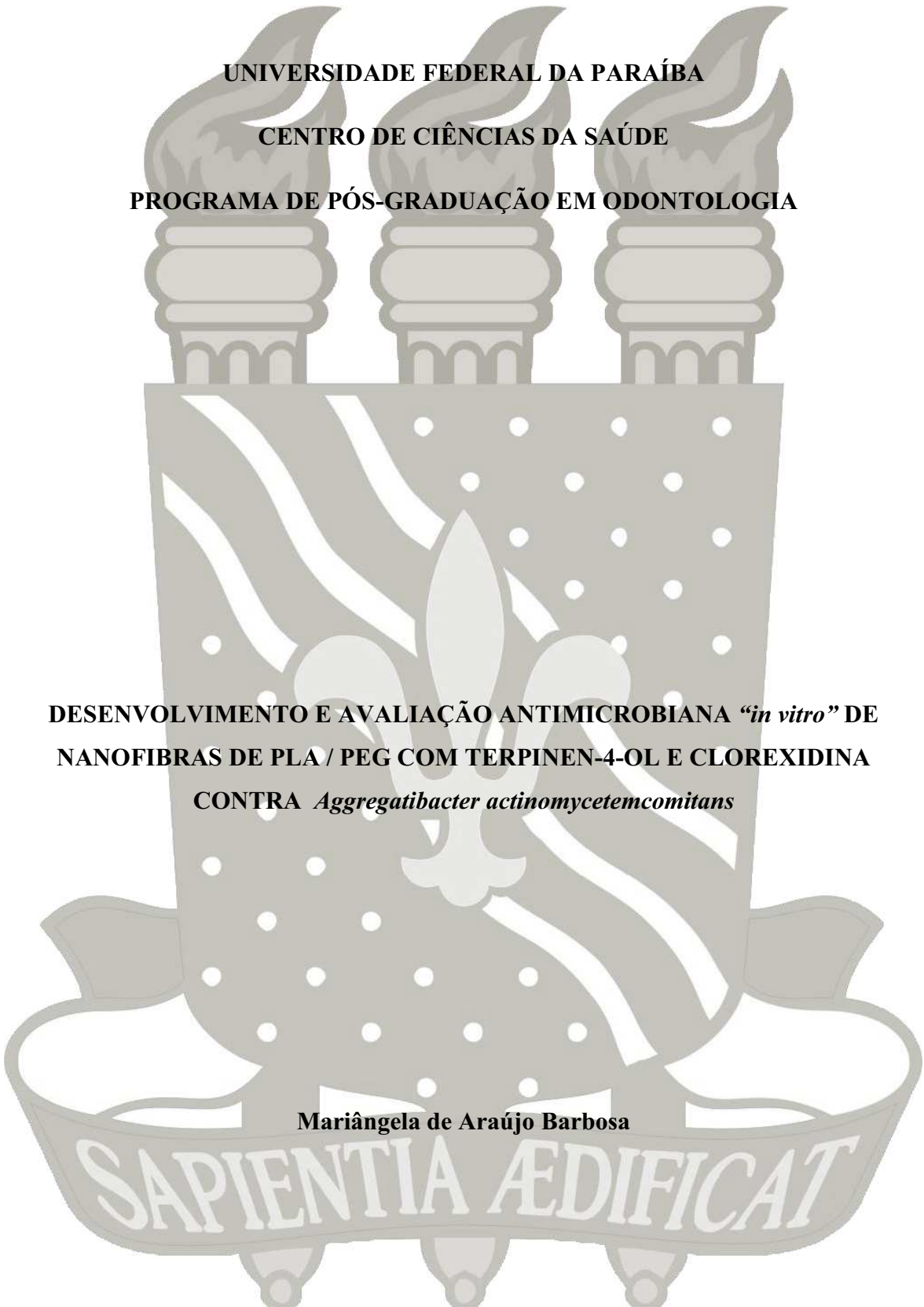




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA “*in vitro*” DE
NANOFIBRAS DE PLA / PEG COM TERPINEN-4-OL E CLOREXIDINA
CONTRA *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Mariângela de Araújo Barbosa

João Pessoa – PB

2016

MARIÂNGELA DE ARAÚJO BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA “*in vitro*” DE
NANOFIBRAS DE PLA / PEG COM TERPINEN-4-OL E CLOREXIDINA
CONTRA *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

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 em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

João Pessoa - PB

2016

B238d Barbosa, Mariângela de Araújo.
Desenvolvimento e avaliação antimicrobiana in vitro de
nanofibras de PLA/PEG com terpinen-4-ol e clorexidina contra
Aggregatibacter actinomycetemcomitans / Mariângela de
Araújo Barbosa.- João Pessoa, 2016.
51f. : il.
Orientador: Eliton Souto de Medeiros
Coorientador: Fábio Correia Sampaio
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1.Odontologia. 2.Nanofibras. 3.Polímeros. 4.Terpinen-4-ol.
5.Clorexidina. 6.Aggregatibacter. 7.Actinomycetemcomitans.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

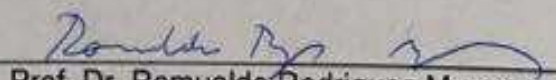
MARIÂNGELA DE ARAÚJO BARBOSA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA "IN
VITRO" DE NANOFIBRAS DE PLA/PLG COM TERPINEN-4-OL
CONTRA AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS

Banca Examinadora


Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros
Orientador


Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista
Examinador - UFPB


Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Deus
porque até aqui o Ele me sustentou.
Toda honra e toda glória somente
para Ele

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus, por sua fidelidade sem fim. Por ter milagrosamente driblado tudo aquilo que me impediria de ter concluído esse mestrado, e claro, por sua misericórdia.

- Ao meu marido Flávio Yuri que esteve ao meu lado me dando força e entendendo minha ausência em alguns momentos importantes para nós dois.

- Agradeço a minha mãe, “*in memoriam*”, por todo seu amor e dedicação em minha criação e hoje me sinto extremamente feliz por conseguir realizar um dos seus grandes sonhos. Mainha, te vejo céu, meu amor.

- A minha irmãzinha, Danila, pelo carinho, e orgulho que sei sente por mim, compartilhando comigo momentos de apoio e de felicidade; Também agradeço por ter me dado de presente a minha Cecília, minha sobrinha.

- A minha sobrinha linda de titia, que mesmo sem saber, conseguia me fazer esquecer todos os problemas e dificuldades enfrentadas nessa fase, apenas com um sorriso no rosto e um lindo “Titia mamazinha, cadê?”, que saía dos seus lábios.

- Ao meu pai, que indiretamente me deu força para que essa etapa se findasse.

- Ao Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros, meu orientador, que compartilhou comigo seus conhecimentos e experiências, pelos dias de descontração e ensinamentos. Por ter confiado em mim. Pelo apoio, inclusive financeiro. Toda a minha admiração, gratidão e respeito;

- Ao Prof. Dr. Fábio Sampaio meu co-orientador, pelo prazer e oportunidade de trabalhar com ele, pela disponibilidade e acessibilidade, por ceder gentilmente os equipamentos laboratoriais, pelos momentos de alegria e descontração essenciais nos momentos de estresse, inclusive com altas risadas. Nunca esquecerei o tempo que dispôs a me ajudar. Sem falar do apoio financeiro. Obrigada por tudo;

- Aos professores componentes das bancas examinadoras de qualificação e defesa.

- Ao meu colega de todas as horas Marcos Alexandre que esteve comigo disposto a me auxiliar em tudo, movendo mundos e fundos para me ajudar nas coisas mais impossíveis e inimagináveis. Talvez esse seja a nossa última jornada juntos, meu amigo de graduação, especialização, mestrado. Amo muito;

- A Allan Albuquerque que foi um anjo de Deus na minha vida, mesmo sem ele saber. Por ter me auxiliado e me orientado em muita coisa dentro do laboratório, pela

eficiência e profissionalismo, pelas brincadeiras e piadas sem graça que tornavam o dia mais leve. Obrigada pelas conversas e desabafos científicos.

- A Roberta Bonan, Neymara Nepomuceno, Adillys Marcelo, Eudes, Isaque Jerônimo, Laís Chantelle, Thiago Marinho, Isabella Passos, Francisco, e a todos os colegas dos laboratórios que passei (Labial/ LACOM/ LAMAB/ LSR) por todo apoio e presteza;

- Aos colegas da turma, pelo apoio, auxílio, piadas, conversas no whatsapp, convívio e por tornar esses dois anos mais prazerosos;

- A minha chefia da UFPB por permitir que muitas vezes eu me ausentasse do trabalho para cumprir obrigações do mestrado;

- A todos, que direta o indiretamente contribuíram com apoio, incentivo e compreensão para minha formação e com este trabalho.

*"Não te mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te
espantes, porque o SENHOR, teu Deus, é contigo por onde
quer que andares."*

Josué 1:9

NOTAS PRELIMINARES

A presente Dissertação foi redigida conforme o Manual para Normatização da Defesa do Trabalho Final proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, adotando o formato alternativo. Apenas um artigo científico compõe este trabalho de Defesa, o qual foi redigido de acordo com as exigências da revista a ser enviado (Materials Science And Engineering: C).

RESUMO

Objetivo: Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do terpinen-4-ol e clorexidina, produzir e caracterizar nanofibras de PLA/PEG incorporadas com terpinen-4-ol e clorexidina, bem como e quantificar a viabilidade celular de biofilme de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) (ATCC 00078) crescido sobre a superfície inibitória desta fibra. **Metodologia:** A determinação de CIM e CBM foi realizada por microdiluição em caldo; as nanofibras de terpinen-4-ol (40%) e clorexidina (0,12%) foram produzidas através da fiação por sopro em solução (SBS) e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A quantificação celular foi verificada por fluorescência e as nanofibras incorporadas com a clorexidina serviam de controle positivo para este teste. **Resultados:** Observou-se uma efetiva atividade antimicrobiana do terpinen-4-ol (CIM e CBM = 25 µg/mL) e da clorexidina (CIM e CBM < 15 µg/mL) sobre células planctônicas de *A.a.* O PEG agiu como agente plastificante proporcionando redução na cristalinidade do PLA, aumento do diâmetro das fibras e leve desestabilização térmica do material. O aumento da concentração do PEG não foi determinante para o aumento da atividade antimicrobiana das fibras, embora tenha contribuído para formação de um material mais amorfo. As fibras de terpinen-4-ol apresentaram atividade antimicrobiana semelhante às fibras de clorexidina ($p < 0,05$), sendo a fibra Terpinen-4-ol com 20% de PEG a que teve melhor desempenho dentre o seu grupo. **Conclusão:** O terpinen-4-ol e a clorexidina apresentaram efetiva atividade antimicrobiana sobre *A.a.* e a técnica de SBS foi eficiente na produção de nanofibras de PLA/PEG com ação antimicrobiana frente a *A.a.* tendo potencial para conduzir futuras aplicações no combate às doenças periodontais.

Palavras-chave: Nanofibras, Polímeros, Terpinen-4-ol, Clorexidina, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

ABSTRACT

To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of terpinen-4-ol and chlorhexidine produce and characterize nanofibers PLA / PEG incorporated with terpinen-4-ol and chlorhexidine as well as quantifying the viability biofilm mobile *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) (ATCC 00078) grown on the surface of this inhibitory fiber. Methodology: The determination of MIC and MBC was performed by broth microdilution; the nanofiber terpinen-4-ol (40%) and chlorhexidine (0.12%) were produced by spinning blow solution (SBS) and characterized by scanning electron microscopy (SEM), thermal gravimetric analysis (TGA), calorimetry differential scanning (DSC) and infrared spectroscopy by Fourier transform (FTIR). The cell was observed by fluorescence quantification and nanofibers incorporated with chlorhexidine served as positive control for this assay. Results: There was an effective antimicrobial activity terpinen-4-ol (MIC and MBC = 25 mg / mL) and chlorhexidine (MIC and MBC <15 mg / mL) on planktonic cells pa PEG acted as a plasticizer resulting in a reduction in the crystallinity of the PLA, increased fiber diameter and lightweight thermal destabilization of the material. The increase in PEG concentration was not decisive for increasing the antimicrobial activity of the fibers but has contributed to formation of a more amorphous material. The terpinen-4-ol fibers showed similar antimicrobial activity to chlorhexidine fibers ($p < 0.05$), and the Terpinen-4-ol fiber with 20% PEG had best performance among your group. Conclusion: The terpinen-4-ol and chlorhexidine had effective antimicrobial activity against A.A and SBS technique was effective in the production of PLA nanofibers / PEG antimicrobial action against A.A having the potential to drive future applications to combat periodontal disease.

