

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de biofilmes patogênicos: efeito de um sistema de
liberação contendo metronidazol**

ANA CAROLINA DOS SANTOS RÉ

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de biofilmes patogênicos: efeito de um sistema de
liberação contendo metronidazol**

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: Ana Carolina dos Santos Ré

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

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 31/03/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

RÉ, A.C.S.	Avaliação de biofilmes patogênicos: efeito de um sistema de liberação contendo metronidazol		MESTRADO FCFRP/USP 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.

Ré, Ana Carolina dos Santos
Avaliação de biofilmes patogênicos: efeito de um sistema de liberação contendo metronidazol. Ribeirão Preto, 2017.
51 p.; 30cm.

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

Orientadora: Garbellini, Carolina Patrícia Aires.

1. Biofilmes. 2. Sistemas de liberação. 3. Metronidazol.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Ana Carolina dos Santos Ré

Título do trabalho: Avaliação de biofilmes patogênicos: efeito de um sistema de liberação contendo metronidazol.

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: Carolina Patrícia Aires Garbellini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho primeiramente a
Jeová Deus por todas as oportunidades e
principalmente o privilégio da vida.
Ao meu precioso marido Renan, pelo amor,
paciência e compreensão;
e a minha mãe Vera, por todo apoio.

Agradecimento Especial

À minha querida amiga e orientadora, Prof.^a Dr.^a Carolina Patrícia Aires Garbellini, pela confiança depositada a mim em todos os sentidos, pelos profundos ensinamentos transmitidos com amor, sabedoria e serenidade. Por me orientar na estrada do saber científico, mas principalmente, a me ensinar como ser humana, buscando sempre melhorar e, que um bom sorriso ameniza todas as ansiedades e dificuldades ao longo desta jornada.

Agradecimentos

Ao Magnífico Reitor da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Marco Antônio Zago.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, na pessoa da sua diretora Prof. Dr.^a Maria Vitória Lopes Brada Bentley, por proporcionar a realização desta pesquisa.

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 secretária de Pós-Graduação, pelo apoio institucional.

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas, pela rica convivência, experiência, pelo aprendizado e carinho.

À técnica de laboratório Maíra Peres Ferreira, pela prontidão, paciência, contribuição científica e acadêmica, pelas horas de valiosas discussões e rico aprendizado.

À técnica de laboratório Ana Cristina Morseli Polizello, pelo grande carinho e amizade sincera, por tornar todos os momentos muito mais do que agradáveis.

Ao Prof. Dr. André Pitondo Silva, pelo valioso auxílio científico, pela prontidão e por suas ricas sugestões e colaboração.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador, pela paciência, disposição, pela prontidão, persistência e pelo apoio científico.

Às amigas Erika e Maria Carolina, companheiras de laboratório, pela amizade, pelos desabafos e principalmente, pelas boas risadas.

À técnica de laboratório Marina Constante Gabriel Del Arco, pela paciência, prontidão e pelo valioso conhecimento prático.

Ao técnico de laboratório Alcides Silva Pereira pela assistência técnica.

À Dr.^a Barbara Santana, do laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas (FMRP/USP), pela colaboração técnica.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa, na pessoa da sua coordenadora Prof.^a Dr.^a Cleni Mara Marzocchi Machado, pelo apoio institucional e pela contribuição.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo pelo apoio financeiro (processo 2012/15423-1 e 2012/15556-1).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio científico e financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

