



DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
DE FÁRMACO PARA TRATAMENTO COADJUVANTE DE DOENÇA
PERIODONTAL

Vanessa De Moura Queiroz

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadoras: Renata Antoun Simão
Maíra do Prado

Rio de Janeiro
Março de 2018

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
DE FÁRMACO PARA TRATAMENTO COADJUVANTE DE DOENÇA
PERIODONTAL

Vanessa De Moura Queiroz

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

Prof. Renata Antoun Simão, D.Sc.

Prof. Máira do Prado, D.Sc.

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva, D.Sc.

Prof. Cristine da Silva Furtado Amaral, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2018

Queiroz, Vanessa de Moura

Desenvolvimento de um dispositivo de liberação controlada de fármaco para tratamento coadjuvante de doença periodontal /Vanessa de Moura Queiroz-Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

X, 100 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadoras: Renata Antoun Simão

Maíra do Prado

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 81-100.

1. Liberação controlada 2. Amido 3. Clorexidina 4. Doença Periodontal. I. Simão, Renata Antoun, *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica de Materiais. III. Título.

DEDICATÓRIA

Por todo obstáculo superado...

Por toda saúde perdida...

Por todas as vezes que pensei em desistir...

Pelos poderes de Grayskull (He-man)...

E pelo poder do Prisma Lunar (Sailor Moon)...

“O pulso ainda pulsa”

Arnaldo Antunes

AGRADECIMENTOS

Ao meu companheiro Rodrigo pelo incentivo, apoio, paciência e pelo suporte financeiro.

Aos meus primos-irmãos André e Andressa por toda motivação e suporte de sempre.

Às minhas irmãs de coração Nadia, Lívia, Werônica e Nicole por toda amizade, carinho e suporte incondicional/emocional/motivacional.

Ao meu psicólogo Leonardo, pelo acolhimento e por não me deixar pirar. Kkkk

Aos meus gatos: Tipinho, Nova, Hórus e Pitica pela companhia silenciosa.

À minha mãe, mesmo ela sendo do contra.

À minha avó, minhas tias, minha afilhada, meu padrasto e minhaS sograS, pelas orações.

“Esses são os sete pilares que sustentamos mares do cavaleiro de Virgem”

(adaptado de Saint Seiya, Saga de Poseidon).

À minha orientadora Renata pela oportunidade, apoio e confiança.

À minha co-orientadora Maíra, pela paciência, apoio e por cuidar bem dos meus dentes! rs

Ao professor Werneck e à Regina Allil pelo reconhecimento, confiança e todo suporte técnico e instrumental.

Aos amigos do Laboratório de Instrumentação e Fotônica: Rafaela, Viviane, Ariadny, Vanessa, Nathalia, Isabel, Larissa, Meysam e Alexandre pela ajuda, paciência, pelas risadas e pelo café de “escape”.

Aos professores Leandro, Regina Domingues, Eliane e a equipe do laboratório de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia - CCS/UFRJ em especial a Andressa, Karinne, Joaquim, Mayara e Scarleth, pelo suporte microbiológico.

Ao professor Marco Miguel e ao técnico Antônio do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia - CCS/UFRJ pelo suporte microbiológico.

Aos professores Gabriela, Rossana, Paula, Marcelo Mansur, Luiz Henrique e Luiz Marcelo da Metalmat pelo apoio e suporte acadêmico.

Aos professores avaliadores Cristine Amaral e Marcelo Prado, por aceitarem o convite.

Ao professor Gilberto e Gustavo do Laboratório de Física Biológica do Instituto de Biofísica – CCS/UFRJ pelo apoio.

À equipe Metalmat: Heleno, Marcia, Amal, Ana Paula e Francisco por todo suporte técnico!

Aos alunos e pesquisadores: Erica, Apoena, Isabelle, Antonio, Olavo, Beatriz, Maíra, Mariana, Martha, Jennifer, Gabrielle e Claudio por aturarem meu mau humor e/ou pela ajuda de alguma maneira.

Aos meus “tutores” de inglês Pati e Fábio, pelo apoio e pela torcida sincera de sempre!

Aos meus “suportes de luz” Aline e Wilton.

À Dani, pelo suporte nos cálculos.

Ao meu pai Carlos, sua esposa Neide e meu irmão Felipe pela torcida!

Aos amigos e colegas Maria Fernanda, Fabrício, Bruno, Carla, Luiz, Wenceslau, Natália, Gabi, Estela, Cristiane, Queiti, Sérgio, Fabrícia, Diana, Felipe, Gabriel, Naira, Talita, Polyana, que sempre torcem e/ou oram por mim e vibram comigo desde as pequenas conquistas.

À amiga Patricia Silva, *in memoriam*.

E a todos que por ventura não citei, mas que contribuíram positivamente, ou não, para conclusão deste trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
DE FÁRMACO PARA TRATAMENTO COADJUVANTE DE DOENÇA
PERIODONTAL

Vanessa de Moura Queiroz

Março/2018

Orientadoras: Renata Antoun Simão

Maíra do Prado

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A doença periodontal é uma condição inflamatória, principalmente devido a ação das bactérias presentes no filme subgingival, que se não tratada, provoca a perda progressiva dos tecidos de suporte dental. O presente estudo descreve o desenvolvimento de um dispositivo para liberação controlada de antimicrobiano, a partir de um filme com base polimérica biodegradável, com o objetivo de ser utilizado como coadjuvante ao tratamento periodontal crônico. Foram fabricados filmes de amido termoplástico com a incorporação da clorexidina, pelo processo de gelatinização e evaporação do solvente, sob agitação de 48 h para formação de partículas no filme. As caracterizações morfológicas realizadas por MEV e AFM, mostraram uma superfície irregular composta de partículas incorporadas com clorexidina com diferentes tamanhos dispersas em matriz de amido. Os módulos de dureza e elasticidade foram determinados por nanoindentação, se mostrando satisfatórios para a proposta de inserção na bolsa periodontal. Os testes de Raman e FTIR determinaram a composição química dos filmes, e mostraram a presença do amido e da clorexidina. A DRX, demonstrou que os filmes formados eram amorfos. A liberação do fármaco *in vitro* foi observada durante 21 dias por espectrofotometria de UV-Vis, com um total de 0,19 g/L de clorexidina liberados. O potencial microbiológico dos filmes foi avaliado pelo teste de disco-difusão em Agar contra micro-organismos importantes da doença periodontal, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, e *P. melaninogenica* e obtendo boa inibição de crescimento em todos os casos.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

DEVELOPMENT OF DRUG DELIVERY SYSTEM FOR THE SUPPORTING
TREATMENT OF PERIODONTAL DISEASE

Vanessa de Moura Queiroz

March/ 2018

Advisors: Renata Antoun Simão

Maíra do Prado

Department: Metallurgical and Materials Engineering

Periodontal disease is an inflammatory condition, mainly due to the action of the bacteria present in the subgingival film that can cause, if not treated, progressive loss of dental support tissues. The present study describes the development of a drug delivery system of antimicrobial, from a film with biodegradable polymer base, with the purpose of being used as an adjunct to chronic periodontal treatment. Thermoplastic starch films were manufactured by gelatinization and casting with the incorporation of chlorhexidine after 48 h of stirring for particle formation in the film. Morphological characterizations were performed by MEV and AFM and showed an irregular surface with particles incorporated with chlorhexidine with different sizes dispersed in a starch matrix. The hardness and elasticity modules were determined by nanoindentation, proving satisfactory results for the insertion proposal in the periodontal pocket. Raman and FTIR tests determined the chemical composition of the films, and showed the presence of starch and chlorhexidine. The DRX, demonstrated that the films were amorphous. The release of the *in vitro* drug was observed for 21 days by UV-vis spectrophotometry, with a total of 0.19 g/L of Chlorhexidine released. The microbiological potential of the films was evaluated by the disk diffusion test in agar against important micro-organisms of periodontal disease, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, and *P. melaninogenica* and obtaining good inhibition of growth in all cases.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVO | 4 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 4 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1. PERIODONTO SAUDÁVEL | 5 |
| 3.2. DOENÇA PERIODONTAL..... | 7 |
| 3.3. BIOFILME DENTAL (BD) | 9 |
| 3.4. TRATAMENTOS PARA DOENÇA PERIODONTAL | 15 |
| 3.4.1. TRATAMENTO MECÂNICO | 15 |
| 3.4.2. TRATAMENTO COADJUVANTE COM ANTIMICROBIANOS | 17 |
| 3.5. DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ANTIMICROBIANOS (LCA)..... | 20 |
| 3.6. CLOREXIDINA | 28 |
| 3.7. AMIDO (AA) | 31 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 38 |
| 4.1. FABRICAÇÃO DOS FILMES DE AMIDO TERMOPLÁSTICOS | 38 |
| 4.1.1. INDUÇÃO PARA FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS E INCORPORAÇÃO DO ANTIMICROBIANO | 38 |
| 4.2. PROPRIEDADE MECÂNICA DOS FILMES | 41 |
| 4.2.1. NANOINDENTAÇÃO | 41 |
| 4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES..... | 43 |
| 4.3.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)..... | 43 |
| 4.3.2. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (ATOMIC FORCE MICROSCOPY – AFM)..... | 43 |
| 4.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FILMES | 44 |
| 4.4.1. ESPECTROSCOPIA RAMAN..... | 44 |
| 4.4.2. ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 44 |

| | |
|---|----|
| 4.4.3. DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) | 44 |
| 4.5. LIBERAÇÃO DO ANTIMICROBIANO POR ESPECTROSCOPIA UV – VISÍVEL ... | 45 |
| 4.6. TESTE DE DISCO-DIFUSÃO | 46 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 50 |
| 5.1. ESCOLHA DO FILME PILOTO | 50 |
| 5.2. NANOINDENTAÇÃO..... | 52 |
| 5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)..... | 54 |
| 5.4. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) | 57 |
| 5.5. ESPECTROSCOPIA RAMAN | 63 |
| 5.6. ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 65 |
| 5.7. DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)..... | 63 |
| 5.8. LIBERAÇÃO DO ANTIMICROBIANO POR ESPECTROSCOPIA UV – VISÍVEL ... | 70 |
| 5.9. TESTE DE DISCO-DIFUSÃO | 75 |
| 6. CONCLUSÕES | 78 |
| 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 80 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma doença de etiologia infecto-inflamatória, que resulta na perda progressiva dos tecidos de suporte dos dentes, ou ainda do elemento dental propriamente dito (AAP 2015).

A DP está relacionada com a susceptibilidade e hábitos do hospedeiro. Em relação às condições sistêmicas que aceleram o desenvolvimento e a evolução da DP, pode-se destacar o *Diabetes Mellitus*, fatores genéticos, obesidade, osteoporose, entre outros fatores não modificáveis. Fatores de risco modificáveis, como o tabagismo e o estresse, também influenciam no agravamento da DP (CAFIEIRO *et al.*, 2013; KINANE *et al.*, 2017).

Os sintomas clássicos que caracterizam o início da DP, são edema, vermelhidão da gengiva marginal e sangramento à sondagem ou espontâneo, além do desenvolvimento da bolsa periodontal (BP). O diagnóstico precoce da DP é o primeiro desafio no tratamento, porque, no seu estágio inicial, a doença periodontal raramente provoca dores. Assim, a maioria dos pacientes não procura ajuda odontológica antes do agravamento da doença (KINANE *et al.*, 2017).

O tratamento da DP requer a remoção da placa bacteriana através do tratamento mecânico não cirúrgico de raspagem e alisamento coronário e radicular, que combinada com um bom controle da higiene bucal, pode promover a redução da BP (LINDHE *et al.*, 2010). A cooperação do paciente é um fator muito importante para manter o controle da placa bacteriana. (HAFFAJEE *et al.*, 1997). Além das dificuldades do paciente ao realizar a limpeza dos tecidos moles e do dente, problemas anatômicos e limitação de acesso a BP, podem comprometer a efetividade da terapia mecânica, permitindo a recolonização da placa e permanência da BP (BERCHIER, *et al.*, 2010).

A terapia coadjuvante ao tratamento mecânico, utilizando antimicrobianos, tem sido sugerida a fim de superar estas limitações. O objetivo do uso de antimicrobianos é conseguir que este tenha uma atividade eficaz e que mantenha a sua concentração inibitória mínima prolongada, com a finalidade de não permitir a reincidência da infecção (TEIXEIRA, 2008). O periodontista pode realizar abordagens diferentes, combinando o tratamento mecânico à antimicrobianos locais ou sistêmicos, de acordo com a necessidade de cada caso (BIDAULT *et al.*, 2007; LINDHE *et al.*, 2010; GAETTI-JARDIM *et al.*, 2010). Dos diversos fármacos utilizados para este fim destaca-se a clorexidina (CHX) (ELLEPOLA & SARAMANAYAKE, 2001; LIMA, 2016).

Nas últimas décadas vem sendo desenvolvidos uma grande variedade de estudos para liberação controlada de fármacos para tratamento da DP (TABARY *et al.* 2014). Em específico, os dispositivos intrabolsa periodontal que podem ser divididos em duas categorias, dispositivos biodegradáveis e não-degradáveis. Os dispositivos biodegradáveis possuem a grande vantagem de exigir que o paciente não precise remover o dispositivo (RAMS, 1996; NAGARAJU *et al.* 1999), além de reduzir as reações adversas e efeitos colaterais indesejados associados à ação do fármaco (LANGER, 1990).

Todavia, apenas alguns dispositivos de liberação controlada intrabolsa periodontal a base polímeros bioabsorvíveis, géis, modificadores de viscosidade ou plastificantes são mundialmente aprovados pela FDA (Food and Drug Administration), tais como Actisite®, Atridox™, Arestin™, Periostat, Periochip®. Além destes, dois dispositivos não são aprovados pela FDA, o Dentomycin® e o Elyzol®.(TABARY *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015).No entanto, a comercialização destes dispositivos é realizada apenas na Europa, Ásia e parte dos Estados Unidos, e possui um custo elevado.

Além disso, pelo fato da periodontite crônica ser uma das doenças orais de alta prevalência, principalmente em países de baixo índice sócio-econômico e com grande

desigualdade social (PETERSEN & OGAWA, 2012), é preciso um dispositivo local, que não seja absorvido sistemicamente, biodegradável, potencialmente superior e mais eficaz, que proporcione uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes.

É preciso que o dispositivo tenha um maior tempo de ação do antimicrobiano, menor toxicidade, amplo espectro, fácil produção, que diminua os custos da terapia periodontal, além de evitar a evolução da DP, terapias cirúrgicas e até a perda dos dentes afetados, fazendo-se assim, necessário o desenvolvimento deste estudo.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de um dispositivo de liberação controlada de fármaco intrabolsa periodontal de base polimérica.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos do presente estudo foram desenvolver um dispositivo de liberação controlada de fármaco intrabolsa periodontal com base polimérica biodegradável (Amido) e um antimicrobiano de amplo espectro (Gluconato de Clorexidina).

Foram avaliados:

- A viabilidade da produção de filmes de amido utilizando CHX como fármaco.
- As propriedades mecânicas através de testes de nanoindentação;
- A caracterização da superfície dos filmes através de MEV e AFM.
- A caracterização da estrutura química do dispositivo através de Raman e FT-IR.
- Avaliação da cristalinidade através de DRX.
- A liberação controlada do fármaco através de espectrofotometria por UV – Visível;
- O potencial bactericida/bacteriostático do dispositivo *in vitro* na presença das bactérias *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella melaninogenica* e *Porphyromonas gingivalis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão apresentados os tópicos relevantes para a contextualização e entendimento do tema.

3.1. PERIODONTO SAUDÁVEL

Todos os dentes saudáveis completamente desenvolvidos são constituídos por tecidos conjuntivos modificados, que compreende: O órgão dentário (esmalte, dentina e polpa), o periodonto de proteção (gingiva e a cutícula do dente) e o periodonto de inserção (ligamento periodontal, cimento radicular e osso alveolar) (LINDHE, *et al* 2010). Cada um destes tecidos possui particularidades quanto à sua posição, arquitetura e composição química/bioquímica, mas desempenham independentemente cada uma das suas funções (LIMA, 2016).

A gengiva é uma membrana composta pelo tecido epitelial estratificado pavimentoso e pelo tecido conjuntivo subjacente, chamado lâmina própria. Pode ser diferenciada em gengiva livre e gengiva inserida. A gengiva livre se caracteriza por coloração rósea, superfície lisa, opaca e arredondada, de consistência firme e espessura em torno de 1mm, formando uma pequena invaginação entre o dente e a gengiva, o sulco gengival (LINDHE *et al.*, 2010). A gengiva inserida encontra-se localizada em direção apical até a junção mucogengival, se tornando contínua com a mucosa alveolar. Esta mucosa está firmemente inserida no osso alveolar e no cimento através de fibras do tecido conjuntivo, sendo comparativamente imóvel em relação aos tecidos subjacentes. Apresenta coloração rosada, textura firme, com pequenas depressões na superfície, dando aspecto de casca de laranja (CARRANZA *et al.*, 2012; LINDHE *et al.*, 2010).

Um termo frequentemente utilizado para descrever as dimensões dos tecidos mucosos em contato com os dentes é o espaço biológico. Esta região consiste em uma barreira biológica, que tem como função proteger os tecidos de suporte (cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar) de agressões bacterianas e seus produtos tóxicos. Quando essa proteção é violada, seja pela doença periodontal, por cárie, fraturas dentais, procedimentos restauradores, entre outros, há um comprometimento do processo fisiológico periodontal, havendo uma migração e reorganização mais apical destas estruturas periodontais (BEZ, 2014). A fisiologia do espaço biológico compreende as medidas do epitélio juncional (0,9 a 1,0 mm), do sulco gengival (0,65 a 0,69mm) e a inserção de fibras supracrestais (1,06 a 1,08mm). Estes valores determinam uma estrutura tecidual sadia na faixa de 2 a 3 mm (GARGIULO *et al.*, 1961).

Em relação ao periodonto de inserção, o ligamento periodontal é um tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizado e celular, unindo o cimento radicular ao osso alveolar. Possui largura variável, medindo entre 0,2 – 0,4mm. A presença do ligamento periodontal permite que a força aplicada na atividade biomecânica de mastigação e mordida seja amortecida, distribuída e absorvida pelo processo alveolar, através do osso alveolar. O ligamento periodontal é essencial para a mobilidade dentária, que é determinada pela largura, altura e pela qualidade do ligamento periodontal (LINDHE *et al.*, 2010). O cimento radicular é um tecido mesenquimal especializado, mineralizado e avascularizado, que reveste as superfícies radiculares e, às vezes, pequenas porções das coroas dos dentes (LINDHE *et al.*, 2010). A parte da maxila e da mandíbula que forma e suporta os alvéolos dentários é o osso alveolar, que constitui o aparelho de inserção dos dentes. Estes são considerados estruturas ósseas dependentes, sujeitas a atrofia em caso de perda do dente (LINDHE *et al.*, 2010).

3.2. DOENÇA PERIODONTAL

O periodonto responde a múltiplos estímulos mediados por processos inflamatórios agudos e crônicos, que são divididos em duas categorias principais: gengivites e periodontites.

A Academia Americana de Periodontia (AAP) classificou as doenças periodontais, em 1999, como: (ARMITAGE, 1999; LINDHE *et al.*, 2010)

- 1) Gengivites;
- 2) Periodontite agressiva;
- 3) Periodontite crônica (PC);
- 4) Periodontite com manifestações de doenças sistêmicas;
- 5) Necrosantes;
- 6) Abscesso Periodontal;
- 7) DP associada a lesões endodônticas;

Já em 2015, a Academia Americana de Periodontia propôs a atualização da classificação proposta por ARMITAGE, 1999. Tal atualização aborda três áreas específicas: nível de inserção, periodontite crônica *versus* agressiva e localizada *versus* generalizada (AAP, 2015).

A periodontite crônica é a forma mais frequente da DP (AAP, 2015; CARRANZA *et al.*, 2012). É caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte dental e além dos sintomas clássicos como alteração de cor, textura, volume da gengiva marginal, sangramento à sondagem, também apresenta redução da resistência dos tecidos moles, o que provoca aumento da profundidade de sondagem da BP, perda de inserção (Figura 1), aumento da mobilidade dentária, exposição de furca, perda de osso alveolar e eventual esfoliação do dente. A PC atinge adultos, mas também pode ocorrer em crianças. A

destruição dos tecidos periodontais está relacionada com os hábitos de higiene bucal, ou com fatores secundários como tabagismo, estresse e fatores de risco sistêmico, tais como diabetes, HIV, obesidade, entre outros (LINDHE *et al.*, 2010).

Diferente da gengivite, que se manifesta após poucos dias ou semanas a partir do acúmulo de biofilme dental (LÖE *et al.*, 1965), a PC, na maioria dos casos, se desenvolve após longos períodos, as vezes por anos de exposição às toxinas liberadas pelas bactérias do biofilme dental (LINDHE & NYMAN., 1975). A progressão da PC é lenta, mas em algum estágio ela sofre uma fase aguda e resulta na perda adicional de inserção e osso alveolar, com conseqüente aumento da BP. A perda de inserção clínica pode determinar a extensão e a gravidade da PC, que pode ser considerada como leve (1 a 2mm de perda de inserção), moderada (3 a 5mm de perda de inserção), ou grave (> do que 5mm de perda de inserção) (AAP, 2015; LINDHE *et al.*, 2010).



Figura 1. Ilustração mostrando a diferença entre a gengiva saudável (lado direito) e apresentando doença periodontal (lado esquerdo). (Adaptado de NAIR & ANOOP, 2012).

3.3. BIOFILME DENTAL (BD)

De forma geral, bactérias gram-positivas e facultativas são associadas à saúde periodontal e são consideradas espécies benéficas, enquanto as bactérias gram-negativas e anaeróbias são geralmente associadas à doença periodontal. Por isso, a compreensão da formação do biofilme dental e da sua estrutura biológica é fundamental para controlar ou prevenir a evolução da DP (HARVEY, 2017).

A composição do biofilme dental é em torno de 70% bactérias e 30% de elementos não microbianos, como por exemplo, mucina salivar, polissacarídeos, detritos alimentares, enzimas, leucócitos, proteínas, sais minerais e células epiteliais descamadas (JAIN *et al.*, 2008). Esta matriz envolve os micro-organismos do BD em um ambiente que os protege eficazmente (ANWAR *et al.*, 1990). Assim, estas bactérias são de 1000 a 1500 vezes mais resistentes aos antimicrobianos que àquelas existentes fora do BD, no mesmo ambiente oral (TEUGHELIS *et al.*, 2012).

O biofilme é permeado por canais circulatórios que permitem o influxo de nutrientes e saída de produtos residuais ou metabólitos. Este sistema de canais atende as necessidades nutricionais e respiratórias da população densa de organismos, o que não seria possível apenas por difusão pela matriz (TEUGHELIS *et al.*, 2012).

A primeira camada que se forma em uma superfície de dente recém-limpa é chamada de película adquirida que caracteriza o biofilme supragengival. Esta camada começa a se formar em segundos pela adsorção de glicoproteínas salivares no esmalte dentário, cemento, dentina ou raiz exposta, ou qualquer outra superfície dura dentro da cavidade oral (HARVEY, 2017; TEUGHELIS *et al.*, 2012; EGLAND & MARQUIS, 2014). A formação da película adquirida é rapidamente seguida pela fixação inicial dos

primeiros colonizadores que são predominantemente gram-positivos, facultativos e sem motilidade, que em geral, são bactérias dos gêneros *Streptococcus* (até 80%) e *Actinomyces*. A fixação, ou adesão, é o processo que envolve o reconhecimento de moléculas receptoras específicas na película por proteínas chamadas adesinas que se projetam de superfícies bacterianas e permitem esta ligação à superfície dental (EGLAND & MARQUIS, 2014).

