UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Obtenção de um sistema de liberação modificada contendo clorexidina e
avaliação de seu efeito em biofilmes orais patogênicos**

Maria Carolina Bonjovanni de Paiva

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Obtenção de um sistema de liberação modificada contendo clorexidina e
avaliação de seu efeito em biofilmes orais patogênicos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Maria Carolina Bonjovanni de
Paiva

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Patrícia
Aires

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 29/09/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

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.

Bonjovanni, Maria Carolina

Obtenção de um sistema de liberação modificada contendo
clorexidina e avaliação de seu efeito em biofilmes orais patogênicos.
Ribeirão Preto, 2017.

41 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Aires, Carolina Patrícia.

1. Sistema de liberação. 2. Biofilmes orais. 3. Clorexidina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Carolina Bonjovanni de Paiva

Obtenção de um sistema de liberação modificada contendo clorexidina e avaliação de seu efeito em biofilmes orais patogênicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Patrícia Aires

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho, primeiramente, à minha família que com muito esforço, amor e companheirismo fez com que essa realização se tornasse possível.

Dedico também, à professora e amiga Carolina Patrícia Aires que contribuiu enormemente, tanto para a minha formação profissional, como pessoal.

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela oportunidade e pela infraestrutura para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação, na pessoa da sua coordenadora Prof.^a Dr.^a Renata Fonseca Vianna Lopez, pelo apoio institucional e científico.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, pelo apoio institucional.

Agradeço a Deus por todo o amor que cerca minha vida, por me proteger de todo o mal e estar presente em todos os momentos iluminando meus passos, me enchendo de esperança nos momentos difíceis e de humildade a cada vitória.

Agradeço ao meu pai, Sebastião de Paiva Filho, por todo esforço para me proporcionar a melhor educação, bem-estar e conforto. Por estar sempre ao meu lado não só como pai, mas como amigo e companheiro para todas as horas. Agradeço à minha mãe, Carla Bonjovanni de Paiva, por toda a dedicação, amizade, paciência, e por cuidar de mim com tanto carinho e amor. Agradeço ao meu irmão Giuseppe Bonjovanni de Paiva e à minha prima-irmã Giulia Moreira Paiva por todos os momentos compartilhados. Obrigada a vocês por me ensinarem o que é certo e o que é errado, por permitirem que eu caminhasse sempre com meus próprios pés nunca me deixando desamparada, por me mostrarem todos os dias o que realmente tem valor na vida. Espero que um dia eu seja pelo menos a metade do que vocês são.

Agradeço à minha orientadora Carolina Patrícia Aires e ao professor Osvaldo de Freitas pela enorme oportunidade, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, pela confiança, amizade e dedicação.

Agradeço às técnicas Ana Cristina Morseli Polizello e Máira Peres Ferreira Duarte por todos os ensinamentos, momentos compartilhados e amizade sincera. Vocês fizeram meus dias mais felizes.

Agradeço às companheiras de laboratório Ana Carolina dos Santos Ré e Erika Kawakita Hashimoto que cresceram comigo durante esses anos e me ajudaram na realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2015/17712-9) pelo apoio científico e financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze
que soa ou como o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda
que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

(Coríntios, 13)

