



UNIVERSIDADE DO PLANALTO CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E SAÚDE

DIONE GLAUCO BATISTA

NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO: AVALIAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA E ANTIMICROBIANA

LAGES

2023

DIONE GLAUCO BATISTA

NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO: AVALIAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA E ANTIMICROBIANA

Dissertação vinculada ao Curso de Mestrado em
Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto
Catarinense, apresentado à Banca Examinadora.
Orientadora: Profa. Dra. Anelise Viapiana Masiero
Coorientadora: Profa. Dra. Cleonice Gonçalves da
Rosa
Linha de Pesquisa: Saúde, Ambiente e Sociedade

LAGES
2023

Ficha Catalográfica

B333n Batista, Dione Glauco
Nanoemulsão de óleo essencial de eucalipto: avaliação físico-química e antimicrobiana / Dione Glauco Batista ; orientadora Prof. Dra. Anelise Viapiana Masiero ; coorientadora Prof. Dra. Cleonice Gonçalves da Rosa – 2023.

53 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Planalto Catarinense. Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense. Lages, SC, 2023.

1. Nanotecnologia. 2. Eucalipto. 3. Odontologia Preventiva. I. Masiero, Anelise Viapiana (orientadora). II. Rosa, Cleonice Gonçalves da (coorientadora). III. Universidade do Planalto Catarinense. Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Saúde. IV. Título.

CDD 610

Catálogo na fonte – Biblioteca Central

DIONE GLAUCO BATISTA

NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO: AVALIAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA E ANTIMICROBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Saúde.

Aprovada em 27 de junho de 2023.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Anelise Viapiana Masiero
(Orientadora – PPGAS/UNIPLAC)

Documento assinado digitalmente
 ANELISE VIAPIANA MASIERO
Data: 06/12/2023 18:39:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Cleonice Gonçalves da Rosa
(Coorientadora – PPGAS/UNIPLAC)

Documento assinado digitalmente
 CLEONICE GONCALVES DA ROSA
Data: 05/12/2023 18:16:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Roberto Pereira Pimentel
(Examinador Titular Externo - UFPEL)

Documento assinado digitalmente
 ROBERTO PEREIRA PIMENTEL
Data: 30/11/2023 17:00:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Natalia Veronez da Cunha
(Examinadora Titular Interna - PPGAS/UNIPLAC)

Participação não presencial
Resolução 432/2020 e IN 01/2023 PPGAS
Documento assinado digitalmente
 NATALIA VERONEZ DA CUNHA
Data: 30/11/2023 21:08:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE

Declaro que os dados apresentados nesta versão da Dissertação para o Exame de Defesa de Dissertação são decorrentes de pesquisa própria e de revisão bibliográfica referenciada segundo normas científicas.

Lages, 27 de junho de 2023.

Dione Glauco Batista

RESUMO

A cárie e a doença periodontal estão entre os principais problemas de saúde bucal. O controle do biofilme dental é determinante para a prevenção o qual pode ser feito pela diminuição do consumo de alimentos fermentáveis, pela correta escovação após as refeições, pelo uso de enxaguatórios bucais com bases em produtos químicos e até mesmo uso da antibioticoterapia. Devido aos efeitos indesejáveis desses dois últimos, a nanoemulsão pode ser utilizada como uma alternativa de administração local de medicamentos com a liberação de agentes de forma controlada. Assim, o objetivo do presente estudo foi sintetizar, caracterizar e avaliar atividade antimicrobiana de nanoemulsão a base de óleo essencial de eucalipto sobre *Streptococcus mutans* e o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. O estudo se caracteriza por um estudo *in vitro* conduzido em duas etapas. Inicialmente foi realizada a síntese das nanoemulsões de óleo essencial de eucalipto de duas espécies: *E. citriodora* (NanoEE-Citriodora) e *E. globulus*, (NanoEE-Globulus) e sua respectiva caracterização físico-química quanto tamanho de partícula (Z_{ave}), índice de polidispersão (IP), potencial zeta (ζ), morfologia e pH. Posteriormente, foi avaliada a ação antimicrobiana estimando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dividindo as amostras em quatro grupos: a) NanoEE-Globulus; b) NanoEE-Citriodora; c) Clorexidina (controle positivo) e d) Água (controle negativo). As amostras de NanoEE-Globulus e NanoEE-Citriodora apresentaram tamanho de médio de partícula em torno de 100 nm, com valores IP próximo as 0,3. Os valores de ζ variaram entre -19 e -30, pH próximo a 7 e formato esférico. Ambas as nanoemulsões NanoEE-Globulus e NanoEE-Citriodora foram eficazes no controle de *S. mutans*. A amostra de NanoEE-Globulus apresentou uma CIM de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a NanoEE-Citriodora apresentou uma CIM em $60 \mu\text{L mL}^{-1}$ (60%) contra esta bactéria gram-positiva, revelando que apresentam atividade inibitória mesmo em concentração próxima a mínima testada. Por outro lado, contra o microrganismo de *A. actinomycetemcomitans* apenas a amostra de NanoEE-Globulus apresentou inibição na concentração de $60 \mu\text{L mL}^{-1}$ (60%). Dessa forma pode-se concluir que as nanoemulsões de óleo essencial de eucalipto possuem propriedades bacteriostáticas e características físico-químicas adequadas e tem potencial futuro para aplicação na Odontologia Preventiva, com o intuito de contribuir para a manutenção da saúde bucal e sistêmica.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Eucalipto. Odontologia Preventiva.

ABSTRACT

Caries and periodontal disease are among the main oral health problems. The control of dental biofilm is crucial for prevention, which can be done by reducing the consumption of fermentable foods, brushing after meals, using mouthwashes based on chemical products and even the use of antibiotic therapy. Due to the undesirable effects of the last two, the nanoemulsion can be used as an alternative for the local administration of drugs with the release of agents in a controlled manner. Thus, the objective of the present study was to synthesize, characterize and evaluate the antimicrobial activity of a nanoemulsion based on eucalyptus essential oil on *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*. The study is characterized by an in vitro study conducted in two stages. Initially, the synthesis of eucalyptus essential oil nanoemulsions of two species was carried out: E. Citriodora (NanoEE-Citriodora) and E. Globulus, (NanoEE-Globulus) and their respective physicochemical characterization regarding particle size (Z-ave), polydispersion index (PI) and zeta potential (ζ), morphology and pH. Subsequently, the antimicrobial action was evaluated by estimating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), dividing the samples into four groups: a) NanoEE-Globulus; b) NanoEE-Citriodora; c) Chlorhexidine (positive control) and d) Water (negative control). The NanoEE-Globulus and NanoEE-Citriodora samples showed an average particle size around 100 nm, with PI values close to 0.3. Zeta potential values varied between -19 and -30, pH close to 7 and spherical shape. Both NanoEE-Globulus and NanoEE-Citriodora nanoemulsions were effective in controlling *S. mutans*. The NanoEE-Globulus sample had a MIC of 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the NanoEE-Citriodora had a MIC of 60 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (60%) against this gram-positive bacterium, revealing that they have inhibitory activity even at a concentration close to the minimum tested. On the other hand, against the *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* microorganism, only the NanoEE-Globulus sample showed inhibition at a concentration of 60 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (60%). Therefore, it can be concluded that eucalyptus essential oil nanoemulsions have bacteriostatic properties and adequate physicochemical characteristics and have future potential for application in Preventive Dentistry, with the aim of contributing to the maintenance of oral and systemic health.

Keywords: Nanotechnology. Eucalyptus. Preventive Dentistry.

IMPACTO E CARÁTER INOVADOR DA PRODUÇÃO INTELECTUAL

Os seres humanos ao longo da vida são frequentemente infectados por microrganismos, como bactérias, fungos, leveduras e vírus. A cárie e doença periodontal ainda se configuram como os principais problemas de saúde bucal em todo mundo, atingindo uma parcela importante da população. Apesar de serem doenças multifatoriais, conforme vai ser melhor elucidado ao longo desta dissertação, os microrganismos tem papel importante neste processo.

Levando em consideração a proposta do Programa de Pós-graduação em Ambiente e Saúde que investiga as questões que envolvem o Ambiente e Saúde e como estas impactam na vida da pessoas, buscou-se na presente dissertação investigar uma abordagem mais preventiva no combate a cárie e doença periodontal. Para tal desenvolveu-se uma nanoemulsão a partir de óleo essencial de eucalipto e avaliou-se seu efeito sobre o *Streptococcus mutans* e o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Os resultados iniciais são favoráveis e acredita-se que esta linha de pesquisa possa ser promissora uma vez encontram-se poucos trabalhos na literatura associado a nanoemulsão a enxaguatórios bucais. A resistência bacteriana é um dos desafios apontados pela Organização mundial da Saúde a ser combatido e reconhecida em 2021 como ameaça aos esforços mundiais de sustentabilidade e desenvolvimento pela Assembleia Geral das Nações Unidas. Neste contexto, desenvolver novos sistemas de transporte de agentes antimicrobianos podem ser possíveis soluções para este problema.

A relação entre o ambiente e o desenvolvimento sustentável é uma preocupação mundial e é tema abordado na Agenda 2030. O presente estudo tem relação com o ODS 3 - Saúde e Bem estar que visa “assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades”, com o ODS 12 que busca “garantir padrões de consumo e de produção sustentáveis” e com o ODS 15 que objetiva “proteger, restaurar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, travar e reverter a degradação dos solos e travar a perda da biodiversidade”. O desenvolvimento de materiais em nanoescala e as propriedades medicinais e antimicrobianas obtidas a partir de plantas podem substituir os métodos tradicionais de tratamento com antibióticos e antimicrobianos em razão de apresentarem características físico-químicas e biológicas únicas, como alta superfície de contato, ação antimicrobiana e antioxidante e atóxica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Concepção interdisciplinar de pesquisa.....	16
Artigo	
Figura 1 - Procedimento metodológico para elaboração das nanoemulsões.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação do tamanho médio, PDI, potencial zeta e pH.....	33
Tabela 2 - Resultado de concentração inibitória mínima e efeito bactericida e bacteriostático.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP	<i>American Academy of Periodontology</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CHX	Gluconato de clorexidina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DCNT	Doença crônica não transmissível
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DLS	Técnica de espalhamento de luz
DP	Doença periodontal
EFP	<i>European Federation of Periodontology</i>
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
GBD	<i>Global Burden of Disease</i>
IADR	<i>International Association for Dental Research</i>
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IMPEDE	<i>Inflammation-Mediated Polymicrobial-Emergence and Dysbiotic-Exacerbation</i>
IP	Índice de polidispersão
LPS	Lipopolissacarídeo
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mV	Milivolts
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORCA	<i>European Organisation for Caries Research</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
QV	Qualidade de vida
QVRSO	Qualidade de vida relacionada à saúde oral
RPM	Rotações por minuto
TSB	Ágar Tríplico de Soja
UFC	Unidade formadora de colônia
Z-ave	Tamanho médio de partícula

LISTA DE SÍMBOLOS

ζ Potencial zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Pergunta de pesquisa.....	17
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Cárie dentária	18
3.2 Doença periodontal.....	21
3.3 Nanoemulsão	23
4 ARTIGO: NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO: UMA ALTERNATIVA PARA A ODONTOLOGIA PREVENTIVA	27
4.1 Resumo	27
4.2 Introdução	28
4.3 Materiais e métodos.....	31
4.3.1 <i>Materiais</i>	31
4.3.2 <i>Extração e caracterização dos óleos essenciais</i>	31
4.3.3 <i>Síntese e caracterização das nanoemulsões.....</i>	31
4.3.4 <i>Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsão de óleo essencial de eucalipto</i>	32
4.3.5 <i>Determinação do tamanho de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ), morfologia e pH</i>	32
4.3.6 <i>Avaliação antimicrobiana das nanoemulsões.....</i>	33
4.3.7 <i>Análise estatística.....</i>	33
4.4 Resultados e discussão.....	34
4.4.1 <i>Caracterização físico-química das nanoemulsões</i>	34
4.4.2 <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	36
4.4.3 <i>Ensaio de Atividade Antimicrobiana: Concentração Inibitória das nanoemulsões</i>	37
4.5 Conclusão	40
4.5 Referências	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS GERAIS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A mucosa e a saliva se configuram como barreiras naturais e são os principais mecanismos de defesa contra a invasão bacteriana dos tecidos moles. Assim como, o esmalte e a dentina são importantes barreiras de tecido duro no processo de cárie (SANZ *et al.*, 2017). Atualmente as evidências científicas sugerem que as etiologias da cárie e da doença periodontal são independentes e que elementos da imunidade inata parecem contribuir para a resistência para ambas as doenças (SANZ *et al.*, 2017). E apesar do avanço na abordagem preventiva, continuam sendo as duas principais doenças relacionadas à cavidade bucal (PETERSEN, 2003; SANZ *et al.*, 2017) e principais responsáveis pela perda dentária impactando negativamente na qualidade de vida (SANZ *et al.*, 2017).