Camadas bacterianas subseqüentes se formam sobre outras bactérias que já estão aderidas na superfície por coagregação, dando origem ao biofilme subgengival. Certas espécies de bactérias só se coagregarão com outras espécies de bactérias, com base em características compartilhadas e / ou relações simbióticas. Um exemplo de tal simbiose ocorre entre *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*. A *T. denticola* produz succinato a partir da fermentação de aminoácidos na placa subgengival, e *P. gingivalis* utiliza este succinato para coagregar a superfície e em contrapartida, ela produz certos ácidos graxos que podem estimular o crescimento a *T. denticola* (JENKINSON *et al.*, 2014; HARVEY, 2017).

Deslocamentos populacionais ocorrem durante o desenvolvimento do biofilme e, com o aumento da população bacteriana, pela coagregação de mais camadas, o oxigênio se torna escasso, tornando o ambiente mais adequado para a colonização por organismos anaeróbios, que são predominantemente bastonetes, gram-negativos e filamentosos, considerados patogênicos. Um exemplo de colonizador chave para este processo é o *Fusobacterium* que é considerado um organismo “ponte” entre os primeiros colonizadores e os colonizadores secundários, porque é exclusivamente capaz de coagregar com todas as outras espécies dentro da placa (TEUGHELIS *et al.*, 2012; EGLAND & MARQUIS, 2014; SCANNAPIECO, 2014; HARVEY, 2017).

Quando se forma a BP, a formação do biofilme se torna muito mais complexa, predominando a presença de bactérias com potencial patogênico maior nas camadas mais apicais da BP. Algumas delas com capacidade de invadir os túbulos dentários, que podem servir de “abrigo” para recolonização após o tratamento da DP (LINDHE *et al.*, 2010).

O trabalho de LOE e colaboradores (1965) confirmou a relação causal entre PB e gengivite experimental em humanos. Eles verificaram clinicamente a evidência que a gengivite se desenvolve no período de 7 a 21 dias após a suspensão das medidas de higiene oral e que o restabelecimento da saúde gengival ocorre entre 7 e 10 dias após a volta da rotina da higiene bucal. Documentou-se também a mudança da população bacteriana predominante gram-positiva, que é normal em periodontos saudáveis, para a maioria de bastonetes gram-negativos e espiroquetas durante a evolução da gengivite para DP. Já no trabalho de SOCRANSKY e colaboradores (1998), seis grandes complexos bacterianos presentes no biofilme subgengival em adultos foram observados (Figura 2).

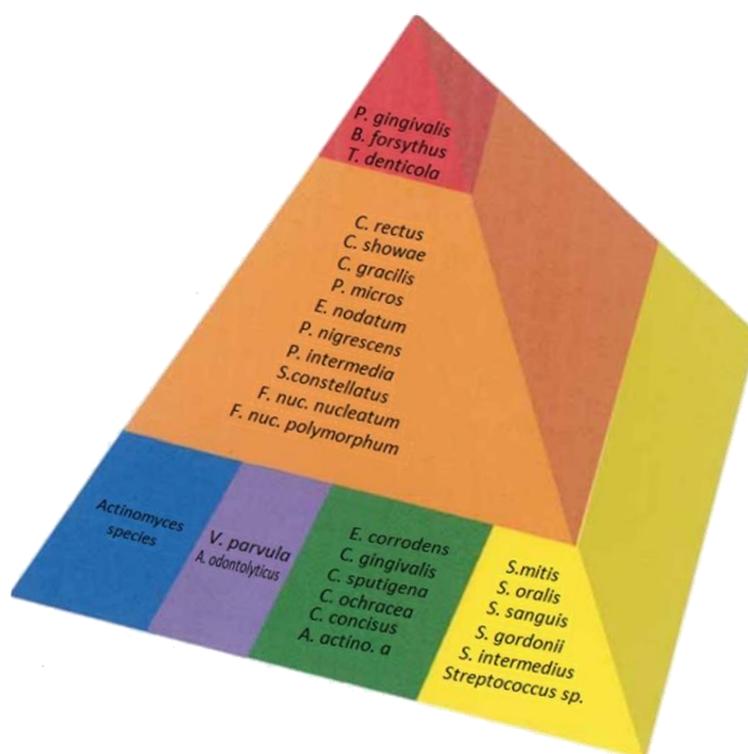


Figura 2. Complexos bacterianos (Adaptado de SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

O complexo vermelho é composto por bactérias extremamente patogênicas que causam maior dano ao periodonto. É intimamente associado ao sangramento na sondagem e é compreendido pelas espécies: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. A *Eubacterium notadum* foi adicionada mais tarde (HARVEY, 2017).

O 2º grupo consiste no complexo laranja, que precede a colonização das bactérias do complexo vermelho e inclui as espécies: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* e *Campylobacter gracilis*. Estes dois grupos são considerados de maior importância no que diz respeito a DP. A *Prevotella melaninogenica* foi adicionada ao grupo posteriormente (TELES *et al.*, 2013).

No 3º grupo, o complexo é representado pela cor amarela e composto por algumas espécies de *Streptococcus*, tal como *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* e *S. intermedius*. O 4º complexo, de cor verde, abrange as espécies de *Capnocytophaga*, incluindo *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a. O complexo roxo, ou 5º é representado pelas espécies *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*, o 6º e último, complexo azul, abrange as outras espécies do gênero *Actinomyces*. Estas espécies são colonizadores primários da superfície do dente e seu crescimento geralmente precede a multiplicação das bactérias dos grupos vermelho e laranja, predominantemente gram-negativos.

Estes autores mostraram que os complexos azul, roxo, verde e amarelo são compostos por bactérias com maior capacidade de adesão à superfície dental. A presença destas bactérias favorece uma ligação através de receptores para adesão de outras bactérias do complexo laranja, que são patogênicas e relacionadas à DP. Sucessivamente, estas bactérias do 2º grupo, criam suporte para a adesão das bactérias do complexo

vermelho, que são agentes etiológicos da PC e estão diretamente relacionadas com o aumento da profundidade da BP.

De acordo com LINDHE (2010), existem dois mecanismos que explicam a maneira que as bactérias da PB são capazes de driblar a resposta imune do paciente para conseguir invadir as células, se multiplicarem e colonizar a BP, baseando-se em fatores de virulência destrutivos.

O primeiro mecanismo, é que durante a formação do biofilme, quando as bactérias se multiplicam e liberam enzimas proteolíticas (ex.: hialuronidase, colagenase, nuclease, hemolisina, coagulase, sulfatase, glicuronidase etc.) que são capazes de lesionar os tecidos, provocando rompimento da barreira epitelial. Desta forma, alcançando o tecido conjuntivo subjacente, ativando o sistema imune com uma resposta à inflamação. No segundo mecanismo é pela presença de várias espécies bacterianas patogênicas capazes de produzir substâncias antigênicas (endotoxinas ou metabólicos tóxicos) que são capazes de evadir-se do sistema imunológico degradando as imunoglobulinas e sistema complemento, tendo um efeito indireto (LIMA,2016).

Isto é demonstrado no estudo *in vitro* de SEYMOUR & HEASMAN (1992), onde várias destas espécies bacterianas podem produzir uma variedade de enzimas e toxinas que podem interferir em muitas funções celulares. As espécies *P.gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* sintetizam colagenase e outras enzimas proteolíticas tóxicas que podem contribuir para a destruição dos tecidos de suporte. Além de também haver a possibilidade de produzirem fatores que inibem o mecanismo de defesa normal na BP, inativando anticorpos e esquivando da fagocitose. A *A. actinomycetemcomitans* secreta leucotoxina, endotoxinas e bacteriocinas, enquanto a *P. gingivalis* produz um lipopolissacarídeo que pode causar infecções orais, extraorais, abscessos de tecidos moles

e destruição total do suporte dos dentes (RASMUSSEN *et al.* 1966; STEINBERG&FRIEDMAN, 1988; PIOVANO, 1999).

O nível de patogenicidade dos micro-organismos também pode influenciar na gravidade da DP e na profundidade da BP. A *P.gingivalis* é uma bactéria encapsulada considerada o principal patógeno responsável pela progressão da DP, devido a sua capacidade de interagir e facilitar o desenvolvimento das outras bactérias do complexo vermelho, como a *T. denticola* (como já descrito anteriormente). Além disso, ela consegue penetrar nas células epiteliais da BP, conseguindo evadir-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Seus componentes moleculares se modulam à resposta imunológica do hospedeiro gerando um aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases de matriz e alterações nos mecanismos de apoptose de macrófagos e linfócitos T (LEON *et al.*, 2016).

As bactérias do gênero *Prevotella* (*nigrescens*, *intermedia* e *melaninogenica*) possuem presença elevada em determinados casos de DP e em sítios progressivos da periodontite crônica (LINDHE *et al.*, 2010). Estes patógenos são produtores de β -lactamase, que é relacionada à resistência bacteriana a antimicrobianos como as penicilinas. A *P. intermédia* e a *P. nigrescens* são alguns dos principais micro-organismos causadores da DP, pois alguns dos seus fatores de patogenicidade são responsáveis por estimular a reabsorção óssea e ativar ou inibir células imunitárias, tais como sua cápsula polissacarídica, a presença de enzimas protetoras contra o oxigênio e de proteases que intensificam a enfermidade periodontal acelerando a destruição dos tecidos de suporte e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (MÜNCHOW *et al.*, 2015).

3.4. TRATAMENTOS PARA DOENÇA PERIODONTAL

Partindo-se do princípio de que a causa primária da DP é a placa bacteriana ou o biofilme dental, o tratamento periodontal tem o objetivo de eliminar, minimizar e reduzir consideravelmente o número de bactérias patogênicas existentes e a redução da BP (STEINBERG & FRIEDMAN, 1988).

3.4.1. TRATAMENTO MECÂNICO

O tratamento mecânico na terapia periodontal é realizado por meio da raspagem e alisamento radicular (RAR) com objetivo de remover os micro-organismos da PB e o cálculo supra e subgingival. A RAR é o principal tratamento periodontal não-cirúrgico considerado padrão ouro e pode ser realizado com instrumentos manuais, sônicos e ultrasônicos. A remoção da PB subgingival através da RAR, expõem a dentina, o cemento e o epitélio da BP, para colonização de bactérias aeróbias menos patogênicas. Com a concentração reduzida de produtos bacterianos patogênicos, há uma redução do fluxo crevicular e a estabilização de pH. Com a diminuição da inflamação, a RAR também promove a redução da BP (LINDHE *et al.*, 2010).

Após o tratamento de RAR em BP profundas ocorre a recessão da margem gengival, devido à redução do processo inflamatório e a adaptação do epitélio juncional na base da BP. Também ocorre a redução do sangramento à sondagem que pode refletir o aumento da resistência de penetração da sonda no tecido, quando é feita a reavaliação (LINDHE *et al.*, 2010).

Os procedimentos para tratamento da DP que são realizados em consultório devem ser combinados com o hábito de higiene bucal do paciente após a consulta, afim de proporcionar uma rápida restauração da homeostase e cicatrização local da área afetada (HARVEY, 2017).

No estudo de HAFFAJEE e colaboradores (2006) foi demonstrado um aumento da colonização de micro-organismos gram-positivos associados a saúde periodontal, tais como *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*, entre outros após o tratamento mecânico subgengival. O reaparecimento de micro-organismos patogênicos do complexo vermelho e laranja foram identificados após 3 meses do tratamento.

No trabalho de TORRES e colaboradores (2000), foi descrito que nos estudos que se desenvolveram na década de 80, observou-se que três meses após o tratamento por RAR com orientações ao paciente sobre a manutenção da higiene oral, o índice da placa atingiu de 60 a 80% em relação ao inicial.

Entretanto, em alguns casos a RAR parece não ser capaz de manter a saúde periodontal, devido a questões anatômicas e também devido à patogenicidade bacteriana, de algumas espécies, como *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, etc. Alguns destes patógenos possuem a capacidade de atingir os tecidos periodontais através dos túbulos dentinários e podem transformar estas áreas em reservatórios de microrganismos, dificultando ou inviabilizando o sucesso do tratamento mecânico (BASTOS, 2015)

Nestes casos, o uso coadjuvante de antimicrobianos no tratamento da DP tem potencial de suprimir as bactérias que colonizam a BP e invadem os tecidos periodontais, de acordo com a indicação do periodontista (BIDAULT *et al.*, 2007).

3.4.2. TRATAMENTO COADJUVANTE COM ANTIMICROBIANOS

A utilização de antimicrobianos como coadjuvantes ao tratamento mecânico podem promover a inibição e controle do biofilme bacteriano, além de serem hábeis em minimizar a patogenicidade da microflora subgingival, obtendo assim melhores resultados no tratamento da DP (SEYMOUR & HEASMAN, 1992).

Entre as décadas de 1930 e 1940, foram testados diversos quimioterápicos potentes e ativos antimicrobianos, tais como penicilinas, estreptomicinas e sulfonamidas, no tratamento da DP. Porém, devido ao uso difundido e indiscriminado dos antimicrobianos, as bactérias da placa foram realizando mutações e adquirindo resistência, além de novamente aparecerem efeitos colaterais do uso sistêmicos destes medicamentos, implicando em outros riscos (LINDHE *et al.*, 2010).

As concentrações terapêuticas dos antimicrobianos sistêmicos eram estabelecidas no foco da infecção por períodos curtos após a sua administração oral. Foi constatado, que não é adequado utilizar os antimicrobianos por um espaço de tempo muito longo, justamente pela possibilidade de apresentarem os efeitos colaterais indesejados como febre, náuseas, diarreia, gastrite, ulceração, transtornos digestivos, além de alergias tornando o tratamento sistêmico inadequado. Desde modo, a aplicação local do antimicrobiano através do sistema de liberação de fármaco intrabolsa periodontal, se tornou um método atrativo no tratamento da DP, além de buscar reduzir bruscamente os efeitos colaterais (BRUSCHI, 2006).

Então, como a DP é uma condição inflamatória, a administração de um antimicrobiano localmente tem várias vantagens em relação ao tratamento sistêmico, como descrito na Tabela 1, além de permitir atingir o intervalo terapêutico adequado e

penetrar perfeitamente nos locais da mucosa apenas na cavidade oral (SCHWACH-ABDELLAOUI *et al.*, 2000; LESZCZY – SKA *et al.*, 2011). Os antimicrobianos mais estudados para tratamento local incluem as Tetraciclina (minociclina e doxiciclina), metronidazol e clorexidina (LINDHE *et al.*, 2010).

Tabela 1. Potenciais vantagens da administração de fármaco local versus a administração sistêmica para tratamento da DP (Adaptado de YADAV *et al.*, 2015)

| Administração Sistêmica | Administração Local |
|---|--|
| Menor concentração de fármaco na BP | Alta concentração do fármaco na BP |
| Desenvolvimento de resistência dos patógenos | Menos chances de desenvolvimento de resistência |
| Efeitos colaterais indesejáveis | Efeitos secundários mínimos |
| Todo o corpo é exposto ao medicamento podendo ser tóxico ao organismo | Evita a exposição do fármaco a locais desnecessários |
| É necessária uma dose mais elevada | É necessária uma dose relativamente mais baixa |
| Inativação de fármacos devido ao metabolismo e excreção | Evita a inativação de drogas |
| Invasivo, podendo perturbar a flora bacteriana residente | Não invasivo, não compromete a flora residente |
| Depender da adesão do paciente às dosagens | Menor dependência do paciente para administrar as dosagens |

Os sistemas de administração local de fármaco possuem uma gama de aplicações (YADAV *et al.*, 2015). Há enxaguatórios bucais (bochechos), pastas especiais, gomas de mascar, irrigantes, jatos pulsáteis, mas que penetram, no máximo até 2mm abaixo da margem gengival. E mesmo utilizando dispositivos irrigantes adequados, o tempo de permanência dentro da BP é insuficiente, devido a frequente troca do fluido crevicular.

Por este motivo, a aderência ao tratamento pelo paciente, se torna um fator limitante para garantir que o tratamento clínico seja eficaz (BRUSCHI, 2006; YADAV *et al.*, 2015).

Sobre a farmacodinâmica, segundo CIONCA e colaboradores (2009), os antimicrobianos utilizados no tratamento da DP, podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação:

- Inibição da síntese de parede celular;
- Inibição de síntese de ácido nucléico;
- Inibição de síntese protéica;
- Alteração da permeabilidade na difusão ou transporte ativo através da membrana celular.

Quanto mais destes mecanismos o fármaco apresentar, aumentará sua efetividade, que pode ser comprovada em estudos *in vitro* e clínicos. Porém, não há produtos comercializados que preencham todos os requisitos e ainda alguns apresentam pouca eficácia e efeitos colaterais indesejáveis ao longo do tratamento (SAMPAIO *et al.*, 2011).

LINDHE (2010) classifica os agentes de acordo com a sua substantividade, que refere-se à atividade antimicrobiana residual. Alguns compostos quaternários de amônio, fenólicos, fluoreto, alcalóides e agentes antioxidantes, possuem baixa substantividade, sendo referenciados antimicrobianos de primeira geração. Já as biguanidas e os β – lactâmicos (que interferem na aderência bacteriana na superfície do dente) possuem substantividade elevada, sendo classificados como antimicrobianos de segunda e terceira geração, respectivamente.

Os antimicrobianos podem ainda ser classificados como bactericidas e os bacteriostáticos. Os bactericidas provocam a morte das bactérias independente do sistema imune do paciente, que pode estar debilitado. Os bacteriostáticos inibem o crescimento bacteriano por um espaço determinado de tempo. Sendo estas denominações não tão exatas, pois pode ocorrer o efeito inverso, dependendo da população bacteriana existente.

O grande determinante para eficácia do antimicrobiano é o conhecimento do seu espectro de alcance em relação aos patógenos envolvidos na DP. Também deve ser considerada a dosagem, via de administração e a duração do tratamento afim de otimizar as chances das concentrações adequadas atingirem efetivamente o local da infecção (BIDAULT *et al.*, 2007; GAETTI – JARDIM *et al.*, 2010). Testes microbiológicos para quantificar e identificar os micro-organismos presentes na PB podem auxiliar na escolha do antimicrobiano apropriado (LINDHE *et al.*, 2010).

A biodisponibilidade do antimicrobiano é um dos fatores determinantes da sua eficácia, pois o efeito vai depender da sua adsorção ou ligação no local da infecção sem a perda da sua atividade. A eficácia clínica depende da sua potência, do nível das ligações nas superfícies e da sua cinética de liberação (BIDAULT *et al.*, 2007).

Com objetivo de aperfeiçoar todas estas características importantes e finalmente erradicar ou suprimir o desenvolvimento destas bactérias patogênicas, associado à resposta anti-inflamatória, os sistemas de liberação controlada do antimicrobiano (LCA) intrabolsa periodontal, tem sido de grande interesse dos pesquisadores (CETIN *et al.*, 2005; AGARWAL *et al.*, 2016; LIMA, 2016; MORELLI *et al.*, 2017).

3.5. DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ANTIMICROBIANOS (LCA)

A LCA é um sistema quem vem sendo desenvolvido e aprimorado com o objetivo de estender o tempo de liberação do ativo, nesse caso o antimicrobiano, no organismo mantendo a concentração plasmática em homeostase e controlando a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo* por meios químicos e biológicos. Este direcionamento

dos ativos no organismo, também é utilizado para tratamento de diversas doenças, tal como o câncer, levando em consideração a característica de redução da dosagem sistêmica, assim diminuindo os efeitos secundários (CERIZE, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014).

Nas administrações sistêmicas de medicamentos, a concentração do fármaco ativo na corrente sanguínea sofre alterações de concentração, primeiro tendo um aumento súbito, atingindo um ápice, e declinando logo em seguida, assim se fazendo necessárias várias doses para que se mantenha a concentração terapêutica de interesse (LOCKMAN, 2012)

As potenciais vantagens do sistema de LCA diretamente na bolsa periodontal são (STEINBERG & FRIEDMAN, 1990; SOSKOLONE & FREIDMAN, 1996; NAIR & ANOOP, 2012):

- Redução significativa dos efeitos colaterais, quando comparado à administração sistêmica;
- Obtenção de altas concentrações do ativo no local de interesse, quando comparadas com os níveis plasmáticos após a administração oral;
- Melhor aceitação do paciente;
- Redução de custos de tratamentos extensivos da saúde bucal;
- Uma administração efetiva em pacientes com problemas de deglutição;
- Absorção pontual e eficaz;
- Não é absorvido pelo sistema gastrointestinal, também não sendo metabolizado pelo fígado;
- Pode ter longa duração com apenas uma aplicação;
- Tem aplicação não invasiva, indolor e simples;

- Disfarça sabor e odor desagradável de determinados fármacos e evita o aparecimento de manchas nos dentes.

Como desvantagens destes sistemas, podemos citar a irritação ou intolerância ao fármaco, a impossibilidade de reverter o processo rapidamente, assim como as condições anatomopatológicas da BP e o efeito do fármaco ser dependente do fluxo do fluido crevicular gengival (SOSKOLONE & FREIDMAN, 1996). Este fluido tem substituição constante (em média de 40 vezes/hora), se fazendo necessário um melhor controle da liberação do fármaco em quantidade suficiente para sua maior eficácia (QUIRYNEN *et al.*, 2002).

O processo de dissolução do fármaco dentro da BP ocorre por lixiviação. A concentração do medicamento deve estar acima da concentração mínima efetiva e abaixo da concentração mínima tóxica (NAIR & ANOOP, 2012). Este tipo de tratamento local deve ser coadjuvante e proporcionar uma concentração de fármaco adequada, de tal forma que consiga penetrar na região mais profunda da BP, combatendo e inibindo o crescimento da placa bacteriana por períodos maiores (SALVI *et al.*, 2002).

A LCA está associada, física ou quimicamente, à biocompatibilidade dos fármacos com os materiais utilizados como matriz, formando um sistema que quando administrado possua as características de conduzir o fármaco até o sítio específico de atuação e ter um controle determinado anteriormente da taxa de liberação e entrega do fármaco por este sistema. Há uma vasta investigação dos materiais usados como matriz destes dispositivos, sendo eles de natureza inorgânica, lipídica e polimérica (MÜLLER *et al.*, 2010).

Os dispositivos de liberação controlada podem ser biodegradáveis e não biodegradáveis, e dependem da base polimérica empregada em sua composição. Os dispositivos biodegradáveis são dissolvidos localmente liberando o fármaco, no caso o antimicrobiano, por períodos prolongados e dosagem controlada. Enquanto que os tipos não biodegradáveis devem ser removidos do local de ação (SOSKOLNE & FREIDMAN, 1996; YADAV *et al.*, 2015). Polímeros, géis formadores *in situ*, modificadores de viscosidade, plastificantes, filmes, fibras, implantes, micropartículas, nanopartículas constituem os vários tipos de dispositivos de LCA com objetivo de melhorar a retenção intrabolsa (YADAV *et al.*, 2015; BRUSCHI *et al.*, 2006).

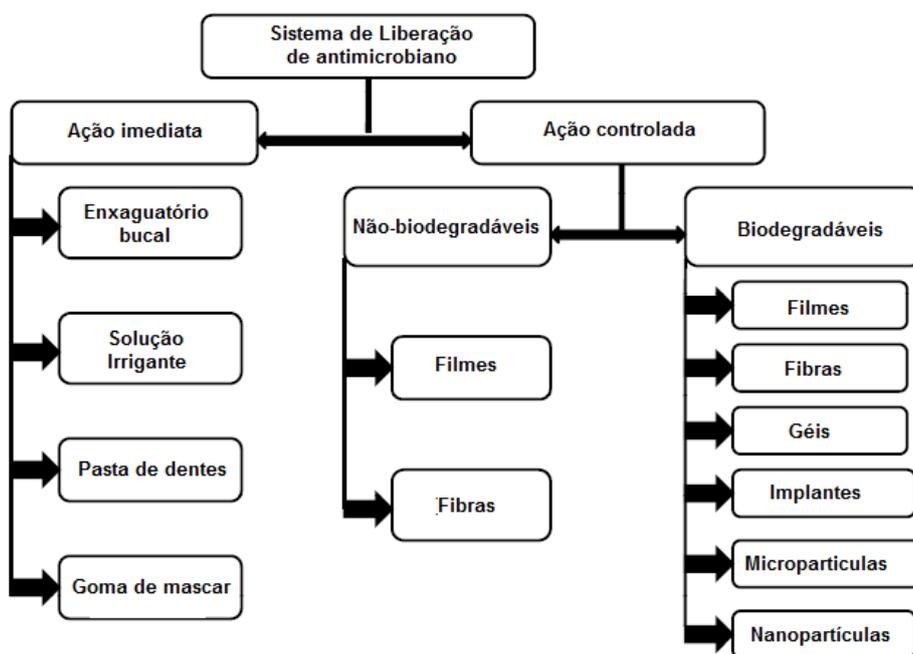


Figura 3. Classificação dos sistemas de LCA (Adaptado de YADAV *et al.*, 2015).

