UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA PAULA DIAS MORENO

**ENCAPSULAMENTO DE EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO (EGCG) EM NANOPARTÍCULAS
PARA USO TÓPICO BUCAL: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Programa: Odontopediatria
Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Prof^a Dr^a Andiana De Rossi

Ribeirão Preto
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreno, Ana Paula Dias

Encapsulamento de Epigallocatequina-3-Galato (EGCG) em Nanopartículas para uso Tópico Bucal: Desenvolvimento, Caracterização e Determinação da Atividade Antimicrobiana *In Vitro*. Ribeirão Preto, 2017.

111p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria

Orientadora: De Rossi, Andiara

1. Epigallocatequina-3-galato
2. Sistemas de Encapsulamento
3. Carreadores lipídicos nanoestruturados
4. Nanopartículas Polimérica
5. Agente Antimicrobiano
6. Quitosana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Moreno, APD. **Encapsulamento de Epigallocatequina-3-galato (EGCG) em nanopartículas para uso tópico bucal: desenvolvimento, caracterização e determinação da atividade antimicrobiana *in vitro***

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Data da defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

ANA PAULA DIAS MORENO

DADOS CURRICULARES

Nascimento	18 de Fevereiro de 1992 – Monte Santo de Minas/MG
Filiação	Andréia Correia e Castro Dias Moreno Luiz Roberto Moreno
2010-2014	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Univerdidade de São Paulo – FORP/USP
2012-2013	Iniciação Científica – Bolsista FAPESP Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Univerdidade de São Paulo – FORP/USP
2013-2014	Iniciação Científica – Bolsista FAPESP Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Univerdidade de São Paulo – FORP/USP
2015-2016	Aperfeiçoamento em Atendimento Odontológico de Pacientes Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Univerdidade de São Paulo – FORP/USP
2015-2017	Curso de Pós-Graduação, nível de Mestrado, em Odontologia, área de concentração: Odontopediatria – Bolsista CNPq Faculdade de Odontologia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FORP/USP

OFEREÇO ESTE TRABALHO

---

*À **Deus**, pelo acalento, pelo exercício da tolerância, pela capacidade de ser útil, pela força da paciência, pelos estímulos que me conduzem, pelas provações que me esclarecem, pelas energias da esperança, pela saúde, pelo bom-ânimo e pelas bênçãos de amor, obrigada meu Deus.*

DEDICO ESTE TRABALHO

---

*À minha mãe **Andréia**, por todo seu amor. É com todo meu afeto que a agradeço por seu apoio, carinho e paciência durante esta etapa tão importante de minha vida. Obrigada, mãe, por não medir esforços para que eu seguisse minhas escolhas. Agradeço também pelos conselhos: sempre pertinentes em todos os momentos! Ser a sua filha é motivo de muito orgulho.*

*Ao meu pai **Beto**, pelo exemplo de bondade. Obrigada por compreender minhas escolhas, por apoiar minhas decisões e estar ao meu lado durante todas as fases de minha vida. Obrigada por acreditar em mim. Eu amo muito o senhor!*

*À minha irmã **Luisa**, pela amizade. Obrigada, Lu, por sua companhia, seu amor, seu apoio, seu incentivo e por me confiar ser exemplo para você. Obrigada por vibrar comigo! Te amo muito!*

*À minha avó **Nídia**, por seu amor e carinho sem medidas. Obrigada por me ensinar a ser curiosa e sempre sonhar e obrigada por me mostrar que um “pouquinho” de teimosia também faz bem! Ao meu avô **Roberto**, pelo exemplo e por sua constante preocupação comigo. Agradeço ao senhor por poder sustentar minhas decisões nos valores que sempre mostrou. Vó e Vô, não existem palavras para agradecer vocês por todo o cuidado comigo. Meu amor por vocês é eterno!*

*À minha tia **Caru**, por ser meu espelho profissional e pessoal. Obrigada pelo apoio em todos os momentos, pelos seus conselhos iluminados e por seu amor e carinho!*

*Às minhas pequenas **Júlia** e **Laura**, pelo amor puro e simples.*

MEUS CARINHOSOS AGRADECIMENTOS

---

*Agradeço ao meu amor **Rafael**, por seu incansável apoio durante estes anos. Mesmo que muitas vezes não tenha sido uma proximidade literal, você esteve sempre perto. Obrigada por seu meu companheiro, meu amigo e parceiro de vida. Agradeço por sempre torcer por mim, por vibrar comigo a cada conquista e por dividir o peso das dificuldades, passando para o plural toda preocupação que surgia, dizendo: “nós vamos resolver isso”. Obrigada por ser um exemplo de dedicação e por me incentivar a sempre lutar por meus sonhos ...e por nossos sonhos... Te amo muito!*

*Agradeço a minha **família**, pelo amor e carinho que nos une. Isto é a coisa mais preciosa da minha vida! Sei o quanto torcem, vibram e compartilham dos meus sonhos. Eu só tenho a agradecer por fazer parte deste laço de amor! Muito obrigada!*

Ser profundamente amado por alguém nos dá força; amar alguém profundamente nos dá coragem.

Lao-Tse

AGRDECIMENTOS ESPECIAIS

---

*Agradeço à minha orientadora **Profª. Drª. Andiana De Rossi**, pela confiança depositada em mim, por sua generosidade e bondade. Por transmitir de forma simples seus grandes conhecimentos e experiências, pelo apoio e orientação e por ser um grande exemplo. Agradeço pela forma carinhosa com que sempre me tratou, pela atenção dada a mim em todos os momentos, por guiar minhas escolhas, pelos conselhos dados, pelas sinceras conversas, enfim, pelo meu bem querer. Andi, sou imensamente grata por tudo!*

*Agradeço à **Profª. Drª. Priscyla Danielly Marcato Gaspari**, pela atenção em todos os momentos, pelos conhecimentos compartilhados e pela paciência em me ajudar a caminhar por este nano-universo tão novo para mim. Obrigada por sua dedicação, carinho, companheirismo e pelos conselhos. Obrigada profa. Pri, pela confiança! Obrigada também ao **Prof. Alexandre Gaspari**, pelos conhecimentos compartilhados, pelo carinho e alto-astrol! Ter conhecido vocês, foi um presente de Deus!*

*Ao Prof. Dr. **Sérgio Luiz de Souza Salvador**, pelas valiosas contribuições e pelo modo gentil com que me recebeu em seu laboratório. Obrigada pelo apoio, pela ajuda e por compartilhar comigo seus conhecimentos e suas experiências. Obrigada por ter acreditado em mim!*

*Agradeço à amiga **Marina Constante Gabriel Del Arco**, técnica do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio, pelos conhecimentos compartilhados, pela paciência e por não medir esforços em me ajudar nos ensaios microbiológicos. Agradeço também pelas conversas sinceras, pelos conselhos e pelos momentos de descontração. Você é muito especial para mim!*

AGRADECIMENTOS

---

*Agradeço ao **Prof. Dr. Roberto Santana da Silva**, pelo apoio, pelos conhecimentos compartilhados e por ser um grande exemplo de professor. Agradeço pelas conversas sempre muito produtivas e esclarecedoras. Obrigada por ceder o laboratório de Química Analítica para as análises no HPLC.*

*Agradeço à técnica do laboratório de Química Analítica, **Juliana Cristina Biazoto de Moraes**, por ter aceitado o desafio de realizar as análises cromatográficas no HPLC e fazê-las com muito empenho e determinação. Obrigada pela atenção e disposição que sempre estiveram presentes por sua parte nesses dois anos. Ju, muito obrigada pela forma educada e carinhosa com que sempre me tratou.*

*Agradeço à **Profª. Drª. Renata Fonseca Vianna Lopez**, por gentilmente disponibilizar o laboratório de Farmacotécnica para realizar as análises no Zeta Sizer.*

*Agradeço à técnica do laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, **Marina Claro de Souza**, pelo carinho com que sempre esclareceu minhas dúvidas. Obrigada pela atenção e apoio, e pela ajuda para caminhar por esse universo tão novo para mim. Obrigada pelas conversas e pela forma solícita com que sempre agendou os horários no Zeta Sizer.*

Meus carinhos e sinceros agradecimentos a todos do Nanobiolab:

*À **Jacqueline Campos**, por desde o início ter me ajudado em tudo que precisei, pela atenção, carinho e amizade. Jacquinha, foi um prazer ter te conhecido e convivido com você por esse tempo! À **Mariza Miranda**, por todo o conhecimento compartilhado, pelos esclarecimentos e pelas análises do NTA. Agradeço também pelo carinho comigo e pelos momentos de descontração. À **Letícia Bueno**, pelo conhecimento compartilhado e pelas risadas. À **Carol Botteon** pela ajuda e pelos esclarecimentos. À **Ivana, Patrícia, Thaís Priscilla**, à técnica **Thaís Massaro** e ao técnico **Luiz Henrique Cenzi** e a todos da família Nanobiolab: essa conquista foi possível graças a ajuda de vocês!*

Ao **Henrique Diniz** e ao laboratório de tecnologia farmacêutica pela contribuição nas análises de DSC.

Ao conterrâneo, **Dr. André Pitondo**, pela conversa esclarecedora e por ter se prestado solícito para me ajudar. Obrigado também por me fazer lembrar da importância de um conselho de mãe.

À **Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, pelos conhecimentos clínicos no atendimento de pacientes especiais e pelos grandes ensinamentos. A senhora é um exemplo de humildade, dedicação e amor.

À **Profª Drª Léa Assed Bezerra da Silva**, pelo exemplo de dedicação e amor à pesquisa e ao ensino. Obrigada pela paciência e pelos conhecimentos compartilhados.

À **Profª Drª Maria Cristina Borsatto**, pelo carinho, pelo companheirismo, pela atenção e pela risada que leva bom humor e alegria a todos à sua volta. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos e por estar sempre disposta a ajudar.

Ao **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, por ser um grande exemplo de professor e pesquisador. Por me fazer despertar a atenção para os detalhes de uma boa didática e uma boa aula. É um orgulho dizer que fui aluna do senhor! Obrigada pelos conhecimentos e pelas orientações nas disciplinas de apresentações de seminários, as quais sempre foram muito enriquecedoras. Muito obrigada por tudo!

À **Profª Drª Alexandra Mussolino Queiroz**, pelos conhecimentos compartilhados e pela atenção dada a mim em todos os momentos em que foi preciso. Obrigada por confiar em mim para realizar o Estágio do Programa PAE, o qual muito contribuiu para a minha formação acadêmica e profissional.

À **Profª Drª Raquel Assed Bezerra Segato**, pelo carinho, atenção, paciência e conhecimentos compartilhados desde a graduação.

Ao **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, pela generosa com que sempre compartilhou seus conhecimentos comigo. Fá, sou imensamente grata por todos os momentos que compartilhamos nesses anos!

*À **Profª Drª Kranya Victória Diáz Serrano**, pelo carinho e conhecimentos compartilhados desde a graduação.*

*Ao **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, pelos valiosos conselhos, experiências e conhecimentos compartilhados. Obrigada pela oportunidade de ter sido aluna do senhor. Não tenho palavras para descrever o quanto o admiro!*

*Aos Professores da Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Profª. Drª. Maria Bernadete Sasso Stuani** e **Profª. Drª. Mírian Aiko Nakane Matsumoto**, pela agradável convivência e pelos conhecimentos transmitidos. Em especial ao **Prof. Dr. Adílson Thomazinho**, por ter, tão gentilmente, me aberto portas na cidade de Cascavel.*

*À **Profª Drª Maria da Conceição Pereira Saraiva**, professora da Disciplina de Epidemiologia, pela atenção e disponibilidade em ajudar.*

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto:

***Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, obrigada pelos conhecimentos compartilhados e pela forma solícita com que sempre orientou nas clínicas. Obrigada pela ajuda e pelas conversas, sempre muito esclarecedoras.*

***Drª Carolina Paes Torres Mantovani**, muito obrigada pelo apoio, carinho, conselhos... Carol, foi um enorme prazer ter convivido com você durante esse tempo. Sou imensamente grata por todos os momentos que compartilhamos!*

***Drª Marília Pacífico Luscisano**, muito obrigada pelo carinho e pela atenção que sempre teve comigo. Obrigada pelos conselhos que me deu e pelas nossas sinceras conversas. Má, obrigada por estar sempre por perto para me ajudar!*

***Marco Antônio dos Santos**, obrigada convivência e pela atenção.*

***Nilza Letícia Magalhães**, querida, obrigada pelo carinho com que sempre me ajudou. Obrigada pelas conversas e pela atenção! Sou grata por tudo o que fez por mim!*

Fátima Aparecida Jacinto, por estar sempre disposta a ajudar e pela convivência.

Fiomena Leli Placciti, obrigada pela convivência durante esses anos. Obrigada por estar sempre pronta para nos ajudar!

Matheus Morelli Zanela, por toda atenção durante esse tempo. Obrigada por ser prestativo e estar sempre disposto a ajudar.

Micheli Cristina Leite Rovanholo, pela disponibilidade e carinho em ajudar em todos os momentos. Mi, sou imensamente grata pela forma carinhosa com que sempre me tratou e pela sua atenção durante todo o curso de Mestrado.

Benedita Viana Rodrigues, pela disponibilidade e atenção durante os atendimentos do CAOPE. Ditinha, sou grata por todos os momentos que convivemos e pelo modo carinho com que sempre me tratou.

Fátima Aparecida Rizoli, pela atenção e ajuda em todos os momentos. Fatinha, obrigada pelos abraços e pelo carinho comigo. Sempre me lembrarei dos bons momentos que passamos!

Aos funcionários da Clínica I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **José Aparecido Neves do Nascimento**, **Vera do Nascimento Scandelai** e **Karina Dadalt Quaglio**, obrigada pela convivência e pela ajuda em todos os momentos.

À funcionaria da Clínica III da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Silvia Helena Campos**, pela amizade desde a minha graduação. Obrigada pelas conversas, conselhos e por sempre querer meu bem! Você é muito especial para mim!

À **Rosemary Alves de Sá**, secretária do curso de especialização em Ortodontia, pela formatação desde trabalho. Rose, obrigada pelo carinho, atenção e pelas palavras de apoio.

Aos alunos do programa de pós-graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto:

Silvana, **Driely**, **Daniele Longo**, **Paula**, **Ana Caroline Fumes**, pela agradável convivência, **Karina**, **Priscilla**, **Carol Maschietto**, pela ajuda e pelas boas conversas, **Ju Arid**, pelos bons conselhos e por estar sempre disposta a ajudar, **Francine**, pela boa convivência, **Elaine**, **Larissa**, **Mariele**, **Thaís**

Xavier, Nicole, Karla, Fernanda, Marjorie, Stephanie, Silvia, Rai, José Guilherme, pelos conhecimentos compartilhados e pela amizade e **Marina Vilela**, por mais do que dividir que a orientadora, mas por ser uma grande amiga e companheira. Agradeço, enfim, a todos pelos momentos compartilhados.

Com todo meu carinho agradeço a minha turma de Mestrado: **Alessandra Parreiro Menino**, por todo seu carinho comigo e pelo grande exemplo que é. Agradeço por não ter ouvido meus conselhos e por ser essa grande e admirável profissional. **Ana Maria Guerra Costa**, pelo seu carinho maternal, por sua atenção e pelos incríveis momentos que compartilhamos. Você é uma pessoa muito especial e terá sempre meu afeto! **Arthur Cunha da Silva**, pela atenção, carinho e pelo exemplo de determinação. **Guido Artemio Marañon Vasquez**, por sua atenção, carinho e também pelo grande exemplo. **Letícia Sgarbi Pinto**, pelos bons momentos que compartilhamos. **Mariana Trevisan**, pela amizade, companheirismo, carinho e afeto. Levarei sempre comigo os bons momentos que vivemos! **Mariana Shirozaki**, pelo companheirismo e pelos bons momentos que compartilhamos. **Thaise Mayumi Taira**, pelo carinho, companheirismo e por ter continuado comigo na pós-graduação, sendo sempre um grande exemplo a seguir.

À minha amiga **Ana Jovina**, pelos bons momentos vividos em Ribeirão Preto. Agradeço pelo carinho e pelas conversas e pelo amparo.

À todas minhas amigas pelo apoio e incentivo. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

---

*À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual reitor **Prof. Dr. Marco Antônio Zago**.*

*À faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual diretora **Profª Drª Léa Assed Bezerra da Silva**, por ser o berço da minha formação profissional há sete anos.*

*À Coordenação do Curso de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora **Profª Drª Alexandra Mussolino Queiroz**, pelas oportunidades dadas à mim.*

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida durante todo o curso de Mestrado.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho: Muito Obrigada!

"O fim duma viagem é apenas o começo doutra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na Primavera o que se vira no Verão, ver de dia o que se viu de noite, com sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para os repetir, e traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre."

José Saramago 1994, viagem a Portugal 2ª edição p. 257

RESUMO

Moreno, APD. Encapsulamento de Epigallocatequina-3-galato (EGCG) em nanopartículas para uso tópico bucal: desenvolvimento, caracterização e determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*. Ribeirão Preto, 2017. 111p. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O uso de agentes químicos coadjuvantes da higienização bucal pode ser necessário para o controle da microbiota cariogênica de indivíduos com alto risco e atividade da doença cárie. Atualmente o agente antimicrobiano mais recomendado é o digluconato de clorexidina (CHX) devido ao seu amplo espectro de ação e efeito residual. Contudo, quando utilizado por longos períodos, este agente químico apresenta efeitos colaterais. Neste contexto, os polifenóis naturais, como a Epigallocatequina-3-galato (EGCG), derivada do chá verde, vêm sendo propostos como alternativa aos agentes antimicrobianos sintéticos. Entretanto, os polifenóis não apresentam estabilidade ao longo do tempo, podendo se oxidar rapidamente. Desta forma, o encapsulamento da EGCG em nanopartículas poderia aumentar a sua biodisponibilidade e estabilidade física e química, manter o efeito deste polifenol no tecido alvo e potencializar sua eficácia farmacológica. Assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas de encapsulamento de EGCG e avaliar, *in vitro*, sua atividade antimicrobiana frente a micro-organismos cariogênicos. Inicialmente, foram preparadas nanopartículas poliméricas (NPP) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), que foram caracterizados e avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana *in vitro* frente aos micro-organismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*. Após a análise dos resultados microbiológicos, o CLN foi selecionado para o encapsulamento da EGCG (CLN-EGCG), por apresentar atividade antimicrobiana frente à todos os micro-organismos avaliados. O CLN-EGCG foi preparado pelo método de emulsão e sonicação e caracterizado quanto ao diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulamento (EE), cristalinidade, capacidade de mucoadesão e morfologia. A atividade antimicrobiana *in vitro* da EGCG livre e encapsulada foi avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). O diâmetro, Pdl e o PZ dos CLN foram 228nm, 0,216 e 36,53mV, respectivamente, sendo que o encapsulamento da EGCG não alterou significativamente estes parâmetros. O CLN apresentou forma esférica, estabilidade por 330 dias e propriedade mucoadesiva devido a presença de quitosana na superfície do CLN. Além disso, a quitosana favoreceu o encapsulamento da EGCG obtendo-se uma EE de ~96%. As concentrações inibitórias e bactericidas mínimas do CLN-EGCG (33,75 a 67,5 µg/mL) foram menores do que as verificadas para a EGCG livre (250 a 2.000 µg/mL), comprovando o aumento do potencial antimicrobiano com o encapsulamento da EGCG em nanocarreadores híbridos. De acordo com esses resultados, o CLN-EGCG, desenvolvido no presente trabalho, constitui um sistema com potencial para o uso tópico bucal, pois além de ser estável e apresentar propriedade de mucoadesão e morfologia adequada, apresentaram alta atividade antimicrobiana frente aos principais micro-organismos envolvidos no processo carioso.

Palavras-chave: epigallocatequina-3-galato; sistemas de encapsulamento; carreadores lipídicos nanoestruturados; nanopartículas polimérica, agente antimicrobiano; quitosana.