Segundo consenso da *European Organisation for Caries Research* (ORCA) e do Grupo de pesquisa em Cariologia da *International Association for Dental Research* (IADR), a cárie dentária é considerada uma doença mediada por biofilme, modulada pela dieta, dinâmica, multifatorial, não transmissível, resultando em perda de tecidos orgânico e mineral da estrutura dentárias (FEJERSKOV, 1997; PITTS *et al.*, 2017). É determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais (MACHIULSKIENE *et al.*, 2019).

O *Global Burden of Disease* (GBD) é um estudo de referência que mostrou que a prevalência de cárie dentária em dentes permanentes está em primeiro lugar entre 328 doenças. Aproximadamente 2,3 bilhões de pessoas em todo o mundo têm cárie em seus dentes permanentes, com anos vividos com a doença totalizando 1,62 milhão, um aumento de 9,4% em comparação com a taxa de incidência em 2007 (JAMES *et al.*, 2018).

Em 2019, nova atualização dos dados incluindo dados relativos a cárie não tratada em 204 países ao longo de 30 anos (1990 a 2019) demonstrou que no ano de 2019 no mundo ocorreram 3,09 bilhões de novos casos em dentes permanentes (aumento de 48%), e 2 milhões de anos vividos com a doença (aumento de 45,64%), considerando o início da análise em 1990. Nestes 30 anos, a taxa de incidência padronizada por idade mostrou uma tendência de 1,15 bilhão de novos casos de cárie dentária não tratada em dentes decíduos e uma tendência estável para os dentes permanentes, com pico nas idades de 5-9 e 20-24 anos (QIN; ZI; ZENG, 2022).

Assim como a cárie, a doença periodontal (DP) é uma doença crônica não transmissível (DCNT), considerada um importante problema de saúde pública, com prevalência em torno de 20 a 50% da população global, sem diferença entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (NAZIR, 2017). Pode variar de acordo com contexto social (KASSEBAUM *et al.*, 2016) mas

a transição demográfica e o envelhecimento da população podem ter relação com o aumento da prevalência especialmente em países desenvolvidos (NAZIR, 2017).

O papel do biofilme microbiano na manutenção da saúde oral e no desenvolvimento da cárie e doença periodontal foi discutido em um workshop realizado pela EFP/ORCA que resultou na publicação de Sanz *et al.* (2017). Dentre os principais achados os autores destacam que o biofilme é um componente essencial envolvido no desenvolvimento das duas patologias e que, portanto, conhecer sua composição e interações microbianas é fundamental para estabelecer medidas preventivas e terapêuticas (SANZ *et al.*, 2017).

A formação da estrutura complexa dos biofilmes é um processo de várias etapas começando com bactérias aderindo às superfícies dentárias usando as adesinas presentes na parede celular (JIAO *et al.*, 2023; LIN *et al.*, 2021). Neste processo as substâncias poliméricas extracelulares promovem a aderência dos demais microrganismos, formando o biofilme e protegendo os microrganismos da resposta imune do hospedeiro e da ação da antibioticoterapia (CASTILLO PEDRAZA, 2017; LIN *et al.*, 2021). Assim, limitar a população dos principais microrganismos e conseqüentemente diminuir a formação de biofilme são estratégias de prevenção para estas duas doenças (SANZ *et al.*, 2017).

Dentre as diferentes abordagens para controle dos biofilmes orais, o uso de antibióticos no manejo da cárie dentária não é indicado, pois o uso excessivo pode resultar em resistência bacteriana e alterar a flora oral e intestinal (NIU *et al.*, 2021). Além disso, os antibióticos muitas vezes são apenas brevemente eficazes devido a flutuações no ambiente oral (CHENG *et al.*, 2015), além de não apresentarem propriedades remineralizantes para auxiliar no tratamento da cárie dentária (NIU *et al.*, 2021).

Na terapia periodontal antibióticos ou outras substâncias com atividade antibacteriana podem ser aplicados como terapia complementar para inibir o crescimento excessivo de bactérias (CHEN *et al.*, 2017; FRITOLI *et al.*, 2015; GINJUPALLI *et al.*, 2016). Entretanto, o uso de antibióticos pode resultar em efeitos colaterais e resistência antimicrobiana (BIDAULT *et al.*, 2007). Neste contexto, uma estratégia para a redução dos biofilmes seria atuar nas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que atuam como um escudo protetor e encapsulam as bactérias individuais, protegendo-as contra ataques (LI *et al.*, 2023).

Os produtos naturais derivados de plantas medicinais têm se mostrado uma fonte abundante de compostos biologicamente ativos, e muitos deles são a base para o desenvolvimento de novos produtos na indústria farmacêutica (RAUF; JEHAN, 2017). Especificamente na odontologia, poderiam ser associados a dentifrícios e enxaguatórios bucais (BARNETT, 2003).

Outra área que tem se destacado nos últimos anos como uma opção para o tratamento das infecções é a nanotecnologia, que em combinação com química orgânica, tem um enorme potencial para produzir produtos inovadores de forma sustentável com o meio ambiente (AL-KHATTAF, 2021). Assim, desenvolver de novos materiais e terapias complementares com propriedades regenerativas e antimicrobianas para aplicação na Odontologia podem ser possíveis soluções para o tratamento das principais doenças da cavidade oral (DA ROSA *et al.*, 2022; NARCISO *et al.*, 2019; 2021).

De forma terapêutica e preventiva os enxaguatórios bucais são veículos ideais para se incorporar substâncias com propriedades bioativas ou antimicrobianas para diminuir a formação do biofilme dental além de promover o controle da halitose (HORVÁTH *et al.*, 2019).

Como resultado da facilidade de utilização de um enxaguatório bucal, algumas melhorias podem ser esperadas, como: melhorar o hálito e o frescor da boca, prevenção de problemas bucais, como a cárie, , resolução da sensibilidade dentinária, alívio de patologias orais, como ulcerações orais e, sobretudo pela prevenção da formação de biofilme dental (QUATRIN *et al.*, 2017).

No entanto, os enxaguatórios apresentam pouca penetração no ambiente subgingival e a utilização de nanoemulsões com antimicrobianos naturais podem favorecer essa penetração (HORVÁTH *et al.*, 2019). Porém, ao realizar-se uma busca sistemática da literatura para a realização do presente estudo, observou-se um número limitado de publicações que utilizaram a nanotecnologia para o desenvolvimento de enxaguatórios bucais, sendo na maioria estudos *in vitro* utilizando nanoemulsões (HORVÁTH *et al.*, 2019; PALMAS *et al.*, 2020; QUATRIN *et al.*, 2017; SALMANN *et al.*, 2021; SANTANA NETO *et al.*, 2020).

Em geral as nanoemulsões são elaboradas a base de compostos naturais, óleos essenciais, mas a diversidade de óleos utilizados dificulta a comparação entre os resultados. Dentre os óleos essenciais utilizados identificou-se estudo com óleo da planta *Nigella Sativa* (SALMANN *et al.*, 2021), de *Eucalyptus globulus* (QUATRIN *et al.*, 2017), à base de cravo, canela, hortelã-pimenta, tomilho (HORVÁTH *et al.*, 2019), a base de canela (*Cinamomum cassia*) (BATTISTI *et al.*, 2022); a base de capim limão e citral (PALMAS *et al.*, 2020), a base de *Lippia sidoides* (SANTANA NETO *et al.*, 2020).

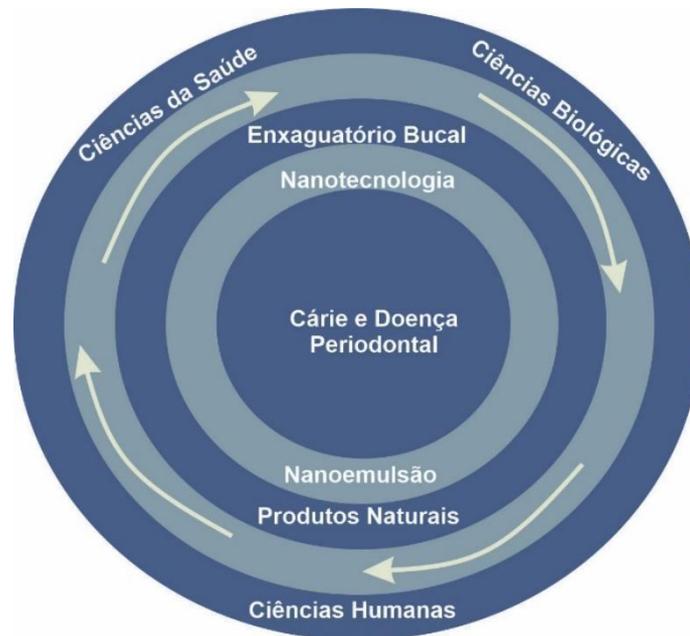
No Brasil, o potencial produtivo dos plantios de eucalipto é superior ao de outros países. A produtividade média no plantio evoluiu de 10 m³/ha/ano (1970) para 38,9 m³/ha/ano (2021) ocupando em 2021 75,8% de toda área plantada no Brasil (IBÁ, 2021). Santa Catarina possui uma área plantada significativa de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) principalmente na região serrana

nos municípios de Otacílio Costa, Lages e Santa Cecília (IBÁ, 2016). Dados sugerem que a planta se adapta melhor em regiões frias (VITTI; BRITO, 2003).

As espécies mais utilizadas na obtenção dos óleos essenciais são *Eucalyptus globulus*, *Corymbia citriodora* e *E. staigeriana* com finalidades aromáticas. O *E. globulus* é uma espécie muito utilizada na exploração de madeira e produção de celulose e suas folhas utilizadas para a extração de óleos essenciais aromáticas (VITTI; BRITTO, 2003).

Diante do exposto o objetivo principal desse estudo foi desenvolver um enxaguatório bucal na forma de nanoemulsão com antimicrobianos naturais, testando sua eficácia *in vitro* contra o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e o *Streptococcus mutans*. Acredita-se que este estudo, caracteriza-se como uma proposta interdisciplinar e inédita à medida que interrelacionam diferentes ciências com um objetivo comum que é avaliar o efeito de um novo enxaguatório a partir de nanoemulsão que possa no futuro ser utilizado na prevenção da doença cárie e periodontal conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Concepção interdisciplinar de pesquisa.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Nesse fractal (Figura 1), observa-se a importância das ciências da saúde, onde se estuda a vida, a saúde das pessoas e no caso específico deste projeto, questões que envolvem a prevenção de doenças orais de alta prevalência como a cárie e doença periodontal. As ciências biológicas, que estudam a vida em várias escalas desde o microscópio com os microrganismos

causadores das referidas doenças até o meio ambiente que o indivíduo está inserido. As Ciências Humanas também tem relação com o tema visto que estes problemas de saúde oral impactam na autoestima e qualidade de vida dos pacientes.

1.1 Pergunta de pesquisa

Quais as propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana de nanoemulsão formulada a base de óleo essencial de eucalipto?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver nanoemulsão a base de óleo essencial de eucalipto para possível aplicação na odontologia preventiva

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar a nanoemulsão a base de óleo essencial de eucalipto.
- Avaliar a atividade antimicrobiana de nanoemulsão a base de óleo essencial de eucalipto frente aos microrganismos relacionados com a cárie e doença periodontal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A cavidade oral se caracteriza com um local ideal para o crescimento e multiplicação de microrganismos (MARSH; MOTER; DEVINE, 2011), com uma complexidade de microflora que varia entre 400 a milhares de espécies, resultando em ações de sinergismo e antagonismo (JAKUBOVICS *et al.*, 2021). A realização da higiene oral adequada, por meios mecânicos e químicos, mantém este ambiente em equilíbrio (ADAM *et al.*, 2022). A perda desse equilíbrio associada a outros fatores pode resultar no surgimento da doença cárie e doença periodontal. Assim, nesta seção serão apresentadas características destas duas doenças e como a nanociência pode se configurar como um aliado na prevenção das mesmas.

3.1 Cárie dentária

As doenças da cavidade oral afetam bilhões de pessoas na atualidade, sendo a cárie dentária a mais prevalente (ROTH, 2018). Nas últimas décadas observa-se uma redução nas taxas de edentulismo que é um importante indicador de saúde oral, e quando há perda, esta acontece mais tarde (SCHWENDICKE *et al.*, 2020).

