



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Mariana Cecchetto Figueiredo

Desenvolvimento de formulações contendo o extrato de *Pterodon pubescens* Benth. para uso odontológico

Development of formulations containing *Pterodon pubescens* Benth.extract for dental use

CAMPINAS

2019

Mariana Cecchetto Figueiredo

Desenvolvimento de formulações contendo o extrato de *Pterodon pubescens* Benth. para uso odontológico

Development of formulations containing the extract of *Pterodon pubescens* Benth. for dental use

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, Área de concentração Patologia Clínica

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences at University of Campinas in partial fulfillment of the requirements to obtain a PhD in Medical Sciences, area of concentration Clinical Pathology

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Mary Ann Foglio

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA MARIANA CECCHETTO
FIGUEIREDO E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. MARY ANN FOGLIO

CAMPINAS

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 02-P-4565/2018; FAPESP, 12/19661-4

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F469d Figueiredo, Mariana Cecchetto, 1980-
Desenvolvimento de formulações contendo extrato de *Pterodon pubescens Benth.* para uso odontológico / Mariana Cecchetto Figueiredo. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Mary Ann Foglio.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Pterodon pubescens Benth.* 2. Nanotecnologia. 3. Filmes mucoadesivos. 4. Cristais líquidos. I. Foglio, Mary Ann, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of formulations containing *Pterodon pubescens Benth.* extract for dental use

Palavras-chave em inglês:

Pterodon pubescens Benth.

Nanotechnology

Mucoadhesive films

Liquid crystals

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Mary Ann Foglio [Orientador]

Priscila Gava Mazzola

Marco Vinícius Chaud

Rogério Heládio Lopes Motta

Catarina Raposo Dias Carneiro

Data de defesa: 27-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARIANA CECCHETTO FIGUEIREDO

ORIENTADOR: Mary Ann Foglio

MEMBROS:

1. PROF. Dra. Mary Ann Foglio
2. PROF. DRA. Priscila Gava Mazzola
3. PROF. DRA. Catarina Raposo Dias Carneiro
4. PROF. DR. Rogerio Heladio Lopes Motta
5. PROF. DR. Marco Vinicius Chaud

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data: DATA DA DEFESA 27/02/2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças e abrir caminhos que nunca pudemos imaginar e que são muito melhores que aqueles um dia planejamos. Os caminhos pelos quais andamos são perfeitos e tudo acontece no momento certo.

Agradeço aos meus pais, Darcy e Maria Helena, por sempre estarem ao meu lado, apoiando todas as minhas escolhas, dando-me discernimento, norte e conforto. Obrigada por nunca deixarem que eu desistisse dos meus sonhos. E obrigada por me mostrarem que com carinho, esforço e dedicação, eles são possíveis!

Meu irmão Eduardo e minha cunhada Nathalia, as minhas cunhadas Anelise, Viviane, ao Hamilton e aos meus sogros Êneo e Marcia que sempre estiveram torcendo e vibrando a cada conquista. Obrigada por todo apoio e incentivo!

Ao meu amor, Humberto, que me acompanhou desde o começo desta jornada, lá no mestrado e agora finalizando o doutorado. Obrigada pelo amor, paciência, companheirismo, apoio, incentivo e por me fazer acreditar que posso ir além do que penso ser capaz.

À minha segunda mãe, orientadora, Prof.^a Dr^a Mary Ann Foglio, agradeço primeiramente por ter acreditado e confiado em mim, por me dar toda estrutura e oportunidade para desenvolver este trabalho, por me abrir novas oportunidades, pelos ensinamentos, conselhos, dedicação e amizade. Obrigada por me ajudar a concluir mais um sonho de forma tão ética e afetuosa. E que venham as próximas conquistas, profissionais e pessoais!

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – Unicamp por possibilitar a realização do meu doutorado e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial à Marcinha, pela competência e por resolver toda a parte burocrática de forma sempre eficiente.

Às Faculdades de Ciências Farmacêuticas (FCF), Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) - UNICAMP, à Universidade Estadual do estado de São Paulo (UNESP) – Campus Araraquara por possibilitar a realização do meu doutorado em parcerias.

Ao Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - Unicamp, pela infraestrutura para a realização do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro (02- P-4565/2018).

À Fundação de Apoio de Pesquisas do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido (12/19661-4).

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela disponibilidade de sua infraestrutura na caracterização das formulações. Ao aluno Bruno Fonseca que não mediu esforços em nos ajudar nestas caracterizações, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Ramiro Mendonça Murata da *East Carolina University (Greenville)* pela cultura de células de fibroblastos gengivais humanos cedidas, à atenção nos dada quanto visitamos, foi um prazer poder conhecer a ECU, muito obrigada!

A Prof.a Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz e ao Prof. Dr. João Ernesto pela amizade, apoio e ensinamentos.

Às queridas amigas Ilza, Núbia, Fabi, Rosanna, Tuany, Patrícia, Lucia, Ellen pela amizade, carinho, ajuda e companheirismo. Não tenho palavras para agradecer a ajuda de vocês, em todos os aspectos. Agradeço a amizade, o apoio, ensinamentos, incentivos, pés no chão e sonhos, o ombro amigo, as risadas e também as lágrimas, as taças de vinho, os almoços deliciosos com sobremesa e café, as coxinhas, e tudo mais. Esse trabalho também é de vocês.

Às queridas Ana Possenti, Karin e Sica pela ajuda fundamental nos ensaios farmacológicos, pela disposição, carinho e alegria sempre compartilhada.

Rogério, Michelle, Vanessa, Gisele, Adriana, agradeço por todo apoio, amizade, risadas, ensinamentos e toda ajuda nos testes realizados em animais e na cultura de células.

Agradeço a todos que ajudaram direta e indiretamente na realização desse trabalho. Cada um de vocês é único, e são essas singularidades que ajudam a me completar. A alegria dessa conquista, que era um sonho e hoje é real, compartilho com vocês.

Muito obrigada!

*Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória
é o desejo de vencer”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

Os produtos de higiene oral com ativos de origem vegetal estão sendo cada vez mais estudados, usando protocolos modernos, os quais comprovam a eficácia da utilização de determinadas plantas no tratamento das doenças bucais. A doença periodontal é definida como uma doença infecto-inflamatória crônica que acomete os tecidos de suporte (gengiva) e sustentação (cimento, ligamento periodontal e osso) dos dentes, caracterizada pela perda do ligamento periodontal e destruição do tecido ósseo adjacentes. O objetivo deste trabalho foi desenvolver formas farmacêuticas com *Pterodon pubescens* Benth. que possa, posteriormente, ser submetida a estudos clínicos necessários para a inserção do novo produto para uso odontológico. Dentre os principais objetivos deste trabalho destacam-se: i) quantificação dos compostos presentes no extrato etanólico; ii) Incorporação inédita do extrato etanólico em formas farmacêuticas de filmes mucoadesivos, apresentando boa solubilidade nas concentrações apresentadas; iii) caracterização dos filmes quanto às propriedades físico-químicas, mecânicas e mucoadesão; iv) Incorporação do extrato em sistemas líquido cristalino (SLC), utilizando dois sistemas (com e sem polímero PVA) e em ambos demonstraram boa solubilidade nas concentrações apresentadas; v) caracterização dos sistemas líquido cristalino (SLC) realizada por microscopia de luz polarizada; vi) análise por reometria oscilatória, análise do perfil de textura e mucoadesão *in vitro*; vii) o extrato e as formulações foram avaliados quanto à citotoxicidade *in vitro* em cultura de fibroblastos gengivais humanos e atividade antimicrobiana em cepas de *Streptococcus* spp; viii) avaliação da melhor formulação em modelo de doença periodontal experimental em ratos. Os resultados apresentados no presente trabalho permitiram concluir que nas duas formulações propostas foi possível solubilizar e incorporar o extrato etanólico de *P. pubescens*, além de apresentarem eficácia antimicrobiana em cepas de *Streptococcus* spp, baixa citotoxicidade e propriedades mecânicas adequadas para uso bucal. Dentre as formulações, o filme a 3% do extrato etanólico apresentou potencial para ser usado no tratamento da doença periodontal.

Palavras-chave: *Pterodon pubescens* Benth, Nanotecnologia, Álcool polivinílico, filmes mucoadesivos, sistema líquido cristalino, Odontologia.

ABSTRACT

Studies of oral hygiene products with active plant ingredients has increased with modern protocols that have proven plants' efficacy for the treatment of oral diseases. Periodontal disease is defined as a chronic infectious-inflammatory disease that affects the tissues (gingiva) and teeth support (cementum, periodontal ligament and bone), characterized by loss of periodontal ligament and destruction of adjacent bone tissue. The objective of this work was to develop pharmaceutical forms with *Pterodon pubescens* Benth. which can subsequently be submitted to clinical studies necessary for the insertion of the new product for dental use. Among the main objectives achieved in this work, we highlight: i) quantification of the phytochemical compounds in the ethanolic extract; ii) Incorporation of the ethanolic extract into pharmaceutical forms mucoadhesive films, presenting good solubility in the concentrations evaluated; iii) characterization of the films physico-chemical, mechanical and mucoadhesive properties; iv) Incorporation of the extract in crystalline liquid systems (CLS), using two systems (with and without PVA polymer) with both presenting good solubility in the concentrations tested; v) characterization of the crystalline liquid systems (CLS) performed by polarized light microscopy; vi) analysis by oscillatory rheometry, texture profile analysis and *in vitro* mucoadhesion; vii) extract and formulations were evaluated for *in vitro* cytotoxicity in culture of human gingival fibroblasts and antimicrobial activity in strains of *Streptococcus* spp; viii) evaluation of the best formulation in experimental periodontal disease model in rats. The results demonstrated that both formulations solubilized and incorporated *P. pubescens* ethanol extract furthermore they presented antimicrobial efficacy in strains of *Streptococcus* spp, low cytotoxicity and mechanical properties suitable for oral use. Among the formulations tested, the 3% film presented the best potential for treatment of periodontal disease.

Keywords: *Pterodon pubescens* Benth, Nanotechnology, Polyvinyl alcohol, mucoadhesive films, crystalline liquid system, Dentistry.

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma do delineamento experimental	21
Figura 2: Imagem da junção cimento- esmalte do periodonto.....	23
Figura 3: <i>Pterodon pubescens</i> Benth. (Sucupira).....	26
Figura 4: Estruturas químicas dos compostos: A) geranilgeraniol, B) 6 α -7 β -diidroxidovouacapano-17 β oato de metila e C) éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila, éster 6 α -hidroxi-7 β - acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila.....	27
Figura 5: Os 12 princípios da química verde.....	29
Figura 6: mecanismos de mucoadesão (Lyra et al, 2007)	32
Figura 7: Representação esquemática de sistemas líquidos cristalinos liotrópicos de fase lamelar, cúbica e hexagonal	34
Figura 8: Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no teste de viabilidade celular	44

Capítulo 1:

Figure 1: Obtaining the mucoadhesive film. Schematic illustration of the mucoadhesive films preparation technique (A) nanodispersion added on Teflon® plates for drying (B) and after drying (C).....	56
Figure 2: images of pva nanoparticles - <i>P. pubescens</i> Benth. obtained from transmission electron microscopy. A: 1% film nanoparticles; B: Crystals of the film 1%; C: 3% film nanoparticles; D: 3% film crystal.....	64
Figure 3: images from the 3% film with <i>P. pubescens</i> Benth. diluted obtained from transmission electron microscopy. A: nanoparticles; B: clustered nanoparticles; C: vouacapano crystal 404 (<i>m/z</i>) D: nanoparticles and crystal.	64
Figure 4: Cell viability indirect method in HGF-1 mucoadhesive films and extract of <i>P. pubescens</i> Benth at concentrations of 1 and 3%. method indirect. White film: white formulation with PVA; (Film 1%): formulation containing extract of <i>Pterodon pubescens</i> 1%; (Film 3%): formulation with containing extract of <i>Pterodon pubescens</i> 3%. Data reported as mean $\pm$ SD. * <i>p</i> < 005, one-way ANOVA with the Bonferroni <i>post-hoc</i>	67
Figure 5: Permeation profile of Film 1% and Film 3%. The amount of drug loading was 0.71 mg (1%) and 1.04 mg (3%) of vouacapano 404 <i>m/z</i> in each formulation. Data is expressed as mean $\pm$ standard deviation of n = 6 samples.....	68

Figure 6: Effect of mucoadhesivs films in <i>Streptococcus mutans</i> adherence biofilm. (A) Bacterial growth profile, presented by absorbance at 595 nm. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (n = 3). Statistical significance: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.....	70
Figure 7: SEM images of <i>Streptococcus mutans</i> biofilm.....	71
Figure 8: SEM images of <i>Streptococcus mutans</i> biofilm after treatment with mucoadhesive film (control).....	72
Figure 9: SEM images of the <i>Streptococcus mutans</i> biofilm after treatments mucoadhesive film containing sucupira ethanolic extract.....	73
Figure 10: Myeloperoxidase dosage of gingival homogenates of animals submitted to periodontal disease in the 7 - day treatment period with 3% extract and 3% mucoadhesive films. The vertical lines indicate the SEM, the asterisk indicates level of significance, * P <0.05, when compared to ligature. Statistical significance was determined by ANOVA one way followed by Bonferroni test. * P <0.0416.....	74
Figure 11: Image of animals receiving buccal treatments. A: only ligature, B: Extract 3%, C: Film 3%.....	74
Figure 12: Effect of treatments buccal with extract and Mucoadhesivs Film 3% <i>P. Pubescens</i> Benth on Alveolar Bone Resorption of rats submitted to periodontal disease. Periodontal disease was induced by ligature around second right upper molars. The hemimaxillae were dissected, photographed and measured for alveolar bone resorption (mm ²). Barrs represents the mean value $\pm$ standard error of the mean (SEM).....	75

Capitulo 2:

Figure 1: Schematic representation of lamellar cubic and hexagonal phase liquid lyotropic crystal systems (Adapted of Tresset, 2009).....	84
Figure 2: A pseudoternary phase diagram of oleic acid with 20%, PPG-5-CETETH-20 with 40%, water 40%. SF: phase separation; EMAY: emulsion high-viscosity; EMBV: emulsion low-viscosity; ST: translucent system; STBV: translucent system low-viscosity; STAV: translucent system high-viscosity; SLT: liquid translucent systems.....	90
Figure 3: Polarized light microscopy obtained from the formulations containing extract of <i>Pterodon pubescens</i> Benth. with and without PVA. A (F1): white formulation without PVA; B (F3): formulation containing extract of <i>Pterodon pubescens</i> Benth without PVA; C (F2): white formulation with PVA; D (F4): formulation containing extract of <i>Pterodon pubescens</i> Benth with PVA.....	91

Figure 4: Continuous rheological behavior for formulations F1, F2, F3 and F4. Empty symbols indicate an upward curve, and full symbols, a downward curve. 93

Figure 5: Bar graphs for the measurements of hardness, area of compression, area of adhesiveness and cohesion obtained by the TPA methodology. F1: white formulation without PVA; F2: white formulation with PVA; F3: formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth without PVA; F4: Formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth with PVA. 95

Figure 6: Cell viability indirect method in HGF-1 with liquid crystal system and *Pterodon pubescens* Benth formulations method indirect. (F1): white formulation without PVA; (F3): formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth without PVA; (F2): white formulation with PVA; (F4): formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth with PVA. Data reported as mean±SD. * $p < 0.05$, one-way ANOVA with the Bonferroni *post-hoc*..... 97

Figure 7: Permeation profile of F3 and F4. The amount of drug loading was 40, 32% F3 and 40, 56 F4, 1.22mg (F3) and 1.21 mg (F4) of vouacapane 404 *m/z* in each system. Data is expressed as mean ± standard deviation of $n = 6$ samples..... 98

Figure 8: Effect of crystalline liquid system in *Streptococcus mutans* formation biofilm. Bacterial growth profile, presented by absorbance at 595 nm. Data are presented as mean ± standard deviation ($n = 3$). Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 100

Figure 9: SEM images of *Streptococcus mutans* biofilm..... 100

Figure 10: SEM images of the *Streptococcus mutans* biofilm after treatments F1 (A) and with the formulation F3 (B) without PVA in the aqueous phase..... 101

Figure 11: SEM images of the *Streptococcus mutans* biofilm after treatments F2 (A) and with the formulation F4 (B) with PVA in the aqueous phase..... 101

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1:

Table 1: Percentage amounts of active compounds present at crude ethanolic <i>Pterodon pubescens</i> fruits extract.....	62
Table 2: size, polydispersity and zeta potential with different proportions of extract, evaluated by dynamic light scattering (Malvern Instruments) (mean $\pm$ standard deviation, n = 3).....	63
Table 3: Mechanical properties of mucoadhesive films formulation (mean $\pm$ standard deviation, n = 3).....	65
Table 4: Mucoadhesive force (mN), mucoadhesive films (control) and incorporated extract <i>Pterodon pubescens</i> (mean $\pm$ SD, n = 5).....	66
Table 5: Permeation parameter values obtained for permeation of vouacapane (404 <i>m/z</i>) (period: 1–8 h).....	68
Table 6: Result of visual reading of extract and mucoadhesive films formulation, in μg / mL in standard <i>Streptococcus</i> strains.....	69
Table 7: Activity antibacterial mucoadhesivs film formulation, in mg / mL in standard <i>Streptococcus</i> strains using the disk diffusion method.....	70

Capítulo 2:

Table 1: Composition (%) of water, the oil phase (oleic acid), and surfactant (PPG-5-CETETH-20) in the formulations.....	85
Table 2: Flow Behavior (<i>n</i>) and Consistency Index (<i>K</i>) of the Systems.....	93
Table 3: Mucoadhesion properties of the loaded unloaded formulation (n=3)....	96
Table 4: Permeation parameter values obtained for permeation of vouacapane (404 <i>m/z</i>) (period: 1–8 h).....	98
Table 5: Result of the visual reading of the crystalline liquid system and its white formulations in mg / mL in standard streptococcus strains.....	99

ABREVIATURAS

AIDS - *Acquired immune deficiency syndrome*

AR - Alisamento radicular

CCD - Cromatografia de camada delgada

CG - Cromatografia gasosa

CLS – *Crystalline liquid system*

D.O – Densidade Optica

DP - Doença periodontal

DPE - Doença periodontal experimental

EMAV - emulsion high-viscosity

EMBV - emulsion low-viscosity

ETOH - Extrato etanólico

HGF-1- Fibroblasto gengival humano

HPLC – *High performance liquid chromatography*

HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose

IM - Intra muscular

m/z: Relação massa/carga

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

min – Minuto

MPO - Mieloperoxidase

PVA - Polivinílico álcool

SF - phase separation

SISGEN - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SLC - Sistema liquido cristalino

SLT - liquid translucent systems.