Keywords: Nanofibers, Terpinen-4-ol, Chlorhexidine Aggregatibacter actinomycetemcomitans

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 CAPÍTULO I	19
PLA/PEG NANOFIBERS DEVELOPMENT AND ANTIMICROBIAL “ <i>in vitro</i> ” EVALUATION WITH TERPINEN-4-OL AND CHLORHEXIDINE AGAINST <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .	
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	45
4 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

O grande interesse em nanoestruturas acontece devido ao seu potencial para inúmeras aplicações em diversas áreas, tais como materiais e ciências biomédicas, eletrônica, óptica, magnetismo, armazenamento de energia, e eletroquímica ^[1]. Nas áreas de nanotecnologia farmacêutica e de nanomedicina, os esforços visam a produção em especial de nanomedicamentos que ofereçam vantagens em relação aos seus homólogos na forma a granel. O tamanho reduzido desses nanomedicamentos proporciona o aumento na área de superfície em relação ao seu volume e melhora a eficácia terapêutica reduzindo a toxicidade celular^[2].

As diferentes geometrias dos materiais nanométricos (tubos, filmes, fibras, partículas, entre outras) podem levar a diferentes propriedades e aplicações^[3,4]. Dentre os formatos de maior interesse científico e tecnológico, as nanofibras estão entre os mais produzidos e estudados, dado o grande número de suas possíveis aplicações e vantagens^[3], tais como a grande área de superfície, a alta porosidade com tamanho de poro pequeno e a possibilidade de controlar as transições de fase cristalina, amorfa, a uma formulação desejável para satisfazer as necessidades farmacêuticas ^[5]. Além disso, as nanofibras apresentam propriedades mecânicas superiores e facilidade de adição de funcionalidades de superfície, em comparação com qualquer outro material ^[6]. Assim, ao longo das últimas décadas, a formulação de novos sistemas de liberação controlada à base de nanofibras com foco em objetivos específicos tem sido investigada em todo o mundo com um nível contínuo de interesse.

Na área biomédica as nanofibras podem ser utilizadas como veículos para a liberação controlada de fármacos de moléculas bioativas tais como citocinas, fatores de crescimento, drogas anticancerígenas, enzimas e certas vitaminas^[6], bem como dispositivos hemostáticos, *scaffolds* e curativos para regeneração dérmica ^[7].

As técnicas de desenvolvimento destas fibras poliméricas (*High speed rotary/centrifugal spinning*, *Blow/jet spinning*, *Electrospinning*, *Meltspinning*, *Emulsion spinning*) são há muito conhecidas ^[5]. Entretanto, uma nova alternativa para sua produção vem se destacando. Segundo Medeiros, *et al.* (2009)^[18], a fiação por sopro em solução, do inglês, *Solution Blow Spinning* (SBS), é uma técnica simples, segura e barata e vem

mostrando-se bastante promissora na produção de *scaffolds* e sistemas de liberação controlada.

A técnica de SBS, consiste de uma nova forma de obtenção de micro e nanofibras poliméricas que tem como suporte teórico os métodos de eletrofiação e fiação convencional a partir do polímero fundido^[9] que utiliza gás pressurizado em vez de alta voltagem^[10]. Tais nanofibras são exploradas como um novo sistema de liberação controlada de fármaco, por isso a produção deste material vem despertando grande interesse na área biomédica^[10].

A SBS foi desenvolvida utilizando elementos de duas técnicas já conhecidas, a de *electrospinning* (eletrofiação) e a de *meltspinning* (fiação a partir do fundido). Este método tem se mostrado como uma alternativa válida na confecção de teias de não-tecido de micro e nanofibras com diâmetros comparáveis àqueles feitos pelo processo de eletrofiação, com a vantagem de ter uma taxa de produção significativamente mais rápida e operar com taxas de injeções mais elevadas^[8,11]. Além disso, a SBS não utiliza alta tensão ou coletor eletricamente condutor para gerar membranas de nanofibras, o que faz com que tecidos vivos e materiais que sofreriam desnaturação pelas altas voltagens da eletrofiação possam ser incorporados a fibras sem perdas em suas propriedades bioativas^[11].

BONAN, *et al.* (2015)^[12], produziram micro e nanofibras de poli (ácido láctico) (PLA) com polivinilpirrolidona (PVP) em proporções de 0, 5, 10, 15 e 20% de PVP, carregadas com 20% óleo essencial de copaíba (*Copaifera sp.*) através da técnica de SBS. As amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), ângulo de contato, além da taxa de liberação “*in vitro*” e atividade antimicrobiana. Todas as composições avaliadas foram capazes de produzir fibras contínuas e suaves pela SBS. A adição de PVP propiciou o aumento do diâmetro da fibra, e diminuiu o ângulo de contato da superfície. Os ensaios de liberação “*in vitro*” de compostos voláteis do óleo essencial de copaíba demonstrou uma taxa de liberação mais elevada em fibras contendo PVP devido ao seu caráter mais hidrófilo. Mantas de fibras feitas a partir de misturas contendo quantidades mais elevadas de PVP tiveram maior ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Segundo os autores, os resultados confirmam o potencial das mantas de fibra para uso em medicamentos de liberação controlada e pode levar a promissoras aplicações no campo biomédico.

Souza *et al.* (2014)^[10] investigaram as características de liberação do diclofenaco de sódio encapsulado em três concentrações (5, 10 e 20% w/v) em nanofibras de poli (3-

hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). As nanofibras foram obtidas por eletrofição e SBS, e o perfil de liberação foi examinado através de espectrofotometria de UV-Vis. Tanto a SBS quanto a eletrofição mostraram-se eficientes na encapsulação do antiinflamatório em membranas de PHBV, sendo a liberação da droga dependente apenas da concentração e da temperatura da mesma.

Sistemas de liberação controlada de drogas também são estudados na odontologia. Reise *et al.*, em 2012 ^[13] desenvolveram um sistema de liberação controlada de metronidazol que serviria no tratamento de periodontite local com fibras de PLA produzidas pela técnica de eletrofição. O perfil de liberação da droga foi analisado pela técnica de HPLC, a eficácia antimicrobiana “*in vitro*” foi avaliada por testes de difusão em ágar frente a *Fusobacterium nucleatum*, *A.a* e *Porphyromonas gingivalis* e os testes de citotoxicidade foram realizados com fibroblastos gengivais. Os autores concluíram que o metronidazol pode ser incorporado às nanofibras poliméricas de PLA com bons resultados e encorajam novos estudos a utilizarem blendas poliméricas para o melhoramento da cinética de liberação de drogas bem como a incorporação de outros agentes antimicrobianos no tratamento da doença periodontal.

Dentre os polímeros mais apropriados para a preparação de sistemas poliméricos de transporte de princípios ativos, os poliésteres alifáticos são os mais estudados. Trata-se de uma classe de polímeros representada pelo poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e seus copolímeros (PLGA), além de diferentes poliésteres alifáticos, como os poli(α -hidroxiácidos), os poli(β -hidroxiácidos) e a poli(α -caprolactona) ^[14]. Juntos formam um grupo de polímeros sintéticos não tóxicos e biodegradáveis que, em ambiente aquoso sofrem degradação hidrolítica mediante clivagem de ligações éster originando ácidos hidroxicarboxílicos atóxicos ^[15].

Atualmente o PLA (Figura 1) tem sido o polímero mais estudado uma vez que a sua degradação origina ácido láctico, um metabólito natural do corpo humano. Isso agrega valores vantajosos, já que, o organismo apresenta vias naturais para sua eliminação ^[16]. No entanto, devido a sua hidrofobicidade, resultando em baixa permeabilidade e menor interação com células, baixa taxa de degradação em relação a outros poliésteres e baixa reatividade superficial, características consideradas desvantajosas para uso biomédico, o PLA tem sido utilizado em conjunto com outros polímeros, através da produção de blendas ^[12].

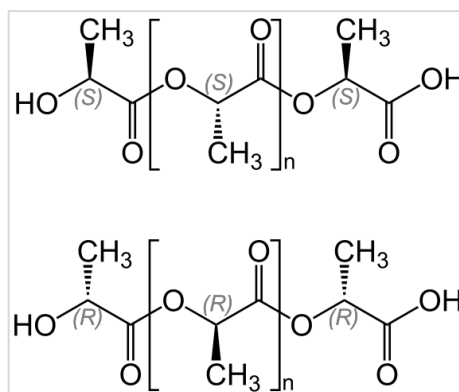


Figura 1 – Unidade estrutural do PLA

Com intuito de melhorar as características dos sistemas poliméricos de transporte, a superfície dos polímeros pode ser modificada através da mistura com outros polímeros de natureza hidrofílica, como o poli(etileno glicol) (PEG) ^[17] (Figura 2). Este apresenta numerosas vantagens tais como a elevada solubilidade em água e em solventes orgânicos, biocompatibilidade, ausência de toxicidade e não é imunogênico ^[18].

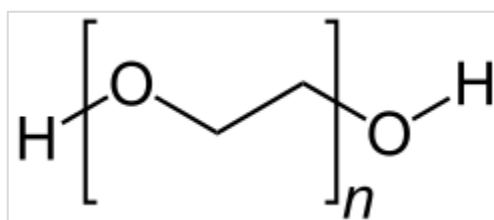


Figura 2 – Unidade estrutural do PEG

A mistura destes polímeros (blenda) poderá servir como um caminho eficaz para melhorar a estabilidade física e mecânica, a permeabilidade e a biodegradabilidade desses materiais, bem como a incorporação de agentes antimicrobianos podem potencializar a sua utilização em várias afecções orais.

Segundo o a última pesquisa nacional de saúde bucal (SBBrasil) realizada em 2010, com relação às doenças periodontais, a sua forma mais grave aparece de modo mais significativo nos adultos (35 a 44 anos), em que se observa uma prevalência de 19,4% ^[19]. As doenças periodontais (DP) são manifestações complexas e multifatoriais caracterizadas por lesões inflamatórias mediadas por interações entre hospedeiro e microrganismos que

ocorrem no periodonto e resultam em destruição das estruturas periodontais de revestimento e sustentação ^[20].

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A.a*) está frequentemente associado a vários quadros de DP, sobretudo nos casos de periodontite agressiva (PA) em que se apresenta como microrganismo predominante^[21]. A periodontite agressiva é uma doença relativamente rara, de progressão acelerada e que acomete adolescentes e adultos jovens, na faixa etária dos doze aos trinta anos. Causa rápida perda vertical do osso alveolar de suporte, resultando no aparecimento de bolsas infra-ósseas geralmente profundas. A causa parece estar relacionada com um grupo de bactérias de alta virulência, além de comprometimento genético em certas famílias, com doença periodontal agressiva^[22]. Clinicamente a quantidade de biofilme dentário é inconsistente com o grau de destruição periodontal observado, mas diretamente proporcional à presença elevada de (*A.a*)^[23].

A.a é um cocobacilo gram-negativo, pertencente à família *Pasteurellaceae*, não móvel, formador de catalase, não formador de esporos, capnofílico, requerendo uma atmosfera contendo 5-10% de CO² para um bom crescimento ^[24]. Esse microrganismo é capaz de produzir uma série de fatores de virulência que facilita sua colonização, invasão e destruição dos tecidos periodontais. O *A.a* também é capaz de formar biofilmes sobre superfícies abióticas como vidros, plásticos e hidroxiapatita, constituindo-se em um importante fator na colonização da cavidade oral e desencadeamento da doença ^[25].

As bactérias quando estruturadas em forma de biofilme possuem capacidade de resistência superior quando comparadas à sua forma planctônica, uma vez que respondem às condições ambientais locais de forma a alterar os seus padrões de expressão genética ou realizar atividades fisiológicas para se adaptar a uma condição particular, a exemplo do stress devido à presença de agentes antimicrobianos^[26].

O tratamento da periodontite agressiva consiste do controle da infecção periodontal através da raspagem e do alisamento radicular de todos os dentes, entretanto, a literatura prova que apenas a instrumentação periodontal é ineficaz para a completa eliminação da *A.a.*^[22], desta forma, torna-se interessante a pesquisa por adjuvantes ao tratamento mecânico da doença.