ABSTRACT

Moreno, APD. Encapsulation of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in nanoparticles for oral topical use: development, characterization and determination of antimicrobial activity *in vitro*. Ribeirão Preto, 2017. 111p. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The use of oral hygiene adjuvants may be necessary to control the cariogenic microbiota of individuals with high risk and caries disease activity. Currently the most recommended antimicrobial agent is chlorhexidine digluconate (CHX) because of its broad spectrum of action and residual effect. However, this chemical has side effects. In this context, as an Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a derivative of green tea, as an alternative to synthetic antimicrobial agents. However, there is no stability over time and can oxidize rapidly. Thus, the encapsulation of EGCG in nanoparticles can increase their bioavailability and physical and chemical stability, maintain the effect of this polyphenol on the target tissue and potentiate its pharmacological efficacy. Thus, the present study aimed to develop and characterize EGCG encapsulation systems and to evaluate, *in vitro*, its antimicrobial activity against cariogenic microorganisms. Initially, polymer nanoparticles (NPP) and nanostructured lipid carriers (CLN) were prepared and evaluated for their *in vitro* antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* microorganisms. After the analysis of the microbiological results, the CLN was selected for the encapsulation of EGCG (CLN-EGCG), due to its higher antimicrobial activity. The CLN-EGCG was developed by emulsion and sonication method and was characterized in relation to diameter, polydispersity index (Pdl), zeta potential (PZ), encapsulation efficiency (EE), crystallinity, mucoadhesion capacity and morphology. The *in vitro* antimicrobial activity of EGCG and its ability to evaluate minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The diameter, Pdl and PZ of the CLNs were 228nm, 0.216 and 36.53mV, respectively, and the EGCG encapsulation did not significantly alter these parameters. The CLN showed a spherical structure, stability for 330 days and a mucoadhesive property due to a presence of chitosan on the CLN surface. In addition, a chitosan favored EGCG encapsulation resulting in an EE of ~ 96%. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of CLG-EGCG (33.75 to 67.5 µg / mL) were lower than those for free EGCG (250 to 2,000 µg / mL), with increased antimicrobial potential with EGCG encapsulation in hybrid nanocarriers. According to the results, the CLN-EGCG, developed in the present study, constitutes a system with potential for oral topical use, besides being stable and possessing mucoadhesion properties, presented high antimicrobial activity against the main microorganisms involved in the carious process.

Keywords: epigallocatechin-3-gallate; Encapsulation systems; Nanostructured lipid carriers; Polymer nanoparticles, antimicrobial agent; Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula molecular da epigallocatequina-3-galato.....	43
Figura 2 -	Esquematização estrutural das nanopartículas (A) CLN imperfeito (B) CLN amorfo (C) múltiplo CLN.....	47
Figura 3 -	Estrutura química da quitosana.....	48
Figura 4 -	Esquema do método de preparação dos CLN pelo método de emulsão a quente e sonicação.....	57
Figura 5 -	Esquema ilustrativo representando o movimento browniano das nanopartículas e sua correlação com a determinação do diâmetro das mesmas.....	58
Figura 6 -	Esquema ilustrativo da disposição dos grupos avaliados na avaliação da atividade antimicrobiana in vitro em microplacas de cultivo de 96 cavidades.....	62
Figura 7 -	Reação de redução da resazurina.....	63
Figura 8 -	Perfil de distribuição de tamanho por intensidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).....	72
Figura 9 -	Perfil de distribuição de tamanho por intensidade das nanopartículas poliméricas (NPP).....	72
Figura 10 -	Perfil de distribuição de tamanho por intensidade do CLN-EGCG (linha verde) e CLN vazio (linha vermelha).....	75
Figura 11 -	Distribuição de potencial zeta apresentando valores positivos para a CLN-EGCG (linha verde) e CLN vazio (linha vermelha).....	76
Figura 12 -	(A) Valores de diâmetro e índice de polidispersão (Pdl) de CLN vazias em função do tempo, (B) valores de potencial zeta de CLN vazias em função do tempo. Análise de One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey não indicou significância estatística entre os valores de diâmetro, Pdl e PZ em um nível de confiança de 95%.....	77
Figura 13 -	(A) Valores de diâmetro e Pdl de CLN-EGCG em função do tempo. (B) Valores de potencial zeta de CLN-EGCG em função do tempo. Análise de One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey não indicou significância estatística entre os valores de diâmetro, Pdl e potencial zeta em um nível de confiança de 95%.....	77
Figura 14 -	Distribuição de tamanho de partículas em 3D dos CLN pela técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	78
Figura 15 -	(A) Morfologia 2D, (B) Morfologia 3D de carreadores lipídicos nanoestruturados híbridos (CLN) por Microscopia de Força Atômica (AFM).....	79
Figura 16 -	Termogramas da EGCG, Manteiga de Illipê (MI), Pluronic F68, Carreador Lipídico Nanoestruturado vazio (CLN) e com EGCG (CLN-EGCG).....	80
Figura 17 -	Gráfico da variação do potencial zeta e diâmetro de CLN em função da concentração de mucina.....	81
Figura 18 -	Cromatograma de padrão de EGCG na concentração de 20 µg/mL.....	82
Figura 19 -	Curva analítica para quantificação de EGCG por CLAE.....	83

Figura 20 -	Cromatograma do filtrado de CLN vazio.....	83
Figura 21 -	Ilustração das placas de cultura dos CLNs vazios (partículas/mL), CLN-EGCG ($\mu\text{g/mL}$) e EGCG livre ($\mu\text{g/mL}$), na sequência. As setas em vermelho indicam as CBM das formulações para os micro-organismos avaliados.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Micro-organismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana.....	60
Tabela 2 -	Composição e fabricante das formulações experimentais e controle avaliadas.....	61
Tabela 3 -	Composição e fabricante das formulações experimentais e controles avaliados.....	67
Tabela 4 -	Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) das nanopartículas.....	71
Tabela 5 -	Valores de CIM e CBM das suspensões de nanopartículas Poliméricas (NPP) e Carreador Lipídico Sólido híbrido (CLN) vazio frente aos micro-organismos estudados em porcentagem de diluição (v/v).....	73
Tabela 6 -	Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) de CLN-EGCG e CLN vazio e seus desvios padrão (DP).....	75
Tabela 7 -	Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) de CLN-EGCG e CLN vazio e seus desvios padrão (DP).....	76
Tabela 8 -	Valores de entalpia, ponto de fusão e índice de recristalinização (IR) do lipídeo MI, Pluronic F68, EGCG, CLN vazio e CLN-EGCG.....	81
Tabela 9 -	Valores de CIM e CBM da EGCG livre, CLN-EGCG e CLN vazio frente a diferentes micro-organismos.....	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Representação esquemática da distribuição das microplacas de cultivo, sendo uma para cada micro-organismo testado.....	68

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

1. INTRODUÇÃO.....	37
1.1 Etiopatogenia da Cárie Dentária	39
1.2 Medidas Preventivas e Terapêuticas da Cárie Dental	40
1.3 O Chá Verde.....	41
1.4 A Epigallocatequina-3-Galato	42
1.5 Sistemas de Encapsulamento de Fármacos.....	45
1.6 Quitosana.....	47
2. OBJETIVOS.....	51
2.1 Geral.....	53
2.2 Específicos.....	53
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 Preparo das Nanopartículas.....	57
3.1.1 Preparo dos carreadores lipídicos Nanoestruturados (CLN) Híbridos.....	57
3.1.2 Preparo de Nanopartículas Poliméricas (NPP).....	58
3.2 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas Vazias.....	59
3.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Partículas Vazias.....	59
3.3.1 Micro-organismos.....	59
3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Partículas Vazias sobre os Micro-organismos Cariogênicos <i>In Vitro</i> pela Técnica de Microdiluição.....	60
3.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das partículas vazias sobre os micro-organismos cariogênicos <i>in vitro</i>	63
3.4 Quantificação de EGCG por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	64
3.4.1 Condições cromatográficas.....	64
3.4.2 Construção da curva de calibração.....	64
3.4.3 Seletividade para Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE%).....	65
3.4.4 Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE%) por método indireto.....	65
3.5 Análise Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	65
3.6 Avaliação da Interação das Nanopartículas com Mucina.....	66
3.7 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	66
3.8 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	66

3.9 Avaliação da Atividade Antimicrobiana do CLN-EGCG Frente aos micro-organismos Cariogênicos.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 Caracterização Físico-Química dos Carreadores Lipídicos Nanoestrutura dos Vazios (CLN) e Nanopartículas Poliméricas Vazias (NPP).....	71
4.1.1 Determinação de diâmetro, Pdl e potencial Zeta.....	71
4.2 Atividade Antimicrobiana <i>In Vitro</i> para Carreadores Lipídicos Nanoestruturados Vazios (CLN) e Nanopartículas Poliméricas Vazias (NPP).....	73
4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) sobre os micro-organismos cariogênicos <i>in vitro</i>	73
4.3 Caracterização Físico-Química dos CLN Vazios E CLN-EGCG.....	75
4.3.1 Determinação de diâmetro e potencial Zeta.....	75
4.3.2 Avaliação da estabilidade dos CLN-EGCG e CLN vazios.....	76
4.4 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	78
4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	79
4.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	79
4.7 Avaliação da Interação Dos CLN Com Mucina.....	81
4.8 Método Analítico de quantificação de EGCG por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	82
4.8.1 Curva analítica.....	82
4.8.2 Determinação da EE%.....	83
4.9 Atividade Antimicrobiana <i>In Vitro</i>	84
4.9.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) sobre os micro-organismos cariogênicos <i>in vitro</i>	84
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
6. CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

---

1. INTRODUÇÃO

1.1 Etiopatogenia da Cárie Dentária

Apesar da implementação de medidas de prevenção e promoção de saúde bucal e da introdução do uso de fluoretos terem proporcionado significativa redução na prevalência e incidência da doença cárie em todo o mundo, esta doença ainda constitui um problema de saúde pública (*World Health Organization*, 1997; Ministério da Saúde, 2012). Assim, ainda é grande o interesse na busca por medidas que possam reduzir ainda mais a prevalência da doença cárie, existindo, atualmente, muitas pesquisas científicas visando maior compreensão de sua etiopatogenia e prevenção, que resultam no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas (Bowen, 2002; Lagerweij; van Loveren, 2015; Vilela, 2015; Sicca et al., 2016; De Rossi et al., 2016).

A doença cárie é primariamente definida como uma desmineralização dental provocada por ácidos, em especial o ácido lático, produzido como resultado da fermentação de carboidratos por micro-organismos presentes no biofilme bacteriano que se forma na superfície dos dentes (Mash; Martin, 1992; Kt et al., 2013; Durso et al., 2014; Zhang, 2014). Seu desenvolvimento depende da interação de fatores relacionados ao hospedeiro, microbiota e dieta alimentar, inicialmente proposto por Keyes (1962). Em 1988, foi proposta a inclusão de um quarto fator, o tempo, considerando que o processo de desmineralização não é instantâneo (Newbrun, 1988). Atualmente, o conceito de cárie dentária foi ampliado, sendo definida como “doença biofilme-açúcar dependente” (Cury; Tenuta, 2014), “doença dieta-bacteriana” (Bowen, 2002), ou “doença comportamental”, uma vez que fatores determinantes para seu aparecimento são influenciados por fatores modificadores como o comportamento do indivíduo, educação, renda, classe social e conhecimento (Fejeskov, 2004). Desta maneira, para a cárie dental se desenvolver na superfície dental, faz-se necessária a presença de um biofilme dental colonizado por micro-organismos cariogênicos, além da ingestão de uma dieta rica em sacarose, que pode variar em frequência e intensidade (Cury et al., 2014, Neves et al., 2016), sendo este processo influenciado por características individuais, comportamentais e biopsicosociais (Fejeskov, 2003; 2004; Fisher-Owens, 2007).

Os tecidos da cavidade bucal são constantemente colonizados por micro-organismos. A microbiota residente no biofilme bucal é uma comunidade com alta diversidade de espécies que podem variar de um sítio para o outro, coexistindo por meio de interações metabólicas altamente relacionadas (Smith; Pippin, 1998). Estes micro-organismos constituem uma microbiota muito complexa que, por si só, não resulta em doença, visto que eles podem estar presentes em equilíbrio com o hospedeiro (Fejeskov, 2003). A lesão de cárie ocorre, então, quando o equilíbrio é quebrado, ou seja, quando a composição e as atividades metabólicas desta complexa comunidade são modificadas (Burne, 1998; Lemos; Abranches; Brune, 2005). Ao consumirem carboidratos

fermentáveis, as bactérias metabolicamente ativas que colonizam o biofilme dental causam flutuações no pH do meio, que pode resultar na desmineralização do esmalte dental (Manji et al., 1991).

Dentre a microbiota envolvida no início do processo carioso, destacam-se os estreptococos do grupo mutans, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Dzink; Socransky, 1985; Loesche, 1986; Seneviratne et al., 2011). As evidências do papel do *S. mutans* e *S. sobrinus* na cárie dental incluem algumas características, tais como a metabolização rápida de açúcares produzindo ácido lático e outros ácidos orgânicos, além da habilidade em manter seu crescimento e continuar a produzir ácidos em baixos valores de pH. Ainda, estes micro-organismos sintetizam polissacarídeos extracelulares insolúveis, por meio de enzimas glicosiltransferases (GTFs), que permitem seu acúmulo e permanência na superfície dos dentes (Hamada et al., 1980; Loesche, 1986; Schilling; Bowen, 1992, Xu et al., 2011). Posteriormente, são os lactobacilos, principalmente o *Lactobacillus casei*, que devido às suas características acidogênicas e acidúricas promovem lesões progressivas, com conseqüente formação de cavidades (Loesche, 1986; Macpherson et al., 1992; Zhang, 2014).

1.2 Medidas preventivas e Terapêuticas da Cárie Dental

A prevenção da doença cárie inclui a efetiva remoção do biofilme dental, por meio de métodos mecânicos, químicos ou a combinação dos mesmos, além do controle de fatores dietéticos, individuais, sociais, comportamentais e ambientais. A escovação regular é o método individual mais empregado para remoção mecânica do biofilme dental, e quando associada aos dentífricos fluoretados oferece proteção adicional para reduzir a desmineralização e aumentar a remineralização do dente (Moran; Addy, 1984; Frandsen, 1986; Moran; Addy; Made, 1988; Arweiler et al., 2002; Tenuta; Cury, 2013). Entretanto, crianças, pacientes portadores de necessidades especiais, pós-cirúrgicos e idosos podem apresentar dificuldade em realizar adequadamente os procedimentos mecânicos, tornando-se necessário o uso adicional de agentes antimicrobianos para melhor controle do biofilme dental (Sjoblom; Ainamo; Ainamo, 1976; Asahi et al., 2014). Ademais, regiões dentais de fossas e fissuras e superfícies proximais, são locais de difícil atuação mecânica da escovação, apresentando alta concentração microbiana (Shaw, 2010; Borsatto et al., 2013). Desta forma, o uso de agentes químicos como coadjuvantes da higienização bucal pode ser necessário para o controle adequado do biofilme em indivíduos com alto risco e atividade da doença cárie.

Diversos agentes químicos são sugeridos pela literatura para atuar como antimicrobianos bucais, como o digluconato de clorexidina (Osso; Kanani, 2013; Pasich; Bialecka; Marcinkiewicz, 2013; Uzer Celik et al., 2016; Tuon et al., 2017), triclosan (Jones et al., 2000; Prasanth, 2011; Sethi; Karde; Joshi, 2016), cloreto de cetilpiridínio (Mankodi et al., 2005; Costa et al., 2013; Teng et al., 2016) e óleos essenciais (Pizzo et al., 2013; Quintas et al., 2014; Marchese et al., 2017). Contudo, no

atual contexto, o digluconato de clorexidina (CHX) representa o padrão-ouro entre os agentes químicos bucais, sendo o antimicrobiano mais recomendado e mais efetivo na Odontologia (Löue et al., 1976; Lang et al., 1982; Lang; Breck, 1986; Jones, 1997; Twetman, 2004; Varoni et al., 2012; Osso; Kanani, 2013; Uzer Celik et al., 2016; Kouadio et al., 2017). A CHX apresenta amplo espectro de ação contra micro-organismos aeróbios e anaeróbios (Rolla; Melsen, 1975; Tenenbaum; Dahan; Soell, 1999; Osso; Kanani, 2013; Cantarelli et al., 2016), efeito bactericida e bacteriostático contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (Moshrefi, 2002; Mathur et al., 2011; da Costa et al., 2017). O mecanismo de ação da CHX é explicado pelo fato de sua molécula catiônica ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, incluindo ligações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio, causando sua morte por precipitação do citoplasma (Rölla; Melsen, 1975). A substantividade, um dos aspectos mais favoráveis da CHX, é resultante da natureza dicatiônica de sua molécula que possui afinidade especial às estruturas orais, permitindo efeito residual com liberação prolongada do agente e persistência do efeito antimicrobiano (Jones, 2000; García-Caballero et al., 2013; Jain; Jain, 2017).

Embora amplamente utilizada na prática Odontológica, a CHX apresenta efeitos indesejáveis quando utilizada por período prolongado (Parwani et al., 2013). Tais efeitos podem incluir a pigmentação extrínseca de dentes, restaurações e língua (Löue et al., 1976; Moshrefi, 2002; Mathur et al., 2011; Kouadio et al., 2017), irritação e descamação das mucosas, sensibilidade na língua e alteração na sensibilidade gustativa (Quirynen et al., 2005), além de maior quantidade de cálculo supra-gengival (Löue et al., 1976; Lang et al., 1982). Em especial, para o uso na dentição decídua, a CHX pode ser pouco aceita por crianças, por apresentar sabor desagradável (Hambire et al., 2015). Desta maneira, mesmo quando utilizada em baixas concentrações (0,12%), a CHX é contraindicada para o uso por períodos prolongados devido aos supracitados efeitos colaterais deste antimicrobiano. No entanto, até o momento não existe um agente colutório para uso tópico bucal que apresente alta capacidade antimicrobiana, efeito residual e ausência de toxicidade ou efeitos indesejados. Neste contexto, os extratos naturais têm sido propostos como alternativa aos agentes antimicrobianos (Jeon et al., 2011, Jain; Jain, 2017), de modo a minimizar os efeitos adversos das formulações sintéticas, bem como proporcionar alternativas menos tóxicas e mais seguras, principalmente para crianças (Magee, 2007; Rezaei et al., 2016).

1.3 O Chá Verde

Existe atualmente um grande interesse em se utilizar compostos ativos formulados a partir de plantas medicinais com finalidades terapêuticas. Compostos naturais são cada vez mais procurados como alternativas para as drogas sintéticas por constituir uma forma segura de

tratamento que pode provocar menos toxicidade e apresentar custo inferior aos medicamentos industrializados (Brasileiro et al., 2008; Allaker; Douglas, 2009; Mehta et al., 2013; Ntie-Kang et al., 2013; Yousaf et al., 2014). Os recentes avanços científicos e tecnológicos indicam que os produtos naturais podem estar entre as mais importantes fontes de novos medicamentos (Ferreira, 2013; De Rossi et al., 2014; Atanasov et al., 2015; Ferreira, 2015; Pereira; Barros; Ferreira, 2015; Vilela, 2015; De Rossi et al., 2016).

O Chá, segunda bebida mais consumida no mundo, tem sua origem na China (Chen; Lin, 2015). A palavra Chá é utilizada para designar uma infusão aquosa derivada da planta *Camellia sinensis*, que é produzida principalmente como quatro variedades: chá branco, chá verde, chá oolong e chá preto. O chá branco é feito de folhas jovens ou botões; o chá verde é feito das folhas maduras não fermentadas; o chá oolong de folhas parcialmente fermentadas e o chá preto a partir de folhas totalmente fermentadas (Reygaert, 2014). Dentre estas variedades, o chá verde possui a maior quantidade de catequinas (Cabera; Artacho; Giménez, 2006) responsáveis por seu efeito antioxidante (Kuo et al., 2015), antimicrobiano (Ferrazzano et al., 2011; Lee et al., 2012; Neturi et al., 2015), anti-erosivo (Barbosa; Kato; Buzalaf, 2011; Mirkarimi; Toomarian, 2012), anti-inflamatório (Fatemi et al., 2014) e anticarcinogênico (Liu et al., 2014; Ramshankar; Krishnamurthy, 2014).

Os benefícios farmacológicos do chá verde são atribuídos, em sua grande maioria, aos polifenóis presentes na sua composição. Os polifenóis são provavelmente o mais importante componente do chá verde e seus principais representantes são as catequinas (flavan-3-ols), que constituem entre 14% a 33% do peso da folha seca (Cabera; Artacho; Giménez, 2006). As quatro principais catequinas são: epigallocatequina-3-galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) e epicatequina (EC) (McKay; Blumberg, 2002). Dentre as catequinas que compõem o extrato de chá verde, a EGCG é a mais ativa biologicamente e principal responsável por seus efeitos benéficos sobre a saúde.

1.4 A epigallocatequina-3-galato

A epigallocatequina-3-galato (EGCG), derivada do chá verde, é um composto fenólico de fórmula molecular $C_{22}H_{18}O_{11}$, peso molecular 458,372g/mol, ponto de fusão 218°C, sólido nas condições ambientes, solúvel em água e disponível comercialmente em partículas de 5µm (Figura 1).

Figura 1 – Fórmula molecular da epigallocatequina-3-galato.