As mudanças da prevalência de dentes permanentes cariados em 53 países com renda média alta em comparação ao Brasil, foram avaliadas considerando os anos de 1990 e 2017 e utilizando dados secundários do *Global Burden of Disease* (CRESCENTE; GEHRKE; SANTOS, 2022). Observou uma redução na prevalência de cárie não tratada no Brasil de 38,2 %, em 1990, para 37,5 % em 2017, levando o país a ocupar a 41^a posição, atrás de países como, Panamá, Argentina, Paraguai, México, Peru e Costa Rica e Cuba. As principais reduções foram observadas nos países que melhoraram os seus índices de desenvolvimento humano (IDH) (CRESCENTE; GEHRKE; SANTOS, 2022).

No Brasil, os contrastes geográficos, climáticos, culturais e socioeconômicos das diferentes regiões implicam em diferentes IDHs, interferindo por exemplo em quantidades de casa com água encanada. Esta realidade pode ter implicação direta nos índices de cárie dentária uma vez que a fluoretação nas águas de abastecimento é uma forma de prevenir a ocorrência da doença (FRIAS *et al.*, 2007). Neste contexto, vale destacar que a escovação dentária e a fluoretação da água estão entre as medidas preventivas de menor custo (GOMES, 2022).

A capacidade tampão da saliva, com sua função reguladora do pH, neutraliza os ácidos, inibe a desmineralização e favorece a remineralização, recicla o flúor ingerido e dificulta a proliferação do *Streptococcus mutans* (CARVALHO, 2013). Desta maneira criar abordagens

preventivas efetivas para modificar a composição da placa bacteriana, permanece um objetivo promissor (GOMES, 2022).

Ao longo dos anos, observou-se diferentes modelos para explicar esta doença de causa multifatorial. O primeiro deles, descrito por Keyes (1962) apontava a dependência de três fatores: o hospedeiro (dente), a microbiota e a dieta (substrato). Weyne (1992) relaciona fatores secundários e inclui o tempo como quarto fator. Fejerskov e Manji (1990) propuseram um modelo mais complexo de determinantes do processo cariioso. No centro estão os fatores que atuam diretamente na estrutura dentária. Com o tempo, uma mudança ecológica na composição e atividade metabólica do biofilme pode resultar em um desequilíbrio levando a perda de mineral e ao início da formação da lesão cariiosa. Na área mais periférica alocam-se outros determinantes que influenciam o processo individualmente ou na população (FEJERSKOV; MANJI, 1990).

A definição mais recente proposta pela ORCA e IADR classifica a cárie dentária como uma doença mediada por biofilme, multifatorial, não transmissível, modulada pela dieta, (FEJERSKOV 1997; PITTS *et al.*, 2017), mas determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais (MACHIULSKIENE *et al.*, 2019).

Os microrganismos como *Neisseria*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* e *Granulicatella* são metabolicamente altamente especializados e organizados em biofilmes multiespécies e tem sido associado à cárie e às doenças periodontais. A progressão destas envolve múltiplas interações microbianas impulsionadas por diferentes estressores. Na cárie, a exposição dos biofilmes a açúcares e sua fermentação para ácidos orgânicos resulta no aumento de espécies acidogênicas e acidúricas (CHAPPLE *et al.*, 2018).

Revisões sistemáticas avaliando relações entre condições socioeconômicas, psicossociais, tempo de tela, dieta e a cárie dentária identificaram que condições socioeconômicas mais elevadas (SCHWENDICKE *et al.*, 2015), proteção psicossocial (SILVA; LIMA; VETTORE, 2018) e baixa frequência de ingestão de açúcar (MOORES; KELLY; MOYNIHAN, 2022) estão associadas com baixos índices de cárie (MOORES; KELLY; MOYNIHAN, 2022; SCHWENDICKE *et al.*, 2015; SILVA; LIMA; VETTORE, 2018).

As pessoas acometidas pela cárie dentária, podem não ter somente como queixa principal a dor, mas também manifestar seus efeitos em mudanças de hábitos alimentares, de dormir, alteração de comportamento que interferem na vida social do indivíduo (FEITOSA; COLARES; PINKHAM, 2005; LOW; TAN; SCWARTZ, 1999), ou seja, a experiência de cárie pode ter impacto na qualidade de vida do indivíduo. Enquanto conceito a qualidade de vida

(QV) é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “a percepção do indivíduo sobre a sua posição na vida, no contexto da cultura e do sistema de valores nos quais ele vive, e em relação a seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações” (WHO, 1995, p. 1405).

Avançando nesta análise, a qualidade de vida relacionada à saúde oral (QVRSO) pode ser descrita como avaliações subjetivas do indivíduo sobre sua própria saúde, bem como as expectativas e satisfação com cuidado dental (JOHANSSON; ÖSTBERG, 2015). Lockeran *et al.* (2007, p. 409) a definem como o “impacto das desordens e doenças oral nos aspectos diários da vida, os quais têm magnitude suficiente em termos de frequência, e severidade para interferir nas experiências e percepções que os indivíduos têm sobre sua vida como um todo”.

Neste contexto, o tratamento da cárie dentária por meio de restaurações tem como prioridade restabelecer a saúde e preservar o tecido saudável e remineralizável, mantendo a saúde pulpar. Dessa forma, a restauração dentária tem por objetivo recuperar a estética, forma e função do dente (SCHWENDICKE; PARIS; TU, 2015).

Considerando os diversos determinantes da doença, incluindo aspectos ambientais e o alto custo econômico do tratamento convencional, investir na prevenção parecer ser uma opção importante. Entretanto, por vezes, estas ações que teriam um efeito positivo na saúde bucal e até mesmo impacto econômico são negligenciadas (GOMES, 2022). Embora a escovação, uso do fio dental, a fluoretação das águas seja considerada métodos preventivos efetivos (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002) é pertinente destacar a utilização de outros métodos alternativos como por exemplo o uso de enxaguatórios como coadjuvante a ação mecânica e no controle químico da placa bacteriana, na intervenção dos processos inflamatórios e infecciosos instalados na cavidade oral (ARAUJO *et al.*, 2015).

Mesmo em pacientes bem treinados, a limpeza adequada das áreas de difícil acesso e da margem gengival é difícil, o que se agrava por exemplo em pacientes idosos com limitações físicas ou mentais, dentes mal posicionados ou isolados, próteses ou aparelhos ortodônticos (SANTOS, 2003).

Por muitos anos os enxaguatórios tem sido o veículo mais testado para avaliar compostos antimicrobianos classificados em produtos cosméticos ou terapêuticos (TAKENAKA *et al.*, 2018). Os cosméticos mascaram temporariamente a halitose. Os enxaguatórios com finalidade terapêutica por outro lado, possuem ingredientes ativos destinados a ajudar no controle mecânico e na manutenção da saúde bucal (TAKENAKA *et al.*, 2018).

Os enxaguatórios previnem a adesão dos microrganismos que corresponde à etapa inicial na formação do biofilme (TAKENAKA *et al.*, 2018). Ao analisar revisões sistemáticas

de ensaios clínicos randomizados, Takenaka *et al.* (2018) identificaram que o agente ativo mais estudado foi o gluconato de clorexidina (CHX), seguido pelo óleo essencial (EO) e cloreto de cetilpiridínio. Revisões de estudos clínicos tem demonstrado a longo prazo que o uso de formulações orais que contenham CHX e OE fornecem melhorias significativas em termos de placa e índices gengivais sem causar resistência microbiana e alterações na flora microbiana (SREENIVASAN; GAFFAR, 2002).

3.2 Doença periodontal

A periodontite é considerada pela Academia Americana de Periodontia uma doença inflamatória iniciada por bactérias (DONGARI-BAGTZOGLOU, 2008). Entretanto, esta relação entre inflamação e doença não está clara, permanecendo incertezas sobre o que ocorre primeiro: se a resposta imune do hospedeiro ou a alteração na integridade homeostática do biofilme polimicrobiano da mucosa (DONGARI-BAGTZOGLOU, 2008).

Em novembro de 2017, a *American Academy of Periodontology* (AAP) e a *European Federation of Periodontology* (EFP) estabeleceram uma nova classificação para as condições e doenças periodontais e peri-implantares (LANG; BARTOLD, 2018). De acordo com as novas diretrizes considera-se peridonto saudável a ausência de inflamação clínica, caracterizada pela presença de microrganismos comensais gram positivos (*Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Rothia* spp.) em homeostase com o hospedeiro (KIRST *et al.*, 2015). A gengivite é considerada uma inflamação gengival e resposta não específica ao acúmulo de biofilme. Esta condição crônica é caracterizada por um crescimento considerável de organismos principalmente comensais que, em indivíduos suscetíveis causa inflamação e edema dos tecidos moles com formação precoce de bolsas, o que leva ao aumento da diversidade de microrganismo no interior da bolsa e pode resultar na alteração do estado de homeostase (BELKAID; HARRISON 2017).

Em indivíduos susceptíveis a inflamação crônica e a presença de microrganismos anaeróbios na bolsa periodontal podem favorecer a proliferação de certas bactérias que resultam em um processo inflamatório descontrolado e destruição tecidual (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017; LAMONT; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018). Ocorre uma alteração no ambiente em relação a disponibilidade de nutrientes e o potencial de oxidorredução o que aumenta a diversidade de microrganismos formando um biofilme polimicrobiano que resulta na disbiose, que por sua vez potencializa o processo inflamatório e inicia o processo de reabsorção óssea (VAN DYKE *et al.*, 2020).

E com este embasamento Van Dyke *et al.* (2020) propuseram o modelo “*Inflammation-Mediated Polymicrobial-Emergence and Dysbiotic-Exacerbation*” (IMPEDE) para complementar a classificação da doença periodontal proposta por Caton *et al.* (2018). Nesta classificação, parte-se da condição de saúde passando por quatro estágios da doença periodontal (VAN DYKE *et al.*, 2020, p. 511):

0 = Saúde Periodontal
 Estágio I = Gengivite (início da inflamação);
 Estágio II = Iniciação/periodontite precoce (surge a diversidade polimicrobiana);
 Estágio III = Periodontite avançada (inflamação desregulada e formação de bolsas)
 Estágio IV = Periodontite em estágio avançado (disbiose mediada por inflamação, infecção e destruição tecidual avançada).

Desta forma é importante obter informações complementares do paciente como o histórico dos índices de progressão da doença, o risco de progressão futura, saúde geral, análise baseada na história da taxa de doença progressão, avaliação do risco de progressão adicional, antecipação de maus resultados do tratamento. Ainda a avaliação do risco do que a doença ou seu tratamento podem afetar negativamente na saúde geral do paciente e outras exposições como tabagismo permitem que o clínico incorpore fatores individuais do paciente no diagnóstico, que são cruciais para o gerenciamento de cada caso (PAPAPANOU *et al.*, 2018; TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018).

Segundo a EFP o tratamento da doença periodontal abrange diferentes intervenções, visando (a) mudanças comportamentais, biofilme supragengival, inflamação gengival e controle de fatores de risco; (b) instrumentação supra e subgengival, com e sem terapias adjuvantes; (c) diferentes tipos de intervenções cirúrgicas periodontais; e (d) o apoio necessário para os cuidados periodontais a fim de prolongar os benefícios ao longo do tempo (SANZ *et al.*, 2020). O paciente com gengivite pode voltar ao estado de saúde, mas um paciente com periodontite permanece um paciente com periodontite por toda a vida, mesmo após terapia bem-sucedida e requer cuidados de suporte ao longo da vida para prevenir a recorrência da doença. (CHAPPLE *et al.*, 2018).

Assim, o padrão de cuidado para o controle da DP é interromper, por meios mecânicos e químicos (uso de fio dental, escovação, enxaguatórios), o acúmulo de microrganismos patogênicos, mantendo o equilíbrio na relação destes com o hospedeiro (LANG *et al.*, 2021). Muitas vezes com a associação de antibióticos, antissépticos ou probióticos para melhorar os resultados do tratamento (JOHN *et al.*, 2017). Entretanto, o modo de administração desses medicamentos ao local de destino continua um desafio (AMINU *et al.*, 2013). Em particular o

uso de antibióticos sistêmicos tem sido questionado em razão do risco de efeitos colaterais e por não atingir níveis de concentração adequado no local-alvo (OSORIO *et al.*, 2016).

Neste contexto, atenção tem sido dada a desenvolver novos sistema de entrega de drogas locais com eficácia e efeito adverso reduzido (BENATTI *et al.*, 2012) inclusive para aplicação na odontologia (DHINGRA *et al.*, 2021; DUBAR *et al.*, 2021; EMMANUEL *et al.*, 2017) Um sistema de administração local de medicamentos deve liberar o agente de forma controlada, manter sua concentração por período prolongado, ser biodegradável, biocompatível e não irritar os tecidos (JOSHI *et al.*, 2016).