Recentemente tem crescido o interesse sobre o uso de óleos essenciais e extratos de plantas considerando a eficiência antimicrobiana contra uma ampla variedade de

microorganismos incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A aplicação desses produtos naturais tem sido sugerida na área médica bem como na indústria de alimentos ^[27]

Diante disto, vários estudos têm sido realizados com intuito de conhecer as plantas mais utilizadas pela população contra as afecções odontológicas, além dos benefícios que elas oferecem a quem delas utilizam^[27]. Nesse contexto, a melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) vem se destacando no campo da odontologia. Trata-se de um arbusto pertencente ao gênero *Melaleuca*, popularmente conhecida como “árvore de chá” (TTO - tea tree oil), cujo principal produto é o óleo essencial, de grande importância medicinal por possuir comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos. O óleo contém predominantemente monoterpenos e álcoois afins e sua composição é regulamentada pela norma internacional ISO 4730: 2004 ^[28].

A produção do TTO é realizada por destilação a vapor das folhas e ramos terminais de *M. alternifolia*. O rendimento de óleo é tipicamente de 1 a 2% do peso molhado de material vegetal. Métodos alternativos de extração, tais como o uso de micro-ondas e outras tecnologias têm sido consideradas, mas nenhuma tem sido utilizada numa escala comercial^[29].

Em virtude da atividade terapêutica em diversas especialidades médicas, o TTO passou a ser empregado na área odontológica. O mecanismo de ação deste óleo se dá através da perda do material bacteriano intracelular, da incapacidade das bactérias manterem a homeostase, além da inibição da respiração celular. Assim, tanto o TTO como os componentes isolados do óleo agem de forma a haver perda da integridade da membrana celular e da função tanto para bactérias gram-positivas quanto gram-negativas [30,29,31].

O TTO pode ser considerado como opção para o tratamento das doenças periodontais, uma vez que possui ação comprovada sobre bactérias periodontopatogênicas ^[10,11] e alguns dos seus componentes tem mostrado propriedades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (*in vivo*), como o terpinen-4-ol (Figura 3) e o α -terpineol, isoladamente ou sinergicamente com um ou mais componentes menores^[32]. Ao contrário da clorexidina, esse óleo essencial não mancha os dentes e a ação antimicrobiana é somada ao efeito antiinflamatório ^[33], assim o TTO pode ser considerado como uma alternativa ao uso da clorexidina ^[34].

A evidência anedótica de quase 80 anos de uso sugere que o uso tópico do TTO é relativamente seguro, e que os eventos adversos são menores, autolimitados e ocasionais. Tais eventos adversos podem ser minimizados evitando a ingestão do produto, a aplicação do óleo de forma diluída por via tópica, e através da utilização apenas de óleos que foram armazenados corretamente^[35]. Além disso, segundo Hammer *Et al.* ^[36], o TTO e o terpinen-4-ol apresentam impacto mínimo sobre o desenvolvimento de resistência antimicrobiana, o que justifica ainda mais a importância de novos estudos utilizando esse fitoterápico e seus compostos isolados.

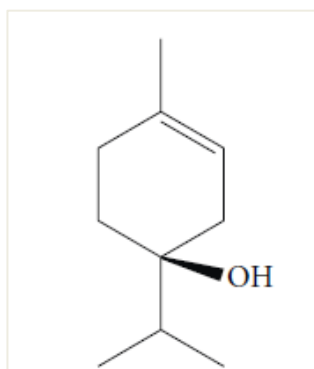


Figura 3: Estrutura química do terpinen-4-ol (NÓBREGA, *et al.*, 2014)

Levando-se em consideração que as nanofibras podem ser utilizadas como dispositivos ou sistemas de liberação controlada de fármacos, e que a literatura mostra que o óleo da melaleuca e seu componente isolado, terpinen-4-ol, têm apresentado atividade antimicrobiana frente a *A.a*, estudos que unam esses dois fatores podem ser valiosos na clínica odontológica uma vez que estes nanomateriais visam manter a concentração do fármaco em níveis terapêuticos por maiores períodos de tempo^[37], sendo um bom auxiliar à terapia mecânica da doença periodontal.

Tendo em vista o potencial tecnológico apresentado pelas nanofibras e a possibilidade de agregar características terapêuticas a esse material, o objetivo deste estudo foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do terpinen-4-ol e da clorexidina, produzir através da fiação por sopro em solução (SBS), e caracterizar nanofibras de PLA/PEG incorporadas com terpinen-4-ol e

clorexidina, bem como e quantificar a viabilidade celular de biofilme de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* crescido sobre a superfície inibitória desta fibra, de forma a agregar técnicas inovadoras ao tratamento das doenças periodontais.

CAPÍTULO 1

1. Chapter 1

ARTICLE: Materials Science and Engineering: C

PLA/PEG nanofibers development and antimicrobial “*in vitro*” evaluation with Terpinen-4-ol and chlorhexidine against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Mariângela A. Barbosa^{b,c}, Allan J.R. Albuquerque^b, Isabella A.P. Farias^{b,d}, Marcos Alexandre C. Oliveira^{b,c}, Roberta F. Bonan^b, Iêda M.G. Santos^e, Fábio C. Sampaio^{c,d}, Eliton S. Medeiros^a

^a Materials Engineering Department (DEMAT), Paraíba Federal University (UFPB), Cidade Universitária, 58.051-900 João Pessoa, PB, Brazil

^b Health Sciences Center (CCS), Paraíba Federal University (UFPB), Cidade Universitária, 58.051-900 João Pessoa, PB, Brazil

^c Dental Post Graduation Program (PPGO/CCS/UFPB), Paraíba Federal University (UFPB), Cidade Universitária, 58.051-900 João Pessoa, PB, Brazil

^d Social and Clinical Dentistry Department (DCOS), Paraíba Federal University (UFPB), Bucal Biology Laboratory – LABIAL, Cidade Universitária, 58.051-900 João Pessoa, PB, Brazil

^e Chemistry Department (DQ), Paraíba Federal University (UFPB), Materials and Fuels – LACOM, Cidade Universitária, 58.051-900 João Pessoa, PB, Brazil

Abstract

To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of terpinen-4-ol and chlorhexidine produce and characterize nanofibers PLA / PEG incorporated with terpinen-4-ol and chlorhexidine as well as quantifying the viability biofilm mobile *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) (ATCC 00078) grown on the surface of this inhibitory fiber. Methodology: The determination of MIC and MBC was performed by broth microdilution; the nanofiber terpinen-4-ol (40%) and chlorhexidine (0.12%) were produced by spinning blow solution (SBS) and characterized by scanning electron microscopy (SEM), thermal gravimetric analysis (TGA), calorimetry differential scanning (DSC) and infrared spectroscopy by Fourier transform (FTIR). The cell was observed by fluorescence quantification and nanofibers incorporated with chlorhexidine served as positive control for this assay. Results: There was an effective antimicrobial activity terpinen-4-ol (MIC and MBC = 25 mg / mL) and chlorhexidine (MIC and MBC <15 mg / mL) on planktonic cells pa PEG acted as a plasticizer resulting in a reduction in the crystallinity of the PLA, increased fiber diameter and lightweight thermal destabilization of the material. The increase in PEG concentration was not decisive for increasing the antimicrobial activity of the fibers but has contributed to formation of a more amorphous material. The terpinen-4-ol fibers showed similar antimicrobial activity to chlorhexidine fibers (p <0.05), and the Terpinen-4-ol fiber with 20% PEG had best performance among your group. Conclusion: The terpinen-4-ol

and chlorhexidine had effective antimicrobial activity against A.A and SBS technique was effective in the production of PLA nanofibers / PEG antimicrobial action against A.A having the potential to drive future applications to combat periodontal disease.

Keywords: Nanofibers, Terpinen-4-ol, Chlorhexidine *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

* Corresponding author. E-mail address: elitonsdemedeiros@gmail.com (E.S.MEDEIROS).

1. Introduction

Periodontal disease (PD) are complex and multifactorial manifestations characterized by inflammatory lesions mediated by interactions between the host and microbes that occur in the periodontium and result in destruction of coating and supportive periodontal structures^[1].

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A.a*) is often associated with many cases of PD, especially in cases of aggressive periodontitis (AP) in which *A.a* itself represents the predominant organism ^[3]. Aggressive periodontitis is a relatively rare disease, with rapid progression which affects adolescents and young adults, ranging in age from twelve to thirty years. It causes fast vertical loss of alveolar bone support, usually resulting in the appearance of deep alveolar bone pockets. The cause seems to be related to a group of highly virulent bacteria, additionally, it has genetic involvement in certain families with aggressive periodontitis ^[4]. Clinically the amount of dental plaque is inconsistent with the degree of periodontal destruction observed, and directly proportional to the high presence of *A.a* ^[5].

A.a is a gram-negative coccobacillus, belonging to the *Pasteurellaceae* family, non-motile, catalase forming, non-spore forming, capnophilic, requiring an atmosphere containing 5-10 % CO₂ for good growth ^[6]. This microorganism is capable of producing a number of virulence factors to facilitate its colonization, invasion and destruction of periodontal tissues. The *A.a* is also able to form biofilms on abiotic surfaces such as glass, plastics and hydroxyapatite, which is an important factor in the colonization of the oral cavity and triggering the disease ^[7].

Bacteria when structured in the form of biofilm have greater resilience when compared to their planktonic form as they respond to local environmental conditions in order to change their patterns of gene expression or conduct physiological activities to adapt to a particular condition, such as the stress due to the presence of antimicrobial agents^[8].

The aggressive periodontitis treatment consists of control of periodontal infection by scaling and root planning of all teeth, however, there is no sufficient evidence to prove that only periodontal instrumentation is effective for complete elimination of *A.a*^[4], therefore, it is necessary to look for adjuvants for mechanical treatment of the disease.

Recently there has been growing interest in the use of essential oils and plant extracts considering the antimicrobial effectiveness against a wide variety of microorganisms^[9]. In this context, the melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) has been outstanding in the field of dentistry. It is a shrub belonging to the genus *Melaleuca*, popularly known as "tea tree" (TTO - tea tree oil), whose main product is the essential oil of great medical importance because it has proven antibacterial and antifungal action against various human pathogens. The oil contains predominantly monoterpenes and aliphatic alcohols and its composition is regulated by the international standard ISO 4730:2004.

The TTO can be considered as an option for treatment of periodontal diseases, as it has a proven action on periodontal bacteria^[10,11] and some of its components have shown antibacterial, antifungal and anti-inflammatory (*in vivo*) such as terpinen-4-ol and α -terpineol, isolated or synergistically with one or more minor components^[12]. Moreover, according to Hammer *et al.*^[13], TTO and terpinen-4-ol have minimal impact on the development of antimicrobial resistance, which further justifies the importance of further studies using this herbal and their isolated compounds.

In the biomedical field, nanofibers can be used as vehicles for the controlled release of drugs, bioactive molecules such as cytokines, growth factors, anticancer drugs, enzymes and some vitamins^[14] as well as hemostatic, scaffolds and dermal regeneration devices^[15]. Amongst the nanostructures, the nanofibers are among the most produced and studied, given its large number of possible applications and benefits^[16], including its large surface area, high porosity with small pore size and the possibility of controlling the crystalline phase transitions, amorphous, a desirable formulation to satisfy the pharmaceutical requirements^[17]. In addition, nanofibers have superior mechanical properties and ease of addition of surface features compared to any other material^[14].

An innovative technology in the development of nanofibers has been well explored in recent years, it is the Solution Blow Spinning (SBS), a simple, safe and inexpensive technique that has shown to be promising in the production scaffolds and drug delivery systems^[18]. The SBS was developed using elements of two known techniques, the electrospinning and melt spinning. This method has proven to be a valuable alternative in the manufacture of micro nonwoven webs and nanofibers with comparable diameters to

those made by electrospinning process, with the advantage of having a significantly faster production rate and operate higher injections rates ^[18,19]. Furthermore, SBS does not use high voltages or electrically conductive collector to produce nanofibers membranes, which makes living tissues and materials denatured by the high voltages electrospinning can be incorporated into fibers without losses in their bioactive properties ^[19].

Therefore, this study aims to determine the terpinen-4-ol inhibitory and bactericide minimum concentration; to produce polymer nanofibers from blends of PLA/PEG with terpinen-4-ol incorporated by solution blow spinning (SBS) technique and to test its inhibitory action on *A.a* biofilm growth.