RESUMO

BONJOVANNI, M. C. **Obtenção de um sistema de liberação modificada contendo clorexidina e avaliação de seu efeito em biofilmes orais patogênicos.** 2017. 41f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Considerando que a obtenção de uma formulação farmacêutica pode ser melhor planejada se algumas condições biológicas inerentes à cavidade oral forem contempladas e que os sistemas de liberação modificada podem ser ferramentas para o controle de doenças orais, o objetivo do trabalho é obter uma formulação contendo clorexidina, avaliando seu efeito sobre os mesmos. Este trabalho foi dividido em duas etapas, sendo que a primeira envolveu a obtenção da formulação mais adequada aos experimentos biológicos e a segunda avaliou seus efeitos sobre biofilmes patogênicos orais. Assim, formulações com diferentes concentrações de clorexidina foram preparadas e avaliadas visualmente em relação à sua integridade física nas condições de crescimento dos biofilmes, seguido de ensaio de liberação em meio estático utilizando tampão como meio de dissolução (meio de dissolução convencional). A formulação selecionada foi submetida a ensaios de liberação em meio estático contendo os diferentes caldos de cultura bacterianos como meio de dissolução. Na segunda etapa do trabalho, o efeito da formulação selecionada foi avaliado em biofilmes cariogênicos de *Streptococcus mutans* ou biofilmes periodontopatogênicos de *Porphyromonas gingivalis*. Biofilmes de *S. mutans* (n=6) ou *P. gingivalis* (n=3) foram formados em caldos de cultura sob lâminas de vidro por 6 e 3 dias, respectivamente, sendo expostos a um dos seguintes tratamentos: 1) Formulação contendo 92% de quitosana e 8% de hidroxipropil metilcelulose (CV, como controle do veículo) ou 2) Formulação contendo 82% de quitosana, 8% de hidroxipropil metilcelulose e 10% de clorexidina (CHX, grupo experimental). Um grupo sem exposição à formulação foi incluído como controle negativo (CN). Após o período experimental, a viabilidade bacteriana, o pH dos biofilmes e a quantificação de clorexidina liberada para os caldos de cultura foram determinados. Os dados foram analisados estatisticamente por teste de Tukey-Kramer e Tukey, sendo o nível de significância estabelecido em 5%. Os resultados sugerem que ainda que a liberação de clorexidina da formulação nos caldos de cultura de *S. mutans* e *P. gingivalis* tenha sido menor se comparada ao meio de dissolução convencional ($p < 0,05$), o efeito biológico promovido foi observado para ambos os biofilmes. Para o pH dos biofilmes de *S. mutans*, os grupos CN e CV não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$), mas apresentaram quedas de pH maiores se comparados à CHX ($p < 0,05$). CHX também resultou em menor viabilidade bacteriana dos biofilmes se comparada aos controles ($p < 0,05$), que não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$). Para *P. gingivalis* também houve mais morte celular nos biofilmes expostos à CHX ($p < 0,05$) mas CV também apresentou perda de viabilidade em comparação à CN ($p < 0,05$). Apesar da liberação de clorexidina da formulação ter sido dificultada pela presença dos microrganismos, os resultados sugerem que o sistema de liberação obtido foi capaz de diminuir a patogenicidade dos biofilmes de *Streptococcus mutans* e de *Porphyromonas gingivalis*. Assim, o presente estudo sugere a importância de aliar os estudos de diferentes áreas de conhecimento de forma a contribuir no planejamento das formulações, vislumbrando futuros benefícios clínicos para o controle das doenças orais.

Palavras-chave: Sistema de liberação; Biofilmes orais;