RESUMO

RÉ, A. C. S. **Avaliação de biofilmes patogênicos: efeito de um sistema de liberação contendo metronidazol.** 2017. 51 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O perfil de liberação e o efeito de um sistema de liberação prolongada contendo metronidazol, antimicrobiano prescrito para o tratamento da periodontite, foram avaliados na presença de biofilmes supra e subgengivais, representados respectivamente pelas bactérias *Streptococcus mutans* e *Porphyromonas gingivalis*. Os biofilmes foram crescidos e expostos ao sistema de liberação prolongada contendo metronidazol (MDZ) ou ao controle de veículo da formulação (CV), composto de monoglicerídeos e monoésterato de sorbitano. Biofilmes não tratados foram utilizados como controle negativo (CN). Os biofilmes e os meios de cultura de *S. mutans* foram coletados após a primeira exposição aos tratamentos nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas enquanto para biofilmes de *P. gingivalis* os tempos foram 24, 48 e 72 horas. Após coleta, os biofilmes foram analisados em relação à quantificação de fármaco e viabilidade bacteriana (biofilmes de *S. mutans*: n=3; biofilmes de *P. gingivalis*: n=6). Biofilmes de *S. mutans* também foram avaliados em relação à acidogenicidade. Nos biofilmes supragengivais, a quantificação de MDZ nas primeiras 24 horas foi de 7% em relação à concentração inicial de fármaco na formulação, permanecendo em torno de 1% para os demais tempos. O teor de MDZ liberado da formulação reduziu a viabilidade bacteriana no tempo 24 horas e diminuiu a acidogenicidade dos biofilmes por 48 horas em relação aos grupos CV e NC ($p < 0,05$). Já para os biofilmes subgengivais, 19% de MDZ foram liberados da formulação nas primeiras 24 horas e 5% do fármaco foram quantificados nas análises dos demais tempos. O antimicrobiano liberado reduziu a viabilidade bacteriana em todos os tempos em relação à CV e NC ($p < 0,05$), não sendo diferente estatisticamente entre si ($p > 0,05$). O grupo CV apresentou menor viabilidade bacteriana se comparado ao grupo CN ($p < 0,05$), mas maior viabilidade em comparação ao grupo MDZ em todos os tempos ($p < 0,05$). De uma forma geral, o sistema de liberação prolongada proposto neste estudo foi capaz de inviabilizar a proliferação de biofilmes de *P. gingivalis* e de desestabilizar biofilmes de *S. mutans*. Além disso, os microambientes originados pelos biofilmes interferiram na cinética de liberação do metronidazol, diminuindo sua disponibilidade biológica. Assim, considerando a continuidade do biofilme sub e supragengival, torna-se interessante aprofundar os estudos sobre formulações que possam inibir biofilmes subgengivais ao mesmo tempo em que desestabilizam biofilmes supragengivais, evitando a rápida recolonização dos nichos periodontais tratados. Em acréscimo, a possibilidade de estudar parâmetros operacionais de desenvolvimento da formulação farmacêutica utilizando-se modelos de biofilmes patogênicos pode ser considerada em futuros estudos.

Palavras-chave: Biofilmes . Sistemas de liberação. Metronidazol.

ABSTRACT

RÉ, A. C. S. **Evaluation of pathogenic biofilms: effect of a release system containing metronidazole.** 2017. 51 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The drug release profile and the effect of a controlled release system containing metronidazole, an antibiotic prescribed for the treatment of periodontitis, were evaluated in the presence of supra and subgingival biofilms, represented respectively by the bacteria - *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. The biofilms were grown and exposed to the controlled release system containing metronidazole (MDZ) as well as vehicle control (VC) of the formulation containing monoglycerides and sorbitan monostearate. Untreated biofilms were used as negative control (NC). The biofilms and culture media of *S. mutans* were collected after the first exposure to the treatments at times 24, 48, 72 and 96 hours while for *P. gingivalis* biofilms, the times were 24, 48 and 72 hours. After collection, biofilms were analyzed for drug quantification and bacterial viability (*S. mutans* biofilms: n=3; *P. gingivalis* biofilms: n=6). Biofilms of *S. mutans* were also evaluated for acidogenicity. In the supragingival biofilms, the MDZ quantification in the first 24 hours was 7% in relation to the initial concentration of drug in the formulation, remaining around 1% for the remaining times. The amount of MDZ released from the formulation reduced the bacterial viability in the 24 hour and decreased the acidogenicity of the biofilms by 48 hours in relation to the VC and NC groups ($p < 0.05$). As for subgingival biofilms, 19% of MDZ was released from the formulation in the first 24 hours and 5% of the drug was quantified in the other analyses. The MDZ released reduced bacterial viability in relation to VC and NC ($p < 0.05$), and was not statistically different at all sampling times studied ($p > 0.05$). The VC group presented lower number of viable bacteria than NC ($p < 0.05$), however, it was higher when compared to the MDZ-treated group at all sampling times studied ($p < 0.05$). In general, the controlled release system proposed in this study was able to prevent the proliferation of *P. gingivalis* biofilms and to destabilize *S. mutans* biofilms. In addition, microenvironments caused by biofilms interfered with the release kinetics of metronidazole, reducing its bioavailability. Thus, considering the continuity of the sub and supragingival biofilms, it is imperative to deepen the studies on formulations that can inhibit the formation of subgingival biofilms while destabilizing supragingival biofilms, thereby avoiding the rapid recolonization of the treated periodontal niches. In addition, the possibility of studying operational parameters for the development of pharmaceutical formulations using models of pathogenic biofilms can be considered in future studies.