Avanços atuais em nanotecnologia e abordagens de liberacao de drogas baseadas em nanopartículas tem permitido que pesquisadores e clínicos alcançassem os objetivos acima mencionados (DUBAR *et al.*, 2021), fazendo com que possam ser usadas na prevenção de cáries e da doença periodontal (ALKATANI, 2018; SILVESTRE *et al.*, 2021).

3.3 Nanoemulsão

As nanoemulsões são utilizadas como veículos na indústria farmacêutica por apresentar vantagens como transporte de ativos tanto hidrofílicos como lipofílicos na mesma formulação, além de possibilitarem o controle de aspectos sensoriais adaptados às necessidades da via de administração para as quais se destinam (ZIBETTI, 2016). As nanoemulsões são sistemas dispersos entre dois líquidos imiscíveis, cujas gotículas encontram-se com tamanho médio inferior a 200nm (OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2019). Sendo necessário para a estabilização da fase aquosa (água) e fase oleosa (óleo essencial), o uso de tensoativo (ou surfactantes), para a obtenção de amostras homogêneas e estáveis (SIDÔNIO, 2017). A mistura de óleo e água ao repousar, se separará em duas fases distintas devido à coalescência dos glóbulos dispersos. Emulgentes ou agentes emulsionantes podem conferir estabilidade a tais sistemas (JAISWAL *et al.*, 2015).

A formulação de nanoemulsão oferece várias vantagens, como a entrega de drogas, como agentes biológicos ou de diagnóstico. Uma das aplicações mais importantes de nanoemulsão é para mascarar o sabor desagradável de líquidos oleosos. Podem também proteger as drogas, que são susceptíveis à hidrólise e oxidação e prolongar a ação dos medicamentos (JAISWAL *et al.*, 2015).

No contexto do tratamento das afecções bucais, as plantas medicinais representam uma importante alternativa frente aos tratamentos convencionais, pois possuem baixo custo e fácil

acesso, sendo utilizadas como alimentação por muitas gerações e nas últimas décadas sua efetividade antimicrobiana tem sido comprovada (BAIRWA *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais são produtos voláteis extraídos das folhas, cascas e frutos de plantas aromáticas (DAVIDSON; BRANEN, 1993). Amplamente usados no mundo se caracterizam por misturas complexas, com componentes aromáticos voláteis e tem suas propriedades medicinais conhecidas desde a antiguidade (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Mais de 3000 constituintes de óleo voláteis já foram identificados e a maioria apresenta propriedades antibacterianas (DUBAR *et al.*, 2021).

A aplicação destes óleos na Odontologia pode ocorrer de diferentes formas: em dentifrícios, enxaguatórios bucais e géis, principalmente pela sua propriedade antisséptica (DAGLI *et al.*, 2015). Óleos de hortelã-pimenta, tomilho, eucalipto e componentes como timol e eugenol têm demonstrado efeitos potentes em anaeróbios orais estritos e facultativos (SHAPIRO *et al.*, 1994). Estudos de revisão embasam os resultados de superioridade dos constituintes dos óleos (mentol, timol, eucaliptol) em comparação ao placebo e ao controle mecânico de placa, caracterizando-os como uma alternativa à clorexidina para redução de placa e gengivite (ARAUJO *et al.*, 2015; STOOKEN; PARASKEVAS; VAN DER WEIJDEN, 2007).

Mahyari *et al.* (2016) avaliaram o uso de antissépticos bucais a base de extratos hidroalcoólicos de alecrim, calêndula e gengibre no tratamento da gengivite comparados com a clorexidina. Participaram do estudo duplo cego randomizado 60 pacientes que utilizaram o enxaguatório de poliervas, clorexidina ou placebo. Os pacientes usaram diariamente o enxaguatório durante duas semanas. Os índices de sangramento gengival e placa foram mensurados. Os escores foram significativamente inferiores nos grupos testes quando comparados ao placebo. O enxaguatório de poliervas foi efetivo no tratamento da gengivite sendo sua eficácia comparada a clorexidina. Neste estudo, os autores observaram que pode ser recomendado o uso dos extratos como enxaguatório bucal em pacientes que não apresentam resultados a clorexidina ou possuem sensibilidade aos efeitos dessa substância.

Objeto do presente estudo, o óleo essencial de eucalipto é composto por monoterpenos, além de hidrocarbonetos, alcoóis, éteres, cetonas, lactonas, entre outros (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2011). Esses compostos são responsáveis pela ação antimicrobiana deste óleo essencial podendo ser empregados na Odontologia (DHAKAD *et al.*, 2017).

Os mecanismos de ação antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto consistem em desnaturar ação de proteínas bacterianas, inativar enzimas microbianas, alterar a permeabilidade da membrana de bactérias gram-negativas e quelar íons de cátions presentes no

citoplasma bacteriano (BURT, 2004). Em estudo avaliando sua ação antimicrobiana, o óleo essencial de eucalipto demonstrou efetividade frente as principais bactérias da cavidade oral (*S. aureus* e *E. faecalis*), com eficácia semelhante a clorexidina a 0,12% (padrão ouro como enxaguatório bucal na Odontologia) (MONTEIRO *et al.*, 2021).

Mais recentemente novas formulações de enxaguatórios a base de nanoemulsões têm sido propostas na literatura (BATISTI *et al.*, 2022; HORVÁTH *et al.*, 2019; SALMAN *et al.*, 2021). Em estudo realizado por Batisti *et al.* (2022) as nanoemulsões proporcionaram atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* não sendo verificado sinergismo entre as nanoemulsões de óleo essencial de canela e a clorexidina a 0,12%, não sendo percebida expressiva diferença entre os grupos em relação a substantividade (BATISTI *et al.*, 2022).

Salman *et al.* (2021), em estudo experimental, compararam um enxaguatório com nanoemulsão de óleo essencial de *Nigella sativa* com a clorexidina a 0,12%, mostrando-se a nanoemulsão eficaz frente aos microrganismos cariogênicos comuns. Já os microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus faecalis* foram mais resistentes, embora os resultados tenham sido inferiores a clorexidina (SALMANN *et al.*, 2021).

Usualmente as emulsões dos enxaguatórios bucais a base de óleos essenciais é estabilizada por surfactantes (BATISTI *et al.*, 2022; SALMAN *et al.*, 2021). Como uma nova forma de obtenção dos enxaguatórios Horváth *et al.* (2019) propuseram o preparo das nanoemulsões por *Pickering* (nanoemulsões estabilizadas com partículas sólidas – sem surfactante). Ao avaliarem a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo, cinamomo, hortelã-pimenta, tomilho em comparação as emulsões convencionais, os resultados demonstraram um maior efeito para as nanoemulsões obtidas pelo método de *Pickering*. Os autores relatam que este efeito pode ser atribuído a melhor performance de transporte dos óleos essenciais através do modelo de biofilme de *S. mutans* (HORVÁTH *et al.*, 2019).

Os enxaguatórios também podem ser funcionalizados com lipossomas (vesículas de fosfatidilcolina) carregadas com óleo essencial de capim limão e citral, sendo as formulações biocompatíveis contra queratinócitos (PALMAS *et al.*, 2020). Os autores explicam que a incorporação de óleo essencial de citral proporciona sabor intenso e agradável protegendo contra o estresse oxidativo e acelerando a cicatrização de feridas na mucosa. Assim, lipossomas carregando 50 mg. mL⁻¹ de citral apareceram como dispersão promissora, pois também inibiram a proliferação de *S. mutans*.

Nanoemulsões contendo óleo essencial de eucalipto foram testadas contra *P. aeruginosa* e *Candida* spp. Apenas o óleo livre apresentou uma pequena atividade em altas concentrações

contra o *P. aeruginosa*, e atividade antimicrobiana contra as três espécies de *Candida*, além de potencial antibiofilme (QUATRIN *et al.*, 2017).

Além da atividade antimicrobiana das nanoemulsões, conforme relatado anteriormente (ARAUJO *et al.*, 2015; STOEKEN; PARASKEVAS; VAN DER WEIJDEN, 2007), a caracterização físico química das nanoemulsões tem fundamental importância para comprovar a eficácia do sistema sintetizado.

A caracterização apropriada das nanoemulsões se torna necessária para controlar a estabilidade do sistema, avaliando o comportamento em relação ao seu tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão (NUNES *et al.* 2022).

O tamanho de partícula depende de fatores como: natureza e concentração do polímero e do surfactante na fase orgânica, polaridade dos solventes, natureza e proporção de fases interno-externas. Esses parâmetros podem ser avaliados por espalhamento luz dinâmico (DLS), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (SUNDAR; KUNDU; KUNDU, 2006).

O espalhamento de luz é um método eficaz para caracterização estrutural de polímeros e nanopartículas em solução, pois a intensidade e a distribuição angular da luz espalhada dependem do tamanho e da forma das partículas que provocam o espalhamento em solução.

A espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também denominada como espalhamento de luz dinâmico, mede a flutuação de intensidade do espalhamento de luz causado pelo movimento das partículas em um ângulo fixo $\Theta=173^\circ$, entretanto, não é capaz de medir a dependência angular, e utiliza uma aproximação conhecida como “back scattering”. Esta aproximação é parcialmente válida para sistemas monodispersos e, em sistemas polidispersos, tende a superestimar o valor do raio hidrodinâmico, dada a maior contribuição de partículas grandes na intensidade de espalhamento neste ângulo (NUNES *et al.* 2022).

A análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) é empregada com o objetivo de adquirir informações sobre o tamanho, dispersão e forma dos sistemas nanoparticulados em solução (TIEDE *et al.*, 2008).

Medidas de potencial zeta, dependem principalmente da natureza química do polímero, do agente estabilizante e do pH do meio (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011). De uma forma geral, o potencial zeta avalia a estabilidade das dispersões coloidais em suspensão seguindo a regra de que os valores de potencial zeta maiores do que ± 30 mV indicam partículas altamente carregadas (negativa ou positivamente), proporcionando dispersões fisicamente estáveis devido à repulsão eletrostática imposta pelas cargas (MEHNERT; MÄDER, 2012).

Diante do exposto, observa-se um número limitado de estudos testando nanoemulsões a base de óleos essenciais com aplicação em enxaguatórios bucais. Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver e avaliar as propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana de uma nanoemulsão a base de óleo essencial de eucalipto com finalidades preventivas. O eucalipto foi selecionado em razão das propriedades terapêuticas acima mencionadas e da disponibilidade na região.

Portanto, em conformidade com as diretrizes para elaboração da dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Saúde – PPGAS, a metodologia, resultados, discussão e conclusão desta pesquisa serão a seguir apresentados no formato de artigo.

4 ARTIGO: NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO: UMA POSSÍVEL ALTERNATIVA PARA A ODONTOLOGIA PREVENTIVA

4.1 Resumo

A cárie e a doença periodontal estão entre os principais problemas de saúde bucal. O controle do biofilme dental é determinante para a prevenção o qual pode ser feito pela diminuição do consumo de alimentos fermentáveis, pela correta escovação após as refeições, pelo uso de

enxaguatórios bucais com bases em produtos químicos e até mesmo uso da antibioticoterapia. Devido aos efeitos indesejáveis desses dois últimos, a nanoemulsão pode ser utilizada como uma alternativa de administração local de medicamentos com a liberação de agentes de forma controlada. Assim, o objetivo do presente estudo foi sintetizar, caracterizar e avaliar atividade antimicrobiana de nanoemulsão a base de óleo essencial de eucalipto sobre *Streptococcus mutans* e o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. O estudo se caracteriza por um estudo *in vitro* conduzido em duas etapas. Inicialmente foi realizada a síntese das nanoemulsões com duas espécies de óleo essencial de eucalipto: *Eucalyptus citriodora* (*NanoEE-Citriodora*) e *E. globulus*, (*NanoEE-Globulus*) e sua respectiva caracterização físico-química quanto tamanho de partícula (Z_{ave}), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ), morfologia e pH. Posteriormente, foi avaliada a ação antimicrobiana estimando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dividindo as amostras em quatro grupos: a) *NanoEE-Globulus*; b) *NanoEE-Citriodora*; c) Clorexidina (controle positivo) e d) Água (controle negativo). As amostras de *NanoEE-Globulus* e *NanoEE-Citriodora* apresentaram tamanho de médio em torno de 100 nm, com valores de IP próximo a 0,3. Os valores de potencial zeta variaram entre -19 e -30, pH próximo a 7 e formato esférico. Ambas as nanoemulsões *NanoEE-Globulus* e *NanoEE-Citriodora* foram eficazes no controle de *S. mutans*. A amostra de *NanoEE-Globulus* apresentou uma CIM de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a *NanoEE-Citriodora* apresentou uma CIM em $60 \mu\text{L mL}^{-1}$ (60%) contra esta bactéria gram-positiva, revelando que apresentam atividade inibitória mesmo em concentração próxima a mínima testada. Por outro lado, contra o microrganismo de *A. actinomycetemcomitans* apenas a amostra de *NanoEE-Globulus* apresentou inibição na concentração de $60 \mu\text{L mL}^{-1}$ (60%). Dessa forma pode-se concluir que as nanoemulsões de óleo essencial de eucalipto possuem propriedades bacteriostáticas e características físico-químicas adequadas e tem potencial futuro para aplicação na Odontologia Preventiva, com o intuito de contribuir para a manutenção da saúde bucal e sistêmica.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Odontologia Preventiva. Eucalipto.