ST - translucent system

STAV - translucent system high-viscosity

STBV - translucent system low-viscosity

TCA - Ácido tricloroacético

WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Revisão da Literatura	22
2.1 Doença Periodontal	22
2.2 Produtos Naturais	24
2.2.1. <i>Pterodon pubescens</i> Benth. (Sucupira)	26
2.3. Química Verde	28
2.4. Formas Farmacêuticas para uso odontológico	30
2.4.1. Filmes mucoadesivos bucais	33
2.4.2. Sistema Líquido cristalino	33
2.5. Modelo experimental de Doença Periodontal em ratos	35
2.6. Justificativa	36
3. Objetivo	37
3.1. Objetivo geral	37
3.2. Objetivo específico	37
4. Material e Métodos	38
4.1. Estudo fitoquímico	38
4.1.1. Obtenção do extrato etanólico	38
4.1.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e rendimento	38
4.1.3. Quantificação por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	39
4.2. – Desenvolvimento de filmes mucoadesivos	39
4.2.1. Preparo do PVA e incorporação do extrato	39
4.2.2. Caracterização por dispersão por luz dinâmica (DLS)	39

4.2.3. Caracterização por Microscopia de transmissão (MET)	40
4.2.4. Análise das propriedades Mecânicas	40
4.2.5. Mucoadesão para filmes	40
4.3. Desenvolvimento de sistemas líquidos cristalinos	41
4.3.1. Microscopia de luz polarizada	41
4.3.2. Análise por reologia Oscilatória	42
4.3.3. Análise de propriedades Mecânicas	42
4.3.4. Mucoadesão para sistemas líquidos cristalinos	43
4.4. Avaliação de citotoxicidade – extrato, filmes mucoadesivos e sistema líquido cristalino em fibroblastos gengivais humanos (HGF-1)	43
4.4.1. Cultivo celular	43
4.4.2. Preparo suspensão celular	44
4.4.3. Preparo e aplicação das amostras	44
4.5. Estudos de permeação <i>in vitro</i>	45
4.6. Avaliação antimicrobiana preliminar - extrato, filmes mucoadesivos e sistema líquido cristalino em bactérias bucais	46
4.6.1. Amostras de bactérias	46
4.6.2. Ajuste de inóculo	47
4.6.3. Método de difusão em ágar	47
4.6.4. Avaliação da eficácia das formulações na formação do biofilme	48
4.6.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
4.7. Estudo Farmacológico - Modelo de doença periodontal experimental em ratos (DPE)	48
4.7.1. Animais	49
4.7.2. Modelo de doença periodontal experimental	49

4.7.3. Dosagem de Mieloperoxidase (MPO)	50
4.7.4. Análise Morfométrica	50
5. Analise estatística	51
6. Resultados	52
6.1. Capítulo 1	52
6.2. Capítulo 2	82
7. Discussão Geral	108
8. Conclusão	121
9. Perspectivas Futuras	122
10. Considerações finais	123
11. Referências	124
12. Anexos	139
Anexo 1: Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 4378-1)	139
Anexo 2: SISGEN	140
Anexo 3: Depósito de Patente Nacional	141
Anexo 4: Depósito de Patente Internacional	154

1. Introdução

Esta Tese está de acordo com a Informação CCPG/001/2015, UNICAMP, de 17/06/2015, que regulamenta o formato alternativo para dissertação e tese, permitindo a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato. Os resultados desta Tese estão apresentados em 2 capítulos, onde cada capítulo corresponde a um artigo científico distinto para os quais estão em fase de submissão para revistas científicas.

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, compreendendo mais de 45.000 espécies de plantas superiores (20 -22% do total existente no planeta) (Dutra et al., 2016). A enorme biodiversidade vegetal pode fornecer insumos para gerar fitoterápicos, fitofármacos e protótipos de novas moléculas com importância econômica (Cragg & Newman, 2013). Em 2016, Cragg & Newman estimavam que aproximadamente 55,1% de todas as novas moléculas aprovadas no período de 1981 a dezembro de 2014, eram derivados diretamente ou indiretamente de produtos naturais.

Para a regulamentação das boas práticas de fabricação de medicamentos fitoterápicos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através da resolução RDC nº 17 de 16/04/2010 e RDC 26/2014 declarou que são necessários estudos prévios envolvendo aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, estudos farmacológicos e toxicológicos, além de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas, com comprovação de eficácia, segurança e reprodutibilidade para garantia da padronização do medicamento fitoterápico. O nosso grupo de pesquisa estuda a espécie *Pterodon pubescens* Benth. desde 2000, com abordagens de pesquisas nas áreas agrícola, química, tecnológica e farmacológica para obtenção de dados pré-clínicos de segurança, eficácia e reprodutibilidade que possam contribuir com dados para a produção de um medicamento fitoterápico.

A produção científica teve início com estudos de eficácia anti-inflamatória (Denny 2002), eficácia antinociceptiva (Spindola 2006), estudos de estabilidade e microencapsulação (Servat 2010), eficácia antinociceptiva e antitumoral (Spindola 2010), estudos de segurança- toxicidade (Sousa 2017), estudos da associação de extratos sucupira e *Cordia verbenacea* (Basting 2018) e estudos de sinergismo com frações da espécie sucupira (Grando 2018).

Diante do avançado estágio de pesquisa não clínica do grupo, surgiu a preocupação do desenvolvimento de tecnologias sustentáveis com solventes

orgânicos, menos tóxicos, considerando a química verde, que visa minimizar a aplicação de substâncias perigosas, utilizando técnicas de extração favoráveis ao meio ambiente e eliminando o uso de solventes orgânicos agressivos para o mesmo (Tundo, P. et al, 2000; Prado, 2003; Amit et al, 2016).

Dentre as espécies brasileiras nativas, os frutos da *Pterodon pubescens* Benth possuem diversas atividades farmacológicas relatadas, entre estas ações antinociceptiva, anti-inflamatória, antirreumática, antiparasitária (*shistosoma manssoni*) além de tônico e depurativo (Mors et al, 1966; Lorenzi, 1998; Carvalho et al, 1999; Sabino et al, 1999; Coelho et al, 2005; Menna-Barreto et al, 2008; Spindola et al, 2009, 2010, 2011; Dutra et al, 2016).

Desde 2010 a fitoterapia tem avançando entre os programas preventivos e curativos na área odontológica, estimulando o estudo dos extratos de plantas para o uso no controle do biofilme dental e outras afecções bucais, aumentando as pesquisas com produtos naturais no meio odontológico devido à busca por novos produtos com maior atividade terapêutica, com menor toxicidade e melhor biocompatibilidade, além de apresentarem custos mais acessíveis à população (Juiz, 2010).

As doenças periodontais são prevalentes em países desenvolvidos e em desenvolvimento, afetando cerca de 20 a 50% da população mundial (WHO, 2005). A alta prevalência da doença periodontal em adolescentes, adultos e idosos torna isso uma preocupação de saúde pública. Vários fatores de risco, como tabagismo, má higiene bucal, diabetes, medicação, idade, hereditariedade e estresse estão relacionados às doenças periodontais (Juiz, 2010; Kinane et al, 2017; Nazir, 2017).

O processo inflamatório das doenças periodontais é desencadeado e perpetuado por bactérias Gram-negativas como por exemplo: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Gram-positivas como *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius* e bactérias espiraladas como o *Treponema denticola* que colonizam o biofilme dental subgengival (Haffajee et al., 2003a; Ribeiro et al, 2015) estimulando uma resposta imune, cuja consequência é a destruição da matriz extracelular e reabsorção do osso alveolar, que pode acarretar na perda do elemento dental (Tonetti et al, 1997).

O tratamento clássico utilizado na doença periodontal é a raspagem, que pode ser feita manualmente e/ou com o uso de instrumentos ultrassônicos; e o alisamento radicular (AR), envolve a raspagem cuidadosa da raiz do dente com o

objetivo de reduzir a inflamação no estágio inicial, podendo em alguns casos ter reinfecção local (Mombelli et al, 2000; Colombo et al, 2006; Lopez et al, 2006).

Em relação aos tratamentos convencionais, sabe-se que a administração de antimicrobianos por um longo período de tempo pode ocasionar efeitos colaterais indesejáveis, tais como náuseas, vômito, diarreia, gastrite, úlceras, outros transtornos digestivos, alergias e desenvolvimento de resistência pelos microrganismos, diminuindo a razão risco/benefício para este tipo de tratamento (Friedman, Golomb, 1982; Ciancio, 1996; Bruschi, 2006).

Na finalidade de promover maior adesão ao tratamento por parte do paciente, o desenvolvimento de novas tecnologias têm sido propostos para a doença periodontal. O desafio da utilização do tratamento bucal é escolher dentre a grande variedade de produtos disponíveis o que melhor se encaixa no perfil do paciente, de acordo com o seu trabalho, rotina social e outras preferências individuais, tais como sabor, textura, viscosidade e duração do efeito (Furness et al, 2011). Os filmes flexíveis e as preparações semi-sólidas bioadesivas, compostas por polímeros biodegradáveis, apresentam maior potencial de eficácia e aplicação prática (Bruschi, 2006).

Este trabalho visou o desenvolvimento de um produto fitoterápico abrangendo diferentes áreas como fitoquímica, farmacotécnica e microbiológica na eficácia desta espécie, na intenção de viabilizar uma nova forma de tratamento coadjuvante aos procedimentos odontológicos.

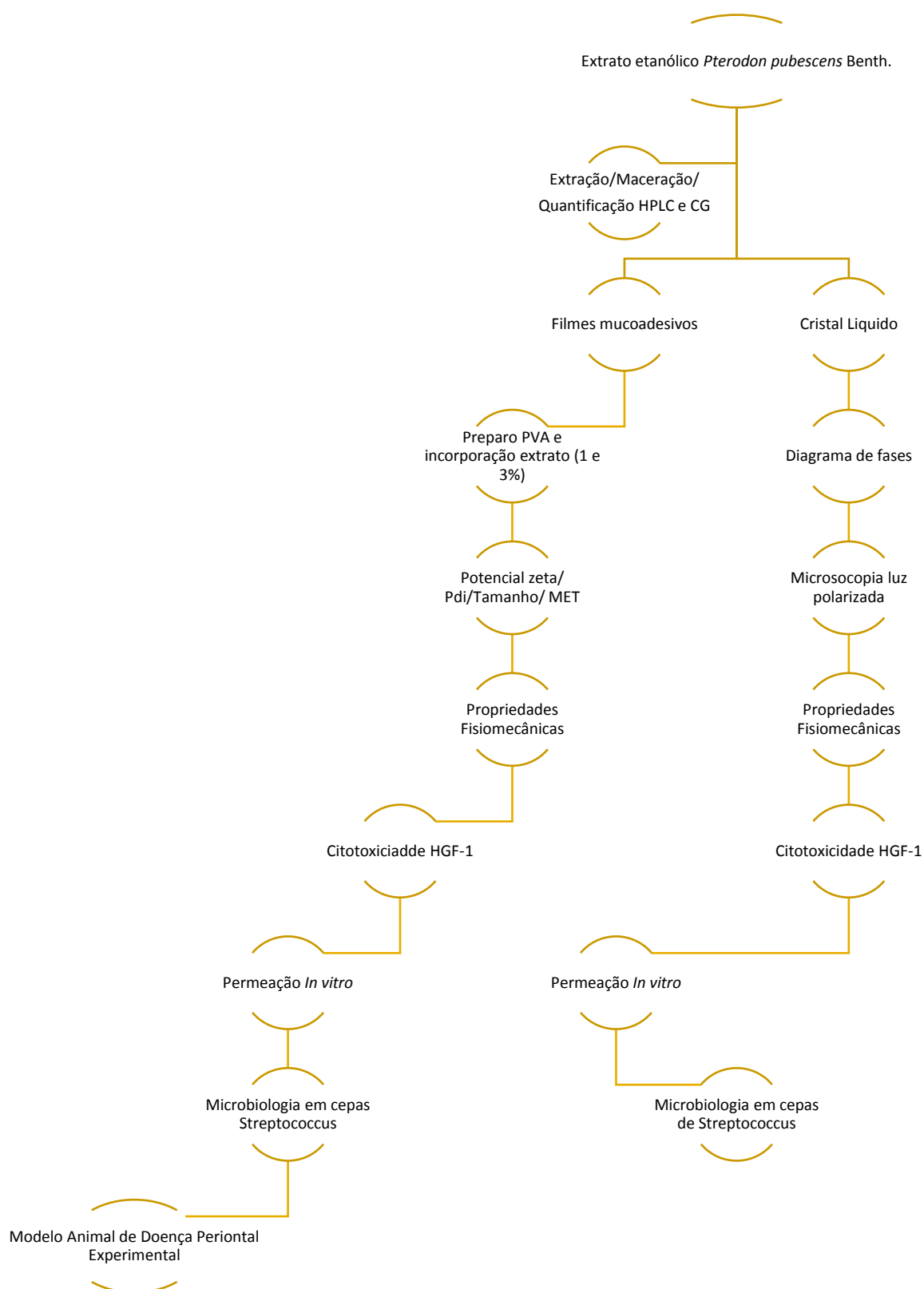


Figura 1: Fluxograma do delineamento experimental.

2. Revisão da Literatura

2.1. Doença periodontal

Reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública no mundo, a doença periodontal (DP) configura um importante fator de risco para várias doenças (Jain et al., 2008; Lim; Kim, 2014). Fatores predisponentes para doença periodontal inflamatória incluem a idade avançada, hereditariedade, anatomia desfavorável, tabagismo, estresse psicológico e algumas desordens sistêmicas, como diabetes *mellitus* insulino dependente, neutropenia e AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*). A diabetes *mellitus* é a doença sistêmica mais prevalente e pesquisada que predispõe à periodontite, com prevalência e gravidade aumentadas em indivíduos com diabetes *mellitus* de longa duração e, em particular, em pacientes com diabetes *mellitus* mal controlada. As predisposições genéticas foram consideradas importantes tanto para o início como para a progressão da periodontite, com estimativas de hereditariedade elevadas como 50% (Michalowicz et al., 2000; Borrell, Papapanou, 2005; Kinane et al., 2017).