Keywords: Biofilms. Drug delivery systems. Metronidazole.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	5
3. DISCUSSÃO GERAL.....	6
4. CONCLUSÃO GERAL.....	9
5. REFERÊNCIAS.....	10
ANEXOS.....	16
Anexo 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP.....	16

1 INTRODUÇÃO GERAL

A maioria das doenças orais compartilha um fator etiológico essencial para a sua iniciação e progressão: a presença de biofilme. Doenças como a cárie dental, relacionada ao acúmulo de biofilme supragengival (MARSH, 2003), ou periodontite, relacionada à formação de biofilme subgengival (SOCRANSKY et al., 1998) podem ter consequências significativas na qualidade de vida do indivíduo (SOCRANSKY, 1977; BEIKLER; FLEMMING, 2011). Uma das maneiras mais eficientes para diminuição da susceptibilidade a tais doenças é a desorganização mecânica do biofilme, promovida através da escovação dental (MEI et al., 2017). Contudo, existem casos em que o uso racional de antimicrobianos é indicado, representando uma estratégia válida para manutenção da saúde oral e periodontal.

Grande parte dos estudos envolvendo a busca de novas substâncias ativas contra microrganismos bucais tem se concentrado em células livres ou biofilmes com pouco tempo de formação (BJARNSHOLT et al., 2013; MARTIN et al., 2015). Contudo, esta avaliação pode produzir resultados diferentes na presença de um biofilme mais estruturado (SIM et al., 2016). O desenvolvimento deste agregado bacteriano acontece por meio da colonização sequencial e ordenada de uma superfície por bactérias que se organizam funcionalmente em uma matriz extracelular polimérica, originando uma estrutura altamente dinâmica (FLEMMING et al., 2016). Tal estruturação permite que as bactérias se comuniquem por um sistema altamente refinado, chamado *quorum sensing* (MARSH et al., 2011). Esta sinalização molecular entre os microrganismos favorece e acentua sua virulência (MILLER; BASSLER, 2001). Aliado a este fator, a presença de uma matriz rica em polímeros funciona como uma barreira protetora, principalmente contra antimicrobianos, uma vez que os mesmos podem ter dificuldades de difusão para as camadas mais profundas do biofilme (MARSH et al., 2011). Este também é um dos motivos pelos quais muitos antimicrobianos avaliados em células livres mostram-se ineficazes em estudos clínicos in vivo.

De acordo com a localização, o biofilme pode ser denominado supragengival ou subgengival. O biofilme supragengival se forma acima da borda da gengiva, podendo estar localizado em toda a coroa dental ou apenas na região cervical (ZIJNGE et al., 2010). Já o biofilme subgengival se forma abaixo da borda gengival, podendo aderir-se à superfície do dente e também ao epitélio do sulco gengival

(ARUNI et al., 2015). O biofilme supragengival apresenta uma composição microbiana primariamente aeróbia, predominando espécies cariogênicas, como o *Streptococcus mutans* (THURNHEER et al., 2016). Conforme o biofilme supragengival amadurece, outras espécies vão se ancorando e a persistência deste biofilme na superfície dental resulta em constante estimulação dos tecidos gengivais, causando inflamação e um suave aprofundamento da gengiva (TABARY et al., 2014). Tais eventos permitem mudanças microambientais que podem alterar a composição microbiana do biofilme. À medida que a fenda gengival se aprofunda, o tecido subjacente é gradualmente destruído pelo processo inflamatório (MIANI, 2010). As condições microambientais progressivamente se tornam anaeróbias e o biofilme formando passa a ser denominado subgengival, favorecendo o crescimento de espécies como *Porphyromonas gingivalis*, que está intimamente associada à periodontite (HOW et al., 2016).

Embora exista esta divisão da nomenclatura do biofilme, vários estudos apontam que a localização supra e subgengival pode ser considerada contínua. Apenas em certo ponto da maturação do biofilme, o habitat subgengival parece ser isolado do ambiente supragengival, devido à sua colonização microbiana e ao seu microambiente (TELES et al., 2013). Assim, o efeito de um antimicrobiano pode influenciar ambos os biofilmes, e, possivelmente, de maneiras distintas. Kaner et al. (2007), em um estudo clínico, observaram que pacientes com periodontite tratados com antimicrobianos sistêmicos apresentaram um índice de biofilme supragengival menor que os grupos controle. Entretanto, a interferência de antimicrobianos prescritos para a periodontite em biofilmes supragengivais permanece pouco explorada.

