e cultivados em microaerofilia, por meio da técnica da vela, durante 72 horas, simulando uma condição supragengival. O meio de cultura foi renovado a cada 24h de incubação (Fig.01).

Durante esta etapa, os biofilmes foram divididos em dois grupos, considerando a origem do pool salivar.

Preparação das substâncias

O cinamaldeído (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 1% foi empregado como substância teste de acordo com resultados prévios (dados não publicados). As especificações técnicas estão no quadro 1. O fitoconstituente foi previamente diluído em meio BHI com 1% de sacarose, adicionado de 0,02% de Tween 80. O sistema foi submetido a agitação em vórtex e armazenado a 4°C para utilização. Como controle terapêutico foi utilizado a solução de clorexidina 0,12% (Colgate-Palmolive, São Paulo, Brasil). A Solução salina (NaCl 0,9%) foi utilizada como controle negativo.

Quadro 1 – Descrição técnica do fitoconstituente cinamaldeído.

Substância	Fórmula Química	Densidade (g/mL, 20°C)	Peso Molecular
Cinamaldeído	$C_6H_5CH = CHCHO$	1,050	132,16 g/mol

Exposição as substâncias testes

Após o período de incubação de 72 horas do biofilme, o meio de cultura foi removido e os espécimes submetidos a exposição das soluções durante 1 minuto. Estas exposições foram realizadas a cada 24 horas por 3 dias consecutivos, sendo uma exposição diária realizada, mimetizando o efeito de um possível agente químico na cavidade oral. Após a exposição, as amostras foram lavadas com solução salina por 2 vezes e, em seguida, inserida nova alíquota de meio de cultura (BHI com 1% sacarose e 10% saliva filtrada). Após a última exposição, as placas foram incubadas por 24 horas adicionais e, então, os testes propostos foram realizados (**Fig.01**).

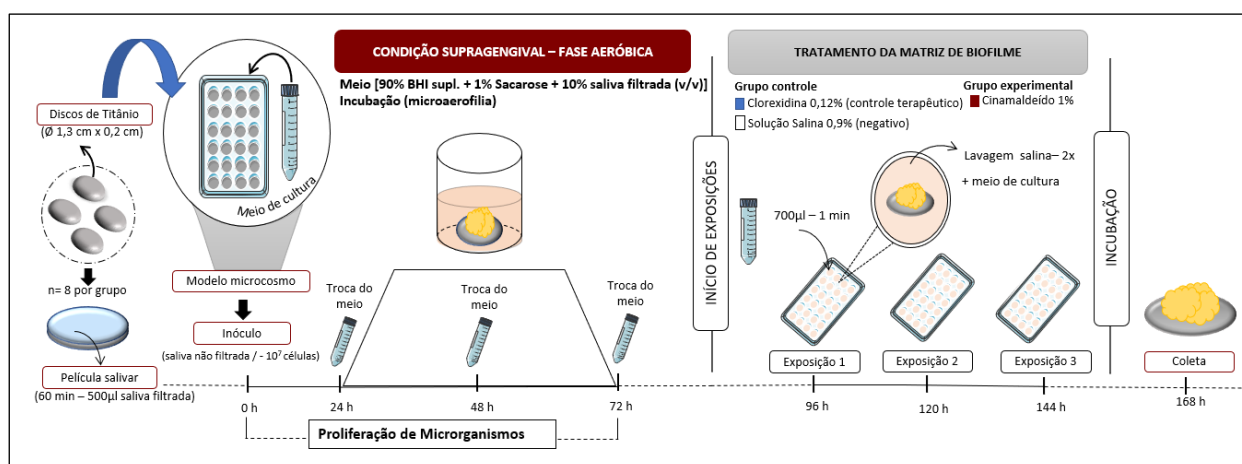


Fig.01 – Esquematização das etapas de formação de biofilme por modelo de Microcosmo e exposição as substâncias testes.

Quantificação de células viáveis

Para análise do número de microrganismos/UFC, os espécimes foram transferidos para tubos contendo 1,0 mL de solução salina estéril, submetidos à agitação em vórtex por 60 segundos, seguida da diluição seriada das alíquotas para determinação do número de microrganismos viáveis (10^{-1} até 10^{-7}).

Alíquotas de 10 µl de cada diluição seriada foram semeadas em placas de diferentes meios de cultura. Para quantificação de microrganismos totais, o meio Brain Heart Infusion Ágar (BHI) foi utilizado. Para quantificação e identificação de

Candida, foi utilizado o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). A identificação de *Streptococcus* do grupo *mitis-mutans* foi realizada pela semeadura das amostras em meio Mitis Salivarius Agar (MSA). *Staphylococcus* totais foram identificados pela semeadura em meio Ágar Sal Manitol (ASM).

Com exceção do Ágar Sal Manitol, que permaneceu em incubação por 48h, os demais meios de cultura foram incubados a 37°C, por 24h, em atmosfera de aerobiose. As amostras semeadas em meio MSA e BHI foram incubadas em microaerofilia, pela técnica da vela. O número de microrganismos viáveis foi definido após o crescimento dos sub-cultivos. O fator de diluição e o número de unidades formadoras de colônias de cada amostra foi utilizado para o cálculo da quantidade de microrganismos viáveis, expresso em logUFC/mL.

Análise metabólica do biofilme

Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e inseridos 600 µL de meio BHI contendo 10% de sal de metiltetrazolium (MTT). O sal foi oxidado pela enzima SDH (desidrogenase succínica), de modo que fosse determinado o metabolismo de células viáveis. Assim, os espécimes foram incubados durante 3 horas a 37°C na presença do sal de MTT e o sistema protegido da luz. Após, o meio foi removido e inseridos 600 µL de isopropanol ácido (6N-HCl) e a homogeneização das amostras realizadas. O sobrenadante foi removido e absorvância determinada a 570 nm em espectrofotômetro. Os valores de absorvância obtidos foram utilizados de forma absoluta.

Dosagem de Polissacarídeos Extracelulares Solúveis e Insolúveis

Para a dosagem dos polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis (PECs e PECis), utilizou-se 900µL da suspensão de biofilme (n=8/grupo). Os microtubos com a suspensão de biofilmes foram centrifugados a 3000 rpm, durante 5 min. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de PECs, ao passo que o precipitado dos biofilmes foi utilizado para determinação e dosagem PECis (AIRES et al., 2008). A metodologia de extração e dosagem de polissacarídeos foi previamente descrita na literatura pelo método do fenol-sulfúrico utilizando uma curva padrão de glicose com leitura a 490 nm (DUBOIS et al., 1956).

Análise dos dados

A tabulação e análise dos dados coletados foram realizadas por meio do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®), versão 21. A normalidade e homocedasticidade dos dados foi determinada pelos testes de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente. Após conferência das referidas determinações, a análise estatística foi realizada por meio de análise de variância one-way (1-way ANOVA) e testes de Tukey ou Kruskal Wallis complementado por Mann Whitney, sendo o nível de significância adotado para este estudo de 95%.

RESULTADOS:

Verificou-se que para a contagem do número de células viáveis dos biofilmes do grupo HB, as amostras semeadas nos meios BHI, MSA e ASM apresentaram diferenças estatísticas quanto a média de contagem final.

A contagem de microrganismos totais em meio BHI foi inferior para as amostras submetidas à exposição ao cinamaldeído 1% (**Fig.02**). As medias da viabilidade celular variaram entre $10,77 \pm 0,21$ e $10,28 \pm 0,50$ LogUFC/mL. Foi verificado diferença estatística entre cinamaldeído a 1% em comparação ao controle de crescimento e entre o cinamaldeído a 1% e a clorexidina 0,12%.