Os polímeros utilizados nos sistemas de LCA podem ser classificados como naturais, naturais modificados e sintéticos. Os polímeros naturais mais utilizados são a quitosana, a celulose e o colágeno. Porém, como eles levam muito tempo para degradar, são estudados polímeros modificados, com a finalidade de reduzir a reticulação

permitindo uma degradação menos complexa. Os polímeros sintéticos mais utilizados são o poli (álcool vinílico), poli (ácido acrílico), poli (etileno), poli (etilenoglicol), entre outros (NASCIMENTO *et al.*, 2011).

Diferentes dispositivos de LCA foram avaliados cientificamente e encontram-se disponíveis no mercado internacional (YADAV *et al.*, 2015), dentre eles:

Actisite® (TONETTI *et al.* 1990) é um dispositivo à base de fibras de acetato de vinil etileno com 23 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro que fornece 12,7 mg de cloridrato de tetraciclina. Este foi o primeiro dispositivo de LCA comercialmente disponível, produzido pela Alza Corporation e sendo distribuído somente nos Estados Unidos (Califórnia). Ele é eficaz contra *A. actinomycetemcomitans*. A fibra é aplicada em camadas ou em circunferências até preencher completamente a BP. É utilizado um adesivo de cianoacrilato para fixação e o tratamento é feito entre 7 – 10 dias. Como não é biodegradável, o dispositivo precisa ser removido após este período.

Atridox™ (STOLLER *et al.*, 1998) é uma formulação biodegradável de gel contendo 10% em peso de hidrato de doxiciclina para liberação subgengival, também produzida pela Atrix Laboratories nos Estados Unidos (Colorado). Uma seringa contém 42,5 mg da doxiciclina e a outra contém 450 mg do sistema de entrega chamado de ATRIGEL que é uma combinação fluida de 36,7% de poli(ácido láctico) dissolvido em 63,3% de N – metil – 2 – pirrolidona. Para aplicação, o conteúdo das seringas é misturado e inserido na BP. O antimicrobiano é liberado durante 21 dias, sendo eficiente contra *P. gingivalis* e *F. nucleatum*.

Arestin™ (JONES *et al.* 1994) são microcápsulas de poli (lático – co – ácido glicólico) (PGLA) incorporadas com cloridrato de minociclina, produzidas pela Ora Pharma em Ohio nos Estados Unidos. Este antimicrobiano faz parte da classe de tetraciclina e inibe a síntese de proteínas. As microcápsulas bioabsorvíveis, são

utilizadas em conjunto com o tratamento mecânico e inseridas no interior da BP, onde o fluxo crevicular provoca a hidrólise do polímero permitindo a liberação do antimicrobiano. Seu período de liberação é de 14 a 21 dias e sua atividade é eficaz contra *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. Actinomycescomitans*.

Periochip® (STEINBERG *et al.*, 1990; SOSKOLNE *et al.*1998) é um chip biodegradável a base de glicerina e gelatina hidrolisada de origem bovina reticulada com glutaraldeído contendo 2,5mg de gluconato de CHX para inserção na BP. Ele foi desenvolvido em Israel pela Perioproducts Ltda. e é produzido nos Estados Unidos e distribuído na Florida e em alguns países da Europa. É aplicado como um tratamento adjuvante ao mecânico, geralmente em pacientes com profundidade da BP > 5mm. A liberação do gluconato de CHX, ocorre 40% nas primeiras 24 horas e o restante é liberado de forma linear durante o período entre 7 e 10 dias. A atividade anti – séptica deste dispositivo se mostra eficaz contra *A. actinomycescomitans*.

Ainda, há 3 sistemas que não são aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (NAIR & ANOOP, 2012; YADAV *et al.*, 2015):

Dentomicyn® é uma pomada com base de Hidroxietil – celulose, aminoalquil – Metacrilato, triacetina e glicerina contendo 2% de cloridrato de minociclina. É fabricada no Reino Unido e comercializada em vários países da Europa, mas não é aprovada pela FDA mundial. No Japão, ele é fabricado e comercializado como Periocline (NAKAGAWA *et al.*, 1991). Ela é aplicada intrabolsa periodontal, a concentração do ativo atinge 1300 µg/ml em 1 hora e diminui para 90 µg/ml após 7 horas. Os níveis detectáveis durante um mínimo de três dias após a administração de única aplicação, é de 0,05 g do gel (1 mg de minociclina) na BP. Se demonstrou eficaz contra *P. gingivalis*, *P.*

intermedia, *T. forsythia*, *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*, em dois estudos (MC COLL *et al.*, 2006; SATOMI *et al.*, 1987).

Elysol® (LOESCHE *et al.*, 1991) é um gel branco a base de óleo de sésamo e Mono-oleato de glicerilo, semisólido incorporado com 25% de metronidazol (equivalente a 1g de Benzoato metronidazol). A mistura da base ajuda manter a concentração desejada do fármaco intra BP entre 24 e 36 horas, entretanto, não é um produto biodegradável. Apresenta efetividade contra anaeróbios da PB em geral (GRIFFITHS *et al.*, 2000). Ele é produzido e distribuído pela Dumex Alpharma em Copenhagen na Dinamarca.

Chlo – Site® (PAOLANTONIO *et al.*, 2009) é um gel com base de xantano, que é um polímero polissacarídeo, que quando combinado com a água, forma uma matriz tridimensional e controla a liberação do fármaco. Contém 1,5% de CHX combinada (0,5% de digluconato de CHX e 1,0% de cloridrato de CHX). É biodegradável, aplicado dentro da BP com uma seringa e pode ser usado como adjuvante do tratamento mecânico, inibindo o crescimento bacteriano durante duas semanas (VERMA *et al.*, 2012). Este produto é produzido pela Ghimas Company, Itália.

Para o tratamento da PC, ainda há necessidade de novos dispositivos que tenham efeitos equivalentes ou superem o tratamento mecânico. Avançar em pesquisas de liberação intrabolsa mais eficazes do que as existentes, poderiam contornar as questões relativas à liberação. Estes novos dispositivos precisam de componentes melhorados com bases biodegradáveis, contendo nanopartículas, nanofibras, lipossomas, etc (YADAV *et al.*, 2015).

MEDAIHAH e colaboradores (2014) avaliou 3 grupos: um grupo apenas com o uso do Periochip®, sem o tratamento mecânico; o outro apenas tratado mecanicamente com aplainamento radicular e o terceiro grupo tratado mecanicamente e com uso do chip de CHX como coadjuvante, em todos os casos, os pacientes apresentavam PC moderada a

grave. Após três meses de acompanhamento, as reduções médias foram de 2,8mm para o grupo que realizou apenas o tratamento mecânico e 2,6mm para o grupo que utilizou o tratamento mecânico mais o chip de CHX como adjuvante. Para o grupo que aplicou apenas o chip de CHX a redução da BP foi apenas de 0,7mm, demonstrando a importância do tratamento mecânico.

DANESHMAND e colaboradores (2000) compararam a microbiota subgengival de sítios com periodontite crônica, de grupo tratado com RAR + o Periochip® e o grupo controle, tratado por RAR, somente. Foi observado que não existiram diferenças estatisticamente significantes na quantidade total de colônias bacterianas de *P. gingivalis*, *P. intermédia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, entre outras bactérias testadas dos complexos laranja, azul e amarelo, nos grupos de teste e o grupo controle após 4 semanas de tratamento. Concluindo que o Periochip® não ofereceu vantagem antimicrobiana adicional, comparado ao tratamento mecânico.

CRUZ e colaboradores (2006) avaliaram a eficácia do Periochip® em pacientes com periodontite crônica moderada a grave, em conjunto com o tratamento de RAR e outro grupo apenas tratado com RAR. Os parâmetros clínicos foram avaliados nos períodos de 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias. Os resultados demonstraram que houve redução do processo inflamatório semelhante nos dois grupos, com e sem o uso do Periochip®. Os autores concluíram que o uso do Periochip® associado ao tratamento por RAR mostrou eficiência clínica, entretanto, não apresentou benefício adicional no ganho de inserção clínica, quando comparado à terapia convencional.

No Brasil, até o presente momento não há comercialização de dispositivos para liberação intrabolsa periodontal. A partir destes dados, houve a ideia de utilizar um polímero natural e biodegradável, como exemplo do amido, junto a um antisséptico padrão ouro contra formação de BD, a clorexidina, no desenvolvimento de um dispositivo

de liberação controlada intrabolsa mais eficaz para tratamento coadjuvante da DP. E estes componentes estão descritos a seguir, sendo os componentes da matriz do dispositivo desenvolvido neste estudo.

3.6 CLOREXIDINA

Dos antimicrobianos usados como adjunto para o tratamento da DP, a clorexidina (CHX) é considerada um anti-séptico potente, padrão ouro no controle do BD (LINDHE *et al.*, 2010).

A CHX é uma bisbiguanida catiônica que teve sua primeira síntese em 1950 na Inglaterra, com o objetivo de alcançar a cura para malária, mas não obteve sucesso. Somente alguns anos depois, em 1953, o cloridrato de clorexidina foi desenvolvido como um antisséptico com excelente ação tópica, para tratamento de ferimentos superficiais na pele. Em 1970 foi produzido nos Estados Unidos, onde teve êxito por mostrar sua função antisséptica com baixa toxicidade e amplo espectro.

Possui ação bactericida e bacteriostática dependendo da concentração, agindo contra uma grande gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de leveduras e fungos como a *Candida albicans*, anaeróbios facultativos e restritivos e alguns vírus (LINDHE *et al.*, 2010). Seu efeito está associado pela atração e adsorção das moléculas de CHX à superfície celular dos micro-organismos, que é carregada negativamente. Ela adsorve compostos aniônicos, tais como glicoproteínas, radicais fosfatados e carboxílicos que estão presentes no biofilme bacteriano. Assim, ocorre a alteração da permeabilidade da membrana, provocando desequilíbrio osmótico e perda de componentes intracelulares (FERRAZ *et al.*, 2001).

Em 1983, foi considerada um agente químico de grande importância pela World Health Organization, devido a sua baixa toxicidade e amplo espectro de ação, sendo a partir daí considerado um antimicrobiano de primeira escolha, amplamente prescrito, quando necessário, para auxiliar no tratamento da DP (FRANCO NETO *et al.*, 2008).

ACHX apresenta substantividade, isto é, ela se liga à hidroxiapatita do esmalte ou da dentina e à grupos aniônicos ácidos de glicoproteínas, sendo liberada lentamente, à medida que a sua concentração no meio diminua, permitindo desse modo um tempo de atuação prolongado. Com isso essa substância pode manter seus efeitos por longos períodos de tempo (GOMES *et al.*, 2003; ZANATTA & RÖSING, 2007; LINDHE *et al.*, 2010).

Considerada uma base forte e mais estável em forma de sal, a CHX é descrita pela fórmula molecular de $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, com massa molar de 505,4 g/mol, composta por dois anéis clorofenólicos nas extremidades da sua estrutura, ligados a um grupamento bisguanida, um de cada lado e conectados por uma cadeia central de hexametileno. Possui densidade = 1,06 g / cm³ e ponto de ebulição = 134 °C. (O'NEIL, 2001).

A CHX em soluções a base de água é geralmente mais estável entre pH de 5-8. Em pH mais alcalino, acontece a precipitação da CHX e em pH mais ácido ocorre a perda da sua atividade, devido a solução não estar mais estável. Ou seja, a sua atividade antimicrobiana da CHX depende da sua estabilidade em pH fisiológico, e sua ação é proporcionada pela liberação das moléculas carregadas positivamente (GIANELLI *et al.*, 2008).

As concentrações efetivas de CHX dentro da BP foram avaliadas por SOSKOLNE e colaboradores (1998), através de um estudo de liberação do Periochip® em pacientes com periodontite crônica, com profundidade de BP entre 5 – 8mm, durante 9 dias. Através de amostras do fluido crevicular gengival, constatou-se que a concentração de CHX duas

horas após inserção do chip na BP, foi de 0,2 g/L, e permaneceu com 1,3 - 1.9 g/L nas 70 horas seguintes, acima da concentração inibitória mínima que é de 0,125 g/L. Progressivamente, a concentração foi decaindo entre as 72 e 120 horas posteriores, e foi obtida a concentração de 0,057 g/L no nono dia após a inserção do chip. Em amostras de sangue e urina, a CHX não foi detectada, indicando que a CHX pode manter um nível clínico efetivo na BP no período em torno de uma semana, sem ser absorvida ou metabolizada sistemicamente.

No estudo de MUSIAL e colaboradores (2010) foi desenvolvido um carreador polimérico em gel de metilcelulose e outro de poli (ácido acrílico) para liberação de CHX. As taxas de liberação foram comparadas com os parâmetros de pH, viscosidade e condutividade em temperaturas de 22°C, 32°C e 42°C. Nas análises de MEV/EDS, os átomos de cloro indicavam a presença de CHX, demonstrando a dispersão homogênea de CHX na matriz polimérica no gel de poli (ácido acrílico). Em relação a liberação, as taxas da CHX no gel de metilcelulose sofreram interferência da temperatura de que quanto maior, também aumentava a liberação da CHX, o que não houve interferência no gel de poli (ácido acrílico). Em 10 horas de liberação, houve um aumento de 35% na taxa de liberação no sistema de metilcelulose, e para o sistema de poli (ácido acrílico) o aumento foi apenas de 0,5%.

GROVER e colaboradores (2011) realizaram um estudo com o Periochip® como adjuvante no tratamento de RAR. Os resultados clínicos mostraram melhora significativa e mais rápida com redução da profundidade da BP em torno de $1,15 \pm 1,30$ mm em relação ao tratamento mecânico sozinho, que teve redução da BP de $0,47 \pm 1,26$ mm.

JOSE e colaboradores (2016) realizaram um estudo para comparar os efeitos de um laser de diodo e um chip de CHX sozinho e em combinação quando usado como adjuvante do tratamento mecânico para DP crônica. O grupo do laser de diodo não

apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Concluiu – se que a CHX administrada localmente ou em combinação com o tratamento mecânico se mostrou altamente eficaz na redução da profundidade da BP e melhoria dos níveis de inserção clínica quando utilizada como adjuvante no tratamento mecânico.

YUE e colaboradores (2014) fabricaram um sistema de LCA em formato de chip a base de poli (ácido lático–co–ácido glicólico) ou PGLA com ciclodextrina e CHX em microsferas e desenvolveram um estudo sobre suas propriedades físico – químicas, além da atividade antimicrobiana *in vitro* contra *A. actynomicetecomitans*. Foi observado que a liberação da CHX se manteve estável por duas semanas, sendo a liberação inicial diminuída com a complexação da ciclodextrina. Em relação à atividade antimicrobiana, a forma do chip foi capaz de manter as zonas de inibição durante uma semana nos testes de difusão em Agar.

Diante dos estudos apresentados em relação a CHX, por conta de todas as suas características, de biodisponibilidade, substantividade, baixa toxicidade e amplo espectro de ação, ela será usada nesta pesquisa como ativo antimicrobiano em um sistema de LCA.

3.7 AMIDO (AA)

O AA é um polímero natural (polissacarídeo), biocompatível, não tóxico, biodegradável, ecológico e de baixo custo. Nos últimos anos, o AA foi tido como um novo biomaterial potencial para aplicações farmacêuticas devido às suas características físico-químicas e funcionais (OCHUBIOJO& RODRIGUES, 2012).

Ele é um carboidrato de reserva entre os vegetais. É estocado pelas plantas, após ser biossintetizado em forma de grânulos com tamanho entre 0,5 – 175µm. Estes grânulos de amidos são semicristalinos, podendo apresentar propriedades diferentes dependendo

de sua origem tais como forma, tamanho, distribuição, composição e cristalização. São encontrados em folhas, tubérculos, raízes, sementes, frutos, entre outros. Os principais alimentos comercializados onde é encontrado o amido são de batata, ervilha, milho, arroz, mandioca, aveia, trigo, cevada, etc (BULÉON *et al.*, 1998; THIRÈ *et al.*, 2004; ANGELLIER *et al.*, 2006).

As macromoléculas que constituem o AA são a amilopectina e a amilose. Ambas são formadas por unidades de α -D-glicose que são ligadas em α -(1,4) na amilose, que é linear ou levemente ramificada e possui peso molecular entre 10^5 a 10^6 , e na amilopectina as ligações são em α -(1,6) em sua maior parte, o que formam mais ramificações e peso molecular entre 10^7 a 10^9 , como mostrado na Figura 4 (BULÉON *et al.*, 1998; RINDLAV – WESTLING & GATENHOLM, 1998; VANDEPUTTE e DELCOUR, 2004).

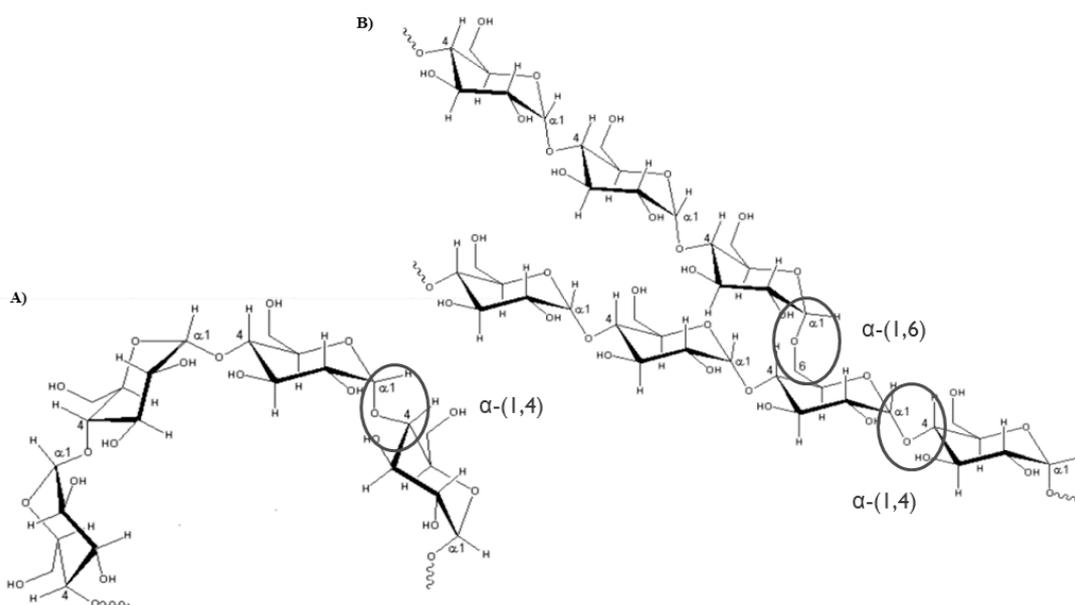


Figura 4. Estrutura da (A) amilose (B) amilopectina (adaptado de LAJOLO & MENEZES, 2006).

No caso do AA de milho nativo a concentração é de 20 – 30% de amilose e 70 – 80% de amilopectina, sendo que esta razão pode variar de acordo com a fonte do AA. Quando o AA de milho contém um alto teor de amilose (50-70%) é denominado de

amilomaize. Outras espécies mutantes também podem produzir amido com alto teor de amilopectina (cerca de 99%), no caso do amido ceroso, denominado *waxymaize* (SHOGREN e JASBERG, 1994). Assim, em relação às diferentes quantidades de amilose e amilopectina, há diferentes propriedades físico-químicas na sua estrutura e distribuição (BULÉON *et al.*, 1998, KURAKAKE *et al.*, 2009).

Além da amilose e da amilopectina, outros componentes estão presentes em menor quantidade. Estes podem ser agrupados em três categorias:

- Materiais particulados, que são compostos por fragmentos de parede celular;
- Componentes superficiais: Enzimas, proteínas e aminoácidos que são removidos durante o procedimento de extração;
- Componentes internos: Lipídeos, que representam a fração mais importante associada ao grânulo de amido. Nos amidos de trigo e milho sua quantidade chega até 1,2 e 0,8%, respectivamente (BULÉON *et al.*, 1998).

O AA apresenta um elevado grau de organização supramolecular no interior dos grãos (THIRÉ, 2003). Os grânulos de amido apresentam birrefringência quando avaliados em microscópio óptico de luz polarizada, observando-se uma cruz escura característica, conhecida como “cruz de malta” (VAN SOEST, 1996). Isto indica que os grãos podem ser considerados como esferocristais distorcidos. O sinal de birrefringência é positivo em relação ao raio do esferocristal, sugerindo que a orientação média das cadeias poliméricas seja radial (BULÉON *et al.*, 1998).

Os grânulos de AA nativo apresentam três tipos principais de estruturas cristalinas: A, B e C. Estas estruturas diferem-se pela densidade de empacotamento das hélices simples ou duplas e pelo teor de água. Os tipos A e B consistem em estruturas de hélices duplas hexagonais. A estrutura do tipo B é uma associação de hélices com uma coluna de água presente no centro do arranjo, enquanto que na cristalinidade do tipo A,

esta coluna de água é substituída por uma hélice dupla. A quantidade de água incorporada na rede cristalina é estimada em 0,1 e 0,25 grama, por grama de amido seco para as formas A e B, respectivamente (VANSOEST *et al.*, 1996). Estruturas tipo A são encontradas em cereais e o tipo B, são encontradas geralmente em tubérculos. A estrutura do tipo C é considerada como uma estrutura intermediária entre os tipos A e B, sendo encontrada em amido de ervilha (THIRÉ, 2003).

Outro tipo de cristalinidade pouco comum, pertence ao grupo das estruturas do tipo V (de origem alemã "Verkleisterung", que significa gelatinização), são originadas da precipitação de complexos de amilose e ácidos graxos ou monoglicérides, que aparecem após o processo de gelatinização do amido. No precipitado cristalino, a amilose assume uma conformação de hélice simples. Este tipo de cristalinidade é raramente vista em grânulos nativos, embora estudos por ressonância magnética nuclear no estado sólido tenham provado a presença de complexos de lipídeos e amilose amorfa em amidos nativos de milho, aveia e arroz (BULÉON *et al.*, 1998). Comparada com as redes do tipo A e B, as estruturas do tipo V apresentam uma cavidade maior, a qual contém o composto complexado (VAN SOEST *et al.*, 1996). Também são conhecidas outras formas intermediárias entre a estrutura hidratada V_H e a estrutura anidra V_A , provavelmente devido às diferenças de hidratação da célula unitária. A V_A apresenta hélices de amilose mais contraídas e contém menos água do que a do tipo V_H (THIRÉ, 2003).

3.7.1 FILMES DE AMIDO TERMOPLÁSTICO

Os amidos quimicamente modificados têm mais reação para transportar compostos biologicamente ativos, tornando-se mais efetivos e biocompatíveis (OCHUBIOJO & RODRIGUES, 2012).

O AA nativo não é solúvel na maioria dos solventes orgânicos e em água na temperatura ambiente. Ele apresenta estrutura termossensível quando é disperso em excesso de água, com cisalhamento moderado. A partir deste processo ocorre a gelatinização. Esta primeira etapa da gelatinização consiste na transformação do amido granular em uma pasta viscoelástica. A temperatura em que acontece a gelatinização é em torno de 60 a 75 °C, dependendo da fonte botânica do amido. Com o aquecimento, ocorre um colapso nas organizações moleculares da estrutura do grão de AA resultando em mudanças irreversíveis nas propriedades primárias tais como inchamento, solubilização, fusão cristalina e viscosidade.