ABSTRACT

BONJOVANNI, M. C. **Obtention of a modified release system containing chlorhexidine and evaluation of its effect on pathogenic oral biofilms.** 2017. 41f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Considering that obtaining a pharmaceutical formulation can be better planned if some biological conditions inherent to the oral cavity are contemplated and that the modified release systems may be tools for the control of oral diseases, the aim of the work is to obtain a formulation containing chlorhexidine and evaluate its effect in pathogenic biofilms. This work was divided in two stages, the first involved obtaining the most appropriate formulation for biological experiments and the second evaluate its effect on oral pathogenic biofilms. Thus, formulations with different concentrations of chlorhexidine were prepared and evaluated visually for their physical integrity under the biofilm growth conditions, followed by the static media release assay using buffer as the dissolution medium (conventional dissolution medium). The selected formulation was subjected to static release tests containing the different bacterial culture broths as the dissolution medium. In the second stage of the work, the effect of the selected formulation was evaluated in cariogenic biofilms of *Streptococcus mutans* or periodontopathogenic biofilms of *Porphyromonas gingivalis*. Biofilms of *S. mutans* (n = 6) or *P. gingivalis* (n = 3) were formed in culture broths under glass slides for 6 and 3 days respectively, being exposed to one of the following treatments: 1) Formulation containing 92 % of chitosan and 8% of hydroxypropyl methylcellulose (CV, vehicle control) or 2) Formulation containing 82% of chitosan, 8% of hydroxypropyl methylcellulose and 10% of chlorhexidine (CHX, experimental group). A group without exposure to the formulation was included as negative control (CN). After the experimental period, bacterial viability, biofilms pH and quantification of chlorhexidine released into the culture broths were determined. Data were statistically analyzed by Tukey-Kramer and Tukey test with a level of significance of 5%. Results suggest that although chlorhexidine release from formulation in the culture broths of *S. mutans* and *P. gingivalis* was lower compared to the conventional dissolution medium (p <0.05), the treatment promoted biological effect for both biofilms. Regarding *S. mutans* biofilms pH, CN and CV groups showed no difference (p > 0.05), but showed higher pH drops when compared to CHX (p <0.05). CHX also resulted in lower bacterial viability of biofilms compared to controls (p <0.05), which did not show any difference (p > 0.05). For *P. gingivalis*, there was higher cell death in the biofilms exposed to CHX (p <0.05) and CV presented loss of viability compared to CN (p <0.05). Although the release of chlorhexidine from the formulation has been hampered by the presence of microorganisms, results suggest that the release system was able to reduce the pathogenicity of *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms. Thus, the present study suggests the importance of combining studies from different areas of knowledge in order to contribute to the design of formulations aiming future clinical benefits for the oral diseases control.

Keywords: Drug delivery system; Oral biofilms; Chlorhexidine.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral apresenta uma variada e exuberante colonização microbiana (DEWHIRST et al., 2010; MANCL; KIRSNER; AJDIC, 2013; MYSAK et al. 2014; ARWEILER; NETUSCHIL, 2016). Estes microrganismos colonizam naturalmente tanto as superfícies dentais quanto os tecidos moles mas uma disbiose pode contribuir para a formação de biofilmes patogênicos supra e subgingivais relacionados à doenças como cárie e a doença periodontal, respectivamente (BEIKLER; FLEMMIG, 2011). De acordo com a indicação clínica, o uso de antimicrobianos como a clorexidina podem auxiliar no controle de tais doenças (RODE et al., 2012).

Antimicrobianos são comumente administrados na cavidade oral na forma de enxaguatórios (SENEL et al., 2000; RIBEIRO; HASHIZUME; MALTZ, 2007; VARONI et al., 2012; YENGOPAL; MICKENAUTSCH, 2012; PITHON et al., 2015; SMILEY et al., 2015; LEE et al., 2016) mas a tecnologia farmacêutica tem contribuído para prolongar seus efeitos, desenvolvendo sistemas de liberação modificados que podem estender o tempo de liberação do fármaco. Entretanto, as condições biológicas encontradas na cavidade bucal tornam o desenvolvimento das formulações orais um verdadeiro desafio (SANKAR et al., 2011) e muitas vezes o benefício clínico não pode ser evidenciado como preconizado laboratorialmente.

Uma das condições biológicas mais desafiadoras encontradas na cavidade oral é a presença de enzimas bacterianas, que podem interagir com componentes específicos da formulação (SANKAR et al., 2011). Além disso, o metabolismo dos microrganismos pode produzir altos níveis de ácidos (VAN HOUTE, 1994) ou bases orgânicas (TAKAHASHI et al., 1997), causando oscilações de pH que podem comprometer a liberação de determinados fármacos. Em acréscimo, há que se considerar os biofilmes, comunidades bacterianas altamente organizadas que promovem proteção física contra antimicrobianos pela formação de uma matriz polimérica, produzindo suas próprias enzimas para adaptação fisiológica celular (JOLIVET-GOUGEON; BONNAURE-MALLET, 2014; FLEMMING et al., 2016). Analisados em conjunto, estes fatores podem implicar na degradação precoce ou na menor liberação do fármaco da formulação, comprometendo sua eficácia clínica. Entretanto, formulações farmacêuticas como os sistemas de liberação modificada contendo antimicrobianos raramente são delineadas na presença de tais condições.