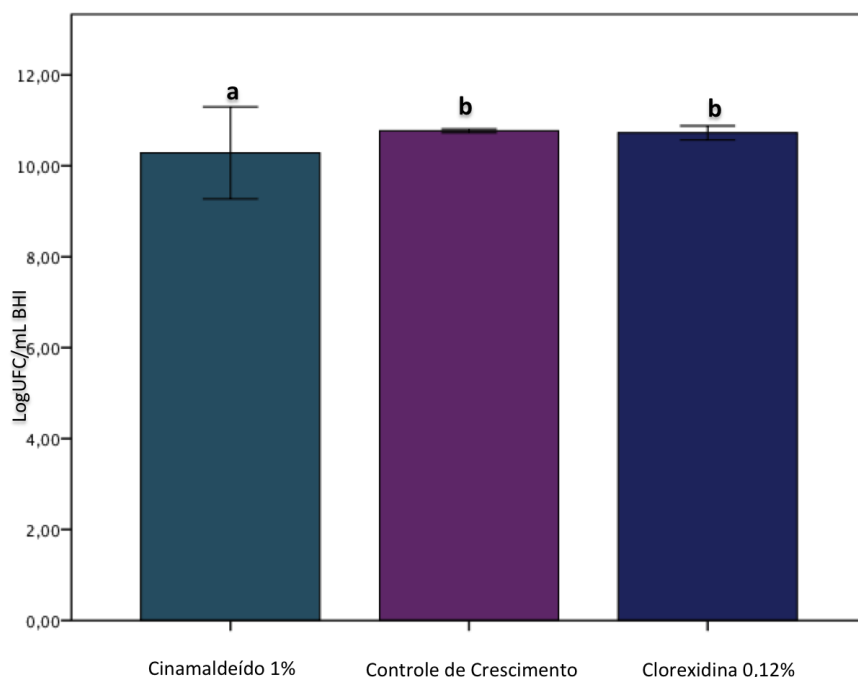


Fig.02: Viabilidade celular dos biofilmes HB (UFC/mL) em meio BHI para identificação de microrganismos totais. As colunas representam as médias e as barras de erro representam

os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). Substâncias: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

A contagem de *Streptococcus* do grupo *mitis-mutans* em meio MSA foi inferior para as amostras submetidas à exposição ao cinamaldeído 1% (**Fig.03**). As médias da viabilidade celular variaram entre $10,69 \pm 0,13$ e $10,28 \pm 0,45$ LogUFC/mL. Foi encontrado diferença estatística entre o cinamaldeído a 1% e a clorexidina 0,12%. Não foi verificada diferenças estatísticas entre o cinamaldeído a 1% e controle de crescimento, nem entre o controle de crescimento e a clorexidina 0,12%.

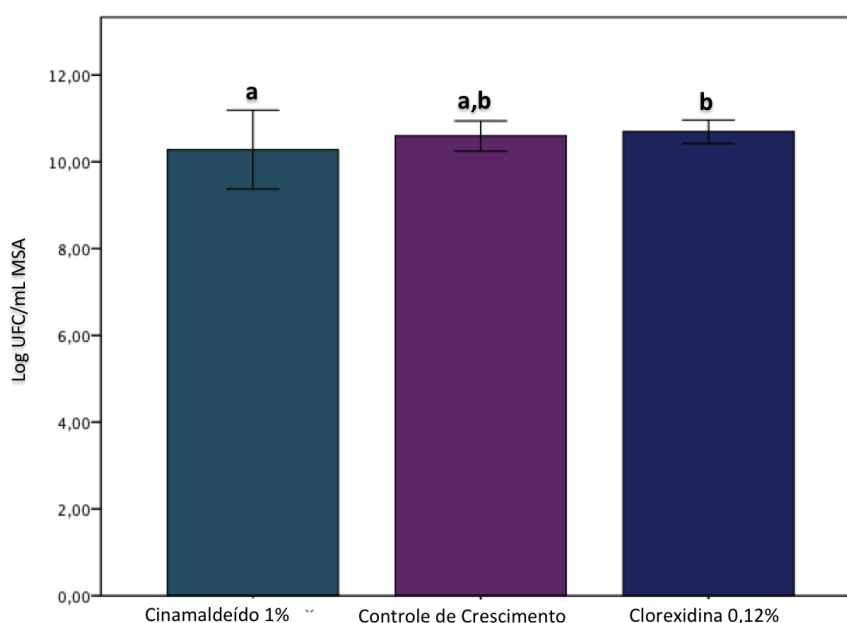


Fig.03: Viabilidade celular dos biofilmes HB (UFC/mL) em meio MSA para quantificação de *Streptococcus* dos grupos *mitis-mutans*. As colunas representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). Substâncias testes: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

A contagem de *Staphylococcus* totais em meio ASM foi inferior para as amostras submetidas à exposição ao cinamaldeído 1% (**Fig.04**). As médias da viabilidade celular variaram entre $9,05 \pm 0,29$ e $2,54 \pm 4,34$ LogUFC/mL. Foi verificada diferença estatística entre o cinamaldeído a 1% e a clorexidina 0,12%.

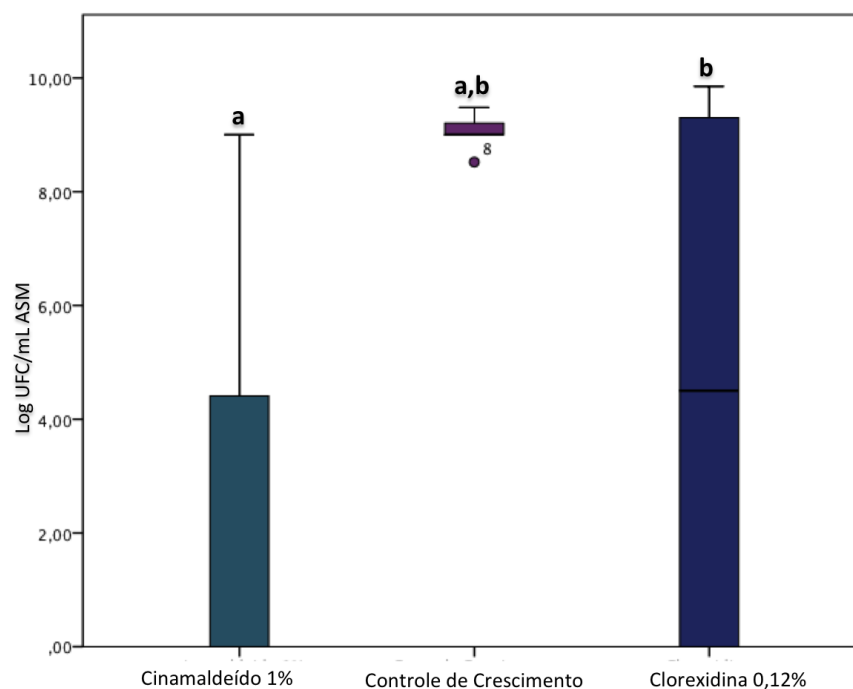


Fig.04: Viabilidade celular dos biofilmes HB (UFC/mL) em meio ASM para quantificação de *Staphylococcus* totais. As colunas representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$). Substâncias testes: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

A contagem de microrganismos do gênero *Candida* em meio ASD não apresentou diferença estatística entre as substâncias avaliadas para biofilmes HB (**Fig.05**). As medias da viabilidade celular foram $10,46 \pm 0,26$ LogUFC/mL para a clorexidina 0,12%, $10,14 \pm 0,45$ LogUFC/mL para o grupo controle de crescimento e $9,76 \pm 0,92$ LogUFC/mL para o cinamaldeído 1%.

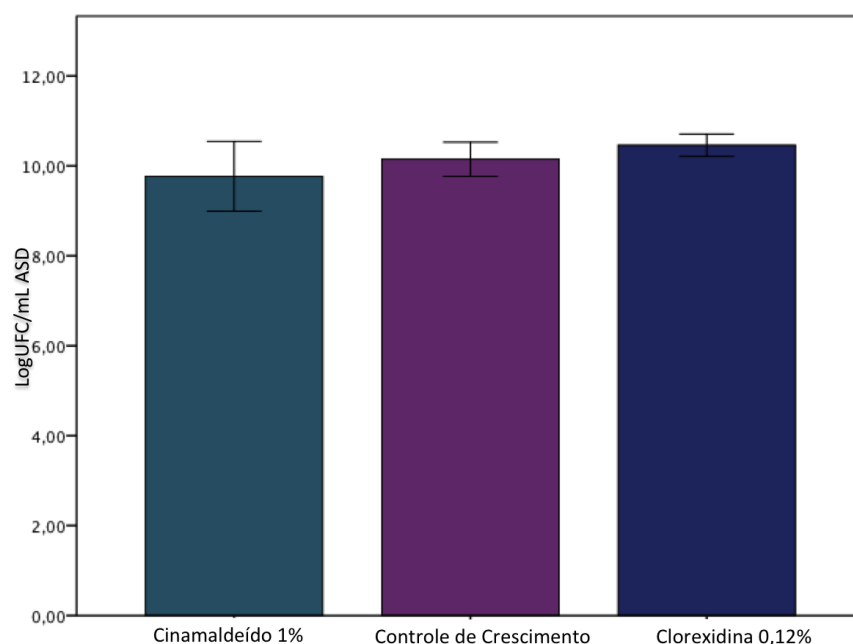


Fig.05: Viabilidade celular dos biofilmes HB (UFC/mL) em meio ASD para quantificação de microrganismos do gênero *Candida*. As colunas representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). Substâncias testes: Cinamaldeído 1%; Controle de Crescimento: Solução Salina; Controle positivo: Clorexidina 0,12%.