2. Experimental

2.1 Materials

Poly (lactic acid) (PLA) ($M_w = 1.25 \times 10^5$ g / mol) - Biomater® (Sao Paulo, Brazil) and polyethylene glycol acid (PEG) ($M_w = 0.8 \times 10^4$ g / mol) - Sigma-Aldrich® (Corp., Saint Louis, USA). Solvents used in the preparation of polymer solutions were chloroform [CHCl_3 , 99%] and acetone [$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, 99.5%] - F.Maia® (Cotia, Brazil). In addition, terpinen-4-ol and chlorhexidine gluconate, both from Sigma-Aldrich® (Corp., St. Louis, USA), were used to add antimicrobial characteristics to the nanofibers.

For "*in vitro*" tests a reference *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 00078) sample was used, obtained upon request from the Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro / RJ) Foundation, from which cultures of planktonic cells and mono specimen biofilms were prepared.

2.2 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC)

The MIC and MBC of Terpinen-4-ol was determined by microdilution in microtiter assays. The inoculum was standardized by reading absorbance at 600nm to match the McFarland 0.5. The culture medium used was Broth Brain Heart Infusion (BHI) broth, supplemented with hemin 5mg / ml solution, yeast extract 0.005 mg / mL and menadione 1mg / ml solution. Antimicrobial agents were prepared so that the concentrations varied from 15 μL / mL to 400 μL / ml ^[20]. After filling all wells, the

microplates were sealed with plastic film and incubated at 37 ° C for 48 hours. After the incubation period, 35 µL of resazurin (0.01%, 10 mg, dissolved in 80 ml of saline) was added to each well. The plates were sealed with parafilm and kept incubated for a further 1h before visual reading. The color change in the holes were interpreted as sensitive microorganism to an antimicrobial agent tested. Wells with pink-violet or pink shows antimicrobial activity with chemical reaction of oxidation-reduction of resazurin in resofurina and, therefore, the last blue pit (left to right) who is the MIC, interpreted as the absence of viable cells by inhibiting cell growth. Subsequently, 100 ml of the well indicated that the MIC, as well as those most concentrated immediately were subcultured in BHI agar plates supplemented with 5% defibrinated sheep blood. After 48 hours incubation at 37 ° C, it was considered as the lowest concentration CBM able to prevent visible growth of subculture. This whole stage was performed in triplicate in anaerobic camera Whitley model dg250 anaerobic workstation, with an atmosphere of 85% N₂, 5% CO₂ and 10% H₂.

2.3 Fiber spinning

The polymer solutions were prepared by solubilization of PLA (10% w / v) in chloroform: acetone (3 : 1 v / v) . PEG was added to 10, 20 and 30% (w / w) PLA (dry basis) . To compose the test group (PLA / PEG- T4) , Terpinen-4-ol was added to 40%^[21] (v/w) and to compose the positive control group (PLA / PEG -CHX) chlorhexidine gluconate 0.12% was added relatively to the total weight of the PLA / PEG mixture (Table 1). Group 1 (PLA / PEG) refers to the negative control, in which no antimicrobial agent was added.

Table 1. Polymer solutions composition

<i>Group</i>	<i>Polimeric composition</i>	<i>Solvent</i>	<i>Antimicrobial agent incorporated</i>
<i>G1</i>	PLA (10%) + PEG (0, 10, 20 e 30%)	Chloroform + acetone (3:1)	-
<i>G2</i>	PLA (10%) + PEG (0, 10, 20 e 30%)	Chloroform + acetone (3:1)	Terpinen-4-ol (40%)
<i>G3</i>	PLA (10%) + PEG (0, 10, 20 e 30%)	Chloroform + acetone	Chlorhexidine

	30%)	(3:1)	gluconate (0.12%)
--	------	-------	-------------------

The fibers were prepared by SBS at a pressure of 50 Psi and injection rate of $100\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. For this two concentric nozzles were used, an external measuring 2.5 mm and an internal with a diameter of 2 mm in which the inner tube was positioned in protrusion of 0.5 mm from the outer tube and a metal collector, in rotation, It was positioned 20 cm from the tip of the inner tube . The fibers produced were deposited in this collector, previously covered with tin foil [22,23]

2.4 Morphological studies of fibers by scanning electron microscopy (SEM)

The morphology of the fibers was observed using a scanning electron microscope (SEM) model LEO 1430 Zeiss. Prior to analysis, the samples were collected in aluminum foil, had their surfaces golden coated with the aid of sputter brand Emitech K 550X. The diameters of the fibers were evaluated by an image analyzer software (Image J, National Institutes of Health, USA).

2.5 Thermal Characterization

Thermal Characterization took place in a nitrogen atmosphere at a flow of 50 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Each sample of approximately 6mg was heated starting from room temperature to 180°C , for differential scanning calorimetry (DSC - Shimatzu DSC 60) and from room temperature to 800°C to thermogravimetric analysis (TGA - Shimatzu DTG 60 H), both with a rate heating $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

(C) To obtain data as glass transition temperature (T_g), crystallization temperature (T_c), melting temperature (T_m), melting enthalpy (ΔH) and degree of crystallinity ($X\%$) OriginPro 9.0 software was used. To calculate the crystallinity of the samples, we used the following equation :

$$\%X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0 * W_{PLA} * W_{PEG}}$$

Where: ΔH_f is the melting enthalpy (J/g) , and W refers to the mass fraction indicated in DSC curves.

ΔH_f^0 is the melting enthalpy (J/g) of the component in its fully crystalline state. The value used for PLA was 93.7 J / g ^[36]

2.6 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Infrared spectra were obtained with the aid of a spectrophotometer using the horizontal attenuated total reflectance (HATR) accessory from Shimadzu , IRAffinity - 1 model / FTIR - 8000 series , in the region of 600 to 4000 cm^{-1} , resolution 4 cm^{-1} and 20 standard scans.

2.7 Evaluation of the antimicrobial nanofiber

2.7.1 Manufacture of specimens

For the biofilm growth nanofibers were cut into circles with a diameter of 2.3 cm joined one to another so that the nanofibers stay to the outer side in contact with the culture medium. In order to allow the specimen submersion in the culture medium, dental floss with a weight of acrylic resin was put on the edge between the two cut blanket circles (Figure 1). For each sample, three specimens were produced, featuring an triplicate experiment .

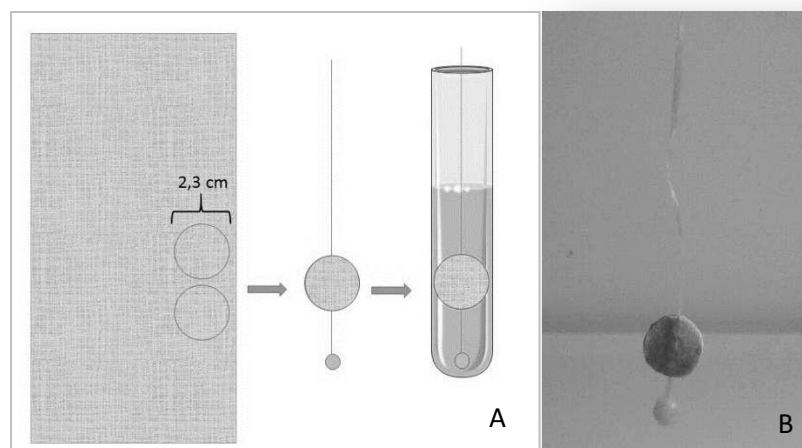


Figure 1: (A) Scheme of the specimen construction ; (B) specimen (A)

2.7.2. "in vitro" *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm Formation on the nanofibers

The antimicrobial activity of the polymer blends was tested using a static model of bacterial biofilms based on the Guggenheim model (2001)^[24]. This model was chosen due to similarity to natural conditions of periodontal pockets.

After growth and standardization of inoculum at 0.5 McFarland scale, the specimens previously sterilized by ultraviolet light were inserted into falcon tubes upright^[25] and remained incubated under anaerobic camera in atmosphere of 85% N₂, 5 % CO₂ and 10% H₂ at 37 ° C for 24 hours .

Only the bacterial biofilms grown on the inhibitory surface of the nanofiber was used, neglecting that formed on the structure attached on specimens. Then they were taken to a sonicator (Ultrasonic Cleaner USC 750 ; Single Group , São Paulo, SP, Brazil) for dispersion of bacteria and homogenized in vortex (Vortex Mixer ; Vision Scientific Co. Ltd , Seoul , South Korea). After the specimens were removed, the result of the bacterial content was used for fluorescence analysis.

2.7.3 Cell quantification

For cell quantification by fluorescence imaging, a calibration curve was constructed initially, and it was used as a reference for the readings of the examined wells. For this purpose, a combination of living (maintained in saline) and dead bacteria (maintained in 70% isopropyl alcohol) was made and the curve had the following concentrations: 0%, 20%, 50%, 80% and 100% viable bacteria and the complement reverse (100%, 80%, 50%, 20% and 0%) of dead bacteria. Mixtures of 30 µL of living and dead bacteria were transferred to a 96-well black plate suitable for fluorescence. Likewise, 30 µL of each bacterial solution to be evaluated were placed into the fluorescence plate wells.

Cell viability was quantified by fluorescence imaging using a mixture of dyes (SYTO 9 and propidium iodide) from the cell viability kit LIVE/DEAD(r) BacLight(tm) (Molecular Probes; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After exposure of each well to the reagent mixture, was made the feasibility analysis on the fluorescence microplate reader (FluoStar OPTIMA; BMG LabTech, Germany).

2.8 Statistical analysis

Data analysis was performed by descriptive statistics through percentages, graphs and tables with values expressed as mean and standard deviation. Statistical significance of differences was assessed using the Tukey test. Differences were significant at $p < 0.05$, α error of 5 % using SPSS 20.0 (2012 IBM Corp. SPSS 20.0 for Windows. Armonk , New York, USA).

3 Results and discussion

3.7 Terpinen-4-ol Antimicrobial "in vitro" activity

Terpinen-4-ol showed antimicrobial activity against planktonic strain of *A.a* with inhibitory concentrations and minimum bactericidal below 100 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2). According to HOLETZ, *et al.* (2002)^[26] values below 100 $\mu\text{g/mL}$ for antimicrobial activity tests through broth microdilution technique are considered indicative of significant antibacterial activity. Thus, it can be considered safe and significant the effect presented by terpinen-4-ol against *A.a*.

Table 2: Data of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bacterial concentration (MBC) of the antimicrobial agents tested.

	<i>MCI</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Standard</i> <i>deviation</i>	<i>MCB</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Standard</i> <i>deviation</i>
<i>Terpinen-4-ol</i>	25	10	25	5
<i>Chlorhexidine</i> <i>gluconate</i> (0.12%)	< 15	-	-	-

3.2 Morphology of the fibers incorporated with Terpinen-4-ol and chlorhexidine gluconate

For each specimen, the mean diameter and its distribution were determined by analyzing 90 randomly chosen fibers (Figure 2 and Table 3). The microscopic aspect of nanofibers are shown in Figure 3. The diameters of the fibers ranged from 612 (PLA / PEG 10%) to 1411 nm (PLA / PEGCHX 30%). It was observed that as the ratio of PEG increased, the fiber diameter also increased (Graph 1), this information was controversial to two samples : PLA / PEG and PLA / PEG -T4 relating to the fibers added 10 % PEG, where PLA / PEG proved to be thinner than the pure PLA fiber, and PLA fiber / PEGT4 proved to be the most bulky of its group. Os diâmetros das fibras variaram de 612 (PLA/PEG 10%) a 1411 nm (de PLA/PEG-CHX 30%).