A prevalência da doença periodontal na população brasileira apresenta-se elevada, caracterizada por 22% moderada e 6% grave, adultos com idade mais avançada, sexo masculino, presentes naqueles com menor escolaridade, menor renda familiar (Vettore et al, 2013). Estimava-se que nos EUA, em 2012, pelo menos 47% dos adultos com 30 anos ou mais tinham periodontite (Papapanou, 2012).

A doença periodontal é uma condição prevalente que pode ser definida como uma inflamação crônica dos tecidos periodontais causada pela infecção bacteriana e advém de um processo de desequilíbrio entre as ações de agressão e defesa sobre os tecidos de sustentação e proteção dos dentes (Lim; Kim, 2014). A gengivite se manifesta quando a inflamação atinge apenas o periodonto de proteção, ou como periodontite, quando ocorre também o comprometimento do periodonto de sustentação (Arora, Mishra, Chugh, 2014; Medeiros, 2018).

O agente etiológico primário das doenças periodontais inflamatórias é o biofilme microbiano, composto principalmente por bactérias colonizadoras da superfície dentária. A persistência dos biofilmes microbianos, em íntima proximidade aos tecidos periodontais, possibilita contínuo estímulo antigênico, tornando a resposta inflamatória inicialmente aguda, com predomínio de alterações vasculo-exsudativas e degradação de colágeno, em lesão crônica. Esta última é

caracterizada por proliferação do epitélio juncional abaixo da junção cimento-esmalte (Fig 2), com formação de bolsa periodontal, além de contínua destruição do colágeno, ativação de fibroblastos e fagócitos, acúmulo de células polimorfonucleares e mononucleares, predominantemente linfoplasmocitárias, e reabsorção óssea alveolar (Listgarten, 2000; Kinane et al, 2017).

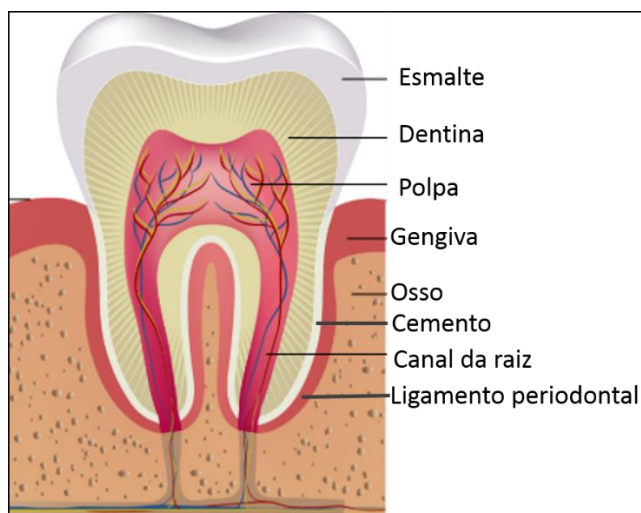


Figura 2: Imagem da junção cimento- esmalte do periodonto.

A deficiência da higiene oral leva a um aumento de microrganismos, ocorrendo mudanças locais, o que leva o aparecimento de novas espécies, dentre as principais bactérias podemos citar espécies Gram-positivas, do gênero *Streptococcus* e *Actinomyces*, e Gram-negativas como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermédia*. Na gengivite, observa-se a presença de Gram-positivos como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces naeslundii*. Na periodontite, destacam-se proporções elevadas de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermédia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, entre outras (Mombelli, 2002; Eto et al, 2003; Kinane et al, 2017).

A evolução da doença periodontal tem início com a gengivite (inflamação da gengiva), podendo progredir para periodontite crônica (que envolve o tecido ósseo). Quando o processo inflamatório progride em direção ao ligamento periodontal, ocorrendo perda do osso alveolar e migração apical das fibras do próprio ligamento periodontal com formação de bolsas periodontais, este processo é denominado periodontite (Kinane, 1999; Kinane et al, 2017).

Para realizar o tratamento, o paciente deve se dirigir ao dentista, que vai retirar a placa através de raspagem e alisamento dos dentes. As cirurgias podem ser indicadas caso os procedimentos citados não atinjam toda a área da raiz comprometida. Mesmo com o tratamento adequado, pode haver sequelas como deslocamento na posição do dente e retração gengival. Para diminuir esses efeitos, existem procedimentos cirúrgicos e protéticos e, às vezes, antibioticoterapia. (Almeida et al., 2006).

Devido ao alto grau inflamatório da doença com aumento expressivo de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), os agentes anti-inflamatórios esteroidais (glicocorticoides) e não-esteroidais (salicilatos, pirazolonas, inibidores seletivos da enzima cicloxigenase) têm sido estudados e utilizados como adjuvantes ao tratamento mecânico de limpeza realizado pelo dentista (Cetin et al, 2004, 2005). A utilização de antimicrobianos e/ou anti-inflamatórios por via sistêmica pode causar vários efeitos colaterais indesejáveis como: gastrite, úlcera e outros transtornos digestivos, hipersensibilidade e desenvolvimento de resistência pelos microrganismos (Friedman e Steimberg, 1990; Souza et al, 2012).

2.2. Produtos naturais

Os produtos naturais, em particular as plantas, têm sido a base da medicina tradicional com registros que datam de cerca de 2600 aC, que documentam o uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia. As espécies vegetais continuam desempenhando um papel essencial na área da saúde e seu uso por diferentes culturas tem sido amplamente disseminado (Monteiro, 2014).

Pesquisadores estimava que aproximadamente 75% de todas as novas drogas aprovadas no período de 1981 a dezembro de 2014, foram derivados diretamente ou indiretamente de produtos naturais (Cragg & Newman, 2016). Através da síntese química, as pesquisas para a utilização adequada de produtos naturais como agentes terapêuticos, especialmente os derivados de plantas, seguem crescentes. Aproximadamente metade das aprovações de novos medicamentos no mercado tem estruturas relacionadas aos compostos presentes nos produtos naturais. Isto se explica devido às estruturas químicas complexas e com atividades

farmacológicas clinicamente significativas serem atribuídas aos metabólitos secundários produzidos por espécies vegetais (Harvey, 2007; Stratton et al., 2015).

O território brasileiro possui uma vasta biodiversidade e permite que o país se estabeleça de maneira estratégica para desenvolver a exploração racional e sustentada de novos metabólitos com valor terapêutico (Hansen et al., 2010). Cerca de 10.000 trabalhos neste âmbito foram publicados por brasileiros em revistas científicas internacionais entre 2011 e 2013 (Dutra et al., 2016).

Desde o início do século 21, as pesquisas relacionadas a produtos naturais cresceram significativamente frente ao aumento pela busca por produtos com menor toxicidade, maior atividade farmacológica e biocompatíveis, além de custos mais acessíveis à população (Francisco, 2010).

Trabalhos publicados têm demonstrado o uso de produtos naturais na terapia odontológica utilizando diferentes formas farmacêuticas. Singh et al (2008) desenvolveram um gel estável para uso bucal com o extrato aquoso liofilizado da camomila (*Matricaria recutita* L) para utilização no tratamento da mucosite em pacientes que se submeteram a radioterapia na região do pescoço e cabeça. Estudos do nosso grupo (Servat-Medina, 2014) utilizando a planta *Arrabidaea chica* demonstraram *in vitro* a potencial atividade das nanopartículas de *A. chica* na proliferação e migração de fibroblastos e *in vivo* demonstraram a atividade promissora em úlceras de mucosa, bem como a atividade na cicatrização de úlceras de pele.

Bruschi (2006) propôs o desenvolvimento de dois sistemas para liberação de *Apis mellifera* no interior da bolsa periodontal (poloxamer 407 e carbopol 934P®), e esses sistemas demonstraram liberação controlada por um período de no mínimo 7 dias no interior da bolsa, promovendo sua ação na prevenção das cáries e no tratamento de doenças periodontais. O óleo essencial de sálvia (*Salvia officinalis*) tem sido usado em formulações farmacêuticas, possuindo um largo espectro de ação antifúngica com atividade contra dermatófitos, *Candida sp.* e fungos filamentosos (Pinto et al, 2007).

Desde 2000, os produtos de higiene oral com ativos de origem vegetal foram mais estudados com protocolos mais modernos que comprovaram a eficácia da utilização de determinadas plantas no tratamento das doenças bucais com benefícios à população. As indicações usuais até então mencionadas foram o

tratamento de inflamações, odontalgias e processos cicatriciais, destacando-se a decocção, a maceração e a infusão como formas de utilização (Coutinho et al, 2004; Lima Júnior et al, 2005).

2.2.1. *Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira)

Dentre as espécies encontradas na flora brasileira, o gênero *Pterodon* se destaca por suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Este gênero compreende quatro espécies nativas do Brasil: *P. abruptus* Benth., *P. apparucuri* Pedersoli, *P. pubescens* Benth, (sinonímia botânica – *P. emarginatus* Vog,) e *P. polygalaeflorus* Benth. A espécie *Pterodon pubescens* Benth., é uma árvore da família das Leguminosae-Papillonoideae, conhecida popularmente como faveiro, sucupira, sucupira-branca ou sucupira lisa, é nativa dos cerrados brasileiros, sendo encontrada em estados como Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia e Sergipe (Carvalho et al, 2004) (Fig 3).

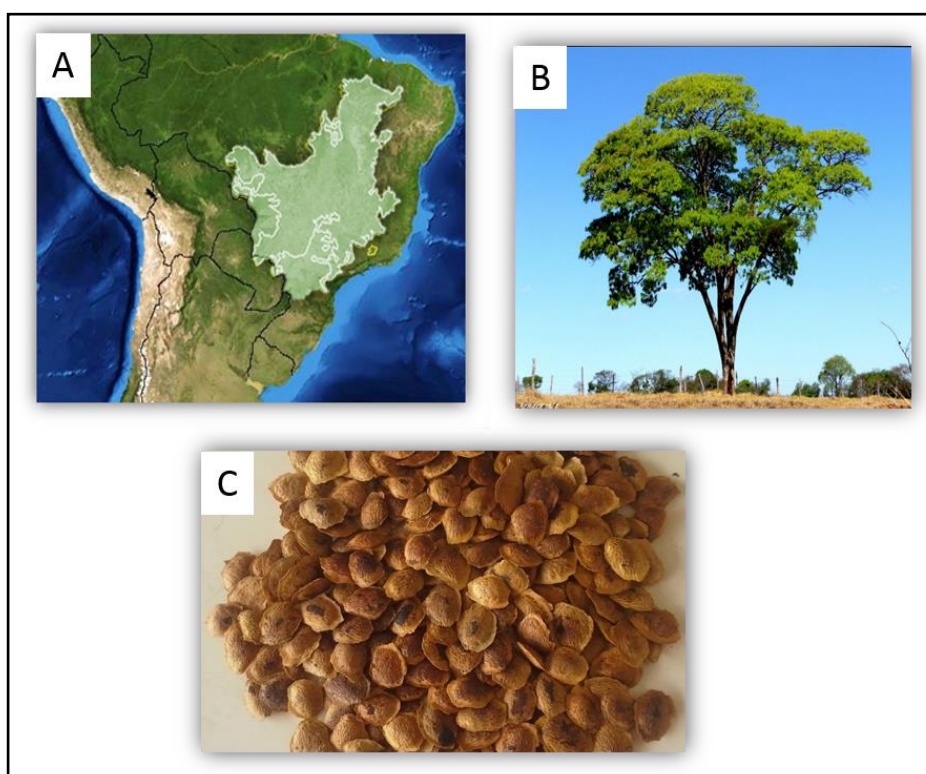


Figura 3: *Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira). Fonte: Servat, 2010. A: região do cerrado; B: árvore da espécie *P. pubescens*; C: frutos obtidos da *P. pubescens*.

Entre os compostos envolvidas com as propriedades biológicas de *Pterodon* estão os diterpenos cíclicos (vouacapanos) e o diterpeno acíclico

geranilgeraniol (Fig 4). Os vouacapanos podem ser encontrados em outros gêneros da família Fabaceae, além de *Pterodon pubescens* Benth. (Spindola et al, 2010; Galceran et al, 2011; Nucci et al, 2012).

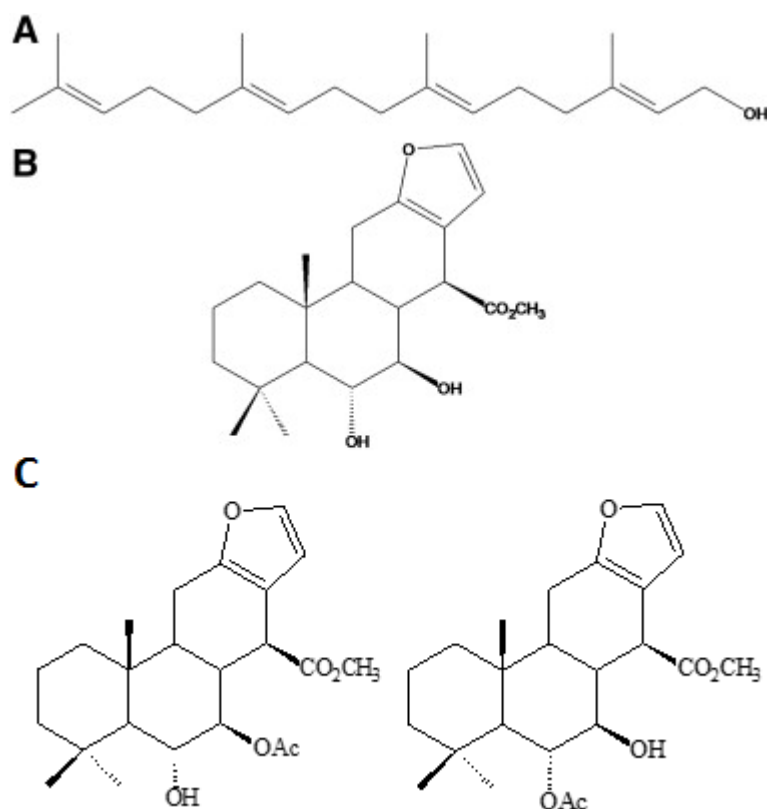


Figura 4: Estruturas químicas dos compostos presentes na *P. pubescens* Benth: A) geranylgeraniol, B) 6 α -7 β -diidroxidovouacapano-17 β oato de metila e C) éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila, éster 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapano-17 β -oato de metila.

O óleo dos frutos da sucupira é muito utilizado na medicina popular, uma vez que confere proteção contra infecção por cercaria de *Schistosoma mansoni*, (Mors et al, 1966; Menna-Barreto et al, 2008) e também como analgésico (dores na coluna, dor de garganta, reumatismo), e até mesmo como tônico (fortificante) e depurativo (Lorenzi, 1998). O efeito antimicrobiano do óleo essencial obtido dos frutos de *P. emarginatus* frente a *Staphylococcus aureus* e a atividade das frações hexânica e butanólica contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi relatada por Dutra et al (2009b).

Cardoso et al. (2008) demonstraram a atividade supressora em linfócitos T e B relacionada à atividade anti-inflamatória do extrato etanólico dessa espécie.

Essa atividade também foi observada no estudo realizado por Velozo et al. (2013), que verificaram que o óleo essencial da espécie *P. Polygalaeflorus* também modulou a inflamação aguda e a ativação dos linfócitos B e T.

Devido às suas propriedades farmacológicas, os frutos deste gênero são comumente comercializados em mercados populares (Dutra et al, 2009) e diversas metodologias já foram utilizadas para comprovar sua atividade anti-inflamatória (Carvalho et al, 1999; Falcão et al, 2005). Com relação à atividade antinociceptiva, Dutra et al. 2008 relataram que o óleo essencial, frações hexânicas e butanólicas dos frutos de *P. emarginatus* foram ativas no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Silva et al. (2004) demonstraram atividades anti-edematogênica de uma fração, rica em sesquiterpenos, da qual foi identificado o composto $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapano. Atividade antiartrite do extrato hidroalcoólico dos frutos *P. pubescens* também foi demonstrada, após tratamento oral prolongado de animais com artrite induzida por colágeno II (Sabino et al, 1999; Coelho et al, 2005). Sugere-se que o ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapan-17 β -óico possivelmente esteja envolvido com a atividade anti-inflamatória da espécie, que foi identificado na fração ativa (Spindola et al, 2009, 2010, 2011).