Para a viabilidade celular entre os biofilmes desenvolvidos a partir do grupo GB, inferiu-se que não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre nenhum dos meios de cultura sólidos estudados.

Para o meio BHI (**Fig.06**), as médias encontradas da viabilidade celular entre os grupos foram $10,72 \pm 0,11$ LogUFC/mL para o controle de crescimento, $9,78 \pm 1,07$ LogUFC/mL para a clorexidina 0,12% e $8,47 \pm 3,47$ LogUFC/mL para o cinamaldeído 1%.

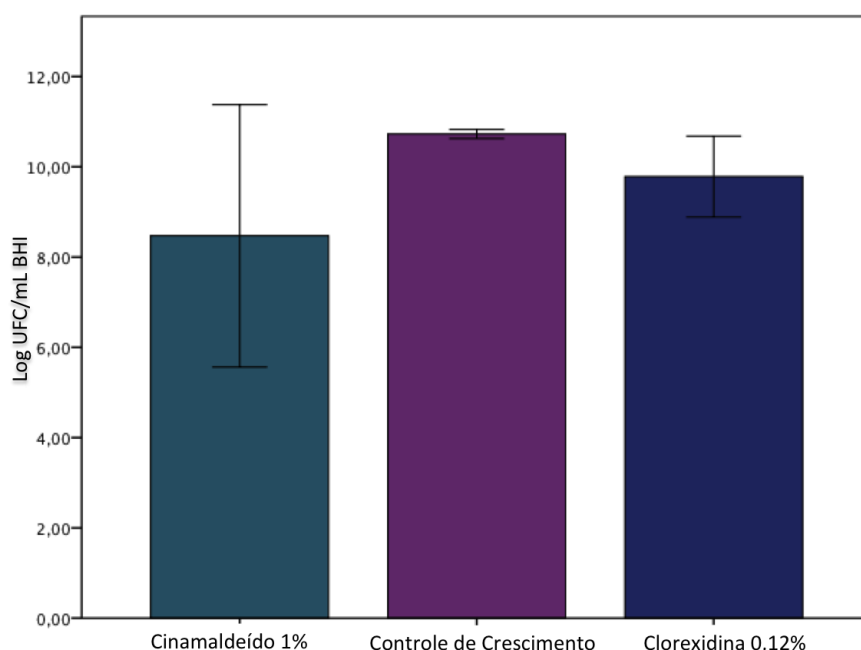


Fig.06: Viabilidade celular dos biofilmes GB (UFC/mL) em meio BHI para identificação de microrganismos totais. As colunas representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). Substâncias: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

Para o meio MSA (**Fig.07**), as médias encontradas da viabilidade celular entre os grupos foram $10,75 \pm 0,05$ LogUFC/mL para o controle de crescimento, $9,68 \pm 0,45$ LogUFC/mL para o cinamaldeído 1% e $8,69 \pm 3,64$ LogUFC/mL para a clorexidina 0,12%.

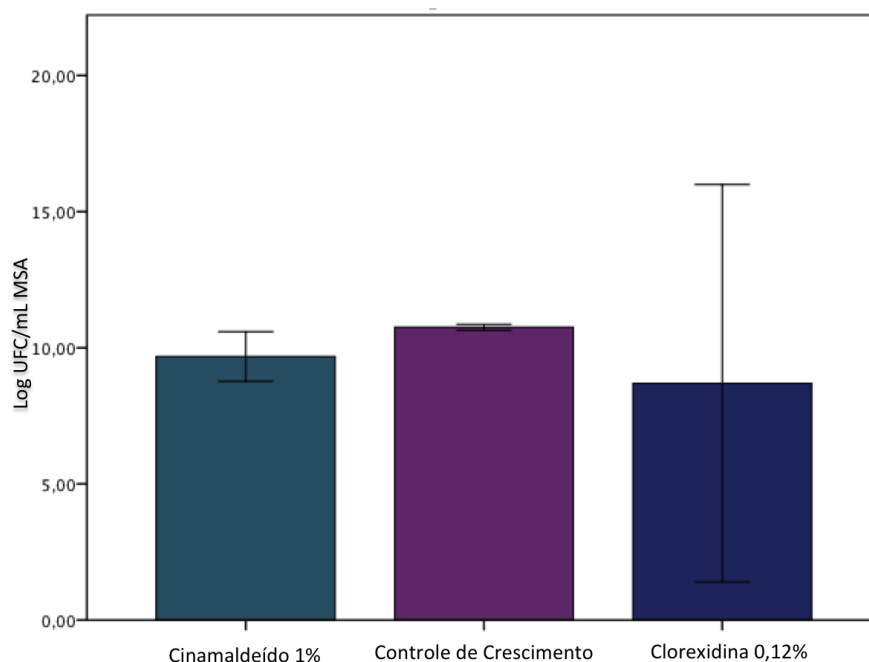


Fig.07: Viabilidade celular dos biofilmes GB (UFC/mL) em meio MSA para quantificação de *Streptococcus* dos grupos *mitis-mutans*. As colunas representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$). Substâncias testes: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

Para o meio ASM (**Fig.08**), as médias encontradas da viabilidade celular entre os grupos foram $9,96 \pm 0,59$ LogUFC/mL para o controle de crescimento, $8,21 \pm 3,36$ LogUFC/mL para o cinamaldeído 1% e $7,87 \pm 3,50$ LogUFC/mL para a clorexidina 0,12%.

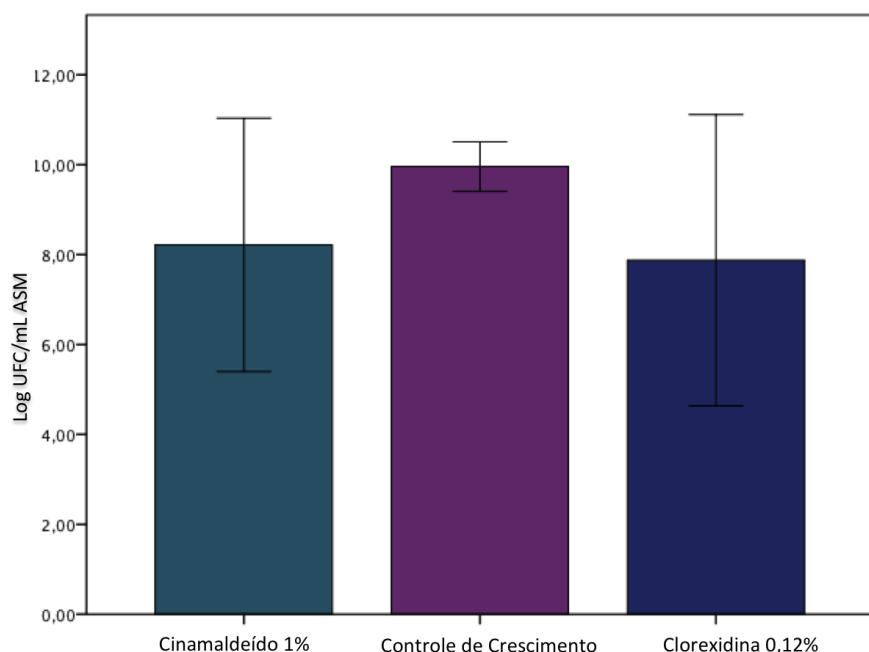


Fig.08: Viabilidade celular dos biofilmes GB (UFC/mL) em meio ASM para quantificação

de *Staphylococcus* totais. As colunas representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). Substâncias testes: GE:Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

Para o meio ASD (**Fig.09**), as médias encontradas da viabilidade celular entre os grupos foram $10,50 \pm 0,74$ LogUFC/mL para o controle de crescimento, $9,82 \pm 1,03$ LogUFC/mL para a clorexidina 0,12% e $9,52 \pm 0,50$ LogUFC/mL para o cinamaldeído 1%.