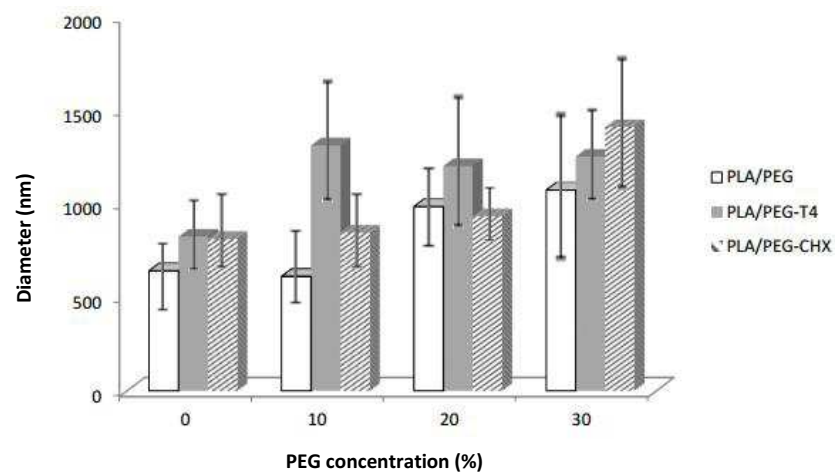


Figure 2: Mean distribution of fibers diameter versus PEG concentration

Table 3 - Data for average fiber diameter for each sample

Group	Sample	Average diameter (nm)	Standard deviation (nm)
I	PEG 0	642	312
	PEG 10	612	266
	PEG 20	986	243
	PEG 30	1074	493
II	PEG 0 – OM	573	191
	PEG 10 – OM	709	257
	PEG 20 – OM	1333	361
	PEG 30 – OM	2286	340

III	PEG 0 – T4	825	322
	PEG 10 – T4	1313	580
	PEG 20 – T4	1203	447
	PEG 30 – T4	1253	342
IV	PEG 0 – CHX	813	253
	PEG 10 – CHX	846	227
	PEG 20 – CHX	934	194
	PEG 30 – CHX	1411	395

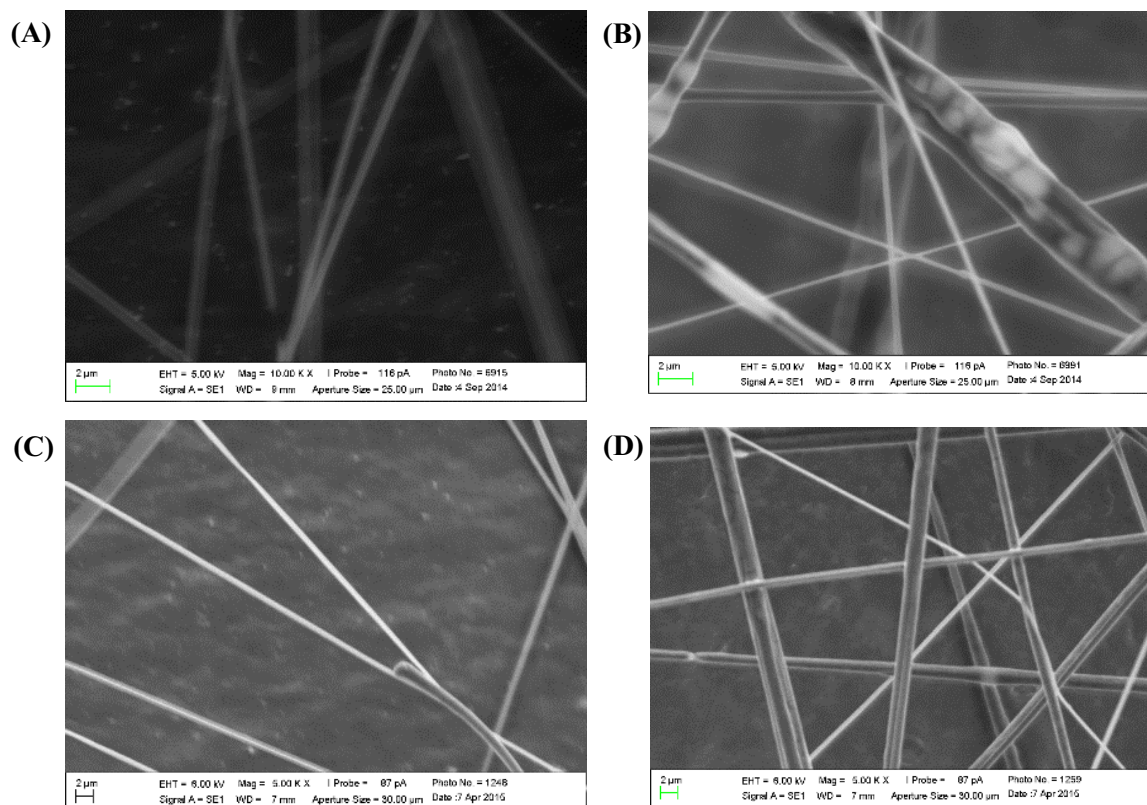


Figure 3: Photomicrographs of magnitude of 10,000 times for (A) and PLA (B) PLA / PEG30 ; and 5,000 times to (C) PLA / PEG- T4 and (D) PLA / PEG –CX

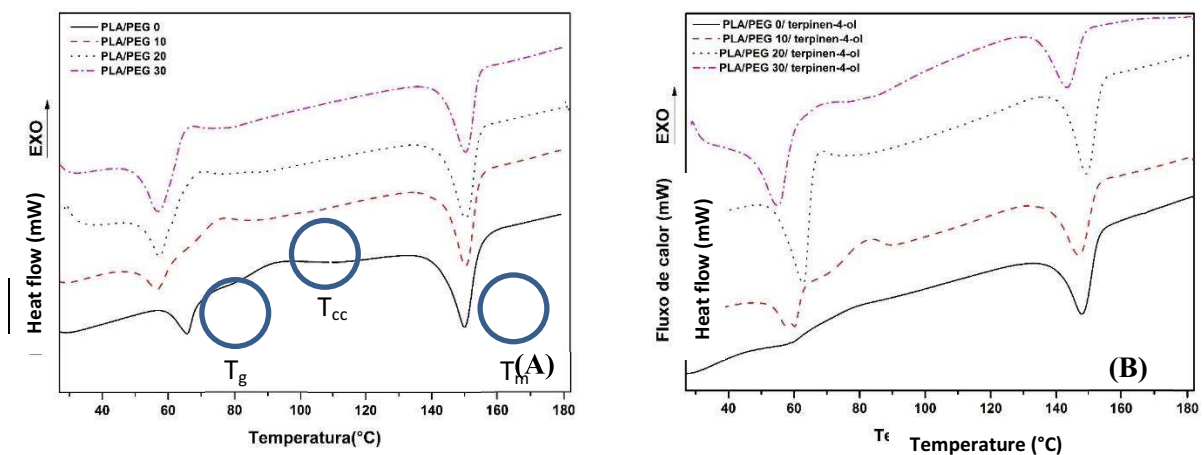
In the same graphic it can be noticed that in a set concentration of PEG , the range of diameters does not follow the same trend , this is due to several polymer - polymer and polymer – substance effects.

All fibers presented homogeneous aspect except the fiber in Group I with 30 % PEG (Figure 3). Lei (2013)^[27], explains that when polymer components is greater than 20 % weight , the mixtures are capable of crystallizing into two crystal phases dispersed in an amorphous matrix ; PEG phase - immediately after melting the glass transition of the amorphous matrix. For other reasons, only the primary component is able to crystallize. These results indicate that mixtures PLA / PEG 30% is not presented as a miscible blend. However, this feature could not be observed in the other fibers having the same PEG content.

It is assumed that agents incorporated into other fiber groups acted this masking effect of morphological heterogeneity.

3.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

In Figure 4A the thermal behavior of the curve relating to PLA / PEG 0% (pure PLA) had T_g glass transition temperature (around 60 ° C) and melting temperature (T_m) (around 150 ° C) confirming the reported temperatures in the literature^[28]. Small displacements in these events are correlated to processing conditions, such as solvent used and the spinning technique. Moreover, the addition of the second polymer (PEG) and other substances (T4 and CHX) might interfere with individual crystallinity and molecular motion of components to be change in T_g as well as seen in the DSC curves for the three groups.



Temperature (°C)

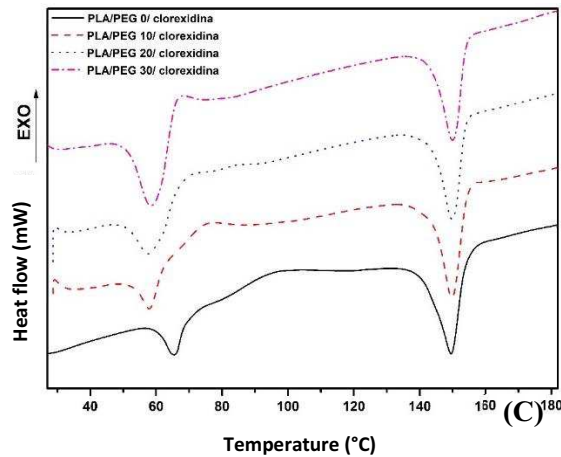


Figure 4: DSC curves for fibers of PLA / PEG (A); PLA / PEG -T4 (B) and PLA / PEG - CHX (C).

The influence of the amount of the plasticizer (PEG) was evident for all three groups since it directly affects the glass transition temperature (T_g) shifting it to the left as there was an increase in its ratio (Figure 4). A plasticizing agent acts reducing the T_g of the material. The greater the proportion of plasticizer, the lower the T_g , due to the plasticizer, which is lower molecular weight substance that assists in the movement of the polymer chains^[29].

The cold crystallization (T_{cc}) of the sample of PLA / PEG 0 % (Figure 4A) that occurred within the range of 70-110 ° was also influenced when the ratio of PEG became 10% , appearing only as a minimum peak in the thermogram. As consequence of PEG acting as a plasticizer which allows the polymer chains to flow at lower temperatures, justifying the displacement of the glass transition temperature^[30].

In small quantities, the addition of plasticizers can also facilitate the alignment of strands thereby promoting cold crystallization due to increased molecular mobility conferred. However, the increase in the amount of these constituents may favor an opposite effect, so that the cold crystallization becomes difficult due to increased volume or insolubility of the plasticizer between the polymer chains^[29]. This effect can be seen in samples with 20 and 30 % PEG (Figure 4A).

The enthalpy of fusion (ΔH_m) and the degree of crystallinity (X_c) also decreased (Table 3) as the ratio of PEG was increased. This happens as consequence of the presence of this polymer which significantly increases the mobility of chains, resulting in greater difficulty to the structure of the PLA pack in the crystal lattice^[31].

However, the PLA melt temperature was not affected by the addition of PEG (Table 3), this behavior was expected due to incompatibility between the two polymers (PLA / PEG) as a result of their different chemical natures, hydrophobic and hydrophilic. It is known that the degree of crystallinity (X_c) plays an important role in drug release profile in physiological medium, the results suggest the formation of a more amorphous nanofiber as PEG is added. This property is evidenced by the decrease in the reference values for X_c .

Table 3: Glass transition temperature values (T_g) , crystallization temperature (T_{cc}) , crystalline melting temperature (T_m) , enthalpy thereof (ΔH) and degree of crystallinity X_c (%) for GI (PLA / PEG).

<i>GI</i>	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_{cc} (°C)	ΔH_{cc} (J/g)	X_c (%)
<i>PLA/PEG 0</i>	62	149	22.01	92.75	4.3	22.6
<i>PLA/PEG 10</i>	53	150	21.47	75.69	2.25	19.9
<i>PLA/PEG 20</i>	55	150	19.03	69.5	7.67	15.6
<i>PLA/ PEG 30</i>	52	150	17.69	-	-	12.7

The glass transition temperatures group PLA / PEG -T4 is presented lower than those obtained in group PLA / PEG (Table 4 and 3). The addition of terpinen-4-ol isolated exerted a plasticizing effect and this is confirmed by the shift in polymer T_g from 62 ° C to 55 ° C. This result is already reported in the literature, in which PLA systems with plasticizers were studied ^[31,32].

Table 4: Glass transition temperature values (T_g), crystallization temperature (T_{cc}), crystalline melting temperature (T_m), enthalpy thereof (ΔH) and degree of crystallinity X_c (%) in GII (PLA / PEG -T4)

<i>G II</i>	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_{cc} (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
<i>PLA/PEG0/ T4</i>	55	147	18.7	78.4	2.05	19.2
<i>PLA/PEG10/T4</i>	53	148	17.4	81.92	4.08	16.1
<i>PLA/PEG20/T4</i>	53	147	18.94	-	-	15.6
<i>PLA/ PEG30/T4</i>	52.3	148	14.7	-	-	10.6

In the case of terpinen-4-ol nanofiber without the addition of PEG (PLA / PEG 0 - T4) it was found that the cold crystallization event is not as well defined as on the same fiber increased with 10 % PEG (Figure 4B). The benzene bulky groups attached to the methyl groups of the terpinen-4-ol, might repel methyl groups of the poly (lactic acid) chains, inhibiting the folding of these and hence the formation of crystals. The addition of PEG (PLA / PEG10 -T4) might have mitigated this repulsive effect between the groups at first, however, the increase in the proportion of this polymer enhanced the plasticizing effect^[32].