O metabolismo de cada biofilme (supra ou subgengival) requer o máximo aproveitamento dos nutrientes disponíveis. O biofilme supragengival é rico em carboidratos provenientes da dieta e bactérias como *S. mutans* podem fermentá-los rapidamente (MARSH, 2003). O ácido decorrente desta fermentação é suficiente para desmineralizar, não só o esmalte de dentes permanentes (CURY et al., 2000) como o esmalte de dentes decíduos (RIBEIRO et al., 2005) ou a dentina (AIRES et al., 2002). *S. mutans* também produz enzimas que sintetizam polissacarídeos extracelulares na presença de sacarose, considerados um dos principais fatores de virulência das bactérias cariogênicas (KLEIN et al., 2015). Já o biofilme subgengival oferece um ambiente distinto do supragengival, onde há predomínio de pH elevado,

ureia, além de citocinas pró-inflamatórias (THURNHEER et al., 2014; HOW et al., 2016). Em acréscimo, este ambiente também apresenta toxinas produzidas pela *P. gingivalis* que podem ajudá-la a estabelecer sua colonização (BAO et al., 2014). Diferente dos microrganismos supragengivais, bactérias como *P. gingivalis* utilizam proteínas, vitamina K e grupamento heme da hemoglobina como nutrientes essenciais para seu desenvolvimento (LEWIS et al., 2006). Assim, considerando que a presença de ácidos, enzimas, toxinas, vitaminas, sangue, entre outros, está diretamente envolvida no ciclo de vida destes patógenos, a presença de biofilmes patogênicos seria um fator a ser considerado na avaliação inicial de um sistema de liberação prolongada de antimicrobianos.

Sistemas de liberação prolongada de fármacos têm como objetivo liberar o fármaco gradualmente, mantendo a concentração do mesmo em níveis terapêuticos por período de tempo prolongado (SANKAR et al., 2011). Diversas tecnologias podem ser empregadas para promover a liberação gradual de um fármaco veiculado em uma forma farmacêutica e a possibilidade de utilização das mesmas em sistemas semissólidos aumenta a sua versatilidade (SANKAR et al., 2011). Em acréscimo, esta forma farmacêutica pode manter uma alta concentração local de princípio ativo, minimizando possíveis efeitos colaterais de antimicrobianos como o metronidazol. O metronidazol é um antimicrobiano com eficácia seletiva para anaeróbios, capaz de interferir no metabolismo dos ácidos nucleicos (SOARES et al., 2012). Entretanto, apesar de ser um dos antimicrobianos mais utilizados na Periodontia (SWEENEY et al., 2004), seu efeito em biofilmes supragengivais, situados nas proximidades das margens afetadas pela periodontite, ainda não foi investigado. Até mesmo a eficácia do metronidazol incorporado em sistemas de liberação prolongada tem sido debatida (SCHWACH-ABDELLAOUI et al., 2000).

De fato, o processo de liberação do fármaco incorporado a uma forma farmacêutica é afetado por vários fatores como o meio de liberação (SANKAR et al., 2011). O meio de liberação do fármaco na cavidade oral é distinto daquele utilizado nos estudos convencionais de liberação, visto que no primeiro há nutrientes, enzimas e bactérias que podem potencialmente interferir em aspectos cinéticos da formulação, modificando o perfil de liberação do antimicrobiano. Assim, um estudo contemplando a liberação de antimicrobiano em um meio biológico mais próximo daquele onde se desenvolvem as doenças biofilme-dependentes poderia trazer

grandes contribuições tanto para desenvolvimento como para o conhecimento de tais sistemas.

Modelos de biofilme *in vitro* são amplamente utilizados para a avaliação de antimicrobianos orais (OMAR; NADWORNY, 2016). Mesmo com a obtenção de resultados válidos, os dados gerados podem ser limitados em termos de revelar o verdadeiro comportamento do produto em estudos *in vivo*. Entretanto, apesar da relativa simplicidade, podem estabelecer e avaliar a eficácia na fase de experimentação de fármacos antes dos estudos clínicos. Assim, o uso de biofilmes pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento da pesquisa básica (OMAR; NADWORNY, 2016). Neste aspecto, os modelos *in vitro* de biofilmes, embora distantes da representação de biofilmes complexos como aqueles existentes na cavidade oral, poderiam permitir a avaliação do perfil de liberação do antimicrobiano na presença de variáveis normalmente ausentes nas condições ideais para a liberação do fármaco.