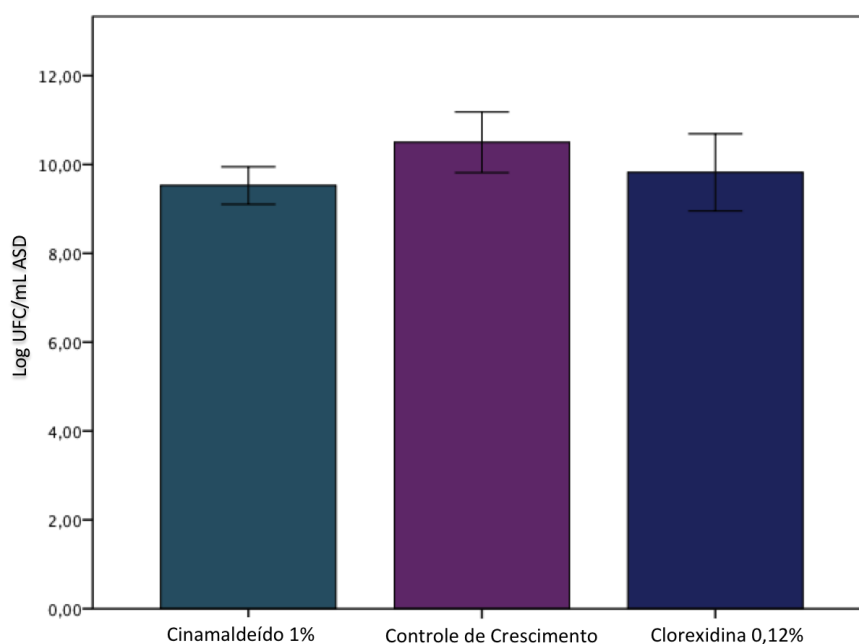


Fig.09: Viabilidade celular dos biofilmes GB (UFC/mL) em meio ASD para quantificação de microrganismos do gênero *Candida*. As colunas representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). Substâncias testes: Cinamaldeído 1%; Controle de Crescimento: Solução Salina; Controle positivo: Clorexidina 0,12%.

A análise metabólica dos biofilmes (MTT) desenvolvidos sobre os espécimes de titânio com as amostras salivares HB e GB está representada pelas **Figuras 10** e **11**, respectivamente. Conforme a representação dos gráficos, não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos, uma vez que a redução da atividade metabólica dos biofilmes mostrou-se semelhante entre as substâncias estudadas tanto entre as amostras salivares do grupo HB, como também GB.

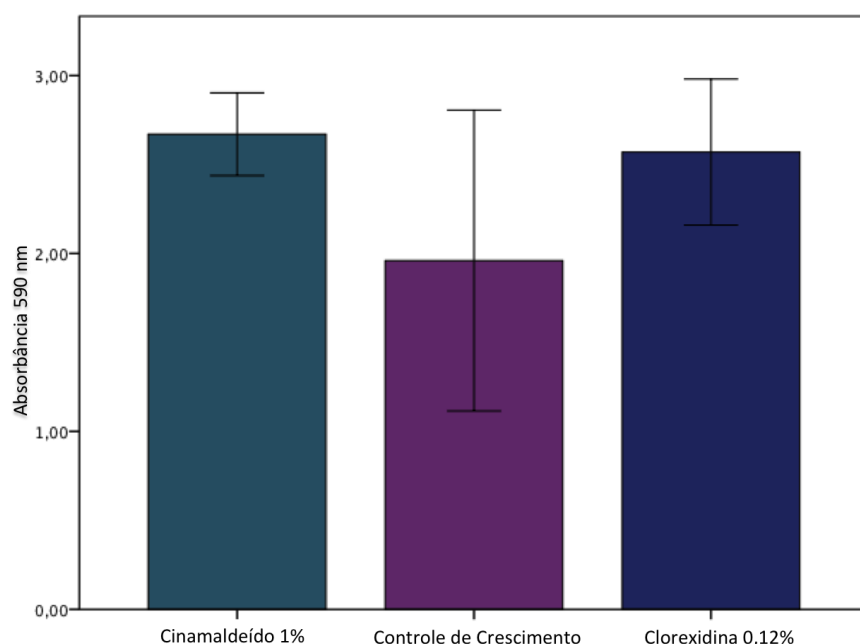


Fig.10: Análise Metabólica dos biofilmes HB (MTT) desenvolvidos sobre os espécimes de titânio. As colunas representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). Substâncias testes: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

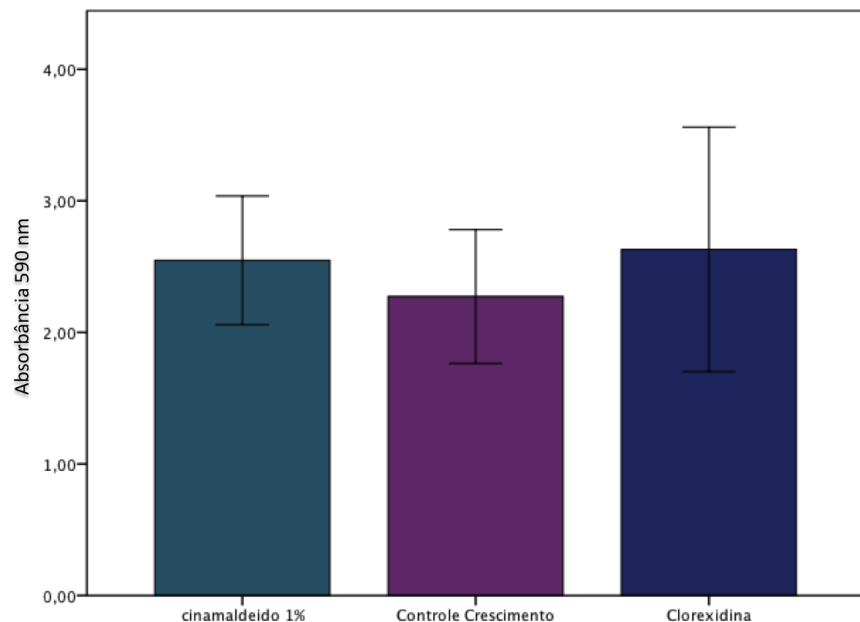


Fig.11: Análise Metabólica dos biofilmes GB (MTT) desenvolvidos sobre os espécimes de titânio. As colunas representam as médias e as barras de erro representam os desvios padrão (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). Substâncias testes: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

A dosagem de polissacarídeos extracelulares solúveis (PecS) e insolúveis (PecI) para o grupo HB, está representada pelas figuras 12 e 13, respectivamente.

Para a concentração de polissacarídeos extracelulares solúveis, observou-se menor concentração para as amostras expostas ao cinamaldeído 1% (**Fig.12**). As médias variaram entre $30,55 \pm 21,99$ e $8,94 \pm 10,80$ ug/mL, sendo o maior e menor valor conferido aos grupos clorexidina 0,12% e cinamaldeído 1%, respectivamente. Observou-se diferença estatística apenas entre os grupos cinamaldeído 1% e clorexidina 0,12%.

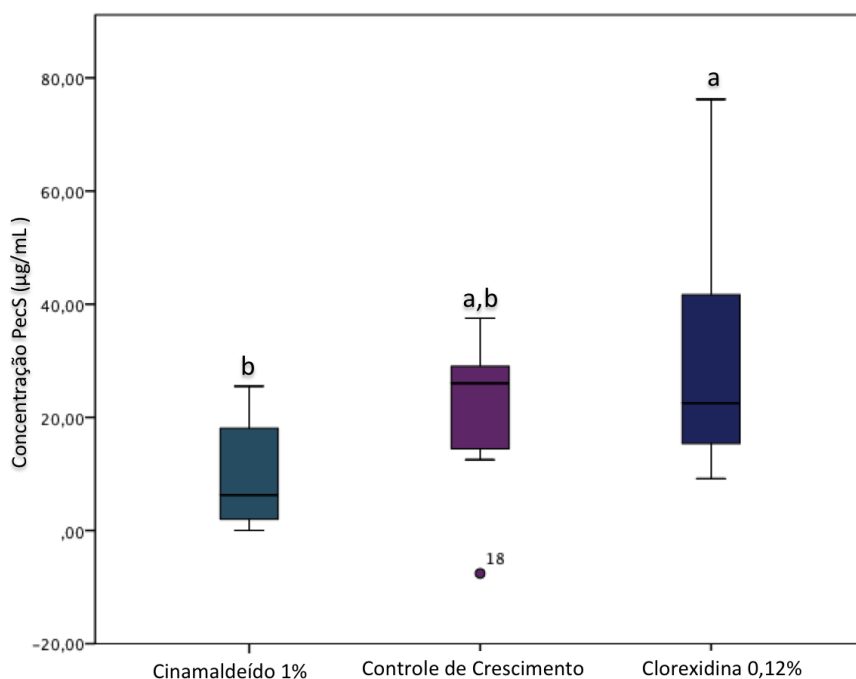


Fig.12: Concentração (ug/mL) de Polissacarídeos extracelulares Solúveis (PecS) extraída dos biofilmes HB (UFC/mL) desenvolvidos a partir da amostra salivar de pacientes com saúde bucal. Gráficos box plot, com representação da mediana, percentil 25 e 75 (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Mann Whitney, $p > 0,05$). Substâncias: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

