



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS



MEMBRANAS BIOATIVAS PARA APLICAÇÃO EM CAVIDADE ORAL

Ieda Xavier Guedes

Campina Grande
Dezembro/2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

MEMBRANAS BIOATIVAS PARA APLICAÇÃO EM CAVIDADE ORAL

Ieda Xavier Guedes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientadora: Profa. Dra. Suédina Maria de Lima Silva

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande

Dezembro/2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFPG

G924m Guedes, Ieda Xavier.
Membranas bioativas para aplicação em cavidade oral / Ieda Xavier
Guedes. – Campina Grande, 2013.
61 f. : il. Color.

Tese (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

"Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Suédina Maria de Lima Silva, Prof. Dr. Marcus
Vinicius Lia Fook".

Referências.

1. Membranas Bioativas. 2. Cavidade Oral. 3. Óleo Essencial de
Melaleuca. I. Silva, Suédina Maria de Lima. II. Fook, Marcus Vinicius
Lia. III. Título.

CDU 667.473(043)

[...] Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito [...]. Não somos o que deveríamos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos.

(Martin Luther King)

Dedicatória

*Ao meu maior professor, orientador, meu guia. Autor da minha vida, que se faz presente em todos os momentos. Porque é em vós que procuro refúgio. Sois o meu senhor, fora de vós não há felicidade: **Jesus Cristo.***

*Ao meu pai e minha mãe, sempre prontos para me ajudar em todos os momentos. Agradeço pelo estímulo de dizerem para sempre ir em frente: **Francisco e Reny.***

*A vocês que têm me amado incondicionalmente, pela compreensão nos momentos que foram privados da minha companhia e pelo grande incentivo na realização desse trabalho, meus filhos: **João Vítor e Laura.***

*Aos melhores amigos de uma vida inteira, que compartilham comigo segredos, experiências, aspirações de valores: **meus irmãos e irmãs.***

*A minha cunhada que faz parte da minha vida, com incentivos e palavras sábias nos momentos de maiores dificuldades e pela nossa amizade, meu muito obrigada: **Bíla.***

*A amiga-irmã, pessoa muito especial em minha vida, agradeço pelo companheirismo, amizade, confidências e pela parceria nesta conquista do nosso mestrado, meu carinho: **Kaká.***


VITAE DA CANDIDATA

- Graduação em odontologia pela Fundação Universidade Regional do Nordeste (URNe) atual UEPB - 1988
- Especialista em saúde da família

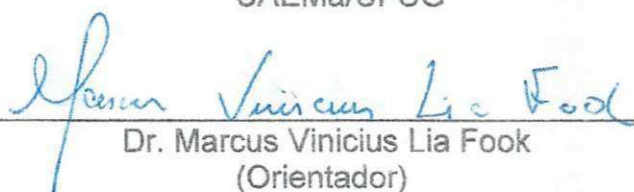
MEMBRANAS BIOATIVAS PARA APLICAÇÃO EM CAVIDADE ORAL.

IEDA XAVIER GUEDES


Dissertação Aprovada em 18/12/2013 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



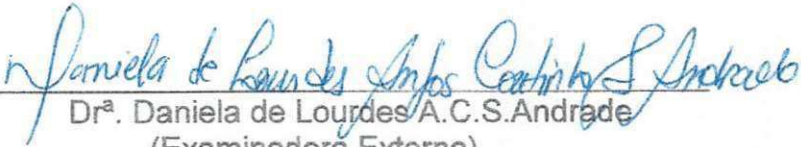
Dr^a. Suédina Maria de Lima Silva
(Orientadora)
UAEMa/UFCG



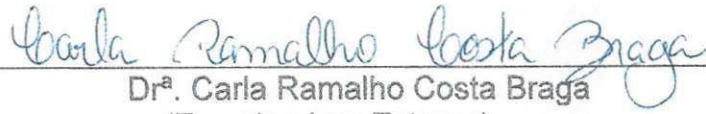
Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador)
UAEMa/UFCG



Dr. Ricardo Dias de Castro
(Examinador Externo)
PPGO/UFPB



Dr^a. Daniela de Lourdes A.C.S. Andrade
(Examinadora Externa)
PRODEP/UFCG



Dr^a. Carla Ramalho Costa Braga
(Examinadora Externa)
Pesquisadora da UFCG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar tantas pessoas boas em meu caminho, iluminando cada passo nessa caminhada. Obrigada senhor, pela realização deste sonho.

A profa. Dra. Suédina Maria de Lima Silva por suas orientações e paciência, assim como pelas palavras de incentivo e ajuda, além dos ensinamentos que levarei para vida toda.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook por acreditar nesta parceria. Apesar do pouco contato, quero que saiba que te admiro por seu caráter, humildade e simplicidade;

À pesquisadora Dra. Carla Ramalho Costa Braga por proporcionar oportunidades e momentos incríveis de crescimento profissional, pelos bons momentos de convivência, pela confiança, carinho. Muito obrigada!

À pesquisadora Dra. Daniela de Lourdes Anjos Coutinho Simões Andrade, que doou seu tempo, em ajudar na construção desse trabalho, obrigada.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro do departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba- UFPB, pela grande contribuição no preparo e realização dos testes microbiológicos.

À querida e amável Meyves, mãe da amiga Gildênia, pela moradia aconchegante (lá em João Pessoa) indispensável para a realização deste trabalho.

Aos técnicos do CERTBIO, pessoas maravilhosas, que trabalharam comigo e que foram de fundamental importância para a realização da parte experimental desta Pesquisa.

Às alunas da iniciação científica Ríllen, Nadiê, Fabiana pela grande contribuição também na parte experimental desta pesquisa, meu muito obrigada.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

MEMBRANAS BIOATIVAS PARA APLICAÇÃO EM CAVIDADE ORAL

RESUMO

Neste estudo, membranas bioativas foram preparadas por meio do encapsulamento do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) em quitosana com o objetivo de aplicação em cavidade oral. Foram empregados dois métodos para a realização do encapsulamento: incorporação direta do TTO à quitosana dissolvida em ácido acético e incorporação da emulsão de TTO- agente tensoativo (polisorbato - Tween 20) à solução de quitosana. Seis teores do óleo essencial TTO foram avaliados e a encapsulação foi evidenciada por espectroscopia no infravermelho (FTIR), microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Visando avaliar o impacto da incorporação do TTO na matriz de quitosana, as propriedades mecânicas das membranas bioativas foram avaliadas e relacionadas com sua microestrutura. A atividade antimicrobiana *in vitro* das membranas contra *Candida albicans*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mutans* também foi estudada. De acordo com os resultados obtidos, fica evidenciado que a quitosana é uma boa matriz polimérica para encapsulação do óleo essencial TTO e que uma dispersão homogênea do TTO na mesma foi possível com a incorporação da emulsão de TTO-agente tensoativo Tween 20. A resistência mecânica das membranas foi reduzida com a incorporação do TTO devido a presença de descontinuidades na matriz. A atividade antimicrobiana da quitosana foi melhorada pela encapsulação do óleo essencial TTO exibindo um forte efeito de inibição sobre o crescimento do *S. oralis*.

Palavras-chave: Membranas bioativas, cavidade oral, óleo essencial de Melaleuca.

BIOACTIVE MEMBRANES FOR USE IN ORAL CAVITY

ABSTRACT

In this study, bioactive membranes for application in the oral cavity were prepared by incorporating different concentrations of tea tree essential oil (TTO) into chitosan. Two methods for performing encapsulation were employed: direct incorporation of the TTO into chitosan dissolved in acetic acid and incorporation of TTO emulsion - surfactant agent (polysorbate Tween 20) into solution of chitosan. The encapsulation was evaluated by infrared spectroscopy (FTIR), optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM). In order to evaluate the impact of incorporating the TTO into chitosan matrix, the mechanical properties of the bioactive membranes were evaluated and related to its microstructure. The in vitro antimicrobial activity of membranes against *Candida albicans*, *streptococcus oralis* and *streptococcus mutans* was also studied. According to the results, it is shown that chitosan is a good polymeric matrix for encapsulation of essential oil TTO and a homogeneous dispersion of the table TTO was possible with the incorporation of the surfactant emulsion TTO agent Tween 20. The mechanical strength of the membranes was reduced with the incorporation of TTO due to the presence of discontinuities in the matrix. The antimicrobial activity of chitosan was improved by encapsulating the essential oil TTO showing a strong inhibitory effect on the growth of *S. oralis*.

Key-works: bioactive membranes, oral cavity, Melaleuca essential oil

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
SUMÁRIO.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Biofilme.....	5
3.2 Produtos Naturais na Prevenção das Doenças Bucais.....	8
3.2.1 Óleos Essenciais.....	12
3.2.1.1 Óleo Essencial de <i>Melaleuca Alternifolia</i>	14
3.3 Quitosana.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Materiais.....	26
4.2 Métodos.....	28
4.2.1 Preparação das Membranas de Quitosana.....	28
4.2.2 Preparação das Membranas de Quitosana Contendo Óleo de <i>Melaleuca Alternifolia</i> – TTO na Ausência de Agente Tensoativo.....	28
4.2.3 Preparação das Membranas de Quitosana Contendo Óleo de <i>Melaleuca Alternifolia</i> – TTO na Presença do Agente Tensoativo Tween 20.....	29
4.3 Caracterização.....	30
4.3.1 Análise Microscópica da Superfície das Membranas.....	30

4.3.2	Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)	31
4.3.3	Propriedades Mecânicas.....	32
4.3.4	Análise Microbiológica <i>in vitro</i>	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Microscopia Ótica (MO)	34
5.2	Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	37
5.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	39
5.4	Propriedade Mecânica – Tração	41
5.5	Atividade Antimicrobiana	43
6	CONCLUSÕES	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 - Composição química do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> – TTO usado neste estudo.	27
Tabela 4.2 - Composição e codificação das membranas de quitosana com TTO na ausência de agente tensoativo.	29
Tabela 4.3 - Composição e codificação das membranas de quitosana com TTO na presença do agente tensoativo Tween 20.	30
Tabela 5.1 - Dados das propriedades mecânicas em tração das membranas de quitosana preparadas sem e com óleo essencial TTO na ausência e na presença de agente tensoativo-Tween 20 e não neutralizadas.	41
Tabela 5.2 - Medidas dos halos de inibição de crescimento microbiano e fúngico produzido pelas membranas de quitosana e quitosana/óleo essencial TTO.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura química da clorexidina.....	8
Figura 3.2 - Foto ilustrativa (a) da árvore do chá e (b) do óleo essencial TTO.....	15
Figura 3.3 - Estrutura química (a) do terpien-4-ol e (b) 1,8 cineol.....	16
Figura 3.4 - Etapas da obtenção da quitosana.....	20
Figura 3.5 - Estrutura química da quitosana.....	21
Figura 3.6 - Esquema ilustrativo da solubilidade da quitosana. Em pH< 6 os grupos amino da quitosana são protonados conferindo a quitosana um comportamento policatiônico. Em pH> 6 os grupos amino da quitosana são desprotonados e reativos.....	23
Figura 4.1 - Estruturas químicas dos constituintes predominantes do óleo essencial de melaleuca alternifolia - TTO: α -terpineno (a); γ -terpineno (b) e terpinen-4-ol (c). 27	27
Figura 4.2 - Microscópio Óptico Hirox, modelo KH-13000.....	31
Figura 4.3 - Microscópio eletrônico de varredura Shimadzu modelo SSY-550.....	31
Figura 4.4 - Espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer.....	32
Figura 5.1 - Imagens obtidas por microscopia ótica das membranas de quitosana sem TTO e neutralizadas (MQN).....	34
Figura 5.2 - Imagens obtidas por microscopia ótica das membranas de quitosana com 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% de TTO, na ausência de agente tensoativo (MQTTO3N; MQTTO9N; MQTTO12N; MQTTO15N; MQTTO22,5N e MQTTO30N) e neutralizadas.....	35
Figura 5.3 - Imagens obtidas por microscopia ótica das membranas de quitosana com 3%; 9%; 12%; 15% e 30% de TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 e neutralizadas (MQTTO3TN; MQTTO9TN; MQTTO12TN; MQTTO15TN e MQTTO30TN).....	36
Figura 5.4 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das membranas de quitosana com 3%; 9%; 15% e 30% de TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 e neutralizadas (MQTTO3TN; MQTTO9TN; MQTTO15TN e MQTTO30TN) com ampliação de 240X (a) e da membrana MQTTO30TN com ampliação de 3000X.....	38
Figura 5.5 - Espectros na região do infravermelho do óleo essencial TTO e das membranas de quitosana, preparadas sem TTO (MQN) e com teores variados de TTO, sem agente tensoativo (a) e com o agente tensoativo Tween 20 (b) e neutralizadas.....	39
Figura 5.6 - Dados das propriedades mecânicas em tração das membranas de quitosana preparadas sem e com óleo essencial TTO na ausência e na presença de agente tensoativo-Tween 20 e não neutralizadas.....	42

Figura 5.7 - Atividade antimicrobiana e antifúngica das membranas de quitosana com 30% em volume de óleo essencial TTO, não neutralizadas e neutralizadas (MQTTO30T e MQTTO30TN) sobre *C. albicans*, *S. mutans* e *S. oralis*..... 45

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia óptica

TTO - *Melaleuca alternifolia*

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral é um habitat microbiano muito complexo formado por mais de 500 espécies bacterianas que compõem a microbiota bucal e esta apresenta uma relação direta com a formação do biofilme dentário - BD (placa bacteriana) desencadeando as principais patologias odontológicas que são reconhecidas como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (Mussi, 2011). Entretanto, fatores como a dieta e a remoção mecânica regular do biofilme, pode variar o tipo de microbiota predominante na cavidade bucal. Todavia, quando a remoção mecânica da placa é deficiente e a ingestão de carboidratos em geral é frequente, ocorre uma seleção para certos organismos patogênicos e o biofilme se torna mais virulento, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro (cáries), quanto de tecido mole (doenças periodontais).

O controle do biofilme bacteriano é de grande importância tanto para o tratamento como para prevenção dessas patologias. Muitos métodos e produtos têm sido investigados e muitas formulações antimicrobianas foram propostas. A clorexidina tem sido considerada padrão ouro no controle do BD, mas devido a seus efeitos colaterais que se apresentam como aumento de resistência a microrganismos, manchamento dentário, diminuição na quantidade do fluxo salivar, maior capacidade no acúmulo de cálculo, como também alterações no paladar, seu uso passou a ser limitado nessas manifestações orais (Filogônio, 2009).

Pesquisas recentes estão sendo conduzidas na busca por alternativas para controlar e prevenir as afecções que ocorrem na cavidade bucal do ser humano, o que se constitui em reduzir o número de microrganismos de forma eficiente (Kloster, 2011). Neste contexto, a utilização de compostos naturais, como óleos essenciais (OEs), substâncias naturais produzidas por espécies vegetais, parece ser uma opção interessante contra patógenos orais devido aos seus princípios ativos, que conferem características antimicrobianas contra microrganismos bucais.

Os óleos essenciais são utilizados em formulações de produtos terapêuticos, como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios e antissépticos (Filogônio, 2009). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, também denominado óleo da árvore do chá - Tea Tree Oil (TTO), por apresentar atividade terapêutica em várias especialidades começou a ser utilizado também em odontologia. Este óleo tem apresentado boa

ação antimicrobiana *in vitro* tomando-se uma alternativa à clorexidina devido apresentar poucos efeitos colaterais (Oliveira *et al.*, 2011).

O TTO tem sido utilizado com sucesso no tratamento de candidose oral em pacientes com AIDS (Vazquez e Zawawi, 2002) e outras infecções fúngicas orais em pacientes que sofrem de câncer avançado (Bagg *et al.*, 2006). Embora o TTO seja considerado relativamente seguro, ele é altamente volátil e sofre reações de degradação em presença de oxigênio gerando produtos alergizantes fortes e/ou produtos com menor atividade biológica que os compostos originais (Pedro *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011). Portanto, mais estudos devem ser realizados a fim de obter o melhor tipo e meios de aplicação, visando aproveitar melhor seus benefícios potenciais como um agente antimicrobiano e antifúngico (Juliano, Demurtas e Piu, 2008).