Os benefícios da EGCG vêm sendo crescentemente relatados nas mais variadas áreas da saúde, incluindo o tratamento e a prevenção de diferentes patologias. Em estudos sobre o câncer, a EGCG inibe a angiogênese, causando deficiência nutricional nas células tumorais (McKay; Blumberg, 2002; Grove et al., 2012; Maruyama et al., 2013; Hashimoto et al., 2013; Braicu et al., 2013; Gu et al., 2013; Shi et al., 2015). Em estudos relacionados com a obesidade, a EGCG apresenta atividade inibitória da lipase pancreática (Friedrich et al., 2012; Snoussi et al., 2014; Bello et al., 2017). Recentes pesquisas abordando a prevenção, o tratamento e as consequências da diabetes comprovam a ação benéfica desta catequina, melhorando a tolerância à glucose e aumentando a secreção de insulina estimulada por glucose (Fu et al., 2011; Ortsäter et al., 2012; Yoon et al., 2014; Rasheed et al., 2107). Em estudos de doenças como Parkinson e Alzheimer, verifica-se grande potencial neuroprotetor da EGCG, devido, em grande parte, à sua ação antioxidante (Mandel et al., 2008; Bitu Pinto et al., 2015; Chesser et al, 2015; Xicota et al., 2017). Na área da Dermatologia e Cosmética (Zink; Traidl-Hoffmann, 2015; Zhang et al., 2016), esta catequina apresenta resultados positivos para o tratamento de queimaduras (Fatemi et al., 2014; Hosnuter et al., 2015) e verrugas víricas (Stockfleth; Meyer, 2014; Aranda Cazón et al., 2015), oferecendo também fotoproteção contra raios UV e consequente prevenção de câncer de pele (Elmets et al., 2001; Yusuf et al., 2007; Camouse et al., 2009).

Na área da Odontologia, o uso da EGCG vem sendo crescentemente relatado, apresentando resultados promissores na ação desta catequina na prevenção e tratamento de doenças periodontais (Morin; Grenier, 2017) e periapicais (Ferreira, 2013), promovendo reparação e regeneração tecidual (Lee et al., 2017) por apresentar ação contra micro-organismos endodontopatogênicos, periodontopatogênicos (Cai et al., 2015) e cariogênicos (Goyal et al., 2017). Pesquisas na área da Periodontia sugerem ser este um promissor agente antimicrobiano, agindo contra os patógenos da

periodontite, como a *Porphyromonas gingivalis*, e anti-inflamatório, reduzindo a expressão de citocinas responsáveis pela reabsorção óssea e destruição de colágeno tecidual (Jung et al., 2012; Cho et al., 2013; Asahi et al., 2014; Cai et al., 2015). A EGCG ainda atua sobre mecanismos de defesa da cavidade bucal, oferecendo proteção epitelial contra o estresse oxidativo (Narotzki et al., 2013), prevenindo e fornecendo o tratamento para diferentes tipos de câncer bucal (Ho et al., 2007; Chen et al., 2011). Ademais, sob condições de erosão e abrasão dentinária a EGCG também pode impedir a degradação da matriz orgânica desmineralizada por atuar na inibição de metaloproteinases, que pode reduzir a perda progressiva de dentina de forma semelhante à clorexidina (Kato et al., 2009; Magalhães et al., 2009; Chen e Huang, 2012). Assim, devido a essas propriedades, a EGCG vem sendo sugerida para ser incorporada a diversos materiais odontológicos, como adesivos dentinários (Du et al., 2012; Santiago et al., 2013; Khamverdi et al., 2013), resinas compostas (Mankovskaia; Lèvesque; Prakki, 2013), cimento de ionômero de vidro (Hu et al., 2013) e dentifrícios (Maruyama et al., 2011; Hrishi et al., 2015).

Os estudos abordando as propriedades anticariogênicas da EGCG revelam atividade antimicrobiana contra os estreptococos do grupo mutans, como o *S. mutans* e *S. sobrinus* (Sakanaka et al., 1989; Yoshino et al., 1996; Ferrazzano et al., 2011; Anita et al., 2014; Sarin et al., 2015; Goyal et al., 2017). A ação antimicrobiana da EGCG frente aos microorganismos cariogênicos é resultado da inibição da enzima glucosiltransferase (GTF), que sintetiza polissacarídeos extra e intracelulares responsáveis pela aderência bacteriana ao dente. Desta maneira, ao inibir a GTF, a EGCG quebra a sequência do desenvolvimento do processo carioso (Subramaniam et al., 2012; Jung et al., 2012; Cai et al., 2013). Ainda, a EGCG é responsável pela inibição da enzima alfa amilase salivar, impedindo a formação de carboidratos fermentáveis envolvidos na formação da cárie dental (Hara et al., 2012; Narotzki et al., 2012) e inibe os fatores de virulência dos estreptococos, responsáveis pela sua acidogenicidade e aciduricidade (Xu; Zhou; Wu, 2012).

Em estudo anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, foi avaliada a atividade antimicrobiana de soluções aquosas de EGCG frente aos micro-organismos cariogênicos *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*, obtendo a comprovação da eficácia desta catequina como antimicrobiano de uso bucal (Vilela, 2016). No entanto, quando formulados em solução aquosa, os polifenóis naturais, como a EGCG, não apresentam estabilidade ao longo do tempo (Lee et al., 2012; Bilia et al., 2017), são muito sensíveis aos fatores ambientais e podem se oxidar rapidamente (Shutava et al., 2009; De Pace et al., 2013), levando ao aparecimento gradual de uma coloração castanha e indesejável, além de apresentar sabor adstringente e também perda considerável de sua atividade (Munin e Edwards-Lévy, 2011; Wang et al., 2014). Contudo, a estabilidade dos polifenóis pode ser alcançada por meio seu encapsulamento em nanocarreadores, mantendo assim a sua atividade biológica (Sanna et al., 2013; Thapa et al., 2013; Li et al., 2015; Xie et al., 2016). Desta maneira, a nanotecnologia poderia

desempenhar um papel importante na melhoria da farmacocinética e farmacodinâmica da EGCG para uso bucal. Ainda, a disseminação do uso de formulações aquosas contendo exclusivamente polifenóis se depara com os elevados custos para a obtenção de seus isolados a partir do extrato, o que torna a formulação onerosa e restrita no que diz respeito à saúde bucal pública (Thassu, 2007; Han et al., 2011).

O uso da nanotecnologia para o encapsulamento de fármacos já é estabelecido na área médica e cosmética (Marcato; Durán, 2008). Estudos envolvendo os mais diversos sistemas de encapsulamento vêm proporcionando alternativas para aperfeiçoar os tratamentos médicos, em sua maioria buscando alternativas para o diagnóstico e a terapia dos mais diversos cânceres (Sanna et al., 2013; Thapa et al., 2013; Li et al., 2015; Xie et al., 2016; Silva, 2016). Os sistemas nanoestruturados podem melhorar a biodisponibilidade oral, aumentar a estabilidade física e química de moléculas, manter o efeito do composto ativo no tecido alvo, minimizando efeitos colaterais e reduzindo a sua toxicidade (Marcato, 2009; Marcato; Durán, 2011; Marcato et al., 2011; Hong et al., 2014; Khan et al., 2014; Marcato; Favaro; Durán, 2014; Satalkar et al., 2015).

Neste contexto, o encapsulamento de EGCG vem sendo crescentemente relatado na literatura, estabelecendo uma promissora alternativa para o aprimoramento das propriedades deste polifenol. Estudos mostraram que o encapsulamento da EGCG em nanopartículas poliméricas aumentou significativamente seu potencial anticancerígeno *in vivo*, inibindo o crescimento tumoral (Sanna et al., 2017). A associação da EGCG com nanopartículas de ouro também potencializa seus efeitos anti-oxidantes (Mukherjee et al., 2014). Ainda, estudos avaliando a diferença entre a utilização da EGCG pura e encapsulada em nanopartículas, revelam que os resultados para a biodisponibilidade oral *in vivo* da catequina encapsulada são mais de duas vezes superiores aos da EGCG livre (Smith et al., 2010; Khan et al., 2014).

As pesquisas propondo o desenvolvimento de formulações à base de EGCG encapsulada são relatadas apenas na área médica, incluindo o tratamento de câncer de próstata (Khan et al., 2014), aterosclerose (Hong et al., 2014), melanoma (Siddiqui et al., 2014), doença de Alzheimer (Smith et al., 2010) na área da Dermatologia (Shin et al., 2014, 2016; Gu et al., 2016;) e da Oftalmologia (Fangueiro et al., 2014). No entanto, na Odontologia não há nenhum estudo propondo o desenvolvimento de uma formulação nanoestruturada contendo EGCG para uso tópico bucal.

1.5 Sistemas de Encapsulamento de Fármacos

Durante as últimas décadas, a nanotecnologia vem se estabelecendo como um promissor campo da ciência sendo crescente a busca pelo desenvolvimento de nanoestruturas, com foco na elaboração de nanomateriais com aplicações potenciais em campos biomédicos e farmacêuticos. Sabe-se que os sistemas de liberação de fármacos baseados em nanomateriais têm potencial para

proporcionar liberação sustentada de fármaco e administração direcionada de compostos ativos (Marcato et al., 2011).

É crescente o número de pesquisas científicas buscando desenvolver tecnologias para sistemas de liberação sustentada. Micelas, lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas têm sido estudadas para este sistema com intuito de manter o efeito do fármaco no tecido alvo, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (Muller et al., 2007; Schwarz; Weixelbaum; Pagitsch, 2012). Dentre os carreadores estudados, destacam-se as nanopartículas poliméricas (NPP) e as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).

As NPP são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm e têm atraído o interesse de muitos grupos de pesquisa, sendo cada vez mais utilizadas para diversas finalidades. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. Esses sistemas podem ser constituídos por polímeros sintéticos como poli (D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poliacrilatos (PA), poli (ϵ -caprolactonas) (PCL), Eudragit ou polímeros naturais como polihidroxialcanoatos (PHA's), gelatina e quitosana (Panyam; Labhasetwar, 2003). Várias técnicas podem ser utilizadas para produzir as NPP, tais como emulsificação e evaporação de solvente, *salting-out*, polimerização *in situ*, nanoprecipitação entre outras.

As NLS são formadas por lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal e estabilizadas por tensoativos, essas partículas são, ainda, biodegradáveis e biocompatíveis. Porém, em geral, as NLS apresentam baixa eficiência de encapsulamento e as moléculas ativas incorporadas na sua matriz lipídica podem ser expulsas durante o armazenamento das formulações. Para superar estas desvantagens, foram desenvolvidos os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) (segunda geração de NLS), sendo considerado um aprimoramento das NLS (Naseri; Valizadeh; Zakeri-Milani, 2015). Existem três tipos de CLN: “CLN imperfeito” (Figura 2a) constituído por uma mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos, “CLN amorfo” (Figura 2b) composto por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos e, “múltiplo CLN” (Figura 2c) formado pela dispersão de alta quantidade de óleo em lipídeo sólido.

Figura 2 – Estrutura das nanopartículas (A) CLN imperfeito (B) CLN amorfo (C) múltiplo CLN.

A Manteiga de Ilipê (MI) pode ser utilizada na formação de CLN. A MI é composta de diferentes ácidos graxos sendo eles o ácido oleico, palmítico e linoleico. Devido a esta mistura de ácidos graxos há a formação de imperfeições na matriz lipídica sólida obtendo-se, portanto, o CLN imperfeito. Essas imperfeições geram mais espaço para acomodar o composto ativo, aumentando assim a eficiência do encapsulamento (Üner et al., 2007; Naseri et al., 2015). Os CLNs imperfeitos compreendem uma classe de nanopartículas de grande importância na atualidade e podem ser preparados por diferentes técnicas como, por exemplo, microemulsão à quente, emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, *nanospray-drying* e homogeneização à alta pressão (Marcato, 2009). Seu tamanho compreende de 80 a 1000 nm (Geszke-Moritz; Moritz, 2016) e seu emprego nas mais variadas áreas da saúde é justificado pelas grandes vantagens deste nanocarreador, que incluem a alta estabilidade, alta capacidade de encapsulamento, baixo custo de produção, biocompatibilidade, possibilidade de ser administrado por diferentes vias e proteção do fármaco contra a degradação (Souto; Müller, 2010, Joshi; Müller, 2009; Mukherjee, 2009; Naseri et al., 2015; Ali; Singh, 2016).

A administração de nanocarreadores para uso tópico bucal pode ainda ser aprimorada com a incorporação de quitosana à sua formulação, resultando assim na produção de nanopartículas híbridas lipídio-polímero, catiônicas, com o objetivo de promover a mucoadesão.

1.6 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiônico hidrofílico obtido de fonte renovável e biodegradável (Sinha et al., 2004). O processo de produção da quitosana compreende a desacetilação da quitina (Amorim et al., 2000; Andrade et al., 2003), um dos biopolímeros mais abundantes na natureza. A quitina é encontrada nos exoesqueletos de crustáceos, na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos. Geralmente o processo de desacetilação ocorre a partir da hidrólise da quitina, em meio alcalino, em temperaturas elevadas sob condições heterogêneas

(Islam et al., 2015; Xu et al., 2015; Patil; Nanduri, 2017). No entanto, este processo também pode ocorrer pela utilização de enzimas específicas e pela ação de micro-organismos (Monteiro Júnior, 1999; Kim; Rajapakse, 2005).

A quitosana é um copolímero natural, biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade, composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina (Figura 3) (Chatterjee et al, 2005). A quitosana apresenta comprovados benefícios biológicos, incluindo a sua capacidade antimicrobiana e propriedade de mucoadesão (Ikinci et al., 2002; Chung et al., 2004; Mohanasrinivasa et al., 2014; Verlee; Mincke; Stevens, 2017)

Figura 3 – Estrutura química da quitosana.

Em pH fisiológico a quitosana apresenta-se como um polycation. Em meio ácido os grupos amino da quitosana são protonados, resultando em uma carga global positiva no polímero. Esta característica permite a sua interação com moléculas carregadas negativamente tais como: gorduras, tecidos animais ou vegetais, membrana celular, mucosas, entre outras formas (Horner et al., 1997; Pawtowska, 1997). Neste contexto, a adesão da quitosana aos tecidos de revestimento da superfície da mucosa bucal é uma característica extremamente favorável no que se diz respeito a sua utilização nos sistemas de liberação de fármacos na cavidade bucal. Assim, os nanocarreadores híbridos com potencial mucoadesivo podem possibilitar a liberação prolongada do fármaco no sítio da ação, mantendo a sua atividade na cavidade bucal por períodos prolongados.

A mucoadesão ocorre por meio da adesão de um polímero à superfície da mucosa e é explicada por diversas teorias que, em conjunto, auxiliam na sua compreensão. Essas teorias, apresentadas por Sosnik e colaboradores em 2014 são: a) teoria eletrônica (que está relacionada com a interação eletrostática entre a carga positiva do sistema de liberação e carga negativa da mucina, glicoproteína que recobre as mucosas); b) teoria da adsorção, na qual a interação ocorre por ligação de hidrogênio e van der Waals; c) teoria da molhabilidade, onde a capacidade do polímero de intumescer e se fixar na superfície da mucosa; d) teoria da difusão, que é dependente do tempo e está relacionada com as cadeias dos polímeros e a quantidade de glicoproteína na mucosa; e) a teoria da fratura, onde a força de separação entre duas superfícies está relacionada com a força de

adesão entre elas e f) teoria mecânica, que é dependente da irregularidade da superfície e da área disponível para interação.

A mucoadesão é uma estratégia que tem sido amplamente empregada para o desenvolvimento dos mais diversos carreadores, contribuindo para muitos benefícios como o aumento do tempo de ação nos locais de aplicação, proteção contra drogas, aumento da penetração do fármaco e aumento da biodisponibilidade de ativos (Raskin; Schlachet; Sosnik, 2016).

Diversos autores vêm buscando o desenvolvimento de partículas mucoadesivas para as mais variadas finalidades (Raskin; Schlachet; Sosnik, 2016; Fabiano; Zambito; Bernkop-Schürch, 2017; Kamath; Sunil, 2017; Bassi da Silva, 2017). Na Odontologia, os poucos trabalhos que desenvolvem nanopartículas com potencial mucoadesivo abordam o tratamento de lesões malignas orais (Hazzah et al., 2016), infecções fúngicas (Rençber et al., 2016) e técnicas anestésicas (Nidhi et al., 2016; Franz-Montan et al., 2016). Não há nenhum trabalho na literatura propondo o uso tópico bucal de nanopartículas com finalidade atividade antimicrobiana, antierosiva, anti-oxidante e anti-inflamatória.

2. OBJETIVOS

---

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados para o encapsulamento da EGCG e avaliar *in vitro* sua atividade antimicrobiana, visando sua futura utilização em formulações colutórias bucais.

2.2 Específicos

1. Preparar e caracterizar nanopartículas poliméricas (NPP) e carreadores lipídicos nanoestruturados híbridos (CLN), ambos catiônicos;
2. Comparar a atividade antimicrobiana das NPP e CLN *in vitro*;
3. Encapsular a EGCG;
4. Caracterizar o sistema de encapsulamento de EGCG quanto ao diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico (DLS);
5. Avaliar a estabilidade das partículas ao longo do tempo por DLS;
6. Avaliar a eficiência de encapsulamento da EGCG;
7. Caracterizar o sistema de encapsulamento de EGCG por meio de microscopia de força atômica (AFM);
8. Caracterizar o sistema de encapsulamento de EGCG por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC);
9. Avaliar o perfil de mucoadesão das partículas por meio da titulação com mucina;
10. Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* da EGCG livre e das nanopartículas, com e sem EGCG, frente aos micro-organismos cariogênicos: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

---

3. MATERIAL E MÉTODOS

A preparação e caracterização das nanopartículas foram realizadas com a gentil colaboração da Profa. Dr^a. Priscyla Daniely Marcato Gaspari do Laboratório de Nanobiotecnologia (Nanobiolab) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.1 Preparo das Nanopartículas

3.1.1 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) híbridos

Os CLNs híbridos foram preparados pelo método de emulsão a quente e sonicação (Marcato et al., 2011). A fase aquosa foi composta pelo estabilizante Pluronic® F68 (Sigma-Aldrich, MO, EUA) na concentração de 0,5% (m/v) e quitosana (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,25% (m/v). A fase oleosa apresentou em sua composição 1% (m/v) do lipídeo Manteiga de Ilipê (AAK, MÖ, SE) acrescida ou não de 5 mg de EGCG (Sigma-Aldrich). Ambas as fases foram aquecidas até a temperatura de 60°C (10°C acima da temperatura de fusão do lipídeo) e, em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa. Este sistema foi sonicado por 10 minutos em sonificador (VCX 750, Sonics, MSS, EUA) com ponta de 13 mm, amplitude de 40% e sem controle de temperatura. Após o processo de sonicação a dispersão de nanopartículas foi resfriada em banho de água fria até atingir 25°C, obtendo assim as CLN híbridas. A Figura 4 mostra o esquema de preparação dos CLN.

Figura 4 – Esquema do método de preparação dos CLN pelo método de emulsão a quente e sonicação.

3.1.2 Preparo de Nanopartículas Poliméricas (NPP)

As NPP foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (Marcato et al., 2011). Para isto, a fase aquosa foi composta pelo estabilizante Tween® 80 (Sigma-Aldrich) na concentração de

0,5% (m/v) e Quitosana (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,66% (m/v). A fase orgânica apresentou em sua composição 1,9% (m/v) de solvente orgânico, neste caso foi utilizada Acetona (Merk, SP, Brasil) acrescida de 0,14% (m/v) de polímero Eudragit S100 (Evonik, Marl, GER). A fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa sob agitação e a dispersão foi transferida para um balão volumétrico de fundo redondo. Esse sistema foi evaporado em baixa pressão para a retirada total do volume de solvente orgânico em rotaevaporador (IKA RV 10 Digital, Biovera, SP, Brasil) na temperatura de 50°C.

3.2 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas Vazias

As nanopartículas foram avaliadas quando ao seu tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. Para a determinação do diâmetro e do índice de polidispersão (Pdl) dos CLN e NPP foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS, *Dynamic Light Scattering*). Esta técnica determina o diâmetro hidrodinâmico das partículas por meio da relação entre as variações de intensidades de luz espalhadas pelas partículas com o seu diâmetro pela equação de Stokes-Einstein. As flutuações de luz são decorrentes do movimento browniano das partículas presentes nas dispersões e do diâmetro das nanopartículas, em que partículas menores se movimentam mais rapidamente que partículas maiores (Malvern, 2017). Para a análise do diâmetro e Pdl das partículas por DLS, todas as amostras foram diluídas 300 vezes em solução preparada com KCl (Sigma-Aldrich) a 1 mM.

Figura 5 – Esquema ilustrativo representando o movimento browniano das nanopartículas e sua correlação com a determinação do diâmetro das mesmas.