Para a concentração de polissacarídeos extracelulares Insolúveis (PecI) do grupo HB, não foi verificada diferença estatística entre as substâncias estudadas (**Fig.13**). As médias variaram entre $13,93 \pm 17,57$ e $-0,23 \pm 11,94$ ug/mL, sendo o maior e menor valor conferido aos grupos controle de crescimento e cinamaldeído 1%, respectivamente.

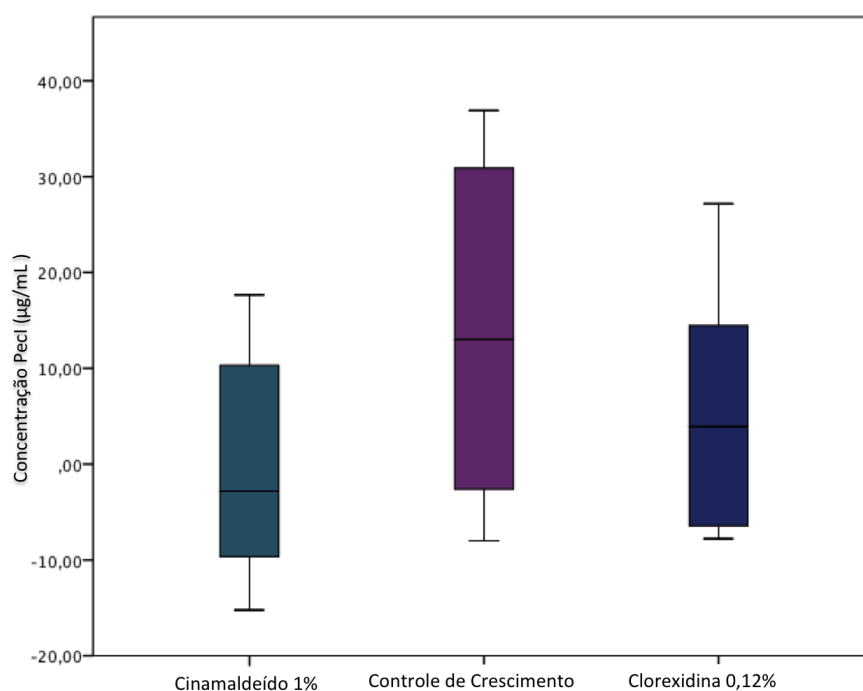


Fig.13: Concentração (ug/mL) de Polissacarídeos Extra Celulares Insolúveis (PecI) extraída dos biofilmes HB (UFC/mL) desenvolvidos a partir da amostra salivar de pacientes com saúde bucal. Gráficos box plot, com representação da mediana, percentil 25 e 75 (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Mann Whitney, $p > 0,05$). Substâncias: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

A dosagem de polissacarídeos extracelulares solúveis (PecS) e insolúveis (PecI) para o grupo GB, está representada pelas figuras 14 e 15, respectivamente. Para a concentração de polissacarídeos extracelulares solúveis não foi verificado diferença estatística entre as exposições estudadas (**Fig.14**). As médias variaram entre $21,35 \pm 20,49$ e $11,99 \pm 16,46$ ug/mL, sendo o maior valor conferido ao grupo clorexidina 0,12% e o menor valor ao cinamaldeído 1%. As medianas com maior e menor valor foi conferida aos grupos controle de crescimento (12,58) e cinamaldeído 1% (9,38), respectivamente.

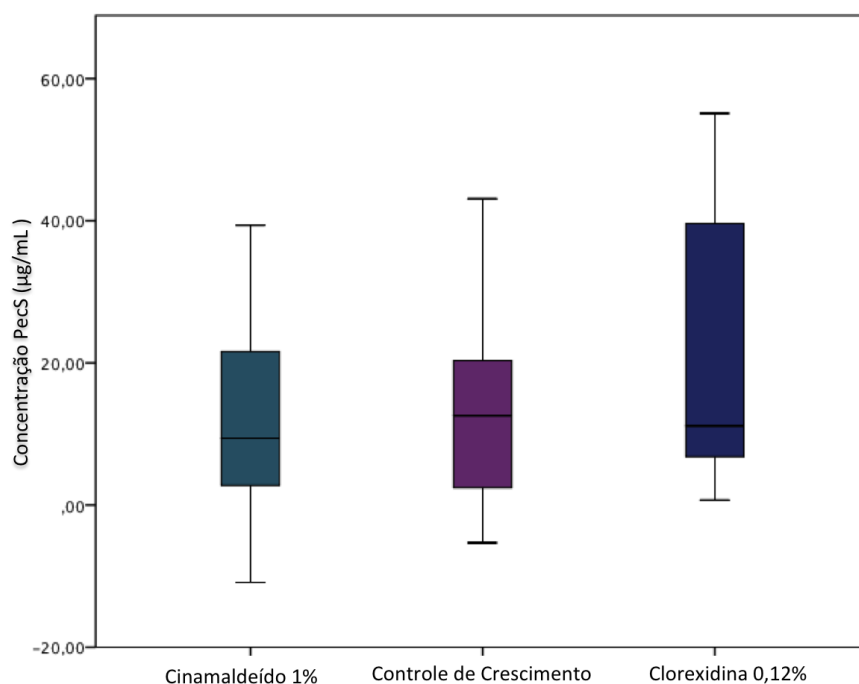


Fig.14: Concentração (ug/mL) de Polissacarídeos Extra Celulares Solúveis (PecS) extraída dos biofilmes GB (UFC/mL) desenvolvidos a partir da amostra salivar de pacientes com saúde bucal. Gráficos box plot, com representação da mediana, percentil 25 e 75 (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Mann Whitney, $p > 0,05$). Substâncias: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

Para a concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis do grupo GB, observou-se menor concentração para as amostras expostas ao cinamaldeído 1% (**Fig.15**). As médias variaram entre $15,56 \pm 14,72$ ug/mL para o controle de crescimento e $-7,08 \pm 8,73$ ug/mL para o cinamaldeído 1%. As medianas variaram entre 17,03 e -5,09 também para os referidos grupos. Observou-se diferença estatística entre os grupos cinamaldeído 1% e controle de crescimento, bem como também cinamaldeído 1% e clorexidina 0,12%.

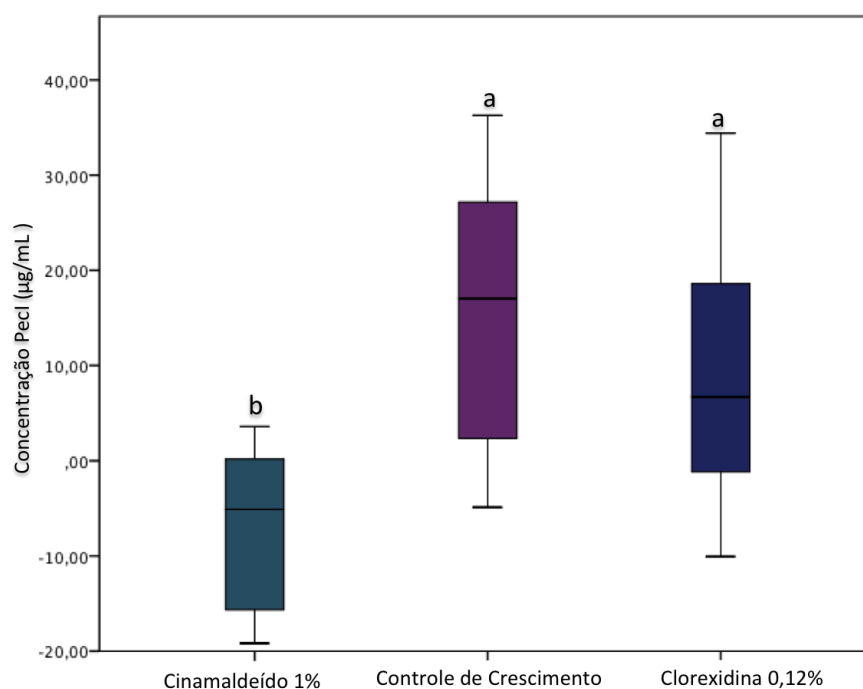


Fig.15: Concentração (ug/mL) de Polisscarídeos Extra Celulares Insolúveis (PecI) extraída dos biofilmes GB (UFC/mL) desenvolvidos a partir da amostra salivar de pacientes com saúde bucal. Gráficos box plot, com representação da mediana, percentil 25 e 75 (n = 8 por grupo). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Mann Whitney, $p > 0,05$). Substâncias: GE: Cinamaldeído 1%; CC: Solução Salina; CP: Clorexidina 0,12%.