Trabalhos recentes como de Nucci-Martins et al (2015) avaliaram o efeito antinociceptivo do extrato etanólico dos frutos *P. pubescens* em modelos experimentais de dores neuropáticas e observaram os efeitos anti-inflamatórios da espécie em estudo sem causar efeitos colaterais como sedação ou disfunção locomotora. Resultados esses que sugerem a inibição de receptores vanilóides sensíveis a capsaicina (TRPV1) e citocinas pro-inflamatórias. Visando o desenvolvimento de um fito medicamento, da Silva Santos et al (2016) desenvolveram uma nanoemulsão utilizando diferentes métodos extrativos, sendo o extrato mais eficaz obtido por fluido supercrítico e incorporado na formulação, obtendo melhor índice de seletividade e atividade significativamente melhorada contra os parasitas.

2.3. Química Verde

A preocupação e o cuidado com o meio ambiente, muito em evidência nas últimas décadas, levaram à geração de protocolos para diminuição da poluição química em diversos países (Clark, 1996; Anatas, 2002). Dentro da problemática, a Química Ambiental estuda os processos químicos que ocorrem na natureza, sejam

eles naturais ou causados pelo homem. O interesse neste momento é o desenvolvimento de medidas que possam beneficiar o meio ambiente e, conseqüentemente, favorecer a sobrevivência do ser humano e, nesse contexto, verificam-se possibilidades de mudança, por meio da abordagem dos princípios da Química Verde (Prado, 2013).

A ideia da química verde tem suas raízes no desenvolvimento sustentável com utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzem ou eliminem os usos de solventes, reagentes ou a geração de produtos e subprodutos que são nocivos à saúde humana ou ao ambiente. Existem doze princípios que regem esse conceito, os quais são apresentados de maneira resumida na figura 5 (Lenardão et al., 2003; Correa e Zuin, 2012; Prado, 2013; USEPA, 2013).

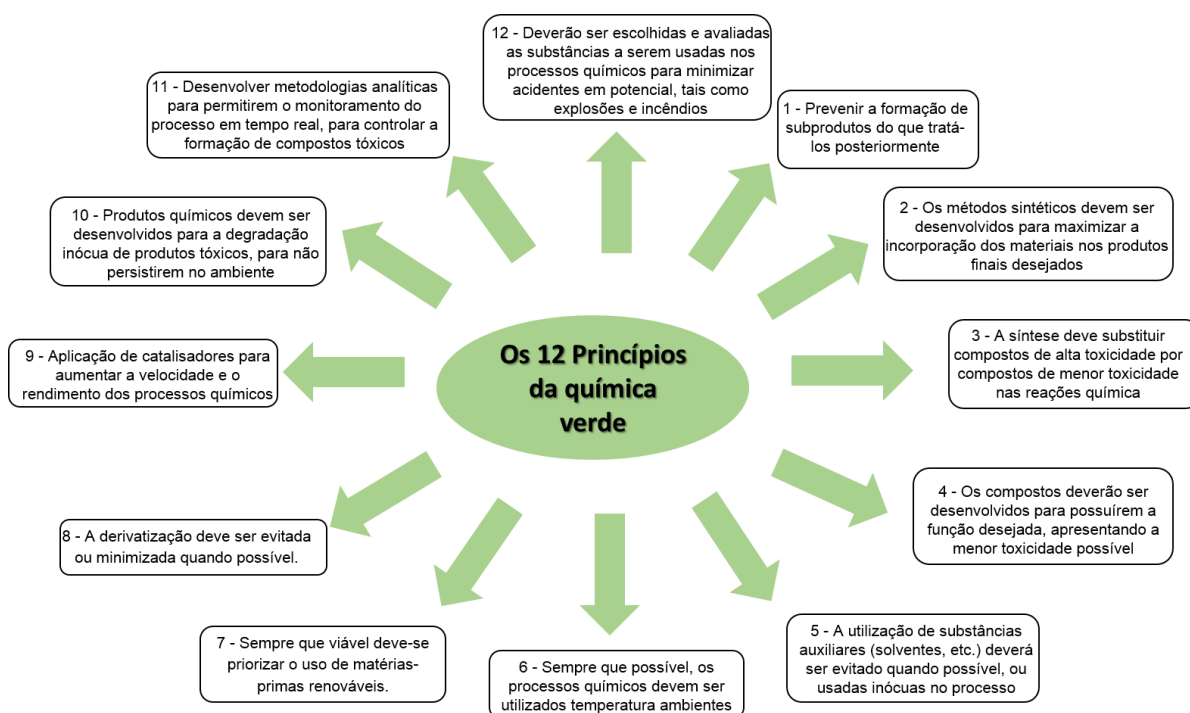


Figura 5: Os 12 princípios da química verde.

A aplicação da química verde tem estado muito presente na área da química analítica, apresentando muitas vantagens como, por exemplo, incluindo novos métodos de obtenção de amostra, a utilização de menos solventes, redução das etapas de tratamento da amostra, diminuição do diâmetro, tamanho e partícula da coluna cromatográfica empregada (Filippou et al, 2017).

A importância da escolha adequada de solventes em diferentes ramos de trabalho é de seriedade e valia, uma vez que poderão representar grande impacto ambiental (Dunn, 2012). O diclorometano é um solvente orgânico que tem sido usado extensivamente em ambientes industriais (por exemplo, como solvente de extração). Devido à sua volatilidade, é encontrado principalmente no ar, e a exposição predominante para a população em geral ocorre por inalação (principalmente de emissões industriais e uso de produtos de consumo), afetando os sistemas respiratório, nervoso, cardiovascular, hepático e renal, além de ser genotóxico e carcinógeno (Schlosser et al, 2015). Pode ser encontrado um guia de solventes menos tóxicos para a substituição do diclorometano na separação de diversos compostos (Taygerly et al, 2012).

A importância da seleção e substituição de um solvente por outro deve levar em conta parâmetros como o rendimento final do produto e os gastos energéticos provenientes dessa substituição, para que a sustentabilidade do processo se mantenha consistente (Welton, 2015).

2.4. Formas farmacêuticas para uso odontológico

A mucosa bucal apresenta uma extensa área de tecido liso, imóvel, expansível e com espessura entre 500 a 800 μm , possuindo uma área ideal para aplicação de sistemas de liberação prolongada hidrofílicos, tais como peptídeos, oligonucleotídeos e polissacarídeos (Langoth et al, 2005). Em comparação com a pele, a mucosa bucal é de 4 a 4000 vezes mais permeável (Sood et al, 2005), porém é menos permeável que a mucosa sublingual, facilitando o controle da absorção sistêmica (Pedrazzi, 1999). Apesar de apresentar muitas vantagens, a administração bucal apresenta algumas limitações, devido, principalmente, à secreção contínua da saliva (0,5 a 2 L/ dia), o que pode levar à diluição e possível ingestão do fármaco e, em última instância, à remoção involuntária da forma farmacêutica (Hearnden et al, 2012; Fonseca-Santos, 2017).

A via bucal oferece várias vantagens em relação à via oral (Harris, 1992, Fonseca-Santos, 2017); uma delas é não ter o metabolismo hepático de primeira passagem e a degradação gastrointestinal do fármaco (Junginger, 1999). Além disso, é facilmente acessível para administração pelo paciente e adequada para administração e remoção de formas de dosagem. Entretanto, a deglutição acidental

dos sistemas de liberação e a dissolução contínua pela saliva são algumas limitações, com consequente diminuição na biodisponibilidade dos fármacos (Senel e Hincal, 2001; Pessanha et al, 2012).

Um dos desafios no desenvolvimento de formulações tópicas bucais é prolongar o tempo de residência da forma farmacêutica no sítio de aplicação (Patel, Liu e Brown, 2012, Fonseca-Santos 2018). As formulações para liberação bucal devem possuir algumas características como: boa mucoadesão, alta resistência contra mecanismos de remoção fisiológica, proporcionar contato prolongado da formulação com a mucosa e possuir propriedades de liberação prolongada (Sandri et al, 2004). O álcool polivinílico (PVA) tem sido utilizado como polímero mucoadesivo, pois forma filmes flexíveis, elásticos e permeáveis ao vapor, que ao mesmo tempo apresentam uma grande compatibilidade com pigmentos e agentes umectantes (Ikeuchi-Takahashi, Kobayashi, Onishi 2017).

Os sistemas mucoadesivos têm despertado grande interesse na pesquisa e desenvolvimento, sobretudo em sistemas que possam melhorar a absorção, como também novas formas de dosagem de medicamentos convencionais como, por exemplo comprimidos/pastilhas, gomas de mascar, *sprays*, *waffles*, filmes, hidrogéis e microesferas (Boddupalli, 2010).

A teoria da mucoadesão compreende mecanismos que estão envolvidos na formação de ligações adesivas, tais como; a) teoria da adsorção (ação das forças secundárias como Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas), b) eletrônica (diferença de cargas e transferências de elétrons entre os materiais adesivos e a mucosa), c) molhabilidade - hidratação (interação tecido e sistema mucoadesivo), d) difusão (interpenetração do polímero nas cadeias de mucina) e e) fratura (a força necessária para separar duas superfícies em contato através de forças mucoadesivas). Os mecanismos de adesão são compostos de 2 estágios: estágio de contato, onde se estabelece um contato entre o sistema e a mucosa, e estágio de consolidação, onde ocorre formação de novas ligações entre o polímero e o muco (fig 6) (Carvalho et al., 2010).

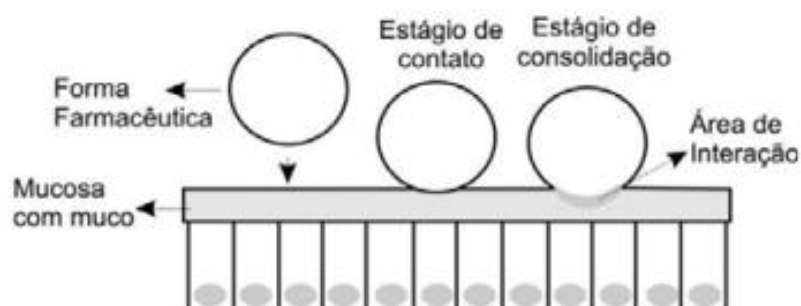


Figura 6: Mecanismos de mucoadesão (Lyra et al, 2007).

Na mucoadesão são utilizados polímeros natural ou sintético a um substrato biológico, ou seja, para aumentar a duração do contato entre o veículo contendo o fármaco e a superfície da mucosa. É um método prático de imobilização ou localização, sendo uma novidade importante em sistemas de liberação. Este tipo de sistema pode melhorar a eficácia do tratamento, mantendo a concentração do fármaco no nível terapêutico, inibindo a diluição do fármaco em fluidos biológicos, e permitindo o direcionamento do fármaco para locais específicos (Laffleur, 2014).

As formulações mucoadesivas utilizam como componente adesivo os polímeros, que formam líquidos viscosos quando hidratados, aumentam o tempo de retenção sobre a superfície da mucosa e proporcionam interações adesivas. Os polímeros bioadesivos devem possuir algumas propriedades físico-químicas, incluindo hidrofiliabilidade, grupos formadores de ligação de hidrogênio, flexibilidade para interpenetração no muco e tecido epitelial e propriedades viscoelásticas. Além disso, não devem ser tóxicos, nem irritantes, ter boa espalhabilidade, serem biodegradáveis e biocompatíveis, aderindo rapidamente à mucosa bucal (Sudhakar et al, 2006; Laffleur, 2014).

Os novos sistemas capazes de modificar a liberação de fármacos liberando-os na quantidade adequada num determinado local de absorção possuem algumas vantagens sobre os sistemas de liberação convencionais, como por exemplo, a redução de efeitos colaterais e a frequência de administração; além do direcionamento do fármaco para o local de ação específico. No caso da via bucal, a biodisponibilidade de fármacos tem sido melhorada com o uso de formas farmacêuticas bioadesivas, pois estas prolongam o tempo de residência do fármaco

no local de ação, além de alcançar uma liberação sustentada (Cid, 2009; Fonseca-Santos, 2017).

2.4.1. Filmes mucoadesivos bucais

Uma opção para a liberação sustentada de fármacos são os filmes, obtidos a partir de polímeros derivados de celulose, naturais e sintéticos. Os sistemas de administração de fármacos baseados em formas farmacêuticas mucoadesivas têm sido utilizados em doenças locais e sistêmicas com diferentes métodos de aplicação, incluindo o epitélio mucoso ocular, nasal, oral, retal e vaginal (Abd El Azim et al, 2015; Morales et al, 2017).

Muitos polímeros mucoadesivos foram testados nas formas bioadesivas como comprimidos, géis, unguentos e filmes para determinar sua capacidade de prolongar o tempo de permanência e aumentar a biodisponibilidade. Os filmes apresentam flexibilidade, suavidade, tamanhos variados e demonstram adaptação do paciente em comparação com outras formas farmacêuticas (Nafee et al, 2004; Kundu, 2008; Giovino et al, 2012, Kraisti et al, 2017,2018).

Na literatura temos alguns exemplos de filmes mucoadesivos; Rana et al (2013) incorporaram uma nanosuspensão de carvedilol em camadas de hidropropilmetilcelulose (HPMC) e Carbopol 934P[®] formando filme e comparou com comprimidos orais quanto aos parâmetros farmacocinéticos (C_{max} e T_{max}), concluindo que os filmes apresentaram uma melhora na biodisponibilidade. Mohamad et al (2017) avaliaram filmes de quitosana e álcool polivinílico com cianocobalamina em um estudo *in vivo*, e avaliaram um dos parâmetros farmacocinéticos (area under the curve – AUC), evidenciando aumento de 1,5 vezes na biodisponibilidade da cianocobalamina em comparação com a injeção intramuscular (I.M.) comercializada.

2.4.2. Cristais Líquidos

Os cristais líquidos (CL) são mesofases auto-organizadas com propriedades intermédias entre sólidos cristalinos e líquidos isotrópicos, sendo classificados: termotrópicos e liotrópicos dependendo do parâmetro físico-químico responsável pela sua transição (Fonseca, 2015; Chaud et al., 2017). Os termotrópicos são cristais líquidos em que sua estabilidade está diretamente

relacionada à temperatura. Já para os cristais líquidos liotrópicos, com o aumento da concentração de tensoativos, podem ser formadas diferentes formas líquido-cristalinas: lamelares, hexagonais e cúbicas (Formariz et al, 2005; Cremonez et al, 2013).

Os cristais líquidos liotrópicos estão atraindo cada vez mais a atenção pelas suas propriedades físico-químicas e microestrutura única. Moléculas bioativas, como fármacos e proteínas, podem ser solubilizadas tanto na fase aquosa quanto na fase oleosa, sendo protegidos de hidrólise ou oxidação, além de terem sua liberação modulada (Guo et al, 2010).

Os CL liotrópicos são formados pela mistura de uma molécula anfifílica e solvente, como óleos e água que, em uma temperatura e concentrações desses dos solventes, podem se organizar em um mesofase. As mesofases liotrópicas podem ser consideradas micelas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. Conforme o aumento da concentração de tensoativo, diferentes formas líquidas cristalinas podem ser formadas, como lamelares, hexagonais e cúbicas, respectivamente (Patel & Patel, 2010; Chorilli et al, 2011).

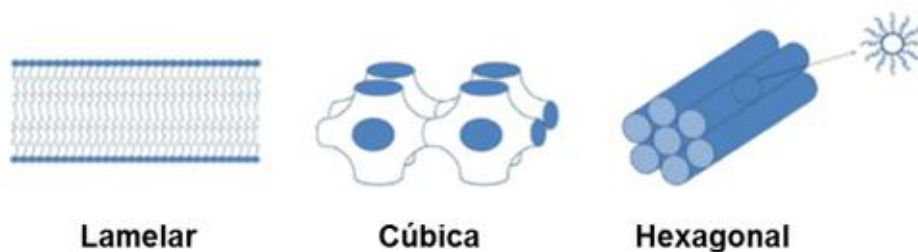


Figura 7: Representação esquemática de sistemas líquidos cristalinos liotrópicos de fase lamelar, cúbica e hexagonal (Adaptado de KIM et al, 2015).