The melting temperatures and enthalpies related to the group PLA / PEG- CHX are slightly lower than PLA / PEG group as well as the degree of crystallinity (Tables 3 and 4). This means that the terpinen-4-ol gave additional feature of the amorphous PLA / PEG fibers.

Finally, the Group III did not significantly altered the degree of crystallization or melting temperature (T_m) of the polymer, Table 5. That was a result of the nature of chlorhexidine gluconate and bulky group associated with this compound that did not act as a plasticizer (Figura 4B) ^[33,34]. The cold crystallization events and the displacement of the glass transition are associated with the use of PEG and the increase in the proportion of this constituent was responsible for the left shift of the events mentioned above.

Table 5: Glass transition temperature values (T_g), crystallization temperature (T_{cc}), crystalline melting temperature (T_m), enthalpy thereof (ΔH) and degree of crystallinity X_c (%) for GIII (PLA / PEG- CHX).

<i>G III</i>	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_{cc} (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
<i>PLA/PEG0/Cx</i>	61	150	20.45	96.7	8.7	21.0
<i>PLA/PEG10/Cx</i>	53	149	19.77	75.4	5.03	18.3
<i>PLA/PEG20/Cx</i>	52.5	149	18.5	77	0.39	15.2
<i>PLA/PEG30/Cx</i>	51.8	149	17.79	-	-	12.8

3.4 Thermogravimetric Analysis

TGA curves analysis showed discrete mass loss for all groups around 80-100 ° C, the resulted from water / moisture loss. The PLA had two characteristic stages of mass loss (Figure 5). The first, with onset temperature around 360 ° C, well-marked, mainly related to the split of the major chains and reactions of inter or intramolecular transesterification, confirming results found in the literature ^[21]. The temperature reduction in this case occurs as the concentration of PEG in the webs increase, indicating a decrease in thermal stability of PLA (Figure 6A). Around 400 ° C, for all PLA / PEG blends, we have the onset temperature of the second event ($T_{onset\ 2}$), related to the end of the thermal degradation of the PLA. At this stage, the weight loss is almost total in the case of pure PLA web (PLA / PEG 0). Thus, the appearance of the "shoulder" is observed (Figure 5A) above 400 ° C is no more related to the degradation of PLA, charactering that the process is associated with the PEG degradation, since the width of the shoulder is amplified as the proportion of PEG increases.

It was not possible to set the $T_{onset\ 2}$ temperature of PLA / PEG0 -T4 samples, because of the amount of the antimicrobial agent was relatively small (Figure 5B). Consequently, the event related to the PLA total degradation at this temperature is more noticeable than the degradation of these components separately.

The figure also shows the thermal behavior of webs produced with the positive control, chlorhexidine gluconate. Comparing to the negative control webs (PLA / PEG) it can be observed that the addition of the drug does not change the characteristic of the PLA events, which corroborates with the study by ^[34]. The change in thermal performance only

occurs when PEG is added, and by increasing the proportion of this polymer, there is a gradual decrease in *onset* temperatures 1 and 2.

The arising of the shoulder above 350 ° C (Figure 5C) is characteristic of degradation of PEG, as found in the first group (Figure 5A) , so this event cannot be observed in PLA / PEG 0-CHX fibers.

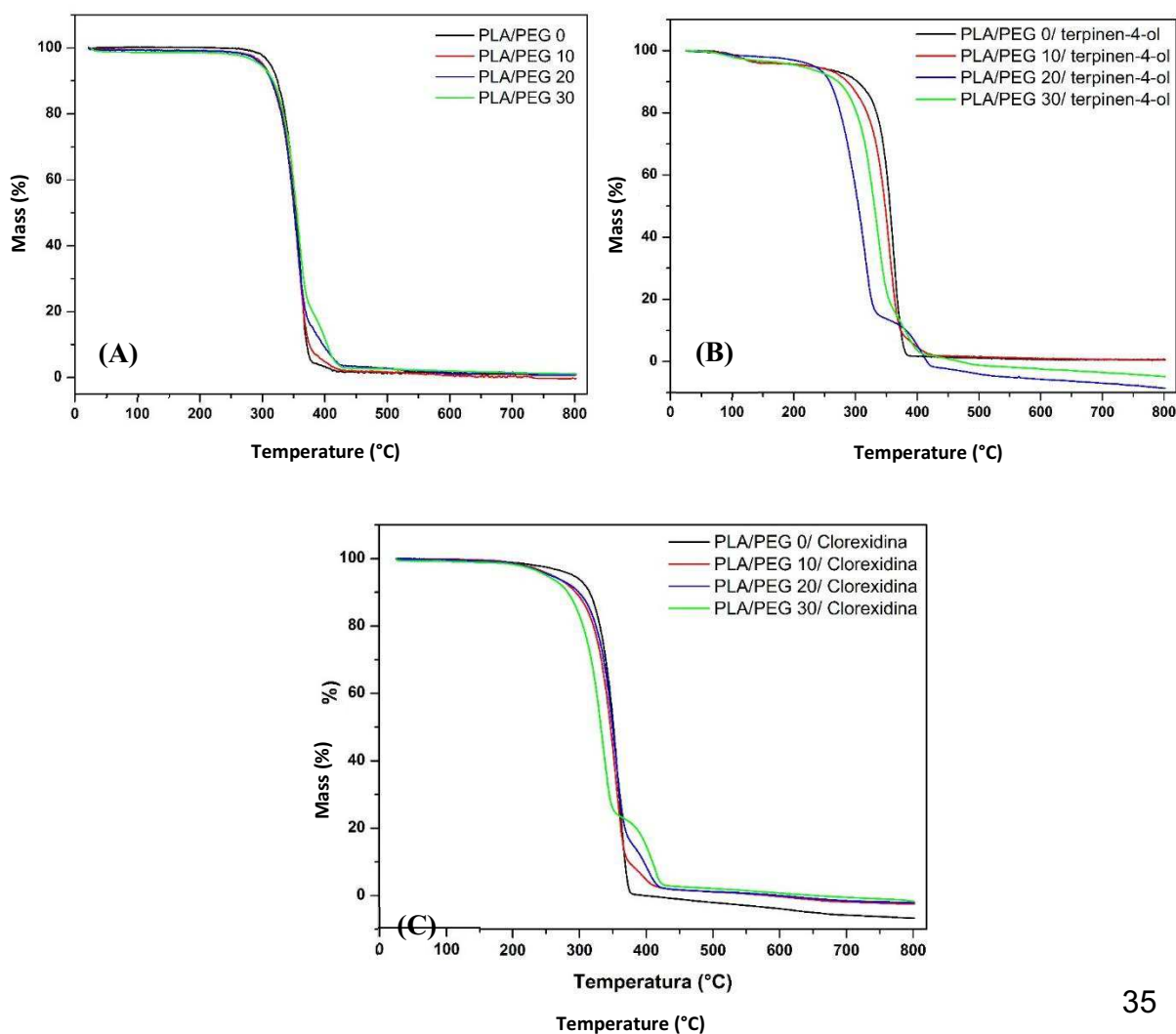


Figure 5: TGA curves relating mass loss versus temperature for PLA / PEG (A); PLA / PEG -T4 (B) and PLA / PEG- CHX (C).

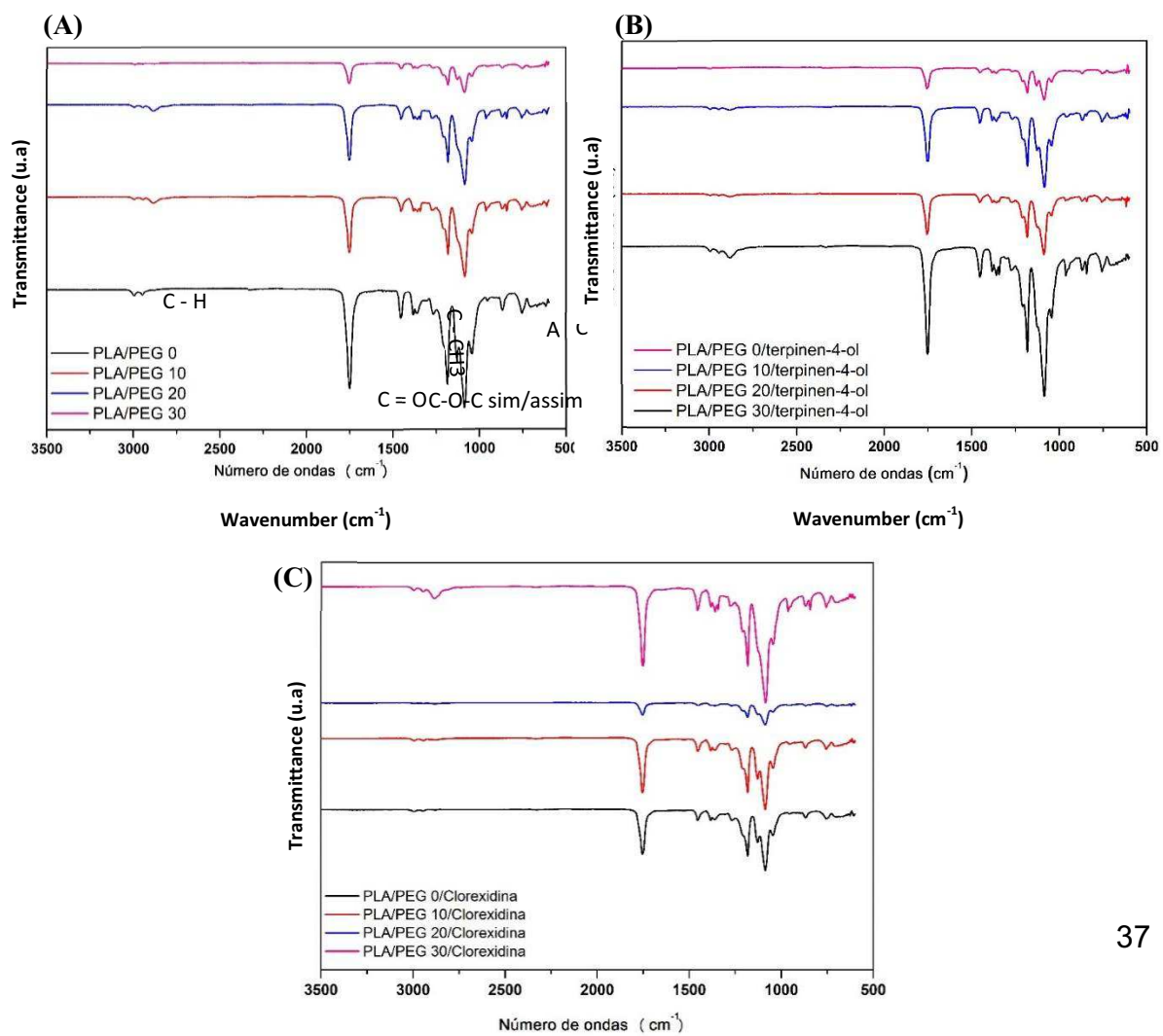
3.5 Spectroscopic Characterization

According to the literature ^[35,36], groups related to poly (lactic acid) - PLA - already identified are listed in Table 6 and its infrared spectrum is shown in Figure 6A (PLA / PEG0), where it is also possible to observe the influence of the increase in the proportion of PEG in the webs of the group.

When the spectrum of the PLA (PLA / PEG0) is analyzed , it is observed that the most intense band is at 1757 cm^{-1} (Figure 6A) related to stretching of the carbonyl ($\text{C}=\text{O}$) of the ester group present in the chain of this polymer . Other major bands are those located at 2995 and 2944 cm^{-1} , for the grouping (CH), and the band located at 1453 cm^{-1} , referring to ($\text{C}-\text{CH}_3$) and three peaks 1132 , 1087 and 1045 cm^{-1} , for the grouping ($-\text{COC}-$) . The peaks 756 and 870 are assigned respectively to the crystalline and amorphous phases of PLA , being denominated C (crystalline) and A (amorphous) ^[35,36].