Uma estratégia interessante para reduzir as doses de TTO requeridas enquanto mantêm a atividade antimicrobiana pode ser a incorporação/encapsulação deste em filmes bioativos que podem fixar e reter o composto na superfície do produto, aumentando assim sua eficiência. Com a encapsulação, feita predominantemente com polímeros biodegradáveis, os custos de aplicação dos óleos essenciais e/ou outros problemas tais como o intenso aroma e potencial tóxico podem ser minimizados (Sánchez-González *et al.*, 2010).

A quitosana, um polissacarídeo catiônico resultante da desacetilação alcalina da quitina (classificada como o segundo composto orgânico mais abundante da natureza, ficando atrás apenas da celulose), tem sido amplamente utilizada na área odontológica por possuir uma forte ação na redução do biofilme dentário, assim como comprovada ação antimicrobiana *in vitro* contra vários patógenos da cavidade oral, diretamente implicados na formação do biofilme e da periodontite, tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, o *Streptococcus mutans* e a *Porphyromonas gingivalis*. Além de ser atóxico, este biopolímero possui uma excelente capacidade de formação de película e, portanto, pode ser usado na encapsulação do TTO (Tavaria *et al.*, 2013).

Apenas um número reduzido de trabalhos que revelam o uso da quitosana como meio de encapsulação de óleos essenciais tem sido publicado. Juliano *et al.* (2008) demonstraram que a quitosana pode ter uma aplicação médica potencial no

desenvolvimento de novas formulações contendo óleo essencial TTO, mostrando, um efeito antimicrobiano sinérgico, sob condições *in vitro*, contra *Candida albicans*. Zivanovic e colaboradores (2005) comprovaram que a associação de óleos essenciais como orégano, manjeriço e anis em matrizes de quitosana têm reforçado ainda mais as propriedades antimicrobianas da quitosana. O mesmo resultado também foi comprovado por Sánchez-González *et al.* (2010) com a obtenção de membranas de quitosana associada ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO). No entanto, foi comprovado que essa associação promoveu descontinuidades estruturais que favoreceram a obtenção de membranas com propriedades mecânicas inferiores as obtidas pelas membranas de quitosana sem TTO.

Partindo do pressuposto que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) e a quitosana possuem características antimicrobianas desejáveis para aplicação em cavidade oral e que apenas um número reduzido de trabalhos tem sido publicado, mais estudos devem ser conduzidos, para desenvolver novos sistemas baseados nesta associação, a fim de obter o melhor tipo e meios de aplicação, visando aproveitar melhor seus benefícios potenciais como um agente antimicrobiano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar uma membrana bioativa de quitosana contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) para aplicação na cavidade oral.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do teor de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) na morfologia, propriedades mecânicas e antimicrobianas das membranas de quitosana;
- Avaliar a influência do agente tensoativo/emulsificante - polisorbato (tween 20) na preparação e propriedades das membranas bioativas de quitosana;
- Avaliar a influência da neutralização das membranas bioativas nas propriedades das mesmas;
- Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana e antifúngica das membranas bioativas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biofilme

O biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e aderida a uma superfície inerte ou viva. As bactérias presentes nos biofilmes apresentam alterações fenotípicas e genotípicas que diferem de células planctônicas, as quais podem ser estratégias de sobrevivência dos microrganismos às condições adversas do ambiente. Representa a mais evidente forma de crescimento microbiano na natureza, sendo determinante para o desenvolvimento das infecções clínicas (O'toole, Kaplan e Kolter, 2000). Biofilmes podem colonizar implantes como válvulas cardíacas, próteses dentárias, cateteres e implantes médicos (Costerton, Stewart e Greenberg, 1999).

Neste contexto, o biofilme dental bacteriano (placa bacteriana) é uma película incolor, aderente, não mineralizada e composta por diversas espécies de bactérias organizadas e sustentada por uma matriz de proteínas salivares, leucócitos, células descamadas, polissacarídeos e restos alimentares que se forma sobre as superfícies dos dentes e tecidos gengivais em diferentes sítios da cavidade oral (Marsh e Bradshaw, 1997).

Os colonizadores primários encontrando condições favoráveis aderem-se à superfície por reações físico-químicas, multiplicando-se sobre o substrato, formando micro-colônias (Rasteiro, 2011).

O pH, níveis de nutrientes, oxigênio, forças iônicas e temperatura são características que podem ter um papel importante na adesão microbiana à superfície (O'toole, Kaplan e Kolter, 2000).

Dentre as bactérias que são responsáveis pela formação de biofilmes podemos citar: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, entre outras (Antunes et al., 2006; Abdollahi, Rezaei e Farzi, 2012).

Apesar de muitos microrganismos do biofilme dental estarem associados à cárie algumas bactérias são muito mais ativas que outras. O *Streptococcus mutans* é um dos microrganismos orais mais relacionados ao desenvolvimento da cárie.

1

Acredita-se que *S. mutans* esteja envolvido com o desenvolvimento inicial da mesma por ser capaz de colonizar os dentes, produzir polissacarídeos intra e extracelulares, ser altamente acidogênico e acidúrico, além de metabolizar várias glicoproteínas salivares. O *Streptococcus mutans* tem sido considerado a principal espécie microbiana envolvida na formação do biofilme dental. Estes não são encontrados na cavidade oral antes da erupção dos dentes e estão associados às bacteremias, endocardites, abscessos e infecções (Kloster, 2011). Os glucanos produzidos pelos *S. mutans* facilitam a aderência e o acúmulo de microrganismos, estabelecendo uma matriz extra celular resistentes às forças mecânicas normais de remoção presentes no hospedeiro, proporcionando alguma proteção ao sistema imune (Canettieri *et al.*, 2010).

As mutacinas são importantes na composição do BD, contribuindo para a estabilidade e colonização das espécies cariogênicas, na manutenção e organização de nichos e na atividade antimicrobiana altamente complexa. Isto talvez explique por que os *Streptococcus mutans* uma vez estabelecidos, são difíceis de serem eliminados da microbiota oral (Chattoraj *et al.*, 2010).

Os *Streptococcus oralis* e *Streptococcus salivarius* também são comumente encontrados nesse biofilme e contribuem para tornar o meio mais adequado para colonização do *S. mutans*, porém, não atuam diretamente na desmineralização do esmalte dentário, haja vista não serem acidúricos nem acidogênicos (Alves *et al.*, 2009). A adesão do *S. Mutans* se relaciona a sua patogenicidade e, portanto, métodos mecânicos e químicos, bem como a utilização de agentes antimicrobianos têm sido estudados (Freires *et al.*, 2010).

As espécies fúngicas do gênero *Candida* coexistem com a comunidade bacteriana da microbiota oral normal, podendo ser isolada em até 60% das cavidades orais. Apresentam fatores de virulência envolvidos na formação do biofilme, sendo que os fatores ambientais tais como: saliva, fluido gengival, pH e nutrientes favorecem a agregação e coadesão entre a mesma e os microrganismos que também participam das principais patologias orais como cárie e doenças periodontais por representarem um grupo de microrganismos oportunistas, podendo causar infecções diagnosticadas como candidoses. Das espécies envolvidas nas candidoses a *Candida albicans* é a mais prevalente. Têm sido elucidados

mecanismos moleculares envolvidos com a virulência de espécies desta na tentativa de elaboração de formulações que apresentem maior especificidade, como também menos efeitos colaterais (Castro e Lima, 2011; Almeida, 2012).

Infecções respiratórias adquiridas em ambientes hospitalares podem estar associadas ao BD devido aos pacientes apresentarem uma higiene bucal deficiente durante a sua internação. Este biofilme pode abrigar diversos microrganismos pulmonares facilitando o desenvolvimento de pneumonias. Uma preocupação é com a pneumonia nasocomial principalmente em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva - UTI, sugerindo-se a revisão de procedimentos específicos no combate destes patógenos na cavidade oral (Oliveira *et al.*, 2007).

Outra preocupação na área odontológica é com pacientes que usam aparelhos ortodônticos fixos. O uso destes aparelhos gera o acúmulo maior de restos alimentares e um maior crescimento bacteriano sobre a superfície dental (Juiz, Alves e Barros, 2010).

Conseguir controlar o acúmulo do BD não é tarefa fácil. Os habituais métodos para remoção mecânica requerem tempo, motivação e destreza manual (Marinho e Araújo, 2007). O uso complementar de agentes químicos poderia ser uma forma de superar esta deficiência. O veículo ideal deveria apresentar boa substantividade, lenta liberação evitando que seu efeito seja neutralizado pela ação do fluxo salivar rapidamente (Ditterich *et al.*, 2007).

Dentre os agentes químicos, o gluconato de clorexidina, tem se destacado pela sua eficácia comprovada na remoção química do biofilme cariogênico ou periodontopatogênico (Lawrence *et al.*, 2008).

A clorexidina, cuja estrutura química está apresentada na Figura 3.1 - Estrutura química da clorexidina.

, é aceita como padrão-ouro para o tratamento de doenças bucais. Geralmente é mais eficaz contra microrganismos Gram-positivos, incluindo os *Streptococos* do grupo *mutans*, que são particularmente sensíveis à clorexidina. Porém, a frequente utilização de clorexidina não é aconselhável devido aos efeitos colaterais locais, como a descoloração de dentes, restaurações e próteses, ulceração da mucosa oral e alteração da percepção gustativa, conforme já descrito (Oliveira *et al.*, 2011).

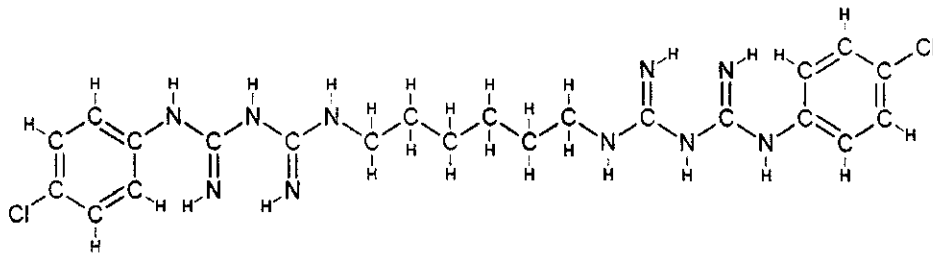


Figura 3.1 - Estrutura química da clorexidina.
Fonte: Pubchem (2008).

Devido à sua natureza catiônica, ela adsorve-se à compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película dental e macromoléculas presentes na mucosa oral. O seu mecanismo de ação antibacteriano é explicado devido à molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio (Freires *et al.*, 2010).

Apesar de sua excelente atividade, seu uso é limitado em cerca de 7 dias devido ao desenvolvimento de importantes efeitos adversos, como o aparecimento de manchas sobre o esmalte, língua e restaurações dentárias; alteração no paladar devido à interação com as papilas gustativas, e um gosto fortemente amargo, o qual é muito difícil de ser mascarado em preparações farmacêuticas (Menegon, 2009).

Diante das limitações desse agente, outros agentes antimicrobianos, incluindo os de origem natural, vêm sendo investigados.

3.2 Produtos Naturais na Prevenção das Doenças Bucais

Os métodos para prevenção e controle das doenças bucais estão orientados, direta ou indiretamente à modificação da atividade do biofilme dental bacteriano para estados compatíveis com a saúde. Portanto, o estabelecimento de medidas que se interponham a qualquer das propriedades fisiológicas de bactérias

potencialmente cariogênicas podem resultar na prevenção das doenças da cavidade oral e na manutenção da saúde dental e do periodonto (Valdevite, 2011).

A diversidade de utilização das plantas resulta do conhecimento empírico da ação dos vegetais nas doenças por muitos e diferentes grupos étnicos. Por muitos séculos as plantas medicinais eram a única forma de utilização como agentes terapêuticos. Hoje esse conhecimento continua evoluindo e permitindo que se alcance novas aplicações destes recursos (Rasteiro, 2011).

Muitas plantas aromáticas fazem parte do patrimônio etnofarmacológico de comunidades desde as mais remotas às mais desenvolvidas. A validação científica do potencial medicinal de remédios tradicionais preparados com plantas aromáticas tem conferido a algumas e a algum produto obtido delas, o estatuto de fármaco e o reconhecimento pelos sistemas de medicina alopática. Muitas delas, particularmente seus óleos essenciais servem a indústria do medicamento por possuírem atividades biológicas de valor terapêutico (Cavaleiro, 2007).

As plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento da saúde. Desde muito tempo são utilizadas como terapia alternativa e tem sido um recurso ao alcance do ser humano com virtudes que passaram de geração a geração. Até nas sociedades mais industrializadas, o uso de vegetais *in natura* pela população tem se intensificado. Além da ação terapêutica comprovada de muitas espécies, estas representam parte integrante da cultura de um povo, sendo um saber utilizado e difundido pelas populações ao longo do tempo (Freires *et al.*, 2010). A estimativa de utilização pelas comunidades locais é cerca de 10% com finalidade terapêutica, mas apenas 1% são reconhecidas cientificamente (Khan *et al.*, 2009).

Pelas suas propriedades químicas possuem grande potencial antimicrobiano. Esta propriedade tem gerado um grande interesse, levando à investigações de compostos ativos, visando o desenvolvimento de produtos que além da atividade farmacológica, apresente biocompatibilidade, baixa toxicidade e preço acessível (Figueiredo, 2009).

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento de produtos naturais, haja vista ter a maior diversidade vegetal do mundo (Brasil, 2006). O uso de plantas medicinais é uma realidade constante devido ao acesso facilitado à

população. O conhecimento empírico somado ao conhecimento científico permitirá de forma segura o uso destes agentes. Em maio de 2006 o Ministério da Saúde aprovou a Política de Práticas Integrativas e Complementares (CNPIC) no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, (Brasil,2006).

O Ministério da Saúde lançou em 2007 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) visando garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso de forma racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Os objetivos são: implantar a utilização de plantas medicinais e fitoterápicos e os serviços que se relacionam à fitoterapia no SUS, desenvolvendo instrumentos para pesquisas, desenvolvimentos de tecnologias e inovações na área, promover e reconhecer essas práticas tradicionais de uso de plantas medicinais como também estabelecer uma política intersetorial visando o desenvolvimento socioeconômico na área de plantas medicinais e fitoterápicos (Brasil,2007)

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos tem em suas diretrizes o fortalecimento da agricultura familiar, inserindo este segmento na cadeia produtivas das plantas medicinais e fitoterápicos. A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao (RESINUS), lista 71 espécies de plantas que podem gerar fitoterápicos destinados ao Sistema Único de Saúde (SUS) encontra-se no Anexo 1 (Brasil,2009).

Apoiado no conhecimento popular, no crescimento da fitoterapia dentro de programas preventivos e curativos, e diante da limitação do uso de antimicrobianos sintéticos, evidenciado pelo aumento da resistência pelos microrganismos e efeitos colaterais indesejáveis de alguns antibióticos, novos agentes são propostos buscando a diminuição de tais eventos. Assim, estudos sobre a avaliação de diferentes extratos de plantas no controle do biofilme dental têm sido conduzidos (Oliveira *et al.*, 2007; Pedro *et al.*, 2009; Castro, 2010).

Os produtos de origem vegetal assumem importante papel dentro das pesquisas em odontologia. Muitos extratos vegetais com conhecidas atividades antimicrobianas têm sido utilizados e estas características são atribuídas aos compostos sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas (Carson, Hammer e Riley, 2006).

Os compostos secundários produzidos pelas plantas podem ser separados em vários grupos de acordo com as estruturas químicas. Dentre eles, os óleos essenciais apresentam atividades farmacológicas como: antissépticas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, dentre outras usadas na medicina popular e na fabricação de medicamentos (Andrade *et al.*, 2012).

Esses compostos, em baixas concentrações, exercem inibição sobre o crescimento de bactérias *gram* positivas e *gram* negativas como também sobre microbactérias, fungos e leveduras o que confirma a importância que esses produtos apresentam, criando perspectivas para a produção de novos produtos farmacêuticos (Filogônio, 2009).

O grupo de compostos com atividade biológica extraídos das plantas incluem terpenanóides e óleos essenciais, alcalóides, lecitinas e peptídeos, polifenóis, quinonas, flavonóides, taninos e cumarinas. A ausência de efeitos colaterais atrelado ao baixo custo da produção é um ponto de grande importância para o seu desenvolvimento (Valdevite, 2011).