Devido à sua maior área de superfície, os cristais líquidos liotrópicos proporcionam aumento na permeação do fármaco e podem ser um veículo promissor para a administração tópica (Estrancanholi et al, 2014). Cristais líquidos liotrópicos também são sistemas de liberação de fármacos eficientes tanto para compostos hidrofílicos como hidrofóbicos (Otto et al, 2009; Kim et al, 2015).

A mesofase lamelar (Fig 7) consiste em bicamadas alternadas de moléculas ordenadas de tensoativo e de solvente, de modo que as cadeias hidrofóbicas do tensoativo são o centro da lamela e sua parte hidrofílica está em

contato com a camada de solvente. Essa fase é caracterizada por sua fluidez e anisotropia na forma de cruz de malta (Wang & Zhou, 2009).

A fase cúbica, também conhecida como fase isotrópica viscosa, é formada por micelas normais (fase contínua polar) ou reversas (fase contínua apolar) empacotadas em arranjo cúbico. Não é birrefringente quando observada em microscópio de luz polarizada como as fases lamelar e hexagonal (Yariv et al, 2010; Calixto, 2013) (Fig 7).

A fase hexagonal consiste em micelas empacotadas em arranjo hexagonal (Yariv et al, 2010); pode ser classificada como fase reversa, formada por canais aquosos circundados pelas cabeças polares do tensoativo, com a porção apolar localizada ao redor dos cilindros, ou pode ser classificada em fase normal, onde as cabeças polares do tensoativo localizam-se na região externa dos cilindros. Essa fase apresenta-se anisotrópica ao campo de luz polarizada, com estruturas estriadas (Calixto, 2013) (Fig 7).

O uso de cristais líquidos apresenta vantagens como sistema de liberação de fármacos, promovendo melhor estabilidade física e amplo potencial para solubilização de fármacos (Chorilli et al, 2011).

2.5. Modelo experimental de doença periodontal em ratos

Ao contrário de outras doenças infecciosas humanas, que não têm correspondentes em outras espécies, a doença periodontal inflamatória é comum no reino animal. Diferentes modelos animais podem ser utilizados para se avaliar a patogênese ou até mesmo as modalidades terapêuticas possíveis com relação à doença periodontal inflamatória. É importante ressaltar, porém, que a anatomia da junção dento gengival da região de molares de rato é muito semelhante àquela descrita no homem, tornando o estudo experimental da doença periodontal inflamatória nesses animais uma ferramenta bastante válida (Klausen, 1991; Weinbeg; Bral, 1999; Aral et al, 2015).

Em ratos, este modelo experimental pode ser induzido por meio de manipulação dietética (Garant, 1979; Klausen, 1991; Robinson, 1991), da inoculação de microrganismo periodontal patogênico ou de seus produtos (Klausen, 1991; Fiehn, 1992) e, ainda, por meio da colocação de ligaduras ao redor da região cervical do molar do animal (Gyorfi, 1994; Klausen, 1991; Lohinai, 1998), geralmente o

primeiro molar superior ou inferior, que funcionam como sítio para colonização bacteriana.

Os modelos animais têm sido amplamente utilizados em benefício da compreensão da patogênese da doença periodontal inflamatória e na avaliação de suas variadas modalidades terapêuticas. Embora não se possam esperar respostas idênticas a agressões semelhantes entre as diferentes espécies, modelos animais podem funcionar como modelos de tendências biológicas e fornecer informações impossíveis de se obter em humanos (Struillou et al, 2010).

Neste sentido, os ratos geralmente são alvo de estudos experimentais da doença periodontal inflamatória, devido às grandes semelhanças com os humanos em relação à arquitetura da região de molares, inclusive da junção dentogengival, baixo custo para obtenção e manuseio, fácil manuseio e disponibilidade de utilização de várias raças com diferentes estados microbiológicos e imunológicos (Klausen, 1991, Weinberg; Bral, 1999, Struillou et al, 2010).

Além da anatomia periodontal do animal (*Rattus norvegicus*) ser semelhante ao homem, eles desenvolvem o biofilme bacteriano e apresentam a histopatologia das lesões periodontais (Klausen, 1991; Struillou et al, 2010).

2.6. Justificativa

Diante do avançado estágio de dados promissores não clínicos produzidos por nosso grupo, que determinam os parâmetros de eficácia, padronização e segurança de extratos e compostos isolados da sucupira, procurou-se avançar no desenvolvimento de formulação para uso odontológico. O principal desafio para atender a essa hipótese foi relacionar a interação entre o ambiente biológico foco do estudo (sistema estomatognático) e a formulação mais adequada de acordo com as características físico-químicas dos ativos a serem incorporados.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Desenvolvimento de formulações para uso odontológico contendo o extrato padronizado dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth.

3.2. Objetivos Específicos

- Obter o extrato etanólico dos frutos da *Pterodon pubescens* Benth; monitorar o teor dos vouacapanos marcadores da espécie vegetal presentes no extrato bruto produzido e padronizado;
- Desenvolver filmes mucoadesivos contendo extrato de *P. pubescens*; verificar a eficácia antimicrobiana *in vitro* em Streptococcus e também na formação do biofilme bacteriano; caracterizar físico quimicamente, além das técnicas mecânicas e de medida da força mucoadesiva;
- Desenvolver cristais líquido contendo extrato de *P. pubescens*; verificar a eficácia antimicrobiana *in vitro* na microbiota bucal e também na formação do biofilme bacteriano; caracterizar físico quimicamente, além das técnicas reológicas, mecânicas e de medida da força mucoadesiva;
- Avaliar sobre a viabilidade celular em cultura celular de fibroblastos gengivais humanos (HGF-1) o efeito do extrato etanólico, filmes mucoadesivos e sistemas líquidos cristalino;
- Avaliar o perfil de permeação das formulações em filme e sistema líquidos cristalino em modelo *in vitro* empregando epitélio de mucosa de esôfago de porco em célula de difusão vertical do tipo Franz;
- Implantação do Modelo de Doença Periodontal experimental *in vivo*;
- Avaliar no Modelo experimental de Doença Periodontal em ratos a melhor formulação proposta, bem como analisar as dosagens de mieloperoxidase nas gengivas e da perda óssea alveolar.

4. Material e Metodos

4.1. Estudo Fitoquímico

4.1.1. Obtenção do extrato etanólico (EBE)

Os frutos de *Pterodon pubescens* Benth. foram coletados na cidade de Ponto Chique – MG (16° 37' 51"S, 45° 3' 57"W) no mês de setembro de 2013 e identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do departamento de Botânica do Instituto de Biologia IB-UNICAMP. As exsicatas foram depositadas no Herbário do IB-UNICAMP sob número 1398-1402. O acesso ao patrimônio genético – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) foi autorizado conforme processo A0FC528.

Foi realizado processo de maceração que consiste em moer os frutos com gelo seco em moinho de facas (Stephen modelo UM40), e em seguida foram adicionados etanol como solvente extrator, três vezes, em períodos de uma hora e meia cada, na proporção de 5:1 (solvente: material vegetal). O extrato foi filtrado e concentrado utilizando vácuo em rotaevaporador (Buchi RE 120).

4.1.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e rendimento

Inicialmente realizou-se uma análise de triagem em cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando cromatoplasmas TLC Sílica gel 60F₂₅₄ (Merck®), nas dimensões de 10 cm altura x 5 cm largura. Foram adicionados na mesma placa os padrões isolados e identificados de Geraniolgeraniol (m/z 288) e dos vouacapanos 6 α -7 β -diidroxidovouacapano-17 β oato de metila (m/z 362) e éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila, éster 6 α -hidroxi-7 β - acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila (m/z 404).

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de hexano/acetato de etila (6:4) v/v. Após a eluição da placa em fase móvel, as mesmas foram visualizadas sob luz UV a 264 e 365 nm (Câmara U.V. Solab®) e posteriormente reveladas com uma solução de anisaldeído/ ácido sulfúrico concentrado/ ácido acético glacial na proporção 1/1/48 (v/v/v) respectivamente e levadas a estufa (Precision®) /a 100 °C por aproximadamente 3 minutos.

4.1.3. Quantificação por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A análise feita para a quantificação dos óleos essenciais foi realizada utilizando um sistema CG (cromatografia gasosa) Agilent 6890N. A temperatura FID (detector de ionização de chamas) foi máxima de 250 ° C. Para obter a mesma ordem de eluição com *Gas chromatography with mass detection* (GC-MS), a auto injeção simultânea foi realizada em duplicata na mesma coluna, aplicando as mesmas condições operacionais. As quantificações foram realizadas usando o padrão analítico α -Humuleno, *trans*-cariofileno e geranilgeraniol (Sigma Aldrich Saint Louis, EUA) (Basting et al, 2019).

Para a análise dos compostos vouacapanos por HPLC foi utilizado o sistema HPLC-DAD (Shimadzu) que consistiu em coluna de fase reversa C18 (Gemini -C18 250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μ m) com 10 μ L de injeção de amostra. A fase móvel foi uma mistura de 70:30 Acetonitrila: água com 0,1% de ácido acético (v: v). A taxa de fluxo e o comprimento de onda UV foram fixados em 1 mL / min e 220 nm, respectivamente (Basting et al, 2019).

4.2. Desenvolvimento dos filmes mucoadesivos

4.2.1. Preparo do PVA e incorporação do extrato

A solução de álcool polivinílico (PVA) 3% foi preparada por dispersão do polímero em água deionizada, mantida em agitação com aquecimento a 100 °C durante 24 horas. A mistura foi filtrada através de um funil de placa porosa e depositada em moldes de Teflon® para evaporação da água à temperatura ambiente e consequente formação dos filmes. O extrato etanólico de *P. pubescens* em concentrações de 1 e 3% foram adicionados à solução de PVA (antes da formação do filme).

4.2.2. Caracterização de dispersão de luz dinâmica (DLS)

Para a avaliação do tamanho, potencial zeta e polidispersidade das formulações foi utilizado à técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) com o Zeta sizer, modelo Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As soluções de PVA contendo extrato de *P. pubescens* em concentrações de 1 e 3 % foram diluídas (1:100) e colocadas na cubeta para posterior leitura.

4.2.3. Caracterização por Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das nanopartículas foi analisada no Centro de Microscopia e Imagem (CMI) da FOP – UNICAMP no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), marca JEOL, modelo JEM 1400, origem Tóquio-Japão na voltagem de 80 kV. Para o preparo das amostras, as mesmas foram diluídas em água destilada (1:100) e depositadas em um disco de cobre recobertas com Formvar/Carbon.

4.2.4. Análise de propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes de controle e mucoadesivos foram avaliadas em um analisador de textura TA-XT2 (*Stable Micro Systems*), utilizando-se uma sonda de tração com extremidade esférica (5 mm). As seções de filme foram fixadas num suporte metálico com um orifício circular ($D = 10 \text{ mm}$) e a sonda foi movida no sentido apical - basal a 1 mm s^{-1} . Durante o teste, a velocidade foi constante ($0,1 \text{ mm.s}^{-1}$). A força de gatilho foi de 0,005 Kg e as curvas de força versus deslocamento foram registradas até a ruptura do filme para determinar os parâmetros de força de perfuração (P_s) e energia de perfuração (E_p), segundo as equações (Eqs. (1) - (2)) (Limmatvapirat et al, 2007; Meneguín et al., 2014, Meneguín et al, 2017):

$$P_s = F / A \quad (1)$$

Onde $F \text{ (N)}$ é a força necessária para fraturar o filme, e $A \text{ (m}^2\text{)}$ é a área seccional do filme ($A = 2rh$, em que r é o raio do orifício e h é a espessura do filme).

$$E_p = AUC / V \quad (2)$$

Finalmente, AUC significa a área sob força de curva versus deslocamento, e V é o volume do filme ($V = \pi r^2 h$, em que r é o raio do orifício e h é a espessura do filme) colocado na placa de orifício.

4.2.5. Mucoadesão para filmes

A mucoadesão dos filmes de controle e mucoadesivos foram avaliadas em um analisador de textura TA-XT2 (*Stable Micro Systems*). As mucosas suínas dos esôfagos frescos (4 cm^2) foram colocadas em um suporte para teste de mucoadesão, e os filmes também foram cuidadosamente anexados a uma sonda

cilíndrica (10 mm), usando fita adesiva dupla face. A sonda foi movida para baixo a uma velocidade constante de 10 mm min^{-1} até atingir uma força de compressão predeterminada (0,5 N). Para garantir o contato com a mucosa, a amostra foi introduzida (1 mm de profundidade) na superfície da mucosa e mantida por 60 s, sem aplicação de força, durante a fase de contato. Em seguida, a sonda foi movimentada a uma velocidade de 20 mm min^{-1} e a força de mucoadesão (mN) correspondente à força máxima de desprendimento (N) foi medida. Antes da análise, os filmes foram pré-hidratados com tampão fosfato em pH (pH 6,8), a 37°C por 1 min (Meneguín, 2017).

4.3. Desenvolvimento dos Cristais Líquidos

Os cristais líquidos foram preparados com álcool cetílico propoxilado e etoxilado – PPG-5-CETETH-20 (Croda®) (“Tensoativo), ácido oleico (Synth®) (“FO” fase oleosa, ácido graxo insaturado, emoliente/hidratante), ‘água (“FA” fase aquosa) e álcool polivinílico –PVA (adicionado junto na fase aquosa equivalente a 10%). As concentrações utilizadas para os sistemas desenvolvidos foram: F1: 40%T, 20% FO (fase orgânica) e 40% FA (fase aquosa); F2: 40% T, 20% FO e 30% FA e 10% PVA a 3%; F3: 40% T, 20% FO e 40% FA e acrescido de 30 mg do extrato etanólico de *P. pubescens*; F4: 40% T, 20% FO e 30% FA e 10% PVA a 3% e acrescido de 30 mg do extrato etanólico de *P. pubescens*

Os sistemas F2 e F4 foram acrescidos de 10% de PVA na FA para conferir a viscosidade e diminuindo assim a concentração de água (FA) para 30%. Todos os componentes foram misturados à temperatura ambiente com auxílio de bastão de vidro e deixados em repouso por um período de 24 horas até completo equilíbrio de fases e eliminação de bolhas. A tabela 1, item 2.2 (capítulo 2) ilustra a composição dos sistemas líquidos cristalinos desenvolvidos.

4.3.1. Microscopia de Luz Polarizada

Os cristais líquidos foram observados utilizando microscópio óptico, Leica® modelo DMLM (Cambridge, Inglaterra). As medidas foram obtidas no modo de luz transmitida com as ampliações de 50,100 e 200 vezes com uso de luz polarizada. As análises foram realizadas no laboratório de Caracterização de

Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

4.3.2. Análise por reologia oscilatória

As análises reológicas foram realizadas na Faculdade de Engenharia Mecânica – Universidade Estadual de Campinas, pelo doutorando Ms. Jose D'avilla. A caracterização reológica foi realizada utilizando o reômetro Anton-Paar MCR-102 Modular Compact. Os testes foram conduzidos usando uma geometria placa-placa (PP50-1) com 50 mm de diâmetro e uma folga de 1 mm. Todos os testes foram realizados a 25 ° C em triplicata. As medições da viscosidade foram realizadas na faixa de 0,01 a 100 s⁻¹.

Ostwald-de-Waele modelo de lei de poder:

$$\eta = m\dot{\gamma}^{n-1}$$

η : Viscosidade (Pa.s)

m : Índice de consistência (Pa.sⁿ)

$\dot{\gamma}$: Taxa de cisalhamento (1/s)

n : Índice de direito da força (-)

4.3.3. Análise de propriedades mecânicas

A análise textura-perfil (TPA) foi realizada para determinar as propriedades mecânicas das formulações, tais como dureza, compressibilidade, adesão e coesão. As amostras (50 g) foram pesadas e colocadas em tubos de centrífuga cónicos de 50 mL (Falcon). Em seguida, eles foram centrifugados em uma centrífuga Sorvall TC6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 2.665 × g por 4 minutos para garantir a uniformidade da superfície e remover as bolhas de ar. Estes tubos foram então transferidos para um banho termostático regulado a 32° C para imitar a temperatura da pele. Um analisador de textura TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) foi programado para comprimir uniaxialmente a 1 mm / s até uma profundidade predefinida (10 mm) e, em seguida, retornar à superfície a uma velocidade de 0,5 mm / segundo. Após 5 segundos, uma segunda compressão foi aplicada sob as mesmas condições. Todas as amostras foram analisadas em triplicata (Meneguín, 2017).