Fonte: Malvern, 2017

O potencial zeta foi determinado por espalhamento de luz eletroforético. Para tanto, as dispersões de nanopartículas são colocadas em uma célula com dois eletrodos. Quando a célula é inserida no equipamento um campo elétrico é aplicado sobre ela o que resulta na mobilidade das

partículas (mobilidade eletroforética) em direção ao o eletrodo de carga oposta a elas. A velocidade do movimento é proporcional à força do campo aplicada e de seu potencial zeta (Malvern, 2017). Para análise do potencial zeta, por espalhamento de luz eletroforético todas as amostras foram diluídas 300 vezes em solução de KCl (Synth, BR) a 1 mM.

A estabilidade das nanopartículas com e sem EGCG também foi avaliada por estes métodos mantendo as amostras a 4°C. Utilizou-se como sistema conservante a mistura de metilparabenos (0,15% (m/v)) e propilparabenos (0,05% (m/v)). A mistura dos parabenos é amplamente utilizada para a preservação de cosméticos e produtos farmacêuticos (Kokoletsi et al., 2005). Os valores de diâmetro médio, Pdl e potencial zeta para ambas as partículas foram analisados estatisticamente utilizando o software Oringin (versão 8.3.7) por análise de One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey, em um nível de confiança de 95%.

3.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Partículas Vazias

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com a gentil colaboração do Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador e apoio técnico de Marina Constante Gabriel Del Arco no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A atividade antimicrobiana das CLN e das NPP foram avaliadas frente aos micro-organismos cariogênicos *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*. Este estudo foi realizado com o objetivo de selecionar a nanopartícula com maior atividade antimicrobiana *in vitro*, para ser utilizada para o encapsulamento da EGCG.

3.3.1 Micro-organismos

As cepas bacterianas foram adquiridas da coleção americana *American Type Culture Collection* (ATCC, VA, EUA). A atividade antimicrobiana das partículas foi avaliada frente aos micro-organismos cariogênicos *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) e *Lactobacillus casei* (ATCC 11578)(Tabela 1).

Para manutenção das cepas, os estreptococos do grupo mutans (*S. mutans* e *S. sobrinus*) e o *L. casei* foram repicados, respectivamente, nos meios de cultura líquidos TIO (*Thioglycollate Medium w/o dextrose or indicator*, Difco, EUA) e BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco, EUA), incubados a 37°C em atmosfera de microaerofilia durante 48 ou 72 horas.

Objetivando avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas, 48 horas antes da realização dos experimentos, as cepas dos micro-organismos foram cultivadas em caldo BHI a 37°C, em atmosfera de microaerofilia.

Após o desenvolvimento dos micro-organismos, os inóculos foram padronizados por espectrofotometria em Espectrofotômetro (AJX 1000, Micronal S.A., BR) a um comprimento de onda de 625nm. Desse modo, as suspensões dos micro-organismos foram ajustadas até atingir a densidade óptica (DO) equivalente a $1,5 \times 10^8$ células/mL, correspondente a $\frac{1}{2}$ da Escala de *McFarland*.

A seguir, foram realizadas duas diluições decimais seriadas para atingir a concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL, correspondente ao encontrado na cavidade bucal de pacientes com altos índices e atividade da doença cárie.

Tabela 1 – Micro-organismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana

Micro-organismos	Procedência	Densidade óptica ($\lambda=625\text{nm}$)	Meio de cultivo	Atmosfera de Incubação
<i>S. mutans</i>	ATCC 25175	0,186	Caldo BHI caldo	Microaerofilia
<i>S. sobrinus</i>	ATCC 33478	0,175	Caldo BHI caldo	Microaerofilia
<i>L. casei</i>	ATCC 11578	0,148	Caldo BHI caldo	Microaerofilia

3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Partículas Vazias sobre os Micro-organismos Cariogênicos *In Vitro* pela Técnica de Microdiluição

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos CLN e NPP frente aos micro-organismos cariogênicos foi realizada pela técnica de microdiluição em microplacas de cultivo de 96 cavidades de fundo côncavo (Plast Bio, BR), de acordo com o preconizado por Eloff (1998) e realizado em estudo anterior por nosso grupo de pesquisa (Vilela, 2015).

Os grupos experimentais foram compostos pelas formulações de CLN e NPP vazias, que foram diluídas sequencialmente em água destilada esterilizada nas porcentagens de 75%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v) de diluição. Como controle negativo foi utilizado a CHX.

Visando comprovar a viabilidade dos micro-organismos indicadores, as cepas bacterianas cultivadas em caldo BHI, foram utilizadas como controle positivo.

Já o controle de esterilidade foi realizado com o caldo BHI não inoculado, água destilada esterilizada, CHX e a formulação de CLN e NPP, para excluir qualquer possibilidade de contaminação prévia. A composição e o fabricante das soluções estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição e fabricante das formulações experimentais e controle avaliadas

Grupo	Solução avaliada	Composição	Procedência
Experimental 1	Carreador lipídico nanoestruturado (CLN)	Manteiga de Ilipê, Água deionizada, Quitosana 0,25% e estabilizante.	Preparado no laboratório Nanobiolab da FCFRP-USP
Experimental 2	Nanopartícula polimérica (NPP)	Eudragit S100, Quitosana 0,66%, água e solvente orgânico.	Preparado no laboratório Nanobiolab da FCFRP-USP
Controle negativo	Clorexidina (CHX)	Gluconato de clorexidina 0,12%, água, glicerina, etanol, polisorbato 20, composição aromática com sabor predominante de menta, sacarinato de sódio, FD&C Blue, nº 1.	Colgate-Palmolive Indústria, BR
Controle positivo	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> e <i>L. casei</i> cultivados em caldo BHI	vide Tabela 1	American Type Culture Collection (ATCC, EUA)
Controle de esterilidade	CLN NPP CHX Água destilada esterilizada Caldo BHI	-	Laboratório de Bacteriologia da FCFRP-USP

Inicialmente foram dispostas três microplacas no fluxo laminar, uma para cada micro-organismo, sendo que cada teste foi realizado em duplicata. Utilizando pipetas automáticas, foi adicionado inicialmente 10µL do inóculo bacteriano em cada poço da microplaca (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*), em seguida, 90µL de caldo BHI (2x concentrado) foi adicionado aos poços, de modo a possibilitar o crescimento adequado das bactérias testadas. Por último, a formulação inicial e as referidas diluições de CLN e NPP foram adicionadas aos poços. A Figura 6 mostra a diluição para as formulações preparadas e a sequência da semeadura nas microplacas de cultivo.

Os controles positivos, negativo e de esterilidade também foram incluídos e as cavidades foram preenchidas respectivamente com: 200µL, sendo 180µL de caldo BHI (2x concentrado) e 20µL de cada um dos inóculos bacterianos para o controle positivo; 100µL de caldo BHI (2x concentrado) e 100µL de água para o controle de esterilidade da água; 100µL e 100µL de formulação sem diluição (CLN, NPP ou CHX) para o controle de esterilidade das formulações e 200µL de caldo BHI (2x concentrado) para o controle de esterilidade do meio de cultura.

Figura 6 – Esquema ilustrativo da disposição dos grupos avaliados na avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* em microplacas de cultivo de 96 cavidades.

As microplacas foram incubadas em estufa (NI 152, Nova Instruments, SP, Brasil) em atmosfera de microaerofilia na temperatura de 37°C durante 24 horas. Após a incubação, foi realizada a inspeção visual do crescimento bacteriano. A seguir, foi realizada a leitura das microplacas com a adição do revelador resazurina (*Resazurin Salt Powder*, Sigma-Aldrich). Para tal finalidade, foram adicionados a cada poço 30µL da solução de resazurina (100µg/mL). A presença de cor azul representa a inativação do crescimento bacteriano e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano, indicando a metabolização do sal pelos micro-organismos (Palomino et al., 2002). A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é o indicador mais utilizado para testes colorimétricos em meios de cultura, apresentando uma correlação direta com a quantidade e a proliferação de organismos vivos (Fukushima et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea) como ilustrado na Figura 7.

A determinação da CIM foi realizada por meio da verificação visual do crescimento bacteriano. Para interpretação dos resultados, foi considerada CIM a inibição total do crescimento microbiano, onde não houve mudança de cor do revelador, indicativo da inibição microbiana. A CIM foi, portanto, definida como a menor concentração de nanopartículas vazias que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano (Rahman et al., 2004; Tortora; Funke; Case, 2005).

3.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das partículas vazias sobre os micro-organismos cariogênicos *in vitro*

O efeito inibitório (CIM) foi complementado pela determinação da CBM. Desse modo, decorrida a incubação das microplacas, e previamente à realização do teste colorimétrico com adição de resazurina, foi realizada a determinação da concentração bactericida mínima (CBM). Para tal, alíquotas de 10µL foram retiradas dos poços por meio de alças bacteriológicas esterilizadas e sequencialmente foram semeadas em placas de Petri de 90x15mm (PlastBio, BR) contendo ágar

sangue suplementado. Logo após o plaqueamento, as placas de Petri foram incubadas em atmosfera de microaerofilia a 37°C por 24h.

Após o tempo de incubação, foram realizadas inspeções visuais para verificar o desenvolvimento de unidades formadoras de colônia. Considerou-se CBM a menor concentração com ausência de crescimento bacteriano (redução da contagem microbiana em 99,9%) após o repique em meio sólido dos poços livres de turvação na realização da CIM (Bosio et al., 2000; CLSI, 2008)

3.4 Quantificação de EGCG por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O desenvolvimento do método analítico, bem como a construção da curva de calibração para determinação da EE% da EGCG foram realizados no laboratório de Química Analítica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com a gentil colaboração do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva e apoio técnico de Juliana Cristina Biazoto de Moraes.

3.4.1 Condições Cromatográficas

Utilizou-se um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC-20AT, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com detector UV-VIS e arranjo diodo SPD-M20A, injetor manual com volume de injeção 20 µL, desgaseificador DGU-20A3, modulo de comunicação CBM-20A e coluna cromatográfica de fase reversa C18 (Shimadzu Corporation) de 250 x 4,6 mm e 5 µM. O sistema foi controlado por software LCsolution (Shimadzu Corporatio). A fase móvel foi composta por uma mistura metanol (Baker, EUA): solução aquosa de ácido acético 0,1 % (Synth, SP, Brasil) na proporção de 40:60 (v/v) e deixada em banho de ultrassom por 20 minutos antes das análises. A solução de ácido acético 0,1% foi preparada utilizando-se água ultrapura e, posteriormente filtrada em membranas de ultrafiltração de 0,45 µM. O volume de injeção foi de 20 µL e as análises foram realizadas no comprimento de onda de 274 nm com modo de eluição isocrática e fluxo de 1 mL/min. O tempo de análise foi de 7 minutos e o composto foi eluído no tempo de retenção de 4,3 minutos.

3.4.2 Construção da Curva de Calibração

Preparou-se em um balão volumétrico de 20 mL uma solução estoque de EGCG em metanol:água 40:60 na concentração de 100 µg/mL. A partir dessa solução foram preparadas soluções em balões volumétricos de 10 mL nas concentrações 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 µg/mL utilizando metanol:água 40:60 para as diluições. Cada solução foi previamente filtrada utilizando filtro de seringa com poro 0,22 µM (Millex®, Merck Millipore, GER) e mantidas no escuro antes da injeção. A curva de calibração foi considerada linear quando apresentou coeficiente de determinação (R^2) com valor superior a 0,99.

3.4.3 Seletividade para Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE%)

A seletividade está relacionada com a especificidade, e é definida como a capacidade de um método de medir exatamente um dado composto em presença de outros componentes (Anvisa, 2003).

A seletividade do método analítico de quantificação para avaliação da EE% foi realizada pela análise da presença de interferentes em amostras de CLN vazio. Para tanto, as amostras das nanopartículas vazias foram ultra-filtradas por 10 minutos a 5000 X g em sistema de filtração com membrana de filtração com corte de massa molar de 10 kDa (Microcon®, Merck Millipore, GER) O sobrenadante foi injetado e analisado por CLAE. O método foi considerado seletivo ao não apresentar interferentes em concentrações quantificáveis no tempo de retenção de 4,3 minutos.

3.4.4 Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE%) por Método Indireto

A eficiência de encapsulamento foi determinada por método indireto. Para isso, 500 µL de dispersão de nanopartículas contendo EGCG foram adicionadas ao sistema de filtração Microcon e, em seguida, centrifugadas por 10 minutos a 5000 x g. A EGCG livre ou não encapsulada foi quantificada no filtrado e depois subtraída da quantidade total de EGCG adicionada na dispersão durante o processo de preparação das nanopartículas ($[EGCG]_{\text{inicial}}$), obtendo-se, assim, a concentração de EGCG encapsulada ($[EGCG]_{\text{encap.}}$). A EE% foi calculada segundo as equações 1 e 2:

$$\% \text{ não encapsulada} = ([EGCG]_{\text{solução filtrada}} / [EGCG]_{\text{inicial}}) \times 100 \quad (1)$$

$$EE (\%) = 100 - \% \text{ não encasulada} \quad (2)$$

3.5 Análise Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de DSC caracteriza os sistemas de encapsulamento quanto a sua cristalinidade. A cristalinidade das partículas está relacionada com a velocidade de liberação do ativo pelo carreador durante o tempo de estocagem, além da sua eficiência de encapsulamento e estabilidade (Svilenov; Tzachev, 2014; de Oliveira et al., 2016).

Os termogramas de DSC foram obtidos em um calorímetro (DSC-50, Shimadzu Corporation) utilizando um porta-amostra padrão de alumínio selado. As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio (fluxo de 50 mL/min⁻¹), na faixa de temperatura de 20°C a 230°C (taxa de aquecimento de 10°C/min). O índice de recristalinidade (IR) foi calculado pela equação 3, como descrita por Liu et al. (2007):

$$IR (\%) = (\Delta H_{\text{dispersão CLN}} / \Delta H_{\text{material}} \times \text{Concentração lipídio}) \times 100 \quad (3)$$

3.6 Avaliação da Interação das Nanopartículas com Mucina

Para determinar a propriedade mucoadesiva das partículas foi realizado o teste de titulação com mucina utilizando um titulador (MTP-2 Multi Purpose Titrator, Malvern Instruments, UK) acoplado ao Zeta Sizer (Nano ZS, Malvern Instruments, UK). Para isto, foi preparada uma solução de mucina na concentração de 2 mg/mL em tampão fosfato (100 mM, pH=6,2), que foi adicionada à amostra em diferentes concentrações (0 a 0,5 µg/mL) utilizando o titulador. O tamanho e o potencial Zeta das partículas foram mensurados a cada concentração.

3.7 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

Inicialmente as amostras foram diluídas em água deionizada (1:8000). A análise de rastreamento de nanopartículas foi realizada no equipamento NanoSight (NS300, Malvern Instruments, UK) equipado com laser vermelho (642 nm) e software NTA 3.1. (Malvern Instruments, UK). Diferentemente da técnica de DLS, a análise de rastreamento de nanopartículas permite identificar e rastrear partículas individualmente e correlacionar o movimento browniano de cada partícula com seu diâmetro hidrodinâmico por meio da equação bidimensional de Stokes-Einstein modificada (Filipe; Hawe; Jiskoot, 2010). Entretanto, ambas as técnicas, DLS e NTA, apresentam alta precisão para o dimensionamento do tamanho de partículas de dispersões com distribuições de tamanho relativamente estreitas (Filipe; Hawe; Jiskoot, 2010), como as preparadas neste estudo.

3.8 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para a análise da morfologia das partículas, inicialmente a dispersão de CLN foi gotejada sobre uma mica recém-clivada realizando em sequência a lavagem com jatos de água deionizada e secagem em temperatura ambiente. O suporte para deposição da amostra foi a mica, visando minimizar a interferência da rugosidade do substrato na análise da amostra. As análises de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram realizadas em microscópio de força atômica (SPM-9600, Shimadzu Corporation, JPN) *na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com a ajuda técnica de Ivana Aparecida Borin*. As análises foram realizadas no modo *tapping* (onde a ponteira faz contato intermitente com a amostra), à temperatura ambiente, ao ar e a uma velocidade de varredura reduzida para melhorar a qualidade da imagem obtida. Para a análise foram utilizadas pontas de silício (PPP-NCHR, Nanosensors, GER) de comprimento de 125 ± 10 µm, frequência de ressonância de 204 ± 497 kHz e constante de força de 10-130 N/m. Todas as imagens, tanto as topográficas quanto as de contraste de fase, foram fornecidas simultaneamente pelo equipamento durante a varredura de cada área.

3.9 Avaliação da Atividade Antimicrobiana DO CLN-EGCG Frente aos Micro-Organismos Cariogênicos

A atividade antimicrobiana do CLN vazio, CLN-EGCG e da EGCG livre seguiu a metodologia apresentada na seção 4.3 e está ilustrada no Quadro 1. A composição e o fabricante das amostras estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição e fabricante das formulações experimentais e controles avaliados.

Grupo	Formulação	Composição	Procedência
Experimental 1	EGCG livre	EGCG 0,4% (diluída em água deionizada)	Sigma Aldrich Co.
Experimental 2	CLN	Manteiga de Ilipê 0,2%, água deionizada, Quitosana 0,25% e estabilizante.	Laboratório de Nano-Biotecnologia da FCFRP-USP
Experimental 3	CLN-EGCG	EGCG 0,025%, Manteiga de Ilipê 0,2%, água deionizada, Quitosana 0,25% e estabilizante.	Laboratório de Nano-Biotecnologia da FCFRP-USP/ Sigma Aldrich Co.
Controle positivo	CHX	Digluconato de clorexidina 0,12%, água, glicerina, etanol, polisorbato 20, composição aromática com sabor predominante de menta, sacarinato de sódio, FD&C Blue, nº 1.	Colgate-Palmolive Indústria, BR
Controle negativo	Água destilada esterilizada	-	Laboratório de Bacteriologia da FCFRP-USP
Controle de esterilidade	Água Solução Salina Meio de cultura (BHI)	-	Laboratório de Bacteriologia da FCFRP-USP

Quadro 1 – Representação esquemática da distribuição das microplacas de cultivo, sendo uma para cada micro-organismo testado.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[ ]			3,29x10 ¹² CLN/mL		2,5x10 ¹² CLN/mL		1,63x10 ¹² CLN/mL		0,82x10 ¹² CLN/mL		0,41x10 ¹² CLN/mL		0,2x10 ¹² CLN/mL
A	CLN vazio		10µL inóc. 100µL CLN vaizo 90µLBHI		10µL inóc. 100µL CLN vazio 90µL BHI		10mL inóc. 100µL CLN vazio 90µL BHI		10mL inóc. 100µL CLN vazio 90µL BHI		10mL inóc. 100µL CLN vazio 90µL BHI		10mL inóc. 100µL CLN vazio 90µL BHI
B	CLN vazio		Duplicata		Duplicata		Duplicata		Duplicata		Duplicata		Duplicata
[ ]			135 µL/mL		101,25 µL/mL		67,5 µL/mL		33,75 µL/mL		16,87 µL/mL		8,43 µL/mL
C	CLN-EGCG		10µL inóc. 100µL CLN-EGCG 90µLBHI		10µL inóc. 100µL CLN-EGCG 90µL BHI		10mL inóc. 100µL CLN-EGCG 90µL BHI		10mL inóc. 100µL CLN-EGCG 90µL BHI		10mL inóc. 100µL CLN-EGCG 90µL BHI		10mL inóc. 100µL CLN-EGCG 90µL BHI
D	CLN-EGCG		Duplicata		Duplicata		Duplicata		Duplicata		Duplicata		Duplicata
[ ]			2.000 de µL		1.000 de µL/mL		750 µL/mL		500 µL/mL		250 µL/mL		125µL/mL
E	EGCG		10µL inóc. 100µL EGCG livre 90µLBHI		10µL inóc. 100µL EGCG livre 90µL BHI		10mL inóc. 100µL EGCG livre 90µL BHI		10mL inóc. 100µL EGCG livre 90µL BHI		10mL inóc. 100µL EGCG livre 90µL BHI		10mL inóc. 100µL EGCG livre 90µL BHI
F	EGCG		Duplicata		Duplicata		Duplicata		Duplicata		Duplicata		Duplicata
G	Controles Negativo e Positivo	20µL inóc. <i>S.mutans</i> 180µL BHI	20µL inóc. <i>S.mutans</i> 180µL BHI	20µL inóc. <i>S.sobrinus</i> 180µL BHI	20µL inóc. <i>S.sobrinus</i> 180µL BHI	20µL inóc. <i>L.casei</i> 180µL BHI	20µL inóc. <i>L.casei</i> 180µL BHI	10µL inóc. <i>S.mutans</i> 100µL CHX 90µL BHI	10µL inóc. <i>S.mutans</i> 100µL CHX 90µL BHI	10µL inóc. <i>S.sobrinus</i> 100µL CHX 90µL BHI	10µL inóc. <i>S.sobrinus</i> 100µL CHX 90µL BHI	10µL inóc. <i>L.casei</i> 100µL CHX 90µL BHI	10µL inóc. <i>L.casei</i> 100µL CHX 90µL BHI
H	Controles de esterilidade	100µL H ₂ O 100µL BHI	100µL H ₂ O 100µL BHI	100µL CHX 100µL BHI	100µL CHX 100µL BH	100µL CLN vazio 100µL BHI	100µL CLN vazio 100µL BHI	100µL CLN-EGCG 100µL BHI	100µL CLN-EGCG 100µL BHI	100µL EGCG livre 100µL BHI	100µL EGCG livre 100µL BHI	200µL BHI	200µL BHI

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Físico-Química dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados Vazios (CLN) e Nanopartículas Poliméricas Vazias (NPP)

4.1.1 Determinação de diâmetro, Pdl e Potencial Zeta

A técnica utilizada para a caracterização das partículas foi o espalhamento de luz dinâmico (DLS), que é amplamente utilizada para a avaliação físico-química de partículas, sendo relatada em diversos trabalhos envolvendo carreadores lipídicos (Marcato, 2009; Svilenov; Tzachev, 2014; Geszke-Moritz; Moritz, 2016) e poliméricos (Kaur et al., 2016). Dentre as vantagens da técnica de DLS estão a praticidade, facilidade de operação e velocidade na aquisição dos dados (Bohren; Huffman, 1983), vantagens estas que contribuíram para a escolha desta técnica para a etapa de caracterização de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das partículas.