Na última década alguns trabalhos foram desenvolvidos no sentido de verificar a eficácia de produtos naturais no controle do biofilme dental. A maioria desses estudos se refere ao controle do biofilme dental bacteriano, como o gel e extrato de *Punica granatum* (romã), *L. sidoides* (alecrim e pimenta) (Botelho *et al.*, 2009) e extrato de *Rheedia brasiliensis* (bacuri) (Almeida *et al.*, 2008).

Em revisão bibliográfica realizada por Oliveira (2007) sobre plantas medicinais indicadas para afecções odontológicas, foram encontradas 132 espécies, distribuídas em 52 Famílias Botânicas citadas como úteis no tratamento de afecções odontológicas. As espécies mais citadas de acordo com a bibliografia consultada foram *Punica granatum* L. (10 citações), *Althaea officinalis* L. (8 citações), *Salvia officinalis* L. (8 citações), *Calendula officinalis* L. (8 citações), *Malva sylvestris* L. (7 citações), *Plantago major* L. (6 citações).

Os óleos essenciais são requeridos pelos seus efeitos sobre o sistema digestivo e aparelho respiratório, pela atividade analgésica e anti-inflamatória ou por efeitos inespecíficos, particularmente sobre a pele e tecidos expostos (Cavaleiro, 2007).

O uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos apresenta duas características principais: *i*) origem natural, o que significa mais segurança para o meio ambiente *ii*) baixo risco de desenvolver resistência bacteriana, pois os óleos essenciais são misturas de vários compostos que aparentemente apresenta atividade antimicrobiana diferenciada dificultando a adaptação de microrganismos (Peralta, 2012).

Sendo assim, os óleos essenciais podem ser pesquisados como alternativa terapêutica para reverter à resistência aos antimicrobianos, para controle de patógenos causadores de infecções, bem como no controle de biofilmes bacterianos.

3.2.1 Óleos Essenciais

O termo óleo essencial foi definido no século XVI por Paracelso, médico e alquimista suíço, para quem o componente efetivo de uma droga era a "quinta essência" (Machado e Junior, 2011). Na legislação brasileira, a definição de óleo essencial está contida na resolução RDC n. 2, de 15 de janeiro de 2007- ANVISA, constando que óleos essenciais - OEs são "produtos voláteis, de origem vegetal, obtidos por processos físicos" (Mussi, 2011).

Os óleos essenciais são caracterizados como misturas complexas de compostos de baixa massa molar, podendo conter mais de 60 componentes e caracterizam-se pela presença de dois ou três compostos majoritários que, em geral, determinam a sua propriedade biológica (Machado e Junior, 2011). Uma importante característica destes, responsável pela ação antimicrobiana, são os componentes hidrofóbicos que permitem a quebra de lipídios da membrana celular bacteriana tornando-a mais permeável e desintegrando suas estruturas (Sikkema, De Bont e Poolman, 1994).

A principal característica dos OEs é a volatilidade, diferindo assim de óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas originadas de sementes. Outra característica é o aroma intenso e agradável, sendo por isso chamados de essências (Rasteiro, 2011).

Fisicamente, se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Não se misturam à água, sendo alguns altamente voláteis, lipofílicos, geralmente odoríferos e podem ser extraídos de várias partes da planta como flores, folhas, galhos, cascas, frutos, raízes ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais e de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor (direto, indireto e coação), CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras (Simões, 2003; Machado e Junior, 2011; Veras, 2011). Em função do modo de extração, normalmente por destilação a vapor, eles contêm uma variedade de moléculas voláteis como terpenos e terpenóides, compostos aromáticos derivados do fenol e componentes alifáticos, respectivamente (Bakkali *et al.*, 2008).

A atividade biológica de óleos essenciais, extratos de plantas, tem sido alvo de intensa investigação científica. Plantas aromáticas são amplamente utilizadas no combate a diversos tipos de infecções pela medicina popular, por apresentarem amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e leveduras com inibição comprovada (Rasteiro, 2011). Os óleos essenciais trazem benefícios clínicos de grande significado sendo recomendado o seu uso associado à limpeza mecânica. Bochechos contendo óleos essenciais em enxaguatórios antiplaca e antigengivite obtiveram efeito antimicrobiano contra periodontopatógenos subgingivais justificando que o controle do biofilme supra gengival influencia na progressão da periodontite (Fine *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais também reduzem o número de bactérias nas bacteremias que resultam de procedimentos dentários, como também na saúde gengival em torno de implantes pós cirurgias periodontais (Seymour, 2003).

Os óleos essenciais não necessitam de equipamentos especiais para obtenção e são de baixo custo (Filogônio, 2009). Quimicamente derivam dos fenilpropanóides e terpanóides, este último encontrado em maior frequência. Os terpanóides são seus constituintes preponderantes sendo os mais frequentes os monoterpenos, cerca de 90% (Gnatta, 2012). A caracterização química dos componentes dos óleos essenciais é realizada normalmente através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e uma grande variação na composição dos óleos essenciais tem sido observada dependendo da origem da

planta, do estágio de desenvolvimento e da parte usada para destilação do óleo (Simões, 2003; Probst, 2012). No entanto, mesmo que óleos diferentes apresentem compostos iguais qualitativamente, diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (Trombetta *et al.*, 2005).

Os efeitos positivos dos óleos estão associados aos seus princípios ativos e compostos secundários. (Gnatta, 2012).

Em nível celular não se conhece ao certo o mecanismo de ação dos óleos essenciais. Acredita-se que a maioria deles exerça efeito antimicrobiano atuando na estrutura da parede celular do microrganismo patogênico, desnaturando e coagulando proteínas. Esta atuação se daria na alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática devido ao caráter lipofílico dos óleos essenciais, o que interromperia os processos vitais das células como translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas. Essas reações resultariam na perda do controle quimiosmótico da célula afetada, ocasionando a morte do patógeno (Dorman, 1998).

Produtos anticárie que contêm óleos essenciais também alcançaram bons níveis de potencial antimicrobiano, justificando assim a atração por antimicrobianos de origem natural.

3.2.1.1 Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia*

O gênero *Melaleuca*, pertencente à família botânica *Myrtaceae* de plantas arbustivas ou arbóreas, é utilizado há muitos anos pelos aborígenes no tratamento de suas doenças. Das espécies do gênero se destaca a *Melaleuca alternifolia*, tendo em sua composição uma menor quantidade de componentes com potencial alergênico como o *cineol* e o *d-limoneno*. O seu óleo essencial pode ser extraído das folhas, ramos, caules. Tem sua composição regulamentada pela ISO 4730 (ISO 4730; 1996) (Bertoluzzi, 2008).

Inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e ilhas do Oceano Índico. É comumente conhecida na Austrália como "árvore do chá", florescendo principalmente em áreas de pântano, próximas a rios. Atinge uma altura de 5 a 8 metros, exibindo folhas que são longas, estreitas, pontiagudas e alternadas. As

flores são sésseis, têm espinhos e apresentam coloração que vai do branco ao amarelo e arroxeadado (Mussi, 2011). Seu principal produto é o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, também denominado óleo da árvore do chá - *Tea Tree Oil* (TTO). É extraído da planta por hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor. A rentabilidade da produção depende tanto do rendimento da folha quanto da concentração do óleo no momento da colheita. Nas épocas mais frias sua concentração diminui quando comparada as épocas mais quentes (Oliveira *et al.*, 2011).

O responsável pelo nome “*Tea Tree*” foi o capitão James Cook, que ao desembarcar na baía de Botany na Austrália, em 1770, observou os aborígenes fazer chá medicinal com folhas verde-escuro e contar histórias de uma lagoa mágica na qual as folhas caíam e a tribo se banhava ali para manter à saúde. A Austrália é o seu maior fornecedor e onde se concentra os principais produtores dominando o mercado e tecnologia para a produção (Lemos *et al.*, 2008).

O primeiro a detectar suas propriedades antimicrobianas do TTO foi Penfold em 1929. O mesmo não mancha; tem boas propriedades de penetração tecidual e é compatível com sabões, sendo considerado um solvente poderoso. É ativo contra um grande número de bactérias *gram*-positivas/negativas e fungos. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra os patógenos mais comuns situa-se entre 0,5 a 1% (Simões *et al.*, 2002). Uma foto ilustrativa da árvore do chá e do óleo essencial TTO está apresentada na Figura 3.2.



(a)



(b)



Figura 3.2 - Foto ilustrativa (a) da árvore do chá e (b) do óleo essencial TTO.

Fonte: <http://www.classificados-brasil.com> e <http://en.wikipedia.org>

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* - TTO apresenta densidade relativa de 0,885 a 0,906 sendo apenas moderadamente solúvel em água e miscível em solventes apolares. Deve ser armazenado no escuro preferentemente a baixas temperaturas, sem umidade e com pouca quantidade de ar, pois sua estabilidade pode ser influenciada por fatores como: temperatura de armazenamento, presença de calor, exposição ao ar e umidade. Para obtenção de soluções aquosas do óleo adicionam-se agentes emulsificantes como o *Tween 80* (polietileno glicol) e o *Tween 20* (polisorbato), não interferindo nas atividades antimicrobianas (Carson, Hammer e Riley, 2006; Oliveira *et al.*, 2011). Quimicamente o óleo de *Melaleuca alternifolia* - TTO é uma mistura complexa de diferentes compostos principalmente monoterpenos e seus álcoois correspondentes, onde os principais compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana são terpien-4-ol e 1,8 cineol. Existem diversas variedades de quimiotipos de *Melaleuca alternifolia* e cada um produz óleo com uma composição química diferente. Seis quimiotipos foram descritos: terpien-4-ol quimiotipo 1, terpinoleno quimiotipo 2, e quatro tipos de 1,8 cineol (Hammer *et al.*, 2003). As estruturas químicas do terpien-4-ol e do 1,8 cineol estão apresentadas na Figura 3.3.



Figura 3.3 - Estrutura química (a) do terpien-4-ol e (b) 1,8 cineol.
Fonte: Oliveira *et al.*, 2011.

O comitê Australiano estabeleceu que o óleo deve conter quantidades de cineol abaixo de 15% e de terpien-4-ol acima de 30%. A indicação desses valores máximos e mínimos são indicados porque o cineol é conhecido como irritante de pele e o terpien-4-ol é apontado como o de maior atividade antimicrobiana (Simões

et al., 2002). O Terpinen-4-ol, em quantidade de 30 a 40% da composição, detém a atividade antimicrobiana, pois induz perda da membrana, interferindo na integridade e fisiologia bacteriana (Oliveira *et al.*, 2011).

Os mecanismos de ação antimicrobiana foram parcialmente elucidados, sendo que o óleo essencial - TTO causa perda da integridade da membrana, devido à saída de íons e inibição da respiração. Essa propriedade é considerada de grande interesse para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas desde que o uso de aditivos naturais ganhou importância como tendência na substituição de conservantes sintéticos artificiais (Machado e Junior, 2011).

Na literatura científica o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* - TTO tem apresentado atividade antimicrobiana, dentre elas antibacterianas, antifúngica e antiviral, além do efeito anti-inflamatório. Estes estudos discorrem sobre várias aplicações do TTO por via cutânea e *in vitro* principalmente no que diz respeito ao tratamento de infecções. Casos de reações adversas também são relatados após usos do TTO. Foi relatado o caso de um paciente com dermatite de contato decorrente da exposição ao TTO e exacerbada pela ingestão do mesmo. Uma revisão de 41 casos de alergia ao TTO em concentração de 5% a 10% evidenciou que os casos são mais comuns nas concentrações maiores e desencorajou a aplicação em concentrações acima desses valores (Gnatta, 2012).

Grosso *et al.* (2002) conduziram um estudo com base na comparação da atividade antimicrobiana do alho, do óleo essencial - TTO e da clorexidina contra microrganismos orais. O estudo revelou que o alho e a clorexidina mostraram boa atividade antimicrobiana contra *S. mutans* do que sobre outros microrganismos orais e que TTO demonstrou atividade antimicrobiana significativa contra *S. mutans* e também a outros microrganismos orais. Portanto, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* - TTO e alho foram relatados como agentes eficazes para serem utilizados como alternativa à clorexidina. Ainda segundo Oliveira *et al.*, (2011) o TTO pode ser considerado como opção para o tratamento das doenças periodontais. Ao contrário da clorexidina, esse óleo não mancha os dentes e a ação antimicrobiana é somada ao efeito anti-inflamatório.

Hammer *et al.* (2003) realizaram um estudo para determinar a ação antibacteriana do TTO. Um total de 162 isolados bacterianos do *Actinomyces*

gêneros, *Branhamella*, *Capnocytophaga*, *Clostridium*, *Eikenella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Stomatococcus*, *Streptococcus* e *Veillonella* foram testados quanto sua suscetibilidade ao óleo de TTO. Todos os isolados foram inibidos e mortos por concentrações de 2% sendo que a maioria foi inibida ou morta em concentrações inferiores a 2%. Isolados com as menores Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) eram do gênero *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Veillonella* e isolados com as maiores CIMs e CBMs eram do gênero *Streptococcus*, *Fusobacterium* e *Lactobacillus*.

Conforme reportado por Ramamurthy e Lakshmi (2011), enxaguatório contendo TTO reduz infecções e inchaço das gengivas. Portanto, é amplamente utilizado em doenças periodontais e ajuda a controlar o mau hálito, o sangramento gengival e a formação biofilme dental bacteriano por ser eficaz na redução do número *S. mutans* ou outras bactérias no meio bucal. O óleo também é aplicado em úlceras orais para ajudar na cura, atuando na redução do crescimento de bactérias na boca.

Hammer *et al.*(2003) avaliaram a susceptibilidade *in vitro* do óleo TTO, verificando que após 30 segundos e após 5 minutos não foi detectado microrganismos viáveis. Isto sugere que o TTO poderia ser utilizado em produtos de manutenção na saúde bucal.

Com relação à atividade antifúngica do óleo de *Melaleuca* - TTO, a literatura tem demonstrado a eficácia do TTO sobre variadas espécies de fungos, dentre eles a *Candida albicans*. Um estudo realizado com leveduras mostrou que *Candida albicans* tratadas com TTO em concentrações entre 0,25 a 1% apresentaram alterações da permeabilidade e fluidez da membrana (Machado e Junior, 2011).

Atualmente, o óleo essencial – TTO é empregado como agente antimicrobiano ou preventivo em escala farmacêutica ou cosmética e a indicação vai desde a utilização em queimaduras, picadas de insetos, gel para espinhas, cremes vaginais, cremes para a pele até dentifrícios (Cox, Mann e Markham, 2001). Em virtude da boa ação antimicrobiana e do amplo emprego em diversas especialidades médicas passou a ser utilizado também em odontologia com sucesso no tratamento da candidose oral, pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e

de outras infecções fúngicas orais em pacientes com câncer em estado avançado. O óleo essencial de *Melaleuca* - TTO, mesmo em concentrações relativamente baixas, tem apresentado eficácia antimicrobiana contra diversos microrganismos causadores de lesões pulpares, demonstrando que essa substância possui potencial ação terapêutica em pacientes com patologias endodônticas (Oliveira *et al.*, 2011).

No entanto, os óleos essenciais são substâncias altamente voláteis que sofre reações de degradação em presença de oxigênio e geram produtos alergizantes fortes e/ou produtos com atividade menos biológica que os compostos originais (Pedro *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011). Então, para manter a estabilidade, a atividade biológica e reduzir as doses requeridas de TTO sua associação com matrizes poliméricas no desenvolvimento de membranas bioativas tem se tomado uma alternativa atraente por permitir fixar e reter o composto sobre a superfície da membrana, aumentando assim sua eficácia. Dentre as matrizes poliméricas utilizadas na associação com óleos essenciais destaca-se a quitosana por ser um polissacarídeo catiônico com capacidade de formação de filmes excelente, além de possuir grande potencial como material de reservatório ou matriz devido a sua atividade antimicrobiana e não toxicidade (Hosseini *et al.*, 2013).

3.3 Quitosana

A descoberta da quitosana (termo derivado da palavra grega *Khitón*, que significa carapaça, casca ou caixa de revestimento) data do século 19, quando em 1859 Rouget avaliou formas de desacetilação do polímero natural quitina, composto por unidades N-acetil-D-glicosamina ligadas através de (1,4)- β - λ ligações glicosídica, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos sendo classificada como o segundo composto orgânico mais abundante da natureza, ficando atrás apenas da celulose. Este material foi nomeado como quitosana em 1894 por Hoppe-Seyler e sua estrutura química finalmente resolvida em 1950 (Braga,2012).