4.3.4. Mucoadesão para sistemas líquidos cristalinos

As formulações foram colocadas em tubos cônicos de centrífuga, e mantidas em banho termostático a 37 °C. Mucosas frescas foram fixadas com borracha elástica na sonda cilíndrica. A sonda cilíndrica foi abaixada para permitir que a mucosa estivesse em contato com a superfície da amostra. O tempo de contato foi de 60 segundos e a sonda foi removida. Este experimento foi realizado em triplicata utilizando equipamento de análise de textura.

4.4. Avaliação de citotoxicidade - extrato, filmes mucoadesivos e sistema líquido cristalino em fibroblastos gengivais humanos (HGF-1)

O laboratório da divisão Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), que possui uma área desenvolvida para cultura de células *in vitro* tumorais e não tumorais. Os testes foram realizados utilizando condições assépticas em ambiente controlado de fluxo laminar biológico, utilizando materiais e reagentes esterilizados de acordo com a natureza de cada um.

Para este experimento foi utilizada a linhagem de fibroblastos gengivais humanos (HGF-1 ATCC® CRL- 2014™), gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Ramiro M. Murata da *East Carolina University (ECU), de Greenville/NC*.

4.4.1. Cultivo celular

Os fibroblastos foram cultivados em frascos de 25 cm² (T25) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco®) e mantidos a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Durante os experimentos, uma solução de penicilina: estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 1 mL/L RPMI 1640 - meio de cultura desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute) foi adicionada ao meio de cultura. Para os fibroblastos aderidos, o desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500 µL de tampão fosfato (PBS, pH 7,0) para eliminar resíduos de meio de cultura e, após aspiração do tampão, foram adicionados 500 µL de tripsina-EDTA 2,5 g.L⁻¹ (Vitrocell®), a 37° C, até que se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI + SFB 5% e uma alíquota dessa suspensão foi transferida aos novos frascos, completando-se o volume para 5 mL.

4.4.2. Preparo da suspensão celular

No primeiro dia de experimento, a suspensão celular foi preparada com meio RPMI com 10% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg. $^{-1}$ L). Foram inoculados 100 μ L da suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido (Monks et al., 1991; Shoemaker, 2006).

4.4.3. Preparo e aplicação das amostras

O extrato etanólico dos frutos da *P. pubescens* foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1 g.mL⁻¹. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em meio de cultura RPMI com 10% de SFB e penicilina: estreptomicina (2 mg/L), o que evitou a toxicidade do DMSO. O extrato, filme mucoadesivos (1 e 3%) e cristal líquido (F1, F2, F3 e F4), foram adicionados nas microplacas (dez amostras por microplaca) nas concentrações de 0,48; 0,97; 1,95; 3,90; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250 μ g/mL (100 μ L/compartimento) em triplicata e, a seguir, foram incubados por 48 horas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido (Figura 8).

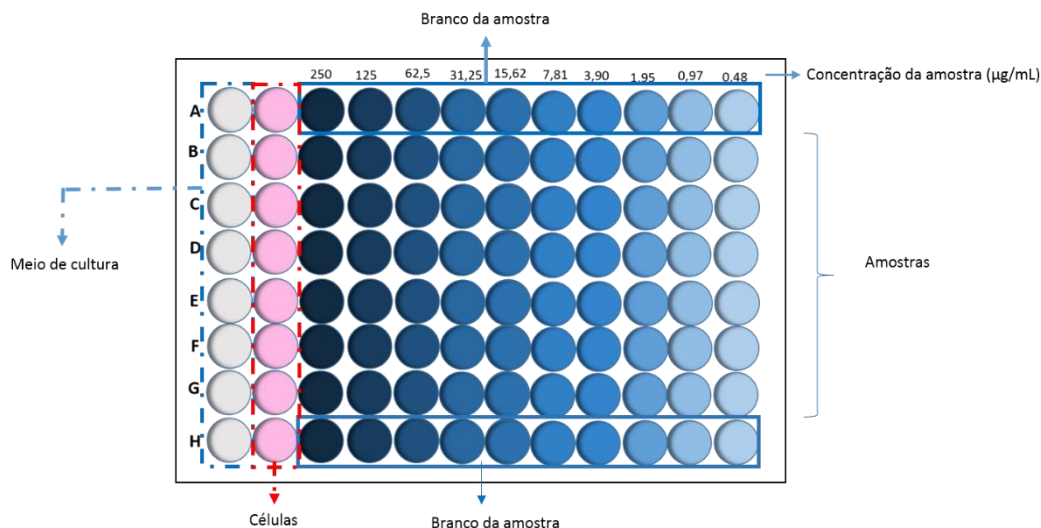


Figura 8: Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no teste de viabilidade celular.

Após as 48 horas, as células foram fixadas com a adição de 50 μ L/compartimento de ácido tricloroacético a 50% (TCA) e incubadas por 1 hora, a 4° C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas em água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, Soro Fetal Bovino (SFB) e metabólitos secundários. Na sequência foram mantidas à temperatura ambiente até

a secagem completa. Após a secagem, foram adicionados 50 µL/compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich®) a 0,4 % (p/v) dissolvido em ácido acético a 1 % (v/v) e, a seguir, as placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 10 minutos.

As placas foram então lavadas por quatro vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% (v/v) e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma-Aldrich®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

A sulforrodamina B é um corante proteico que se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, há mais células viáveis (Skehan et al, 1990; Rubinstein et al, 1990; Monks et al, 1991).

4.5. Estudos de permeação *in vitro*

Estudos de permeação *in vitro* foram realizados utilizando células de difusão vertical do tipo Franz com área de permeação de 0,6 cm² e volume do compartimento receptor de 4,7 mL. Os ensaios foram realizados com epitélio de esôfago de porco, obtido de um frigorífico local (Frigorífico Angelelli Ltda., Localizado em Piracicaba, São Paulo, Brasil), segundo método descrito por Diaz del Consuelo (2005). O uso de epitélio de esôfago de porco demonstrou ser um modelo de barreira equivalente ao epitélio bucal, uma vez que apresenta características histológicas, permeabilidade e composição epiteliais semelhantes (Diaz del Consuelo, 2005).

A mucosa esofágica apresenta algumas vantagens, incluindo maior área de superfície, ausência de danos causados pela mastigação e fácil preparo. Resumidamente, dentro de 2 horas de abate, a mucosa esofágica de porco foi cuidadosamente separada do tecido circundante com um bisturi. Mucosas com qualquer dano visual na superfície foram descartadas. O epitélio foi separado do tecido conjuntivo após imersão em água deionizada a 60° C por 2 min sendo utilizado imediatamente. Esta temperatura demonstrou ser incapaz de alterar a integridade ou a permeabilidade do tecido. O epitélio foi colocado sobre um filtro de celulose de 0,45 µm, com o lado conectivo do tecido voltado para o filtro de membrana, devido à sua

fragilidade. O filtro de membrana evita danos no epitélio, sem alterar a permeação do fármaco.

O filme mucoadesivo, epitélio e filtro de membrana foram fixados entre os compartimentos doador e receptor. Água - solução de etanol (50:50, v / v) foi utilizada no compartimento receptor para manter as condições de afundamento. O experimento foi realizado a 37° C durante 8 h, sob agitação magnética (400 rpm). Amostras (300 µL) foram retiradas periodicamente do compartimento receptor e imediatamente substituídas pelo mesmo volume de solução, levando-se em conta os efeitos da diluição. As amostras foram transferidas para frascos de cromatografia e armazenadas em geladeira até a análise por HPLC para quantificação de vouacapano (404 *m / z*). Após a quantificação por HPLC, os parâmetros de permeação do extrato etanólico de sucupira foram calculados, tais como: tempo necessário para permeação inicial ou intervalo de tempo; coeficiente de fluxo e permeabilidade. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (n = 6).

4.6. Avaliação antimicrobiana preliminar - extrato, filmes Mucoadesivos e dos sistemas líquido cristalino com *P. pubescens* em bactérias bucais

4.6.1. Amostras de bactérias

Foram utilizadas cepas de diferentes espécies de *Streptococcus*, como descritos: *Streptococcus mitis* (NCTC 12261); *Sptreptococcus oralis* (ATCC 10557); *Streptococcus sanguinis* (SK36), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073); *Streptococcus gordonii* (NCTC7868), *Streptococcus mutans* (UA159).

Todas as amostras foram armazenadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP. O extrato etanólico e os filmes foram testados quanto à atividade antimicrobiana, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato em diferentes cepas de *Streptococcus* spp. por meio de técnica de microdiluição em caldo, em busca da concentração inibitória mínima (CIM). O inóculo foi transferido do estoque com glicerol mantido em congelamento à -20° C para o meio de cultura *Mitis Salivarius* Agar (MSA) por 24h em estufa de 10% CO₂, e depois transferido para o caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), incubado *overnight* sob as mesmas condições.

4.6.2. Ajuste do inóculo

O inóculo foi ajustado com solução salina, comparando-se a turbidez com a escala de Mac Farland (0,5), equivalente a uma absorbância de 0,08 a 0,10 a 625nm no espectrofotômetro, seguida de diluições em salina e em Müller-Hinton (Sigma-Aldrich®). O inóculo foi padronizado a $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, seguindo as recomendações do protocolo M2-A6 (CSLI, 2003- documento de padronização desenvolvido pelo *Clinical Laboratory Standards Institute*). Em uma microplaca esterilizada foram depositados 100 µL do meio Müller-Hinton, 100 µL do extrato e filmes nas concentrações citadas abaixo diluídos em Tween 80® a 0,05% + meio de cultura e 100 µL do inóculo ajustado. A placa foi incubada a 37° C, 10% CO₂ por 24 horas. Os grupos testados foram: NC: controle negativo, contendo apenas o meio de cultura Müller Hinton; PC: controle positivo, contendo apenas o meio de cultura e o inóculo, para observar o crescimento da bactéria; EBE na concentração inicial de 2,5 mg/mL; Filmes mucoadesivos na concentração inicial de 25 mg/mL (1 e 3 %) (tabela 6 – capítulo 1) com incubação das microplacas em 37° C $\pm$ 1° C, por 2 h. A concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato e dos filmes capaz de inibir o crescimento visível das bactérias. Foram realizados três experimentos independentes e em triplicata.

4.6.3. Método de difusão em ágar

O método de difusão em ágar seguiu as recomendações do protocolo M2-A6 (CSLI, documento de padronização desenvolvido pelo *Clinical Laboratory Standards Institute*). Discos de papel secos e estéreis foram usados. Os filmes mucoadesivos foram cortados com cortador de papel com 6 mm de diâmetro esterilizado com luz UV por 30 minutos de exposição em cada lado. O procedimento foi realizado como segue: As placas contendo ágar Mueller Hinton pré-preparado foram mantidos à temperatura ambiente até geleificação; os inoculos noturnos pré-incubados foram ajustados para 2×10^8 UFC / mL e com um *swab* estéril, 100 µL foram distribuídos uniformemente sobre a superfície do ágar, deixado em repouso à temperatura ambiente por aproximadamente 3 minutos. Usando uma pinça estéril, os discos de papel foram distribuídos uniformemente sobre a superfície do ágar e as amostras de filmes mucoadesivos foram colocadas em cima dos discos de papel. As placas foram incubadas em estufa a 37° C em 10% de CO₂ durante 24 horas. O halo

de inibição do crescimento foi medido utilizando um calibre digital. Os testes foram realizados em triplicatas.

4.6.4. Avaliação da ação da formulação na Formação de Biofilme

As formulações foram testadas em biofilme de *Streptococcus mutans* (AU159). A cultura foi incubada durante a noite em BHI em 10% de CO₂ a 37° C. O inóculo foi ajustado para 0,05 de D.O. (Densidade óptica) e adicionado à placa em BHI + 1% de sacarose. Em uma placa de microdiluição foram depositados 100 µL de meio BHI, 100 µL de formulação na concentração de 0,08 µL / ml e depois diluições seriadas da concentração do grupo de tratamento. Posteriormente, 100 µL de inóculo ajustado e incubado por 24 horas. Após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes com água destilada e 150 µL de violeta de cristal em cada cavidade da placa durante 30 minutos. Após este período, a placa foi lavada com 3x de água destilada, a secagem completa era esperada. O corante foi então solubilizado com álcool a 96° C durante 30 minutos e a absorbância lida a 575 nm no espectrofotômetro de microplaca. Os testes foram realizados em triplicatas e independentes.

4.6.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a leitura da formação do biofilme, as amostras foram centrifugadas para formar pellets, em seguida foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (pH 7,4) e depois adicionadas a glutaraldeído a 2% durante 30 min. As amostras foram então desidratadas utilizando enxaguamentos sequenciais de etanol a concentrações de 50, 70, 90% e etanol absoluto. Cada concentração de lavagem foi usada duas vezes. As amostras foram revestidas com ouro por 120 segundos (BAL-TEC SCD 050, Balzers Liechtenstein). A análise das amostras foi realizada usando um microscópio eletrônico de varredura operando a uma aceleração de 15 KV (JSM-5600 Lv; JEOL, Tóquio, Japão).

4.7. Estudos Farmacológica - Modelo de Doença Periodontal Experimental em ratos

4.7.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas (300 a 350 g), provenientes do CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório e transferidos para o biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA, sob o comitê de ética: 4378-1, de acordo com a legislação nacional vigente pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Brasil. Os animais (n=5) foram mantidos em gaiolas apropriadas, todos receberam água e alimentação *ad libitum*, mantidas em ambiente controlado (luz entre 7 h e 19 h e temperatura média de 23° C).

4.7.2. Modelo de Doença Periodontal Experimental (DPE)

O modelo de doença periodontal experimental utilizado foi realizado como previamente descrito (Crawford et al, 1978; Koide et al, 1995). A doença periodontal foi induzida através de ligadura com fio de nylon 4-0 (Shalon[®]). Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina (80 mg/kg) (Dopalen – Sespo, Jacareí/SP, Brasil) e Cloridrato de Xylazina (Rompun – Bayer do Brasil, São Paulo/SP, Brasil) (10 mg/kg), via intraperitoneal e, após a imobilização dos mesmos, os animais foram colocados em um dispositivo cirúrgico BR018170001122 apropriado para facilitar o acesso aos dentes posteriores mandibulares. Com auxílio de uma lima endodôntica nº 25, por entre as faces proximais (mesial e distal) do primeiro molar inferior esquerdo, criando espaço para a passagem de um fio de nylon 4-0 (Shalon[®]) que foi transpassado ao redor do mesmo dente. Após a colocação do fio, foi dado um nó duplo de reforço.

Os animais foram divididos em 4 grupos: Grupo I (6 ratos) satélite não tratado, Grupo II (8 ratos) apenas doença periodontal por colocação de uma ligadura em torno dos dentes molares, Grupo III (8 ratos) doença periodontal com tratamento tópico com extrato etanólico *Pterodon pubescens* Benth., Grupo IV (8 ratos) doença periodontal com tratamento tópico com filmes mucoadesivos contendo *P. pubescens*.

O implante do fio de nylon induziu a progressão da doença periodontal sendo avaliada por sete dias. Os animais receberam o extrato e o filme mucoadesivo ambos a 3%, uma vez ao dia, via bucal. Para avaliar a evolução da doença periodontal, os animais foram eutanasiados no oitavo dia, e os tecidos gengivais

foram removidos para a avaliação do biomarcador de inflamação MPO (mieloperoxidase) e as mandíbulas para análise de perda óssea.

4.7.3. Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

A dosagem de MPO foi avaliada de acordo com o método Kaplow descrito por Bradley et al. (1982). Para a quantificação da MPO, fragmentos gengivais da região de molares inferiores foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 (na relação de 100 mg de tecidos para cada 1 mL de tampão) com HTAB - brometo de hexadecil-metil-amônio 0,5% (250 mg de HATB para 50 mL de tampão) e congelada a – 80° C. As amostras foram homogeneizadas em triturador IKA (Disperser T 10 basic, Staufen, Germany) e posteriormente centrifugadas por 10 minutos 12.000 rpm a 4° C. Em placas de 96 poços, pipetou-se 30 µL do sobrenadante em duplicata e, em seguida, 270 µL de tampão substrato (0,167 mg/mL de orto-dianisina e 0,002% de H₂O₂ em tampão fosfato - 1µL de H₂O₂ para cada 50 mL) foram adicionados à preparação. Para o branco utilizou-se 300 µL do tampão substrato. A atividade de MPO por mg de tecido foi medida usando 0,0005% de peróxido de hidrogênio como substrato para MPO. Durante o ensaio, como o peróxido de hidrogênio foi degradado, ocorreu a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de um composto em cor marrom - dianisidina. Os resultados foram expressos como atividade de MPO / mg de tecido.