Sistemas de liberação modificada de fármacos são formulações que proporcionam uma atividade a longo prazo, pois liberam o princípio ativo em concentração terapêutica por um período estendido (LAVOINE et al., 2014). Em acréscimo, tais sistemas podem ser utilizados

como ferramenta para aumentar as propriedades biofarmacêuticas do fármaco aumentando sua solubilidade, biodistribuição e estabilidade, além de melhorar sua atividade biológica (MARTIN et al., 2015). Assim, a veiculação de um antimicrobiano em uma formulação farmacêutica de liberação modificada poderia trazer inovações para o controle dos biofilmes orais patogênicos.

Um dos antimicrobianos mais prescritos na Odontologia é a clorexidina, considerada padrão ouro no controle de biofilmes (VARONI et al., 2012). Seu amplo espectro de ação antibacteriano permite sua indicação tanto como coadjuvante na redução do biofilme supragengival cariogênico em pacientes que utilizam aparelhos ortodônticos (PITHON et al., 2015) quanto no controle do biofilme subgengival em pacientes com periodontite (SMILEY et al., 2015). Entretanto, sua veiculação em sistemas de liberação modificada é considerada controversa, ao menos para o tratamento da periodontite (TABARY et al., 2014; MEDAIAH et al., 2014).

Neste contexto, considerando que a obtenção de uma formulação farmacêutica pode ser melhor planejada se algumas condições biológicas inerentes à cavidade oral forem contempladas e que os sistemas de liberação modificada podem ser ferramentas para o controle de doenças orais, o objetivo do trabalho é obter uma formulação contendo clorexidina na presença de biofilmes patogênicos, avaliando seu efeito sobre os mesmos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o sistema de liberação obtido foi eficiente na liberação do ativo. O modelo proposto para a avaliação da formulação mostrou que componentes do meio de dissolução como nutrientes, microrganismos e seus metabólitos podem interferir na liberação do ativo do sistema. Apesar disso, o sistema de liberação obtido foi capaz de diminuir a patogenicidade dos biofilmes de *Streptococcus mutans* e de *Porphyromonas gingivalis*, mostrando que essa formulação pode apresentar relevância clínica na área da odontologia.

REFERÊNCIAS

1. AIRES, C.P.; DEL BEL CURY, A.A.; TENUTA, L.M.; KLEIN, M.I.; KOO, H.; DUARTE, S.; CURY, J.A. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, p. 380-6, 2008.
2. AMEYE, D.; MUS, D.; FOREMAN, P.; REMON JP. Spray-dried Amioca® starch/Carbopol® 974P mixtures as buccal bioadhesive carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 170–80, 2005.
3. ANVISA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RE_899_2003.pdf/10773d22-ab7f-473c-ab4e-6827dd5f4d42>. Acesso em: 30 jul. 2017.
4. ARWEILER, N.B.; NETUSCHIL, L. The oral microbiota. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 902, p. 45-60, 2016.
5. BAATI, T.; SCHEMBRI, T.; VILLARD, C.; CORREARD, F.; BRAGUER, D.; ESTÈVE, M.A. An ultrasensitive LC–MS/MS method with liquid phase extraction to determine paclitaxel in both cell culture medium and lysate promising quantification of drug nanocarriers release in vitro. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 300-6, 2015.
6. BEIKLER, T.; FLEMMIG, T.F. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. **Periodontology** 2000, v. 55, p. 87-103, 2011.
7. BONFERONI, M.C; ROSSI, S.; FERRARI, F.; STAVIK, E.; PENA-ROMERO, A.; CAMELLA, C. Factorial analysis of the influence of dissolution medium on drug release from carrageenan-diltiazem complexes. **AAPS PharmSciTec**, v. 1, p. 72-9, 2000.
8. BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G.N. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 333, p.1-9, 2012.
9. BRUSCHI, M.L.; FREITAS, O. Oral bioadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, p.293-310, 2005.
10. CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.A.; CURY, J.A. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, v.24, p.135-41, 2010.
11. CURY, J.A.; REBELLO, M.A.; DEL BEL CURY, A.A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Research**, v. 31, p. 356-60, 1997.
12. CURY, J.A.; REBELO, M.A.; DEL BEL CURY, A.A.; DERBYSHIRE, M.T.; TABCHOURY, C.P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Research**, v. 34, p. 491-7, 2000.