A quitosana caracterizada como uma fibra branca ou com tendência a um tom castanho suave é um polissacarídeo amino, biodegradável, atóxica e derivada do processo de desacetilação da quitina que pode realizar-se segundo duas metodologias distintas: homogênea e heterogênea. A desacetilação homogênea começa

primeiramente por um pré-tratamento de inchamento e a eventual dissolução da quitina, em hidróxido de sódio, a frio ($\approx 0^{\circ}\text{C}$) mediante a utilização de uma relação de 1:10 (m/m) da quitina e de hidróxido de sódio. A desacetilação ocorre depois à temperatura ambiente durante longos períodos de tempo. Permitindo-se assim que a reação não ocorra em determinados sítios da cadeia e que o ataque aos grupos amida seja mais uniforme. A desacetilação termo alcalina heterogênea ocorre de preferência na região amorfa da quitina e processa-se com a quitina sólida dispersa em meio alcalino (solução alcalina de hidróxido de sódio ou potássio) sob temperaturas elevadas de 90°C a 120°C e por um período de 2 a 5 horas sob atmosfera de nitrogênio e o resíduo é lavado para eliminação do excesso alcalino e seco a 110°C por 24 h (Dash *et al.*, 2011). Nos dias atuais é este o tratamento mais usado em escala industrial.

Uma representação esquemática das etapas de obtenção da quitosana está mostrada na Figura 3.4.

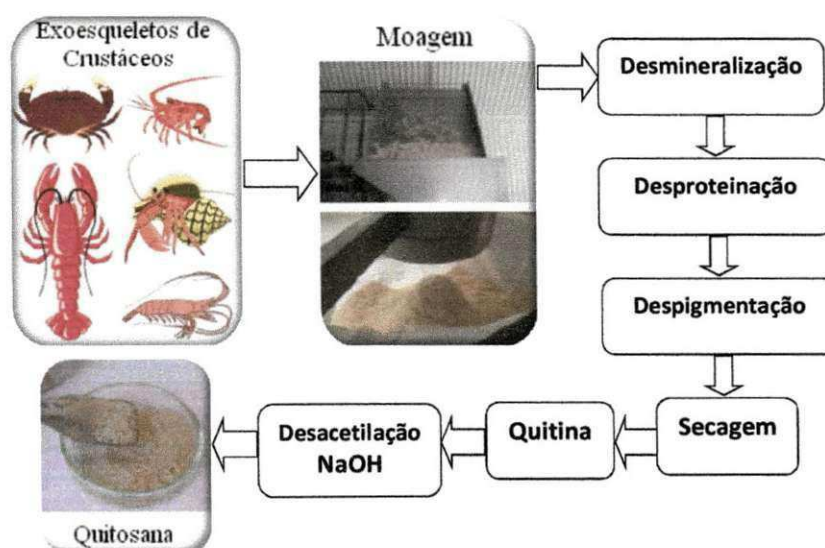


Figura 3.4 - Etapas da obtenção da quitosana.
Fonte: Melo (2010).

Durante o curso da desacetilação alcalina, as ligações N-acetil-D-glicosamina presentes no C-2 (carbono dois) do anel glicopiranosídico do polímero natural quitina são rompidas, formando ligações D-glicosamina que contém um grupo amino livre. Desta forma, a quitosana não pode ser considerada uma molécula uniforme e sim um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, dos quais os que apresentam grau de

desacetilação acima de 50%, comumente de 70 a 90%, podem ser considerados como quitosana. Portanto, a quitosana é um copolímero constituído por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, ligadas através de (1,4)- β -ligações glicosídicas, mas com predominância das unidades D-glicosamina - Figura 3.5 (Laranjeira e Fávere, 2009).

O baixo custo de produção, a abundância de matéria-prima (fonte renovável) e o aproveitamento dos subprodutos da pesca de crustáceos tornam o processo de produção de quitosana ecologicamente interessante e economicamente viável. No entanto, um rígido controle das condições reacionais (tempo, temperatura, concentração do banho alcalino e condições atmosféricas empregadas na reação de desacetilação) é essencial em escala industrial para que se obtenha um polímero com pureza, massa molar e com grau de desacetilação na faixa desejada (Silva *et al.*, 2012).

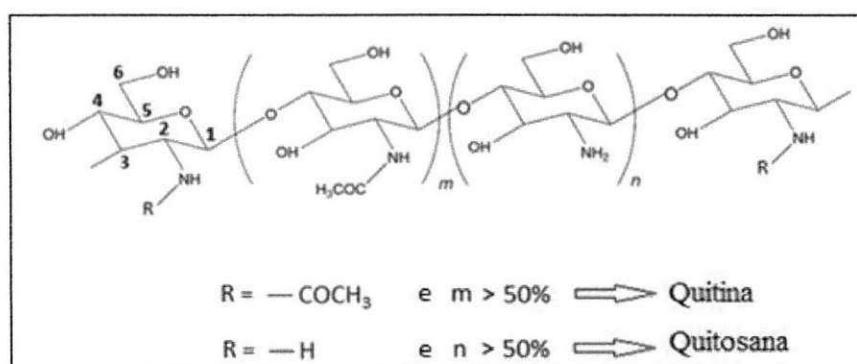


Figura 3.5 - Estrutura química da quitosana.
 Fonte: Silva et al. (2012).

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia tem sido muito investigada, e muitos polimorfismos são mencionados na literatura. Cristais de quitosana são obtidos usando-se a desacetilação completa da quitina de baixa massa molar. Na difração de raios X da quitosana é observada uma célula unitária ortorrômbica com parâmetros $a=0,807\text{nm}$, $b=0,844\text{nm}$, $c=1,034\text{nm}$ e $\beta = 90^\circ$ (Valdevite, 2011).

A quitosana é comumente caracterizada pela sua massa molar (MW) e grau de desacetilação (GD). A quitosana disponível comercialmente tem grau de desacetilação maior que 85% e massa molar compreendida entre 100 e 1000 kDa. É

geralmente aceito que a quitosana de baixa massa molar apresenta MW menor que 50 kDa, a de médio massa molar MW de 50 a 150 kDa e a de alta massa molar MW maior que 150 kDa (Nguyen, Winnik e Buschmann, 2009; Tavarina *et al.*, 2013). A quitosana de grau médico deve apresentar um grau de desacetilação maior ou igual a 90%.

O grau de desacetilação da quitosana pode ser determinado por diversas técnicas como titulação potenciométrica, espectroscopia de infravermelho, cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência (Spin-Neto *et al.*, 2008). No entanto, a técnica mais utilizada para determinação do grau de acetilação em amostras sólida, tem sido a espectroscopia de infravermelho (Santos, 2004; De Souza Costa Jr e Mansur, 2008). Esta técnica é adequada para análises de rotina uma vez que é rápida e de baixo custo.

Propriedades químicas e físicas da quitosana, tais como solubilidade, cristalinidade, viscosidade, biodegradabilidade e conseqüentemente suas aplicações são afetadas pelo grau de desacetilação (Dash *et al.*, 2011). A atividade antimicrobiana da quitosana sobre os microrganismos também sofre influência da massa molar e do grau de desacetilação (Vieira, 2005). Quanto menor a massa molar e menor o grau de acetilação mais eficiente será a atividade antimicrobiana, reduzindo o crescimento e a multiplicação dos microrganismos (Holanda, 2011). Em estudo realizado por Liu *et al.* (2001) que avaliaram a ação antibacteriana, *in vitro*, da quitosana e da carboximetil quitosana com diferentes massas molares sobre a *Escherichia coli*, concluíram que quanto maior a massa molar e o grau de desacetilação maior a ação bactericida, devido ao aumento da concentração de grupos NH₂ protonados, que podem se ligar á superfície bacteriana negativa das células bacterianas.

Teixeira (2002) avaliou *in vitro* a ação antimicrobiana da quitosana com diferentes massas molares e graus de desacetilação sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus sanguinis* organizados em biofilme. A quitosana de alta massa molar e grau de desacetilação e baixa viscosidade apresentou efeito bactericida sobre bactérias orais organizadas em biofilme de forma similar à clorexidina. No entanto, a quitosana com baixa massa molar e grau de desacetilação não foi capaz de inibir nenhuma cepa bacteriana testada.

Dentre os modelos propostos para explicar a ação antimicrobiana da quitosana o mais aceitável é que a interação das cargas positivas das moléculas de quitosana com as cargas negativas da membrana microbiana é mediada pelas forças eletrostáticas entre o grupo amina protonado NH^{3+} e os resíduos carregados negativamente na superfície da (Tavaria *et al.*, 2013).

Quanto à solubilidade o aumento do grau de desacetilação assegura a presença de grupos amino livres, os quais em meio ácido, com valores de pH menor que 6, podem ser facilmente protonados (NH^{3+}) gerando uma carga positiva por unidade D-glicosamina e tornando a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em água (Krajewska, 2004; Lavorgna *et al.*, 2010). Por outro lado, o aumento do pH para valores maiores que seis favorece a desprotonação dos grupos amino e o polímero perde a carga tornando-se insolúvel.

A quitosana é facilmente solúvel em soluções ácidas diluídas, $\text{pH} < 6$, devido a quaternização do grupo amina que tem um valor de pK_a igual a 6,3 tornando a quitosana um polieletrólito catiônico ou seja, com uma alta densidade de carga (Dash *et al.*, 2011). O que justifica sua apreciável interação com biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucléicos, ácidos graxos e silicatos em camadas, montmorilonitas e bentonitas sódicas, por apresentarem cargas negativas em suas superfícies. A Figura 3.6 apresenta um esquema ilustrativo da solubilidade da quitosana.

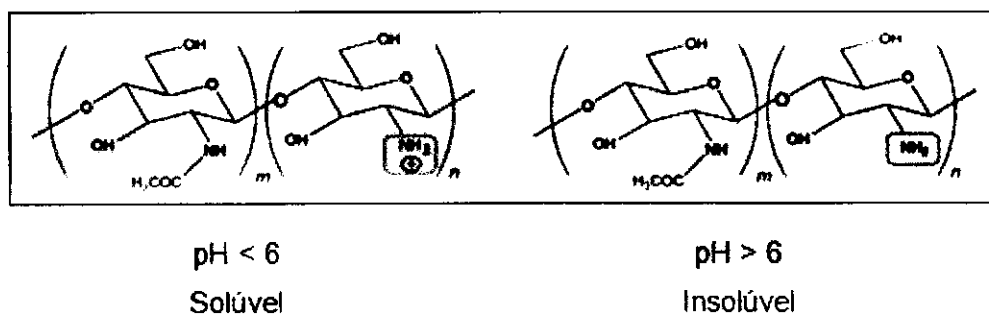


Figura 3.6 - Esquema ilustrativo da solubilidade da quitosana. Em $\text{pH} < 6$ os grupos amino da quitosana são protonados conferindo a quitosana um comportamento policatiónico. Em $\text{pH} > 6$ os grupos amino da quitosana são desprotonados e reativos.
Fonte: Silva *et al.*, 2011.

Um estudo *in vitro* mostrou que soluções de quitosana mais diluídas apresentaram maiores halos de inibição em comparação com as mais concentradas para *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*, concluindo que quanto maior a viscosidade menor a atividade antimicrobiana (Vieira, 2005).

As aplicações da quitosana na área médica devem-se essencialmente às suas propriedades de biocompatibilidade, capacidade bactericida e quando em contato com células humanas não provoca reações adversas; é uma substância segura para o organismo humano. A quitosana pode ser degradada por enzimas amplamente encontradas no corpo humano (presente em tecidos, órgãos e fluidos corporais) e os produtos da degradação enzimática são os oligômeros de n-acetil-D-glicosamina, que são totalmente absorvidos pelo organismo. Por outro lado, a quitosana é reconhecida por células tumorais, e conseqüentemente, pode trazer fármacos ao seu alvo seletivamente devido a sua decomposição enzimática e por apresentar produtos de degradação não tóxicos (Costa, 2008; Holanda, 2011).

Na área odontológica, as aplicações da quitosana e seus derivados resultam de suas propriedades bioadesivas, viscosas, permeabilizantes, antimicrobianas e anticariogênicas que promovem a liberação prolongada de medicamentos na cavidade oral, mostrando serem eficazes na redução do biofilme dentário e no tratamento de doenças periodonticas e candidoses orais (Decker *et al.*, 2005).

Desde a última década muitos estudos têm sido desenvolvidos com a quitosana na área odontológica que comprovam sua eficácia e ampliam suas possibilidades de aplicação; alguns deles estão listados abaixo.

Şenel *et al.* (2000) observaram que a incorporação de 0,1% de clorexidina a géis de quitosana com uma concentração de 2% é eficaz no tratamento de candidoses da cavidade oral.

Decker *et al.* (2005) mostraram que o uso de revestimentos de quitosana para a veiculação local de antimicrobianos, como a clorexidina, na mucosa oral, canais radiculares ou bolsas periodontais, são atóxicos para o hospedeiro.

Sano *et al.* (2003) concluíram que um colutório à base de quitosana foi eficaz na redução da placa e na contagem de *S. mutans* da saliva num espaço de 14 dias.

Pignatello *et al.* (2009) avaliaram hidrogéis a base de quitosana para aplicação bucal de anestésicos no tratamento de aftas; estes mostraram-se eficazes promovendo a liberação local e o aumento da biodisponibilidade do componente ativo, além de reduzir o número de aplicações.

Uysal *et al.* (2011) com o objetivo de prevenir a desmineralização ao redor dos *brackets* ortodônticos realizaram um estudo de comparação de um dentífrico a base de quitosana com os dentífricos fluoretados de uso comum e observaram que os dentífricos à base de quitosana reduzem a descalcificação do esmalte à volta dos braquetes dentários em pacientes em reabilitação e com fraca higiene oral.

De acordo com Luca, (2011) dependendo da concentração e do tempo de contato com o dente, a quitosana interfere no processo de desmineralização do esmalte dentário pela inibição da perda de fósforo e age como uma barreira contra a penetração de ácidos na estrutura dentária.

Apesar de já existir várias aplicações para a quitosana em produtos orais, outros usos poderão incluir a sua associação com derivados de polifenóis a fim de constituir um benefício adicional (Tavaria *et al.*, 2013). Portanto, a tecnologia de encapsulamento de óleos essenciais em matriz de quitosana pode ser uma alternativa para garantir a proteção dos óleos essenciais evitando reações de oxidação e aumentando a sua biodisponibilidade.

Estudos realizados por Popa e colaboradores (2000) avaliaram a interação entre a quitosana e polifenóis em casca de madeira e concluíram que a quitosana e os polifenóis formam um complexo estável em um meio alcalino demonstrando que a associação deste polímero com óleos essenciais são adequados para melhorar as propriedades antimicrobianas da quitosana.

Zivanovic *et al.* (2005) comprovaram que a associação de óleos essenciais como orégano, manjerição e anis em matrizes de quitosana tem reforçado ainda mais as propriedades antimicrobianas da quitosana. O mesmo resultado também foi comprovado por Sánchez-González *et al.* (2010) com a obtenção de membranas de quitosana associada ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. No entanto, foi comprovado que essa associação promoveu descontinuidades estruturais que favoreceram a obtenção de membranas com propriedades mecânicas inferiores as obtidas pelas membranas de quitosana sem óleo de *Melaleuca alternifolia*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os materiais utilizados, os procedimentos experimentais para preparação das membranas bioativas e as técnicas de caracterização utilizadas tais como: microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia na região do infravermelho, propriedades mecânicas em tração e atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro*.

4.1 Materiais

A Quitosana ($C_{12}H_{24}N_2O_9$) fornecida na forma de pó pela Polymar, com grau de desacetilação de 86,7% e densidade de $0,2 \text{ g/cm}^3$, conforme informação do fabricante foi utilizada como matriz polimérica na preparação das membranas.

O ácido acético glacial P.A de 99,9%, foi usado como solvente para a quitosana. Este reagente foi fornecido pela Vetec e usado como recebido.