Assim, considerando que a presença de biofilmes patogênicos pode influenciar o desempenho de um sistema de liberação prolongada de fármaco por requerer parâmetros biológicos inerentes à sua formação e crescimento e que o efeito deste sistema deve ser estudado tanto nos biofilmes supra quanto nos subgingivais, o objetivo do trabalho é avaliar o perfil de liberação de um sistema semissólido contendo metronidazol e estudar seu efeito em biofilmes. Desta forma, o objetivo do primeiro trabalho (capítulo 1) foi avaliar o efeito de um sistema de liberação prolongada contendo metronidazol em biofilmes de *S. mutans* e o do segundo (capítulo 2) foi ampliar o estudo avaliando a formulação em biofilmes de *P. gingivalis*. A liberação do antimicrobiano na presença destes biofilmes patogênicos também foi contemplada.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é avaliar o perfil de liberação e estudar o efeito de um sistema semissólido contendo metronidazol em biofilmes patogênicos.

3 DISCUSSÃO

O controle do biofilme supragengival é considerado parte ativa da terapia periodontal (XIMENEZ-FYVIE et al., 2000; FERES et al., 2009) e isto se deve à proximidade destes depósitos microbianos. Assim, o biofilme supragengival pode criar condições necessárias para a subsequente formação do biofilme subgengival, e, da mesma forma, pode ser afetado pelo antimicrobiano de escolha. Entretanto, além deste efeito ser pouco explorado, a eficácia do antimicrobiano contra biofilmes é dependente de sua liberação da forma farmacêutica, a qual tem sido discutida como uma possível interferência nos estudos clínicos (MARTIN et al., 2015).

Ambos os estudos (capítulo 1 e 2) mostraram que os parâmetros necessários para o desenvolvimento dos biofilmes bacterianos diminuem a liberação do princípio ativo da forma farmacêutica proposta. Até mesmo entre os estudos este perfil foi diferente. Enquanto no estudo com *S. mutans* (capítulo 1) a liberação inicial (24 horas) foi de 7% de metronidazol, no estudo com *P. gingivalis* (capítulo 2) a liberação foi de quase 19% de fármaco em relação à concentração inicial na formulação. Embora sejam inferiores aos seus respectivos controles, os perfis de liberação distintos podem ser discutidos em relação ao microambiente exigido por cada biofilme. O baixo pH originado pela metabolização de carboidratos por *S. mutans* podem ter interferido na força iônica do meio e, assim, contribuído para a diminuição da liberação do fármaco. Por outro lado, este mesmo fator pode ter favorecido a liberação do metronidazol no estudo com a *P. gingivalis*, uma vez que seu metabolismo é capaz de gerar produtos com características básicas. De fato, o metronidazol apresenta características básicas (TOLLS, 2001) o que poderia justificar sua maior solubilidade em pH básico. Em relação aos demais tempos do perfil de liberação, observou-se que no estudo com *S. mutans*, cerca de 1% de metronidazol foi detectado em 48, 72 e 96 horas. Já no estudo com *P. gingivalis*, verificou-se liberação estendida de 5% após as primeiras 24 horas de exposição à formulação. Embora estes resultados sugiram que a integridade física da formulação foi capaz de resistir ao ambiente desafiador promovido pela presença dos biofilmes, parâmetros como erosão deste sistema semissólido devem ser contemplados em estudos futuros.

Os resultados de liberação de metronidazol da formulação corroboram com os resultados de viabilidade bacteriana. No primeiro estudo (capítulo 1), os resultados mostram que o biofilme de *S. mutans* teve sua viabilidade diminuída pela liberação de antimicrobiano nas primeiras 24 horas após a exposição ao sistema de liberação. Ao mesmo tempo, o número de bactérias livres aumentou no caldo de cultura, sugerindo que as bactérias agregadas no biofilme migraram para o meio de cultura após o contato com o fármaco. Apesar do metronidazol não inviabilizar bactérias como *S. mutans* (MCBAIN et al., 2004), este efeito de desagregação bacteriana deve ser melhor investigado. Estudos apontam a migração de bactérias para regiões distantes de seu nicho como uma causadora de complicações, como as endocardites bacterianas (BANAS, 2004). Entretanto, é difícil discutir com biofilmes monoespécie o que possivelmente ocorreria em biofilmes in vivo, pois as mudanças qualitativas podem ser mascaradas pelas quantitativas. Assim, apesar deste modelo de biofilme monoespécie ser muito empregado na literatura devido às suas características metabólicas marcantes (LEMOS et al., 2013) sua utilização para estudos iniciais de liberação de fármacos poderia ser mais explorada, principalmente ao se considerar uma futura aplicação clínica. Em acréscimo, meios biológicos mais complexos, presença de saliva em fluxo contínuo e biofilmes com diversidade maior de bactérias poderiam contribuir para uma maior acuidade no estudo destas formulações antes dos estudos clínicos.