13. DANESHMAND, N.; JORGENSEN, M.G.; NOWZARI, H.; MORRISON, J.L.; SLOTS, J. Initial effect of controlled release chlorhexidine on subgingival microorganisms. **Journal of Periodontal Research**, v. 37, p. 375-9, 2002.
14. DARRENE, L.N.; CECILE, B. Experimental Models of Oral Biofilms Developed on Inert Substrates: A Review of the Literature. **Biomed Research International**, v. 2016, p.1-8, 2016.
15. DEWHIRST, F.E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B.J.; Tanner, A.C.R.; YU, W.H.; LAKSHMANAN, A; WADE, W.G. The Human oral microbiome. **Journal of Bacteriology**, v.192, p. 5002-17, 2010.
16. DUARTE, S.; KLEIN, M.I.; AIRES, C.P.; CURY, J.A.; BOWEN, W.H.; KOO, H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. **Oral Microbiology Immunology**, v.23, p. 206-12, 2008.
17. DUTTA, J.; TRIPATHI, S.; DUTTA, P.K. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. **Food Sci Technol Int**, v. 18, p.3-34, 2011.
18. ELVIRI, L.; ASADZADEH, M.; CUCINELLI, R.; BIANCHERA, A.; BETTINI, R. Macroporous chitosan hydrogels: Effects of sulfur on the loading and release behaviour of amino acid-based compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 50–58, 2015.
19. FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S.A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 11, p. 563-75, 2016.
20. GARG, T.; SINGH, O.; ARORA, S.; MURTHY R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 29, p. 1–63, 2012.
21. GRISI, D.C.; SALVADOR, S.L.; FIGUEIREDO, L.C.; SOUZA, S.L.S.; NOVAES JR, A.B., GRISI M.F.M. Effect of a controlled-release chlorhexidine chip on clinical and microbiological parameters of periodontal syndrome. **J Clin Periodontol.**; v. 29, p. 875–81, 2002.
22. GROVER V.; KAPOOR, A.; MALHOTRA, R.; BATTU, V.S.; BHATIA, A.; SACHDEVA, S. To assess the effectiveness of a chlorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis: A clinical and radiographic study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 15, p. 139-46, 2011.
23. HAAS, A.N.; PANNUTI, C.M.; ANDRADE, A.K.; ESCOBAR, E.C.; ALMEIDA; E.R.; COSTA, F.O.; CORTELLI, J.R.; CORTELLI, S.C.; RODE, S.D.; PEDRAZZI, V.; OPPERMAN, R.V. Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. **Brazilian Oral Research**, v. 28, p. 1-8, 2014.

24. HURLOW, J.; COUCH, K.; LAFORET, K.; BOLTON, L.; METCALF, D.; BOWLER, P. Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. **Advances in Wound Care (New Rochelle)**, v. 4, p. 295-301, 2015.
25. IKINCI, G.; SENEL, S.; AKINCIBAY, H.; KAS, S.; ERCIS, S.; WILSON, C.G.; HINCAL, A.A. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 121–7, 2002.
26. JEFFCOAT, M.K.; BRAY, K.S.; CIANCIO, S.G.; DENTINO, A.R.; FINE, D.H.; GORDON, J.M.; GUNSOLLEY, J.C.; KILLOY, W.J.; LOWENGUTH, R.A.; MAGNUSSON, N.I.; OFFENBACHER, S.; PALCANIS, K.G.; PROSKIN, H.M.; FINKELMAN, R.D.; FLASHNER, M. Adjunctive use of a subgingival controlled-release chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone. **Journal of Periodontology**, v. 69, p. 989-97, 1998.
27. JI, Q.X.; ZHAO, Q.S.; DENG, J.; LÜ, R. A novel injectable chlorhexidine thermosensitive hydrogel for periodontal application: preparation, antibacterial activity and toxicity evaluation. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 21, p. 2435-42, 2010.
28. JIN, L.J.; LAMSTER, I.B.; GREENSPAN, J.S.; PITTS, N.B.; SCULLY, C.; WARNAKULASURIYA, S. Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. **Oral Diseases**, v. 22, p. 609-19, 2016.
29. JOLIVET-GOUGEON, A.; BONNAURE-MALLET, M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 49-56, 2014.
30. KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, p. 2339–49, 2003.
31. KILLOY, W.J. The use of locally-delivered chlorhexidine in the treatment of periodontitis. **Clinical results. Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, p. 953-8, 1998.
32. KOO, H.; HAYACIBARA, M.F.; SCHOBEL, B.D.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; PARK, Y.K.; VACCA-SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 782-9, 2003.
33. KRZYŚCIAK, W.; JURCZAK, A.; KOŚCIELNIAK, D.; BYSTROWSKA, B.; SKALNIAK, A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 499-515, 2014.
34. LAMONT, R.J.; JENKINSON, H.F. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 1244-63, 1998.