O polisorbato (tween 20) fornecido por Mix das essências foi utilizado como agente tensoativo para aumentar a estabilidade cinética da emulsão obtida pela mistura do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* - TTO com a solução de quitosana.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* - TTO foi fornecido pela Destilaria Bauru LTDA e conforme ficha técnica do produto, apresenta as seguintes propriedades organolépticas: líquido límpido, sem cor e odor característico picante e as seguintes propriedades físico-química: densidade de $0,895 \text{ g/mL}$ a 20°C ; índice de refração de 1,478; índice de acidez é de no máximo 3 mg KOH/g ; insolúvel em água e solúvel em etanol 80%. A composição química está apresentada na Tabela 4.1 e as estruturas químicas dos constituintes predominantes estão mostradas na Figura 4.1.

As cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC10557) e *Candida albicans* (ATCC289065) foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz.

Tabela 4.1 - Composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* – TTO usado neste estudo.

Constituinte	%
α -thujeno	0,8
α -pineno	2,3
β -pineno	0,7
Mirceno	0,7
α -terpineno	9,2
ρ -cimeno	2,4
Limoneno	1,3
1,8-cineol	1,9
γ -terpineno	19,8
Terpinoleno	3,4
terpinen-4-ol	32,1
α -terpineol	2,3
β -gurjuneno	2,1
Viridiflorino	2,0
Cis-calameno	2,2

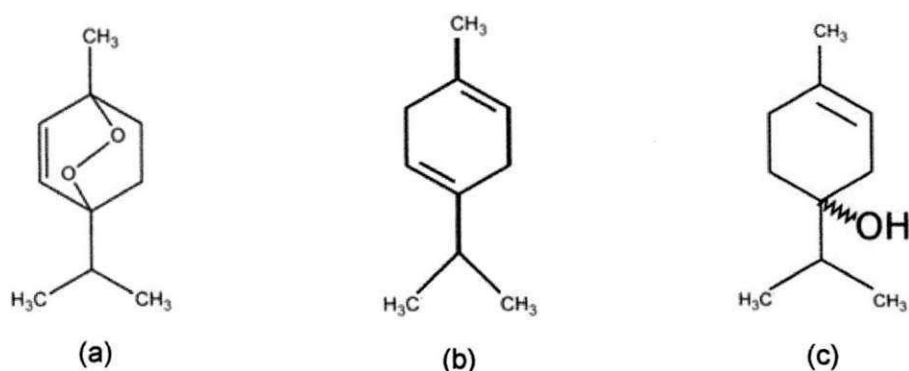


Figura 4.1 - Estruturas químicas dos constituintes predominantes do óleo essencial de melaleuca alternifolia - TTO: α -terpineno (a); γ -terpineno (b) e terpinen-4-ol (c).
Fonte: Oliveira *et al.*(2011)

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das Membranas de Quitosana

A metodologia empregada na preparação das membranas de quitosana foi realizada de acordo com estudo realizado por Braga (2012). Em resumo, a solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 1 g de quitosana em 100 mL de uma solução a 1% (v/v) de ácido acético, sob agitação magnética a 45 °C por 2 h. Em seguida, a solução polimérica foi filtrada a vácuo, duas vezes, para remover o material insolúvel. O filtrado foi vertido em placas de Petri e acondicionado em estufa a 50 °C por 18 h para evaporação do solvente e formação da membrana. Após a secagem, as membranas foram cobertas com uma solução de hidróxido de sódio a 1M por meia hora a fim de assegurar sua completa neutralização. Em seguida, foram lavadas, com água destilada, até pH neutro e secas à temperatura ambiente.

4.2.2 Preparação das Membranas de Quitosana Contendo Óleo de *Melaleuca Alternifolia* – TTO na Ausência de Agente Tensoativo

A metodologia empregada na preparação das membranas de quitosana contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* – TTO, na ausência de agente tensoativo, foi adaptada de estudo realizados por Sánchez-González *et al.* (2010). A partir da solução de quitosana, obtida como descrito no item 4.2.1., foi incorporado o óleo – TTO nas concentrações de 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% em relação à massa de quitosana, quantidades especificadas na Tabela 4.2, diretamente à solução de quitosana que foi mantida sob agitação mecânica, agitador mecânico Fisatom 713D, a 600 rpm por 15 min. A escolha das concentrações listadas foi feita visando avaliar o teor máximo que poderia ser incorporado à matriz de quitosana.

Em seguida as soluções de quitosana contendo o óleo essencial - TTO foram vertidas em placas de Petri e secas em estufa a 50°C por 18 h. Após a secagem, as membranas foram cobertas com uma solução de hidróxido de sódio a 1M por meia hora a fim de assegurar sua completa neutralização. Em seguida, foram lavadas, com água destilada, até pH neutro, e secas à temperatura ambiente.

As codificações empregadas para as membranas de quitosana contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* – TTO (membrana de quitosana/TTO) estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Composição e codificação das membranas de quitosana com TTO na ausência de agente tensoativo.

Teor de TTO em mL (%)	Codificação
0 (0)	MQN
0,10 (3)	MQTTO3N
0,30 (9)	MQTTO9N
0,40 (12)	MQTTO12N
0,50 (15)	MQTTO15N
0,75 (22,5)	MQTTO22,5N
1,00 (30)	MQTTO30N

4.2.3 Preparação das Membranas de Quitosana Contendo Óleo de *Melaleuca alternifolia* – TTO na Presença do Agente Tensoativo Tween 20

A metodologia empregada na preparação das membranas de quitosana contendo o óleo – TTO, na presença do agente tensoativo Tween 20, foi semelhante à descrita no item 4.2.2. O – TTO, nas concentrações de 3%; 9%; 12%; 15%; e 30% em relação à massa de quitosana foi incorporado na solução de quitosana preparada conforme descrito no item 4.2.1. Antes da incorporação do TTO a solução de quitosana o mesmo foi misturado manualmente com o Tween 20 na proporção de 1:1 a fim de aumentar a estabilidade cinética da emulsão obtida pela mistura do óleo TTO com a solução de quitosana.

A solução de quitosana contendo TTO/Tween 20 foi mantida sob agitação mecânica, agitador mecânico Fisatom 713D, a 600 rpm por 15 min. Em seguida as soluções obtidas foram vertidas em placas de Petri e secas em estufa a 50°C por 18 h. Após a secagem, as membranas foram divididas em dois grupos: membranas neutralizadas com uma solução de hidróxido de sódio a 1M (cuja metodologia está apresentada no item 4.2.2) e membranas não neutralizadas.

A composição e a codificação das membranas de quitosana preparadas com TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 estão apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Composição e codificação das membranas de quitosana com TTO na presença do agente tensoativo Tween 20.

Teor de TTO mL (%)	Teor de Tween mL (%)	Codificação	
		Membranas não neutralizadas	Membranas neutralizadas
0 (0)	0 (0)	MQ	MQN
0,10 (3)	0,10 (3)	MQTTO3T	MQTTO3TN
0,30 (9)	0,30 (9)	MQTTO9T	MQTTO9TN
0,40 (12)	0,40 (12)	MQTTO12T	MQTTO12TN
0,50 (15)	0,50 (15)	MQTTO15T	MQTTO15TN
1,00 (30)	1,00 (30)	MQTTO30T	MQTTO30TN

4.3 Caracterização

4.3.1 Análise Microscópica da Superfície das Membranas

As superfícies das membranas de quitosana preparadas sem TTO e com 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% de TTO, na ausência e na presença do agente tensoativo (polisorbato - Tween 20), foram analisadas em microscópio óptico Hirox, modelo KH-13000 (Figura 4.2), operando no modo transmissão e em microscópio eletrônico de varredura da Perkin Elmer modelo SSY-550 (Figura 4.3). Antes da análise, as amostras foram cortadas e fixadas em um suporte pelo uso de uma fita de carbono. Para estas caracterizações foram empregadas membranas neutralizadas.



Figura 4.2 - Microscópio Óptico Hirox, modelo KH-13000.



Figura 4.3 - Microscópio eletrônico de varredura Shimadzu modelo SSY-550.

4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

O óleo essencial TTO e as membranas de quitosana preparadas sem TTO e com 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% de TTO, na ausência e na presença do agente tensoativo (polisorbato - Tween 20) foram caracterizadas por FTIR, em um espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer (Figura 4.4) com varredura de 4000 a 650 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . Para esta caracterização também foram empregadas membranas neutralizadas.

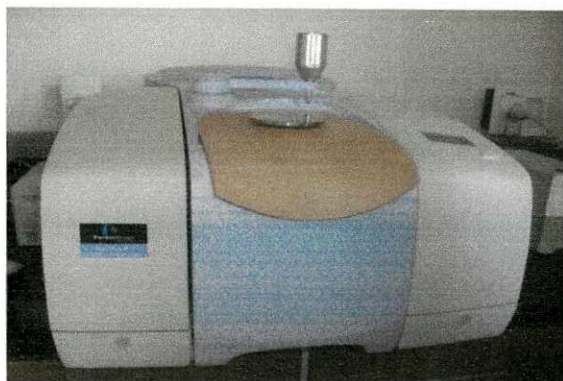


Figura 4.4 - Espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer.

4.3.3 Propriedades Mecânicas

O ensaio de resistência à tração das membranas de quitosana preparadas sem TTO e com 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% de TTO, na ausência e na presença do agente tensoativo (polisorbato - Tween 20), não neutralizadas e neutralizadas, foi conduzido de acordo com a norma ASTM D 882 em uma máquina universal de ensaio DL (Digital Line) da Emic, utilizando uma célula de carga de 20 Kgf e velocidade de deslocamento do travessão de 5 mm/min. A resistência a tração (RT), a percentagem de alongamento na ruptura (%A) e o módulo de elasticidade (ME) foram avaliados em oito amostras de cada composição e os resultados obtidos reportados como uma média das 8 medidas.

4.3.4 Análise Microbiológica *in vitro*

Os ensaios microbiológicos para determinação da atividade antibacteriana e antifúngica das membranas de quitosana preparadas sem TTO e com 3%; 9%; 12%; 15%; e 30% de TTO, na presença do agente tensoativo (polisorbato - Tween 20), não neutralizadas e neutralizadas, foram conduzidos pelo método da difusão em meio sólido, de acordo com a metodologia descrita por Castro e Lima (2010). Inicialmente foi feita a seleção das cepas e preparação dos inóculos e em seguida a determinação da atividade antifúngica e antibacteriana.

Suspensões da cepa teste foram preparadas em BHI caldo (Brain Heart Infusion Broth, DIFCO®, São Paulo, Brasil) e Caldo Sabouraud Dextrose

(HIMEDIA®, São Paulo), para crescimento das bactérias e leveduras, respectivamente, e padronizadas de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland, correspondendo à concentração de aproximadamente 10^8 e 10^6 Unidades Formadoras de Colônia - (UFC mL⁻¹) para bactérias e leveduras, nessa ordem.

A partir do inóculo obtido em solução salina, foi feita a semeadura de 100 µL do mesmo em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (Acumedia®), para as bactérias, e Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA®, São Paulo), para leveduras, com o auxílio de *swab*, de modo que toda a extensão da placa fosse semeada.

Em cada placa semeada foram inseridos os discos das membranas de quitosana, com 6 mm de diâmetro, bem como discos de papel absorvente, de mesmo tamanho, impregnados com clorexidina ou nistatina, considerados controles positivos, nas concentrações de 1200 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente, sendo todo o procedimento em triplicata.

Após essa etapa, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, sendo o *S. mutans* incubado em condições de microaerofilia, para posterior mensuração dos halos de inibição de crescimento bacteriano e fúngico em milímetros (mm) (Bauer *et al.*, 1966). O ensaio foi realizado em triplicata, sendo considerada a média aritmética dos valores obtidos.

Estes ensaios (ensaios microbiológicos) foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, que disponibilizou linhagens de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) e *Candida albicans* (ATCC 289065), cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, estão apresentados e discutidos os resultados experimentais referentes às caracterizações das membranas de quitosana preparadas sem TTO e com 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% de TTO, na ausência e na presença do agente tensoativo (polisorbato - Tween 20) feitas por: microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia na região do infravermelho, propriedades mecânicas em tração e atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro*.

5.1 Microscopia Ótica (MO)

A Figura 5.1 e Figura 5.2 mostram as imagens obtidas por microscopia ótica das membranas de quitosana preparadas sem o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* – TTO (MQN) e com 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% de TTO, na ausência de agente tensoativo e neutralizadas (MQTTO3N; MQTTO9N; MQTTO12N; MQTTO15N; MQTTO22,5N e MQTTO30N).

De acordo com a Figura 5.1, é possível observar que a membrana de quitosana (MQN) apresenta uma superfície compacta e ausente de poros, embora muitos riscos provenientes da placa usada na confecção da mesma estejam presentes.

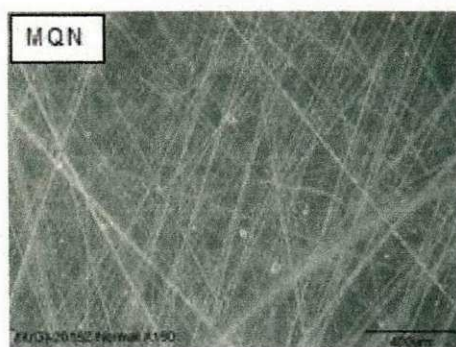


Figura 5.1 - Imagens obtidas por microscopia ótica das membranas de quitosana sem TTO e neutralizadas (MQN).

As membranas de quitosana preparadas com 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% de TTO, na ausência de agente tensoativo e neutralizadas (MQTTO3N;

MQTTO9N; MQTTO12N; MQTTO15N; MQTTO22,5N e MQTTO30N), revelam a formação de uma estrutura bifásica formada por uma fase contínua constituída pela matriz de quitosana e uma fase dispersa, constituída pelo óleo essencial TTO (Figura 5.2).

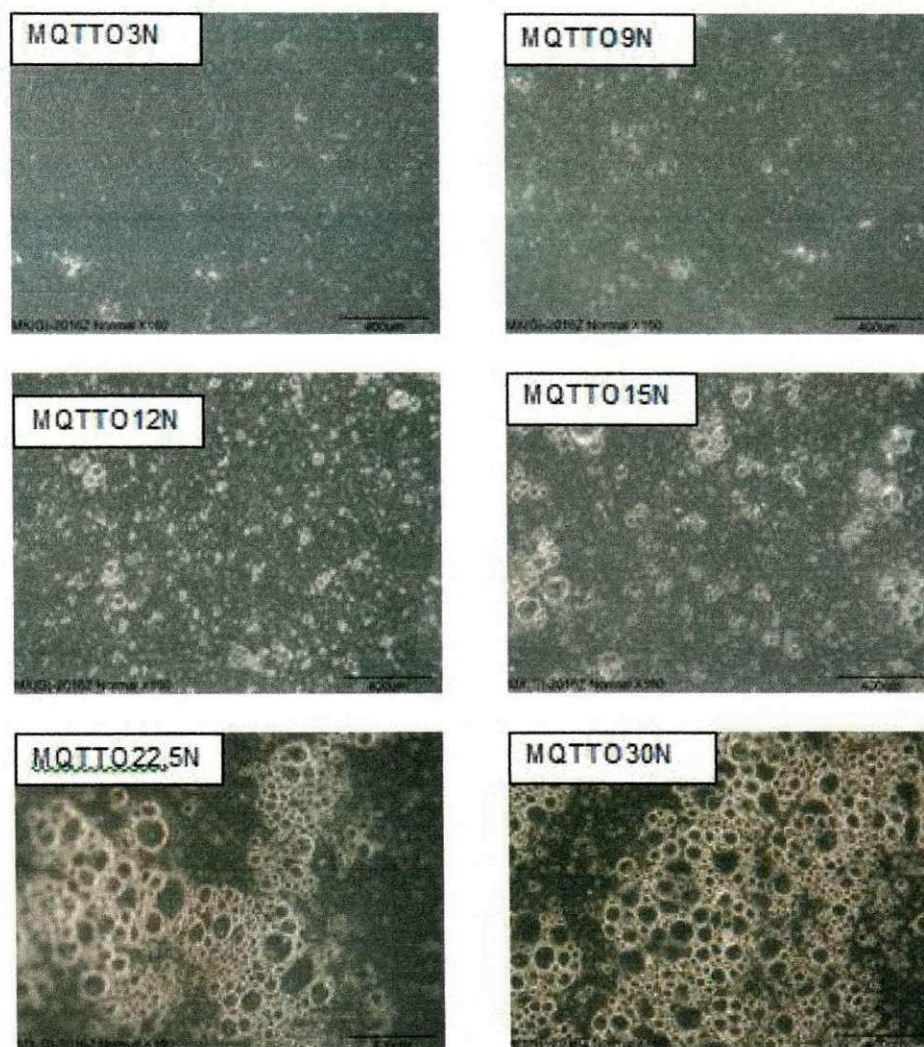


Figura 5.2 - Imagens obtidas por microscopia ótica das membranas de quitosana com 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% de TTO, na ausência de agente tensoativo (MQTTO3N; MQTTO9N; MQTTO12N; MQTTO15N; MQTTO22,5N e MQTTO30N) e neutralizadas.