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão das nanopartículas vazias estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) das nanopartículas.

Partícula	Diâmetro (nm)(DP)	Pdl(DP)	Potencial Zeta (mV)
CLN	238,5(11,34)	0,219(0,02)	35,2(6,04)
NPP	231,5(22,9)	0,218(0,02)	33,7(9,58)

O índice de polidispersão dos CLN e NPP foi abaixo de 0,2. O índice de polidispersão é um indicativo de homogeneidade ou não das dispersões de nanopartículas sendo que valores de Pdl abaixo de 0,3 indicam pouca polidispersão com faixa estreita de distribuição de tamanho de partícula, sendo, portanto, considerada ideal (Üner et al., 2004; Tomasina et al., 2013; Marcato et. al., 2009). Verifica-se, portando, que as duas formulações de nanopartículas apresentaram baixa polidispersão.

O perfil de distribuição de tamanho para o CLN foi monomodal e estreito, o que é característico de formulações pouco polidispersas (Figura 8), já para as NPP, a distribuição de tamanho foi bimodal (Figura 9). Este perfil bimodal é característico de distribuições mais polidispersas, entretanto, a segunda população de nanopartículas foi representada por uma banda pouco significativa e por este motivo o seu Pdl foi abaixo de 0,3, porém maior que o Pdl dos CLN.

Figura 8 – Perfil de distribuição de tamanho por intensidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).

Figura 9 – Perfil de distribuição de tamanho por intensidade das nanopartículas poliméricas (NPP).

Na análise de potencial Zeta verificou-se que ambas as partículas apresentam carga superficial positiva e não apresentam variação significativa entre si. O valor positivo de carga superficial é decorrente da característica catiônica da quitosana, a qual reveste as nanopartículas. Desta forma, este resultado decorre do revestimento das partículas pelo polímero catiônico quitosana. Além disso, o potencial zeta de ambas as nanopartículas apresentou valores semelhantes. Estes valores indicam a magnitude de interações de repulsão e atração eletrostática entre as partículas de dispersões aquosas de CLN e NPP. Portanto, o potencial zeta pode ser considerado um parâmetro chave para prever a estabilidade de dispersões coloidais (Thatipamula et al., 2011). Dentro deste contexto, para partículas estabilizadas somente por carga, valores de potencial zeta iguais ou maiores que 30 mV em módulo são necessários para promover estabilidade eletrostática de dispersões coloidais (Freitas; Müller, 1999). Contudo, as partículas desenvolvidas neste projeto além de apresentarem estabilidade por carga (eletrostática), possuem também estabilidade estérica

devido a presença de quitosana e do estabilizante polimérico Pluronic F68 na superfície das nanopartículas. Portanto, estas partículas apresentam estabilidade eletroestérica (Fritz et al., 2002). A estabilidade eletroestérica é apresentada como a mais robusta forma de estabilização devido ao fato de que combina as vantagens de ambos os mecanismos de estabilidade, elétrico e estérico. Em decorrência a tais vantagens, a estabilidade eletroestérica tem sido utilizada para estabilizar diversas nanopartículas (Vilinska et al., 2014).

4.2 Atividade Antimicrobiana *In Vitro* Para Carreadores Lipídicos Nanoestruturados Vazios (CLN) e Nanopartículas Poliméricas Vazias (NPP)

4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) sobre os micro-organismos cariogênicos *in vitro*

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para determinar, *in vitro*, a sensibilidade de bactérias à agentes e nanoformulações com finalidade antimicrobiana. Para o presente estudo, foi utilizada a técnica de diluição em caldo, realizada por meio da microdiluição, como apresentado por Eloff em 1998. Esta técnica permite determinar a menor concentração de uma formulação para inibição do crescimento do micro-organismo testado. O baixo custo operacional, elevada reprodutibilidade e sensibilidade, além da necessidade de pequenas amostras e registro permanente, caracterizam a microdiluição como um efetivo método laboratorial (Eloff, 1998).

Não obstante as limitações da técnica, que incluem a adesão de micro-organismos à base do poço (Eloff, 1998) e precipitação de compostos presentes em alguns extratos (Ostrosky et al., 2008-marina), é estabelecido o uso da microdiluição para a determinação da atividade antimicrobiana dos mais variados compostos, dentre eles as nanoformulações (Aliasghari et al., 2016; Moghimi; Aliahmadi; Rafati, 2017), além de que as referidas limitações não foram encontradas no presente estudo. A Tabela 5 apresenta os resultados da determinação da CIM e CBM das suspensões de nanopartículas Poliméricas (NPP) vazias e Carreador Lipídico Sólido híbrido (CLN) vazio.

Tabela 5 – Valores de CIM e CBM das suspensões de nanopartículas Poliméricas (NPP) e Carreador Lipídico Sólido híbrido (CLN) vazio frente aos micro-organismos estudados em porcentagem de diluição (v/v).

Nanopartículas	Micro-organismos	CIM	CBM
NPP	<i>S. mutans</i>	37,5%	37,5%
	<i>S. sobrinus</i>	50%	50%
	<i>L. casei</i>	-	-
CLN	<i>S. mutans</i>	12,5%	12,5%
	<i>S. sobrinus</i>	25%	25%
	<i>L. casei</i>	25%	25%

(-) Ausência de atividade antimicrobiana

Na Tabela 5 pode-se observar que os valores obtidos de CIM e CBM para ambas as partículas foram iguais entre si. Isto significa que em cada ensaio, foi necessária a mesma quantidade de amostra tanto para inibir o crescimento do micro-organismo quanto para reduzir a contagem bacteriana em 99,9%.

Verifica-se que NPP promoveu inibição e redução da contagem apenas dos estreptococos do grupo mutans, apresentando CIM e CBM na diluição de 37,5% (v/v) para o *S. mutans* e 50% (v/v) para o *S. sobrinus*. No entanto, não apresentaram atividade nem bacteriotática nem bactericida sobre os *L. casei*. Diferentemente das NPP, os CLN inibiram e reduziram o crescimento bacteriano do *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*, apresentando atividade bacteriostática e bactericida sobre todos os micro-organismos cariogênicos avaliados. A CIM e CBM verificadas para o CLN vazio (25%, v/v) não diferiram entre si para o *S. sobrinus* e *L. casei*.

A partir da análise dos resultados microbiológicos das nanopartículas vazias sobre os micro-organismos cariogênicos *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*, observa-se que mesmo na ausência do encapsulamento do ativo de interesse, os CLN apresentaram ação inibitória e bactericida frente a todos os micro-organismos testados e as NPP apresentaram atividade antimicrobiana sobre os estreptococos do grupo mutans. A atividade antimicrobiana de nanopartículas compostas por quitosana também foram relatadas por outros autores (Neilands et al. em 2011 e Targino et al. em 2014).

A atividade antimicrobiana da quitosana está relacionada com a formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos aminos protonados se ligam seletivamente à superfície aniônica dos micro-organismos, interferindo na atividade celular e na permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares com consequente inibição microbiana (Albuquerque et al., 2009). Apesar do espectro de ação da quitosana abranger fungos, leveduras e bactérias, este polímero mostra-se mais eficaz contra bactérias Gram-positivas, como apresentado no presente estudo para os micro-organismos do grupo estreptococos mutans e o *L. casei*, corroborando com outros trabalhos presentes na literatura (Tavaria et al., 2013). Entretanto, quando são comparados os resultados microbiológicos para os dois tipos de partículas preparadas, observa-se que o CLN foi o carreador que apresentou atividade bacteriostática e bactericida frente a todos os micro-organismos cariogênicos avaliados. Sugere-se que a atividade antimicrobiana superior para o CLN seja devido à presença do lipídeo MI na composição destas partículas, que a caracterizam como carreadores imperfeitos. Porém, sua ação sobre micro-organismos não está bem estabelecida na literatura.

Considerou-se, portanto, o CLN híbrido o carreador mais adequado para o encapsulamento da EGCG, uma vez que apresentou maior atividade bacteriostática e bactericida sobre todos os micro-organismos cariogênicos avaliados.

4.3 Caracterização Físico-Química dos CLN Vazios e CLN-EGCG

4.3.1 Determinação de diâmetro e potencial Zeta

Da mesma forma que o apresentado no item 5.1.1, a técnica utilizada para a etapa de caracterização das partículas foi a técnica de DLS, que é amplamente utilizada para a avaliação físico-química de partículas.

Após a escolha dos CLN, realizou-se uma nova etapa de produção e caracterização, assim como o encapsulamento do ativo de interesse: a catequina EGCG. O diâmetro dos CLN-EGCG foi de $285,09 \pm 51,91$ nm e o índice de polidispersão foi de $0,172 \pm 0,04$ (Tabela 6). O diâmetro dos CLN foi de aproximadamente $228 \pm 24,84$ nm com índice de polidispersão de $0,216 \pm 0,02$. O aumento do diâmetro das CLN-EGCG pode ser atribuído ao encapsulamento da EGCG, assim como também relatado por outros autores (Frias et al., 2016).

Tabela 6 – Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) de CLN-EGCG e CLN vazio e seus desvios padrão (DP)

Partícula	Diâmetro (nm)(DP)	Pdl (DP)	Potencial Zeta (mV)(DP)
CLN-EGCG	285,09 (51,91)	0,172 (0,04)	38,14 (13,54)
CLN	228 (24,84)	0,216 (0,02)	36,53 (8,58)

O perfil de distribuição de tamanho para o CLN e CLN-EGCG foi monomodal e estreito, conforme apresentado na Figura 10.

CLN e CLN-EGCG apresentaram valores de potencial zeta (PZ) positivos (Figura 11). A carga superficial das partículas é devido à carga catiônica da quitosana a qual reveste as nanopartículas.

Figura 11 – Distribuição de potencial zeta apresentando valores positivos para a CLN-EGCG (linha verde) e CLN vazio (linha vermelha).

A Tabela 7 mostra os valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta (PZ) de CLN-EGCG e CLN vazios e seus desvios padrão. O valor de potencial zeta dos CLN e CLN-EGCG não apresentou diferença relevante entre si (Figura 12), comprovando assim que o encapsulamento da EGCG não alterou significativamente a característica físico-química de carga superficial das nanopartículas, como também relatado por outros autores (Radhakrishnan et al., 2016; Frias et al., 2016). O diâmetro médio encontrado para o CLN-EGCG reflete o aumento do tamanho das partículas quando ocorre o encapsulamento da EGCG, assim como também relatado por outros autores (Frias et al., 2016).

Tabela 7 – Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) de CLN-EGCG e CLN vazio e seus desvios padrão (DP).

Partícula	Diâmetro (nm)(DP)	Pdl (DP)	Potencial Zeta (mV)(DP)
CLN-EGCG	285,09 (51,91)	0,172 (0,04)	38,14 (13,54)
CLN	228 (24,84)	0,216 (0,02)	36,53 (8,58)

4.3.2 Avaliação da Estabilidade dos CLN-EGCG e CLN Vazios

A avaliação da estabilidade das partículas é uma etapa primordial para garantir a qualidade da formulação em função do tempo (Souto; Müller, 2008; Marcato, 2009). A avaliação da estabilidade das partículas pode ser feita pela análise do diâmetro, Pdl e PZ por DLS que é uma técnica de fácil execução e baixo custo (Marcato, 2009), sendo escolhida para ser realizada no presente estudo.

A estabilidade dos CLN vazios foi avaliada pelo período de 240 dias. Durante estes períodos os valores de diâmetro, Pdl e potencial zeta destas nanopartículas apresentaram-se praticamente inalterados, não apresentando diferença estatística em função do tempo ($p < 0,05$) (Figura 12). Os resultados indicam, portanto, que as preparações de CLN vazios são estáveis quando armazenadas a 4° C.

Figura 12 – (A) Valores de diâmetro e índice de polidispersão (Pdl) de CLN vazias em função do tempo, (B) valores de potencial zeta de CLN vazias em função do tempo. Análise de One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey não indicou significância estatística entre os valores de diâmetro, Pdl e PZ em um nível de confiança de 95%.

A estabilidade dos CLN-EGCG foi avaliada pelo período de 90 dias. Durante estes períodos os valores de diâmetro, Pdl e potencial zeta não apresentaram diferença estatística significativa no período avaliado ($p < 0,05$) (Figura 13), demonstrando a alta estabilidade dos CLN-EGCG quando armazenadas a 4° C.

Figura 13 – (A) Valores de diâmetro e Pdl de CLN-EGCG em função do tempo. (B) Valores de potencial zeta de CLN-EGCG em função do tempo. Análise de One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey não indicou significância estatística entre os valores de diâmetro, Pdl e potencial zeta em um nível de confiança de 95%

Assim como apresentado no presente estudo, a estabilidade de nanopartículas encapsulando EGCG também é relatada na literatura por outros autores (Radhakrishnan et al., 2016; Frias et al., 2016). Frias e colaboradores em 2016 avaliaram a estabilidade de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados encapsulando EGCG e, assim como o presente trabalho comprovaram a estabilidade das partículas preparadas pelo período de 3 meses. No entanto, diferentemente do presente estudo, o diâmetro hidrodinâmico e o potencial Zeta das partículas com EGCG diminuíram com o passar do tempo, fato esse que pode ser justificado pela ausência de quitosana na preparação destas partículas.

4.4 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A técnica de rastreamento de nanopartículas foi utilizada para caracterizar as suspensões de CLN. Essa técnica permite a determinação do diâmetro hidrodinâmico, visualização das nanopartículas e seu movimento browniano por meio de vídeos, bem como a determinação da concentração de nanopartículas por mL de dispersão.

A análise de distribuição de tamanho das partículas em 3D é apresentada na Figura 13. Nesta Figura é possível observar que há partículas com o mesmo diâmetro, porém com espalhamentos distintos indicando a presença de mais de um tipo de estrutura na formulação. O diâmetro hidrodinâmico médio dos CLN foi de $143,1 \pm 47,4$ nm. A concentração foi de $6,59 \times 10^{12}$ partículas por mL. Esta concentração é importante para determinar a concentração de nanopartículas vazias que foram usadas no tratamento dos micro-organismos nos ensaios antimicrobianos.

Figura 14 – Distribuição de tamanho de partículas em 3D dos CLN pela técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).

O diâmetro hidrodinâmico obtido por NTA foi inferior ao obtido por DLS. Esta diferença pode ser atribuída à maior precisão da técnica de NTA que mede partícula por partícula podendo, em alguns casos, diferenciar diferentes estruturas na formulação como, por exemplo, nanopartículas de cristais de fármaco ou micelas (Filipe; Hawe; Jiskoot, 2010). Além disso, observa-se por NTA diferentes populações de partículas; que pode ser devido a presença da quitosana como componente das nanoformulações.

4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise morfológica de nanopartículas por AFM é amplamente empregada para a etapa de caracterização da morfologia superficial de partículas, bem como para a determinação do seu diâmetro médio. Diversos autores têm empregado esta técnica para a caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados, justificando ser uma metodologia sensível e eficaz (Silva, 2016; Sandri et al., 2017).

A microscopia de força atômica mostra que a maioria dos carreadores lipídicos nanoestruturados preparados neste estudo apresentam morfologia esférica (Figura 15) e diâmetro médio de 251 ± 96 nm. A morfologia esférica para os carreadores lipídicos foi também observada por AFM em outros trabalhos (Taratula et al., 2013; Singh et al., 2016; Sandri et al., 2017).

Figura 15 – (A) Morfologia 2D, (B) Morfologia 3D de carreadores lipídicos nanoestruturados híbridos (CLN) por Microscopia de Força Atômica (AFM).

4.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise da cristalinidade das nanopartículas por meio da avaliação do comportamento térmico pela técnica de DSC também é relatada por outros autores (de Oliveira et al., 2016; Silva, 2015) devido às suas vantagens, que incluem o rápido processamento da amostra, necessidade de pequena quantidade de amostra necessária e fácil detecção de interações físicas (Chadha; Bhandari, 2014; Severino et al., 2011). Assim, a técnica de calorimetria exploratória diferencial foi empregada no presente estudo com o objetivo de caracterizar os CLN para obter informações sobre cristalinidade e interações entre o fármaco e lipídeos.

Foram analisados os componentes separados (manteiga de illipê (MI), Pluronic F68, EGCG), e as formulações de CLN e CLN-EGCG (Figura 16).

Figura 16 – Termogramas da EGCG, Manteiga de Illipê (MI), Pluronic F68, Carreador Lipídico Nanoestruturado vazio (CLN) e com EGCG (CLN-EGCG)

A MI apresenta um único pico endotérmico em aproximadamente 36,4 °C enquanto que o Pluronic F68 apresenta um pico endotérmico em 53 °C. A EGCG apresentou dois picos endotérmicos 117 e 220 °C. No CLN híbrido, é possível observar picos endotérmicos sendo o primeiro referente a fusão da MI em 36,4° C e o segundo em aproximadamente em 45 °C referente a fusão do estabilizante Pluronic F68. Não foi observado os picos endotérmicos da EGCG, indicando que, provavelmente, a mesma está molecularmente dispersa na matriz do CLN (Istenič et al., 2016; Moreno-Vásquez, 2017).

A avaliação da cristalinidade das partículas é muito relevante no desenvolvimento de formulações de NLS e CLN, uma vez que as nanopartículas lipídicas sólidas podem sofrer mudanças na estrutura cristalina durante a sua estocagem saindo de uma forma cristalina menos organizada (α) para uma forma cristalina mais organizada (β) com consequente expulsão do composto ativo encapsulado. Além disso, a produção de NLS ou CLN muito cristalinos, na forma polimórfica β , reduz a quantidade de fármaco encapsulado (Liu et al., 2007). Desta forma, a determinação da cristalinidade das NLS e CLN é muito relevante.

Na Tabela 8 pode-se observar o baixo índice de recristalização (IR) dos CLN com e sem EGCG, indicando o caráter pouco cristalino das partículas. Essa característica permite encapsular uma maior quantidade de moléculas nos espaços entre as cadeias lipídicas do lipídeo MI, além de prevenir a expulsão do fármaco da CLN durante a estocagem (Liu et al, 2007; Marcato, 2009). Além disso, pode-se observar-se que quando a EGCG foi encapsulada no CLN o IR diminuiu indicando a formação de partículas menos cristalinas em relação às CLN vazias.

Tabela 8 – Valores de entalpia, ponto de fusão e índice de recristalização (IR) do lipídeo MI, Pluronic F68, EGCG, CLN vazio e CLN-EGCG.

Material	Entalpia (J/g)	Ponto de fusão (°C)	IR (%)
Manteiga de Ilipê	135,7	36,35	100,0
Pluronic	129,9	53,01	-
EGCG	88,35/67,12	117,29/220,45	-
CLN-EGCG	18,46/8,14	36,28/44,79	20,93
CLN vazio	19,46/44,79	36,46/41,19	57,22

4.7 Avaliação da Interação dos CLN Com Mucina

Com o objetivo de avaliar a propriedade mucoadesiva dos CLN, foi realizado um estudo de titulação de mucina em uma dispersão de partículas pela técnica de DLS. A técnica de DLS fornece uma metodologia conveniente e acessível para avaliar as interações entre nanopartículas e mucina, assim como apresentado por outros autores (Mazzarino et al., 2012; Griffiths et al., 2016).