Table 6: Bands characteristics of PLA in Infrared ^[35,36]

<i>Wave number (cm-1)</i>	<i>Functional groups</i>	<i>Vibrational mode</i>
3571	—OH	Free stretch
2995	—CH—	Asymmetric stretch
2944	—CH—	Symmetric stretch
1759	—C=O	Carbonila stretch
1453	—CH ₃	Angular deformation
1453, 1382, 1362	—CH—	Angular deformation
1268, 1194, 1130,1093	—C—O—C	Symmetric and asymmetric stretch
1047	C—CH ₃	Stretch
926,870, 756	—C—COO	Stretch



Wavenumber (cm⁻¹)

Figure 6: Infrared spectrum for PLA / PGA); PLGA / PEG-T4 (B) and PLA / PEG-CHX (C).

The increase of PEG in PLA webs provides a decrease in the intensity and resolution of the peak of the crystalline portion of the PLA, as it can be seen in Figure 5A. An explanation for this is the characteristic of the plasticizer PEG acting on the chains mobility during the spinning process, which allows small crystalline groups formation. This may justify the bifurcation in the peak at 860 cm⁻¹.

In Figure 6B the decrease in intensity is noted and the displacement of bands located at 2995 and 2944 cm⁻¹, becoming 2995 and 2887 cm⁻¹ related to the connection (CH), regarding Figure 6A, the result of addition of terpinen-4-ol. In this same figure, regarding the peak 756 cm⁻¹ (crystalline) and 870 cm⁻¹(amorphous), it is observed that the first becomes less defined in the samples as the amount of PEG increases.

Figure 6C shows the obtained spectrum of PLA web with addition of the positive control, chlorhexidine gluconate. It was not possible to identify the typical signs of biguanide groups, which are present amongst 1550-1450 cm⁻¹. Possibly due to small amount of chlorhexidine gluconate that was used in the formulation of the webs and the sensitivity of the equipment [33,34].

3.6 Quantification of cell viability of A.a biofilm front inhibitory surface of nanofibers incorporated with terpinen-4-ol

Figure 7 shows the therapeutic effectiveness for the positive control, 0.12% chlorhexidine gluconate that had controlled release for 24 hours from the nanofibers. All bacteria was dead in all the webs tested for this group, with no statistically significant difference in cell viability amongst the webs with and without PEG (p> 0.05).

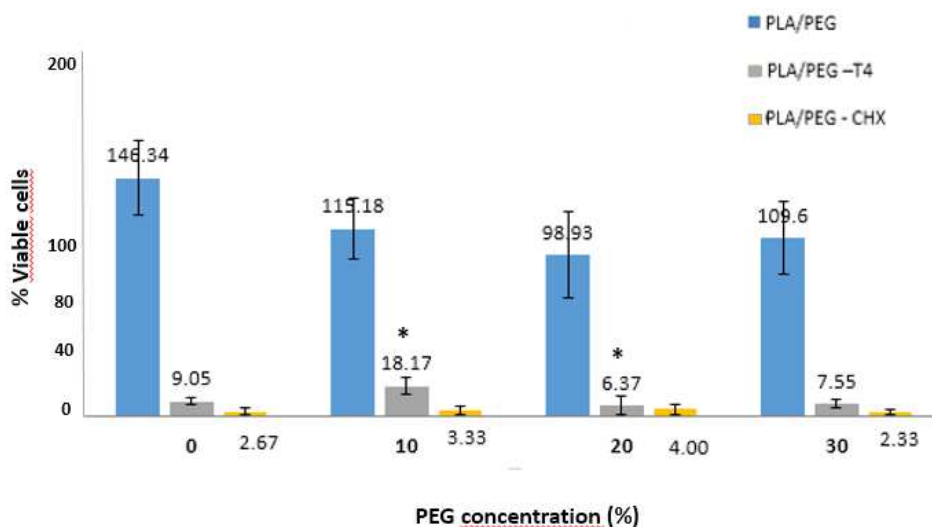


Figure 7: Percentage of viable cells of *A.a* biofilm on the surfaces of nanofibers with different concentrations of PEG

* Statistically significant difference between PEG concentration, while maintaining set drug group ($p < 0.05$) (ANOVA Tukey)

For the PLA / PEG -T4 there was only statistically significant difference between PEG 10 and PEG 20 ($p = 0.03$), thus, fibers with 20% PEG had higher antimicrobial efficacy when compared to other fibers of the same group. Therefore, increasing the PEG concentration was not decisive for antimicrobial efficacy of the fiber. Comparing PLA / PEG -T4 with the positive control (PLA / PEG -CHX), for all the fibers there was no statistically significant difference between the two groups ($p > 0.05$). Accordingly, the fibers of terpinen-4-ol for all PEG concentrations, showed similar antimicrobial activity to fibers containing chlorhexidine gluconate. In 2015, Bonan and colleagues^[21] tested the antimicrobial activity of PLA blends with varying concentrations of PVP (0%, 5%, 10% and 20%) incorporated with copaiba oil against planktonic strains of *S. aureus* and *E. coli* using the agar diffusion method. The authors observed that increasing the antimicrobial properties of the blend was directly related to the PVP amount, this effect was probably achieved because of the hydrophilic and hygroscopic nature of this polymer, allowing greater interaction with the culture medium and thus favoring drug release.

The PEG did not play a facilitating role for the release of active principles, since the antimicrobial properties of the blends showed no improvement with increasing percentage of this polymer, taking into consideration the other parameters were left unchanged, regardless of the nature also hydrophilic and hygroscopic of polyethylene glycol

(SANTOS, 2012). However, the molecular weight of PEG may have interfered in the process. PLA plasticized with PEG Recent studies have demonstrated the increase in plasticization efficiency with decreasing molecular weight of PEG. The low molecular weight plasticizer allows increased miscibility with PLA and greater efficiency in reducing T_g [32]. Thus, further studies can be made using PEG having molecular weight lower than studied in this work, in order to evaluate the influence of this polymer in drug release.

4 Conclusion

In conclusion, the production of nanofibers PLA / PEG incorporated with terpinen-4-ol and chlorhexidine using SBS is viable. The addition and PEG increased the diameter and the amorphicity of the fibers and altered thermal curve of PLA causing the fibers to initiate weight loss process in slightly lower temperatures than pure PLA fibers. The terpinen-4-ol in pure form had effective antimicrobial activity against A.a being capable of inhibiting bacterial growth at low concentrations. When incorporated into polymer nanofibers, it was also possible to observe the excellent antimicrobial activity of this agent showing results similar to those found in the fibers with chlorhexidine gluconate. The produced nanofibers demonstrated high potential for use against A.a, so it might be used as an adjunct to the treatment of aggressive periodontitis. Further studies should be performed varying PEG molecular weight and concentrations of terpinen-4-ol, as well as cytotoxicity tests.

References

- 1 American Academy of Periodontology. Parameters on periodontal maintenance. J Periodontol. 2000; 71: 847-883.
- 2 BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SBBrasil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Resultados Principais. Brasília, 2012
- 3 Raslan AS, Alencar CO, Cortelli JR, Cortelli C, Aquino DR. Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em associação a *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em pacientes periodontais. Rev Odontol UNESP, Araraquara. nov./dez., 2011; 40(6): 304-309
- 4 Hepp V, Tramontina VA, Bezeruska C, Vianna GP, Kim SH. Periodontite Agressiva: relato de casos e revisão da literatura. Rev. Clín. Pesq. Odontol. jan/abr., 2007;3(1):23-31.
- 5 Van Hoogmoed CG, Geertsema-doornbusch GI, Teughels W, Quirynen M, Busscher HJ, Van der Mei HC. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23: 43– 48

- 6 Buchanan RE, Gibbons NE, Cowan,ST, Holt JG, Liston J, Murray RGE, Niven CF, Ravin AW, Stanier RY. Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 8. ed. Baltimore: The Williams & Wilkings; 1974.p.1268.
- 7 Kaplan JB, Meyenhofer, MF, Fine, DA. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Bacteriol. 2003; 185: 1399-1404
- 8 Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat Rev Microbiol. 2008; 6:199-210.
- 9 Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas Medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Campinas. out., 2006; 7
- 10 Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Rev Clin Microbiol. Jan, 2006; 19(1): 50–62.
- 11 Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. Oral Microbiol. Immunol. 2003; 18: 389–392
- 12 Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. Inflamm res. 2000; 49(11): 619-26
- 13 Hammer, KA, Carson, CF, Riley, TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoter-pene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother. 2012; 56:909–915
- 14 Morie A, Garg T, Goyal AK, Rath G. Nanofibers as novel drug carrier - An overview. Artif Cells Nanomed Biotechnol, Jul., 2014; 14:1-9.
- 15 Ellison CJ, Phatak A, Giles, DW, Macosko, CW, Bates FS. Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. Polymer. 2007; 48(20):6180
- 16 Costa RGF, Oliveira JE, Paula GFP, Picciani PHS, Medeiros ES, Ribeiro C, Matosso LHC. Eletrofição de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. Polímeros. 2012; 22 (2): 170-177.
- 17 Sebe I, Petzke M, Zelkó, R, Szabó, B. Preparation and possibilities for pharmaceutical use of nano- and microfiber systems I. Acta Pharm Hung. 2013; 83(3):96-104.
- 18 Medeiros ES, Glenn GM, Klamczynski AP, Orts WJ, Mattoso LHC. Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. Journal of Applied Polymer Science. 2009;113: 2322–30.
- 19 Oliveira JE, Zucolotto V, Mattoso LH, Medeiros ES. Multi-Walled Carbon Nanotubes and Poly(lactic acid) Nanocomposite Fibrous Membranes Prepared by Solution Blow Spinning. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2012;12(3):2733-41.
- 20 Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011; 48(1):5-16

- 21 BONAN, RF, Bonan PRF, Batista AUD, Sampaio FC; Albuquerque AR, Moraes MCB, Mattoso LHC, Glenn GM, Medeiros ES, Oliveira JE. *In vitro* antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/ polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. *Materials Science & Engineering. C.* 2015; 48: 372-77.
- 22 Oliveira JE, Moraes EA, Costa RGF, Afonso AS, Mattoso LHC, Orts WJ, Medeiros ES. Nano and Submicrometric Fibers of Poly(D,L-Lactide) Obtained by Solution Blow Spinning: Process and Solution Variables. *Journal of Applied Polymer Science.* 2011;122(5):3396-3405.
- 23 Oliveira JE, Moraes EA, Marconcini JM, Mattoso LHC, Glenn GM, Medeiros ES. Properties of poly(lactic acid) and poly(ethylene oxide) solvent polymer mixtures and nanofibers made by solution blow spinning. *Journal of Applied Polymer Science.* 2013;129(6):3672-81.
- 24 Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *Journal of Dental Research.* 2001; 80:363-70.
- 25 Nakajo K, Takahashi M, Kikuchi M, Takada Y, Okuno O, Sasaki K, Takahashi N. Inhibitory effect of Ti-Ag alloy on artificial biofilm formation. *Dental Materials Journal.* 2014; 33(3): 389–393
- 26 Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2002; 97(7): 1027–31
- 27 Lei X. Blends of High Molecular Weight Poly(lactic acid) (PLA) with Copolymers of 2-bromo-3-hydroxypropionic Acid And Lactic Acid (PLB). *Electronic Thesis or Dissertation.* University of Akron, 2013. <https://etd.ohiolink.edu/>
- 28 Motta AC, Duek EAR. Síntese, Caracterização e Degradação “*in vitro*” do Poli(L-ácido láctico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2006;16(1):26-32.
- 29 Lucas EF, Soares BG, Monteiro E. Caracterização de polímeros – Determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-paper, 2001.
- 30 Wang BY, Fu SZ, Ni PY, Peng JR, Zheng L, Luo F, Liu H, Qian ZY. Electrospun polylactide/poly(ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* Feb., 2012;100(2):441-9.
- 31 Zhou D, Shao J, Li G, Sun J, Bian X, Chen X. Crystallization behavior of PEG/PLLA block copolymers: Effect of the different architectures and molecular weights. *Polymer.* 2015; 62: 70-76.
- 32 Kulinski Z, Piorkowska E. Crystallization, structure and properties of plasticized poly(L-lactide). *Polymer.* 2005; 46: 10290–10300
- 33 Fernandes JG, Correia DM, Botelho G, Padrão J, Dourado F, Ribeiro C, Méndez SL, Sencadas V. PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. *Polymer Testing.* 2014; 34: 64–71
- 34 Llorens E, Calderón S, Valle, LJD. Jordi Puiggalí a,b Polybiguanide (PHMB) loaded in PLA scaffolds displaying high hydrophobic, biocompatibility and antibacterial properties. *Materials Science and Engineering C.* 2015; 50:74–84
- 35 Garlotta D. A literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment.* 2001; 9(2):63-84.