A separação de fases e a coesão das moléculas do óleo essencial TTO resultante da tensão energeticamente desfavorável, devido à natureza química polar da fase contínua e apolar da fase dispersa, fez com que às moléculas do TTO se

arranjassem na forma de gotas esféricas de modo a minimizar a área da interface e a favorecer um estado de menor energia. A tendência para a forma esférica é baseada no fato de que a esfera é a forma geométrica com menor razão área de superfície/volume.

As imagens Figura 5.2 também evidenciam que, para todos os teores de TTO estudados houve a formação de agregados lipídicos na matriz de quitosana, embora o aumento tenha sido mais pronunciado para teores mais elevados de TTO. Visando minimizar ou eliminar os agregados de TTO na matriz de quitosana, membranas de quitosana/TTO foram preparadas na presença do agente tensoativo Tween 20 e os resultados da microscopia óptica das mesmas estão apresentados na Figura 5.3.



Figura 5.3 - Imagens obtidas por microscopia óptica das membranas de quitosana com 3%; 9%; 12%; 15% e 30% de TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 e neutralizadas (MQTTO3TN; MQTTO9TN; MQTTO12TN; MQTTO15TN e MQTTO30TN).

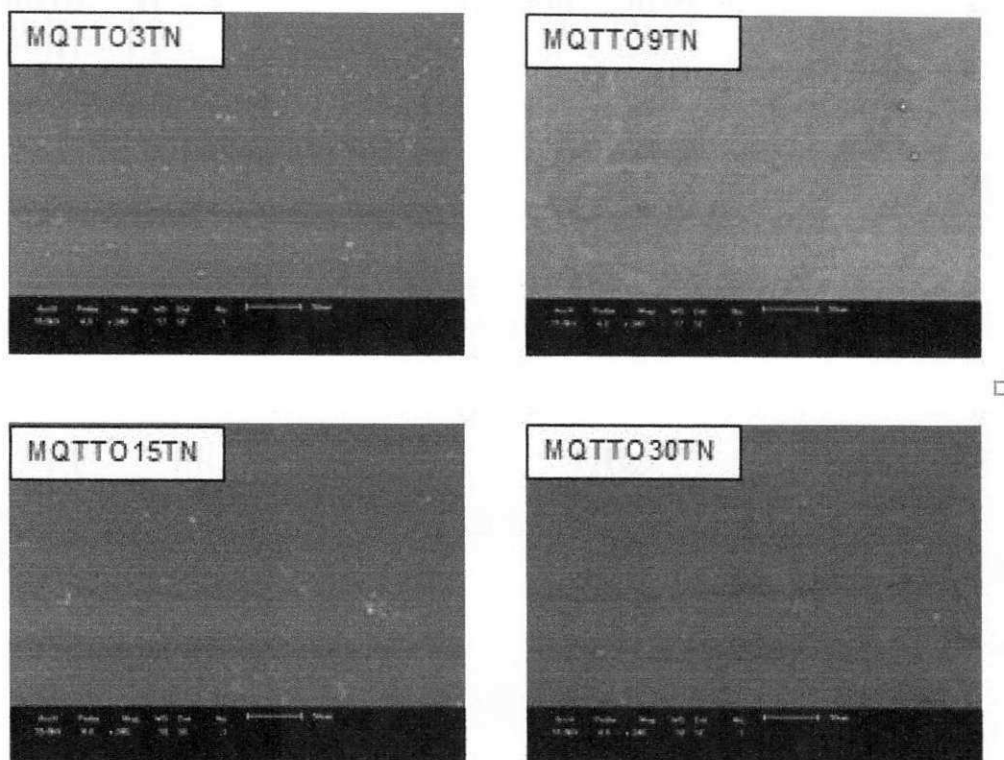
De acordo com a Figura 5.3 houve uma boa dispersão do TTO na matriz de quitosana evidenciando que a dispersão/dissolução do óleo essencial TTO no agente tensoativo Tween 20 antes do mesmo ser incorporado na solução de quitosana é fundamental para a boa dispersão do TTO na matriz de quitosana. A

provável causa deve ser a seguinte: a solução de quitosana contém grupos $-\text{CH}_3\text{COO}-$ e $-\text{NH}_4^+$ em sua estrutura e o agente tensoativo Tween 20 anfótero, que tem íons negativos e positivos, pode ter reagido com os grupos $-\text{CH}_3\text{COO}-$ e $-\text{NH}_4^+$ ao mesmo tempo, resultando na boa dispersão, conforme sugerido por Hsieh *et al.* (2006) em estudo semelhante.

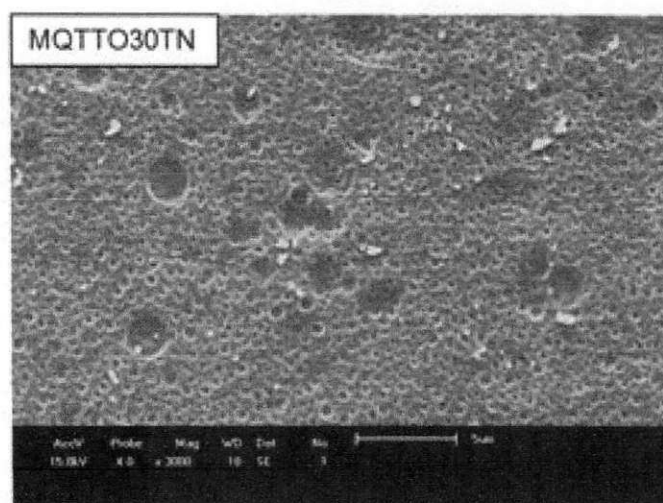
A partir destes resultados podemos concluir que é possível preparar membranas de quitosana/TTO, com boa dispersão do TTO na matriz de quitosana, mesmo empregando elevados teores de TTO, desde que o óleo essencial TTO seja previamente disperso/dissolvido no agente tensoativo Tween 20.

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As membranas de quitosana preparadas com 3%; 9%; 15% e 30% de TTO, na presença do agente tensoativo Tween 20 e neutralizadas (MQTTO3N; MQTTO9N; MQTTO15N e MQTTO30N), também foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 5.4. Estes resultados corroboram os dados de microscopia óptica. Para todos os teores de TTO estudados, houve uma boa dispersão do mesmo na matriz de quitosana (Figura 5.4 a). A membrana de quitosana contendo 30% de TTO (MQTTO30TN) apresentou uma estrutura porosa com tamanho de poro em torno de 0,001 mm, bem dispersos e bem distribuídos ao longo da matriz. A presença de poros nesta membrana (MQTTO30TN) também foi evidenciada nas imagens obtidas por microscopia óptica (Figura 5.3).



(a)



(b)

Figura 5.4 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das membranas de quitosana com 3%; 9%; 15% e 30% de TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 e neutralizadas (MQTTO3TN; MQTTO9TN; MQTTO15TN e MQTTO30TN) com ampliação de 240X (a) e da membrana MQTTO30TN com ampliação de 3000X.

5.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

A estrutura química das membranas de quitosana preparadas sem óleo essencial TTO e neutralizadas (MQN); do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* – TTO e das membranas de quitosana preparadas com 3%; 9%; 12%; 15%; 22,5% e 30% de TTO, sem agente tensoativo (MQTTO3N; MQTTO9N; MQTTO12N; MQTTO15N e MQTTO22,5N) e com o agente tensoativo Tween 20 (MQTTO3TN; MQTTO9TN; MQTTO15TN e MQTTO30TN) e neutralizadas foi avaliada por espectroscopia na região do infravermelho e os espectros obtidos estão apresentados na Figura 5.5.

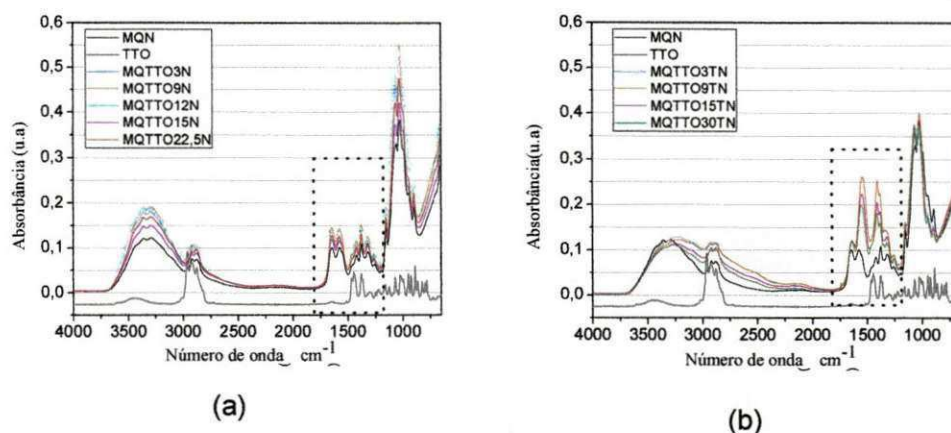


Figura 5.5 - Espectros na região do infravermelho do óleo essencial TTO e das membranas de quitosana, preparadas sem TTO (MQN) e com teores variados de TTO, sem agente tensoativo (a) e com o agente tensoativo Tween 20 (b) e neutralizadas.

A membrana de quitosana (MQN) mostra picos na faixa de 3750 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} , sobrepostas à banda de estiramento NH, referentes ao estiramento axial do grupo OH; em 2920 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} atribuídos ao estiramento axial assimétrico e simétrico da ligação CH dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, respectivamente. Vibrações angulares dos grupos metileno e metil também são visíveis em 1376 cm^{-1} e 1421 cm^{-1} , respectivamente (Mano, Koniarova e Reis, 2003). A absorção em 1645 cm^{-1} associada à deformação axial da ligação carbonila C=O da amida secundária e em 1574 cm^{-1} [$\delta_{\text{NH}_3^+}$] referente às vibrações angulares do grupo amina protonado (Marchessault, Ravenelle e Zhu, 2006); a absorção na faixa de 1160 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} é atribuída as vibrações do grupo CO. A banda em 1149 cm^{-1} é relativa

as vibrações assimétricas do grupo CO das pontes de oxigênio resultantes da desacetilação da quitosana. As bandas na faixa de 1080 cm^{-1} a 1025 cm^{-1} são atribuídas às vibrações do grupo CO no anel COH, COC e CH_2OH . Em 892 cm^{-1} corresponde as vibrações da estrutura sacarídea da quitosana (anel piranósico) (Darder, Colilla e Ruiz-Hitzky, 2003; Yuan *et al.*, 2010; Paluszkiwicz *et al.*, 2011).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) mostra picos característicos em 3440 cm^{-1} (OH), em 2955 , 2924 e 2853 cm^{-1} (estiramento CH), em 1467 , 1442 e 1378 cm^{-1} (deformação CH) e em 888 cm^{-1} (anel aromático), Figura 5.5 (Keawchaon e Yoksan, 2011).

Os espectros das membranas de quitosana/óleo essencial TTO preparadas (Figura 5.5) apresentam picos característicos da quitosana e do óleo essencial, no mesmo número de onda. Contudo, em comparação com espectro da quitosana (MQN), a adição do óleo essencial TTO resultou em um aumento significativo na intensidade dos picos em 2920 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} (estiramento CH), especialmente para o caso onde as membranas foram preparadas na presença do agente tensoativo Tween 20 (Figura 5.5 b), indicando um aumento no teor de grupos éster, que pode ser proveniente das moléculas do óleo essencial TTO uma vez que há sobreposição das bandas da quitosana e do óleo essencial.

Estes resultados sugerem que nas membranas de quitosana, preparadas com o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* – TTO na ausência de agente tensoativo (Figura 5.5 a) houve uma encapsulação física. Por outro lado, nas membranas de quitosana, preparadas com o óleo essencial TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 (Figura 5.5 b) é possível ter havido ligação ponte de hidrogênio entre o óleo essencial TTO e os grupos amina da quitosana, pois a intensidade do pico em 1574 cm^{-1} , referente às vibrações angulares do grupo amina protonado [$\hat{\sigma}_{\text{NH}_3^+}$], aumentou consideravelmente conforme região destacada por retângulo tracejado (Figura 5.5). Resultados semelhantes foram reportados por Hosseini *et al.* (2013).

5.4 Propriedade Mecânica – Tração

A influência da incorporação do TTO nas propriedades mecânicas (resistência à tração no escoamento-RT, porcentagem de alongamento na ruptura - Along. e módulo de elasticidade - ME) das membranas (filmes) de quitosana está mostrada na Tabela 5.1 e Figura 5.6.

Tabela 5.1 - Dados das propriedades mecânicas em tração das membranas de quitosana preparadas sem e com óleo essencial TTO na ausência e na presença de agente tensoativo-Tween 20 e não neutralizadas

Amostra	Espessura (mm)	RT (MPa)	Along. (%)	ME (GPa)
MQ	0,03 ± 0,000	49,99 ± 2,10	4,89 ± 1,24	2,4 ± 0,036
MQTT03	0,03 ± 0,004	40,33 ± 1,59	26,30 ± 5,76	1,8 ± 0,084
MQTT03T	0,03 ± 0,017	17,58 ± 1,94	28,52 ± 0,89	0,8 ± 0,062
MQTT09	0,03 ± 0,005	35,17 ± 6,03	23,52 ± 3,32	1,9 ± 0,024
MQTT09T	0,04 ± 0,020	25,09 ± 1,27	17,86 ± 5,62	1,1 ± 0,075
MQTT015	0,02 ± 0,007	20,98 ± 4,51	7,25 ± 3,36	1,2 ± 0,019
MQTT015T	0,04 ± 0,009	19,22 ± 2,52	5,95 ± 1,24	0,9 ± 0,059
MQTT030	0,03 ± 0,006	44,78 ± 2,18	30,49 ± 2,20	1,8 ± 0,058
MQTT030T	0,05 ± 0,010	12,47 ± 1,71	13,90 ± 1,77	0,8 ± 0,097

De uma forma geral, em comparação com as membranas MQ a adição de TTO, nas concentrações investigadas, causou uma redução no módulo de elasticidade e na resistência à tração das membranas. Por outro lado, acarretou aumento no alongamento na ruptura. Os valores das propriedades mecânicas apresentados pelas membranas de quitosana preparadas com o agente tensoativo Tween 20 (MQTT03T, MQTT09T, MQTT015T e MQTT030T) foram menores do que as preparadas sem Tween 20 (MQTT03, MQTT09, MQTT015 e MQTT030).

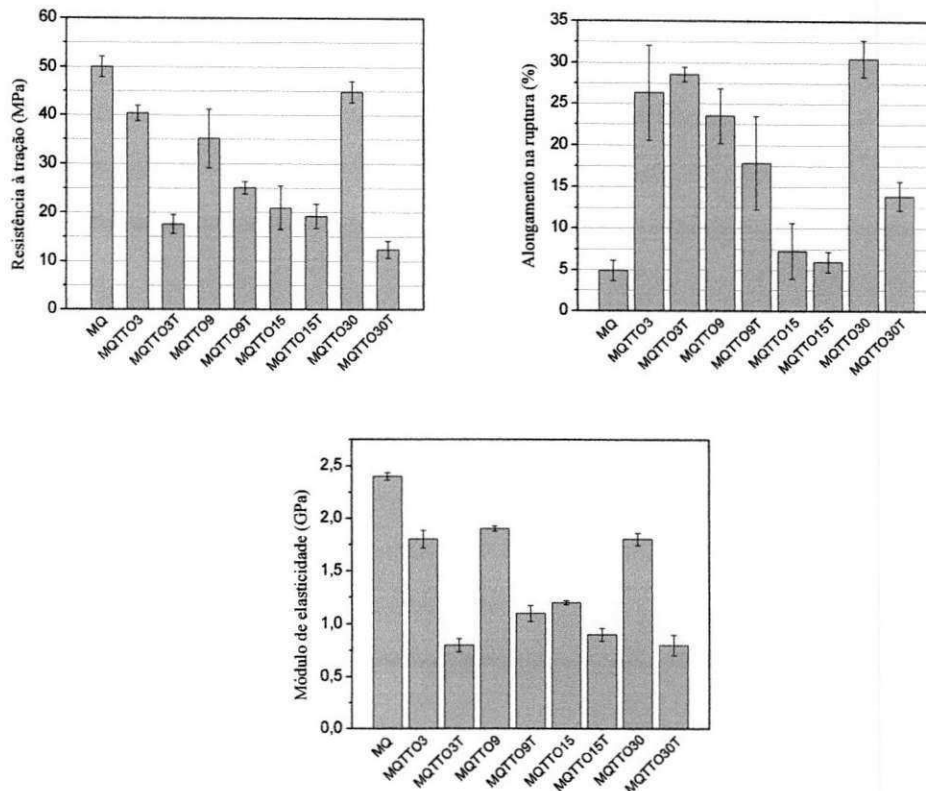


Figura 5.6 - Dados das propriedades mecânicas em tração das membranas de quitosana preparadas sem e com óleo essencial TTO na ausência e na presença de agente tensoativo-Tween 20 e não neutralizadas.