A titulação foi feita variando a concentração de mucina de 0 até 0,5 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 16 mostra que ao adicionar concentrações crescentes de mucina, a carga residual positiva da dispersão de nanopartículas começa a reduzir até que se torne negativa. Essa mudança no potencial zeta indica a interação entre as nanopartículas e a mucina. A linha azul no gráfico da Figura 17 indica o potencial zeta dos CLN, sendo que a mudança da carga de positiva para negativa ocorre na concentração de mucina de 0,115 $\mu\text{g/mL}$. A linha preta no gráfico indica a variação do diâmetro hidrodinâmico do CLN; sendo possível observar que o diâmetro dos CLN dobrou quando 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de mucina foi adicionado, indicando também a interação do CLN com a mucina.

Figura 17 – Gráfico da variação do potencial zeta e diâmetro de CLN em função da concentração de mucina.

A mucina possui carga residual negativa devido a ionização de resíduos sulfatados e ácido siálico. Os grupos carboxílicos da mucina contribuem para o desenvolvimento de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, favorecendo a sua interação com moléculas com carga

positiva como, por exemplo, a quitosana (Raskin; Schlachet; Sosnik, 2016). Já a quitosana possui grupos OH e NH₂, que podem dar origem a ligações de hidrogênio e forte interação eletrostática com a mucina. Além disso, a quitosana é uma molécula linear e flexível sendo que a sua conformação é altamente dependente da força iônica (Islam et al., 2015; Xu et al., 2015; Patil; Nanduri, 2017). Estas propriedades são consideradas essenciais para mucoadesão. Para tanto, a capacidade das nanopartículas mucoadesivas de interagirem com a superfície mucosa carregada negativamente pode ser útil para prolongar o tempo de ação da EGCG, o que melhoraria o seu desempenho para o uso tópico bucal.

4.8 Método Analítico de Quantificação de EGCG por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O método de eluição isocrática com fase móvel composta por uma mistura de metanol e solução aquosa de ácido acético 0,1% (v/v) na proporção de 40:60 (v/v), com fluxo de 1 mL/min, detecção em 274 nm foi eficiente para eluir a EGCG com pico definido no tempo de retenção de 4,337 minutos (Figura 18). Essas condições cromatográficas também foram descritas por Burana-osot e Yanpaisan em 2012.

Figura 18 – Cromatograma de padrão de EGCG na concentração de 20 µg/mL.

4.8.1 Curva Analítica

Inicialmente, foi construída uma curva de calibração na faixa de 5 – 30 µg/mL. A equação da reta da curva analítica foi: $y = -65672,1 + 20639,3x$ e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9935, indicando que a faixa de concentração utilizada é linear de acordo com a RE899 da ANVISA (Figura 19) (Anvisa, 2003).

Figura 19 – Curva analítica para quantificação de EGCG por CLAE.

A seletividade do método foi determinada através da análise por CLAE da presença de interferentes na formulação de CLN vazio. O método analítico foi seletivo para a quantificação de EGCG, pois não houve pico cromatográfico no tempo de retenção de 4,3 minutos e, portanto, não há interferentes nas formulações de CLN (Figura 20).

Figura 20 – Cromatograma do filtrado de CLN vazio.

4.8.2 Determinação da EE%

A partir da curva analítica obtida (Figura 21) por CLAE, calculou-se a eficiência de encapsulamento dos CLN-EGCG obtendo o valor de 95,85%. Esta alta porcentagem de encapsulamento, também relatada por outros autores (Sun et al., 2009; Frias et al., 2016), pode ser atribuída a presença de quitosana nas partículas que favorece o encapsulamento de moléculas hidrofílicas (Frias et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2016).

4.9 Atividade Antimicrobiana *In Vitro*

4.9.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) sobre os micro-organismos cariogênicos *in vitro*

A atividade antimicrobiana dos CLN, CLN-EGCG e EGCG livre foi realizada pela técnica de microdiluição, seguido pela determinação da CBM. Embora existam estudos comprovando a atividade antimicrobiana de soluções à base de EGCG (Vilela, 2015; Xu; Zhou; Wu, 2012), não existe na literatura estudos que avaliem a atividade antimicrobiana de EGCG encapsulada em nanopartículas.

A Tabela 9 apresenta os resultados da determinação da CIM e CBM dos CLNs com e sem EGCG e EGCG livre e a Figura 21 apresenta os resultados comparativos de CIM e CBM para a EGCG na forma livre e encapsulada.

Tabela 9 – Valores de CIM e CBM da EGCG livre, CLN-EGCG e CLN vazio frente a diferentes micro-organismos.

Micro-organismo	EGCG livre ($\mu\text{g/mL}$)		CLN-EGCG ($\mu\text{g/mL}$)		CLN vazio (partículas/mL)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. mutans</i>	250	500	33,75	33,75	$0,79 \times 10^{12}$	$0,79 \times 10^{12}$
<i>S. sobrinus</i>	500	500	33,75	33,75	$0,79 \times 10^{12}$	$0,79 \times 10^{12}$
<i>L. casei</i>	1000	1000	67,5	67,5	$1,65 \times 10^{12}$	$1,65 \times 10^{12}$

Verifica-se que as formulações de CLN, CLN-EGCG e EGCG livre inibiram o crescimento bacteriano de todos os micro-organismos cariogênicos avaliados.

Os resultados de MIB e MBC para EGCG na forma livre e encapsulada (CLN-EGCG) indicam que o encapsulamento da EGCG em nanopartículas reduziu em média 95% da concentração necessária de catequina para inibir e reduzir a contagem dos micro-organismos *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*. As concentrações bacteriostáticas (CIM) e bactericidas (CBM) mínimas apresentadas para a EGCG na forma encapsulada e livre foram diferentes entre si para todos os micro-organismos avaliados, sendo que, menores concentrações da catequina são necessárias para inibir e reduzir a contagem de todos os micro-organismos indicadores. A EGCG livre em concentrações inferiores a $250 \mu\text{g/mL}$, não apresentou atividade antimicrobiana sobre nenhum dos micro-organismos cariogênicos avaliados. No entanto, quando é encapsulada em CLNs, uma concentração de $67,5 \mu\text{g/mL}$ de catequina já foi capaz de inibir o crescimento e reduzir a contagem de todos os micro-organismos estudados.

A CIM e CBM verificadas para o CLN vazio e CLN-EGCG não diferiram entre si para os estreptococos do grupo mutans (*S. mutans* e *S. sobrinus*), ou seja, ambas as amostras foram diluídas a 12,5% (v/v) obtendo-se $0,79 \times 10^{12}$ CLN vazio/mL equivalente a $33,75 \mu\text{g/mL}$, de EGCG encapsulada

em CLN (CLN-EGCG). Já para o *L. casei*, os resultados de CIM e CBM foram verificados em amostras de CLN e CLN-EGCG mais concentradas (diluuição de 25%, v/v), obtendo-se $1,65 \times 10^{12}$ CLN vazio/mL equivalente a 67,5 µg/mL de EGCG encapsulada em CLN (CLN-EGCG).

Quanto à EGCG livre, os valores verificados para CIM e CBM foram iguais para os micro-organismos *S. sobrinus* e *L. casei*, ou seja, 500 e 2.000 µg/mL, respectivamente. Mas, foram diferentes para o *S. mutans*, sendo necessário o dobro da concentração de EGCG para que haja ação bactericida frente a esse micro-organismo.

A Figura 21 apresenta os resultados de CBM das formulações de CLN, CLN-EGCG e EGCG livre para os micro-organismos avaliados.

Figura 21 – Ilustração das placas de cultura dos CLNs vazios (partículas/mL), CLN-EGCG (µg/mL) e EGCG livre (µg/mL), na sequência. As setas em vermelho indicam as CBM das formulações para os micro-organismos avaliados.

As concentrações inibitórias e bactericidas mínimas de EGCG livre para os estreptococos do grupo mutans (*S. mutans* e *S. sobrinus*) e para os Lactobacilos foram semelhantes às aquelas apresentada anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Vilela, 2015). Ainda, os valores de CIM e CBM para o *S. mutans* foram semelhantes aos apresentados por outros autores (Xu; Zhou; Wu, 2012). Tanto os resultados microbiológicos constantes no presente trabalho, quanto outros apresentadas anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Vilela 2015) indicam que somente concentrações maiores que 125 µg/mL são capazes de inibir e reduzir a contagem de *S. mutans*, *S.sobrinus* e *L.casei*. Para o presente estudo, concentrações inferiores a 250 µg/mL, não apresentam atividade antimicrobiana sobre nenhum micro-organismo cariogênico. Contudo, quando é encapsulada em CLN, uma concentração de 67,5 µg/mL da catequina já foi capaz de exercer atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos cariogênicos.

No entanto, ao verificar os resultados de CIM e CBM para as partículas vazias sugere-se que a EGCG não influenciou a atividade inibitória e bactericida das nanopartículas vazias, já que tanto a CIM quanto a CBM não diferiram entre as CLN e CLN-EGCG. Ambas as formulações apresentaram concentrações mínimas iguais, equivalentes à diluição 12,5% (v/v) para os *S. mutans* e *S. sobrinus* e 25% (v/v) para o *L. casei*. Apesar dos resultados de atividade antimicrobiana dos CLN e CLN-EGCG terem se mostrado iguais, a EGCG encapsulada em nanopartículas permite explorar também as demais propriedades biológicas desta catequina, que incluem seu potencial antioxidante, antierosivo, antitumoral, anticarcinogênico e inibidor de metaloproteinases. Ainda, o encapsulamento da EGCG em nanopartículas permite melhorar a biodisponibilidade oral desta catequina, aumentar a sua estabilidade física e química e manter o seu efeito na cavidade bucal por longos períodos. Ademais, a comparação entre nossos resultados com os da literatura torna-se impossibilitado, uma vez que não existem, até a presente data, publicações avaliando formulação semelhante.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho se propôs a desenvolver e caracterizar um sistema de encapsulamento de EGCG para a futura aplicação clínica para ser utilizada por pacientes com alto índice e atividade de cárie dental. Assim, o desenvolvimento de uma formulação nanoestruturada composta por nanopartículas revestidas por quitosana encapsulando EGCG possibilitou verificar a eficácia de suas propriedades físico-químicas e antimicrobianas. Essas partículas apresentaram-se estáveis, com propriedade mucoadesivas e alta atividade antimicrobiana, com grande potencial para uso bucal.

No que se diz respeito à eficácia da EGCG, verificada no presente trabalho pela determinação da atividade antimicrobiana desta catequina quando encapsulada em nanopartículas, constatou-se que o processo de encapsulação foi altamente favorável, reduzido a concentração de EGCG necessária para promover efeito antimicrobiano. Desta forma, embora o processo de encapsulamento ainda seja oneroso, a redução de custos referente à matéria prima pôde ser alcançada. Assim, a utilização da nanotecnologia para incorporar EGCG possibilitou o aprimoramento de suas propriedades biológicas e físico-químicas. Embora no presente estudo tenha sido realizado o ensaio microbiológico *in vitro*, trabalhos clínicos futuros são necessários, sendo que muitas crianças ainda apresentam alta atividade de cárie dental. Além da doença cárie, outras condições bucais também compreendem grandes problemas no contexto da saúde bucal, como infecções bacterianas, fúngicas, virais e tumorais. Ainda, mucosites, úlceras e aftas bucais são frequentes em pacientes hospitalizados ou que são submetidos à tratamentos radioterápicos e merecem atenção quanto a novas e efetivas possibilidades para a utilização clínica do sistema desenvolvido. Neste contexto, o nanocarreador com EGCG desenvolvido no presente estudo poderia desempenhar papel preventivo e terapêutico sobre múltiplas condições que afetam a cavidade bucal.

A capacidade mucoadesiva dos carreadores lipídicos híbridos foi comprovada pelo ensaio de titulação com mucina, que demonstrou a interação da nanopartícula desenvolvida com a solução de mucina, representando a mucosa bucal. Portanto, a utilização da quitosana como um componente dos carreadores nanoestruturados é interessante do ponto de vista biológico devido à propriedade mucoadesiva. Assim, uma solução para uso tópico bucal com potencial mucoadesivo que possibilite liberação prolongada e aumento da biodisponibilidade de um produto natural na cavidade bucal confirma desenvolvida uma promissora possibilidade de manejo das doenças bucais infecciosas e inflamatórias. Contudo, estudos futuros com o objetivo de explorar as características de mucoadesão da nanoformulação, que incluem a liberação, disponibilidade e penetração do ativo nos locais de aplicação, devem ser realizados.

Por fim, os aspectos inerentes às propriedades dos carreadores nanoestruturados, verificados no presente trabalho pelas etapas de caracterização físico-química, evidenciam o grande

potencial da partícula desenvolvida no presente estudo. Tal potencial é justificado pela alta taxa de encapsulamento da EGCG, além da estabilidade, mucoadesão e características adequadas da partícula desenvolvida. Para tanto, estudos futuros com a formulação de CLN-EGCG para uso tópico bucal, devem ser realizados, a fim de verificar o comportamento das partículas quando submetidas ao desafio cariogênico e às condições do meio bucal.

Portanto, os CLN-EGCG desenvolvidos no presente trabalho tem potencial para uso como tópico bucal como um excelente agente antimicrobiano que, ainda, apresenta possibilidade de aplicação em outras condições bucais, incluindo outras apresentações como géis, soluções, pomadas e cremes dentais. Os promissores resultados, a possibilidade de aplicação em outras doenças que afetam a cavidade bucal e os benefícios apresentados para uma nanoformulação inédita na área odontológica, contribuiu para a aquisição de sua patente por nosso grupo de pesquisa, que foi depositada com o número BR10201602375 na data de 11/10/2016.

6. CONCLUSÕES

---

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados no presente trabalho, conclui-se que o desenvolvimento de carreadores híbridos nanoestruturados foi eficiente no encapsulamento da EGCG, apresentando mucoadesão, estabilidade, características físico-químicas adequadas e atividade antimicrobiana superior à sua forma livre.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Albuquerque RB, Souza EL, Stamford TLM, Stamford TCM. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *listeria monocytogenes* em produtos cárneos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2009; 10(5):260-274.
- Aliasghari A, Rabbani Khorasgani M, Vaezifar S, Rahimi F, Younesi H, Khoroushi M. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic streptococci: an in vitro study. *Iran J Microbiol*. 2016Apr;8(2):93-100.
- Allaker RP, Douglas CW. Novel anti-microbial therapies for dental plaque related diseases. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:8-13.
- Amorim RVS, Souza W, Fukushima K, Campos-Takaki GM. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Brazilian Journal Microbiology*. 2000;32:20-23.
- Andrade VS, Neto BB, Fukushima K, Campos-Takaki GM. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factorial study. *Revista Iberoamericana de Micologia*. 2003;20:149-153
- Anita P, Sivasamy S, Madan Kumar PD, Balan IN, Ethiraj S. In vitro antibacterial activity of *Camellia sinensis* extract against cariogenic microorganisms. *J Basic Clin Pharm*. 2014;6(1):35-9.
- Antunes DP, Salvia AC, de Araújo RM, Di Nicoló R, Koga Ito CY, de Araujo MA. Effect of green tea extract and mouthwash without alcohol on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. *Gerodontology*. 2014;(5)21.
- Anvisa. Lei nº 10.674/2003 de 16 de maio de 2003. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/alimentos>. Acesso em: 12 dez. 2012.
- Araghizadeh A, Kohanteb J, Fani MM. Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *Med Princ Pract*. 2013;22(4):368-72.
- Aranda Cazón C, Campos Muñoz L, Conde Taboada A, López Bran E. Viral wart treatment with green tea sin catechins. *An Pediatr (Barc)*. 2015;(8)5.
- Arweiler, N.B., Auschill, T.M., Reich, E. and Netuschil, L. Substantivity of toothpaste slurries and their effect on reestablishment of the dental biofilm. 2002. *J Clin Periodontol* 29, 615-621.
- Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, et al. Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol*. 2014;116(5):1164-71
- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv*. 2015;(8)15.
- Barbosa CS, Kato MT, Buzalaf MA. Effect of supplementation of soft drinks with green tea extract on their erosive potential against dentine. *Aust Dent J*. 2011;56(3):317-21.
- Bassi da Silva J, Ferreira SB, de Freitas O, Bruschi ML. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 2017 Mar 1:1-18.
- Bello M, Basilio-Antonio L, Fragoso-Vázquez J, Avalos-Soriano A, Correa-Basurto J. Molecular recognition between pancreatic lipase and natural and synthetic inhibitors. *Int J Biol Macromol*. 2017 May;98:855-868.

- Bilia AR, Piazzini V, Guccione C, Risaliti L, Asprea M, Capecchi G, Bergonzi MC. Improving on Nature: The Role of Nanomedicine in the Development of Clinical Natural Drugs. *Planta Med.* 2017 Mar;83(5):366-381.
- Bitu Pinto N, da Silva Alexandre B, Neves KR, Silva AH, Leal LK, Viana GS. Neuroprotective Properties of the Standardized Extract from *Camellia sinensis* (Green Tea) and Its Main Bioactive Components, Epicatechin and Epigallocatechin Gallate, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:161092.
- Bohren C F.; Huffman, D. R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles, 1983. Wiley-Interscience: New York, EUA.
- Borsatto MC, Giuntini Jde L, Contente MM, Gomes-Silva JM, Torres CP, Galo R. Self-etch bonding agent beneath sealant: Bond strength for laser-irradiated enamel. *Eur J Dent.* 2013 Jul;7(3):289-95.
- Bosio K. et al. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 31(3):174- 177.
- Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):126-31.
- Braicu C, Gherman CD, Irimie A, Berindan-Neagoe I. Epigallocatechin-3 Gallate (EGCG) inhibits cell proliferation and migratory behaviour of triple negative breast cancer cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013;13(1):632-7.
- Brasil. Ministério da Saúde (MS). SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- Brasileiro, BG et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no "Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2008;44(4):629-636.
- Burana-osot J, Yanpaisan W. Catechins and caffeine contents of Green Tea commercialized in Thailand. *Journal of Pharmaceutical and biomedical sciences.* 2012; 22(17):1-7.
- Burne RA. Oral streptococci... products of their environment. *J Dent Res.* 1998 Mar;77(3):445-52.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr.* 2006;25(2):79-99.
- Cai Y, Chen Z, Liu H, Xuan Y, Wang X, Luan Q. Green tea epigallocatechin-3-gallate alleviates *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2015 Dec;29(2):839-45.
- Camouse MM, Domingo DS, Swain FR, Conrad EP, Matsui MS, Maes D, et al. Topical application of green and White tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. *Exp Dermatol.* 2009;18(6):522-6.
- Cantarelli R, Negrini TC, Muniz FW, Oballe HJ, Arthur RA, Rösing CK. Antimicrobial potential and gustatory perception of chlorhexidine gluconate mouthwashes with or without alcohol after a single rinse - a randomized controlled crossover clinical trial. 2016 *Int J Dent Hyg* Nov 7.
- Chadha R, Bhandari S. Drug-excipient compatibility screening--role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *J Pharm Biomed Anal.* 2014 Jan;87:82-97.
- Chatterjee S, Adhya M, Guha AK, Chatterjee BP. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemical.* 2005;40:395-400.
- Chávez de Paz LE, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Jun;77(11):3892-5.
- Chen H, Huang B. Pilot study of the effect of green tea extractive epigallocatechin-3-gallate on degradation of collagen in dental erosion. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2012 Oct;30(5):549-51.