Considerando o estudo com *S. mutans* e observando os efeitos do microambiente do biofilme sobre o perfil cinético da liberação de fármaco, a próxima etapa do trabalho foi avaliar a liberação do metronidazol e seu efeito em um biofilme susceptível a ele (capítulo 2). Neste capítulo, biofilmes de *P. gingivalis* tiveram sua viabilidade diminuída em todos os tempos do experimento, até mesmo nos tempos onde a liberação foi significativamente menor que a inicial (em torno de 5% de sua concentração inicial na formulação). O efeito do metronidazol em microrganismos anaeróbios é bem estabelecido na literatura (NOYAN et al., 1997 SOARES et al., 2012) e sua indicação para o tratamento da periodontite é considerada promissora (SWEENEY et al., 2004). Este antimicrobiano permeia a célula por difusão e, quando metabolizado, produz radicais livres e metabólitos reduzidos que são capazes de danificar o DNA bacteriano, levando a morte celular. Assim, mesmo com uma baixa concentração nos tempos de 48 e 72 horas, a formulação proposta foi capaz de inibir a formação de biofilmes. O controle do veículo da formulação, composto de

monoglicerídeos e monoestearato de sorbitano, também inibiu o crescimento bacteriano em todos os tempos de formação do biofilme de *P. gingivalis*, mas não de *S. mutans*. O monoestearato de sorbitano é um derivado do sorbitol e seu efeito inibitório sobre *P. gingivalis* é relatado na literatura (HASHINO et al., 2013). Já o efeito deste poliálcool em *S. mutans* parece não ter caráter inibitório (DE COCK et al., 2016), havendo a sugestão de que estas bactérias metabolizam sorbitol e podem utilizá-lo como fonte de energia (DURSO et al., 2014).

De uma forma geral, o sistema de liberação prolongada proposto neste estudo foi capaz de inviabilizar a proliferação de biofilmes de *P. gingivalis* e de desestabilizar biofilmes de *S. mutans*. Em acréscimo, os microambientes ideais para o crescimento das diferentes espécies, juntamente com seus produtos metabólicos, são capazes de interferir na cinética de liberação do metronidazol, diminuindo sua disponibilidade biológica. Assim, considerando a continuidade do biofilme sub e supragengival, torna-se interessante aprofundar os estudos sobre formulações que possam inibir biofilmes subgengivais (capítulo 2) ao mesmo tempo em que desestabilizam biofilmes supragengivais (capítulo 1), evitando a rápida recolonização dos nichos periodontais tratados. Além disso, a possibilidade de estudar parâmetros operacionais de desenvolvimento da forma farmacêutica utilizando-se modelos de biofilmes patogênicos pode ser considerada em futuros estudos, contribuindo para o aumento das chances de sucesso clínico desta forma farmacêutica, consideradas baixas para grande parte das formulações desenvolvidas para a cavidade oral (PATEL et al., 2012). Apesar da limitação dos modelos de biofilme monoespécie utilizados neste estudo, a realização destes trabalhos (capítulo 1 e 2), que envolvem os estudos de liberação de fármaco na presença de biofilmes e a avaliação dos efeitos do princípio ativo incorporado em um sistema semissólido, visa unir esforços integrados e contínuos de pesquisa básica que possam atuar na interface Farmácia-Odontologia. A partir do conhecimento do perfil de liberação na presença de biofilme formado em diferentes condições (como por exemplo, biofilmes de *S. mutans* e de *P. gingivalis*), estratégias de inibição e desagregação de biofilmes podem ser idealizadas e assim contribuir com o desenvolvimento/aprimoramento de novos modelos biológicos in vitro para estudo de formulações farmacêuticas no futuro.