DISCUSSÃO:

Este estudo avaliou, in vitro, o efeito antimicrobiano do cinamaldeído a 1% em biofilmes polimicrobianos desenvolvidos a partir da saliva de indivíduos saudáveis e com gengivite sobre superfícies de titânio. A caracterização e utilização deste modelo experimental, deu-se pela necessidade de simular uma situação de peri-implante mucosite.

Biofilmes polimicrobianos são modelos pouco utilizados para avaliar o efeito antimicrobiano de produtos de origem natural, a exemplo do cinamaldeído. Embora diferenças metodológicas sejam prevesíveis entre os estudos, a literatura relata o efeito antimicrobiano do cinamaldeído por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (HE et al. 2019). Assim, o potencial antimicrobiano da substância tem sido apresentado em concentrações distintas (ALBANO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018; de SOUTO MAIOR et al., 2019; HE et al. 2019; BALASUBRAMANIAN et al., 2020; ALI et al., 2021).

O efeito do cinamaldeído a 1% foi promissor considerando os biofilmes HB. Esse resultado pode estar relacionado aos mecanismos de inibição do biofilme, uma vez que o cinamaldeído impede a biossíntese da parede celular (SHEREAZ et al., 2016). Os fatores de virulência dos biofilmes podem ser modificados a partir da supra regulação de genes associados ao *quorum sensing* bacteriano, diminuindo a proliferação do biofilme (BALASUBRAMANIAN et al. 2020).

Verificou-se que o cinamaldeído a 1% e a clorexidina 0,12%, utilizada como padrão ouro devido a sua atividade antimicrobiana, não foram efetivos na diminuição da contagem de células viáveis e metabolismo celular dos biofilmes GB. Desta forma, o uso isolado de soluções antissépticas frente a biofilmes maduros, requer complementação da higiene oral por ação mecânica para garantir efetivamente a remoção dos biofilmes (VAN DER WEIJDEN et al., 2015; TAKENAKA et al., 2019).

A análise metabólica determinou que as substâncias avaliadas não apresentaram efeitos deletérios frente a este parâmetro. Este resultado pode estar ligado ao tempo de cultivo do biofilme, 168h, tornando-se maduro. Biofilmes desta magnitude apresentam extensa variedade de microrganismos, arquitetura espessa, canais de água bem desenvolvidos, além de proteínas e exopolissacarídeos, que dificultam a difusão de substâncias antimicrobianas para o interior da matriz (BALASUBRAMANIAN et al., 2020).

Além disto, é necessário ressaltar que a concentração do fitoconstituente utilizado no presente estudo foi de 10mg/mL, o qual a literatura ainda não dispõe de dados que certifiquem que essa concentração possa ser considerada segura, do ponto de vista citotóxico, para uso em biofilmes polimicrobianos *in vivo*. Um estudo demonstrou que a clorexidina 0,12%, além de outros agentes químicos utilizados em biofilmes polimicrobianos durante a terapia peri-implantar, pode apresentar resquícios de contaminantes sobre as superfícies de titânio, capazes de apresentar alterações físico-químicas que afetam negativamente a resposta osteoblástica (KOTSAKIS et al., 2016);

A literatura aponta que a exposição frequente de sacarose aumenta a quantidade de biofilme, elevando-se sua biomassa, e altera a qualidade dos componentes bioquímicos – a exemplo dos exopolissacarídeos (RIBEIRO et al., 2018) – de biofilmes formados em superfícies de titânio, em detrimento de uma matriz extracelular mais robusta (SOUZA et al., 2019). O presente estudo realizou

trocas de meio de cultura (BHI suplementado com 1% de sacarose), diariamente, por seis dias consecutivos.

Nesse sentido, considerando-se a alteração de proteínas presentes na matriz extracelular dos biofilmes, além da redução da viabilidade celular (COSTA OLIVEIRA et al., 2017) frente às exposições de substâncias testadas, é possível considerar que a baixa concentração de PecS provocada pela ausência de exposição frequente à sacarose nos biofilmes HB, juntamente com a exposição ao cinamaldeído a 1%, aumentou a porosidade da matriz extracelular e permitiu a difusão do agente antimicrobiano para o interior dela.

Além disso, a baixa disponibilidade de sacarose presente no biofilme, também implicou em uma baixa quantidade de polissacarídes extracelulares insolúveis, tendo em vista que o cinamaldeído reduziu a capacidade de síntese e adesão à matriz extracelular (COSTA OLIVEIRA et al., 2017).

Diferentemente do que é visto a partir de culturas planctônicas, a interação entre microrganismos em biofilmes polimicrobianos é complexa (HAN, 2021). Assim, a não redução das quantidades de PecS GB e PecI nas amostras HB pode indicar que não foram metabolizados durante o período de miséria, ou que foram metabolizados em pequena quantidade, apenas para manter o metabolismo basal bacteriano (COSTA OLIVEIRA, et al., 2017),

No tocante as limitações deste estudo, não foram realizados ensaios de citotoxicidade para o cinamaldeído a 1%. A realização desses testes poderão subsidiar na produção de mais evidências científicas quanto ao uso do cinamaldeído a 1%, bem como poderá ser usado como auxílio durante o delineamento de estudos clínicos para determinar dose, frequência e modo de liberação mais efetivos na terapia da doença peri-implantar.

Assim, é válido ressaltar a importância da realização de mais estudos com uso de fitoconstituintes, uma vez que eles têm se mostrado como alternativas em potencial para a substituição e ou complementação na terapia per-implantar.

CONCLUSÃO:

O cinamaldeído a 1% apresentou atividade antimicrobiana semelhante à clorexidina 0,12% frente aos biofilmes polimicrobianos desenvolvidos a partir da saliva de indivíduos saudáveis e com gengivite sobre superfícies de titânio.

REFERÊNCIAS

- Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA. (2008). Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.*42(5):380-6.
- Albano M, Crulhas BP, Alves FCB, Pereira AFM, Andrade BFMT, Barbosa LN, Furlanetto A, Lyra LPDS, Rall VLM, Júnior AF (2019). Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microb Pathog.* 126:231-238.
- Ali IAA, Matinlinna JP, Lévesque CM, Neelakantan P. (2021). Trans-Cinnamaldehyde Attenuates *Enterococcus faecalis* Virulence and Inhibits Biofilm Formation. *Antibiotics (Basel)*. 11;10(6):702.
- Balasubramanian AR, Vasudevan S, Shanmugam K, Lévesque CM, Solomon AP, Neelakantan P. (2020). Combinatorial effects of trans-cinnamaldehyde with fluoride and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol.* 130(2):382-393.
- Costa Oliveira BE, Cury JA, Ricomini Filho AP. (2017). Biofilm extracellular polysaccharides degradation during starvation and enamel demineralization. *PLoS One.* 12(7):e0181168.
- Costa RC, Souza JGS, Bertolini M, Retamal-Valdes B, Feres M, Barão VAR. (2020). Extracellular biofilm matrix leads to microbial dysbiosis and reduces biofilm susceptibility to antimicrobials on titanium biomaterial: An in vitro and in situ study. *Clin Oral Implants Res.* 31(12):1173-1186.
- de Souto Maior LF, Maciel PP, Ferreira VYN, de Lima Gouveia Dantas C, de Lima JM, Castellano LRC, Batista AUD, Bonan PRF. (2019). Antifungal activity and Shore A hardness of a tissue conditioner incorporated with terpinen-4-ol and cinnamaldehyde. *Clin Oral Investig.* 23(7):2837-2848.
- Doyle AA, Stephens JC. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia.* 139:104405.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem;* 28:350-356.
- Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R. (2010). Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res.* 21(8):866-72.
- Han Y. (2021). Effects of cigarette smoking on the growth of *Streptococcus mutans* biofilms: An in vitro study. *PLoS One.* 16(11):e0259895.
- He Z, Huang Z, Jiang W, Zhou W. (2019) Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde on *Streptococcus mutans* Biofilms. *Front Microbiol.* 25;10:2241.