- Chen PN, Chu SC, Kuo WH, Chou MY, Lin JK, Hsieh YS. Epigallocatechin-3 gallate inhibits invasion, epithelial-mesenchymal transition, and tumor growth in oral cancer cells. *J Agric Food Chem*. 2011 Apr 27;59(8):3836-44.
- Chen ZM, Lin Z. Tea and human health: biomedical functions of tea active components and current issues. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2015;16(2):87-102.
- Chesser AS, Ganeshan V, Yang J, Johnson GV. Epigallocatechin-3-gallate enhances clearance of phosphorylated tau in primary neurons. *Nutr Neurosci*. 2015 Jul 24.
- Cho AR, Kim JH, Lee DE, Lee JS, Jung UW, Bak EJ, et al. The effect of orally administered epigallocatechin-3-gallate on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2013;48(6):781-9.
- Chung JE, Tan S, Gao SJ, Yongvongsoontorn N, Kim SH, Lee JH, Choi HS, Yano H, Zhuo L, Kurisawa M, Ying JY. Self-assembled micellar nanocomplexes comprising green tea catechin derivatives and protein drugs for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2014 Nov;9(11):907-12.
- Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JC, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin*. 2004 Jul;25(7):932-6.
- Clinical and Laboratory Standards institute. Methods for Dilution Antimicrobial Sceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9 (ISBN 1-56238-783-9 [Print]; ISBN 1-56238-784-7 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
- Costa X, Laguna E, Herrera D, Serrano J, Alonso B, Sanz M. Efficacy of a new mouth rinse formulation based on 0.07% cetylpyridinium chloride in the control of plaque and gingivitis: a 6-month randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2013 Nov;40(11):1007-15.
- Cury JA, Tenuta LM. Evidence-based recommendation on toothpaste use. *Braz Oral Res*. 2014;28 Spec No:1-7.
- da Costa LF, Amaral CD, Barbirato DD, Leão AT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc*. 2017 Mar 8. pii: S0002-8177(17)30082-X.
- de Oliveira GG, Feitosa A, Loureiro K, Fernandes AR, Souto EB, Severino P. Compatibility study of paracetamol, chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in physical mixtures. *Saudi Pharm J*. 2017 Jan;25(1):99-103.
- De Pace RCC, Liu X, Sun M, Nie S, Zhang J, Cai Q, Gao W, Pan X, Fan Z, Wang S. Anticancer activities of (–)-Epigallocatechin-3-gallate encapsulated nanoliposomes in MCF7 breast cancer cells. *J. Liposome Res*. 2013;23:187–196.
- De Rossi A, Ferreira DCA; Silva, LAB, Silva RS, inventores. Formulação à base de Epigallocatequina-3-galato e seu uso. Brasil patente-Int. BR1020140141871.11 Jun 2014.
- De Rossi A, Moreno APD, Marcato PD, De Rossi A, Vilela MM, Salvador SL, Silva RS, inventores. Formulação tópica de uso bucal e seu uso. Brasil patente-Int. BR10201602375. 11 Out 2016.
- Du X, Huang X, Huang C, Wang Y, Zhang Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. *J Dent*. 2012 Jun;40(6):485-92.
- Durso SC1, Vieira LM, Cruz JN, Azevedo CS, Rodrigues PH, Simionato MR. Sucrose substitutes affect the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* biofilms. *Caries Res*. 2014;48(3):214-22.
- Dzink JL, Socransky SS. Comparative in vitro activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 Apr;27(4):663-5.

- Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Mukhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(3):425-32.
- Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med*. 1998 Dec;64(8):711-3.
- Elton Luiz Silva. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo ácido retinóico e ácido láurico para o tratamento tópico da acne vulgaris [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- Fabiano A, Zambito Y, Bernkop-Schnürch A. About the impact of water movement on the permeation behaviour of nanoparticles in mucus. *Int J Pharm*. 2017 Jan 30;517(1-2):279-285.
- Fangueiro JF, Andreani T, Fernandes L, Garcia ML, Egea MA, Silva AM, Souto EB. Physicochemical characterization of epigallocatechin gallate lipid nanoparticles (EGCG-LNs) for ocular instillation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Nov 1;123:452-60.
- Fatemi MJ, Nikoomaram B, Rahimi AA, Talayi D, Taghavi S, Ghavami Y. Effect of green tea on the second degree burn wounds in rats. *Indian J Plast Surg*. 2014;47(3):370-4.
- Fejerskov O, Nyvad B: Is dental caries an infectious disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner; in Schou L (ed): *Nordic Dentistry 2003 Yearbook*. Copenhagen, Quintessence Publishing, 2003, pp 141– 151.
- Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*. 2004 May-Jun;38(3):182-91.
- Ferrazzano GF, Roberto L, Amato I, Cantile T, Sangianantoni G, Ingenito A. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: an in vivo study. *J Med Food*. 2011;14(9):907-11.
- Ferreira, DCA. Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema para liberação intracanal de Epigallocatequina-3-galato e seu efeito na cor dos dentes [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2013.
- Ferreira, DCA. Formulação à base de Epigallocatequina-3-galato, derivada do chá verde, desenvolvida para uso endodôntico: estudo físico-químico e biológico. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2015.
- Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*. 2010 May;27(5):796-810.
- Fisher-Owens SA, Gansky SA, Platt LJ, Weintraub JA, Soobader MJ, Bramlett MD, Newacheck PW. Influences on children's oral health: a conceptual model. *Pediatrics*. 2007 Sep;120(3):e510-20
- Frandsen A. Mechanical oral hygiene practices. In: Löe, H. & Kleinman, D.V., eds. *Dental Plaque Control Measures and Oral Hygiene Practices*. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1986; 93-116.
- Franz-Montan M, Ribeiro LN, Volpato MC, Cereda CM, Groppo FC, Tofoli GR, de Araújo DR, Santi P, Padula C, de Paula E. Recent advances and perspectives in topical oral anesthesia. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016 Sep 1:1-12.
- Freitas C, Müller RH. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm*. 1999 Mar;47(2):125-32.
- Frias I, Neves AR, Pinheiro M, Reis S. Design, development, and characterization of lipid nanocarriers-based epigallocatechin gallate delivery system for preventive and therapeutic supplementation. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Oct 31;10:3519-3528.
- Friedrich M, Petzke KJ, Raederstorff D, Wolfram S, Klaus S. Acute effects of epigallocatechin gallate from green tea on oxidation and tissue incorporation of dietary lipids in mice fed a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(5):735-43.

Fritz G, Schädler V, Willenbacher N, Wagner NJ. Electrosteric stabilization of colloidal dispersions. *Langmuir*. 2002 Abr;18(16):6381-6390.

Fu Z, Zhen W, Yuskavage J, Liu D. Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. *Br J Nutr*. 2011;105(8):1218-25.

Fukushima RS, Weimer PJ, Kunz DA. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

García-Caballero L, Quintas V, Prada-López I, Seoane J, Donos N, Tomás I. Chlorhexidine substantivity on salivary flora and plaque-like biofilm: an in situ model. *PLoS One*. 2013 Dec 27;8(12):e83522.

Geszke-Moritz M, Moritz M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Nov 1;68:982-94.

Ghasempour M, Moghadamnia AA, Abedian Z, Amir MP, Feizi F, Gharekhani S. In vitro viability of human periodontal ligament cells in green tea extract. *J Conserv Dent*. 2015;18(1):47-50.

Ghorbani P, Soltani M, Homayouni-Tabrizi M, Namvar F, Azizi S, Mohammad R, Moghaddam AB. Sumac silver novel biodegradable nano composite for bio-medical application: antibacterial activity. *Molecules*. 2015 Jul 17;20(7):12946-58.

Goyal AK, Bhat M, Sharma M, Garg M, Khairwa A, Garg R. Effect of green tea mouth rinse on *Streptococcus mutans* in plaque and saliva in children: An in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2017 Jan-Mar;35(1):41-46.

Griffiths PC, Cattoz B, Ibrahim MS, Anuonye JC. Probing the interaction of nanoparticles with mucin for drug delivery applications using dynamic light scattering. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015 Nov;97:218-22.

Grove KA, Sae-Tan S, Kennett, MJ and Lambert, JD. Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Pancreatic Lipase and Reduces Body Weight Gain in High Fat-Fed Obese Mice. *Obesity*. 2012. 20: 2311–2313.

Gu JW, Makey KL, Tucker KB, Chinchar E, Mao X, Pei I, et al. EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression. *Vasc Cell*. 2013;25(1):9.

Gu Y, Wang Y, Zhou Q, Bowman L, Mao G, Zou B, Xu J, Liu Y, Liu K, Zhao J, Ding M. Inhibition of Nickel Nanoparticles-Induced Toxicity by Epigallocatechin-3-Gallate in JB6 Cells May Be through Down Regulation of the MAPK Signaling Pathways. *PLoS One*. 2016 Mar 4;11(3):e0150954.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*. 1980 Jun;44(2):331-84.

Hambire CU, Jawade R, Patil A, Wani VR, Kulkarni AA, Nehete PB. Comparing the antiplaque efficacy of 0.5% *Camellia sinensis* extract, 0.05% sodium fluoride, and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in children. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(3):218-26.

Han DW, Lee MH, Kim HH, Hyon SH, Park JC. Epigallocatechin-3-gallate regulates cell growth, cell cycle and phosphorylated nuclear factor- κ B in human dermal fibroblasts. *Acta Pharmacol Sin*. 2011 May;32(5):637-46.

Hara K, Ohara M, Hayashi I, Hino T, Nishimura R, Iwasaki Y, Ogawa T, Ohyama Y, Sugiyama M, Amano H. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate precipitates salivary proteins including α -amylase: biochemical implications for oral health. *Eur J Oral Sci*. 2012 Apr;120(2):132-9.

Hashimoto O, Nakamura A, Nakamura T, Iwamoto H, Hiroshi M, Inoue K, et al. Methylated-(3'')-epigallocatechin gallate analog suppresses tumor growth in Huh7 hepatoma cells via inhibition of angiogenesis. *Nutr Cancer*. 2014;66(4):728-35.

- Hazzah HA, Farid RM, Nasra MM, Zakaria M, Gawish Y, El-Massik MA, Abdallah OY. A new approach for treatment of precancerous lesions with curcumin solid-lipid nanoparticle-loaded gels: in vitro and clinical evaluation. *Drug Deliv*. 2016 May;23(4):1409-19.
- Ho YC, Yang SF, Peng CY, Chou MY, Chang YC. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *J Oral Pathol Med*. 2007 Nov;36(10):588-93.
- Hong Z, Xu Y, Yin JF, Jin J, Jiang Y, Du Q. Improving the effectiveness of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) against rabbit atherosclerosis by EGCG-loaded nanoparticles prepared from chitosan and polyaspartic acid. *J Agric Food Chem*. 2014;31;62(52):12603-9.
- Horner V, Pittermann W, Wachter R. Efficiency of high molecular weight chitosan in skin care applications. In: Domard A, Roberts GAF, Varum KM. *Advances in chitin science*. 1997. Lyon, Jacques Andre Publishers. p 671-677.
- Hosnuter M, Melikoglu C, Aslan C, Saglam G, Sutcu R. The Protective Effects of Epigallocatechin Gallate Against Distant Organ Damage After Severe Skin Burns--Experimental Study Using a Rat Model of Thermal Trauma. *Adv Clin Exp Med*. 2015 May-Jun;24(3):409-17.
- Hrishi T, Kundapur P, Naha A, Thomas B, Kamath S, Bhat G. Effect of adjunctive use of green tea dentifrice in periodontitis patients - A Randomized Controlled Pilot Study. *Int J Dent Hyg*. 2015 Feb 17.
- Hu J, Du X, Huang C, Fu D, Ouyang X, Wang Y. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. *J Dent*. 2013 Oct;41(10):927-34.
- Ikinci G, Senel S, Akincibay H, Kaş S, Erciş S, Wilson CG, Hincal AA. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Pharm*. 2002 Mar 20;235(1-2):121-7.
- Islam MA, Park TE, Reesor E, Cherukula K, Hasan A, Firdous J, Singh B, Kang SK, Choi YJ, Park IK, Cho CS. Mucoadhesive Chitosan Derivatives as Novel Drug Carriers. *Curr Pharm Des*. 2015;21(29):4285-309.
- Istenič K, Cerc Korošec R, Poklar Ulrih N. Encapsulation of (-)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes. *J Sci Food Agric*. 2016 Oct;96(13):4623-32.
- Jain I, Jain P. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of three different formulations of mouth rinses with multi-herbal mouth rinse. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2016 Oct-Dec;34(4):315-23.
- Jeon J, Kim JH, Lee CK, Oh CH, Song HJ. The Antimicrobial Activity of (-)-Epigallocatechin 3-Gallate and Green Tea Extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Isolated from Skin Wounds. *Ann Dermatol*. 2014 Oct;26(5):564-9.
- Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontol 2000*. 1997 Oct;15:55-62.
- Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009 Feb;71(2):161-72.
- Jung IH, Lee DE, Yun JH, Cho AR, Kim CS, You YJ, Kim SJ, Choi SH. Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament. *J Periodontal Implant Sci*. 2012 Dec;42(6):185-95.
- Kamath PR, Sunil D. Nano-chitosan particles in anticancer drug delivery: An up-to-date review. *Mini Rev Med Chem*. 2017 Feb 27.
- Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci*. 2009 Nov-Dec;17(6):560-4.

- Kaur S, Bhararia A, Sharma K, Mittal S, Jain R, Wangoo N, Sharma RK. Thyrotropin-Releasing Hormone Loaded and Chitosan Engineered Polymeric Nanoparticles: Towards Effective Delivery of Neuropeptides. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016 May;16(5):5324-32
- Keyes PH, Fitzgerald RJ. Dental caries in the Syrian hamster. IX. *Arch Oral Biol*. 1962 May-Jun;7:267–277.
- Khamverdi Z, Rezaei-Soufi L, Kasraei S, Ronasi N, Rostami S. Effect of Epigallocatechin Gallate on shear bond strength of composite resin to bleached enamel: an in vitro study. *Restor Dent Endod*. 2013 Nov;38(4):241-7
- Khan N, Bharali DJ, Adhami VM, Siddiqui IA, Cui H, Shabana SM, Mousa SA, Mukhtar H. Oral administration of naturally occurring chitosan-based nanoformulated green tea polyphenol EGCG effectively inhibits prostate cancer cell growth in a xenograft model. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):415-23.
- Kim SK, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*. 2005;62:357- 368.
- Kokoletsi MX, Kafkala S, Tsiaganis M. A novel gradient HPLC method for simultaneous determination of ranitidine, methylparaben and propylparaben in oral liquid pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2005; 38(4):763-767.
- Kouadio AA, Struillou X, Bories C, Bouler JM, Badran Z, Soueidan A. An in vitro analysis model for investigating the staining effect of various chlorhexidine-based mouthwashes. *J Clin Exp Dent*. 2017 Mar 1;9(3):e410-e416.
- Kt S, Kmk M, N B, Jimson S, R S. Dental caries vaccine - a possible option? *J Clin Diagn Res*. 2013 Jun;7(6):1250-3.
- Kuo YC, Lin JC, Bernard JR, Liao YH. Green tea extract supplementation does not hamper endurance-training adaptation but improves antioxidant capacity in sedentary men. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015;8:1-7.
- Lagerweij MD, van Loveren C. Declining Caries Trends: Are We Satisfied? *Curr Oral Health Rep*. 2015;2(4):212-217.
- Lang NP, Hotz P, Graf H, Geering AH, Saxer UP, Sturzenberge OP, Meckel AH. Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. *Journal of Periodontal Research* 1982;17: 101–111.
- Lang NP, Brex MC. Chlorhexidine digluconate—an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *Journal of Periodontal Research*, 1986; 21: 74–89.
- Lee BS, Lee CC, Lin HP, Shih WA, Hsieh WL, Lai CH, Takeuchi Y, Chen YW. A functional chitosan membrane with grafted epigallocatechin-3-gallate and lovastatin enhances periodontal tissue regeneration in dogs. *Carbohydr Polym*. 2016 Oct 20;151:790-802.
- Lee HJ, Lee YN, Youn HN, Lee DH, Kwak JH, Seong BL, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS. Anti-influenza virus activity of green tea by-products in vitro and efficacy against influenza virus infection in chickens. *Poult Sci*. 2012;91(1):66-73.
- Lee S, Razqan GS, Kwon DH. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with β -lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*. 2017 Jan 15;24:49-55.
- Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol*. 2005 Jan;7(1):95-107.
- Leu JG, Chen SA, Chen HM, et al. The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and α -lipoic acid. *Nanomedicine*. 2012;8(5):767–775.

Li C, Zhang J, Zu YJ, Nie SF, Cao J, Wang Q, Nie SP, Deng ZY, Xie MY, Wang S. Biocompatible and biodegradable nanoparticles for enhancement of anti-canceractivities of phytochemicals. *Chin J Nat Med*. 2015 Sep;13(9):641-52.

Liu J, Gong T, Wang C, Zhong Z, Zhang Z. Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization. *Int J Pharm*. 2007 Aug 1;340(1-2):153-62.

Liu XL, Liu HQ, Li J, Yang L, Zhao X. Experimental study on anti-tumor effect and mechanism of green tea extract. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2014. *Journal of dental research* 2014;93(1):8–18.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986 Dec.; 50(4): 353-380

Löue H, Rindom Schiöutt C, Glavind L, Karring T. Two years oral use of chlorhexidine in man. *Journal of Periodontal Research*. 1976; 11:135–144

Macpherson LM, MacFarlane TW, Geddes DA, Stephen KW. Assessment of the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* strains and its relationship to in vivo caries experience. *Oral Microbiol Immunol*. 1992 Jun;7(3):142-7.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf M. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent*. 2009; 37:994-998.

Magee P. Antiseptic drugs and disinfectants. *Side Eff. Drugs Annu*. 2007, 29, 241–243.

MALVERN STRUMENTS. Disponível em: <http://www.malvern.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/> Acessado em 13 de Fev 2017.

Mandel SA, Amit T, Weinreb O, Reznichenko L, Youdim MB. Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurosci Ther*. 2008 Winter;14(4):352-65.

Manji F, Fejerskov O, Nagelkerke NJ, Baelum V. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1991 Dec;19(6):324-8

Mankodi S, Bauroth K, Witt JJ, Bsoul S, He T, Gibb R, Dunavent J, Hamilton A. A 6-month clinical trial to study the effects of a cetylpyridinium chloride mouthrinse on gingivitis and plaque. *Am J Dent*. 2005 Jul;18 Spec No:9A-14A.

Mankovskaia A1, Lévesque CM, Prakki A. Catechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans*. *J Appl Oral Sci*. 2013 Mar-Apr;21(2):203-7.

Marcato PD, Caverzan J, Rossi-Bergmann B, Pinto EF, Machado D, Silva RA, Justo GZ, Ferreira CV, Durán N. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011 Mar;11(3):1880-6.

Marcato PD, Durán N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *J Nanosci Nanotechnol*. 2008 May;8(5):2216-29.

Marcato PD, Favaro WJ, Duran N. Cisplatin Properties in a Nanobiotechnological Approach to Cancer: A Mini-Review. *Curr Cancer Drug Targets*. 2014 May 8.

Marcato PD. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica De Farmácia*. 2009;6:1-37.

Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, Izadi M, Abdollahi M, Nabavi SM, Ajami M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Crit Rev Microbiol*. 2017 Mar 27:1-22

Marsh P, Martin M. *Oral Microbiology* 1992. Springer. London, UK.

- Maruyama T, Murata S, Nakayama K, Sano N, Ogawa K, Nowatari T, et al. (-)- Epigallocatechin-3-gallate suppresses liver metastasis of human colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2014;31(2):625-33.
- Maruyama T, Tomofuji T, Endo Y, Irie K, Azuma T, Ekuni D, Tamaki N, Yamamoto T, Morita M. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. *Arch Oral Biol.* 2011 Jan;56(1):48-53.
- Mathur S, Mathur T, Shrivastava R, Khatri R. Chlorhexidine: The gold standard in chemical plaque control. *Nat J Physiol Pharm Pharmacol.* 2011; 1(2): 45-50.
- Mazzarino L, Travelet C, Ortega-Murillo S, Otsuka I, Pignot-Paintrand I, Lemos-Senna E, Borsali R. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. *J Colloid Interface Sci.* 2012 Mar 15;370(1):58-66.
- McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr.* 2002 Feb;21(1):1-13.
- Mehta S, Pesapathy S, Joseph M, Tiwari PK, Chawla S. Comparative evaluation of a herbal mouthwash (Freshol) with chlorhexidine on plaque accumulation, gingival inflammation, and salivary *Streptococcus mutans* growth. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2013;3(1):25-8.
- Mirkarimi M, Toomarian L. Effect of green tea extract on the treatment of dentin erosion: an in vitro study. *J Dent (Tehran).* 2012;9(4):224-8.
- Moghim R, Aliahmadi A, Rafati H. Ultrasonic nanoemulsification of food grade trans cinnamaldehyde: 1,8-Cineol and investigation of the mechanism of antibacterial activity. *Ultrason Sonochem.* 2017 Mar;35(Pt A):415-421.
- Mohanasrinivasan V, Mishra M, Paliwal JS, Singh SK, Selvarajan E, Suganthi V, Subathra Devi C. Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste. *3 Biotech.* 2014 Apr;4(2):167-175.
- Monteiro Júnior AO. Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 1999.
- Moran J, Addy M, Wade W. Determination of minimum inhibitory concentrations of commercial toothpastes using an agar dilution method. *J Dent*, v.16, p. 27-31, 1988.
- Moran J; Addy M. The antibacterial properties of some commercially available toothpaste in vitro. *Br. Dent. J*, v. 10, p. 156-75, 1984.
- Moreno-Vásquez MJ, Valenzuela-Buitimea EL, Plascencia-Jatomea M, Encinas-Encinas JC, Rodríguez-Félix F, Sánchez-Valdes S, Rosas-Burgos EC, Ocaño-Higuera VM, Graciano-Verdugo AZ. Functionalization of chitosan by a free radical reaction: Characterization, antioxidant and antibacterial potential. *Carbohydr Polym.* 2017 Jan 2;155:117-127.
- Morin MP, Grenier D. Regulation of matrix metalloproteinase secretion by green tea catechins in a three-dimensional co-culture model of macrophages and gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2017 Mar;75:89-99
- Moshrefi A. Chlorhexidine. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr.* 2002;50(1):5-9.
- Mukherjee B. Nanosize drug delivery system. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14(15):1221.
- Mukherjee S, Ghosh S, Das DK, Chakraborty P, Choudhury S, Gupta P, Adhikary A, Dey S, Chattopadhyay S. Gold-conjugated green tea nanoparticles for enhanced anti-tumor activities and hepatoprotection- synthesis, characterization and in vitro evaluation. *J Nutr Biochem.* 2015 Nov;26(11):1283-97.