4 CONCLUSÃO GERAL

O sistema de liberação prolongada contendo antimicrobiano foi capaz de inviabilizar a proliferação de biofilmes subgengivais e de desestabilizar biofilmes supragengivais. Em acréscimo, a presença de biofilmes patogênicos foi capaz de interferir na cinética de liberação do metronidazol, diminuindo sua disponibilidade biológica.

5 REFERÊNCIAS*

AIRES, C. P.; TABCHOURY, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; CURY, J. A. Effect of a lactose-containing sweetener on root dentine demineralization in situ. **Caries Research**, Basileia, v. 36, n. 3, p. 167-9, May-June 2002.

ARUNI, A. W.; DOU, Y.; MISHRA, A.; FLETCHER, H. M. The biofilm community-rebels with a cause. **Current Oral Health Reports**, Nova Iorque, v. 2, n. 1, p. 48-56, Mar. 2015.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience**, Califórnia, v. 9, p. 1267-77, May 2004.

BAO, K.; BELIBASAKIS, G. N.; THURNHEER, T.; ADUSE-OPOKU, J.; CURTIS, M. A.; BOSTANCI, N. Role of *Porphyromonas gingivalis* gingipains in multi-species biofilm formation. **BMC Microbiology**, Londres, v. 14, p. 258, Oct. 2014.

BEIKLER, T.; FLEMMING, T. F. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 55, n. 1, p. 87-103, Feb. 2011.

BJARNSHOLT, T.; CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HØIBY, N. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? **Nature Reviews Drug Discovery**, Londres, v. 12, n. 10, p. 791-808, Oct. 2013.

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**, Basileia, v. 34, n. 6, p. 491-7, Nov-Dec. 2000.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DE COCK, P.; MÄKINEN, K.; HONKALA, E.; SAAG, M.; KENNEPOHL, E.; EAPEN, A. Erythritol is more effective than xylitol and sorbitol in managing oral health endpoints. **International Journal of Dentistry**, Cairo, 2016, doi: 10.1155/2016/9868421.

DURSO, S. C.; VIEIRA, L. M.; CRUZ, J. N.; AZEVEDO, C. S.; RODRIGUES, P. H.; SIMIONATO, M. R. Sucrose substitutes affect the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* biofilms. **Caries Research**, Basileia, v. 48, n. 3, p. 214-22, 2014.

FERES, M.; GURSKY, L. C.; FAVERI, M.; TSUZUKI, C. O.; FIGUEIREDO, L. C. Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, Chicago, v. 36, n. 10, p. 857-67, Oct. 2009.

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. 14, n. 9, p. 563-75, Aug. 2016.

HASHINO, E.; KUBONIWA, M.; ALGHAMDI, S. A.; YAMAGUCHI, M.; YAMAMOTO, R.; CHO, H.; AMANO, A. Erythritol alters microstructure and metabolomic profiles of biofilm composed of *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis*. **Molecular Oral Microbiology**, Chicago, v. 28, n. 6, p. 435-51, Dec. 2013.

HOW, K. Y.; SONG, K. P.; CHAN, K. G. *Porphyromonas gingivalis*: An overview of periodontopathic pathogen below the gum line. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 53, Feb. 2016.

KANER, D.; CHRISTAN, C.; DIETRICH, T.; BERNIMOULIN, J. P.; KLEBER, B. M.; FRIEDMANN, A. Timing affects the clinical outcome of adjunctive systemic antibiotic therapy for generalized aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 78, n. 7, p. 1201-8, July 2007.

KLEIN, M. I.; HWANG, G.; SANTOS, P. H.; CAMPANELLA, O. H.; KOO, H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontier in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 10, Feb. 2015.

LEMOS, J. A.; QUIVEY JR, R. G.; KOO, H.; ABRANCHES, J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? **Microbiology**, Londres, v. 159, pt. 3 p. 436-45, Mar. 2013.

LEWIS, J. P.; PLATA, K.; YU, F.; ROSATO, A.; ANAYA, C. Transcriptional organization, regulation and role of the *Porphyromonas gingivalis* W83 hmu haemin-uptake locus. **Microbiology**, London, v.152, pt. 11, p. 336-82, Nov. 2006.

MARSH, P. D. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. **Oral diseases**, Oxorford, v. 9, p. 16-22, 2003. Supplement 1.

MARSH, P. D.; MOTER, A.; DEVINE, D. A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 55, n. 1, p. 16-35, Feb. 2011.