Existem dois estágios no processo de gelatinização: hidratação e inchamento. A região amorfa dos grânulos é hidratada e por conseqüência incha, ocorrendo a perda da birrefringência de sua cristalinidade, em seguida há o rompimento dos grânulos (DORRER & RÜHE, 2006; NOSONOVSKY & BHUSHAN, 2008a; 2008b).

O estudo de SOUZA & ANDRADE (2000) demonstrou que os grânulos de amido se rompem ao sofrer o processo de inchamento durante a gelatinização, quando a quantidade de água é maior do que 40%. Ao reduzir a quantidade de água, a temperatura precisa ser elevada para obter o rompimento dos grânulos. Além da temperatura, a velocidade de agitação durante a gelatinização interfere nas propriedades dos filmes.

Durante o resfriamento de suspensões gelatinizadas, ocorre o processo de gelificação do AA, tornando um gel opaco, com aumento de sua viscosidade e rigidez.

Este processo constitui a rede intermolecular tridimensional formado por moléculas de amilose e grânulos inchados gelatinizados que contém principalmente amilopectina. A resistência do gel vai depender da concentração e do tamanho formado pelas moléculas de amilose e das moléculas contendo amilopectina (VAN SOEST, 1996; MORRIS, 1990).

Quando o amido gelatinizado é armazenado e resfriado, ele sofre um fenômeno chamado retrogradação. Este processo ocorre acima da temperatura de transição vítrea (Tg), onde o AA amorfo ou com baixo grau de ordenação, independente do teor de água, começa a se reassociar em um estado mais ordenado, resultando na formação de zonas de união entre as moléculas gelificadas e cristalizadas, agregadas de estruturas helicoidais resultantes. O aumento da cristalinidade neste processo pode influenciar em mudanças no comportamento mecânico (SHOGREN 1992; VAN SOEST *et al.*, 1996; ELFSTRAND *et al.*, 2004). Na amilose, os processos de gelificação e retrogradação são relativamente rápidos, diferente no caso da amilopectina que a retrogradação é lenta, sendo diretamente dependente da concentração de amido e da temperatura de secagem ou armazenagem (VAN SOEST *et al.*, 1996).

Para conseguir uma matriz polimérica homogênea e essencialmente amorfa em um processo convencional chamado *casting*, que envolve a evaporação do solvente e reorganização das cadeias de amilose e amilopectina durante a secagem do filme, pode-se utilizar diferentes plastificantes, tais como a água e o glicerol (SOUZA & ANDRADE, 2000; THIRÈ *et al.*, 2003; MALI *et al.*, 2010).

A adição dos plastificantes aliado a um processo termo-mecânico produz um AA completamente termoplástico, diminuindo as interações entre os segmentos de cadeia e sua energia (VAN SOEST & VLIEGENTHART, 1997). Eles são aditivos com massa molecular menor em relação ao polímero. São muito empregados e de grande importância

para aumentar a flexibilidade e melhorar a processabilidade do amido. Durante o processo da gelatinização, a água contida no processo e os plastificantes adicionados formam ligações de hidrogênio com o amido, substituindo as fortes interações entre os grupos hidroxila das moléculas do amido, resultando no amido termoplástico. Na maioria dos estudos, os polióis são frequentemente utilizados como plastificantes, tais como glicerol, sorbitol e ureia, e outros (VISAKH *et al.*, 2016).

O glicerol é o plastificante mais comumente utilizado, pois ele contém três grupos hidroxila, que permite sua solubilidade em água. A sua eficácia na produção filmes biodegradáveis de AA termoplástico é provavelmente devido ao seu pequeno tamanho, o que lhe permite ser mais facilmente inserido entre as cadeias do polímero e como consequência, exercer mais influência nas propriedades mecânicas (CRISTANCHO, 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. FABRICAÇÃO DOS FILMES DE AMIDO TERMOPLÁSTICOS

Os filmes foram produzidos com base no processo de *casting* proposto por MA e colaboradores (2008). Uma solução polimérica contendo 200 mL de água milli – Q, 10,7 gramas de amido de milho (AMIDEX® 3001 – TinnKol, SP, Brasil) e 6,2mL de glicerol $\geq 99.5\%$ (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), foi mantida sob agitação no reator com capacidade para 500mL (Laborglas, São Paulo, SP, Brasil), conforme Figura 5(A) e com o agitador mecânico RW20 digital (IKA equipamentos de laboratório, Campinas, SP, Brasil) em velocidade constante de 420rpm, na temperatura ambiente, em torno de 28°C, durante 30 minutos.

Em seguida, a solução foi aquecida até 95°C em banho-maria (Fiastom, Perdizes, SP, Brasil) contendo óleo de silicone 95% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), mantida em agitação constante de 420rpm durante 30 minutos para gelatinizar o amido e torná-lo termoplástico.

4.1.1. INDUÇÃO PARA FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS E INCORPORAÇÃO DO ANTIMICROBIANO

O amido gelatinizado foi transferido para um balão com capacidade de 1L, sob agitação constante, até retornar a temperatura ambiente e em seguida foi adicionado 200 mL de etanol 99% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por gotejamento, formando uma suspensão de amido termoplástico permitindo formação de partículas de amido.

Neste momento, é coletada uma amostra de 50 mL para sedimentação, e depois de 1h foi coletado 30 mL do fundo precipitado para formação de um filme controle e acondicionado em uma placa de petri 90 x 15 mm.

A partir desta etapa, o protocolo foi adaptado para incorporar uma solução de gluconato de clorexidina (CHX) 20% (Drogal© Farmacêutica, São Paulo, Brasil), junto ao processo de retrogradação e a formação de partículas. Foram adicionados 80mL de CHX, que equivalem a proporcionalmente 16g de fármaco, por gotejamento na suspensão de amido termoplástico, mantido sob agitação em velocidade constante de 420rpm durante 24 e 48 horas.

Após cada período, as suspensões foram fracionadas em Erlenmeyers de 250 mL e submetidas à sedimentação do precipitado, descansando por 1 hora, conforme Figura5(B). De cada uma das suspensões, foram coletadas alíquotas de 30 mL do precipitado sedimentado, com o auxílio de uma pipeta Pasteur (Kasvi®, Curitiba, PR, Brasil) e condicionados em uma placa de petri 90 x15cm, gerando entre 4 e 5 placas de cada lote. A secagem dos filmes para evaporação do solvente e formação do filme foi realizada por 24 horas, em estufa (Labiomédica Engenharia de laboratório, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 50°C, conforme Figura 5 (C),



Figura 5. Etapas de fabricação dos filmes: A) Gelatinização do amido; B) Sedimentação do precipitado C) Secagem das placas; D) Filme pronto.

Um organograma do protocolo pode ser visto na Figura 6.

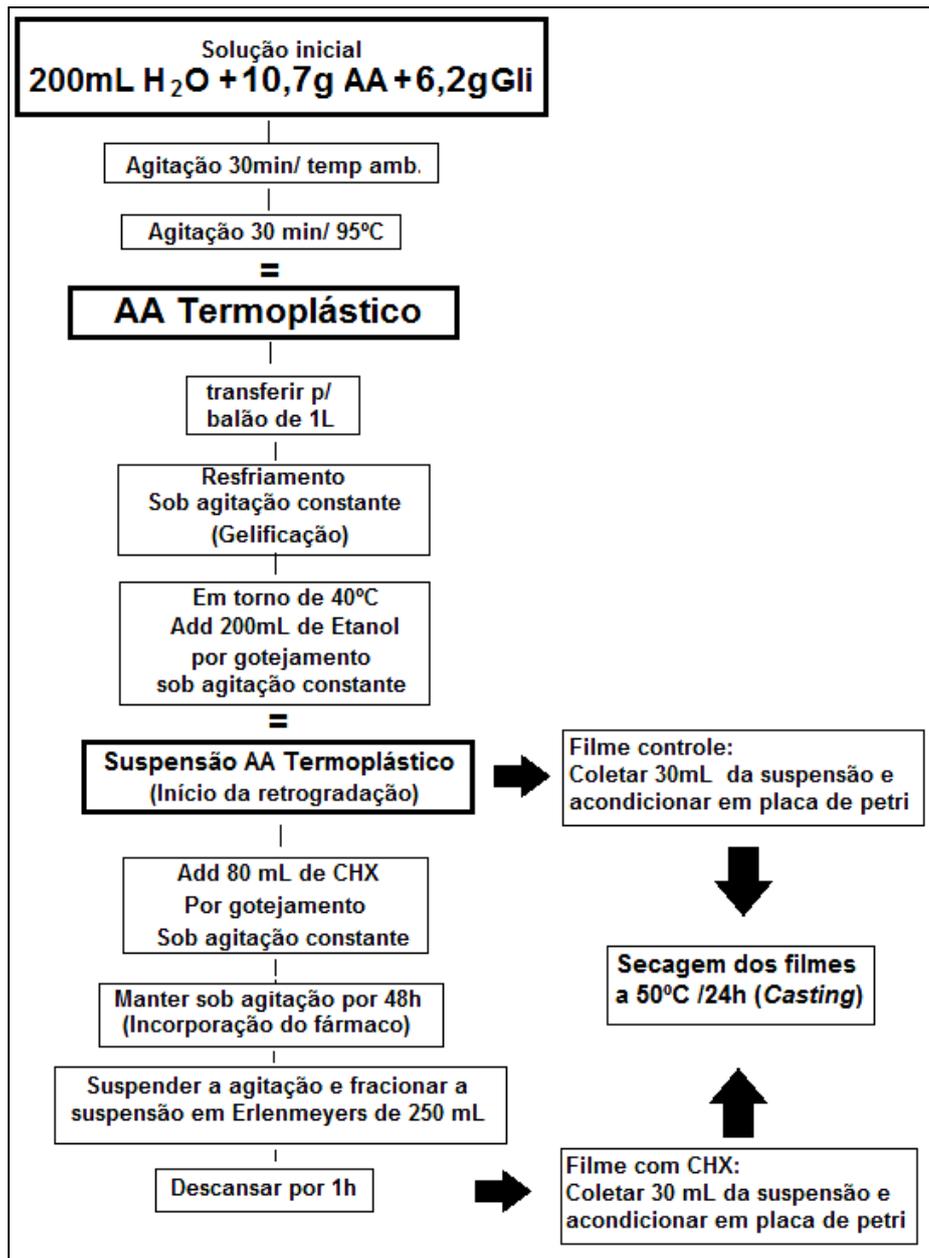


Figura 6. Etapas de fabricação dos filmes.

A aferição da espessura dos filmes foi realizada com auxílio de paquímetro digital modelo Insize (1-25 mm) com precisão de 0,001 mm. Foram realizadas 5 mensurações de espessura, por filme.

Todos os testes foram padronizados e realizados com as amostras de filme em triplicata, no tamanho 4 mm x 5 mm ou discos com diâmetro de 4 mm.

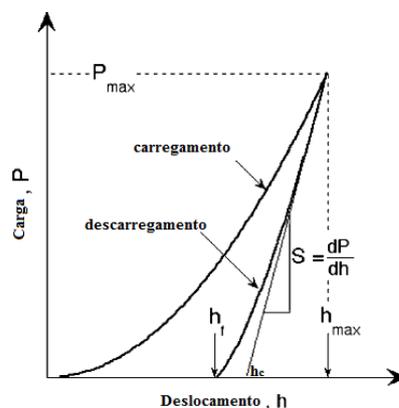
4.2. PROPRIEDADE MECÂNICA DOS FILMES

4.2.1 NANOINDENTAÇÃO

Para determinação da dureza e do módulo de elasticidade dos filmes, o método de nanoindentação instrumentada foi utilizada usando o Nanoindentador Agilent G200 (Santa Clara, EUA), que tem a resolução de deslocamento $< 0,01$ nm e resolução de força de 50 nN. Um microscópio óptico com uma ampliação de 40x acoplado ao Nanoindenter foi usado para localizar as posições de indentação na superfície da amostra.

Foi utilizado o método básico de dureza e módulo elástico com um indentador Berkovich com raio de 20nm e área da indentação calibrada com padrão de sílica, para obtenção da curva de carga e descarga (Figura7). Foram realizadas para cada amostra 10 indentações, com carga de 10 mN, em ciclo único de 15 s e pico de espera de 1 s. A razão de Poisson das amostras foi estimada em 0,3 (assumindo um polímero). Os valores e gráficos da dureza e do módulo de elasticidade foram obtidos usando o software NanoSuit v5 baseado no método de OLIVER E PHARR (2004).

Figura 7. Curva de carregamento e descarregamento utilizada para medir propriedades mecânicas dos filmes.



A partir da Figura7, a carga máxima (P_{max}), a profundidade (ou deslocamento) na carga máxima (h_{max}), a rigidez do material (S), a área de contato (sob a curva) (A), o

deslocamento residual após a descarga do indentador (h_f) e a profundidade de contato real (h_c) foram obtidas. Uma vez que a área de indentação é determinada, a dureza foi calculada usando a Equação 1, enquanto que o módulo elástico foi calculado a partir das Equações 2 e 3:

$$H = \frac{P_{\max}}{A} \quad (1)$$

$$S = \beta \frac{2}{\sqrt{\pi}} E_{\text{eff}} \sqrt{A} \quad (2)$$

$$\frac{1}{E_{\text{eff}}} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} \quad (3)$$

Onde, H é a dureza do filme, que se baseia na área de contato sob a carga. E é o modo de elasticidade, que tem relação com a área de contato (A) e a rigidez do material (S). E_{eff} se trata do módulo elástico efetivo, que leva em consideração o deslocamento elástico que podem ocorrer na amostra com módulo elástico (E), na razão de Poisson (ν), e no indentador, descrito pelas constantes elásticas E_i e ν_i . (OLIVER E PHARR, 2004).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A MEV foi realizada para visualizar a morfologia e o tamanho das partículas na superfície dos filmes. Amostras, com dimensões de 4 mm x 5 mm foram fixados em fita adesiva de carbono dupla-face, sem recobrimento. As imagens foram obtidas através do microscópio de feixe de íons focalizados FEI Helios NanoLab 650 Dual Beam da Thermo Scientific (Thermo Electron Scientific Instruments Corporation, Madison, WI, USA) do laboratório de caracterização de materiais NULAM/DIMAT no INMETRO, operando com corrente de 13pA, tensão de 700V no aumento de 6000x.

4.3.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (ATOMIC FORCE MICROSCOPY – AFM)

A AFM foi realizada para analisar o padrão de dispersão da CHX na matriz de AA através da análise no AFM JPK™ (JPK Instruments AG, Colditzstr, Berlin, Alemanha), modelo NanoWizard® 1, com a agulha NCST – 50 em *soft tapping mode* (modo intermitente), com frequência de ressonância de 160kHz e constante de mola de 7,4 N/m (Nanoworld Inovate Technology, Neuchâtel, Suíça). A varredura foi feita na frequência de oscilação livre da haste e com diferentes amplitudes, dependendo da estabilidade e do contraste obtido. O *set point* foi fixado em 20-40% da amplitude de oscilação livre. Foram realizadas três imagens em cada filme, com tamanho de 10 X 10 μm^2 e resolução de 512 X 512 pixels. As imagens foram analisadas no modo topografia (*height*) e contraste de fase (*phase*).

4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FILMES

4.4.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

O Raman foi realizado nas regiões aproximadas das caracterizações de AFM para correlacionar a composição química específica das partículas dispersas e da matriz dos filmes de AA com CHX. Os espectros foram obtidos no Microscópio Raman Confocal Witec alpha300 R operando com um laser de excitação em 785 nm, potência máxima de 50 mWe objetiva de 100X com N.A. = 0,95.

4.4.2 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para a identificação e determinação de grupos funcionais das estruturas das macromoléculas e comparações químicas dos três lotes de filmes produzidos com AA e CHX, foram realizadas análises de FTIR no Laboratório Multi-usuário de Caracterização de Materiais do PEMM/ COPPE/ UFRJ, utilizando-se espectrofotômetro de absorção no infravermelho Perkin Elmer, modelo Spectrum 100, no módulo de refletância total atenuada (ATR). Os espectros foram registrados em intervalo de 4000 – 550 cm^{-1} , com 32 scans e 4 cm^{-1} de resolução.

4.4.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A técnica de difração de raios-X foi utilizada para avaliar variação da cristalinidade nos filmes produzidos com AA e com AA/CHX. Utilizou-se o difratômetro de raios X (XRD 6000, Shimadzu, Japão), tubo Cobre (Cu) do Laboratório Multiusuário de caracterização de Materiais - PEMM/COPPE/ UFRJ. As análises das amostras foram

realizadas a temperatura ambiente no intervalo angular 2θ de 5 a 50 ° em modo de scan contínuo, operando com potência de 30kV/30 mA a uma velocidade 2 °/min.

4.5 LIBERAÇÃO DO ANTIMICROBIANO POR ESPECTROSCOPIA UV – VISÍVEL

Para avaliar a liberação da CHX, um total de nove amostras de filmes medindo 4mm x 5mm foram imersos em 200 mL de tampão fosfato (PBS) 1X estéril pH 7,4 em Erlenmeyers de 250 mL e acondicionados na estufa (Labiomédica Engenharia de laboratório, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 37°C, durante 21 dias. As medidas foram obtidas através do espectrofotômetro Evolution 600 UV-VIS (Thermo Electron Scientific Instruments Corporation, Madison, WI, USA), ajustado para gerar gráficos de absorbância, no intervalo de 210 - 400 nm. As alíquotas de 1,5mL foram coletadas e medidas nos tempos de 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 168h (7dias), 240h (10dias), 360h (15dias) e 504h (21dias), esta análise foi adaptada do protocolo de OBERMEIER e colaboradores (2014).

A solução tampão fosfato pH 7,4 10X foi preparada em 200 mL em um frasco tipo Schott com capacidade para 500 mL onde foram misturados 136,9 mM (38 g) de NaCl, 2,7 mM (1 g) de KCl, 15 mM (20,1 g) do NaH₂PO₄ e 1,5 mM (1 g) de KH₂PO₄ e adicionada água milli-Q para completar 500 mL de solução. O ajuste de pH foi feito com 3 gotas ácido clorídrico atingindo assim o pH desejado e em seguida a solução foi autoclavada a 121°C por 15min. Após esse processo, 300 mL da solução tampão 10X foi diluída para 1X em 2,7 L de água milli-Q, totalizando 3 L de solução tampão estéril 1X em um frasco tipo Schott com capacidade para 5L. O pH não precisou ser ajustado.

Para construção da curva de calibração, preparou-se uma solução inicial de 0,4 g/L de CHX20% em 10mL de solução tampão. A partir desta, foram preparadas outras cinco soluções alíquotadas com a solução inicial e completadas para 3 mL de volume final com a solução tampão, de acordo com as quantidades descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração de CHX em g/L das soluções utilizadas para construção da curva de calibração.

| Solução | Solução inicial + Tampão PBS | Concentração g/L |
|---------|------------------------------|------------------|
| 1 | 0,3 mL + 2,7 mL | 0,04 |
| 2 | 0,6 mL + 2,4 mL | 0,08 |
| 3 | 0,9 mL + 2,1 mL | 0,12 |
| 4 | 1,2 mL + 1,8 mL | 0,16 |
| 5 | 1,5 mL + 1,5 mL | 0,20 |

Todas as soluções foram preparadas em ambiente estéril e utilizando micropipetadores calibrados de 1000 µL e 200 µL (Gilson S.A., Middleton, WI, USA).

O pico de absorvância de 230nm foi utilizado para determinar as concentrações de CHX (LIMA, 2016). As concentrações das soluções, descritas na Tabela 2, quantificadas seguindo a equação $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$. (FERNANDES, 2014).

4.6 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

A atividade antimicrobiana dos filmes, contra micro-organismos presentes na cavidade oral foi avaliada em testes de disco-difusão em agar frente aos seguintes micro-organismos: *Porphyromonas gingivalis* (P.g), *Prevotella intermedia* (P.i) e *Prevotella nigrescens* (P.n), *Prevotella melaninogenica* (P.m).

Estes micro-organismos foram selecionados por estarem descritos entre os principais agentes etiológicos da DP, que fazem parte dos complexos vermelho e laranja (SOCRANSKY *et al*, 1998).

A) PREPARO DO INÓCULO

Os micro-organismos foram previamente cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) suplementado com extrato de levedura (1%), Hemina (1%) e Menadiona (1%) em condições de anaerobiose (H₂ 5 %;CO₂ 5 %;N₂ 90 %) a 37° C por 24 horas. Após este período, foi realizado um repique deste inóculo em ágar Brucella Sangue, pelo método de esgotamento e incubado nas mesmas condições de anaerobiose por período suficiente para crescimento de colônias entre 2 a 4 dias.

Para o teste de disco-difusão foi preparada, em condições de anaerobiose, uma diluição de 3 ou 4 colônias do repique já crescido, em solução salina 0,85%, seguindo o padrão de turbidez da escala de McFarland 0,5, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. A densidade correta do controle de turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro com cubeta apropriada para determinar a absorvância. A absorvância da solução padrão de McFarland a 0,5 deverá variar de 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625 nm (CLSI, 2003).

B) PREPARO DO MATERIAL

Com 48h de antecedência ao teste de disco-difusão, foram preparadas 9 placas de ágar BHI-pras (Brain Heart Infusion) e Agar Brucella Sangue, suplementados com extrato de

levedura (1%), Hemina (1%) e Menadiona (1%) em tamanho 90x15mm. Este intervalo permitiu a realização do teste de esterilidade do meio, em temperatura ambiente por 48h.

Os três lotes de filme (**L1, L2 E L3**) foram testados em cada placa com amostras medindo 4 mm de diâmetro.

Para o controle positivo, foram utilizados discos de papel estéreis, também com 4 mm de diâmetro, embebido em 5 µL de solução de digluconato de clorexidina a 2% e 0,2%.

C) TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

Dentro da câmara de anaerobiose, um swab foi embebido na solução bacteriana, semeado uniformemente na placa de BHIprás e de Brucella Sangue. Este processo foi repetido para cada bactéria (OH *et al.*, 2014; CLSI, 2003);

Em cada uma das placas semeadas foram aplicados 1 disco de cada lote do filme e 1 controle com 2% de CHX e 1 controle com 0,2% de CHX de acordo com o esquema ilustrado na Figura 7.

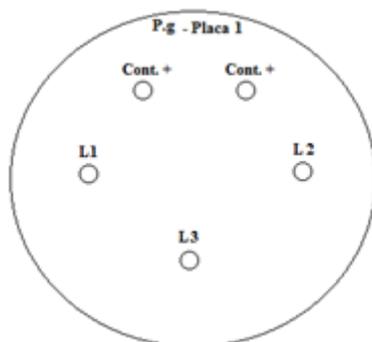


Figura 7. Esquema de organização do teste de disco-difusão

Os testes foram realizados em triplicata, para cada bactéria, totalizando 24 placas.

As placas foram incubadas a 37° C por 10 dias em condições de anaerobiose. Os

resultados foram avaliados através da aferição dos halos formados de cada placa. Para os valores finais, as medidas das triplicatas de cada lote, foram feitas suas respectivas médias e desvios padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESCOLHA DO FILME PILOTO

O amido foi escolhido para fabricação dos filmes deste trabalho por ser um polímero natural, biodegradável com capacidade de formar filmes a partir de processos simples como de gelatinização, além do seu baixo custo. Em trabalhos anteriores, a produção do dispositivo de LCA teve como partida materiais poliméricos que não são totalmente naturais, como o polietilenoglicol com gelatina (LIMA, 2016) e gelatina com glutaraldeído (STEINBERG *et al.*, 1990,) que passam por processos mais complexos e com muitas etapas para produção de filme ou partículas incorporadas de CHX quando comparados ao processo utilizado no presente estudo. Os processos de gelatinização, precipitação e *casting* têm a vantagem de formar filmes com partículas dispersas de maneira muito mais simples.