4.7.4. Análise morfométrica

As hemimandíbulas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio (3%) por 3h para remover o excesso de tecido. Após esse procedimento, as hemimandíbulas foram coradas com azul de metileno a 1% (30 minutos) para demarcar a junção cimento-esmalte (JEC). Em seguida, seguiu-se o registro fotográfico utilizando uma câmera digital, Canon (D40, Melville, NY, EUA). As medidas foram feitas ao longo da raiz do primeiro dente molar inferior (duas raízes). Essas áreas foram avaliadas pelo software ImageJ (Software ImageJ® 1.32j, National Institutes of Health; EUA) como descrito anteriormente por Lima (2004).

5. Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão da média dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni para comparação entre o grupo controle e os grupos testes. O programa estatístico utilizado foi o *GraphPad Prism 5*[®]. O nível de significância mínimo utilizado foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Capítulo 1 – Development, Evaluation and Characterization of a Novel Mucoadhesive Film containing *Pterodon pubescens* Benth ethanolic extract in dentistry

Mariana Cecchetto Figueiredo, Leila Servat Medina, Fabiana Zanutto Volpe, Ilza Maria de Oliveira Sousa, Rosanna Tarkany Basting, Lucia Braga, Ellen Cristina Souza de Oliveira, Simone Nataly Busato de Feiria, Bruno da Fonseca Santos, Marlus Chorilli, Ramiro Mendonça Murata, Mary Ann Foglio

Abstract

Periodontal diseases comprise a number of infectious and inflammatory conditions brought about by the interaction between supragingival and subgingival biofilms and the host inflammatory response. Studies of oral hygiene products with active plant ingredients have increased with modern protocols that validate the efficacy of plants for the treatment of oral diseases, such as periodontal. *Pterodon pubescens* Benth, known as sucupira, has anti-inflammatory and analgesic properties. Studies have described pharmacological activities describing efficacy, demonstrating antinociceptive, anti-inflammatory, anti-edematogenic, antiarthritis, antiproliferative and antiplatelet activities, confirming the logic of the plant's folk-use. Films have advantages such as self-administration, rapid dissolution, being a versatile platform in drug administration. The objective of this study was to develop a mucoadhesive film formulation for dental use. Films were prepared using Poly (vinyl alcohol) and physical chemical characteristics, mechanical properties and mucoadhesion analyses were performed. Cytotoxicity studies using fibroblasts were also accomplished. The antibacterial activity of the films was investigated against *Streptococcus* spp. Results showed the presence of nanoparticles of 200 to 500 nm and crystals, with a higher extract concentration of the PZ increases, presents *PDI* of 0.5 and decreases the nanoparticles. The mechanical properties were characterized by high strength and low energy drilling with low mucoadhesion. Permeation studies demonstrated that the best outcome was achieved with a mucoadhesive film containing 30 mg *P. pubescens* (3%) in relationship to film containing 10mg (1%) that after 8 h released $33.84 \pm 3.14 \mu\text{g}$ and $21.14 \pm 7.27 \mu\text{g}$ respectively, which approximately 41% and 29% 404 m / z permeation. Data reported herein report mucoadhesive film with 3% *P. pubescens* extract to be a promising candidate for development of a new oral formulation for dental use.

Keywords: *Pterodon pubescens* Benth, Natural product, Nanotechnology, *Pterodon pubescens* Benth, Poly (vinyl alcohol).

1. Introduction

Periodontal disease is a general term that describes different pathological conditions that cause weakness, chronic inflammation, and erosion of alveolar bone

and gingival tissue. Gingivitis localized inflammatory process is initiated by bacteria in the dental plaque, which is a microbial biofilm that forms in the teeth and gingiva (Davoudi, 2017; Kinane et al, 2017).

The treating initial periodontal disease is a timely and accurate diagnosis, as the loss of periodontal bone and soft tissue is incremental and largely irreversible, and it is particularly difficult as early periodontal disease is painless and patients rarely seek early care. Indeed, the early symptom of gingivitis is bleeding while brushing; pain is rarely reported. However, typical periodontal disease is painless and it is common for periodontal disease to have reached advanced degrees of severity before it is detected and treatment is started (kinane, 2017).

Treatment of the disease is mainly through the mechanical cleaning of the tooth surface to remove bacterial plaque and calculus (Lindhe & Nyman, 1984). However, as specific bacteria (Ciancio, 1996) and the host response are thought to play a major role in the development of periodontal disease, antimicrobial (e.g., tetracycline, minocycline, clindamycin, metronidazole, and chlorhexidine) and anti-inflammatory (e.g., flurbiprofen) drugs have also been used as adjuncts to mechanical treatment, particularly in treating early-onset and refractory cases (Bruschi, 2008).

The genus *Pterodon* is found in Brazilian flora because it has anti-inflammatory and analgesic properties. *Pterodon pubescens* Benth., is a tree of the family Leguminosae-Papillonoideae, popularly known as faveiro, sucupira, sucupira. is a native of the Brazilian cerrado, being found in states like Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia and Sergipe (Carvalho et al, 2004). In the literature, several pharmacological activities are described, especially efficacy studies, the antinociceptive, anti-inflammatory, anti-edematogenic, antiarthritis, antiproliferative and antiplatelet activities, confirming the logic of the popular use of the plant (Coelho et al, 2005, Nucci-Martins et al, 2012, Spindola et al, 2007, Spindola et al, 2017). Safety studies (Souza, 2017) evaluated the non-clinical toxicity of the methyl dichloromethane extract (EBD) and the 6 α -hydroxy-7 β -acetoxy-valeric-17 β -oate isomers and 6 α -acetoxy-7 β -hydroxyivacapan-17 β -methyl ester. The EBD did not show signs that inferred toxicity inherent to the sample, but the daily intake of high doses (500 mg / kg) altered the metabolic homeostasis of the animals that manifested hepatic microgoticular steatosis. The micronucleus induction (MNs), EBD and *m / z* 404 vouacapan tests showed no mutagenic potential.

In view of the advanced stage of non-clinical research of the group, which has determined the parameters of efficacy, standardization and safety of the products obtained from sucupira, we sought to advance the development of a formulation for dental use, being a strategy clinically promising to enable the incorporation of this natural compound in mucoadhesive films.

The buccal cavity constitutes an attractive route for administration of drugs. Among the various mucosal membranes, available, buccal mucosa is the most convenient and easily accessible for the delivery of therapeutic agents for either local or systemic effects (Sudhakar, 2006). The buccal route has a high patient acceptability when compared with other nonoral routes of drug administration (Salamat-Miller, 2005). However, the short residence time at the site of application

displayed by conventional formulations because of the washing effect of saliva limits the absorption of drugs through the buccal mucosa (Scholz et al, 2008; Mazzarino, 2014).

Among the mucoadhesive dosage forms designed for buccal administration, films are preferable in terms of flexibility and comfort over buccal tablets and circumvent the relatively short residence time of gels and ointments on the mucosa. Additionally, these systems showed good morphological characteristics, such as thickness and flexibility, desirable for application in the oral cavity (Perugini, 2003; Mazzarino, 2014).

In this study, the combination of Poly (vinyl alcohol) and crude extract ethanolic *Pterodon pubescens* Benth was used to produce a mucoadhesive film for buccal administration. To the best of our knowledge, there is no report on the application of such a formulation for mucoadhesive drug delivery. Physicochemical, mechanical, cytotoxicity, microbiologic, *in vitro* release and mucoadhesive properties of the produced composite films were also evaluated.

2. Materials and methods

Polyvinyl alcohol (Dinamica, São Paulo, Brazil), Viscosity (20°C, 4% CP) 40 – 48, hidrolise level (% mol) 87 – 89. The other reagents were of pharmaceutical grade. Mucosa porcine were acquired from a local slaughterhouse (Piracicaba, São Paulo, Brazil).

2.1. Phytochemical Study

2.1.1. Plant material and extraction

Pterodon pubescens Benth. fruits from Ponto Chique, Minas Gerais, Brazil (16 ° 37'51 "S, 45 ° 3 '57" W) were collected in September 2013. Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro from the Department of Botany of IB-UNICAMP identified the specimen, and the voucher specimen was deposited in the Herbarium of (UNICAMP) University of Campinas of, under no. 1398-1402. Access to genetic patrimony - National System of Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) was authorized under process A0FC528.

The extraction process was carried out in stainless steel tank with mechanical stirring using ethanol as liquid extractor. The fruits were ground with dry ice to increase the contact surface providing a higher extraction yield. The plant material (kg) by volume of organic solvent (l) ratio was a 1: 3 by performing three extractions of 1.5 hours each, total of 4.5 hours (3 times 1.5 h) at room temperature renewing the solvent at each step. The partial extracts were filtered, combined and concentrated under vacuum by rotary evaporation system at 40°C (Büchi RE 120). The extract was stored in amber bottle and stored at room temperature.

2.1.2. GC–MS analysis

The Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis was carried out with an Agilent 5975 GC–MS system. HP5 column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film

thickness) was used with helium as carrier gas (1.0 ml/min). GC oven temperature was kept at 60°C for 3 minutes and programmed to 240°C at a rate of 3°C/min, and kept constant at 240°C for 5 minutes and then programmed to 240°C at a rate of 1°C/min. Split ratio was adjusted at 40:1. The injector temperature was set at 250°C. Mass spectra were recorded at 70 eV. Mass range was from m/z 100 to 600 (Basting et al, 2019).

2.1.3. GC analysis essential oil quantification

The GC (Gas chromatography) analysis was carried out using an Agilent 6890N GC system. FID (Flame ionization detector) temperature was 250°C. To obtain the same elution order with GC–MS, simultaneous auto-injection was done on a duplicate of the same column applying the same operational conditions. Quantifications were accomplished using analytical standard α -Humulene, *trans*-caryophyllene and geranylgeraniol (Sigma Aldrich Saint Louis USA) (Basting et al, 2019).

2.1.4. HPLC analysis voucapan compounds

The HPLC-DAD system (Shimadzu) consisted of C18 reverse phase column (Gemini -C18 250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m) with 10 μ L sample inject. The mobile phase was a mixture of 70:30 Acetonitrile: water with 0.1% acetic acid (v: v). The flow rate and UV wave-length were set at 1 mL/min and 220 nm, respectively (Basting et al, 2019).

2.2. Pharmacotechnical study

2.2.1. Materials

Polyvinyl alcohol (PVA) (Dinamica, São Paulo, Brazil), Viscosity (20°C, 4% CP) 40 – 48, hydrolyse level (% mol) 87 – 89. The other reagents were of pharmaceutical grade.

2.2.2. Development of Mucoadhesive films

The polyvinyl alcohol (PVA) solution 3% was prepared by dispersing the polymer in distilled water, kept under stirring with heating at 100 ° C for 48 hours. The mixture was filtered through a funnel of porous plate and deposited in Teflon molds for evaporation of the water at room temperature and consequent formation of the films (figure 1). The extract of *Pterodon Pubescens* Benth. in concentrations 1 and 3% were added to the PVA solution (before film formation).

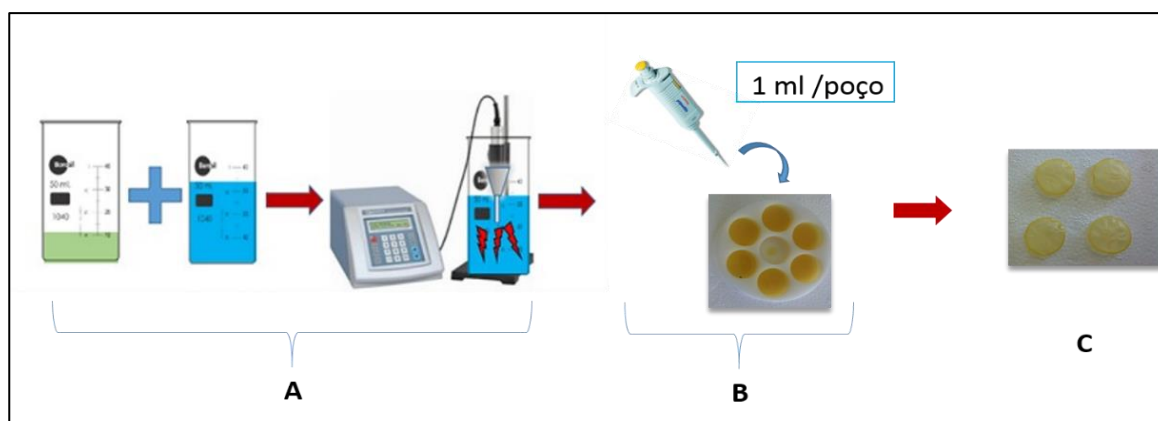


Figure 1: Obtaining the mucoadhesive film. Schematic illustration of the mucoadhesive films preparation technique (A) nanodispersion added on Teflon® plates for drying (B) and after drying (C).

2.2.3. Dynamic light scattering - Nanosizer

The size and zeta potential of the particles were evaluated using the dynamic light scattering (DLS) technique with the Zeta sizer, Nano ZS model (Malvern Instruments, UK).

2.2.4. Transmission electronic microscopy (TEM)

The morphology of the nanoparticles was analyzed at the (University of Dentistry of Piracicaba) - UNICAMP Microscopy and Image Center (MIC), JEOL brand, model JEM 1400, Tokyo - Japan origin at 80 kV voltage. To prepare the samples, they were deposited on a copper disk covered with Formvar / Carbon.

2.2.5. Mechanical properties analysis

The mechanical properties of control and mucoadhesivs films were evaluated on a Texture analyzer TA-XT2 (Stable Micro Systems), using a spherical-ended puncture probe (5 mm). The film sections were fixed on a metallic holder with a circular hole ($D = 10$ mm) and the probe was moved down at 1 mm s^{-1} . During the test, the velocity was constant (0.1 mm s^{-1}). The trigger force was 0.005 kg and force versus displacement curves recorded until the film rupture were used to determine the puncture strength (Ps) and perforation energy (Ep) parameters, according to the following equations (Eqs. (1)– (2)) (Limmatvapirat, Limmatvapirat, Puttipipatkachorn, Nuntanid, & Luangtana-Anan, 2007; Meneguín et al., 2014, 2017):

$$Ps = F / A \quad (1)$$

Where F (N) is the force required to fracture the film, and A (m^2) is the sectional area of the film ($A = 2rh$, in which r is the hole radius and h is the film thickness).

$$Ep = AUC / V \quad (2)$$

Finally, AUC means the area under curve force versus displacement, and V is the film volume ($V = \pi r^2 h$), in which r is the hole radius and h is the film thickness) placed on the orifice plate.

2.2.6. Mucoadhesion measurement

The mucoadhesion of control and mucoadhesivs films was evaluated in a TA-XT2 Texture Analyzer (Stable Micro Systems). Fresh porcine colonic mucosa sections (4 cm²) were placed on a support for mucoadhesion test, and films were also carefully attached to a cylindrical probe (10 mm), using double-sided tape. The probe was moved down at a constant speed of 10 mm min⁻¹ until it achieved predetermined compression force (0.5 N). To ensure the contact with the mucosa, the sample was introduced (1 mm deep) into the mucosal surface and kept for 60 s without force application during the contact phase. Then, the probe was moved up at a speed of 20 mm min⁻¹ and mucoadhesion force (FMA) corresponding to the detachment maximum force (N) was measured. The work of the mucoadhesion (WMA) (N s), provided by AUC of the force versus time curve was determined for each sample. Prior to analysis, the films were pre-hydrated with phosphate buffer at colonic pH (pH 6.8), at 37 °C for 1 min (Meneguín, 2017).

2.3. *In vitro* cytotoxicity studies

The human gingival fibroblasts HGF-1 (ATCC CRL- 2014) were cultured in RPMI 1640 (Gibco®) with 10% fetal bovine serum (Gibco®) 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Cells were maintained in a humidified incubator at 37°C in 5% CO₂. Changes in cell viability caused by the contact with membranes were evaluated by indirect cytotoxicity tests of the SRB assay (Vichai, 2006; Qiu, 2016). The attachment of cells on the membranes was evaluated by direct cytotoxicity tests of the SRB assay.