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**, Emirados Árabes Unidos, v. 21 n. 1, p. 43-66, 2015.

MCBAIN, A. J.; LEDDER, R. G.; SREENIVASAN, P.; GILBERT, P. Selection for high-level resistance by chronic triclosan exposure is not universal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 53, n. 5, p. 772-7, May 2004.

MEI, L.; CHIENG, J.; WONG, C.; BENIC, G.; FARELLA, M. Factors affecting dental biofilm in patients wearing fixed orthodontic appliances. **Progress in Orthodontics**, Londres, v. 18, n. 1, p. 4, Dec. 2017.

MIANI, P. K. **Avaliação de um gel contendo metronidazol para o tratamento adjuvante da periodontite crônica.** 2010. 170 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Califórnia, v. 55 p. 165-99, 2001.

NOYAN, U.; YILMAZ, S.; KURU, B.; KADIR, T.; ACAR, O.; BÜGET, E. A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients. **Journal of Clinical Periodontology**, Chicago, v. 24, n. 3, p. 158-65, Mar. 1997.

OMAR, A.; NADWORNÝ, P. Review: Antimicrobial efficacy validation using in vitro and in vivo testing methods. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, Sept. 2016. doi: 10.1016/j.addr.2016.09.003.

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**, Amsterdam, v. 161, n. 3, p. 746-56, Aug. 2012.

RIBEIRO, C. C.; TABCHOURY, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 94, n. 1, p. 44-50, July 2005.

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**, Oxford, v. 17, p. 73-84, Apr. 2011. Supplement 1.

SCHWACH-ABDELLAOUI, K.; VIVIEN-CASTIONI, N.; GURNY, R. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 83-99, July 2000.

SIM, C. P.; DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. **Journal of Dentistry**, Amsterdam, v. 50, p. 1-11, July 2016.

SOARES, G. M.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M.; CORTELLI, S. C.; DUARTE P. M.; FERES, M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. **Journal of Applied Oral Science**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 295-309, May-June 2012.

SOCRANSKY, S. S. Microbiology of periodontal disease - present status and future considerations. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 48, n. 9, p. 497-504, Sept. 1977.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, JR. R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 134-44, Feb. 1998.

SWEENEY, L. C.; DAVE, J.; CHAMBERS, P. A.; HERITAGE, J. Antibiotic resistance in general dental practice--a cause for concern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 53, n. 4, p. 567-76 Apr. 2004.

TABARY, N.; CHAI, F.; BLANCHEMAIN, N.; NEUT, C.; PAUCHET, L.; BERTINI, S.; DELCOURT-DEBRUYNE, E.; HILDEBRAND, H. F.; MARTEL, B. A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 318-29, Jan. 2014.

TELES, R.; TELES, F.; FRIAS-LOPEZ, J.; PASTER, B.; HAFFAJEE, A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 62, n. 1, p. 5-162, June 2013.

THURNHEER, T.; BELIBASAKIS, G. N.; BOSTANCI, N. Colonisation of gingival epithelia by subgingival biofilms in vitro: role of "red complex" bacteria. **Archives of Oral Biology**, Amsterdã, v. 59, n. 9, p. 977-86, Sept. 2014.

THURNHEER, T.; BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G. N. Microbial dynamics during conversion from supragingival to subgingival biofilms in an in vitro model. **Molecular Oral Biology**, Chicago, v. 31, n. 2, p. 125-35, Apr. 2016.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 35, n. 17, p. 3397-406, Sept. 2001.

XIMÉNEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, Chicago, v. 27, n. 9, p. 648-57, Sept. 2000.

ZIJNGE, V.; VAN LEEUWEN, M. B.; DEGENER, J. E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMÜR, R.; HARMSSEN, H. J. Oral biofilm architecture on natural teeth. **Public Library of Science**, California, v. 5, n. 2, p. e9321, Feb. 2010.

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 042/2015
 kms

Ribeirão Preto, 26 de junho de 2015.

À pós-graduanda
Ana Carolina dos Santos Ré
 Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carolina Patrícia Aires
 FCFRP/USP

Prezadas Pesquisadoras,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado **"PROPOSTA DE MODELO BIOLÓGICO COMO FERRAMENTA DE OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS"**, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 375** foi aprovado *ad referendum* do Comitê de Ética em Pesquisa em 08/05/2015.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF^ª. DR^ª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
 Coordenadora do CEP/FCFRP