A redução na resistência mecânica causada pela adição do TTO pode estar relacionada com o arranjo estrutural da fase lipídica dentro da matriz de quitosana, conforme dados de MO e MEV. Assim, as discontinuidades estruturais provocadas pela incorporação do TTO podem explicar a menor resistência mecânica das membranas.

As membranas preparadas com Tween 20, além de apresentar discontinuidades estruturais, exibem também uma estrutura porosa particularmente para a membrana contendo 30% de TTO (MQTTO30T), conforme dados de MEV apresentados no item 5.2, o que pode ter contribuído ainda mais para a redução das propriedades mecânicas. Apenas alguns dos valores foram na faixa dos reportados por Zivanovic *et al.*(2005); Srinivasa *et al.*(2007) e Vargas *et al.* (2009). Vários

fatores, tais como a fonte de quitosana, o meio ácido utilizado para dissolver o polímero e as condições experimentais podem explicar as diferenças observadas.

5.5 Atividade Antimicrobiana

A Tabela 5.2 mostra os resultados dos testes da atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* das membranas de quitosana preparadas sem óleo essencial TTO (MQ) e com óleo essencial TTO na presença do agente tensoativo Tween 20, não neutralizadas (MQTTO3T, MQTTO9T, MQTTO15T, MQTTO30T) e neutralizadas (MQTTO3TN, MQTTO9TN, MQTTO15TN, MQTTO30TN).

A avaliação antibacteriana e antifúngica *in vitro* das membranas foi feita pelo método de difusão em meio sólido, sobre cepas de *Candida albicans*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mutans*. Este método baseia-se na medição da zona límpida causada pela inibição de crescimento produzida por um disco contendo o agente antimicrobiano e antifúngico quando colocado em contato direto com uma cultura bacteriana (Weerakkody *et al.*, 2010).

A membrana controle, membrana de quitosana sem o óleo essencial TTO (MQ), não mostrou uma zona de inibição nos organismos *C. albicans* e *S. mutans*, mas mostrou uma zona de inibição no organismo *S. oralis*, cujo diâmetro médio do halo de inibição foi de aproximadamente 6,0 mm conforme Tabela 5.2.

As membranas de quitosana preparadas com óleo essencial TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 e não neutralizadas (MQTTO3T, MQTTO9T, MQTTO15T, MQTTO30T), não foram eficazes contra *C. albicans* e *S. mutans*, mas exibiu um forte efeito de inibição sobre o crescimento do *S. oralis*, o qual foi proporcional ao teor de óleo essencial TTO, conforme valores das médias dos diâmetros dos halos das triplicatas apresentados pelas referidas membranas Tabela 5.2.

As membranas de quitosana preparadas com óleo essencial TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 e neutralizadas (MQTTO3TN, MQTTO9TN, MQTTO15TN, MQTTO30TN), não foram eficazes contra nenhum dos organismos testados. No *et al.* (2002) observaram que a atividade antibacteriana da quitosana foi aumentada pela presença do ácido acético, do ácido fórmico ou do

ácido láctico dentro do meio. Portanto, a eliminação do ácido acético, cuja atividade antimicrobiana é largamente conhecida, durante a etapa de neutralização das membranas pode ter contribuído para a inatividade antimicrobiana das mesmas no fungo e nas bactérias testados neste estudo.

A nistatina e a clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana, como esperado, tendo como média dos diâmetros dos halos 20,0 mm para *C. albicans*, 17,3 mm para *S. oralis* e 16,6 mm para *S. mutans* (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Medidas dos halos de inibição de crescimento microbiano e fúngico produzido pelas membranas de quitosana e quitosana/óleo essencial TTO.

Amostra	Diâmetro da Zona de Inibição (mm)		
	Organismos Testados		
	<i>C. albicans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. mutans</i>
Nistatina	20,0 ± 1,7	-	-
Clorexidina	-	17,3 ± 1,5	16,6 ± 0,6
MQ	0,0	6,0 ± 1,5	0,0
MQTTO3T	0,0	7,3 ± 0,0	0,0
MQTTO9T	0,0	9,0 ± 0,0	0,0
MQTTO15T	0,0	11,0 ± 0,0	0,0
MQTTO30T	0,0	14,0 ± 0,0	0,0
MQTTO3TN	0,0	0,0	0,0
MQTTO9TN	0,0	0,0	0,0
MQTTO15TN	0,0	0,0	0,0
MQTTO30TN	0,0	0,0	0,0

Imagens do efeito inibitório das membranas de quitosana preparadas com 30 % de óleo essencial TTO, contra os microrganismos *C. albicans*, *S. oralis* e *S. mutans* são mostradas na Figura 5.7.

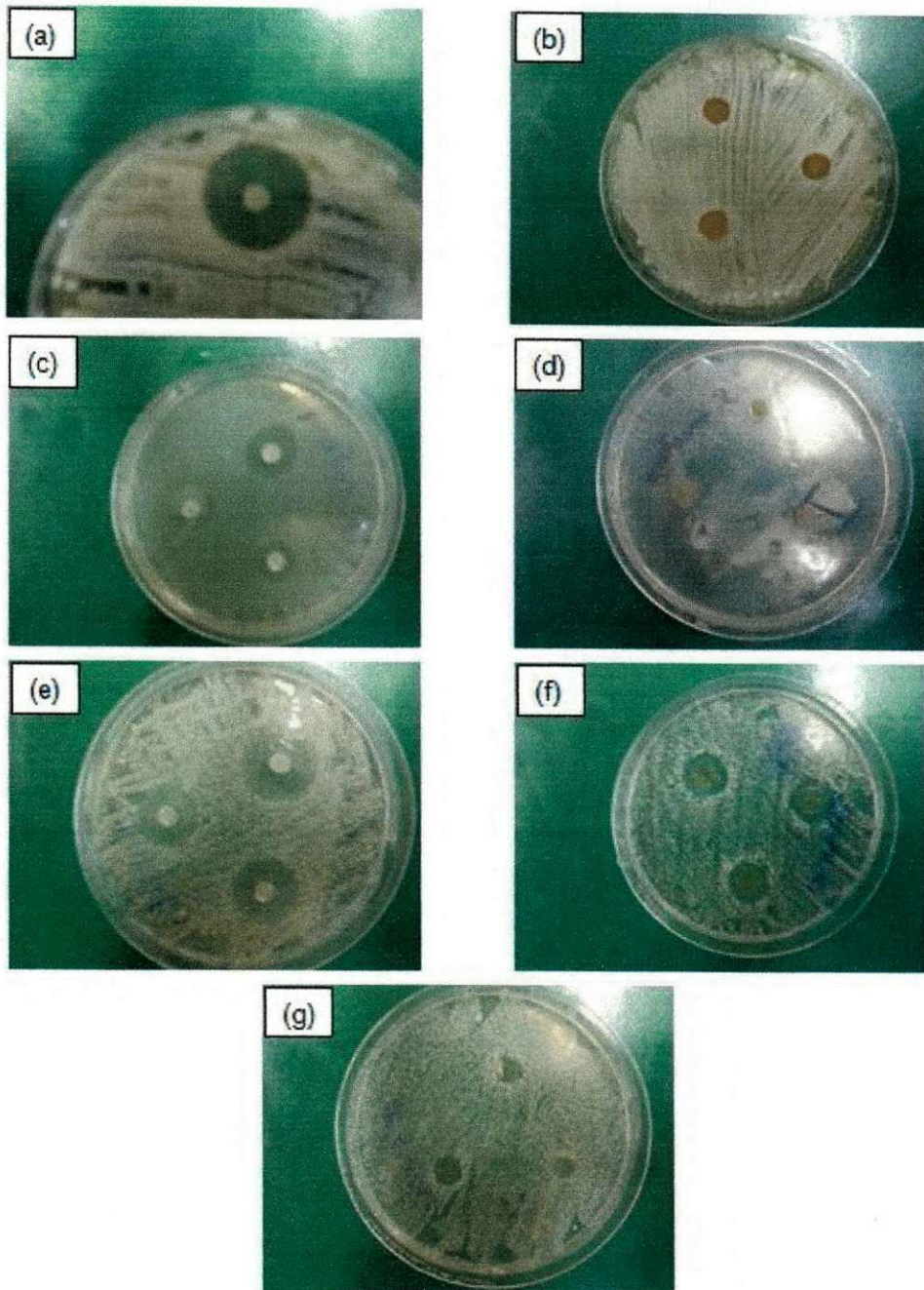


Figura 5.7 - Atividade antimicrobiana e antifúngica das membranas de quitosana com 30% em volume de óleo essencial TTO, não neutralizadas e neutralizadas: (a) Albicans-Nistatina; (b) Albicans- MQTTO30T; (c) Mutans- Clorexidina; (d) Mutans-MQTTO30TN; (e) Oralis- Clorexidina; (f) Oralis- MQTTO30T; (g) Oralis-MQTT030TN.

Qin *et al.* (2006) correlacionaram a solubilidade em água da quitosana e sua atividade antimicrobiana. De acordo com estes autores, quitosanas solúveis em água (grau de desacetilação < 50) não mostram atividade antimicrobiana. Por outro lado, quitosanas insolúveis em água, dissolvidas em meio ácido, mostram atividade antimicrobiana. Devido ao pH fisiológico na célula ser aproximadamente neutro, as amostras insolúveis em água podem precipitar, formando uma camada impermeável em torno da célula, bloqueando os canais, que são determinantes para a vida das células. Além disso, tem sido estabelecido que a atividade antimicrobiana da quitosana é resultado de vários mecanismos.

As interações entre as moléculas de quitosana carregadas positivamente e as células microbiológicas carregadas negativamente podem levar a sua destruição e perda de constituintes intracelulares essenciais. Moléculas de quitosana dissociadas em solução, com baixa massa molar, podem se ligar com DNA e inibir a síntese de mRNA através da penetração no núcleo dos microrganismos (Kong *et al.*, 2008).

Foi observado em estudos *in vitro* que a incorporação de óleo essencial em matriz de quitosana melhora suas propriedades antimicrobianas (Zivanovic, Chi e Draughon, 2005; Pelissari *et al.*, 2009). Entretanto, fatores como a fonte de quitosana, a massa molar e o grau de desacetilação da quitosana, o meio ácido utilizado para dissolver o polímero e as condições experimentais podem afetar na atividade antimicrobiana e antifúngica das membranas.

Ressalta-se que este estudo representa uma avaliação inicial para determinação da atividade antifúngica e antimicrobiana das membranas de quitosana preparadas com óleo essencial de *Melaleuca* TTO, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de outros ensaios pré-clínicos incluindo melhorias na determinação de concentrações fungicida e fungistática, bactericida e bacteriostática.

6 CONCLUSÕES

Membranas bioativas, para aplicação em cavidade oral, foram preparadas por meio do encapsulamento do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) em quitosana, empregando as técnicas de incorporação direta do TTO à quitosana dissolvida em ácido acético e incorporação da emulsão de TTO- agente tensoativo (polisorbato - Tween 20) à solução de quitosana.

A técnica de incorporação direta do TTO resultou na separação de fases e coesão das moléculas do óleo essencial, formação de agregados lipídicos na matriz de quitosana, para todos os teores de óleo estudados, sendo o aumento mais pronunciado para teores mais elevados de TTO.

Membranas de quitosana/TTO, com boa dispersão do mesmo na matriz de quitosana, foram preparadas quando o óleo essencial foi incorporado a matriz de quitosana na forma de emulsão com o Tween 20.

Os resultados de espectroscopia na região do infravermelho sugerem uma interação física entre a quitosana e o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* – TTO para as membranas preparadas na ausência de agente tensoativo e interação química – formação de ligação ponte de hidrogênio entre o óleo essencial TTO e os grupos amina da quitosana para as membranas preparadas na presença do agente tensoativo Tween 20.

O módulo de elasticidade e a resistência dessas à tração das membranas de quitosana foram reduzidos pela presença do TTO e o alongamento na ruptura aumentou; sendo estes valores ainda menores para as membranas de quitosana preparadas com o agente tensoativo Tween 20. As membranas preparadas com Tween 20, além de apresentar descontinuidades estruturais, exibiram uma estrutura porosa, particularmente para a membrana contendo 30% de TTO, o que pode ter contribuído para os menores valores das propriedades mecânicas.

As membranas de quitosana preparadas com óleo essencial TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 e não neutralizadas, não foram eficazes contra *C. albicans* e *S. mutans*, mas apresentou efeito de inibição sobre o crescimento do *S. oralis*, o qual foi proporcional ao teor de óleo essencial TTO.

As membranas de quitosana preparadas com óleo essencial TTO na presença do agente tensoativo Tween 20 e neutralizadas, não foram eficazes contra nenhum dos organismos testados. A ausência de resíduos ácidos pode ter contribuído para a inatividade antimicrobiana das mesmas no fungo e nas bactérias testados neste estudo.

SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Avaliar a influência da matriz do nanocompósito (quitosana/argila) na incorporação do óleo essencial TTO.

Avaliar a liberação controlada do óleo essencial por medidas *in-vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 343-350, 2012. ISSN 0260-8774.

ALMEIDA, L. F. D. C., Y.W.; CASTRO,R.D.; LIMA,E.O. . Atividade antifúngica e alterações morfológicas induzidas pelo óleo essencial de cinnamomum cassi frente a cepas isoladas de pacientes HIV positivos. **Pesq Bras Integ, João Pessoa**, v. 12, p. 293-298, 2012.

ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 886-891, 10/17/ 2008. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711307003169> >.

ALVES, P. M. et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.

ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana" in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 517-524, 2006.

BAGG, J. et al. Susceptibility *Melaleuca alternifolia*(tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. **Oral Oncology**, v. 42, n. 5, p. 487-492, 2006. ISSN 1368-8375.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008. ISSN 0278-6915.

BARROSO, K. M. A. **Avaliação da eficácia do fitoterápico *Cymbopogon citratus* no tratamento da *Candida albicans* em usuários de prótese**. 2009. 74f (Dissertação(Mestrado em Odontologia)). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. Pb.

BAUER, A. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966. ISSN 0002-9173.

BERTOLUZZI, N. L. M., L.G.;CASTRP,M.P.;MORAIS,F.R.EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* no tratamento de feridas cicatrizadas por

segunda intensão: relato de caso., 35º CONBRAVET(Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária – Anais), 2008.

BOTELHO, M. A. et al. Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 9, p. 1214-1219, 2009. ISSN 1099-1573.

BRAGA, C. R. C. **Caracterização de membranas quitosana/silicatos em camadas para uso como suporte enzimático na construção de um biossensor de uréia.** 2012. 200f (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais)). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande - PB.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 971 de 3 de Maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Prática Integrativa e Complementares(PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). Maio 2006

BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Secretaria de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília, 2009

CANETTIERI, A. C. V. et al. Efeito do anticorpo monoclonal 56G sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* em caldo e no acúmulo de placa bacteriana in vitro. **Brazilian Dental Science**, v. 9, n. 4, 2010. ISSN 2178-6011.

CARSON, C.; HAMMER, K.; RILEY, T. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006. ISSN 0893-8512.