4.2 Introdução

A carie dentária é uma doença mediada por biofilme, modulada pela dieta, dinâmica, multifatorial, não transmissível, resultando em perda de tecidos orgânico e mineral (FEJERSKOV, 1997; PITTS *et al.*, 2017). É determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais. Aproximadamente 2,3 bilhões de pessoas em

todo o mundo têm cárie em seus dentes permanentes (VOS, 2017).

Assim como a cárie, a doença periodontal (DP) é uma doença crônica não transmissível (DCNT), considerada um importante problema de saúde pública, com prevalência em torno de 20 a 50% da população global, sem diferença entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (NAZIR, 2017). Pode variar de acordo com contexto social (KASSEBAUM *et al.*, 2016) mas a transição demográfica e o envelhecimento da população podem ter relação com o aumento da prevalência especialmente em países desenvolvidos (NAZIR, 2017).

Considerando os diversos determinantes da doença, incluindo aspectos ambientais e o alto custo econômico do tratamento convencional, investir na prevenção parecer ser uma opção importante. O biofilme é um componente essencial envolvido no desenvolvimento da cárie e da doença periodontal e, portanto, conhecer sua composição e interações microbianas é fundamental para estabelecer medidas preventivas e terapêuticas (SANZ *et al.*, 2017). Entretanto, por vezes, estas ações que teriam um efeito positivo na saúde bucal e até mesmo impacto econômico são negligenciadas (GOMES, 2022).

Embora a escovação, uso do fio dental, a fluoretação das águas seja considerada métodos preventivos efetivos (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002) é pertinente destacar a utilização de outros métodos alternativos como por exemplo o uso de enxaguatórios como coadjuvante a ação mecânica e no controle químico da placa bacteriana, na intervenção dos processos inflamatórios e infecciosos instalados na cavidade oral (ARAUJO *et al.*, 2015). De fato, os enxaguatórios estão entre os veículos mais testados para avaliar compostos antimicrobianos, uma vez que previnem da adesão dos microrganismos que corresponde à etapa inicial na formação do biofilme (TAKENAKA *et al.*, 2018). Dentre os agentes ativos mais estudados estão o gluconato de clorexidina (CHX), seguido pelo óleo essencial (OE) e cloreto de cetilpiridínio (SREENIVASAN; GAFFAR, 2002).

Os óleos essenciais são produtos voláteis extraídos das folhas, cascas e frutos de plantas aromáticas (DAVIDSON; BRANEN, 1993) e tem suas propriedades medicinais conhecidas desde a antiguidade (KALEMBA; KUNICKA, 2003). As espécies mais utilizadas na obtenção dos óleos essenciais são *Eucalyptus globulus*, *Corymbia citriodora* e *E. staigeriana* com finalidades aromáticas. O *E. globulus* é uma espécie muito utilizada na exploração de madeira e produção de celulose e suas folhas utilizadas para a extração de óleos essenciais aromáticas (VITTI; BRITTO, 2003).

No Brasil, o potencial produtivo dos plantios de eucalipto é superior ao de outros países. A produtividade média no plantio evoluiu de 10 m³/ha/ano (1970) para 38,9 m³/ha/ano (2021) ocupando em 2021 75,8% de toda área plantada no Brasil (IBÁ, 2021). Santa Catarina possui

uma área plantada significativa de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) principalmente na região serrana nos municípios de Otacílio Costa, Lages e Santa Cecília (IBÁ, 2016). Dados sugerem que a planta se adapta melhor em regiões frias (VITTI; BRITO, 2003).

A aplicação destes óleos na Odontologia pode ocorrer de diferentes formas: em dentífricos, enxaguatórios bucais, géis, principalmente pela sua propriedade antisséptica caracterizando-os como uma alternativa à clorexidina para redução de placa e gengivite (ARAÚJO *et al.*, 2015; MAHYARI *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2021; STOEKEN; PARASKEVAS; VAN DER WEIJDEN, 2007).

Recentemente formulações a base de nanoemulsões têm sido propostas na literatura os quais têm apresentando atividade antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans* (BATISTI *et al.*, 2022; HORVÁTH *et al.*, 2019).

As nanoemulsões são sistemas dispersos entre dois líquidos imiscíveis, cujas gotículas encontram-se com tamanho médio inferior a 200 nm (OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2019). Sendo necessário para a estabilização da fase aquosa (água) e fase oleosa (óleo essencial), o uso de tensoativo (ou surfactantes), para a obtenção de amostras homogêneas e estáveis (SIDÔNIO, 2017).

A formulação de nanoemulsão oferece várias vantagens, como a entrega de drogas, como agentes biológicos ou de diagnóstico. Uma das aplicações mais importantes de nanoemulsão é para mascarar o sabor desagradável de líquidos oleosos. Podem também proteger as drogas, que são susceptíveis à hidrólise e oxidação e prolongar a ação dos medicamentos (JAISWAL *et al.*, 2015).

No contexto do tratamento das afecções bucais, as plantas medicinais representam uma importante alternativa frente aos tratamentos convencionais, pois possuem baixo custo e fácil acesso, sendo utilizadas como alimentação por muitas gerações e nas últimas décadas sua efetividade antimicrobiana tem sido comprovada (BAIRWA *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de materiais em nanoescala e as propriedades medicinais e antimicrobianas obtidas a partir de plantas podem substituir os métodos tradicionais de tratamento com antibióticos e antimicrobianos em razão de apresentarem características físico-químicas e biológicas únicas, como alta superfície de contato, ação antimicrobiana e antioxidante e atóxica.

Diante do exposto, observa-se um número limitado de estudos testando nanoemulsões a base de óleos essenciais com aplicação em enxaguatórios bucais. Assim, o presente trabalho se propõe a desenvolver e avaliar as propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana de uma nanoemulsão a base de óleo essencial de eucalipto com finalidades preventivas.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Materiais

Foram utilizados os surfactantes monooleato de sorbitano (Span 80), polissorbato 80 (Tween 80) obtidos a partir da Sigma Aldrich Aldrich (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA).

Os microrganismos utilizados foram *Aggregatybacter actinomycetemcomitans* – ATCC 29522, *Streptococcus mutans* ATCC-25175 (adquiridos na Plast Labor-Rio de Janeiro).

Os meios de cultura utilizados foram: ágar Tríplico de Soja (Himedia), ágar de infusão de cérebro e coração (BHI) (Merck).

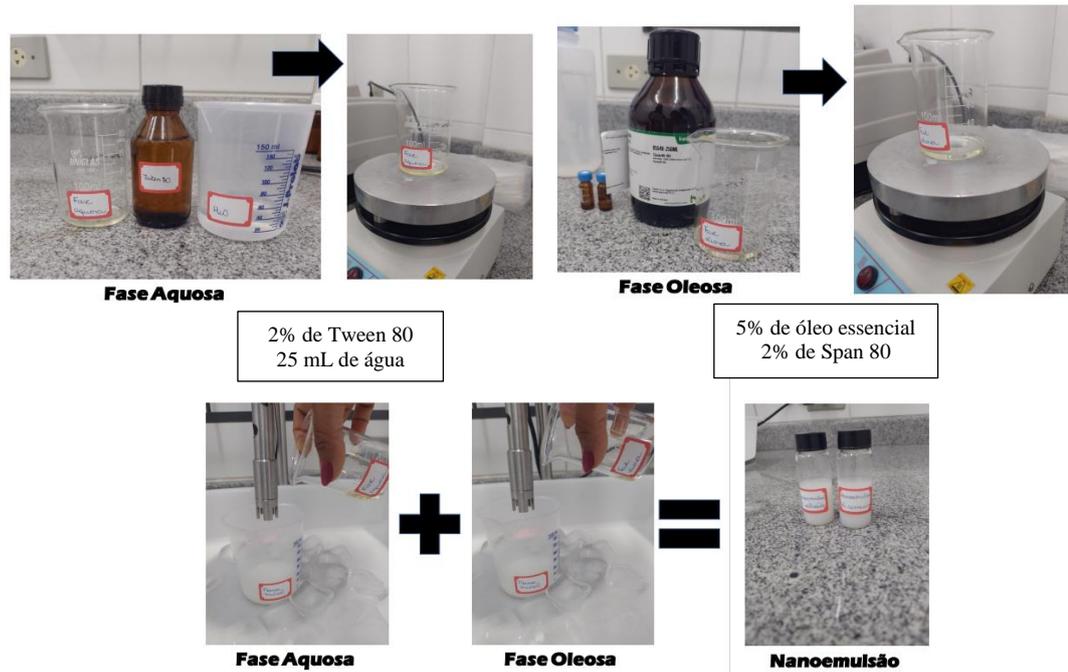
4.3.2 Extração e caracterização dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos das folhas de eucalipto (*Eucalipitus citriodora* e *Eucalipitus globulus*) por extração por arraste de vapor utilizando aparato Clevenger.

4.3.3 Síntese e caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões foram elaboradas com o óleo essencial de eucalipto (n = 3) de acordo com Quatrin *et al.* (2017), de duas cultivares diferentes: *E. citriodora* e *E. globulus*, denominadas de *NanoEE-Globulus* e *NanoEE-Citriodora*, pelo método de emulsificação com alta agitação utilizando o equipamento Ultra Turrax[®]. A fase oleosa da nanoemulsão foi composta por 5% de óleo essencial e 2% de monooleato de sorbitano (Span 80). A fase aquosa foi composta de 2% de polissorbato 80 (Tween 80) e 25 mL de água ultrapura. Ambas as fases foram previamente solubilizadas separadamente com um agitador por 15 min. Logo após, a fase oleosa foi vertida na fase aquosa, sob agitação a 10.000 RPM e a velocidade de agitação foi aumentada para 17.000 RPM e mantida por 1 h com temperatura controlada em banho de gelo.

Figura 1 - Procedimento metodológico para elaboração das nanoemulsões.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023)

4.3.4 Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsão de óleo essencial de eucalipto

A caracterização *físico-química e morfológica* das nanoemulsões de óleo essencial de eucalipto (*NanoEE-Globulus* e *NanoEE-Citriodora*) foi estabelecida pelos parâmetros de tamanho médio de partícula (Z - ave), potencial zeta (ζ - mV), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e potencial hidrogeniônico (pH).

4.3.4.1 Determinação do tamanho de partícula (Z -ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ), morfologia e pH

A determinação do tamanho da partícula (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) das nanoemulsões foram obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz (DLS), utilizando um equipamento Zetasizer Nano Series (*Malvern Instruments*). As amostras de nanoemulsões e amostra controle foram diluídas apropriadamente com água filtrada Milli-Q®, e as medições foram realizadas a 25°C a um ângulo de 173° em triplicata (n=3). Para as medições, as amostras foram colocadas em célula de eletroforese.

A morfologia das nanoemulsões foram avaliadas por meio de MET utilizando um microscópio JEOL modelo JEM -1011 (Tóquio, Japão) operando a 70 kV. As soluções contendo as nanoemulsões e amostra controle foram previamente diluídas em água ultrapura

Milli-Q®, e cerca de 5 µL de cada amostra foi depositada sobre grids de cobre revestidas com carbono (200 mesh). Após secagem à temperatura ambiente, as grids foram observadas no microscópio.

A determinação do pH foi realizada em pHmetro de bancada utilizando eletrodo seletivos para íons H⁺. Os eletrodos foram inseridos nas amostras das nanoemulsão para leitura do pH e os dados foram registrados.

4.3.5 Avaliação antimicrobiana das nanoemulsões

A avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada com a nanoemulsão de óleo essencial de eucalipto, e amostra controle com clorexidina (controle positivo), sendo:

- a) *NanoEE-Globulus*
- b) *NanoEE-Citriodora*
- c) Clorexidina (controle positivo)
- d) Água (controle negativo)

A atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada em microplacas usando o método de microdiluição padrão adaptado do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (documento NCCLS M7-A9, 2012). As amostras de nanoemulsão *NanoEE-Globulus* e *NanoEE-Citriodora* foram primeiro diluídas em água ultrapura estéril para 40, 60, 80 e 100 µL/mL. Em seguida, 5 µL de cultura bacteriana (10⁵ UFC/mL) foram inoculados em poços contendo 90 µL de caldo TSB (ágar Tríplico de Soja) e 10 µL das nanoemulsões (*NanoEE-Globulus* e *NanoEE-Citriodora*) em diferentes concentrações. *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29522) e *S. mutans* (ATCC-25175) (gram positivo) foram usados nos testes.