A quantidade ideal da suspensão de amido termoplástico com CHX em placa foi determinada a partir da observação na variação da morfologia dos filmes formados quando depositada 7 mL, 30 mL e 40 mL da suspensão. Verificou-se que, nas placas com 7 mL de suspensão, agitadas por 24 e 48h, não houve volume suficiente para formação de um filme contínuo (Figura 8 A). Na placa com 40 mL de suspensão agitada por 24 e 48h, os filmes formados eram muito espessos ($> 0.5\text{mm}$) (Figura 8 B). Observou-se ainda que o filme com 30 mL de suspensão, agitado por 24h, não foi resistente o suficiente, apresentando grande maleabilidade e ausência de rigidez, o que inviabilizaria a aplicação proposta, isto é, a inserção na bolsa peridontal (BP)(Figura 8 C).

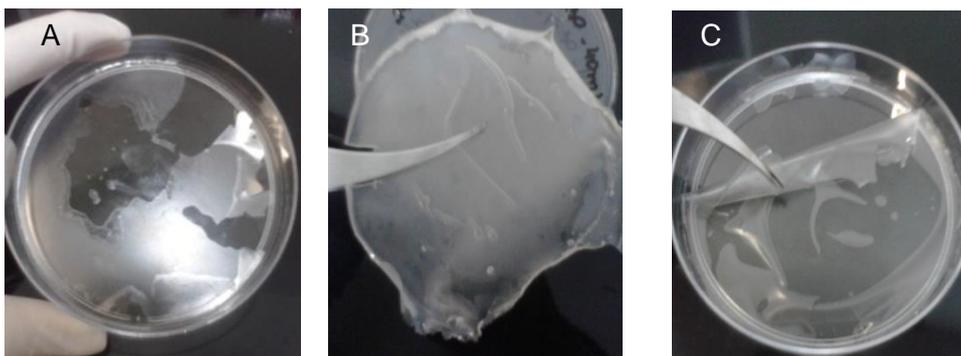


Figura 8. Observação das morfologias dos filmes em relação a quantidade de suspensão de amido termoplástico com CHX de 7 mL(A), 40 mL(B) e 30 mL agitado por 24 h (C).

Os filmes contendo 30 mL de suspensão de amido termoplástico e CHX, agitados por 48 horas, apresentaram elasticidade e dureza que se parecem ser adequadas para a aplicação proposta. Estes filmes apresentaram morfologia translúcida com espessura média de 0,35 mm e massa média de 2,6 g quando produzidos em placas de 90 mm de diâmetro, com uma densidade de 1,17 g/cm³(Figura 9 A) e resistência a manipulação e ao corte (Figura 9 B e C). Após a definição do protocolo para produção dos filmes, em estudo piloto, o processo de fabricação foi repetido por três vezes, com a finalidade de demonstrar a reprodutibilidade do método.

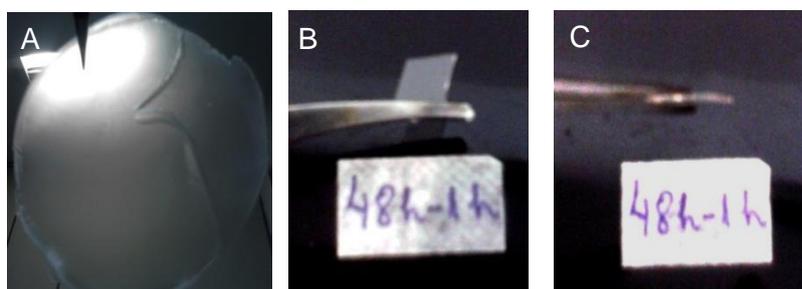


Figura 9. Filme piloto contendo 30mL de suspensão de amido termoplástico com CHX(A) e seu corte (B e C), agitado por 48 horas, sedimentado por 1 hora e seco a 50°C por 24 horas.

5.2 NANOINDENTAÇÃO

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por nanoindentação a fim de determinar a dureza e o módulo de elasticidade dos filmes com e sem CHX. Com o auxílio do microscópio óptico acoplado ao equipamento, foi possível visualizar a superfície de cada filme para marcação da posição da indentação. A partir das curvas de carregamento/descarregamento e com auxílio do software NanoSuite v5 foram calculados os seguintes parâmetros: a profundidade de penetração máxima de carga, a dureza e o módulo de elasticidade das amostras. A Tabela 3 mostra a variação da profundidade de penetração da ponta no filme controle em relação aos filmes com CHX, suas respectivas médias e desvios padrão para uma carga máxima de 10 mN. A partir destes dados obteve-se a dureza e o módulo elástico dos filmes (Tabela 4).

Tabela 3. Faixa de profundidade de indentação e suas respectivas médias e desvio padrão do filme controle e os três lotes com CHX.

| Lotes | Faixa de profundidade (μm) | Média (μm) | D.P. |
|----------|---|-------------------------|------|
| Controle | 1,60 – 2,27 | 1,92 | 0,25 |
| 1 | 3,45 – 4,28 | 3,90 | 0,22 |
| 2 | 4,47 – 5,87 | 5,24 | 0,47 |
| 3 | 3,12 – 4,20 | 3,75 | 0,10 |

Tabela 4. Médias e desvios padrão de dureza e módulo elástico do filme controle e dos três lotes de filmes com CHX.

| Lotes | Dureza (MPa) | D.P. | Mód. Elástico (GPa) | D.P. |
|----------|--------------|------|---------------------|------|
| Controle | 158 | 40 | 2,31 | 0,15 |
| 1 | 32 | 4 | 1,22 | 0,12 |
| 2 | 18 | 4 | 0,82 | 0,13 |
| 3 | 35 | 6 | 1,48 | 0,21 |

O filme controle mostrou maior dureza e rigidez em relação ao filme contendo CHX. Uma explicação para diferença de dureza e módulo elástico com e sem CHX, pode ser pelo fato de que a amilose apresenta alta tendência de interação através de ligações de hidrogênio, formando filmes rígidos como no caso do filme controle, o que concorda com o trabalho de ESCAMILLA-GARCÍA e colaboradores (2017), onde os filmes de amido termoplástico, mais finos, modificados com quitosana, apresentaram dureza e módulo de elasticidade menores (com dureza em torno de $7,0 \text{ MPa} \pm 0,7$ e módulo de elasticidade em torno de $0,44 \pm 0,3 \text{ GPa}$) em relação aos filmes de amido termoplástico, que se apresentaram mais rígidos (com dureza em torno de $180 \pm 10 \text{ MPa}$ e módulo de elasticidade em torno de $3,0 \pm 0,15 \text{ GPa}$).

Com a adição de CHX, pode ter ocorrido um efeito plastificante adicional, com o aumento da mobilidade das cadeias do amido, não permitindo o seu rearranjo durante o processo de secagem do filme, reduzindo sua cristalinidade, o que concorda com um estudo de DIEZ-PASCUAL e colaboradores (2015), onde eles estabelecem a correlação das propriedades mecânicas e a cristalinidade de polímeros, mostrando que materiais mais amorfos exibem baixa dureza em relação a polímeros com maior cristalinidade, o que será apresentado mais adiante nos resultados de DRX.

Na Figura 10 é possível observar nas curvas de nanoindentação que a do filme controle se apresentou com maior inclinação em comparação aos filmes com CHX. Segundo a teoria de OLIVER & PHARR (2004), quanto mais inclinada é a curva de descarregamento, maior é a rigidez do material. No estudo de KLAPPERICH e colaboradores (2001), eles observam a variação nos gráficos de nanoindentação testando diferentes tipos de polímeros, apresentando inclinações variadas, concordando com os resultados do presente estudo.

Na micrografia do filme controle observou-se a superfície menos irregular com um aumento de 100X, sendo possível visualizar as marcas do indentador. Os filmes com CHX apresentam micrografias no aumento de 40X para observar uma área maior de irregularidade dos filmes. As análises do lote 2 apresentaram variação em relação as outras duas amostras dos lotes 1 e 3, o que pode ser devido a diferença das zonas de transição entre fases em materiais com partes cristalinas e partes amorfas, especificamente em sua superfície ou interface, em intervalos de sensibilidade muito baixos, o que concorda com ESCAMILA-GARCÍA e colaboradores (2017) e igualmente com KLAPPERICH e colaboradores (2001) que também encontraram irregularidades.

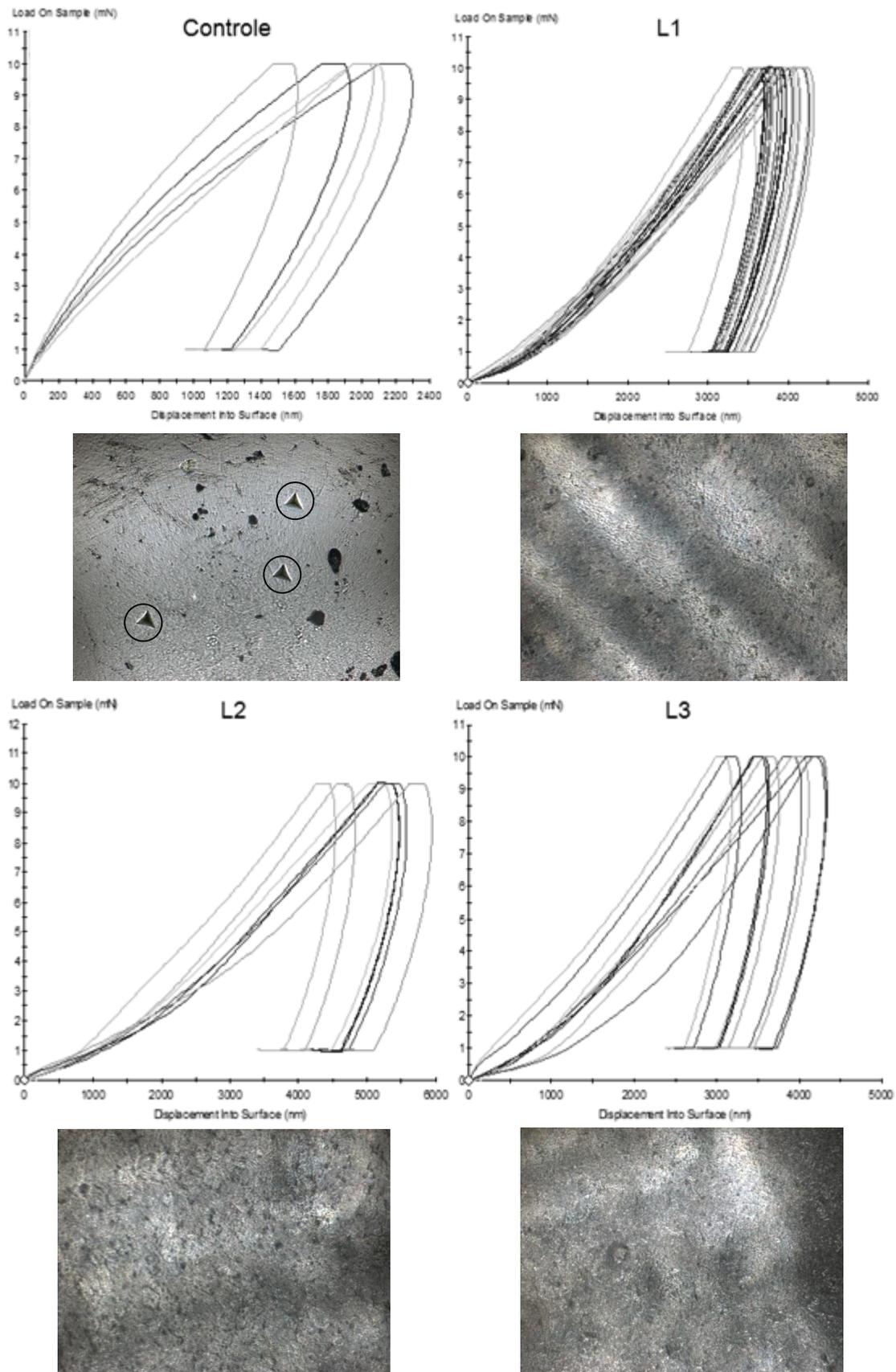


Figura 10. Curvas convencionais de nanoindentação e suas respectivas micrografias dos filmes controle (com as marcas de indentação em aumento de 100X), lotes 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) com aumento de 40X.

Obter as propriedades mecânicas dos filmes foi um desafio devido às irregularidades de superfície tanto para o filme controle quanto para os filmes com CHX. Além disso, a espessura dos filmes e sua sensibilidade a temperatura não permitiu serem realizados ensaios de tração ou DMA, que geralmente são técnicas escolhidas na maioria dos trabalhos para determinar as propriedades mecânicas dos materiais poliméricos. A nanoindentação vem sendo usada recentemente e ainda não há muitas publicações no que se refere a avaliação das propriedades de amido termoplástico.

Inicialmente, os filmes com CHX haviam sido escolhidos para este estudo devido à sua facilidade de manipulação com a pinça, sem quebrar ou dobrar. O filme controle se mostrou quebradiço ao corte e sem resistência e firmeza ao ser manipulado. Isso pôde ser confirmado com os resultados dos testes de nanoindentação. Além disso, foi possível demonstrar que não foi preciso utilizar agentes adicionais na fabricação dos filmes com CHX, como o exemplo do glutaraldeído, que é usado para reticular a gelatina no Periochip® (SOSKOLNE *et al.*, 1998), para obter as propriedades mecânicas suficientes com a finalidade de manipulação dos filmes e posteriores tentativas de inserção na bolsa periodontal.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foram analisados os filmes com CHX agitados por 48h e um filme controle, produzido de uma alíquota da suspensão gelatinizada que foi agitada aproximadamente por 4 horas, até a adição de CHX, para verificação das partículas dispersas na superfície.

Comparando a superfície dos filmes na Figura 11, é possível observar que todos os filmes apresentaram uma superfície irregular, além das partículas em formato esférico muito pequenas (entre 40 – 500 nm) no filme controle e maiores nos filmes com CHX (entre 2 – 9 μm), com uma menor quantidade de partículas dispersas na matriz.

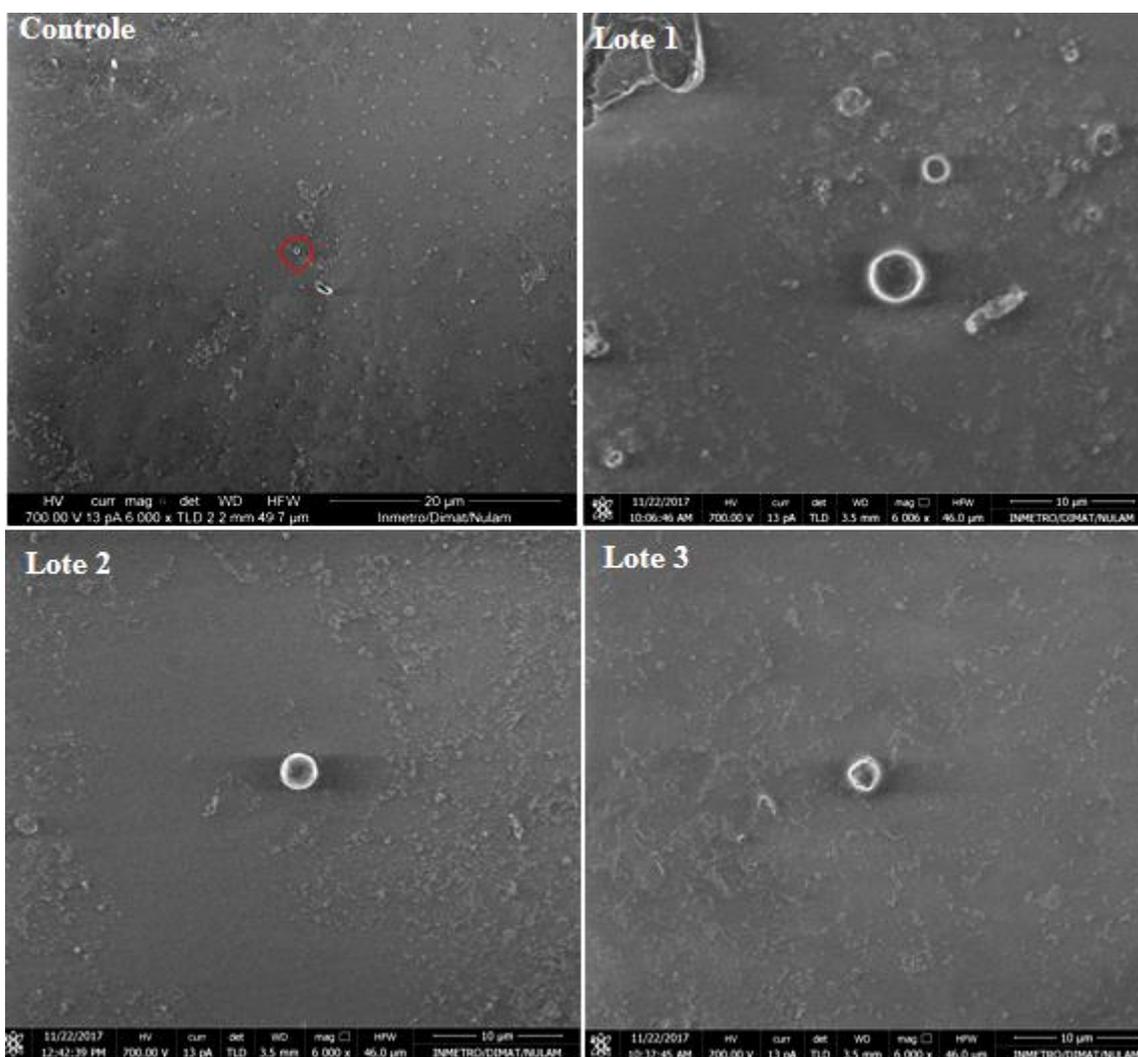


Figura 11. Micrografias dos filmes controle e com CHX no aumento de 6000X.

A irregularidade das superfícies dos filmes pode ser explicada porque, quando o etanol é gotejado lentamente na solução de amido gelatinizado, partículas de tamanhos nano e micrométrico precipitam. As partículas menores terão a tendência de ficar no sobrenadante da solução, apesar de algumas ainda serem carregadas para o fundo juntamente com o amido gelatinizado. Assim, o fundo que foi aliquoteado na placa de petri conterá tanto amido gelatinizado quanto partículas. Quando ocorre a evaporação dos solventes na secagem dos filmes, observa-se a formação de uma matriz completamente gelatinizada composta pelo soluto e partículas de diferentes tamanhos, o que concorda com o trabalho de MA e colaboradores (2008), que produziu filmes de amido termoplástico com ácido ascórbico com o ativo e foi observada a formação de partículas arredondadas de tamanhos variados entre 50-500 nm, com um tempo de agitação em torno de 4h.

Como foi comparado, o tamanho das partículas formadas no filme controle, é menor em relação as partículas dos filmes com CHX. É possível observar na Figura 12 em um maior aumento (100.000X), que permite visualizar que o padrão morfológico das partículas do filme controle é mantido nos filmes dos lotes com CHX.

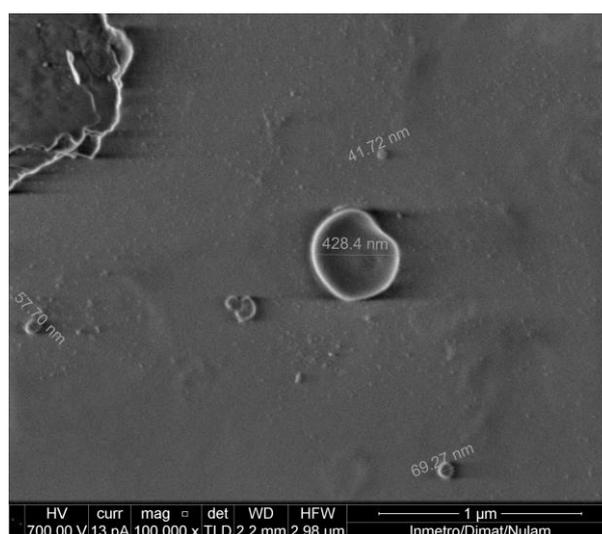


Figura 12. Micrografia do filme controle no aumento de 100.000X para observação da morfologia das partículas.

Esta diferença de tamanho das partículas nos filmes com CHX, pode estar associado à incorporação do antimicrobiano à partícula ou ainda ao tempo de agitação, além da ação do etanol, que se liga quimicamente na água através das hidroxilas de acordo com MA e colaboradores (2008), permitindo maior disponibilidade de amido e CHX no meio para formarem as partículas e também demonstrando a reprodutibilidade do método de fabricação.

No trabalho de LIMA (2016) foram produzidas micropartículas de base polimérica (Polietilenoglicol e gelatina) com incorporação de CHX através da formação de filmes em duas etapas e trituração dos mesmos ao final de cada uma delas, mostrando que partículas muito maiores são formadas no processo, com tamanhos em torno de 100 μm . Com os resultados do presente trabalho, é possível dizer que o processo de fabricação dos filmes em menos etapas e mantendo a matriz polimérica em filme, permite a formação de partículas menores o que talvez possa ser um melhoramento em relação ao potencial de liberação do fármaco.

MUSIAL e colaboradores (2010) produziram um hidrogel com partículas de poli (ácido acrílico), incorporadas com CHX em meio aquoso, sob agitação constante por 48h à 20°C, com o propósito de liberação controlada de antimicrobiano. As partículas apresentaram formato esférico com diâmetro de 2–10 μm dispersas na superfície da matriz do hidrogel. Estes formatos e tamanhos são semelhantes aos das partículas formadas na superfície dos filmes do presente estudo. É possível que o tempo de agitação para formação de partículas e incorporação do fármaco, interfira na morfologia e no diâmetro das partículas formadas.

5.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (ATOMIC FORCE MICROSCOPY – AFM)

As imagens de topografia obtidas por AFM permitiram observar a dispersão da matriz, das partículas formadas e a variação da fase na presença da CHX. Foram analisadas amostras dos filmes com e sem CHX. A matriz de AA termoplástico é utilizada como controle. Na Figura 13, pode-se observar o filme controle sem adição de CHX em contraste de fase e topografia, com aumento de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$,

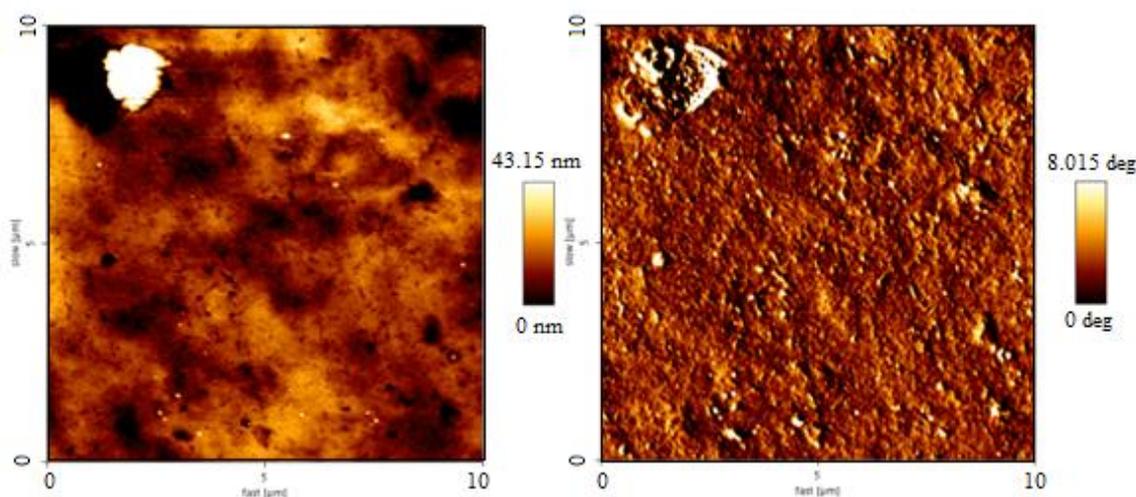


Figura 13. Imagens de topografia e contraste de fase da superfície do filme de AA termoplástico sem adição de CHX (filme controle).