Janus J, Fauxpoint G, Arntz Y, Pelletier H, Etienne O. (2010). Surface roughness and morphology of three nanocomposites after two different polishing treatments by a multitechnique approach. *Dent Mater.* 26(5):416-25.

Kotsakis GA, Lan C, Barbosa J, Lill K, Chen R, Rudney J, et al. (2016). Antimicrobial Agents Used in the Treatment of Peri-Implantitis Alter the Physicochemistry and Cytocompatibility of Titanium Surfaces. *J Periodontol.* 87(7):809-19.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33(1): 159-174.

Losenická J, Gajdoš O, Kamenský V. (2021). Cost-utility analysis of an implant treatment in dentistry. *BMC Oral Health.* 21(1):433.

Martorano-Fernandes L, Cavalcanti YW, de Almeida LFD. (2020). "Inhibitory effect of Brazilian red propolis on *Candida* biofilms developed on titanium surfaces". *BMC Complement Med Ther.* 20(1):104.

Polyzois I. (2019). Treatment Planning for Periimplant Mucositis and Periimplantitis. *Implant Dent.* 28(2):150-154.

Rangbulla V, Nirola A, Gupta M, Batra P, Gupta M. (2017). Salivary IgA, Interleukin-1 β and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients. *Chin J Dent Res.* 20(1):43-51.

Renvert S, Polyzois I. (2018). Treatment of pathologic peri-implant pockets. *Periodontol 2000.* 76(1):180-190.

Ribeiro M, Malheiro J, Grenho L, Fernandes MH, Simões M. (2018). Cytotoxicity and antimicrobial action of selected phytochemicals against planktonic and sessile *Streptococcus mutans*. *PeerJ.* 6:e4872.

Sánchez MC, Llama-Palacios A, Fernández E, Figuero E, Marín MJ, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. (2014). An in vitro biofilm model associated to dental implants: structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dent Mater.* 30(10):1161-71

Shreaz S, Wani WA, Behbehani JM, Raja V, Irshad M, Karched M, et al. (2016). Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia.* 112:116-31.

Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. (2014). Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head Face Med.* 10:34.

Souza JGS, Cury JA, Ricomini Filho AP, Feres M, Faveri M, Barão VAR. (2019). Effect of sucrose on biofilm formed in situ on titanium material. *J Periodontol.* 90(2):141-148.

Takenaka S, Ohsumi T, Noiri Y. (2019). Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Jpn Dent Sci Rev.* 55(1):33-40.

Van der Weijden FA, Van der Sluijs E, Ciancio SG, Slot DE. (2015). Can Chemical Mouthwash Agents Achieve Plaque/Gingivitis Control? *Dent Clin North Am.* 59(4):799-829.

Verardi G, Cenci MS, Maske TT, Webber B, Santos LR. (2016). Antiseptics and microcosm biofilm formation on titanium surfaces. *Braz Oral Res.* 30:S1806-83242016000100225.

Wang CW, Renvert S, Wang HL. (2019). Nonsurgical Treatment of Periimplantitis. *Implant Dent.* 28(2):155-160.

Wang Y, Zhang Y, Shi YQ, Pan XH, Lu YH, Cao P. (2018). Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog.* 116:26-32.

World Health Organization (2013). *Oral Health Surveys*, 5th edn. Geneva, Switzerland: WHO.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Dentre os resultados encontrados, podemos inferir que o cinamaldeído a 1% apresentou efeito a depender do biofilme semeado no meio sólido.

Esses resultados mostram-se bastante promissores, pois o cinamaldeído a 1% apresentou boa efetividade quanto sua utilização, podendo ser considerado como uma alternativa em potencial quanto a sua aplicação em diversos ramos da Odontologia, podendo este fitoconstituente ser inserido como componente em dentrífrícios, antissépticos intra-orais e extra-orais, além de sua incorporação no desenvolvimento de outros tipos de materiais odontológicos.

Por outro lado, apesar dos bons resultados obtidos quanto a sua utilização, é importante ressaltar que este estudo apresenta a limitação de não ter realizado a avaliação do efeito citotóxico do cinamaldeído a 1%. Consideramos a realização dessa proposição como um processo fundamental na validação de sua utilização, uma vez que é necessário a obtenção de segurança quanto a sua manipulação.

Portanto, ainda que sejam necessárias a realização de mais pesquisas para a consolidação da real eficácia deste fitoconstituente, os resultados mostrados até aqui propõem perspectivas positivas quanto ao uso desta substância na Odontologia.

6. CONCLUSÃO

A utilização do cinamaldeído a 1% desempenhou atividade antimicrobiana semelhante à clorexidina 0,12%, solução terapêutica tida como padrão ouro na Odontologia, frente aos biofilmes polimicrobianos desenvolvidos a partir da saliva de indivíduos saudáveis e com gengivite sobre superfícies de titânio.

REFERÊNCIAS*

Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res*. 2008. 42(5):380-6.

Albano M, Crulhas BP, Alves FCB, Pereira AFM, Andrade BFMT, Barbosa LN, Furlanetto A, Lyra LPDS, Rall VLM, Júnior AF. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microb Pathog*. 2019. 126:231-238.

Ali IAA, Matinlinna JP, Lévesque CM, Neelakantan P. Trans-Cinnamaldehyde Attenuates *Enterococcus faecalis* Virulence and Inhibits Biofilm Formation. *Antibiotics (Basel)*. 2021. 11;10(6):702.

Belibasakis GN. Microbiological changes of the ageing oral cavity. *Arch Oral Biol*. 2018 Dec;96:230-232.

Bakhtiari S, Jafari S, Taheri JB, Kashi TSJ, Namazi Z, Iman M, et al. The Effects of Cinnamaldehyde (Cinnamon Derivatives) and Nystatin on *Candida Albicans* and *Candida Glabrata*. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019 Apr 10;7(7):1067-1070.

Balasubramanian AR, Vasudevan S, Shanmugam K, Lévesque CM, Solomon AP, Neelakantan P. Combinatorial effects of trans-cinnamaldehyde with fluoride and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol*. 2020 Feb;130(2):382-393.

Bezerra NVF, Brito ACM, de Medeiros MMD, de França Leite KL, Bezerra IM, de Almeida LFD, et al. Glucose supplementation effect on the acidogenicity, viability, and extracellular matrix of *Candida* single- and dual-species biofilms. *J Invest Clin Dent*. 2019 Aug;10(3):e12412.

Braga AS, Pires JG, Magalhães AC. Effect of a mouthrinse containing *Malva sylvestris* on the viability and activity of microcosm biofilm and on enamel demineralization compared to known antimicrobials mouthrinses. *Biofouling*. 2018 Mar;34(3):252-261.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466 de dezembro de 2012. Dispõe sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília, DF: Conselho Nacional de Saúde, 2012.

Carinci F, Lauritano D, Bignozzi CA, Pazzi D, Candotto V, Santos de Oliveira P, et al. A New Strategy Against Peri-Implantitis: Antibacterial Internal Coating. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 9;20(16):3897.

Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence*. 2015;6(3):183-7.

Cieplik F, Zaura E, Brandt BW, Buijs MJ, Buchalla W, Crielaard W, et al. Microcosm biofilms cultured from different oral niches in periodontitis patients. *J Oral Microbiol.* 2018 Nov 27;11(1):1551596.

Costa Oliveira BE, Cury JA, Ricomini Filho AP. Biofilm extracellular polysaccharides degradation during starvation and enamel demineralization. *PLoS One.* 2017 Jul 17;12(7):e0181168.

Costa RC, Souza JGS, Bertolini M, Retamal-Valdes B, Feres M, Barão VAR. Extracellular biofilm matrix leads to microbial dysbiosis and reduces biofilm susceptibility to antimicrobials on titanium biomaterial: An in vitro and in situ study. *Clin Oral Implants Res.* 2020 Dec;31(12):1173-1186.