Poços de controle negativo foram preparados substituindo as amostras por água ultrapura estéril sem o inóculo bacteriano e o controle positivo substituindo as amostras por clorexidina e o inóculo bacteriano.

As placas foram incubadas a 35°C por 16-20 h, em jarra de anaerobiose. A inibição do crescimento bacteriano foi realizada por turbidez em relação aos poços controle. Os poços contendo um meio que não apresentou turbidez foram replicados em placas de ágar nutriente e incubados a 37 °C por 24 horas para classificá-los como bactericidas ou bacteriostáticos.

4.3.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como médias e desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias por meio do teste de ANOVA e Tukey com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa STATISTICA.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Caracterização físico-química das nanoemulsões

4.4.1.1 Tamanho de partícula e Índice de polidispersão

Neste estudo as nanoemulsões de *NanoEE-Globulus* e apresentaram menores tamanho de gotícula quando comparado as nanoemulsões de *NanoEE-Citriodora*. Ambas as nanoemulsões apresentaram comportamento de estabilidade físico-química com relação aos parâmetros de tamanho das gotículas e índice de polidispersão, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Determinação do tamanho médio, IP, potencial zeta e pH.

Amostra	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	pH
1 <i>NanoEE-Globulus</i>	117,2 ± 0,9b	0,214±0,03a	-19,2±0,5a	6,6±0,17a
2 <i>NanoEE-Citriodora</i>	168,8±1,2a	0,209±0,001a	-33,8±1,2b	6,8±0,02a

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) quando analisado pelo teste de Tukey na coluna

Legenda: IP: índice de polidispersão

Fonte: Autores (2023)

Neste estudo, as amostras de *NanoEE-Globulus* e *NanoEE-Citriodora* apresentaram tamanho de médio em torno de 100 nm, e com valores de IP próximo a 0,3.

O tamanho das gotículas da nanoemulsão depende de fatores como: natureza e concentração do surfactante na fase aquosa e oleosa, natureza do óleo essencial utilizado, polaridade dos solventes, natureza e proporção da fase aquosa e oleosa (CIMINO *et al.* 2021)

É recomendado pela literatura, que tamanho reduzido de diâmetro das gotículas, variando entre 100 e 200 nm, como os resultados encontrados no presente estudo, são fundamentais para a absorção e distribuição *in vivo* das suspensões (da ROSA, 2020)

Além disso, ao se pensar em desenvolver uma nova formulação com finalidade terapêutica, estes são pontos-chaves para a liberação da agente: o tamanho e a uniformidade das gotículas, no caso de uma nanoemulsão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Quanto maior o IP, maior a faixa de tamanho de partícula e, conseqüentemente, mais heterogêneo é o tamanho das gotículas na nanoemulsão (SOUTO *et al.*, 2022). Resultados de IP abaixo de 0,3 (como no presente estudo) revelam uma distribuição estreita de tamanho, e uma boa homogeneidade da nanoemulsão (QUATRIN *et al.*, 2017).

Quanto menor o valor obtido de IP ($\leq 0,2$) maior o grau de homogeneidade no tamanho das gotículas (QUATRIN *et al.*, 2017). Fato importante a se considerar, quando se pensa na possibilidade de desenvolvimento futuro de um enxaguatório bucal, pois se o sistema se mantém com tamanho homogêneo das gotículas, isso contribui para a estabilidade físico-química do produto (BATISTI *et al.*, 2022).

4.4.1.2 Potencial zeta e pH

No presente estudo as nanoemulsões de *NanoEE-Globulus* e *NanoEE-Citriodora* possuem valores de potencial zeta variando entre -19 e -30 e valores de pH próximo a 7 (tendendo a neutralidade, conforme demonstrado na Tabela 1).

O surfactante polissorbato 80 por possuir uma parte apolar que interage com o óleo, e uma parte polar direcionado para a parte externa da nanoemulsão, expõe a carga negativa para a nanoemulsão, resultando em uma densidade superficial negativa, devido à presença de átomos de oxigênio na molécula (QUATRIN *et al.*, 2017).

Medidas de potencial zeta, dependem principalmente dos agentes estabilizantes e do pH do meio (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011). O potencial zeta reflete a carga superficial das nanoemulsões, e indica a estabilidade da nanoemulsão, de acordo com as forças de repulsividade entre as gotículas e as mudanças de potencial na superfície das mesmas (da ROSA *et al.*, 2020). Ainda, avalia a capacidade que as partículas conseguem manter em suspensão, isto é, sem agregar ou sedimentar (PATIL *et al.*, 2007).

De uma forma geral, o potencial zeta avalia a estabilidade das nanoemulsões seguindo a regra de que os valores de potencial zeta maiores do que ± 30 mV indicam gotículas carregadas (negativa ou positivamente), proporcionando emulsões fisicamente estáveis devido à repulsão eletrostática imposta pelas cargas, quando são utilizados surfactantes catiônicos (NUNES *et al.* 2022).

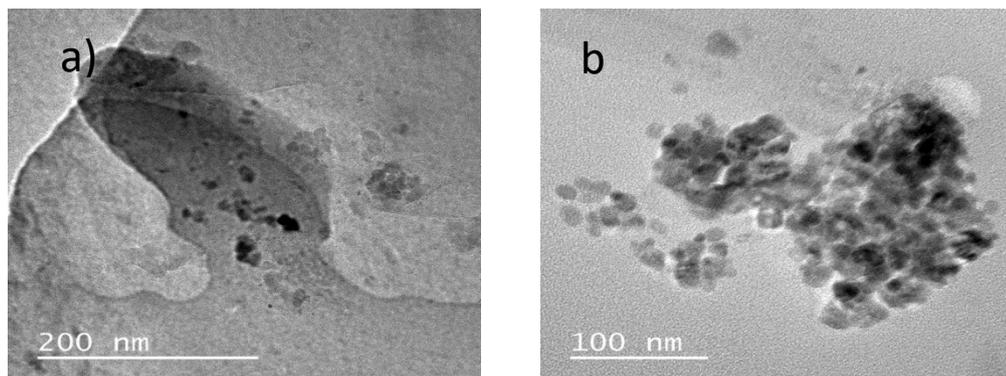
No entanto, quando se utiliza surfactantes aniônicos em bloco, como o polissorbato 80 (tween 80) e monooleato de sorbitano (Span 80), como no presente estudo, a estabilidade da dispersão é conferida por impedimento estérico, evitando a coalescência das partículas e permitindo estabilidade físico química (da ROSA *et al.* 2020). Além disso, a ausência da repulsão eletrostática é confirmada também pelos resultados de pH tendendo a neutralidade.

No entanto, a literatura afirma, quando há uma estabilização estérica adicional (como neste caso o Tween 80) valores em torno de 20 mV já são suficientes para manter a estabilidade do sistema coloidal (de MELO *et al.* 2021).

4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Através das micrografias obtidas por Microscopia eletrônica de transmissão, observa-se a morfologia das partículas, que apresentam formato esférico (Figura 1), com tamanho diferente da aquela obtida pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (em inglês DLS, *Dynamic Light Scattering*).

Figura 1 - Morfologia das nanoemulsões avaliadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão, sendo (a) *NanoEE-Citriodora* e (b) *NanoEE-Globulus*.



Fonte: Autores (2023)

A análise microscópica fornece uma avaliação precisa do tamanho e forma das gotículas, porém, a variação no tamanho das partículas entre as técnicas de DLS e MET pode ser explicado pelo preparo da amostra para a leitura do microscópio, podendo esta, modificar a área superficial a ser analisada (da ROSA *et al.* 2020).

O preparo da amostra para as medidas de MET requerem técnicas como a evaporação do solvente, achatamento das partículas no *grid* e menor número de partículas visualizadas pela

técnica de microscopia quando comparado à técnica de Espalhamento de Luz (de MELO *et al.* 2021).

4.4.3 Ensaio de Atividade Antimicrobiana: Concentração Inibitória das nanoemulsões

O teste de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a CIM das nanoemulsões. A turbidez foi o parâmetro utilizado para verificar o crescimento do microrganismo nos poços da microplaca. Para isso, a CIM foi a menor concentração entre as testadas, onde não foi verificada a presença de turbidez no meio de crescimento. Ambas as nanoemulsões: *NanoEE-Globulus* e *NanoEE-Citriodora* foram eficazes no controle de *S. mutans* (Tabela 2). A amostra de *NanoEE-Globulus* apresentou uma CIM de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a *NanoEE-Citriodora* apresentou uma CIM em $60 \mu\text{L mL}^{-1}$ (60%) contra esta bactéria gram-positiva, revelando que apresentam atividade inibitória mesmo em concentração próxima a mínima testada. Por outro lado, contra o microrganismo de *A. actinomycetemcomitans* apenas a amostra de *NanoEE-Globulus* apresentou inibição na concentração de $60 \mu\text{L mL}^{-1}$ (60%).

Tabela 2 - Resultado de concentração inibitória mínima e efeito bacteriostático.

Efeito do microrganismo		
<i>Streptococcus mutans</i>		
<i>NanoEE-Globulus</i>	Bactericida	Bacteriostático
100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (100%)	-	-
80 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (80%)	-	-
60 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (60%)	-	-
40 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (40%)	-	X
<i>NanoEE-Citriodora</i>	Bactericida	Bacteriostático
100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (100%)	-	X
80 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (80%)	-	X
60 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (60%)	-	X
40 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (40%)	-	-
<i>Clorexidina</i>	Bactericida	Bacteriostático
100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (100%)	X	X
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>		
<i>NanoEE-Globulus</i>	Bactericida	Bacteriostático
100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (100%)	-	-
80 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (80%)	-	-
60 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (60%)	-	X
40 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (40%)	-	-
<i>NanoEE-Citriodora</i>		
100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (100%)	-	-

80µL mL ⁻¹ (80%)	-	-
60µL mL ⁻¹ (60%)	-	-
40µL mL ⁻¹ (40%)	-	-
Clorexidina	Bactericida	Bacteriostático
100µL mL ⁻¹ (100%)	X	X

Legenda: X indica resultado positivo para Inibição ou controle microbiológico / – Indica que a nanoemulsão não controlou e o microrganismo cresceu.

Fonte: Autores (2023)

Os mecanismos de ação antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto consistem em desnaturar ação de proteínas bacterianas, inativar enzimas microbianas, alterar a permeabilidade da membrana de bactérias gram-negativas e quelar íons de cátions presentes no citoplasma bacteriano (BURT, 2004). Em estudo avaliando sua ação antimicrobiana, o óleo essencial de eucalipto demonstrou efetividade frente a bactérias presentes na cavidade oral (*S. aureus* e *E. faecalis*), com eficácia semelhante a clorexidina a 0,12% a qual é considerada o padrão ouro como enxaguatório bucal (MONTEIRO *et al.*, 2021).

A menor sensibilidade a bactérias gram negativas (*A. actinomycetemcomitans*) contra as nanoemulsões pode ser explicada pelo fato de que esses microrganismos possuem uma camada externa de lipopolissacarídeo (LPS) em sua membrana, limitando a difusão de compostos para o interior da célula (HARKAT-MADOURI *et al.* 2015). No entanto, a maior concentração de agente antimicrobiano é necessária para obter o mesmo efeito obtido em bactérias gram-positivas para bactérias gram-negativas (da ROSA *et al.*, 2020).

Gutiérrez Pineda (2021) em estudo de revisão de literatura, avaliaram o o efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus labill* sobre microrganismos relacionados a doença periodontal, e reportaram uma CMI necessária para inibir a bactéria *P. gingivalis* é 0,28 mg.mL⁻¹; *F. nucleatum* é de 1, 14 mg.mL⁻¹ e *A. actinomycetemcomitans* (AA) é de 9,13 mg.mL⁻¹, ficando desta forma evidente, a maior resistência do AA.

Observa-se uma limitação na literatura para comparação dos resultados do presente estudo, pois além do número limitado de estudos que tenham testados óleos essenciais com a finalidade de aplicação em enxaguatórios bucais, há uma diversidade de apresentações, de metodologias e óleos. Há uma predominância por estudos especificamente *in vitro* (BATISTI *et al.*, 2022; HORVÁTH *et al.*, 2019; PALMAS *et al.*, 2020; QUATRIN *et al.*, 2017; SALMANN *et al.*, 2021; SANTANA NETO *et al.*, 2020), um estudo apresenta uma fase *in vitro* e outra *in vivo* em animais (RISSO *et al.*, 2020) e um ensaio clínico duplo cego randomizado (MAHYARI *et al.*, 2016).