O filme controle apresentou superfície com baixa rugosidade nas imagens de topografia, mostrada pela escala de contraste lateral. Em relação à fase, pode-se observar uma boa miscibilidade do AA termoplástico. Também é possível observar pequenas áreas mais claras, que podem corresponder as partículas que contém uma maior quantidade de glicerol, o que também é reportado nos resultados de THIRÉ (2003) que fabricou filmes de amido termoplástico com concentrações diferentes de amido sem precipitação (5 mg, 20 mg e 90 mg) observando um padrão aproximado em relação à rugosidade (entre 24 e

40 nm) e a mesma variação nas imagens de contraste de fase, com pequenos pontos de irregularidades na superfície e partículas muito pequenas.

A Figura 14 mostra os filmes de amido termoplástico incorporado com a CHX, onde observa-se a evidente variação na topografia e no contraste de fase em relação ao filme controle. É possível visualizar também partículas formadas contendo CHX, com formatos arredondados e dispersas na matriz, apresentando uma heterogeneidade em relação ao controle. Estas partículas se apresentam com tamanhos mais regulares e melhores dispersas na matriz. No trabalho de WOOD e colaboradores (2014), que produzem uma matriz polimérica de etileno acetato de vinila (EVA) com nanopartículas de hexametáfosfato de CHX com tamanhos em torno de 40 nm que foram observadas por AFM demonstrando um padrão semelhante ao dos resultados do presente estudo, com partículas com formatos arredondados, que formavam aglomerados na superfície dos filmes, o que pode confirmar o padrão da incorporação de CHX nas partículas formadas nas imagens de contraste de fase.

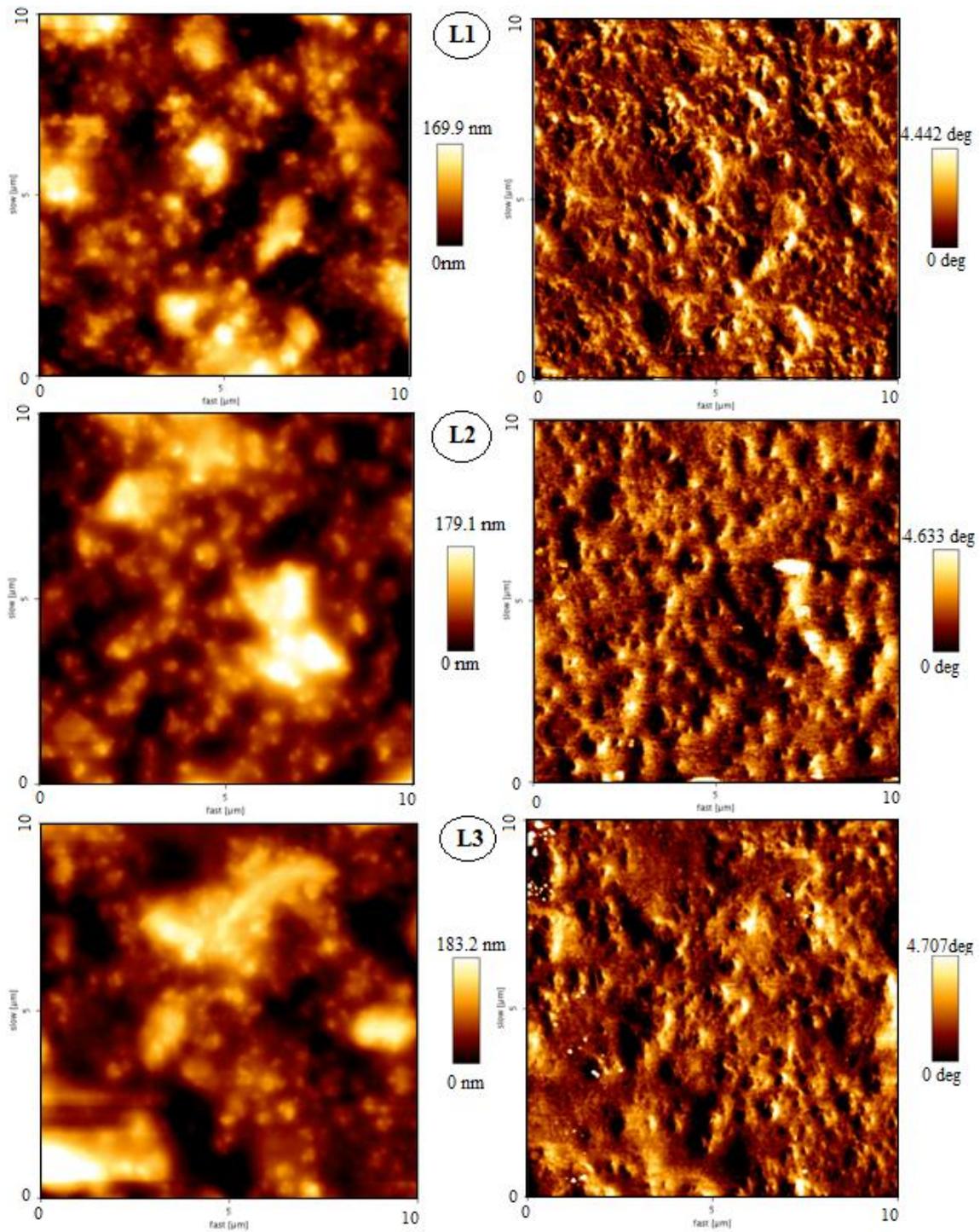


Figura 14. Imagens de topografia e contraste de fase da superfície dos 3 lotes dos filmes de amido termoplástico com CHX no aumento de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$.

5.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN

O Raman foi correlacionado com a área aproximada das amostras analisadas por AFM. Desta forma, foi possível avaliar os componentes dispersos na superfície da matriz e identificar a presença de AA no filme controle, como mostram a Figura 15.

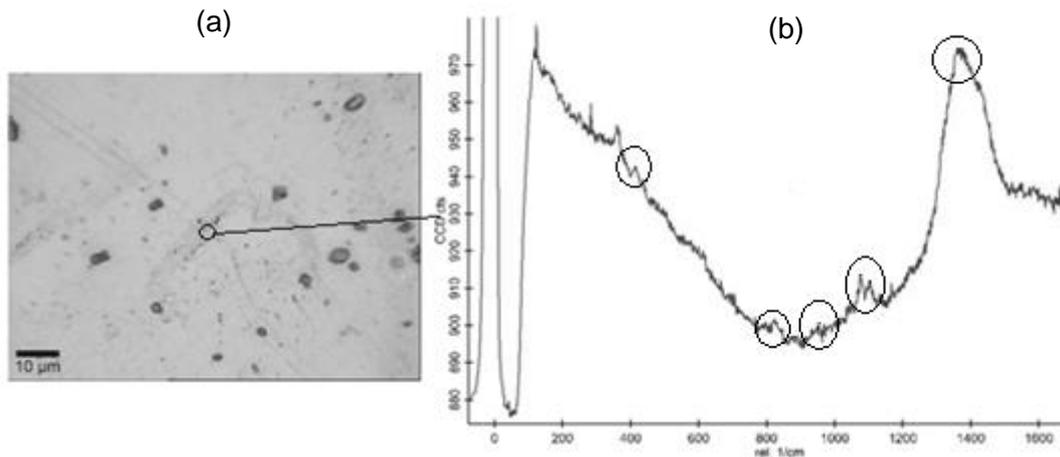


Figura 15. Micrografia da região analisada do filme controle (a) e seu espectro Raman com marcação dos picos característicos de AA (b).

Das vibrações características do AA, pode-se observar na região entre 1380 e 1400 cm^{-1} o acoplamento do C-C-H e deformações nas ligações de C-OH, que são geralmente atribuídas a polímeros, e foi semelhante ao resultado encontrado no trabalho de MIR e colaboradores (2016). Na região entre 1200 - 800 cm^{-1} são muito característicos os estiramentos de C-O, C-C e deformações nas ligações de C-O-C, o que se refere às ligações do anel glicosídico das cadeias de amilose e amilopectina. Esta região é também conhecida como a impressão digital ou região anomérica. As vibrações originadas das ligações α -1,4 podem ser encontradas na região entre 920-960- cm^{-1} sendo atribuídas à amilose, o que concorda com os resultados de HOLDER (2012) e ALMEIDA e colaboradores (2010). As vibrações na faixa em torno de 800 - 400 cm^{-1} , foram atribuídas

as deformações das ligações de C-O-C e C-C-C, com forte acoplamento entre as ligações devido à deformação do anel glicosídico (ALMEIDA *et al.*, 2010; MIR *et al.*, 2016).

No espectro Raman dos filmes com CHX, apresentados na Figura 16, surge uma variação das vibrações na faixa de 1564 a 1608 cm^{-1} , que podem ser atribuídas à protonação da base de CHX por conta do grande número de grupos carboxílicos na suspensão polimérica que continha etanol, o que também pode estar relacionado ao fato de a CHX ter sua solubilidade diminuída, devido a alguma variação de pH do meio (JONES *et al.*, 2000), se tornando mais ácido durante o processo de fabricação dos filmes ou quando a suspensão foi acondicionada nas placas para a etapa de *casting*. Isto pode descrever a mudança de fase nas imagens de AFM, onde a CHX fica evidente na superfície das partículas formadas, mas que também se encontra presente em outras áreas do filme, devido a semelhança entre todos os espectros analisados. Esta ação do etanol também pode ter influenciado em relação à maior concentração de CHX livre na superfície do filme, mantendo a intensidade do pico referente a ela em todas as análises.

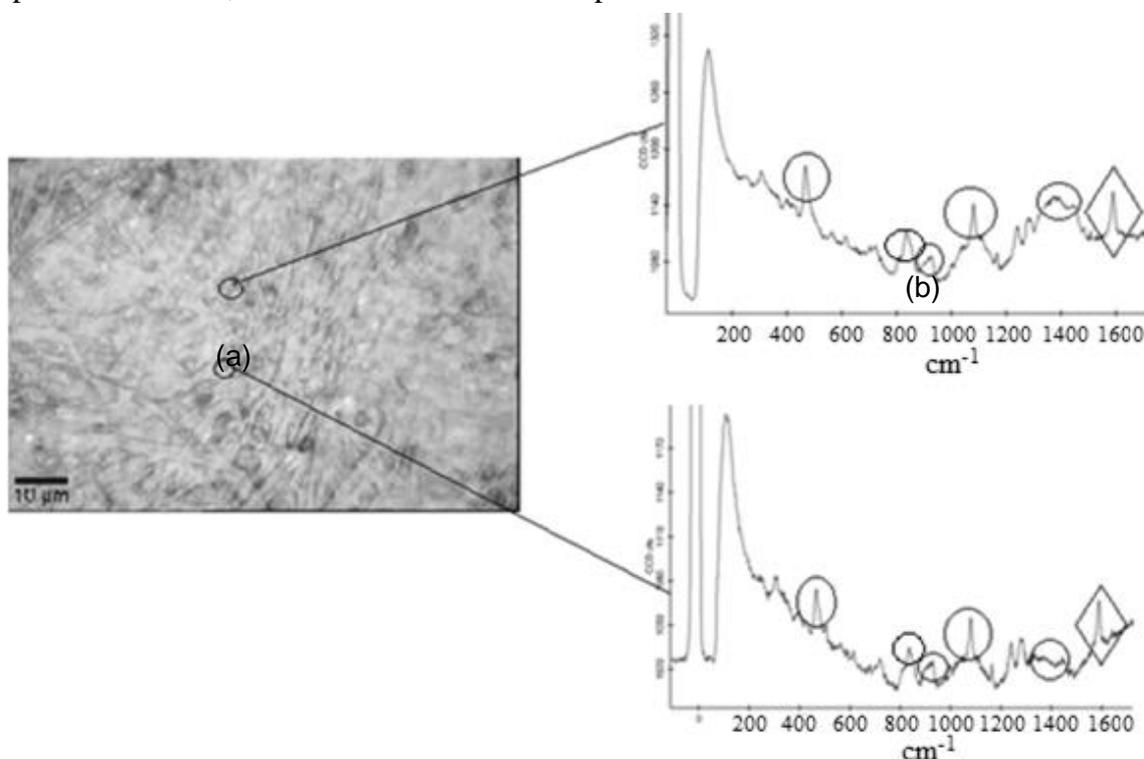


Figura 16. Micrografia do filme com CHX (a) e seu espectro Raman mostrando a variação de intensidade dos picos característicos de AA (O) e CHX (◇) (b).

5.6 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A avaliação da miscibilidade dos componentes nos filmes pôde ser realizada verificando os deslocamentos das bandas de absorção no infravermelho em relação ao número de onda, devido às interações entre grupos funcionais. Nestas análises, houve a tentativa de observar se houve a degradação dos componentes dos filmes testados.

Na Figura 17 é possível observar a alteração quando o filme é processado e adicionado CHX. Para o filme controle (sem CHX), observa-se uma banda larga na região de 3000 - 3500 cm^{-1} que é referente às vibrações de deformações dos grupos hidroxila associados às ligações de hidrogênio inter e intramoleculares.

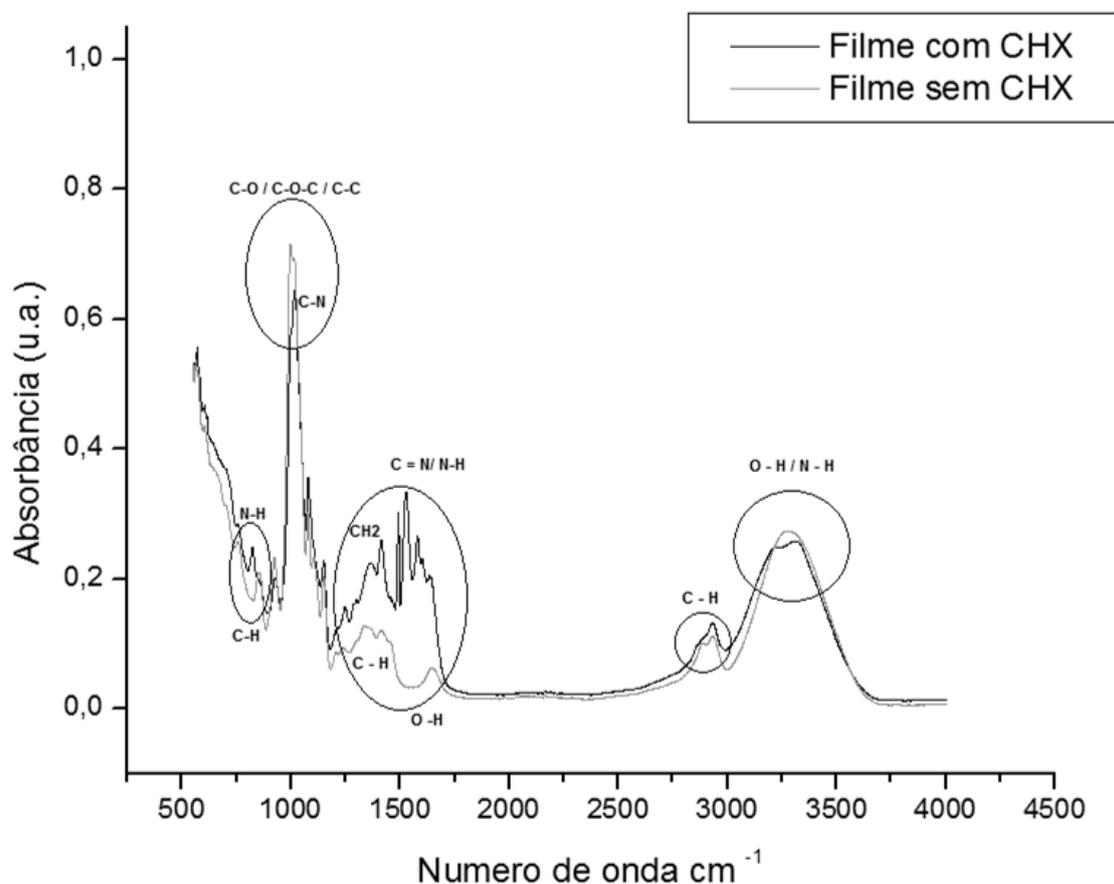


Figura 17. Espectro na região do infravermelho do filme controle e com CHX.

Nos filmes com CHX mostrou-se nas bandas na faixa de 3220 cm^{-1} e 3330 cm^{-1} que são referentes aos estiramentos de N-H da CHX que se sobrepuseram às bandas representativas dos grupos hidroxilas que mostra a incorporação da CHX à matriz do AA termoplástico.

Na região entre 2825 cm^{-1} e 2980 cm^{-1} apresentam as bandas correspondentes ao estiramento assimétrico C-H no AA termoplástico. As bandas em 2945 cm^{-1} estão relacionadas às vibrações de deformação assimétrica do CH_2 da CHX.

Em 1645 cm^{-1} a banda é atribuída à deformação angular de O-H no amido termoplástico, o que deixa de ser observada na amostra do filme com CHX que apresenta bandas em torno de 1.660 cm^{-1} e 1.590 cm^{-1} específicas para aromáticos, C=N e estiramento de N-H, do grupo amina, que também mostram a incorporação da CHX a matriz.

As bandas $1415 - 1350\text{ cm}^{-1}$ fazem referência à deformação angular da ligação C-H, referente ao amido. Em 1330 cm^{-1} está relacionada às vibrações de deformação assimétrica de CH_2 referente a CHX.

A banda em 1090 cm^{-1} corresponde à ligação C-N e ao estiramento do cloro ligado ao grupamento aromático da CHX; em 1155 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo C-O-C proveniente do grupo éster da CHX; As bandas entre $900 - 1150\text{ cm}^{-1}$ são relacionadas ao estiramento das ligações C-O, C-C e ligações glicosídicas C-O-C correspondentes aos grupos funcionais de amido e glicerol. Estas bandas observadas são encontradas também nos trabalhos de MENDES e colaboradores (2015) e CRISTANCHO (2017) onde ambos analisam filmes de amido termoplástico variando as concentrações de amido entre 25 g e 35 g. Em relação às bandas correspondentes a presença de CHX nos filmes, os resultados são semelhantes aos trabalhos de PRIYADARSHINI e colaboradores (2016) que comparou os espectros de CHX pura com

micropartículas de hidróxido de cálcio incorporado com CHX e de LIMA (2016) que analisou a presença de CHX em partículas poliméricas de polietilenoglicol incorporadas com CHX.

As bandas em torno de 850 cm^{-1} são correspondentes a deformação das ligações de C–H de D-glicose do amido termoplástico que é sobreposta pela banda 825 cm^{-1} no filme com CHX que corresponde as vibrações de N-H, estas bandas também são observadas nos trabalhos de TOKAJUK e colaboradores (2017) e PRIYADARSHINI (2016).

Com esse resultado observa-se que a sobreposição das várias bandas encontradas, semelhantes aos resultados dos trabalhos citados, pode ser devido à maior concentração de CHX em relação ao amido na superfície dos filmes, o que interfere na intensidade dos picos referentes ao amido, havendo uma redução dos mesmos. Assim não sendo possível confirmar se houve interação ou degradação do material nas bandas apresentadas, apenas sendo determinada a presença dos componentes de acordo com a concentração apresentada na superfície dos filmes.

5.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Os difratogramas de Raios X foram obtidos com a finalidade de comparar a perda da cristalinidade do AA puro, pelo processamento do AA termoplástico e a adição de CHX. Estes resultados são diretamente relacionados às propriedades mecânicas dos filmes analisados. Quanto mais cristalino, maior a organização das cadeias e menor o teor de água. De acordo com a Figura 18, observa-se que o AA de milho regular (puro), que contém 27% de amilose e 73% de amilopectina (conforme informado pelo fabricante) apresenta cristalinidade tipo A, que é típica de cereais, representada pelos picos em 2θ iguais a 15° , $17,7^{\circ}$ (pico duplo), $19,7^{\circ}$ e $23,2^{\circ}$, o que também é observado nas amostras de amido puro no trabalho de CRISTANCHO (2017).

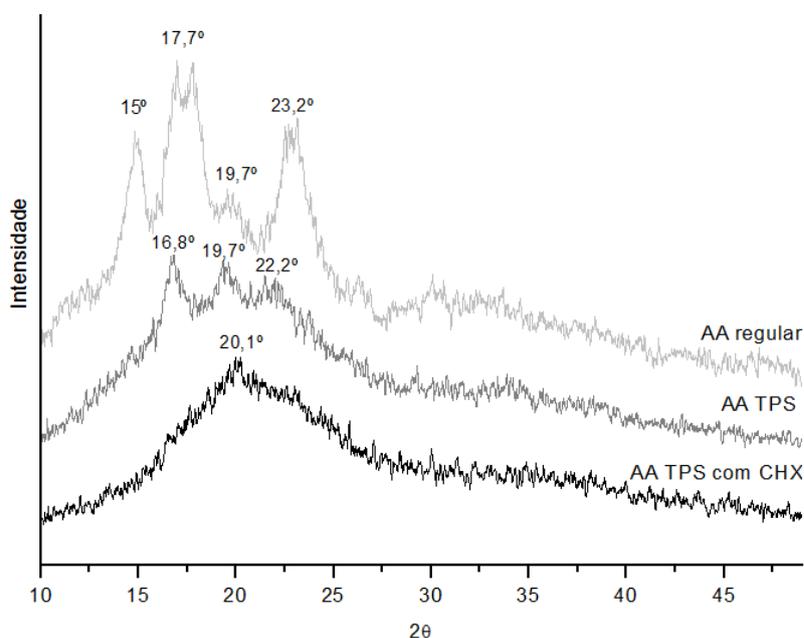


Figura 18. Difratograma de Raios X dos filmes de amido termoplástico em comparação ao amido regular puro.

Após a primeira etapa de gelatinização do amido com glicerol e adição do etanol é evidente a alteração na cristalinidade do tipo A para o tipo B, representada pelo pico

característico em 2θ igual a $16,8^\circ$ e cristalinidade do tipo V_H que é característica nos picos em 2θ iguais a $19,7^\circ$ e $22,2^\circ$, devido a interação do plastificante (glicerol) entre as cadeias de amilose, que formam estruturas helicoidais únicas. Além disso, o processo de formação das partículas de amido após a adição de etanol, que marca o início do processo de retrogradação, pode ter contribuído para a modificação da cristalinidade tipo A. Estes padrões também são reportados nos resultados de THIRÉ (2003) onde observou-se picos de cristalinidade semelhantes em relação ao filme de amido termoplástico envelhecido. No trabalho de CRISTANCHO (2017) também são observados picos de cristalinidade semelhantes aos do presente estudo, em blendas de amido termoplástico comparado ao amido puro.

Os filmes de AA termoplástico adicionados de CHX apresentaram a perda praticamente completa da cristalinidade. Este padrão amorfo observado indica que a CHX pode ter atuado também como plastificante no material, reduzindo sua resistência mecânica e aumentando seu potencial de deformação elástica, como mostrado nos resultados de nanoindentação. No trabalho de LIMA (2016), nos resultados de DRX também foi possível observar a perda de cristalinidade comparando o polietilenoglicol puro e quando é adicionado CHX e gelatina, em diferentes concentrações, na produção de partículas carreadoras de fármaco.

Além disso, a presença da CHX pode ser caracterizada pelo deslocamento de um pico de baixa intensidade em 2θ igual a $20,1^\circ$, que é citado como referência no estudo de PRIYADARSHINI e colaboradores (2016), ou também pode ser considerada como a redução de cristalinidade tipo V_H . Este padrão da perda de cristalinidade é semelhante aos dos filmes produzidos por THIRE (2003).

5.8 LIBERAÇÃO DO ANTIMICROBIANO POR ESPECTROSCOPIA UV – VISÍVEL

O potencial de liberação de CHX dos filmes no formato do dispositivo foi realizado para determinar a concentração liberada em função do tempo, através das medidas de absorbância obtidas por espectroscopia de UV-visível, no comprimento de onda de 230nm que é característico da presença de CHX.