- 36 Zhang G, Zhang J, Zhou X, Shen D. Miscibility and phase structure of binary blends of polylactide and poly(vinylpyrrolidone). *Journal of Applied Polymer Science*. 2003; 88(4):973-79.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A nanociência e a nanotecnologia são campos de crescente interesse, e pesquisas relacionadas a estas áreas retratam um novo patamar do conhecimento, com imensos impactos científicos e econômicos^[38]. Dessa forma as nanofibras poliméricas estão entre os materiais biotecnológicos mais vantajosos para o campo biomédico uma vez que, a natureza orgânica dos polímeros e dimensão submicrométrica das fibras criam um microambiente compatível e de interações similares, permitindo que a junção das propriedades biológicas/poliméricas seja feita de forma mais suave e natural^[3]. Entretanto,

bem pouco deste potencial tem sido explorado, e espera-se que novas pesquisas possam desenvolver nanofibras com comprovada aplicação clínica de forma a atender às vastas necessidades biomédicas.

O PLA está entre os polímeros mais utilizados para produção de nanofibras, todavia nanofibras de PLA puro apresentam a característica hidrofóbica derivada da propriedade do próprio polímero, entretanto a adição de polímeros hidrofílicos, a exemplo do PEG, permite modular esta hidrofobicidade e favorecer a liberação dos aditivos incorporados às nanofibras em meio aquoso ^[17,39]. Além disso, a análise por DSC das nanofibras PLA/PEG mostrou que este polímero de mistura foi capaz de reduzir a cristalinidade das fibras de PLA puro o que favoreceria ainda mais a liberação de fármacos incorporados às nanofibras, contudo, apesar do excelente resultado antimicrobiano apresentado pelas fibras de terpinen-4-ol, o aumento da concentração e PEG não foi fator determinante para a melhoria da efetividade antimicrobiana do material.

Diante do efeito antimicrobiano e anti-inflamatório apresentado e da potencialidade comprovada diante de patógenos bucais^[32], o terpinen-4-ol apresentou resultados promissores para constituição de sistemas de liberação controlada. Esse dado é válido pois terpinen-4-ol apresenta impacto mínimo sobre o desenvolvimento de resistência antimicrobiana, o que justifica ainda mais a importância de novos estudos utilizando este constituinte ^[36].

Assim, respondendo à proposição deste estudo, nanofibras poliméricas de PLA/PEG incorporadas com terpinen-4-ol foram eficazmente produzidas através da técnica de SBS, obtendo excelentes resultados antimicrobianos, “*in vitro*”, contra *A.a* e com grandes perspectivas para servirem como adjuvantes ao tratamento mecânico da doença periodontal, principalmente sobre a periodontite agressiva. Para isso, estudos complementares “*in vitro*”, tais como análise da liberação controlada, testes de citotoxicidade, e atividade antimicrobiana sobre biofilme multiespécie, devem ser feitos a fim de tornar essa nanoestrutura propícia para pesquisas “*in vivo*” e finalmente serem aplicadas na clínica odontológica.

3. CONCLUSÃO

Diante do exposto, pode-se concluir que a produção de nanofibras de PLA/PEG incorporadas com terpinen-4-ol e clorexidina usando SBS é possível. A adição de PEG aumentou o diâmetro bem como a amorficidade das fibras, porém desestabilizou termicamente o PLA fazendo com que as fibras iniciassem o processo de perda de massa em temperaturas levemente inferiores as da fibra de PLA puro. O terpinen-4-ol na forma pura apresentou efetiva atividade antimicrobiana frente a *A.a* sendo capaz de inibir o crescimento bacteriano em baixas concentrações. Quando incorporados às nanofibras poliméricas, também foi possível observar a excelente atividade antimicrobiana desse agente apresentando dados semelhantes aos encontrados nas fibras com clorexidina. Novos estudos podem ser feitos utilizando PEG com peso molecular e com concentrações variadas do terpinen-4-ol. Faz-se necessário a produção de um biofilme multiespécie que ultrapasse as 24h de cultivo para que seja observado o perfil de liberação das drogas dia-a-dia, e para que os testes se assemelhem ainda mais às condições clínicas, bem como testes de citotoxicidade.

REFERÊNCIAS*

- 1 Huczko A. Template-based synthesis of nanomaterials. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*. 2000; 70(4): 365-76.
- 2 Dimer FA, Friedrich RB, Silva RCRB, Guterres S. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Quim Nova*. 2013; 36(10):1520-26
- 3 Costa RGF, Oliveira JE, Paula GFP, Picciani PHS, Medeiros ES, Ribeiro C, Matosso LHC. Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. *Polímeros*. 2012; 22 (2): 170-177.
- 4 Lucas EF, Soares BG, Monteiro E. Caracterização de polímeros – Determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-paper, 2001.
- 5 Sebe I, Petzke M, Zelkó, R, Szabó, B. Preparation and possibilities for pharmaceutical use of nano- and microfiber systems I. *Acta Pharm Hung*. 2013; 83(3):96-104.
- 6 Morie A, Garg T, Goyal AK, Rath G. Nanofibers as novel drug carrier - An overview. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, Jul., 2014; 14:1-9.
- 7 Ellison CJ, Phatak A, Giles, DW, Macosko, CW, Bates FS. Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. *Polymer*. 2007; 48(20):6180
- 8 Medeiros ES, Glenn GM, Klamczynski AP, Orts WJ, Mattoso LHC. Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. *Journal of Applied Polymer Science*. 2009;113: 2322–30.
- 9 Paschoalin RT, Brich GS, Oliveira JE, Mattoso LHC. Efeito do polietilenoglicol nas nanofibras de poli(ácido láctico). In: Workshop Da Rede De Nanotecnologia Aplicada Ao Agronegócio Juiz de fora. 2014; p. 418-421
- 10 Souza MA, Sakamoto KY, Mattoso LHC. Release of the Diclofenac Sodium by Nanofibers of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Obtained from Electrospinning and Solution Blow Spinning. *Journal of Nanomaterials*. 2014; 2014
- 11 Oliveira JE, Zucolotto V, Mattoso LH, Medeiros ES. Multi-Walled Carbon Nanotubes and Poly(lactic acid) Nanocomposite Fibrous Membranes Prepared by Solution Blow Spinning. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2012;12(3):2733-41.
- 12 Bonan, RF, Bonan PRF, Batista AUD, Sampaio FC; Albuquerque AR, Moraes MCB, Mattoso IHC, Glenn GM, Medeiros ES, Oliveira JE. *In vitro* antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. *Materials Science & Engineering. C*. 2015; 48: 372-77.
- 13 Reise M, Wyrwa R, Muller U, Zylinki M, Volpel A, Schnabelrauch M, Berg A, Jandt K, Watts D. Release of metronidazole from electrospun poly(l-lactide-co-d/l-lactide) fibers for local periodontitis treatment. *Dental materials*. 2012; 28: 179-188
- 14 Cameron DJ, Shaver MP. Aliphatic polyester polymer stars: synthesis, properties and applications in biomedicine and nanotechnology. *Chem*.

- Soc. Rev. 2011; 40:1761-1776
- 15 Knight PT, Kirk JT, Anderson JM, Mather PT. In vivo kinetic degradation analysis and biocompatibility of aliphatic polyester polyurethanes. J Biomed Mater Res A. 2010; 94:333–43
 - 16 Liu TB, Burger C, Chu B. Nanofabrication in polymer matrices. Progress in Polymer Science. 2003; 28(1): 5-26
 - 17 Wang BY, Fu SZ, Ni PY, Peng JR, Zheng L, Luo F, Liu H, Qian ZY. Electrospun polylactide/poly(ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering. J Biomed Mater Res A. Feb., 2012;100(2):441-9.
 - 18 Severino, P; Santana, M.H.A; Malmonge, S.M; Souto, E.B. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativo. Polímeros. 2011; 21(5): 361-368
 - 19 BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SBBrazil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Resultados Principais. Brasília, 2012
 - 20 American Academy of Periodontology. Parameters on periodontal maintenance. J Periodontol. 2000; 71: 847-883.
 - 21 Raslan AS, Alencar CO, Cortelli JR, Cortelli C, Aquino DR. Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em associação a *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em pacientes periodontais. Rev Odontol UNESP, Araraquara. nov./dez., 2011; 40(6): 304-309
 - 22 Hepp V, Tramontina VA, Bezeruska C, Vianna GP, Kim SH. Periodontite Agressiva: relato de casos e revisão da literatura. Rev. Clín. Pesq. Odontol. jan/abr., 2007;3(1):23-31.
 - 23 Van Hoogmoed CG, Geertsema-doornbusch GI, Teughels W, Quirynen M, Busscher HJ, Van der Mei HC. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23: 43-48
 - 24 Buchanan RE, Gibbons NE, Cowan, ST, Holt JG, Liston J, Murray RGE, Niven CF, Ravin AW, Stanier RY. Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 8. ed. Baltimore: The Williams & Wilkins; 1974.p.1268.
 - 25 Kaplan JB, Meyenhofer, MF, Fine, DA. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Bacteriol. 2003; 185: 1399-1404
 - 26 Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat Rev Microbiol. 2008; 6:199-210.
 - 27 Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas Medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Campinas. out., 2006; 7
 - 28 International Organisation for Standardisation. 2004. ISO 4730:2004, oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil). International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland
 - 29 Carson CF, Hammer KA, Riley TV. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Rev Clin Microbiol. Jan, 2006; 19(1): 50–62.
 - 30 Oliveira JE, Moraes EA, Costa RGF, Afonso AS, Mattoso LHC, Orts WJ, Medeiros ES. Nano and Submicrometric Fibers of Poly(D,L-Lactide) Obtained by Solution Blow Spinning: Process and Solution Variables. Journal of Applied Polymer Science. 2011;122(5):3396-

- 3405.
- 31 Cox SD, Mann CM, Markham JL, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol.* 2000; 88(1): 170-5
 - 32 Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm res.* 2000; 49(11): 619-26
 - 33 Oliveira JE, Moraes EA, Costa RGF, Afonso AS, Mattoso LHC, Orts WJ, Medeiros ES. Nano and Submicrometric Fibers of Poly(D,L-Lactide) Obtained by Solution Blow Spinning: Process and Solution Variables. *Journal of Applied Polymer Science.* 2011;122(5):3396-3405.
 - 34 Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int. Dent. J.* 2002; 52:433–437
 - 35 Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem. Toxicol.* 2006; 44: 616–625
 - 36 Hammer, KA, Carson, CF, Riley, TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoter-pene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56:909–915
 - 37 Tao SL, Desai TA. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2003; 55(3): 315- 328
 - 38 Pohlmann AR, Beck, RC. A special issue on the developments in biomedical nanotechnology in Latin America.. *J. Biomed. Nanotechnol.* April, 2012; 8: 191-192
 - 39 Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Ramakrishna, Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds, *Tissue Eng.* 2005; 11: 101-109.

ANEXO

A – Normas para a Defesa da Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB

Formato alternativo.

- Capa
- Folha de rosto (primeira folha interna)
- Ficha catalográfica (verso da folha de rosto)
- Folha de aprovação
- Dedicatória (Opcional)
- Agradecimentos (Opcional)
- Epígrafe (Opcional)
- Resumo (com no máximo quinhentas palavras)
- Abstract (com no máximo quinhentas palavras)
- Lista de Abreviaturas e Siglas (Opcional)
- Sumário

1. Introdução (trata-se, como no formato tradicional, da parte inicial do texto, da formulação clara e simples do tema investigado, constando a delimitação do assunto tratado, sua justificativa e objetivos da pesquisa)

2. Capítulos (devem ser inseridas as cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem. Cada capítulo deve conter sua indicação, seguido do número (em arábico) correspondente. Ex.: Capítulo 1, Capítulo 2 e assim sucessivamente)

3. Discussão ou Considerações Gerais (de caráter opcional, esta parte poderá conter argumentos para estabelecer relações entre os artigos apresentados nos capítulos)

4. Conclusão

- Referências
- Anexo (Opcional)
- Apêndices (Opcional)