35. LAUDENBACH, J.M.; SIMON, Z. Common dental and periodontal diseases: evaluation and management. **Medical Clinics of North America**, v. 98, p. 1239-60, 2014.
36. LAVOINE, N.; TABARY, N.; DESLOGES, I.; MARTEL, B.; BRAS, J. Controlled release of chlorhexidine digluconate using β -cyclodextrin and microfibrillated cellulose. **Colloids Surf B: Biointerfaces**, v. 121, p. 196–205, 2014.
37. LEE, D.W.; JUNG, J.E; YANG, Y.M.; KIM, J.G.; YI, H.K., JEON, J.G. The antibacterial activity of chlorhexidine digluconate against *Streptococcus mutans* biofilms follows sigmoidal patterns. **European Journal of Oral Sciences**, v., p. 1-7, 2016.
38. LEMOS, J.A.; QUIVEY JR, R.G.; KOO, H.; ABRANCHES, J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? **Microbiology**, v. 159, p. 436-45, 2013.
39. MANCL, K.A.; KIRSNER, R.S.; AJDIC, D. Wound biofilms: lessons learned from oral biofilms. **Wound Repair and Regeneration**, v.21, p. 352-62, 2013.
40. MARTIN, C.; LOW, W.L.; GUPTA, A.; AMIN, M.C.; RADECKA, I.; BRITLAND, S.T.; RAJ, P.; KENWARD, K.M. Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, p. 43-66, 2015.
41. MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, e307, p. 2458-2461, 2007.
42. MEDAIAH, S.; SRINIVAS, M.; MELATH, A.; GIRISH, S.; POLEPALLE, T.; DASARI, A.B. Clorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis – a clinical study. **Journal of Clinical and Diagnostical Research**, v. 8, p. 22-5, 2014.
43. MYSAK, J.; PODZIMEK, S.; SOMMEROVA, P. LYUYA-MI, Y.; BARTOVA, J.; JANATOVA, T.; PROCHAZKOVA, J.; DUSKOVA, J. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1-8, 2014.
44. PAES LEME, A.F.; KOO, H.; BELLATO, C.M.; BEDI, G.; CURY, J.A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, p. 878-87, 2006.
45. PAPAIOANNOU, W.; PANAGOPOULOS, A.; KOLETSI-KOUNARI, H.; KONTOU, E.; MAKOU, M. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* and biofilm formation on different types of orthodontic brackets. **International Journal of Dentistry**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
46. PARK, J.H.; LEE, J.K.; UM, H.S.; CHANG, B.S.; LEE, S.Y. A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 44, p.79-84, 2014.
47. PATEL, V.F.; LIU, F.; BROWN, M.B. Modeling the oral cavity: In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 746-56, 2012.