Para determinação da concentração, foi construída uma curva analítica a partir de soluções padronizadas descritas na metodologia, que foram analisadas no espectrofotômetro no mesmo comprimento de onda. A relação entre a concentração e absorbância confirma-se linear, de acordo com os resultados dos coeficientes do modelo de regressão linear fornecidos pelo programa VISION *pro*TM Software, que forneceu a equação $A = 5,05715 \times C + 0,00183$, onde, A é absorbância e C é a concentração de CHX (g/L), com erro residual de 0,00009 e com um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,999544, como mostrado na Figura 19.

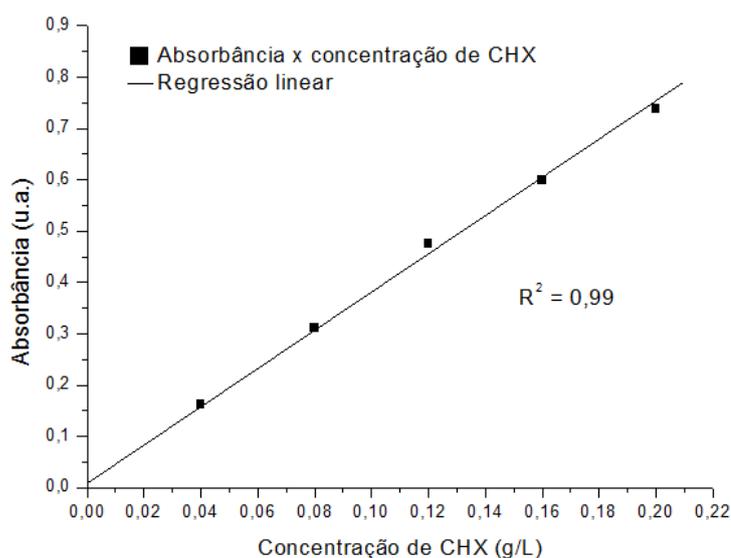


Figura 19. Curva de Calibração que relaciona a concentração de clorexidina em g/L com a absorbância no comprimento de onda de 230nm.

As soluções diluídas para construção da curva tiveram as seguintes concentrações: 0,04 g/L (solução 1), 0,08 g/L (solução 2), 0,12 g/L (solução 3), 0,16g/L (Solução 4) e 0,20 g/L (solução 5). Estas foram mantidas sob condições estéreis até o momento da análise.

Os perfis de liberação dos lotes 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) foram analisados em triplicata até 21 dias de liberação e os valores foram calculados a partir das médias de concentração de cada lote. Foi possível observar que no período de 24 horas houve uma liberação significativa na média de 0,13 g/L da quantidade de CHX em relação aos períodos seguintes. Este comportamento se mostrou semelhante ao do Periochip®, entre as primeiras 24 h e 48 h (PURI *et al.*, 2013). Nas amostras deste estudo, houve uma liberação média de 0,02 g/L até 48 h, e continuou liberando em menor quantidade, por período, em torno de 0,01 g/L, no período de 72h até o décimo dia (240 h). A partir das 240h (10 dias) iniciou-se uma tendência à estabilização, liberando uma quantidade em torno de 0,007g/L CHX até os 21 dias, como mostrado na Figura 20.

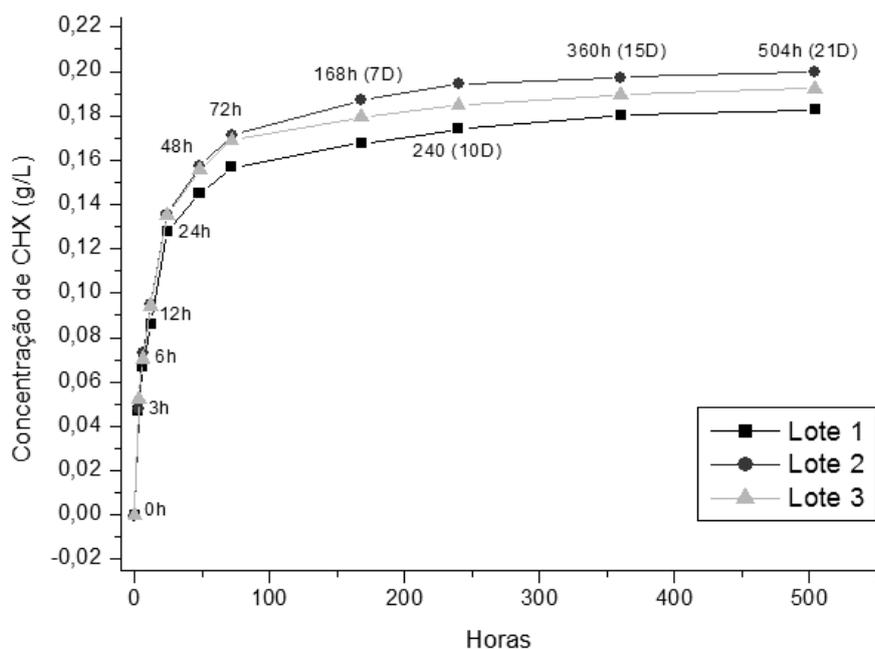


Figura 20. Perfil de liberação dos três lotes de filmes de AA termoplástico com CHX.

As médias e os desvios padrão das concentrações em cada lote são observadas em relação ao tempo e estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Média e desvios padrão da concentração de CHX encontrada nos 3 lotes dos filmes.

| Tempo | L1 | | L2 | | L3 | |
|---------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| | Média | D.P. | Média | D.P. | Média | D.P. |
| 3 h | 0,0470 g/L | 0,005 | 0,0481 g/L | 0,005 | 0,0522 g/L | 0,006 |
| 6 h | 0,0669 g/L | 0,005 | 0,0729 g/L | 0,005 | 0,0705 g/L | 0,006 |
| 12 h | 0,0861 g/L | 0,008 | 0,0948 g/L | 0,007 | 0,0943 g/L | 0,007 |
| 24 h | 0,1280 g/L | 0,009 | 0,1357 g/L | 0,008 | 0,1352 g/L | 0,009 |
| 48 h | 0,1450 g/L | 0,01 | 0,1572 g/L | 0,009 | 0,1555 g/L | 0,009 |
| 72 h | 0,1566 g/L | 0,01 | 0,1715 g/L | 0,01 | 0,1689 g/L | 0,01 |
| 168 h (7 D) | 0,1676 g/L | 0,01 | 0,1870 g/L | 0,01 | 0,1794 g/L | 0,01 |
| 240 h (10 D) | 0,1740 g/L | 0,01 | 0,1942 g/L | 0,01 | 0,1851 g/L | 0,01 |
| 360 h (15 D) | 0,1801 g/L | 0,01 | 0,1973 g/L | 0,01 | 0,1895 g/L | 0,01 |
| 504 h (21 D) | 0,1829 g/L | 0,01 | 0,1998 g/L | 0,01 | 0,1924 g/L | 0,01 |

Os três lotes, de modo geral, apresentaram variações muito pequenas em relação à concentração total liberada. O lote 1 apresentou uma pequena diferença de concentração ao final do período avaliado em relação aos outros lotes. O lote 3 obteve a maior taxa de liberação nas primeiras 3 horas, mas sua concentração final foi ligeiramente inferior ao lote 2. Foram realizadas leituras até o 25º dia, porém estas não apresentaram variações de concentração em relação aos 21 dias, sendo desconsideradas.

Em comparação à outros dispositivos de LCA com matriz polimérica que utilizam a CHX como ativo, no trabalho de MUSIAL e colaboradores (2010) um hidrogel de poli (ácido acrílico) e metilcelulose promovem uma liberação de CHX através das partículas formadas em torno de 10 horas, que com a variação de temperatura, o tempo de liberação

pode ser reduzido. O dispositivo proposto por LIMA (2016) com micropartículas de polietilenoglicol e gelatina, demonstrou uma liberação de apenas 24h. Outro trabalho com microesferas de alginato testado em diferentes concentrações, contendo CHX (SCHOLZ *et al.*, 2017), apresentou liberação em torno de 5 dias. O Periochip® de SOSKOLNE e colaboradores (1998), que é um dos poucos dispositivos com CHX disponíveis no mercado exterior, aprovado pela FDA, com base de gelatina reticulada com glutaraldeído demonstrou a liberação em até 10 dias. Por fim, o dispositivo que apresenta um tempo mais aproximado de liberação de CHX, em até 14 dias, é o Chlo – Site® (PAOLANTONIO *et al.*, 2009), se trata de um gel com base de xantano aplicado com uma seringa na bolsa periodontal, mas que não é aprovado pela FDA. Em comparação à estes dispositivos, o desempenho de liberação de CHX do filme de amido termoplástico deste estudo demonstrou um tempo de liberação de CHX superior em relação aos outros dispositivos.

De acordo com SOSKOLNE e colaboradores (1998) a concentração mínima efetiva que inibe o crescimento das bactérias da placa subgengival é de 0,125 g/L. Com este dado, é possível dizer que os filmes de amido termoplástico com CHX, liberam uma concentração acima da mínima inibitória nos ensaios *in vitro*, em volumes de 200 mL de tampão PBS. Além disso, o potencial de liberação controlada dos filmes, pode ter se dado pela capacidade de inchamento ou expansão do amido termoplástico em contato com as moléculas de água do meio, antes de degradar e liberar a CHX restante.

Outra observação, é em relação ao volume de CHX liberada nas primeiras 24h. Os dispositivos de liberação controlada, liberam um volume maior do ativo até as primeiras 30 horas, como exemplo do Periochip®, que libera em torno de 40% do volume total da CHX contida no dispositivo nas primeiras 24h (SOSKOLNE, *et al.*, 1998). Os filmes de amido termoplástico com CHX, apresentaram uma liberação em torno de 50% do volume

total do ativo, tendendo a estabilização da concentração nas horas seguintes. Isto pode ser ilustrado na Figura 21, que apresenta um gráfico de liberação de uma das amostras testadas, com as medidas por absorvância, onde pode ser observado um espaçamento maior nas primeiras 24 h.

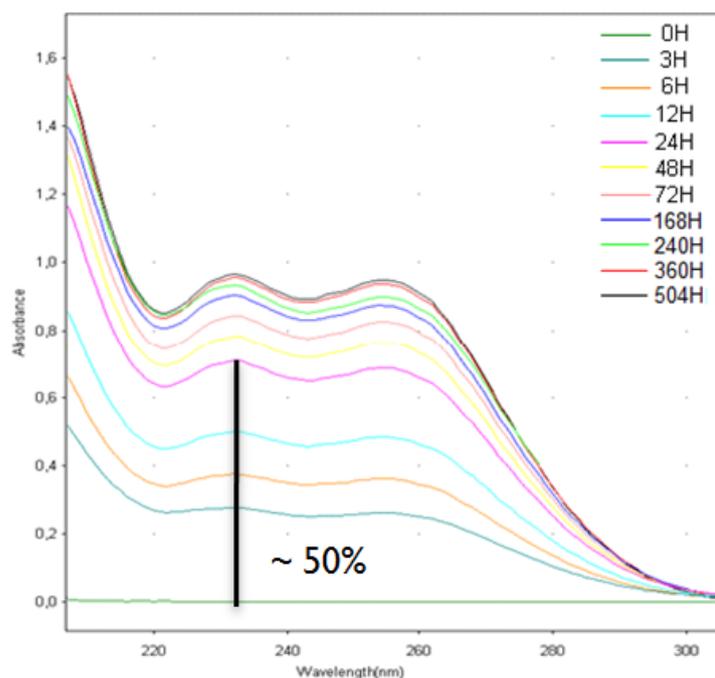


Figura 21. Perfil de liberação em absorvância de uma das amostras de filme de AA com CHX analisadas, demonstrando a maior liberação do ativo no período de 24h.

É possível que este maior volume liberado inicialmente, possa garantir a substantividade da CHX na bolsa periodontal. Como já citado na revisão, a CHX tem adsorção rápida na superfície bacteriana e aderência eficaz no esmalte do dente, se tornando biodisponível por alguns dias dentro da bolsa, possivelmente sendo apenas renovada em menor concentração nos dias subsequentes. Este comportamento pode não permitir o desenvolvimento do biofilme dental em um maior espaço de tempo. Esta suposição, poderá ser estudada em ensaios *in vivo*.

5.9 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

O potencial de ação microbiológico dos filmes foi avaliado para inibição de crescimento das bactérias que estão presentes nos biofilmes subgingivais e que são as principais causadoras da DP. A *P. gingivalis* (*P.g.*), que faz parte do complexo vermelho, uma das mais patogênicas do grupo, a *P. intermedia* (*P.i.*), *P. nigrescens* (*P. n.*) e *P. melaninogenica* (*P. m.*) que fazem parte do complexo laranja, como já descrito na revisão. A inibição das bactérias foi bem sucedida com todos os filmes testados. Na Figura 22 é possível visualizar uma das placas de Brucella sangue onde foi testada uma *P. m.* Na maioria das placas, os controles de 0,12% e 2% tiveram seu potencial de inibição menor em relação ao filmes dos três lotes testados, provavelmente devido ao material do disco (papel) ter liberado ou evaporado mais rapidamente a solução de CHX a qual ele foi embebido para o teste. Outra explicação plausível é devido a liberação lenta da CHX, que pode ter contribuído para uma maior inibição, formando halos maiores.

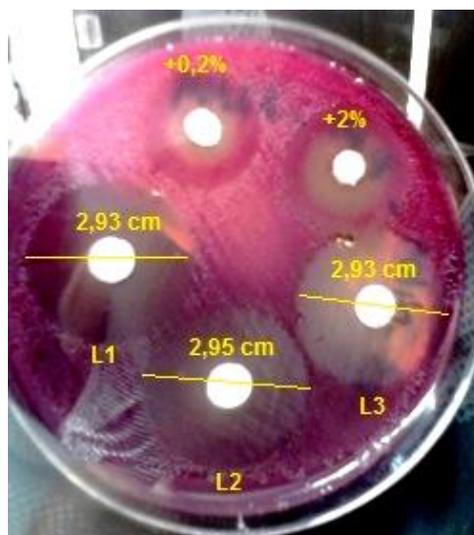


Figura 22. Um dos testes de disco-difusão em placa de Brucella Sangue da bactéria *P. melaninogenica* contendo os dois controles e os três lotes de filmes com CHX.

Outra observação importante é de que os filmes tiveram um leve inchamento em contato com o meio de cultura com o passar dos dias. Isso ocorreu na maioria das placas dos testes. Uma explicação para isso, é com relação ao processo de inchamento do AA termoplástico em relação à umidade exposta, como já foi visto anteriormente no teste de liberação do fármaco.

O tamanho médio dos halos de inibição e seus respectivos desvios padrão aferidos podem ser visualizados na Tabela 6.

A *F. nucleatum* não pode ser testada devido à contaminação cruzada do seu crescimento após o descongelamento.

Tabela 6. Média das aferições dos halos de inibição durante o teste de disco-difusão.

| Micro-organismo | Brucella sangue (cm) | D.P. | BHI (cm) | D.P. |
|--------------------------|----------------------|------|----------|------|
| <i>P. gingivalis</i> | 3,0 | 0,1 | 3,1 | 0,1 |
| <i>P. intermedia</i> | 2,9 | 0,1 | 2,9 | 0,05 |
| <i>P.nigrescens</i> | 2,9 | 0,1 | 3,0 | 0,05 |
| <i>P. melaninogenica</i> | 2,8 | 0,1 | 2,9 | 0,05 |

Nas aferições é possível perceber uma discreta sensibilidade maior da *P. g* em relação as outras bactérias. E a *P. m.* foi a que apresentou os menores halos de inibição. Também foi possível observar que o sangue contido no meio Brucella, não afetou os níveis de sensibilidade em relação ao meio BHI. Assim, verificou-se que a hemólise não interferiu significativamente na formação dos halos.

Não foram encontrados trabalhos na literatura de dispositivos de liberação controlada contendo CHX para comparativo direto, apenas trabalhos utilizando discos embebidos com CHX em solução em relação à outros tipos antimicrobianos naturais ou sintéticos. O

trabalho de NOIRI e colaboradores (2003) que comparou o potencial inibitório de três antimicrobianos (Minociclina, Metronidazol e CHX) contra *P.gingivalis* em biofilmes produzidos *in vitro*, com amostras em triplicata durante 48h, demonstraram que a CHX teve um melhor potencial antimicrobiano, com uma redução significativa do crescimento de *P.gingivalis* ($P < 0,001$). Mostrando que a estrutura da matriz extracelular da *P.g* foi alterada na presença de CHX através de MEV. O cloridrato de minociclina também causou uma redução significante no crescimento da *P.g* ($P < 0,05$) e metronidazol não apresentou eficácia significativa contra biofilmes testados. Eles concluíram que a CHX demonstrou melhor ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de biofilme que continha *P.g*.

No trabalho de MANKAR e colaboradores (2016) foi comparado o efeito antimicrobiano do extrato de casca e laranja (Grupo A) da CHX (grupo B) em diferentes concentrações (75 µg, 50 µg, 25 µg, 10 µg e 5 µg) contra *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* por difusão em caldo durante 72h. O índice utilizado para o teste foi o de CIM (Concentração Inibitória Mínima), apresentando as médias contra *P.g.*, *P.i.* e *A.a.*, respectivamente, de 66 µg/ml, 75 µg/ml e 33 µg/ml para o grupo A e 14 µg/ml, 7 µg/ml e 20 µg/ml para o grupo B, demonstrando a maior eficácia da CHX, em menor concentração contra todos os 3 micro-organismos, demonstrando seu maior potencial antimicrobiano.

Pode-se dizer que a escolha da CHX para o presente estudo contra as bactérias de importância periodontal foi bem sucedida, demonstrando ser eficaz durante os 10 dias de teste, que foi um período maior do que os avaliados em outros trabalhos. Isto pode ter ocorrido provavelmente devido ao potencial de liberação controlada dos filmes de amido termoplástico, o que amplia o tempo de ação da CHX contra os patógenos estudados.

6. CONCLUSÕES

Os filmes de amido termoplástico incorporados com CHX foram fabricados com sucesso para produção de um dispositivo de liberação controlada pelo processo de gelatinização e evaporação do solvente. Este processo de produção se mostrou simples, realizado em poucas etapas, de fácil reprodução e facilmente escalonável, não demandando uso de equipamentos sofisticados.

As propriedades mecânicas mostraram que o filme sem CHX, utilizado como controle, apresentou um comportamento mais plástico e mais rígido em relação aos filmes com CHX, que obtiveram módulo de elasticidade em torno de 50% menores, com redução de quase 1 ordem de grandeza na dureza, o que permitiu se obter filmes menos quebradiços e que podem ser facilmente manipulados com uma pinça para o objetivo posterior de inserção na bolsa periodontal. Não havendo a necessidade de adicionar várias etapas ao processo de fabricação ou outros tipos de componentes sintéticos ou que não fossem biodegradáveis para obtenção destas propriedades.

Através das caracterizações das superfícies, foi possível demonstrar a boa dispersão das partículas formadas com a incorporação de CHX na matriz dos filmes. Possivelmente, as irregularidades observadas na superfície, podem ser devido à variação no tamanho destas partículas. Com a análise por espectroscopia Raman, foi possível confirmar as caracterizações de superfície por AFM, onde se observaram várias regiões contendo CHX incorporada na matriz de amido termoplástico.

As análises de FTIR indicaram as bandas de absorção específicas de amido nos filmes termoplásticos sem adição de antimicrobiano e as bandas específicas da adição de CHX, mostrando a incorporação no filme. Entretanto, a possível quantidade maior de CHX na

superfície proporcionou a sobreposição das bandas de amido, não sendo possível analisar com precisão as possíveis interações ou se houve algum tipo de degradação do material.

A redução de cristalinidade dos filmes com CHX, devido a ação plastificante do glicerol em conjunto com a CHX, não permitiu a reorganização das cadeias de amido. Isto contribuiu diretamente para obtenção das propriedades mecânicas esperadas.

Em relação à liberação controlada do antimicrobiano, em ambiente simulando condições encontradas na bolsa periodontal, a CHX conseguiu atingir uma liberação de 21 dias à uma concentração total de aproximadamente 0,19 g/L, o que atende a concentração mínima de inibição do crescimento bacteriano descrita na literatura. Com este dado, conclui-se que a proporção de CHX em relação ao peso total da medida do dispositivo (4 mm x 5mm) é em torno 10%. O dispositivo se demonstrou superior ao Periochip® e outros dispositivos de LCA para uso periodontal, em relação ao tempo e a proporção de liberação do antimicrobiano, o que talvez demonstre ser possível controlar a formação do biofilme dental em um maior intervalo de tempo.

A inibição bacteriana observada nos testes de disco-difusão demonstraram que durante os 10 dias, os dispositivos testados foram eficazes contra os principais patógenos responsáveis pela doença periodontal: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. melaninogenica*.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Melhorar a regularidade da superfície dos filmes, mantendo as propriedades mecânicas adequadas;
- Avaliar a influência do tempo de agitação dos filmes com e sem CHX;
- Acompanhar a cristalinidade e as propriedades mecânicas, avaliando as amostras durante o tempo de envelhecimento;
- Variar a concentração de CHX para avaliar melhor o tempo de liberação e o potencial bactericida/bacteriostático;
- Estudar um revestimento para o dispositivo, a fim de aumentar o seu potencial de liberação controlada;
- Realizar testes de inibição bacteriana, com outras bactérias importantes na DP, que não puderam ser testadas no presente estudo;
- Realizar um mapa químico mais completo das interações entre a CHX e o AA, através do Raman e do FTIR;
- Realizar testes de toxicidade celular com o dispositivo;
- Realizar estudos clínicos *in vivo* do dispositivo dentro da bolsa periodontal para avaliar seu potencial de liberação e inibitório.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S., CHAUBEY, K. K., CHAUBEY, A., *et al.* “Clinical efficacy of subgingivally delivered simvastatin gel in chronic periodontitis patients”, *Journal of Indian Society of Periodontology*, v. 20, n. 4, pp. 409–416, 2016.

ALMEIDA, R. M., ALVES, S.R., NASCIMBEM, L.B.S.R., *et al.* “Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, n.7, pp.2693–2701, 2010.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. “American Academy of Periodontology Task Force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions”. *Journal of Periodontology*, v. 86 n. 7 pp. 838-838, 2015.

ANGELLIER, H., MOLINA-BOISSEAU, S., DOLE, P., *et al.* “Thermoplastic Starch–Waxy Maize Starch Nanocrystals Nanocomposites”, *Biomacromolecules*, v. 7, pp. 531 – 539, 2006.

ANWAR, H., DASGUPTA, M.K., COSTERTON, J.W. “Testing the susceptibility of bacteria in biofilm to antibacterial agents”. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, v. 34, n.11, pp. 2043 – 2046, 1990.

ARMITAGE, G. “Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions”, AAP Workshop, Oak Brook, Illinois, October 30- November 2, 1999. *Annals Periodontology* v. 4 pp, 1-112, 1999.

BASTOS, M.D.R, *Monitoramento do pH e dos níveis de inserção óssea antes e após tratamento com sistemas bioadesivos poliméricos para a liberação modificada de metronidazol intrabolsa periodontal*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, faculdade de odontologia. Ribeirão Preto, SP, 2015.

BEZ, C.N. *Cirurgia periodontal em restaurações estéticas*. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina – SC. 2014.

BERCHIER, C.E., SLOT, D.E., VAN DER WEIJDEN, G.A. “The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review”. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 37, n. 9, pp. 829-839, 2010.

BIDAULT, P., CHANDAD, F., GRENIER, D. “Systemic antibiotic therapy in the treatment of periodontitis”. *Journal of the Canadian Dental Association*, v. 73, n.6, pp. 515 – 520, 2007.

BRUSCHI, M.L., PANZERI, H., FREITA, O. “Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal”. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 1, pp. 29 – 47, 2006.

BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., BALL, S. “Starch granules: structure and biosynthesis”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 23, pp. 85 – 112, 1998.

CAFIERO, C., MATARASSO, M., MARENZI, G., *et al.* “Periodontal Care as a Fundamental Step for an Active and Healthy Ageing” . *The Scientific World Journal*, ID 127905, pp. 1-7, 2013.