CASTRO, R. D. **Atividade antifúngica do óleo essencial cinnamomum zeylanicum Blume (canela) e sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de cândida.** 2010. 168f. Tese (Doutorado Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre Cepas de *Candida*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa**, v. 11 p. 341-345, 2011.

CAVALEIRO, C. Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. In:Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais Curso Técnico- Prático. In: FIGUEIREDO, A. C. B., J.G.; PEDRO,L.G. (EDS) (Ed.). 3: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa-Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal, 2007. p.55-62.

CHATTORAJ, P. et al. ClpP of *Streptococcus mutans* differentially regulates expression of genomic islands, mutacin production, and antibiotic tolerance. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 5, p. 1312-1323, 2010. ISSN 0021-9193.

COSTA, E. S. **Desenvolvimento de Materiais de Quitosana/PVA, quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. 2008. 151f Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte.

COSTERTON, J.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999. ISSN 0036-8075.

COX, S.; MANN, C.; MARKHAM, J. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 492-497, 2001. ISSN 1365-2672.

DARDER, M.; COLILLA, M.; RUIZ-HITZKY, E. Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 20, p. 3774-3780, 2003. ISSN 0897-4756.

DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011. ISSN 0079-6700.

DE CASTRO, R. D.; DE OLIVEIRA LIMA, E. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, n. 3, p. 179-184, 2010.

DE LUCA, M. P. **Verniz à base de quitosana contendo própolis verde brasileira: avaliação de atividade antimicrobiana, citotoxicidade e perfil de liberação**. 2011. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade Federal de Minas Gerais UFMG. Faculdade de Odontologia. Belo Horizonte.

DE SOUZA COSTA JR, E.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

DECKER, E. M. et al. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, n. 5, p. 373-377, 2005. ISSN 1600-0765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00817.x> >.

DITTERICH, R. G. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de substâncias naturais presentes nos dentífricos; In vitro antimicrobial activity of natural substances in toothpastes. **Odontol. Clín.Cient**, v. 6, n. 4, p. 303-307, 2007. ISSN 1677-3888.

DORMAN, H. J. D., S.G.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: 1998.

FIGUEIREDO, N. L. L. **Efeito inibitório de extratos de plantas no crescimento e fatores de virulência de Streptococcus sobrinus e Streptococcus** 2009.149f Dissertação (Mestrado em Bioquímica).Faculdade de Ciência. Departamento de Química e Bioquímica.Universidade de Lisboa.

FILOGÔNIO, C. F. B. **Estudo comparativo do efeito de óleos vegetal e mineral contidos em dentrífcio no controle do biofilme dentário**. 2009.60f(Dissertação (Mestrado em Odontologia). Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - Belo Horizonte

FINE, D. H. et al. Effect of rinsing with an essential oil-containing mouthrinse on subgingival periodontopathogens. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 10, p. 1935-1942, 2007. ISSN 0022-3492.

FREIRES, I. D. A. et al. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de Schinus terebinthifolius (Aroeira) e Solidago microglossa (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 9, n. 2, p. 139-143, 2010. ISSN 1677-3888.

GNATTA, J. R. **Comparação da eficácia antimicrobiana de sabonetes contendo óleo essencial de tea tree (Melaleuca alternifolia) e triclosan na higienização de mãos artificialmente contaminadas**. 2012. 144f Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. São Paulo.

GROPPO, F. et al. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. **International Dental Journal**, v. 52, n. 6, p. 433-437, 2002. ISSN 1875-595X.

HAMMER, K. A. et al. Susceptibility of oral bacteria to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil in vitro. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 6, p. 389-392, 2003. ISSN 1399-302X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.0902-0055.2003.00105.x> >.

HOLANDA, A. L. D. **Membranas de Quitosanas para Uso em Sistema de Liberação controlada de Insulina: Síntese e Caracterização**. 2011.113f.Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande - PB.

HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization *in vitro* release study. **Carbohydrate Polymers**, 2013. ISSN 0144-8617.

HSIEH, W.-C.; CHANG, C.-P.; GAO, Y.-L. Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, n. 2, p. 209-214, 2006. ISSN 0927-7765.

JUIZ, P. J.; ALVES, R. J.; BARROS, T. F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 134-139, 2010.

JULIANO, C.; DEMURTAS, C.; PIU, L. In vitro study on the anticandidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil combined with chitosan. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 227-231, 2008. ISSN 1099-1026.

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163-171, 5/1/ 2011. ISSN 0927-7765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511000063> >.

KHAN, R.; ISLM, B.; AKRAM, M.; SHAKIL, S.; AHMAD, A. A.; ALI, S. M.; SIDDIQUI, M.; KHAN, A. U. Antimicrobial activity of herbal extracts against multi resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 586-597, 2009.

KLOSTER, A. P. **Desenvolvimento e análise "in vitro" do efeito antimicrobiano de bandagem bucal**. 2011. 101f .Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

KONG, M. et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, n. 2, p. 197-202, 2008. ISSN 0927-7765.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 8/5/ 2004. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022904001231> >.

LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. T. D. Chitosan: functional byopolymer with biomedical industrial potential. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009. ISSN 0100-4042.

LAVORGNA, M. et al. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 291-298, 2010. ISSN 0144-8617.

LAWRENCE, J. et al. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 11, p. 3541-3550, 2008. ISSN 0099-2240.

LEMOS, D. R. H. et al. Influence of drying air temperature on the essential oil content from *Melaleuca alternifolia cheel*. XXXVII Congresso Braz. Agric. Eng, 2008.

LIU X. F.; GUAN .L.;YANG D.Z.; LI, D. Z. Y., K.D. Antibacterial action of chitosan and Carboximetylated chitosan. **J Appl Polym Sci.** v. 79, p. 1224-1235, 2001.

MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. p. 105-127, 2011. ISSN 2175-2532.

MANO, J.; KONIAROVA, D.; REIS, R. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 2, p. 127-135, 2003. ISSN 0957-4530.

MARCHESSAULT, R. H.; RAVENELLE, F.; ZHU, X. X. **Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications.**An American Chemical Society Publication, 2006. ISBN 0841239606.

MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. O uso de enxaguatórios bucais sobre a gengivite eo biofilme dental. **International Journal of Dentistry**, v. 6, n. 4, p. 124-131, 2007.

MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Physiological approaches to the control of oral biofilms. **Advances in Dental Research**, v. 11, n. 1, p. 176-185, 1997. ISSN 0895-9374.

MELO, F. M. A. D. **Uso da Quitosana como surfactante policatiônico para modificação de bentonita.**2010.56f.Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais).Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande - PB

MENEGON, R. F. **Estudo biológico e desenvolvimento de formulação do sal tetrapalmitato de clorexidina para uso em doenças bucais.** 2009. 96f.Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

MUSSI, M. C. M. **Análise da atividade antimicrobiana dos óleos de copaiba (*Copaifera officinalis*) e Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre fusobacterium nucleatum e Porphyromonas gingivalis: determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e efeito de concentração subinibitórias sobre agregação.** 2011.122f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru . Universidade de São Paulo.

NGUYEN, S.; WINNIK, F. M.; BUSCHMANN, M. D. Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 528-533, 2009. ISSN 0144-8617.

NO, H. K. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 65-72, 2002. ISSN 0168-1605.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000. ISSN 0066-4227.

OLIVEIRA, A. et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Rev. Bras. Plantas Med**, v. 13, n. 4, p. 492-499, 2011. ISSN 1516-0572.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.

PALUSZKIEWICZ, C. et al. FT-IR study of montmorillonite–chitosan nanocomposite materials. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 4, p. 784-788, 2011. ISSN 1386-1425.

PEDRO, A. S. et al. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 501-508, 2009. ISSN 0144-8617.

PELLISSARI, F. M. et al. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch–chitosan films incorporated with oregano essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7499-7504, 2009. ISSN 0021-8561.

PERALTA, S. L. ÓLEO ESSENCIAL DE “*Butia Capitata*” Uma Alternativa como Antibacteriano em Sistemas Adesivos. XIV Encontro de Pós Graduação Universidade Federal de Pelotas. XIV Encontro de Pós Graduação Universidade Federal de Pelotas.2012.

PIGNATELLO, R.; BASILE, L.; PUGLISI, G. Chitosan glutamate hydrogels with local anesthetic activity for buccal application. **Drug Delivery**, v. 16, n. 3, p. 176-181, 2009. ISSN 1071-7544.

PINHO, A.; PICHONELLI, M. Governo lista plantas que poderão virar fitoterápicos São Paulo, sábado, Folha de São Paulo Saúde, 2009. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/lista_plantas_sus.pdf. Acesso em 16 de Abril, 2013.

POPA, M.-I. et al. Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan. **Reactive and Functional Polymers**, v. 45, n. 1, p. 35-43, 2000. ISSN 1381-5148.

PROBST, I. D. S. **Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais e Avaliação de potencial Sinérgico**. 2012.112f .Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociência de Botucatu

PUBCHEM. Estrutura química da clorexidina
2008. Disponível em: <
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=9552079> >. Acesso em:
04 de abril.

QIN, C. et al. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 367-374, 2006. ISSN 0144-8617.

RAMAMURTHY, J. Pharmacological Aspects of Tea Tree Oil (TTO) and Its Role in Dentistry-A Comprehensive Review Jaiganesh Ramamurthy and Lakshmi.T. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 572-581., 2011.

RASTEIRO, V. M. D. C. **Efeito dos óleos essenciais de Cymbopogon citratus e Melaleuca alternifolia sobre Candida albicans estudo in vitro e in vivo; Effects of essential oils from Cymbopogon citratus and Melaleuca alternifolia on Candida albicans-study in vitro and in vivo**. 2011. 98f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal). UNESP-Univ.Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 4, p. 443-452, 2010. ISSN 0260-8774.

SANO, H. et al. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 44, n. 1, p. 9-16, 2003. ISSN 0040-8891.

SANTOS, J. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. **Teses de doutorado. Universidade Federal de São Carlos**, 2004.

ŞENEL, S. et al. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, n. 2, p. 197-203, 2000. ISSN 0378-5173.

SEYMOUR, R. Additional properties and uses of essential oils. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. s5, p. 19-21, 2003. ISSN 1600-051X.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994. ISSN 0021-9258.

SILVA, S. M. et al. Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites. In: (CROATIA), T. T. I. R. (Ed.). **Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites. Capítulo 3 (22 pp)**

na obra: **Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology**, 2012. p.22. ISBN ISBN 978-953-51-0537-4.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 4. 2002. 838f.

SIMÕES, C. M. O. S., E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. . 5. 2003.

SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.

SRINIVASA, P.; RAMESH, M.; THARANATHAN, R. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1113-1122, 2007. ISSN 0268-005X.

TAVARIA, F. K. et al. Chitosan as a dental biomaterial: state of the art. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 29, n. 1, p. 110-120, 2013. ISSN 1517-3151.

TEIXEIRA, J. D. A. **Ação antimicrobiana in vitro de derivados da quitina sobre bactérias orais organizadas em biofilme**.2002.58p.Dissertação(Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Norte.Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Odontologia

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005. ISSN 0066-4804.

UYSAL, T. et al. Does a chitosan-containing dentifrice prevent demineralization around orthodontic brackets? **The Angle Orthodontist**, v. 81, n. 2, p. 319-325, 2011. ISSN 0003-3219.

VALDEVITE, L. M. **Estudo do efeito in vitro de extrato das folhas e do óleo resina de copaíba sobre fatores de virulência de streptococcus mutans, relacionados à cárie dental**. . 2011. 128f (Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto – SP.

VARGAS, M. et al. Characterization of chitosan–oleic acid composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 536-547, 2009. ISSN 0268-005X.

VAZQUEZ, J. A.; ZAWAWI, A. A. Efficacy of alcohol-based and alcohol-free melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS/HIV **Clinical Trials**, v. 3, n. 4, p. 379-385, 2002.

ANEXO 1

Relação de plantas medicinais de interesse do SUS (RENISUS)

	<i>Planta</i>		<i>Planta</i>
1	<i>Achillea millefolium</i>	37	<i>Lippia sidoides</i>
2	<i>Allium sativum</i>	38	<i>Malva sylvestris</i>
3	<i>Aloe spp*</i> (<i>A. vera</i> ou <i>A. barbadensis</i>)	39	<i>Maytenus spp*</i> (<i>M. aquifolium</i> ou <i>M. ilicifolia</i>)
4	<i>Alpinia spp*</i> (<i>A. zerumbet</i> ou <i>A. speciosa</i>)	40	<i>Mentha pulegium</i>
5	<i>Anacardium occidentale</i>	41	<i>Mentha spp*</i> (<i>M. crispa</i> , <i>M. piperita</i> ou <i>M. villosa</i>)
6	<i>Ananas comosus</i>	42	<i>Mikania spp*</i> (<i>M. glomerata</i> ou <i>M. laevigata</i>)
7	<i>Apuleia ferrea</i> = <i>Caesalpinia ferrea</i> *	43	<i>Momordica charantia</i>
8	<i>Arrabidaea chica</i>	44	<i>Morus sp*</i>
9	<i>Artemisia absinthium</i>	45	<i>Ocimum gratissimum</i>
10	<i>Baccharis trimera</i>	46	<i>Orbignya speciosa</i>
11	<i>Bauhinia spp*</i> (<i>B. affinis</i> , <i>B. forficata</i> ou <i>B. variegata</i>)	47	<i>Passiflora spp*</i> (<i>P. alata</i> , <i>P. edulis</i> ou <i>P. incarnata</i>)
12	<i>Bidens pilosa</i>	48	<i>Persea spp*</i> (<i>P. gratissima</i> ou <i>P. americana</i>)
13	<i>Calendula officinalis</i>	49	<i>Petroselinum sativum</i>
14	<i>Carapa guianensis</i>	50	<i>Phyllanthus spp*</i> (<i>P. amarus</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. tenellus</i> e <i>P. urinaria</i>)
15	<i>Casearia sylvestris</i>	51	<i>Plantago major</i>
16	<i>Chamomilla recutita</i> = <i>Matricaria chamomilla</i> = <i>Matricaria recutita</i>	52	<i>Plectranthus barbatus</i> = <i>Coleus barbatus</i>
17	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	53	<i>Polygonum spp*</i> (<i>P. acre</i> ou <i>P. hydropiperoides</i>)

18	<i>Copaifera spp*</i>	54	<i>Portulaca pilosa</i>
19	<i>Cordia spp*</i> (<i>C. curassavica</i> ou <i>C. verbenacea</i>)*	55	<i>Psidium guajava</i>
20	<i>Costus spp*</i> (<i>C. scaber</i> ou <i>C. spicatus</i>)	56	<i>Punica granatum</i>
21	<i>Croton spp</i> (<i>C. cajucara</i> ou <i>C. zehntneri</i>)	57	<i>Rhamnus purshiana</i>
22	<i>Curcuma longa</i>	58	<i>Ruta graveolens</i>
23	<i>Cynara scolymus</i>	59	<i>Salix alba</i>
24	<i>Dalbergia subcymosa</i>	60	<i>Schinus terebinthifolius</i> = <i>Schinus aroeira</i>
25	<i>Eleutherine plicata</i>	61	<i>Solanum paniculatum</i>
26	<i>Equisetum arvense</i>	62	<i>Solidago microglossa</i>
27	<i>Erythrina mulungu</i>	63	<i>Stryphnodendron adstringens</i> = <i>Stryphnodendron barbatimam</i>
28	<i>Eucalyptus globulus</i>	64	<i>Syzygium spp*</i> (<i>S. jambolanum</i> ou <i>S. cumini</i>)
29	<i>Eugenia uniflora</i> ou <i>Myrtus brasiliiana</i> *	65	<i>Tabebuia avellanedeae</i>
30	<i>Foeniculum vulgare</i>	66	<i>Tagetes minuta</i>
31	<i>Glycine max</i>	67	<i>Trifolium pratense</i>
32	<i>Harpagophytum procumbens</i>	68	<i>Uncaria tomentosa</i>
33	<i>Jatropha gossypifolia</i>	69	<i>Vernonia condensata</i>
34	<i>Justicia pectoralis</i>	70	<i>Vernonia spp*</i> (<i>V. ruficoma</i> ou <i>V. polyanthes</i>)
35	<i>Kalanchoe pinnata</i> = <i>Bryophyllum calycinum</i> *	71	<i>Zingiber officinale</i>
36	<i>Lamium álbum</i>		

Fonte: Adaptado de Pinho e Pichonelli (2009).