Quanto as características das formulações, estas têm sido testadas na forma de emulsões (PALMAS *et al.*, 2020), nanoemulsões (BATISTI *et al.*, 2022; HORVÁTH *et al.*,

2019; MAHYARI *et al.*, 2016; QUATRIN *et al.*, 2017; RISSO *et al.*, 2020; SALMANN *et al.*, 2021) e microemulsões (SANTANA NETO *et al.*, 2020).

Em relação a diversidade das substâncias testadas observa-se enxaguatório de poliervas com *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis* e *Calendula officinalis* (MAHYARI *et al.*, 2016), com óleo essencial *Eucalyptus globulus* (QUATRIN *et al.*, 2017), à base de cravo, canela, hortelã-pimenta, tomilho (HORVÁTH *et al.*, 2019), a base de capim limão e citral (PALMA *et al.*, 2020), de *Nigella Sativa* (SALMANN *et al.*, 2021) a base de canela (*Cinamomum cassia*) (BATISTI *et al.*, 2022).

No que se refere aos microrganismos testados, também há uma diversidade, como: *Streptococcus mutans* (HORVÁTH *et al.*, 2019; SALMANN *et al.*, 2021), *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Monococcal fecalis*, *Enterococcus faecalis* (SALMANN *et al.*, 2021), *P. aeruginosa* e *Candida spp.* (QUATRIN *et al.*, 2017).

Em estudo recente, Karnjana *et al.*, (2023) identificaram que extratos etanólicos de *Streblus asper*, *Cymbopogon citratus*, *Syzygium aromaticum* podem ser agentes naturais com múltiplas ações sobre o *S. Mutans*. Modificações nas paredes celulares das bactérias foram observadas após o tratamento com os extratos etanólicos aumentando a hidrofobia e diminuindo a formação de biofilme bacteriano em 24h. Ainda os autores reportam que os extratos foram utilizados também para síntese verde de nanopartículas de prata apresentando igualmente resultados satisfatórios.

Neste interim é preciso levar consideração: o quanto as doenças da cavidade oral afetam a população adulta e infantil tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (JAMES *et al.*, 2018); o quanto a saúde oral tem relação com a saúde geral e qualidade de vida dos indivíduos (JOHN *et al.*, 2017); que a cárie dentária é depende da interação de vários fatores que incluem a presença do biofilme microbiano na superfície dentaria, da dieta, fator protetor da saliva, imunidade e genética e que os tecidos duros dentais sofrem desmineralização e remineralização (DES-RE) (MURAS; OTERO, 2020).

Ainda ao se considerar que esse processo DES-RE tem relação com a capacidade de produção acidogênica das bactérias que estão acumuladas no biofilme, o qual apesar de ser uma estrutura complexa multiespécie, inicia com a aderência da bactéria na superfície mineralizada do dente por meio das adesinas (CASTILLO PEDRAZA *et al.*, 2017) e que o *S. Mutans* é o principal microrganismo neste processo limitar sua população ou diminuir a formação de biofilme são formas de prevenção da doença (LIN *et al.*, 2021) .

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido discutida há bastante tempo e ainda são consideradas como agentes importantes pela dificuldade que as bactérias tem de

desenvolver resistência a eles (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Entretanto, a atividade antimicrobiana dos OE não pode ser compreendida por um único componente pois há um sinergismo complexo entre os componentes dos OE que precisa ser mais investigado (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

EXPLORAR EFEITOS COLATERAIS DA CLOREXIDINA E ANTIBIOTICOS

4.5 Conclusão

Em relação as características físico-químicas, as amostras de NanoEE-Globulus e NanoEE-Citriodora apresentaram tamanho de médio em torno de 100 nm, índice de polidispersão próximo as 0,3, potencial zeta entre -19 e -30 e valores de pH próximo a 7.

A NanoEE-Globulus teve efeito bacteriostático superior em relação ao *S. Mutans*. Mas ainda não igual ao clorexidina (mas com potencial efeitos colaterais menores).

4.5 Referências

- ARAÚJO, M. W. B. *et al.* Meta-analysis of the effect of an essential oil-containing mouthrinse on gingivitis and plaque. **The Journal of the American Dental Association**, v. 146, n. 8, p. 610-622, 2015.
- BATISTI, D. L. S. *et al.* Avaliação do efeito antisséptico de nanoemulsão com óleo essencial de canela sobre *Streptococcus mutans*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e33211426314, 2022.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CASTILLO PEDRAZA, M.C. *et al.* Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. **Biofouling**, v. 33, n. 9, p. 722-740, 2017.
- CIMINO, C. *et al.* Essential oils: Pharmaceutical applications and encapsulation strategies into lipid-based delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 327, 2021.
- da ROSA, C. G. *et al.* Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105339, 2020.
- DAVIDSON, P.; BRANEN, A. L. (eds). **Antimicrobials in Foods**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1993.

de MELO, Z. A. P. *et al.* Nanoencapsulation of vitamin D3 and fortification in an experimental jelly model (*Acca sellowiana*): bioaccessibility in a simulated gastrointestinal system. **LWT-Food Science and Technology**, v. 145, p. 111287, 2021.

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 25, n. 1, p. 5-12, 1997.

VOS, T. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1211-1259, 2017.

GUTIÉRREZ PINEDA, S. V. *et al.* Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial *Eucalyptus globulus* labill sobre *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Revisión de la literatura**. 2021.

HARKAT-MADOURI, L. *et al.* Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 148-153, 2015.

HORVÁTH, B. *et al.* Preparation, characterization and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, p. 123-127, 2015.

JOHANSSON, G.; ÖSTBERG, A. L. Oral health-related quality of life in Swedish young adults. **International Journal of Qualitative Studies on Health and Well-being**, v. 10, n. 1, p. 27125, 2015.

JOHN, J. R. *et al.* Prevalence of dental caries, oral hygiene knowledge, status, and practices among visually impaired individuals in Chennai, Tamil Nadu. **International Journal of Dentistry**, v. 2017, p. 1-7, 2017.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KASSEBAUM, N.J. *et al.* Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1603-1658, 2016.

LIN, Y. *et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 667-677, 2021.

MAHYARI, S. *et al.* Evaluation of the efficacy of a polyherbal mouthwash containing *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis* and *Calendula officinalis* extracts in patients with

gingivitis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 22, p. 93-98, 2016.

MONTEIRO, N. F. *et al.* Atividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* no controle de bactérias gráficas orais. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 14, p. e60101420387, 2021.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002.

NAZIR, M.A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **International Journal of Health Sciences**, v. 11, n. 2, p. 72-80, 2017.

NUNES, M. R. *et al.* **Zein Nanoparticles: Bioactive Compounds and Controlled Delivery.** In: Sougata Jana; Subrata Jana. (Org.). *Nanoengineering of Biomaterials Drug Delivery & Biomedical Applications*. 1ed.: John Wiley & Sons, v. 2. p. 411-436, 2022.

OLIVEIRA, T. A. S *et al.* Antibacterial activity of essential oils against oral pathogens. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, n. 4, p. e202200097, 2022.

PALMAS, L. *et al.* Entrapment of *Citrus limon* var. *pompia* essential oil or pure citral in liposomes tailored as mouthwash for the treatment of oral cavity diseases. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 216, 2020.

PATIL, S. *et al.* Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n.31, p. 4600–4607, 2007.

QIN, X.; ZI, H.; ZENG, X. Changes in the global burden of untreated dental caries from 1990 to 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease study. **Heliyon**, v. 8, n. 9, p. e10714, 2022.

QUATRIN, P. M. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 230-242, 2017.

RISSO, N. H. *et al.* Chlorhexidine nanoemulsion: a new antiseptic formulation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p.6935-6944, 2020.

SALMAN, B.N. *et al.* The comparison of antimicrobial effect of *Nigella sativa* nanoparticle and chlorhexidine emulsion on the most common dental cariogenicic bacteria. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 35, n. 149, p.1-7, 2021.

SANTANA NETO *et al.* Development of chlorhexidine digluconate and *Lippia sidoides* essential oil loaded in microemulsion for disinfection of dental root canals: substantivity profile and antimicrobial activity. **AAPS PharmSciTech**, p. 21, n. 302, p. 1-11, 2020.

SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SREENIVASAN, P.; GAFFAR, A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 11, p. 965-974, 2002.

SOUTO, E. B. *et al.* Microemulsions and nanoemulsions in skin drug delivery. **Bioengineering**, v. 9, n. 4, p. 158, 2022.

STOEKEN, J. E.; PARASKEVAS, S.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 7, p. 1218-1228, 2007.

TAKENAKA, S. *et al.* Evidence on the use of mouthwash for the control of supragingival biofilm and its potential adverse effects. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 727, 2022.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cavidade oral consiste em um ambiente complexo com uma diversidade de microrganismos que estão envolvidos nos principais problemas de saúde bucal como cáries, doenças periodontais e patologias pulpares e periapicais. A manutenção da saúde bucal é importante não apenas para as funções fisiológicas como mastigação e fonação, mas também se relaciona a aspectos psicológicos como a autoestima, aspectos importantes para o bem estar e qualidade de vida do indivíduo.

E neste contexto, destaca-se a relevância deste estudo inicial, na perspectiva de desenvolver uma nanoemulsão a base de óleos essenciais que tem potencial futuro para ser aplicada em enxaguatório bucal. Os resultados obtidos mostraram atividade antimicrobiana das amostras NanoEE-Globulus e NanoEE-Citriodora principalmente sobre *S. mutans*, importante bactéria envolvida na formação dos biofilmes orais.

Ainda, destaca-se a importância do estudo por se propor a investigar métodos preventivos alternativos, com base em novos sistemas de transporte de agentes antimicrobianos, que podem ser possíveis soluções para a resistência antimicrobiana, problema fortemente apontado pela literatura científica e organizações de saúde. Desta forma, o estudo alinha-se aos objetivos da Agenda 2030 da ONU, com ênfase para saúde e bem estar, padrões de consumo e produção sustentáveis dos ecossistemas terrestres, à medida que utiliza plantas cultivadas na região do desenvolvimento do estudo.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ADAM, F. A. *et al.* A systematic review and meta-analysis on the comparative effectiveness of *Salvadora persica*-Extract mouthwash with chlorhexidine gluconate in periodontal health. **Journal of Ethnopharmacology**, v.302, p. 115863, 2022.
- ALKAHTANI, R. N. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. **The Saudi Dental Journal**, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2018.
- AL-KHATTAF, F. S. Gold and silver nanoparticles: green synthesis, microbes, mechanism, factors, plant disease management and environmental risks. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 6, p. 3624-3631, 2021.
- AMINU, N. *et al.* Development and evaluation of triclosan loaded poly- ϵ -caprolactone nanoparticulate system for the treatment of periodontal infections. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 1-15, 2013.
- ARAUJO, M. W. B. *et al.* Meta-analysis of the effect of an essential oil-containing mouthrinse on gingivitis and plaque. **The Journal of the American Dental Association**, v. 146, n. 8, p. 610-622, 2015.
- BAIRWA, R. *et al.* Traditional medicinal plants: use in oral hygiene. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 1873-1882, 2012.
- BARNETT, M. L. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. **The Journal of the American Dental Association**, v. 134, n. 6, p. 699-704, 2003.
- BATISTI, D. L. S. *et al.* Avaliação do efeito antisséptico de nanoemulsão com óleo essencial de canela sobre *Streptococcus mutans*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e33211426314, 2022.
- BELKAID, Y; HARRISON, O. J. Homeostatic immunity and the microbiota. **Immunity**, v.46, n. 4, p. 562-576, 2017.

- BENATTI, B. B. *et al.* Effects of a *Mikania laevigata* extract on bone resorption and RANKL expression during experimental periodontitis in rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, p. 340-346, 2012.
- BIDAULT, P.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 73, n. 8, p. 721-725, 2007.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CARVALHO, D. F. N. **Diabetes Mellitus e cárie dentária**. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) - Universidade Católica Portuguesa, Viseu, 2013.
- CASTILLO PEDRAZA, M. C. *et al.* Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. **Biofouling**, v. 33, n. 9, p. 722-740, 2017.
- CATON, J. G. *et al.* A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. S1-S8, 2018.
- CHAPPLE, I. L. C. *et al.* Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. S74-S84, 2018.
- CHEN, R. *et al.* Antibacterial activity, cytotoxicity and mechanical behavior of nano-enhanced denture base resin with different kinds of inorganic antibacterial agents. **Dental Materials Journal**, v. 36, n. 6, p. 693-699, 2017.
- CHENG, L. *et al.* Natural products and caries prevention. **Caries Research**, v. 49, n.1, p. 38-45, 2015.
- CIMINO, C. *et al.* Essential oils: pharmaceutical applications and encapsulation strategies into lipid-based delivery systems. **Pharmaceutics**, v.13, n.3, p. 327, 2021.
- CRESCENTE, L. G.; GEHRKE, G. H.; SANTOS, C. M. Mudanças da prevalência de dentes permanentes cariados no Brasil e em países de renda média-alta nos anos 1990 e 2017. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, n.3, p. 1181-1190, 2022.
- DA ROSA, C. G. *et al.* Applicability of silver nanoparticles and innovation of magnetic nanoparticles in dentistry. *In*: HUSSAIN, C. M.; PATANKAR, K. K. (eds.). **Fundamentals and industrial applications of magnetic nanoparticles**. Woodhead Publishing, p. 317-348, 2022.
- DA ROSA, C. G. *et al.* Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105339, 2020.