Daubert DM, Weinstein BF. Biofilm as a risk factor in implant treatment. *Periodontol 2000.* 2019 Oct;81(1):29-40.

de Araújo MRC, Maciel PP, Castellano LRC, Bonan PRF, Alves DDN, de Medeiros ACD, de Castro RD. Efficacy of essential oil of cinnamon for the treatment of oral candidiasis: A randomized trial. *Spec Care Dentist.* 2021.41(3):349-357.

de Moraes AP, Barwaldt CK, Nunes TZ, Sarkis-Onofre R, Ogliari FA, Boscatto N, et al. Effect of triazine derivative added to denture materials on a microcosm biofilm model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012 Jul;100(5):1328-33.

de Souto Maior LF, Maciel PP, Ferreira VYN, de Lima Gouveia Dantas C, de Lima JM, Castellano LRC, Batista AUD, Bonan PRF. Antifungal activity and Shore A hardness of a tissue conditioner incorporated with terpinen-4-ol and cinnamaldehyde. *Clin Oral Investig.* 2019 Jul;23(7):2837-2848.

Doyle AA, Stephens JC. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia.* 2019 Nov;139:104405.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem;* 28:350-356.

Eick S, Ramseier CA, Rothenberger K, Brägger U, Buser D, Salvi GE. Microbiota at teeth and implants in partially edentulous patients. A 10-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2016 Feb;27(2):218-25.

Emami E, Michaud PL, Sallaleh I, Feine JS. Implant-assisted complete prostheses. *Periodontol 2000.* 2014 Oct;66(1):119-31. doi: 10.1111/prd.12041. PMID: 25123765.

Fernandez Y Mostajo M, Exterkate RAM, Buijs MJ, Beertsen W, van der Weijden GA, Zaura E, et al. A reproducible microcosm biofilm model of subgingival microbial communities. *J Periodontal Res.* 2017 Dec;52(6):1021-1031.

Ferreira GLS, Bezerra LMD, Ribeiro ILA, Morais Júnior RCD, Castro RD. Susceptibility of cariogenic microorganisms to phytoconstituents. *Braz J Biol*. 2018 Nov;78(4):691-696.

Filoche SK, Soma D, van Bekkum M, Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Oct;54(1):27-36.

Friedman M. Chemistry, Antimicrobial Mechanisms, and Antibiotic Activities of Cinnamaldehyde against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. *J Agric Food Chem*. 2017 Dec 6;65(48):10406-10423.

Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Aug;21(8):866-72.

Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *J Dent Res*. 2018 Feb;98(2):148-156.

Han Q, Jiang Y, Brandt BW, Yang J, Chen Y, Buijs MJ, et al. Regrowth of Microcosm Biofilms on Titanium Surfaces After Various Antimicrobial Treatments. *Front Microbiol*. 2019 Nov 25;10:2693.

He Z, Huang Z, Jiang W, Zhou W. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde on *Streptococcus mutans* Biofilms. *Front Microbiol*. 2019 Sep 25;10:2241.

Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S237-S245.

Hussain RA, Miloro M, Cohen JB. An Update on the Treatment of Periimplantitis. *Dent Clin North Am*. 2021 Jan;65(1):43-56.

Janus J, Fauxpoint G, Arntz Y, Pelletier H, Etienne O. Surface roughness and morphology of three nanocomposites after two different polishing treatments by a multitechnique approach. *Dent Mater*. 2010 May;26(5):416-25.

Kim YS, Kang SM, Lee ES, Lee JH, Kim BR, Kim BI. Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation. *J Biomed Opt*. 2016 Oct;21(10):101409.

Kotsakis GA, Lan C, Barbosa J, Lill K, Chen R, Rudney J, et al. Antimicrobial Agents Used in the Treatment of Peri-Implantitis Alter the Physicochemistry and Cytocompatibility of Titanium Surfaces. *J Periodontol*. 2016 Jul;87(7):809-19.

Martins ML, Leite KLF, Pacheco-Filho EF, Pereira AFM, Romanos MTV, Maia LC, et al. Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. *Arch Oral Biol*. 2018 Sep;93:56-65.

Martorano-Fernandes L, Cavalcanti YW, de Almeida LFD. "Inhibitory effect of Brazilian red propolis on *Candida* biofilms developed on titanium surfaces". *BMC Complement Med Ther*. 2020 Apr 3;20(1):104.

Martorano-Fernandes L, Rodrigues NC, Bezerra NVF, Borges MHS., Cavalcanti YW, Almeida LFD. Cinnamaldehyde and α -terpineol as an alternative for using as denture cleansers: antifungal activity and acrylic resin color stability. *Research, Society and Development*. 2021 Mar;10(3), e28010313512.

Maske TT, Brauner KV, Nakanishi L, Arthur RA, van de Sande FH, Cenci MS. An in vitro dynamic microcosm biofilm model for caries lesion development and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling*. 2016;32(3):339-48.

Nakano M, Wakabayashi H, Sugahara H, Odamaki T, Yamauchi K, Abe F, et al. Effects of lactoferrin and lactoperoxidase-containing food on the oral microbiota of older individuals. *Microbiol Immunol*. 2017 Oct;61(10):416-426.

Oliveira Jde A, da Silva IC, Trindade LA, Lima EO, Carlo HL, Cavalcanti AL, de Castro RD. Safety and Tolerability of Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume Leaves with Action on Oral Candidosis and Its Effect on the Physical Properties of the Acrylic Resin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:325670..

Polyzois I. Treatment Planning for Periimplant Mucositis and Periimplantitis. *Implant Dent*. 2019. 28(2):150-154.

Reynolds-Campbell G, Nicholson A, Thoms-Rodriguez CA. Oral Bacterial Infections: Diagnosis and Management. *Dent Clin North Am*. 2017 Apr;61(2):305-318. doi: 10.1016/j.cden.2016.12.003. PMID: 28317568.

Ribeiro M, Malheiro J, Grenho L, Fernandes MH, Simões M. Cytotoxicity and antimicrobial action of selected phytochemicals against planktonic and sessile *Streptococcus mutans*. *PeerJ*. 2018 Jun 4;6:e4872.

Roehling S, Astasov-Frauenhoffer M, Hauser-Gerspach I, Braissant O, Woelfler H, Waltimo T, et al. In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. *J Periodontol*. 2017. 88(3):298-307.

Rosen P, Clem D, Cochran D, Froum S, McAllister B, Renvert S, et al. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: a current understanding of their diagnoses and clinical implications. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4):436-43.

Sánchez MC, Llama-Palacios A, Fernández E, Figuero E, Marín MJ, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. An in vitro biofilm model associated to dental implants: structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dent Mater*. 2014 Oct;30(10):1161-71

Santos DMSD, Pires JG, Braga AS, Salomão PMA, Magalhães AC. Comparison between static and semi-dynamic models for microcosm biofilm formation on dentin. *J Appl Oral Sci*. 2019 Jan 7;27:e20180163.

Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S267-S290.

Shreaz S, Wani WA, Behbehani JM, Raja V, Irshad M, Karched M, et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*. 2016 Jul;112:116-31.

Sousa V, Mardas N, Spratt D, Boniface D, Dard M, Donos N. Experimental models for contamination of titanium surfaces and disinfection protocols. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Oct;27(10):1233-1242.

Sousa V, Nibali L, Spratt D, Dopico J, Mardas N, Petrie A, et al. Peri-implant and periodontal microbiome diversity in aggressive periodontitis patients: a pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2017 May;28(5):558-570.

Souza JGS, Cury JA, Ricomini Filho AP, Feres M, Faveri M, Barão VAR. Effect of sucrose on biofilm formed in situ on titanium material. *J Periodontol*. 2019. 90(2):141-148.

Verardi G, Cenci MS, Maske TT, Webber B, Santos LR. Antiseptics and microcosm biofilm formation on titanium surfaces. *Braz Oral Res*. 2016;30:S1806-83242016000100225.

Wang Y, Zhang Y, Shi YQ, Pan XH, Lu YH, Cao P. Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*. 2018 Mar;116:26-32.

World Health Organization. Oral Health Surveys, 5th edn. Geneva, Switzerland: WHO; 2013.

Xu W, Zhou W, Wang H, Liang S. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2020;120:45-84.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *Medline*.