CARRANZA, F., NEWMAN, G., TAKEI, H., KLOKKEVOLD, P.R. *PeriodontiaClínica*, 11º ed. Rio de Janeiro, Brasil, Guanabara, Koogan Ltda, 2012.

CERIZE, N.N.P. *Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5 – aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica*. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2012.

CETIN, E.O., BUDUNELI, N., ATLIHAN, E., *et al.* “In vitro studies on controlledrelease cellulose acetate films for local delivery of chlorhexidine, indomethacin, and meloxicam”. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 31, n. 12, pp. 1117 – 1121, 2004.

CIONCA, N., GIANNOPOULOU, C., UGOLOTTI, G., MOMBELLI, A. “Amoxicillin and metronidazole as na adjunct to full – mouth scaling and root planing of chronic periodontitis”. *Journal of Periodontology*, v. 80, n. 3, pp. 364 – 371, 2009.

CLSI, “Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Oitava Edição”. *Anvisa, M2-A8*, v. 23 n. 1. 2003.

CRISTANCHO, J. P. F. *Elaboração e caracterização de blendas biodegradáveis a base amido de milho com polihidroxibutirato (phb)*. Dissertação de Mestrado, Programa de

Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

CRUZ, G.A., JOLY, J.C., LIMA, A.F.M. “Utilização de um dispositivo de liberação lenta de clorexidina em pacientes com periodontite crônica”. *Jornal Brasileiro de Endo/Perio*, v. 2, n. 5, pp. 171-175, 2001.

DANESHMAND, N., JORGENSEN, M.G., NOWZARI, H., *et al.* “Effect of Periochip® treatment on the subgingival microbiota”. *Journal of Periodontology*, v. 71, pp.1806-1807, 2000.

DORRER, C. & RÜHE, J. “Advancing and Receding Motion of Droplets on Ultrahydrophobic Posts Surfaces”, *Langmuir*, v.22, n.18, pp.7652 – 7657, 2006.

DÍEZ-PASCUAL, A.M., GÓMEZ-FATOU, M.A., ANIA, F., *et al.* “Nanoindentation in polymer nanocomposites”. *Progress in Materials Science*, v. 67, pp. 1–94, 2015.

ELLEPOLA, A.N.B., SAMARANAYAKE, L.P. “Adjunctive use of a chlorhexidine in oral candidoses: Review”. *Oral Diseases*, v. 7, n.11 pp. 7, 2001.

ELFSTRAND, L., FRIGARD, T., *et al.* “Recrystallisation behaviour of native and processed waxy maize starch in relation to the molecular characteristics” *Carbohydrate Polymers*, v. 57, pp. 389–400, 2004.

EGLAND, P.G., MARQUIS, R.E. “Oral microbial physiology”. In: LAMONT, R.J., HAJISHENGALLIS G.N., JENKINSON H.F., editors. *Oral microbiology and immunology*. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press. pp. 113, 130, 134–138, 2014.

ESCAMILLA-GARCÍA, M., REYES-BASURTO, A., GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E., *et al.* “Modified Starch-Chitosan Edible Films: Physicochemical and Mechanical Characterization”. *Coatings*, v. 7, pp. 224, 2017.

FERNANDES, D.M.S. “Espectrofotometria UV-vis: Determinação de ácido ascórbico em efervescente comercial”, Relatório de química analítica, *Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE campus Quixadá*, pp 1-11. 2014.

FERRAZ, C.C., GOMES, B.P., ZAIA, A.A., *et al.* “*In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant”. *Journal of Endodontics*, v.27, n. 7, pp.452 – 455, 2001.

FRANCO NETO, C.A., PAROLO, C.C.F., ROSING, C., *et al.*, “Comparative analysis of the effect of two chlorhexidine mouthrinses on plaque accumulation and gingival bleeding”. *Brazilian Oral Research*, v. 22, n.2, pp.139 – 44, 2008.

GAETTI–JARDIM, E.C., MARGUETI, A.C., FAVERANI, L. P., *et al.*. “Antimicrobial resistance of aerobes facultative anaerobes isolated from the oral cavity”. *Journal of Applied Oral Science*, v.18,n. 6, pp. 551 – 559, 2010.

GARGIULO, A.W., WENTZ, F.M., ORBAN, B. "Dimensions and Relations of the Dentogingival Junction in Humans". *Journal of Periodontology*, v.32, n.3, pp:261-267, 1961.

GRIFFITHS, G.S., SMART, G.J., BULMAN, J.S., *et al.* "Comparison of clinical outcomes following treatment of chronic adult periodontitis with subgingival scaling or subgingival scaling plus metronidazole gel". *Journal of Clinical Periodontology*, v. 27, n.12, pp. 910 – 917, 2000.

GROVER, V., KAPOOR, A., MALHOTRA, R., *et al.* "To assess the effectiveness of a chlorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis: Aclinical and radiographic study". *Journal of Indian Society of Periodontology*, v. 15, n.1, pp. 139 – 146, 2011.

GOMES, B.P., SOUZA, S.F., FERRAZ, C.C., *et al.* "Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*". *International Endodontic Journal.*, v. 36, n. 4, pp. 267 – 275, 2003.

HAFFAJEE, A.D., CUGINI, M.A., DIBART, S., *et al.* "Clinical and microbiological features of subjects with adultperiodontitis who responded poorly to scaling and root planning". *Journal Clinical Periodontology*. v. 24, n. 10, pp. 767-776,1997.

HAFFAJEE, A.D., TELES, P., SOCRANSKY, S.S. "The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota". *Periodontology 2000*, v. 42, pp. 219–258, 2006.

HARVEY, J.D. “Periodontal Microbiology”. *Dental Clinics of North America*, v. 61, n. 2, pp.253 – 269, 2017

JAIN, N., JAIN G.K., JAVED S., *et al.* “Recent approaches for the treatment of periodontitis”. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 21/22, pp. 932 – 943, 2008.

JENKINSON, H.F., LAMONT, R.J., HAJISHENGALLIS, G.N.“General microbiology - Oral microbiology and immunology”. 2^a edição. Washington DC. ASM PRESS, 2014.

JONES, A.A., KORNMANN, K.S., NEWBLOND, D.A., *et al.* “Clinical and microbiological effects of controlled – release locally delivered minocycline in periodontitis”. *Journal of Periodontology*, v. 65, n. 11, pp. 1058–1066, 1994.

JONES, D. S., BROWN, A. F., WOOLFSON, A. D., *et al.* “Examination of the physical state of chlorhexidine within viscoelastic, bioadhesive semisolids using raman spectroscopy”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, pp. 563–571. 2000.

JOSE, K.A., AMBOOKEN, M., MATHEW, J.J., *et al.* “Management of chronic periodontitis using chlorhexidine chip and diode laser – a clinical study”. *Journal of clinical and diagnostic research*, v. 10, n. 4, pp. ZC76 – ZC80, 2016.

KLAPPERICH, C., KOMVOPOULOS, K., PRUITT, L. “Nanomechanical Properties of Polymers Determined From Nanoindentation Experiments”. *Journal of Tribology*, v. 123, n. 3, pp. 624-631, 2001.

KINANE D.F., STATHOPOULOU P.G AND PAPAPANOU P.N. “*Periodontal Diseases*” *Nature Reviews Disease Primers* v. 3, pp. 17038, 2017.

LANGER, R. “New methods of drugs delivery”. *Science*, v. 249, n. 4976, pp. 1527 – 1533, 1990.

LESZCZY – SKA, A., BUCZKO, P., BUCZKO, W., *et al.* “Periodontal pharmacotherapy – an updated review”. *Advances in Medical Sciences*, v. 56, n. 2, pp. 123 – 131, 2011.

LIMA, N.R.B, *Sistemas de liberação controlada de clorexidina baseados em poli (succinato de butileno – b – etilenoglicol) e gelatina úteis para a supressão de periodontopatógenos subgingivais*. Dissertação de Mestrado, Instituto de macromoléculas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

LINDHE, J., KARRING, T., ARAÚJO, M. “*Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral*”. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan Ltda, 2010.

LINDHE, J. NYMAN, S. “The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease”. *Journal Clinical Periodontology*, v. 2, n. 2, pp. 67-79, 1975.

LÖE, H., THEILADE, E., JENSEN, S.B. “Experimental gingivitis in man”. *Journal of Periodontology*, v. 36, pp. 177 – 187, 1965.

LOCKMAN, P.R., & ALLEN, D.D. "The transport of choline". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 28, n. 7, pp. 749 – 771, 2012.

LOESCHE, W.J., SCHMIDT, E., SMITH, B.A., *et al.* "Effects of metronidazole on periodontal treatment needs". *Journal of Periodontology*, v.62, n. 4, pp. 247–257, 1991.

MC COLL, E., PATEL, K., DAHLEN, G., *et al.* "Supportive periodontal therapy using mechanical instrumentation or 2 % minocycline gel : a 12 month randomized controlled, single masked pilot study". *Journal of Clinical Periodontology*, v. 33,n. 2, pp. 141 – 150, 2006.

MA, X., JIAN, R., CHANG, P.R., YU, J. "Fabrication and characterization of citric acid – modified starch nanoparticles/plasticized – starch composites" *Biomacromolecules*, v. 9, n. 11, pp. 3314 – 3320, 2008.

MANKAR, C.H., SHAH, M.U., DOSHI, Y.S., *et al.* "Evaluation of antimicrobial activity of orange peel extract against oral biofilm forming organisms: an in vitro microbial study and scanning electron microscopic assessment". *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, v. 5, n. 5, pp. 1917-1923, 2016.

MEDIAIAH, S., SRINIVAS, M., MELATH, A., *et al.* "Chlorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis – a clinical study". *Journal of Clinical Diagnostic Research*, v. 8, n. 6, pp. ZC22 – ZC25, 2014.

MENDES, J.F., PASCHOALIN, R.T., CARMONA, V.B., *et al.* "Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion", *Carbohydrate Polymers*, v. 137, pp.452-458. 2016.

MIR, S.A., BOSCO, S. J. D., BASHIR, M., *et al.* "Physicochemical and structural properties of starches isolated from corn cultivars grown in Indian temperate climate", *International Journal of Food Properties*, v. 20, n. 4, pp. 821-832. 2016.

MORELLI, L., CAPPELLUTI, M. A., RICOTTI, L., *et al.* "Injectable System for Local and Sustained Release of Antimicrobial Agents in the Periodontal Pocket" *Macromolecular Bioscience*, v. 17 n. 8, pp. 1 – 11, 2017.

MUNCHOW, E.A., OLIVEIRA, H.L., VALENTE, L.L., *et al.* "Prevotella intermédia, uma breve revisão". *Brazil Journal Periodontology*, v. 25, n.1, pp. 21-27, 2015.

MUSIAL, W., KOKOL, V., VONCINA, B. "Deposition and release of chlorhexidine from non – ionic and anionic polymer matrices". *Chemical Papers*, v.64, n.3, pp.346 – 353, 2010.

MÜLLER, R.H., MADER, K., GOHLA, S., "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery a review of the state of the art". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, pp. 161 – 177, 2010.

NASCIMENTO, R.L., QUEIROZ, A.A.A., RIBELA, M.T.C, *et al.* “Sistemas de liberação controlada de crotoxina a partir de matriz polimérica: uma alternativa para o tratamento de cancer”. *Revista Ciência e Saúde*, v.1, n. 2, pp. 42 – 47, 2011.

NAGARAJU, R., JACOB, M., UDUPA, N., *et al.* “Biodegradable dental implants of ciprofloxacin BCD complexes in the treatment of periodontitis”. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 37n. 3, pp. 305–307,1999.

NOIRI, Y., OKAMI, Y., NARIMATSU, H., *et al.* “Effects of chlorhexidine, minocycline, and metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* strain 381 in biofilms”. *Journal of Periodontology*, v. 74, n. 11, pp. 1647 -1651, 2003.

NOSONOVSKY, M., BHUSHAN, B. “Capillary effects and instabilities in nanocontacts”. *Ultramicroscopy*, v. 108, n. 10, pp. 1181 – 1185, 2008a.

NOSONOVSKY, M., BHUSHAN, B. “Do hierarchical mechanisms of superhydrophobicity lead to self – organized criticality?”. *Scripta Materialia*, v. 59, n.9, pp. 941 – 944, 2008b.

O’NEIL, M.J. *TheMerck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological*. 13^a ed. United States, Whitehouse Station, 2001.

OBERMEIER, A., SCHNEIDER, J., WEHNER, S. MATL, *et al.* “Novel High Efficient Coatings for Anti-Microbial Surgical Sutures Using Chlorhexidine in Fatty Acid Slow-Release Carrier Systems”. *PLOS ONE*, v. 9, n. 7, pp. e101426, 2014.

OCHUBIOJO, E.M. AND RODRIGUES, A. “Starch: From Food to Medicine”. *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*, pp. 355-380, 2012.

OH, J. H., JEONG, Y .J., KOO, H.J., PARK, *et al.* “Antimicrobial Activities against Periodontopathic Bacteria of *Pittosporum tobira* and its active Compound”. *Molecules*, v. 19, pp. 3607-3616. 2014.

OKUDA, K., WOLFF, L., OLIVER, R., *et al.* “Mynocline slow – release formulation effect on subgingival bacteria”. *Journal of Periodontology*, v. 63, n. 2, pp. 73 – 79, 1992.

OLIVER, W., & PHARR, G. “Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology”. *Journal of Materials Research*, v. 19, n. 1, pp. 3-20. 2004.

PAOLANTONIO, M., D’ERCOLE, S., PILLONI, A., *et al.* “Clinical, Microbiologic, and Biochemical Effects of Subgingival Administration of a Xanthan – Based Chlorhexidine Gel in the Treatment of Periodontitis: A Randomized Multicenter Trial”. *Journal of Periodontology*, v. 80, n. 9, pp. 1479 – 1492, 2009.

PENNEL, B.M., KEAGLE, J.G. “Predisposing factors in the etiology of chronic inflammatory periodontal disease”. *Journal of Periodontology*, v. 48, n. 9, pp. 517 – 532, 1977.

PETERSEN, P.E. & OGAWA H. "The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control". *Periodontology 2000*, Vol. 60, pp. 15–39, 2012.

PIOVANO, S. "Bacteriology of most frequent oral anaerobic infections". *Anaerobe*, v. 5, n. 3, pp. 221 – 227, 1999.

PRIYADARSHINI, B.M., SELVAN, S.T., LU, T.B., *et al.* "Chlorhexidine Nanocapsule Drug Delivery Approach to the Resin-Dentin Interface" *Journal of Dental Research*.v.95, n. 9, pp. 1065 – 1072, 2016.

PRESHAW, P.M., TAYLOR, J.J. "Periodontal pathogenesis". In: NEWMAN, M.G., TAKEI, H.H.,KLOKKEVOLD, P.R., *et al*, editors. *Carranza's clinical periodontology*. 11th edition. St Louis (MO): Elsevier, pp. 194–216, 2012.

PURI, K., DODWAD, V., BHAT, K., & PURI, N. "Effect of controlled-release Periochip®TM on clinical and microbiological parameters in patients of chronic periodontitis". *Journal of Indian Society of Periodontology*, v. 17, n. 5, pp. 605–611, 2013.

QUIRYNEN, M., TEUGHEL, W., DE SOETE, M., *et al.* "Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects". *Periodontology 2000*,v. 28, pp. 72 – 90, 2002

RAMS, T.E., SLOTS, J. “Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket”. *Journal of Periodontology*, v. 10, pp.139–59, 1996.

RASMUSSEN, E.G., GIBBONS, R.J., SOCRANSKY, S.S. “A taxonomic study of fifty gram positive anaerobic diphtheroids isolated from the oral cavity of man”. *Archives of Oral Biology*, v. 11, n. 6, pp. 573 – 578, 1966.

RINDLAV – WESTLING, Å., STADING, M., HERMANSSON, A.M., *et al.* “Structure, Mechanical and Barrier Properties of Amylose and Amylopectin Films”, *Carbohydrate Polymers*, v. 36, pp. 217 – 224, 1998.

NAIR, S.C. & ANOOP, K.R, “Intraperiodontal pocket: An ideal route for local antimicrobial drug delivery”. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, v. 3, n. 1, pp. 9–15, 2012.

NAKAGAWA, T., YAMADA, S., OOSUKA, Y., SAITO, A., HOSAKA, Y., ISHIKAWA, T., *et al.* “Clinical and microbiological study of local minocycline delivery (Perioline) following scaling and root planing in recurrent periodontal pockets”. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, v. 32, n. 2, pp. 63 – 70, 1991.

SALVI, G.E, MOMBELLI, A., MAYFIELD, *et al.* “Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. A randomized clinical trial comparing three biodegradable sustained release polymers”. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 29, n. 6 ,pp. 540–550, 2002.

SAMPAIO, E., ROCHA, M., FIGUEIREDO, L.C., *et al.* “Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo – controlled clinical trial”. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 38, n. 9, pp. 838–846, 2011.

SATOMI, A., URAGUCHI, R., NOGUCHI, T., *et al.* “Minocycline HCl concentration in periodontal pocket after administration of LS007”. *Journal of Japanese Society of Periodontology*, v. 29, n. 3, pp. 937 – 943, 1987.

SCANNAPIECO, F.A. “The oral environment”. In: LAMONT, R.J., HAJISHENGALLIS, G.N., JENKINSON, H.F., editors. *Oral microbiology and immunology*. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press, pp. 57–62, 66, 72, 2014.

SCHELEMMER, D. “Preparação, caracterização e degradação de blendas de poliestireno e amido termoplastico utilizando glicerol e óleo de buriti como plastificantes” Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2007.

SEYMOUR, R.A.& HEASMAN, P.A. *Drugs, diseases, and the periodontum*. 1ed. New York, Oxford Medical Publications, Oxford University Press, 1992.

SOSKOLNE, W.A.& FREIDMAN, M.F. “Intra – periodontal pocket drug delivery systems”. In: RATHBONE, M.J. *Oral mucosal drug delivery*. 1ed. New York, Marcel Dekker, v. 74, pp. 359 – 379, 1996.

SOSKOLNE, W.A., CHAJEK, T., FLASHNER, M., LANDAU, I., STABHOLTZ, A., KOLATCH, B., LERNER, E.I. “An *in vivo* study of the chlorhexidine release profile of the Periochip®TM in the gingival crevicular fluid, plasma and urine”. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 25, pp. 1017 – 1021, 1998.

SOUZA, C. R., ANDRADE, C.T.. “Investigação dos Processos de Gelatinização e Extrusão de Amido de Milho”. *Polímeros -Ciência e Tecnologia*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, v. 10, n 1, pp. 24-30, 2000.

STEINBERG, D.& FRIEDMAN, M. “Sustained release drug delivery devices for local treatment of dental diseases”. In: TYLE, P. *Drug Delivery Devices*. 1ed. New York, Marcel Dekker. pp. 491 – 515, 1988.

STOLLER, N.H, JOHNSON, L.K., TRAPNELL, S., *et al.* “The pharmacokinetic profile of a biodegradable controlled – release delivery system containing doxycycline compared to systemically delivered doxycycline in gingival crevicular fluid, saliva, and serum”. *Journal of Periodontology*, v. 69, n.10, pp. 1085–1091, 1998.

SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., CUGINI, M.A., *et al.* “Microbial complexes in subgingival plaque”. *Journal of Clinical Periodontology*, v.25, n. 2, pp. 134–144, 1998.

SOCRANSKY, S.S.& HAFFAJEE, A.D. “Dental biofilms: Difficult therapeutic targets”. *Periodontology 2000*, v. 28, pp. 12–55, 2002.

SCHOLZ, M., RESKE, T., BÖHMER, F., *et al.* “*In vitro* chlorhexidine release from alginate based microbeads for periodontal therapy”. *PLoS ONE*, v. 12, n. 10, pp.e0185562, 2017.

SCHWACH – ABDELLAOUI, K., VIVIEN – CASTIONI, N., *et al.* “Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, pp. 83 – 99, 2000.

TABARY, N., CHAI, F., BLANCHEMAIN, N., *et al.* “A Chlorhexidine – loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment”. *ActBio*, v. 10 n. 1, pp. 318–329, 2014.

TEIXEIRA, K. I.R. *Estudo das alterações da membrana celular de micro-organismos por compostos de inclusão de Clorexidina: beta – ciclodextrina em diferentes proporções molares usando Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

TELES, R., TELES, F., FRIAS-LOPEZ, J., *et al.* “Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology”. *Periodontology 2000*, v. 62 n. 1, pp. 95 – 162, 2013.

TEUGHEL, W., QUIRYNEN, M. JAKUBOVICS, N. “Periodontal microbiology”. In: NEWMAN, M.G., TAKEI, H.H., KLOKKEVOLD, P.R., *et al*, editors. *Carranza’s clinical periodontology*. 11th edition. St Louis, Elsevier, pp. 232– 270, 2012.

THIRÉ, R.M.S.M., *Obtenção e Caracterização de Filmes Biodegradáveis a Base de Amido de Milho com Reduzida Sensibilidade à Água*. Tese de Doutorado, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

THIRÉ, R. M. S. M., RIBEIRO, T. A. A., ANDRADE, C. T. “Effect of Starch Addition on Compression-Molded Poly(3hydroxybutyrate)/Starch Blends”. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 100, pp. 4338–4347, 2006.

TOKAJUK, G., NIEMIROWICZ, K., DEPTULA, P., *et al.* "Use of magnetic nanoparticles as a drug delivery system to improve chlorhexidine antimicrobial activity". *Dove Press Medical Research*, v. 2017 n. 12, pp. 7833 – 7846, 2017.

TONETTI, M., CUGINI, M.A., GOODSON, J.M. “Zero – order delivery with periodontal placement of tetracycline – loaded ethylene vinyl acetate fibers”. *Journal of Periodontal Research*, v. 25, n.4, pp. 243–249, 1990.

TORRES, C.R.G., KUBO, C.H., ANIDO, A.A., *et al.* “Agentes antimicrobianos e seu potencial uso na Odontologia”. *Revista da Pós – Graduação da FOU SP*, v. 3, n. 2, pp. 43 – 52, 2000.

TROMBELLI, L., SCABBIA, A., CALURA, G. “Non diseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of the effects of solution concentration and application time”. *The International Journal of*

Periodontics and Restorative Dentistry.v. 14, n. 5, pp. 461 – 70, 1994.

VANDEPUTTE, G.E.; DELCOUR, J.A. “From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch”. *Carbohydrate Polymers*, v.58, pp. 245-266, 2004.

VAN SOEST, J.J.G.*Starch Plastics: Structure – property Relationships*. Ph.D. dissertation, P. and L. Press, Faculteit Scheikunde, Utrecht University, Wageningen, The Netherlands, 1996.

VAN SOEST, J.J.G., VLEGENTHART, J.F.G. “Crystallinity in Starch Plastics: Consequences for Materials Properties”, *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 6, pp. 208 – 213, 1997.

VERMA, A., SANGHI, S., GROVER, D., *et al.* “Effect of insertion of xanthan-based chlorhexidine gel in the maintenance phase following the treatment of chronic periodontitis”. *Journal of Indian Society of Periodontology*, V. 16, n. 3, pp. 381–385, 2012.

WOOD, N. J., MADDOCKS, S. E., GRADY, H. J., *et al.* “Functionalization of ethylene vinyl acetate with antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles”. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, n.1, pp. 4145–4152.

YADAV, S. K., KHAN, G., MISHRA, B. “Advances in Patents Related to Intrapocket Technology for the Management of Periodontitis”. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, v. 9, n. 2, pp. 129 – 145, 2015.

YUE, I. C., POFF, J., CORTÉS, M. E., *et al.* “A novel polymeric delivery device for the treatment of periodontal disease”. *Biomaterials*, v. 25, n. 17, pp. 3743 – 3750, 2004.

ZANATTA, F. B., RÖSING, C. K. “Chlorhexidine: action’s mechanisms and recent evidences of it’s efficacy over supragingival biofilm context”. *Scientific – A*, v. 1, n. 2, pp. 35 – 43, 2007.