Müller RH, Runge SA, Ravelli V, Thünemann AF, Mehnert W, Souto EB. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008 Mar;68(3):535-44.

Narotzki B, Levy Y, Aizenbud D, Reznick AZ. Green tea and its major polyphenol EGCG increase the activity of oral peroxidases. *Adv Exp Med Biol.* 2013;756:99-104.

Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Adv Pharm Bull.* 2015 Sep;5(3):305-13.

Neilands J, Sutherland D, Resin A, Wejse PL, Chávez de Paz LE. Chitosan nanoparticles affect the acid tolerance response in adhered cells of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 2011;45(6):501-5.

Neturi RS, R S, B VS, Y SS, T CS, P SK. Effects of Green Tea on *Streptococcus mutans* Counts- A Randomised Control Trail. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(11):ZC128 30.

Neves PA, Ribeiro CC, Tenuta LM, Leitão TJ, Monteiro-Neto V, Nunes AM, Cury JA. Breastfeeding, Dental Biofilm Acidogenicity, and Early Childhood Caries. *Caries Res.* 2016;50(3):319-24.

Newbrun E. Uses and abuses of the news release/press conference. *J Dent Res.* 1988 Nov;67(11):1442-3

Nidhi M, Patro MN, Kusumvalli S, Kusumdevi V. Development of transmucosal patch loaded with anesthetic and analgesic for dental procedures and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine.* 2016 Jun 20;11:2901-20.

Ntie-Kang F, Lifongo LL, Mbaze LM, Ekwelle N, Owono Owono LC, Megnassan E, Judson PN, Sippl W, Efange SM. Cameroonian medicinal plants: a bioactivity versus ethnobotanical survey and chemotaxonomic classification. *BMC Complement Altern Med.* 2013;26;13:147.

Ortsäter H, Grankvist N, Wolfram S, Kuehn N, Sjöholm A. Diet supplementation with green tea extract epigallocatechin gallate prevents progression to glucose intolerance in db/db mice. *Nutr Metab (Lond).* 2012;14;9:11.

Osso D, Kanani N. Antiseptic mouth rinses: an update on comparative effectiveness, risks and recommendations. *J Dent Hyg.* 2013 Feb;87(1):10-8.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Aug;46(8):2720-2.

Panyam, J.; Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Delivery Rev.* 55, 329-347.

Parwani SR, Parwani RN, Chitnis PJ, Dadlani HP, Prasad SV. Comparative evaluation of anti-plaque efficacy of herbal and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in a 4-day plaque re-growth study. *J Indian Soc Periodontol.* 2013 Jan;17(1):72-7.

Pasich E, Bialecka A, Marcinkiewicz J. Efficacy of taurine haloamines and chlorhexidine against selected oral microbiome species. *Med Dosw Mikrobiol.* 2013;65(3):187-96.

Patil SV, Nanduri LS. Interaction of Chitin/Chitosan with Salivary and other epithelial cells - An Overview. *Int J Biol Macromol.* 2017 Mar 15.

Pawtłowska E. The assessment of influence of chitosan on the dental pulp in rats. In: Domard A, Roberts GAF, Varum KM. *Advances in chitin science.* Lyon: Jacques Andre Publishers. 1997:705-710

Pereira C, Barros L, Ferreira IC. Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects. *J Sci Food Agric.* 2015;(9)3.

Pizzo G, Compilato D, Di Liberto B, Pizzo I, Campisi G. Effects of two essential oil mouthrinses on 4-day supragingival plaque regrowth: a randomized cross-over study. *Am J Dent.* 2013 Jun;26(3):156-60.

- Poggio C, Trovati F, Ceci M, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Biological and antibacterial properties of a new silver fiber post: In vitro evaluation. *J Clin Exp Dent*. 2017 Mar 1;9(3):e387-e393.
- Ponnuraj R, Janakiraman K, Gopalakrishnan S, Senthilnathan K, Meganathan V, Saravanan P. Formulation And Characterization of Epigallocatechin Gallate Nanoparticles. *Indo American Journal of Pharm Research*. 2015 Jan; 5(01):399-387.
- Prasanth M. Antimicrobial efficacy of different toothpastes and mouthrinses: an in vitro study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2011 Spring;8(2):85-94.
- Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. Atlas Desenvolvimento Humano no Brasil 2013. Índice Desenvolvimento Humano [Internet]. Brasília: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento [acessado em 2016 Abr 20]. Disponível em: <http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/consulta>
- Quintas V, Prada-López I, Prados-Frutos JC, Tomás I. In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2 % chlorhexidine. *Clin Oral Investig*. 2014 Apr 1.
- Quirynen M, Soers C, Desnyder M, Dekeyser C, Pauwels M, van Steenberghe D. A 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2005 Apr;32(4):390-400.
- Radhakrishnan R, Kulhari H, Pooja D, Gudem S, Bhargava S, Shukla R, Sistla R. Encapsulation of biophenolic phytochemical EGCG within lipid nanoparticles enhances its stability and cytotoxicity against cancer. *Chem Phys Lipids*. 2016 Jun;198:51-60
- Rahman M, Kühn I, Rahman M, Olsson-Liljequist B, Möllby R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Apr;70(4):2398-403.
- Rajabi M, Mousa SA. Lipid Nanoparticles and their Application in Nanomedicine. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(8):662-72
- Ramshankar V, Krishnamurthy A. Chemoprevention of oral cancer: Green tea experience. *J Nat Sci Biol Med*. 2014 Jan;5(1):3-7.
- Rasheed NO, Ahmed LA, Abdallah DM, El-Sayeh BM. Nephro-toxic effects of intraperitoneally injected EGCG in diabetic mice: involvement of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Sci Rep*. 2017 Jan 18;7:40617
- Raskin MM, Schlachet I, Sosnik A. Mucoadhesive nanogels by ionotropic crosslinking of chitosan-g-oligo(NiPAam) polymeric micelles as novel drug nanocarriers. *Nanomedicine (Lond)*. 2016 Feb;11(3):217-33.
- Rençber S, Karavana SY, Yılmaz FF, Eraç B, Nenni M, Özbal S, Pekçetin Ç, Gurer-Orhan H, Hoşgör-Limoncu M, Güneri P, Ertan G. Development, characterization, and in vivo assessment of mucoadhesive nanoparticles containing fluconazole for the local treatment of oral candidiasis. *Int J Nanomedicine*. 2016 Jun 10;11:2641-53.
- Reygaert WC. The antimicrobial possibilities of green tea. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:434.
- Rezaei S, Rezaei K, Mahboubi M, Jarahzadeh MH, Momeni E, Bagherinasab M, Targhi MG, Memarzadeh MR. Comparison the efficacy of herbal mouthwash with chlorhexidine on gingival index of intubated patients in Intensive Care Unit. *J Indian Soc Periodontol*. 2016 Jul-Aug;20(4):404-408.
- Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*. 1975 Jun;54 Spec No B:B57-62.
- Sakanata S., Kim M., Taniguchi M. and Yamamoto T. (1989). Antibacterial substances in Japanese green tea extracts against *Streptococcus mutans*, a carcinogenic bacterium. *Agricultural Biology and Chemistry*, 53: 2307-2311.

- Sandri G, Motta S, Bonferoni MC, Brocca P, Rossi S, Ferrari F, Rondelli V, Cantù L, Caramella C, Del Favero E. Chitosan-coupled solid lipid nanoparticles: Tuning nanostructure and mucoadhesion. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017 Jan;110:13-18.
- Sanna V, Siddiqui IA, Sechi M, Mukhtar H. Nanoformulation of natural products for prevention and therapy of prostate cancer. *Cancer lett* 2013; 334: 142-51.
- Sanna V, Singh CK, Jashari R, Adhami VM, Chamcheu JC, Rady I, Sechi M, Mukhtar H, Siddiqui IA. Targeted nanoparticles encapsulating (-)-epigallocatechin-3-gallate for prostate cancer prevention and therapy. *Sci Rep.* 2017 Feb 1;7:41573.
- Santiago SL, Osorio R, Neri JR, Carvalho RM, Toledano M. Effect of the flavonoid epigallocatechin-3-gallate on resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent.* 2013 Dec;15(6):535-40.
- Sarin S, Marya C, Nagpal R, Oberoi SS, Rekhi A. Preliminary Clinical Evidence of the Antiplatelet, Antigingivitis Efficacy of a Mouthwash Containing 2% Green Tea - A Randomised Clinical Trial. *Oral Health Prev Dent.* 2015 Jan 20.
- Satalkar P, Elger BS, Shaw DM. Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter? *Sci Eng Ethics.* 2015;(9)15.
- Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1992 Jan;60(1):284-95.
- Schwarz JC, Weixelbaum A, Pagitsch E. Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties. *Int. J. Pharm.* 2012; 437: 83–88.
- Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res.* 2011; 14: 87–9.
- Sethi KS, Karde PA, Joshi CP. Comparative evaluation of sutures coated with triclosan and chlorhexidine for oral biofilm inhibition potential and antimicrobial activity against periodontal pathogens: An in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2016 Sep-Oct;27(5):535-539.
- Severino P, Pinho SC, Souto EB, Santana MH. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011 Aug 1;86(1):125-30.
- Shaw L. Modern thoughts on fissure sealants. *Dent Update.* 2000;27:370–4
- Shi J, Liu F, Zhang W, Liu X, Lin B, Tang X. Epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine-induced migration and invasion by the suppression of angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2015;33(6):2972-80.
- Shin YC, Shin DM, Lee EJ, Lee JH, Kim JE, Song SH, Hwang DY, Lee JJ, Kim B, Lim D, Hyon SH, Lim YJ, Han DW. Hyaluronic Acid/PLGA Core/Shell Fiber Matrices Loaded with EGCG Beneficial to Diabetic Wound Healing. *Adv Healthc Mater.* 2016 Dec;5(23):3035-3045
- Shin YC, Yang WJ, Lee JH, Oh JW, Kim TW, Park JC, Hyon SH, Han DW. PLGA nanofiber membranes loaded with epigallocatechin-3-O-gallate are beneficial to prevention of postsurgical adhesions. *Int J Nanomedicine.* 2014 Aug 22;9:4067-78.
- Shin YS, Seo JY, Oh SH, Kim JH, Kim ST, Park YB, Moon HS. The effects of ErhBMP-2-/EGCG-coated BCP bone substitute on dehiscence around dental implants in dogs. *Oral Dis.* 2014 Apr;20(3):281-7.
- Shutava TG, Balkundi SS, Vangala P, Steffan JJ, Bigelow RL, Cardelli JA, O'Neal DP, Lvov YM. Layer-by-layer-coated gelatin nanoparticles as a vehicle for delivery of natural polyphenols. *ACS Nano.* 2009;3:1877–1885
- Sicca C, Bobbio E, Quartuccio N, Nicolò G, Cistaro A. Prevention of dental caries: A review of effective treatments. *J Clin Exp Dent.* 2016 Dec 1;8(5):e604-e610

- Siddiqui IA, Bharali DJ, Nihal M, Adhami VM, Khan N, Chamcheu JC, et al. Mukhtar H. Excellent anti-proliferative and pro-apoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate encapsulated in chitosan nanoparticles on human melanoma cell growth both in vitro and in vivo. *Nanomedicine*. 2014;10(8):1619-26.
- Silva, LB. Preparação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico in vitro de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato encapsulando quercetina em células de câncer de bexiga [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2015.
- Singh I, Swami R, Pooja D, Jeengar MK, Khan W, Sistla R. Lactoferrin bioconjugated solid lipid nanoparticles: a new drug delivery system for potential brain targeting. *J Drug Target*. 2016;24(3):212-23.
- Singh M, Bhatnagar P, Mishra S, Kumar P, Shukla Y, Gupta KC. PLGA-encapsulated tea polyphenols enhance the chemotherapeutic efficacy of cisplatin against human cancer cells and mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Int J Nanomedicine*. 2015 Oct 30;10:6789-809.
- Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;274(1-2):1-33.
- Sjöblom M, Ainamo A, Ainamo J. Antimicrobial effect of four different toothpastes. *Scand J Dent Res*. 1976 Nov;84(6):377-80.
- Smith A, Giunta B, Bickford PC, Fountain M, Tan J, Shytle RD. Nanolipidic particles improve the bioavailability and α -secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Pharm*. 2010;389(1-2):207-212
- Smith VH, Pippin DJ. Implications of resource-ratio theory for oral microbial ecology. *Eur J Oral Sci*. 1998 Apr;106(2 Pt 1):605-15.
- Snoussi C, Ducroc R, Hamdaoui MH, Dhaouadi K, Abaidi H, Cluzeaud F, Nazaret C, Le Gall M, Bado A. Green tea decoction improves glucose tolerance and reduces weight gain of rats fed normal and high-fat diet. *J Nutr Biochem*. 2014;25(5):557-64.
- Sosnik A, Das Neves J, Sarmento B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Progress in Polymer Science*. 2014;39(12):2030-2075.
- Souto EB, Müller RH. Lipid nanoparticles: effect on bioavailability and pharmacokinetic changes. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;(197):115-41
- Stockfleth E, Meyer T. Sinecatechins (Polyphenon E) ointment for treatment of external genital warts and possible future indications. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14(7):1033-43.
- Subramaniam P, Eswara U, Maheshwar Reddy KR. Effect of different types of tea on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *Indian J Dent Res*. 2012;23(1):43-8.
- Sun Y, Hung WC, Chen FY, Lee CC, Huang HW. Interaction of tea catechin (-)-epigallocatechin gallate with lipid bilayers. *Biophys J*. 2009 Feb;96(3):1026-35.
- Svilenov H, Tzachev C. Solid Lipid Nanoparticles – A promissing Drug Delivery System. *Nanomedicine*. 2014:187-237.
- Taratula O, Kuzmov A, Shah M, Garbuzenko OB, Minko T. Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA. *J Control Release*. 2013 Nov 10;171(3):349-57.
- Targino AG, Flores MA, dos Santos Junior VE, de Godoy Bené Bezerra F, de Luna Freire H, Galembeck A, Rosenblatt A. An innovative approach to treating dental decay in children. A new anti-caries agent. *J Mater Sci Mater Med*. 2014 Aug;25(8):2041-7.

- Teixeira KI, Denadai AM, Sinisterra RD, Cortés ME. Cyclodextrin modulates the cytotoxic effects of chlorhexidine on microorganisms and cells in vitro. *Drug Deliv*. 2014 Feb 4
- Tenenbaum H, Dahan M, Soell M. Effectiveness of a sanguinarine regimen after scaling and root planing. *J Periodontol*. 1999;70(3):307-11.
- Teng F, He T, Huang S, Bo CP, Li Z, Chang JL, Liu JQ, Charbonneau D, Xu J, Li R, Ling JQ. Cetylpyridinium chloride mouth rinses alleviate experimental gingivitis by inhibiting dental plaque maturation. *Int J Oral Sci*. 2016 Sep 29;8(3):182-90.
- Tenuta LM, Cury JA. Laboratory and human studies to estimate anticaries efficacy of fluoride toothpastes. *Monogr Oral Sci*. 2013 Jun 3;23:108-24.
- Thapa RK, Khan GM, Parajuli-Baral K, Thapa P. Herbal medicine incorporated nanoparticles: Advancements in herbal treatment. *Asian J Biomed Pharm Sci* 2013; 3:7-14.
- Thassu D, Deleers M, Pathak YV. Nanoparticulate drug delivery systems. *Drugs and the pharmaceutical Sciences*. 2007; 166: 225-365.
- Thatipamula R, Palem C, Gannu R, Mudragada S, Yamsani M. Formulation and in vitro characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Daru*. 2011;19(1):23-32.
- Tomasina J, Poulain L, Abeilard E, Giffard F, Brodin E, Carduner L, Carreiras F, Gauduchon P, Rault S, Malzert-Fréon A. Rapid and soft formulation of folate-functionalized nanoparticles for the targeted delivery of triptone in ovarian carcinoma. *Int J Pharm*. 2013 Dec 15;458(1):197-207.
- Tortora GF, Funke BR, Case CL. Microbial growth. In: Tortora GF, Funke BR, Case CL. *Microbiology: An introduction*, 6th ed. California. Benjamin/ Cummings, 2005, p. 154-180.
- Tuon FF, Gavrilko O, Almeida S, Sumi ER, Alberto T, Rocha JL, Rosa EA. Prospective, randomised, controlled study evaluating early modification of oral microbiota following admission to the intensive care unit and oral hygiene with chlorhexidine. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017 Feb 18;8:159-163.
- Twetman, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res* 2004 38, 223-229.
- Üner M, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carriers. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publishers. 2007; 10: 43-56.
- Uzer Celik E, Tunac AT, Ates M, Sen BH. Antimicrobial activity of different disinfectants against cariogenic microorganisms. *Braz Oral Res*. 2016 Nov 28;30(1):e125.
- Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol*. 2012;61: 399-419.
- Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym*. 2017 May 15;164:268-283.
- Vilela, MM. Formulação à base de um extrato do chá verde desenvolvida para uso bucal: avaliação da atividade antimicrobiana e da alteração de cor dental [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2015.
- Vilinska A, Ponnurangam S, Chernyshova I, Somasundaran P, Eroglu D, Martinez J, West AC. Stabilization of Silicon Carbide (SiC) micro- and nanoparticle dispersions in the presence of concentrated electrolyte. *J Colloid Interface Sci*. 2014 Jun 1;423:48-53.
- Wang S, Su R, Nie S, Sun M, Zhang J, Wu D, et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *J Nutr Biochem* 2014; 25: 363-76.
- World Health Organization. Oral health surveys: basic methods. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1997.

- Xicota L, Rodriguez-Morato J, Dierssen M, de la Torre R. Potential Role of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in the Secondary Prevention of Alzheimer Disease. *Curr Drug Targets*. 2017;18(2):174-195
- Xie J, Yang Z, Zhou C, Zhu J, Lee RJ, Teng L. Nanotechnology for the delivery of phytochemicals in cancer therapy. *Biotechnol Adv*. 2016 Jul-Aug;34(4):343-53.
- Xu J, Strandman S, Zhu JX, Barralet J, Cerruti M. Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. *Biomaterials*. 2015 Jan;37:395-404.
- Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes. *Arch Oral Biol*. 2012 Jun;57(6):678-83.
- Xu X, Zhou XD, Wu CD. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 ;55(3):1229-36.
- Yang W, Xu C, Liu F, Yuan F, Gao Y. Native and thermally modified protein-polyphenol coassemblies: lactoferrin-based nanoparticles and submicrometer particles as protective vehicles for (-) epigallocatechin-3-gallate. *J Agric Food Chem*. 2014 Nov 5;62(44):10816-27.
- Yoon SP, Maeng YH, Hong R, Lee BR, Kim CG, Kim HL, Chung JH, Shin BC. Protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *Acta Histochem*. 2014;116(8):1210-5.
- Yoshino K, Nakamura Y, Ikeya H, Sei T, Inoue A, Sano M, Tomita I. Antimicrobial activity of tea extracts on cariogenic bacterium (*Streptococcus mutans*) *J Food Hyg Soc Japan*. 1996;37(2):104-8.
- Yousaf S, Butt MS, Suleria HA, Iqbal MJ. The role of green tea extract and powder in mitigating metabolic syndromes with special reference to hyperglycemia and hypercholesterolemia. *Food Funct*. 2014;5(3):545-56
- Yusuf N, Irby C, Katiyar SK, Elmets CA. Photoprotective effects of green tea polyphenols. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007;23(1):48-56.
- Zhang S, Liu X, Mei L, Wang H, Fang F. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation of BALB/c mice. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Aug 31;16(1):334
- Zhang S. Dental Caries and Vaccination Strategy against the Major Cariogenic Pathogen, *Streptococcus mutans*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2014 Nov;14(11):960-6.
- Zink A, Traidl-Hoffmann C. Green tea in dermatology - myths and facts. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13(8):768-75.