- DAGLI, N. *et al.* Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: a review. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 5, n. 5, p. 335-340, 2015.
- DAVIDSON, P.; BRANEN, A. L. (eds). **Antimicrobials in Foods**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1993.
- DHAKAD, A. K. *et al.* Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 833-848, 2017.
- DHINGRA, K. *et al.* Mucoadhesive silver nanoparticle-based local drug delivery system for peri-implantitis management in COVID-19 era. Part 1: antimicrobial and safety in-vitro analysis. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 12, n. 1, p. 177-181, 2022.
- DONGARI-BAGTZOGLU, A. Mucosal biofilms: challenges and future directions. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 6, n. 2, p. 141-144, 2008.
- DUBAR, M. *et al.* In-situ forming drug-delivery systems for periodontal treatment: current knowledge and perspectives. **Biomedical Materials**, v. 16, n. 6, p. 062003, 2021.
- EMMANUEL, R. *et al.* Antimicrobial efficacy of drug blended biosynthesized colloidal gold nanoparticles from *Justicia glauca* against oral pathogens: a nanoantibiotic approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 295-302, 2017.
- FEITOSA, S.; COLARES, V.; PINKHAM, J. The psychosocial effects of severe caries in 4-year-old children in Recife, Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1550-1556, 2005.
- FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 25, n. 1, p. 5-12, 1997.
- FEJERSKOV, O.; MANJI, F. Risk assessment in dental caries. In: BADER, J. D. (ed.). **Risk assessment in dentistry**. Chapel Hill (NC): University of North Carolina Dental Ecology, 1990. p. 215-217.
- FRIAS, A. C. *et al.* Determinantes individuais e contextuais da prevalência de cárie dentária não tratada no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 22, n. 4, p. 279-285, 2007.
- FRITOLI, A. *et al.* The effect of systemic antibiotics administered during the active phase of non-surgical periodontal therapy or after the healing phase: a systematic review. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, p. 249-254, 2015.
- VOS, T. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1211-1259, 2017.

GINJUPALLI, K. *et al.* Antimicrobial activity and properties of irreversible hydrocolloid impression materials incorporated with silver nanoparticles. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 115, n. 6, p. 722-728, 2016.

GOMES, M. P. Paradigma da cárie dentária: etiologia e tratamentos preventivos e restauradores minimamente invasivos. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 16, n. 1, p.83-99, 2022.

HAJISHENGALLIS, G.; KOROSTOFF, J. M. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 116-151, 2017.

HORVÁTH, B. *et al.* Preparation, characterization and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

IBÁ – INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório IBÁ 2016. Disponível em: https://www.iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf

IBÁ– INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório IBÁ 2021. Disponível em: <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf>

JAIWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, p. 123-127, 2015.

JAMES, S. L. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v.392, n.10159, p.1789-1858, 2018.

JAKUBOVICS, N.S. *et al.* The dental plaque biofilm matrix. **Periodontology 2000**, v. 86, n. 1, p. 32-56, 2021.

JIAO, Y. *et al.* Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v.11, p. 1-11, 2019.

JOHANSSON, G.; ÖSTBERG, A. Oral health-related quality of life in Swedish young adults. **International Journal of Qualitative Studies on Health and Well-Being**, v. 10, p. 27125, 2015.

JOHN, M. T. *et al.* Network meta-analysis of studies included in the Clinical Practice Guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. 6, p. 603-611, 2017.

JOSHI, D. *et al.* Advanced drug delivery approaches against periodontitis. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p. 363-377, 2016.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

- KASSEBAUM, N.J. *et al.* Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1603-1658, 2016.
- KEYES, P. H. Dental caries in the molar teeth of rats. I. Distribution of lesions induced by high carbohydrate low-fat diets. **Journal of Dental Research**, v. 37, n. 6, p. 1077-1087, 1958.
- KIRST, M. E. *et al.* Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 783-793, 2015.
- LAMONT, R.J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 745-759, 2018.
- LANG, N.P.; BARTOLD, P. M. Periodontal health. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. S9-S16, 2018.
- LI, Y. *et al.* Disruption of biofilms in periodontal disease through the induction of phase transition by cationic dextrans. **Acta Biomaterialia**, v.158, n.1, p. 759-768, 2023.
- LIN, Y. *et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 667-677, 2021.
- LOCKERAN. D. *et al.* Disparities in oral health-related quality of life in a population of Canadian children. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 35, n. 5, p. 348-356, 2007.
- LOW, W.; TAN, S.; SCWARTZ, S. The effect of severe caries on the quality of life in young children. **Pediatric Dentistry**, v. 21, n. 6, p. 325-6, 1999.
- MACHIULSKIENE, V. *et al.* Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. **Caries Research**, v. 54, n. 1, p. 7-14, 2020.
- MAHYARI, S. *et al.* Evaluation of the efficacy of a polyherbal mouthwash containing *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis* and *Calendula officinalis* extracts in patients with gingivitis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 22, p. 93-98, 2016.
- MARSH, P. D.; MOTER, A.; DEVINE, D.A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 16-35, 2011.
- MEHNERT, Wolfgang; MÄDER, Karsten. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012
- MONTEIRO, N. F. *et al.* Atividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* no controle de bactérias gráficas orais. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 14, p. e60101420387, 2021.

MOORES, C. J.; KELLY, S. A. M.; MOYNIHAN, P. J. Systematic review of the effect on caries of sugars intake: ten-year update. **Journal of Dental Research**, v. 101, n. 9, p. 1034-1045, 2022.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. **Advances in colloid and interface science**, v. 163, n. 2, p. 90-122, 2011.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002.

MURAS, A.; OTERO, A. Breaking bad: Understanding how bacterial communication regulates biofilm-related oral diseases. **Trends in Quorum Sensing and Quorum Quenching**, p. 175-185, 2020.

NARCISO, A. M. *et al.*, Antimicrobial green silver nanoparticles in bone grafts functionalization for biomedical applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 102074, 2021.

NARCISO, A. M. *et al.* Síntese verde de nanopartículas de prata para uso em biomateriais odontológicos. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, p. 64-73, 2019.

NAZIR, M.A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **International Journal of Health Sciences**, v. 11, n. 2, p. 72-80, 2017.

NIU, J. Y. *et al.* Antimicrobial peptides for the prevention and treatment of dental caries: A concise review. **Archives of Oral Biology**, v. 122, p. 105022, 2021.

NUNES, M. R. ; da ROSA, C. G. ; BORBA, J. R. ; SANTOS, G. M. ; FERREIRA, ANA LETÍCIA ANDRADE ; BARRETO, PEDRO LUIZ MANIQUE . Zein Nanoparticles: Bioactive Compounds and Controlled Delivery. In: Sougata Jana; Subrata Jana. (Org.). Nanoengineering of Biomaterials Drug Delivery & Biomedical Applications. 1ed.: John Wiley & Sons, 2022, v. , p. 411-436.

OSORIO, R. *et al.* Bioactive polymeric nanoparticles for periodontal therapy. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0166217, 2016.

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, n. 1, p. 95-102, 2012.

PALMAS, L. *et al.* Entrapment of *Citrus limon* var. *pompia* essential oil or pure citral in liposomes tailored as mouthwash for the treatment of oral cavity diseases. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 216, 2020.

- PAPAPANOU, P.N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. S173-S182, 2018.
- PATIL, S. *et al.* Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n.31, p. 4600–4607, 2007.
- QIN, X.; ZI, H.; ZENG, X. Changes in the global burden of untreated dental caries from 1990 to 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease study. **Heliyon**, v. 8, n. 9, p. e10714, 2022.
- QUATRIN, P. M. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 230-242, 2017.
- RAUF, A.; JEHAN, N. Natural products as a potential enzyme inhibitors from medicinal plants. *In*: SENTURK, M. (ed). **Enzyme Inhibitors and Activators**. Intech, p. 165-177, 2017.
- REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2011.
- RISSO, N. H. *et al.* Chlorhexidine nanoemulsion: a new antiseptic formulation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p.6935-6944, 2020.
- ROTH, G. Global burden of disease collaborative network. global burden of disease study 2017 (GBD 2017) results. Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2018. **The Lancet**, v. 392, p. 1736-1788, 2018.
- SALMAN, B.N. *et al.* The comparison of antimicrobial effect of *Nigella sativa* nanoparticle and chlorhexidine emulsion on the most common dental cariogenic bacteria. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 35, n. 149, p.1-7, 2021.
- SANTANA NETO *et al.* Development of chlorhexidine digluconate and *Lippia sidoides* essential oil loaded in microemulsion for disinfection of dental root canals: substantivity profile and antimicrobial activity. **AAPS PharmSciTech**, p. 21, n. 302, p. 1-11, 2020.
- SANTOS, A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 13-16, 2003.
- SANZ, M. *et al.* Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S5-S11, 2017.
- SANZ, M. *et al.* Treatment of stage I–III periodontitis - The EFP S3 level clinical practice guideline. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, p. 1-60, 2020.

- SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n. 5, p. 726–737, 2003.
- SCHWENDICKE, F. *et al.* Epidemiological trends, predictive factors, and projection of tooth loss in Germany 1997–2030: Part II. Edentulism in seniors. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, p. 3997-4003, 2020.
- SCHWENDICKE, F. *et al.* Socioeconomic inequality and caries: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 1, p. 10-18, 2015.
- SCHWENDICKE, F.; PARIS, S.; TU, Y. Effects of using different criteria for caries removal: a systematic review and network meta-analysis. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 1, p. 1-15, 2015.
- SREENIVASAN, P; GAFFAR, A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 11, p. 965-974, 2002.
- SHAPIRO, S.; MEIER, A.; GUGGENHEIM, B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. **Oral microbiology and immunology**, v. 9, n. 4, p. 202-208, 1994.
- SIDÔNIO, I. A. P. **Avaliação do efeito letal da nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* L. sobre *Bactrocera carambolae* Drew e Hancock (Diptera: Tephritidae)**. 2017. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biodiversidade Tropical). Universidade Federal do Amapá, UNIFAP. Macapá. 2017.
- SILVA, A. N.; LIMA, S. T. A.; VETTORE, M. V. Protective psychosocial factors and dental caries in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Pediatric Dentistry**, v. 28, n. 5, p. 443-458, 2018.
- SILVESTRE, A. L. P. *et al.* Current applications of drug delivery nanosystems associated with antimicrobial photodynamic therapy for oral infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, p. 120078, 2021.
- SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, v. 28, n. 1, p. 12-55, 2002.
- SOUTO, E. B. *et al.* Microemulsions and nanoemulsions in skin drug delivery. **Bioengineering**, v. 9, n. 4, p. 158, 2022.
- STOEKEN, J. E.; PARASKEVAS, S.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 7, p. 1218-1228, 2007.
- SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, 2010.
- TAKENAKA, S. *et al.* Evidence on the use of mouthwash for the control of supragingival biofilm and its potential adverse effects. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 727, 2022.

TIEDE, K. et al. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. **Food additives and contaminants**, v. 25, n. 7, p. 795-821, 2008.

TONETTI, M. S.; GREENWELL, H.; KORNMAN, K. S. Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. S159-S172, 2018.

VAN DYKE, T. E.; BARTOLD, P. M; REYNOLDS, E.C. The nexus between periodontal inflammation and dysbiosis. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 511, 2020.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, v.17, p. 1-30, 2003.

WEYNE, S. Cariologia. *In*: BARATIERI, L. N. *et al.* **Dentística**: Procedimentos preventivos e restauradores. Rio de Janeiro: Quintessence, 1992.

WHO. The WHOQOL Group. The World Health Organization quality of life assessment (WHOQOL): position paper from the World Health Organization. **Social Science & Medicine**, v. 41, n. 10, p. 1403-1409, 1995.

ZIBETTI, F. M. **Desenvolvimento de formulação nanoestruturada contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* para o tratamento tópico do herpes**. 2016. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos da Saúde). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói. 2016.