48. PITHON, M.M.; SANT'ANNA, L.I.; BAIÃO, F.C.; DOS SANTOS, R.L.; COQUEIRO RDA, S.; MAIA, L.C. Assessment of the effectiveness of mouthwashes in reducing cariogenic biofilm in orthodontic patients: a systematic review. **Journal of Dentistry**, v. 43, p. 297-308, 2015.
49. RICHTER, A.E.; ARRUDA, A.O.; PETERS, M.C.; SOHN, W. Incidence of caries lesions among patients treated with comprehensive orthodontics. **American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics**, v. 139, p.657-64, 2011.
50. RIBEIRO, L.G.; HASHIZUME, L.N.; MALTZ, M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 35, p. 359-70, 2007.
51. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-32, 2006.
52. RODE SDE, M.; GIMENEZ, X.; MONTOYA, V.C.; GÓMEZ, M.; BLANC, S.L.; MEDINA, M.; SALINAS, E.; PEDROZA, J.; ZALDIVAR-CHIAPA, R.M.; PANNUTI, C.M.; CORTELLI, J.R.; OPPERMAN, R.V. Daily biofilm control and oral health: consensus on the epidemiological challenge -- Latin American Advisory Panel. **Brazilian Oral Research**, v. 26, p. 133-46, 2012.
53. RODRIGUEZ-GARCIA, A.; GALAN-WONG, L.; AREVALO-NIÑO, K. Development and in vitro evaluation of biopolymers as a delivery system against periodontopathogen microorganisms. **Acta Odontologica Latinoamericana**, v. 23, p. 158-63, 2010.
54. SANKAR, V.; HEARNDEN, V.; HULL, K.; JURAS, D.V.; GREENBERG, M.S.; KERR, A.R.; LOCKHART, P.B.; PATTON, L.L.; PORTER, S.; THORNHILL, M. Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities. **Oral Diseases**, v. 17, p.73-84, 2011.
55. SENEL, S.; IKINCI, G.; KAS, S.; YOUSEFI-RAD, A.; SARGON, M.F.; HINCAL, A.A. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.193, p. 197–203, 2000.
56. SHARPE, L.A.; DAILY, A.M.; HORAVA, S.D.; PEPPAS, N.A. Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.11, p. 901-15, 2014.
57. SLOTS, J.; GENCO, R.J. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. **Journal of Dental Research**, v. 63, p. 412–21, 1984.
58. SMILEY, C.J.; TRACY, S.L.; ABT, E.; MICHALOWICZ, B.S.; JOHN, M.T.; GUNSOLLEY, J.; COBB, C.M.; ROSSMANN, J.; HARREL, S.K.; FORREST, J.L.; HUJOEL, P.P.; NORAIAN, K.W.; GREENWELL, H.; FRANTSVE-HAWLEY, J.; ESTRICH, C.; HANSON, N. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic

periodontitis by means of scaling and root planning with or without adjuncts. **Journal of the American Dental Association**, v. 146, p. 508-25, 2015.

59. TABARY, N.; CHAI, F.; BLANCHEMAIN, N.; NEUT, C.; PAUCHET, L.; BERTINI, S.; DELCOURT-DEBRUYNE, E.; HILDEBRANDE, H.F.; MARTEL, B. A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 318–29, 2014.

60. TAKAHASHI, N.; SAITO, K.; SCHACHTELE, C.F.; YAMADA, T. Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 12, p. 323-8, 1997.

61. TENUTA, L.M.; CERZETTI, R.V.; DEL BEL CURY, A.A.; TABCHOURY, C.P.; CURY, J.A. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. **Journal of Dental Research**, v. 87, p. 1032-6, 2008.

62. VARONI, E.; TARCE, M.; LODI, G.; CARRASSI, A. Chlorexidine (CHX) in dentistry: state of the art. **Minerva Stomatologica**, v. 61, p. 399-419, 2012.

63. VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **Journal Dent Res**, v. 73, p. 672-81, 1994.

64. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Oral Health. Fact sheet N°318. Abril 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>>. Acesso em: 02 fev.2016.

65. WU, H.; MOSER, C.; WANG, HZ.; HØIBY, N.; SONG, Z.J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 7, p. 1-7, 2014.

66. YENGOPAL, V.; MICKENAUTSCH, S. Chlorhexidine for the prevention of alveolar osteitis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, p. 1253-64, 2012.