2.3.1. Cell viability study indirect method

The indirect method was carried out by seeding HGF-1 (~ 6x10⁴ cells/mL) cells into 96-well plates followed by incubation overnight. The heavy formulations were sterilized by UV irradiation for 2 h. A certain amount of DMEM were used to incubate the sterilized formulations according to the Chinese standard ISO10993 (Qiu, 2016). After incubation, 100 µL of the media extract was transferred into each well. Cells from the indirect tests were incubated for 48 h and tested with the SRB assay. The spectrophotometric reading of the absorbance was performed on a microplate reader at 540 nm (Molecular Devices®, VersaMax model). At each time point, three samples were used to measure the number of the viable cells. The percentage of viable cells was calculated using the following formula (1):

$$\% \text{cell viability: } A_{\text{membrane}} = A_{\text{control}} \times 100 \quad (1)$$

2.4. *In vitro* Permeation Studies

In vitro permeation studies were carried out using Franz-type vertical diffusion cells with permeation area of 0.6-cm² and receptor compartment volume of 4.7 mL. The assays were performed using pig esophagus epithelium obtained from a local slaughterhouse (Frigorific Angelelli Ltda, located in Piracicaba, Sao Paulo St Brazil),

according to the method described by Diaz del Consuelo (2005). The use of pig esophageal epithelium was demonstrated to be an equivalent barrier model to buccal epithelium, since it has similar histological characteristics, permeability, and epithelium composition. Moreover, esophageal mucosa has some advantages including larger surface area, absence of damage caused by mastication and easy preparation. Briefly, within 2 h of slaughter, the pig esophageal mucosa was carefully separated from the surrounding tissue with a scalpel. Mucosa with any visual damage at the surface were discarded. The epithelium was separated from the connective tissue after immersion in deionized water at 60°C for 2 min and it was used immediately. This temperature was demonstrated to be unable to alter integrity or permeability of the tissue. The epithelium was placed over a 0.45 µm cellulose filter, with the connective side of the tissue facing the membrane filter, due to its fragility. The membrane filter avoids epithelium damage, without altering drug permeation.

In addition, it reduces the release of impurities from the epithelium to the receptor solution. The mucoadhesive film, epithelium, and membrane filter were clamped between the donor and receptor compartments. Water - ethanol (50:50, v/v) solution was used in the receptor compartment in order to maintain the sink conditions. The experiment was performed at 37°C during 8 h, under magnetic stirring (400 rpm). Samples (300 µL) were periodically withdrawn from the receptor compartment and immediately replaced by the same volume of solution, taking account of dilution effects. The samples were transferred to chromatography vials and stored in a refrigerator until HPLC analysis for quantification of vouacapano (404 *m/z*). After quantification by HPLC, the permeation parameters of sucupira ethanolic extract were calculated, such as: time required for initial permeation or time lag; flux and permeability coefficient. The experiments were carried out in six experiments. Data were expressed as mean ± standard deviation (n = 6).

2.5. Microbiology study

2.5.1. Minimal inhibitory concentration (MIC)

Strains of different species of *Streptococcus* were used as described: *Streptococcus mitis* (NCTC 12261); *Sptreptococcus oralis* (ATCC 10557); *Streptococcus sanguinis* (SK36), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073); *Streptococcus gordonii* (NCTC7868), *Streptococcus mutans* (UA159). All samples were stored in the Laboratory of Microbiology and Immunology of the University of Dentistry of Piracicaba / UNICAMP. The ethanolic extract and the films were tested for antimicrobial activity, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract in different strains of *Streptococcus* spp. by means of microdilution technique in broth, in search of the minimum inhibitory concentration (MIC). The inoculum was transferred from the stock with glycerol kept frozen at -20 ° C to the culture medium *Mitis Salivarius Agar* (MSA) for 24 h in a 10% CO₂ greenhouse, and then transferred to the incubated BHI broth (*Brain Heart Infusion*) overnight under the same conditions.

2.5.2. Inoculum adjusted

The inoculum was adjusted with saline solution, comparing turbidity with the Mac Farland scale (0.5), equivalent to an absorbance of 0.08 to 0.10 to 625 nm in the spectrophotometer, followed by dilutions in saline and Müller -Hinton. The inoculum was standardized at 5.0×10^5 CFU/mL, following the recommendations of protocol M2-A6 (CSLI, 2003- standardization document developed by the Clinical Laboratory Standards Institute). 100 μ L of the Müller-Hinton medium, 100 μ L of the extract and films at the concentrations mentioned below were diluted in 0.05% Tween 80® + culture medium and 100 μ L of the adjusted inoculum were deposited on a sterile microplate. The plate was incubated at 37 °C, 10% CO₂ for 24 hs. The groups tested were: NC: negative control, containing only the Müller Hinton culture medium; PC: positive control Clorexidine (Sigma-Aldrich®) at a concentration of 2.5 mg/mL ; Film blank; films with extract *P. pubescens* at the initial concentration of 25 mg / mL (1 and 3%) with incubation of the microplates at 37° C $\pm$ 1° C, for 2 h. MIC was defined as the lowest concentration of extract and films capable of inhibiting visible growth of bacteria. Three independent experiments were carried out in triplicate.

2.5.3. Method of diffusion in agar

The agar diffusion method followed the recommendations of protocol M2-A6 (CSLI, standardization document developed by the Clinical Laboratory Standards Institute). Dry, sterile paper disks were used. The mucoadhesive films were cut with paper punch with 6 mm diameter sterilized with UV light for 30 minutes exposure each side. The procedure was performed as follows: Plates containing Mueller Hinton agar (Sigma-Aldrich®) pre-prepared were removed from the refrigerator until room temperature; the pre-incubated overnight inóculo were adjusted to 2×10^8 CFU / mL and with a sterile swab, the bacterial inoculum (100 μ L) was evenly distributed over the surface of the agar, allowed to stand at room temperature for approximately 3 minutes. Using sterile forceps, the paper disks were evenly distributed over the surface of the agar and the mucoadhesive films samples were placed on top of the paper disks. Plates were incubated in an oven at 37 ° C in 10% CO₂ for 24 hours. Growth inhibition halo was measured using a digital caliper. Three independent experiments were carried out in triplicate.

2.5.4. Evaluation of the formulation action on Biofilm Formation

The formulations were tested on *Streptococcus mutans* biofilm (UA159). The culture was incubated overnight in BHI in 10% CO₂ at 37 ° C. The inoculum was adjusted to 0.05 of O.D. and added to the plate in BHI + 1% sucrose. In a microtiter plate were deposited 100 μ L BHI medium, 100 μ L of formulation in the concentration of 0.08ul / ml and then serial dilutions of concentration of the treatment group. Subsequently, 100 μ L of adjusted inoculum and incubated 24 hours. After the incubation period, plate was washed 3 x with distilled water and 150 μ L of Crystal violet in each well of the plate for 30 minutes. After this period the plate was washed with 3 x distilled water, complete drying was expected. The dye was then solubilized

with 96° alcohol for 30 minutes and absorbance read at 575nm in microplate spectrophotometer. Three experiments were carried out independent of each test.

2.5.5. Scanning Electron Microscopy (SEM)

After reading the biofilm formation, the samples were centrifuged to form pellets, then washed twice with phosphate buffer (pH 7.4) and then added to 2% glutaraldehyde for 30 min. The samples were then dehydrated using sequential ethanol rinses at concentrations of 50, 70, 90% and absolute ethanol. Each wash concentration was used twice. The samples were coated with gold for 120 seconds (BAL-TEC SCD 050, Balzers Liechtenstein). Sample analysis was performed using a scanning electron microscope operating at a 15 KV acceleration (JSM-5600 Lv; JEOL, Tokyo, Japan).

2.6. Pharmacological study

2.6.1. Animals

The Ethics Committee approved the present study for Animals Use (CEUA) from the University of Campinas (UNICAMP) through protocol number 4378-1, according to national legislation enforced by the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA) of Brazil. Rats were kept in plastic boxes in a room under controlled temperature, with light-dark cycles of 12 hours and fed with standard ration and water *ad libitum*. The rats were divided into 4 groups: Group I (6 rats) served as an untreated control group, Group II (8 rats) served as an untreated periodontal disease by placement of a ligature around molar teeth, Group III (8 rats) served as an untreated periodontal disease with treatment crude ethanolic *Pterodon pubescens* Benth., Group IV (8 rats) served as an untreated periodontal disease with film mucoadhesivs *Pterodon pubescens* Benth.

In order to induce periodontitis, the animals were first submitted to general anesthesia by intraperitoneal injection of Ketamine® (Francotar, Virbac do Brasil Ind Com Ltda., São Paulo, Brazil) at a dose of 0.08 mL/ 100g of body weight and Xylazine® at a dose of 0.04 mL/100g of body weight (Virbaxyl 2%, Virbac do Brasil Ind Com Ltda., São Paulo, Brazil). The animals were placed on an appropriate surgical (Anexo 3) pad to facilitate the access to the mandibular posterior teeth. Induction of periodontal disease with a ligature was performed as described by (Crawford et al, 1978; Koide et al, 1995) involving the placement of nylon n°4 (shalon®) wire around the mandibular lower first molars of each animal. The rats were given a normal food ration and water *ad libitum* daily beginning on day 0 (Baseline. Eight (8) rats of each group were killed 7 days after baseline). Gingival tissues were surgically removed to assess MPO by means of ELISA and jaws for bone loss analysis.

2.6.2. Mieloperoxidase (MPO)

Neutrophil infiltration to the gingival tissues of rats was evaluated by MPO kinetic-colorimetric assay, as a quantitative marker of the infiltration of neutrophils in

inflammatory processes in multiple tissues. For this, 50 mg of gingival tissue was placed in a buffer with 0.5% potassium bromide hexadecyltrimethylammonium (pH 6.0, 50 mg tissue per ml) and subsequently homogenized IKA crusher (Disperser T 10 basic, Staufen, Germany) and subsequently centrifuged for 10 minutes 12,000 rpm at 4 °C, and the supernatant was collected. The MPO activity per mg of tissue was measured using 0.0005% hydrogen peroxide as a substrate for MPO. The unit of MPO activity was defined as being able to convert 1 μ mol of hydrogen peroxide in water for 1 min at 22 °C. During the test, as the hydrogen peroxide was degraded occurred the production of superoxide anion, responsible for the conversion of a compound in dianisidine - brown color. The results were expressed as MPO activity/mg tissue (Bradley, 1982).

2.6.3. Morphometric analysis

The hemimandibles immersed in hydrogen peroxide solution (3%) for 3h to remove the excess tissue. After this procedure, the hemimandibles were stained with methylene blue 1% (30 minutes) to demarcate the cement-enamel junction (CEJ). Then, were followed photographic registration using a digital camera, Nikon (D40, Melville, NY, USA). Measurements were made along root of the first inferior molar tooth (two roots). These areas were evaluated by ImageJ software (Software ImageJ® 1.32j, National Institutes of Health; EUA) as previously described by Lima, 2004.

3. Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SD (standard deviation). Statistical comparisons between groups were made using ANOVA analysis of variance followed by Bonferroni test. The statistical program used was *GraphPad Prism*® 5. Significance was accepted when the *p* value was ≤ 0.05 .

4. Results and discussion

4.1. Phytochemical Study

4.1.1. Plant extraction

For the crude ethanolic *Pterodon pubescens*, fruits extract 500 g of ground fruits were placed in a stainless steel tank with mechanical stirring. The extraction process provided approximately 177, 8 g, representing 35, 56% yield.

4.1.2. Phytochemical analysis

Quantifications were accomplished using analytical standard α -Humulene, trans-Caryophyllene and geranylgeraniol (Sigma Aldrich Saint Louis USA). The peak area calculated from HPLC chromatograms was correlated linearly with compound *m/z* 404 concentrations and compound *m/z* 362. The percentage amounts of the separated compounds were calculated in samples test (Table 1).

Table 1: Percentage amounts of active compounds present at crude ethanolic *Pterodon pubescens* fruits extract.

Extracts	<i>trans</i> -Caryophyllene (% w/w)	α -Humuleno (% w/w)	Geranylgeraniol (% w/w)	Voucapano 362 (% w/w)	Voucapano 404 (% w/w)
EBE <i>P. pubescens</i>	1,16 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,003	0,23 $\pm$ 0,02	5,70 $\pm$ 050	12,58 $\pm$ 1,16

In this study, was specifically monitored the vouacapane compounds, the major constituents of fruits from state MG. These compounds are related to antinoceptive and anti-inflammatory activities, targets for the developed product. The amount of geranylgeraniol in these samples is very small and the low percentage of this compound does not compromise the pharmacological activity of the plant extract (Servat, 2010).

Two methodologies were used in order to obtain better results of the compounds in the quantification. In GC analysis the presence of volatile compounds such as *trans*-Caryophyllene, α -Humulene and diterpene geranylgeraniol can be observed. The HPLC analysis, a better separation of the vouacapane compounds can be observed.

4.2. Pharmacotechnical study

4.2.1. Development mucoadhesivs films

The aqueous solution of 3% PVA was prepared under constant stirring and heating (100 ° C). The mixture was filtered to ensure no PVA residues. To obtain the film of the desired thickness, the volume of solution added to the Teflon mold was evaluated. For a 10 cm, diameter die the chosen volume was 12 mL, which resulted in films with a thickness of 0.05 – 0.15 mm with the pachymeter. For incorporation of the *P. pubescens* Benth. nanodispersion, different amounts of these (1-3%) were mixed with the PVA solution using probe ultrasound for approximately one minute.

4.2.2. Dynamic light scattering - Nanosizer

The DLS (dynamic light scattering) technique also known as photon correlation spectroscopy (Digman, 2011) or almost elastic light scattering (Dzakpasu, 2004) - and ZP (zeta potential) have emerged as simple techniques to investigate the (hydrodynamic) size and charge of the nanoparticles, respectively (Bhattacharjee, 2016).

The data presented are the sample size (nm), polydispersity index (PDI) and zeta potential (PZ) of nanodispersion formulated at room temperature at 25 ° C for *P. pubescens* Benth (Table 2). The measurements were carried out on the same day as formulated.

In table 2, is observed that size and *PDI* decrease with increasing nanoparticle concentration in nanodispersion. However, the PZ fluctuates with the concentration increase between - 19.8% and - 9.26%. It suggestis an instability in the nanodispersion extract of *P. pubescens* (Freitas, 1993; Güncüm et al, 2018). In general, the zeta potential of more than +30 mV at -30 mV is considered as a standard

value in supplying sufficient repulsive forces to avoid particle aggregation (Güncüm et al, 2018).

Table 2: size, polydispersity and zeta potential with different proportions of extract, evaluated by dynamic light scattering (Malvern Instruments). (mean $\pm$ standard deviation, n = 3)

Proportion of <i>P. pubescens</i> Benth.	Size (nm)	polydispersity (PDI)	zeta potential (mV)
Blank	27.87 $\pm$ 4.94	0.7 $\pm$ 0.07	-9.26 $\pm$ 4.04
1.0%	379.1 $\pm$ 29.95	0.36 $\pm$ 0.05	-17.9 $\pm$ 2.18
3.0%	359.0 $\pm$ 23.33	0.34 $\pm$ 0.007	-19.8 $\pm$ 0.46

Negative zeta potential can be attributed to the presence of the ionized hydroxyl group on the surface of the nanoparticle; this was verified in other studies where other concentrations of PVA presented values of electric potential around -12 mV similar to that obtained in this study (Sahoo et al, 2002).

4.2.3. Transmission electronic microscopy (TEM)

Transmission Electron Microscopy generates high-resolution images that allow observation of the morphology, crystalline structures, micro-textures, organelles, particles and interfaces in different types of animal, human, vegetal, mineral, and numerous types of microorganisms.

The nanometric size of the particles was confirmed by the TEM images (Figure 1 and 2), which demonstrate the spherical morphology of PVA-containing particles and the presence of crystals is suggested, characteristics of compound *m/z* 404.

In Figure 2, we have the newly prepared and added nanodispersion in Formvar. Nanoparticles smaller than 200 nanometers and agglomerated with oval and spherical shape are observed in 2 A and 2 C and the presence of crystals in 2B and 2D images in both samples. The presence of the agglomerated particles may be due to the polymer used PVA which favors the formation of films. In this case, the dilution was performed 1: 100 of the original nanodispersion sample.

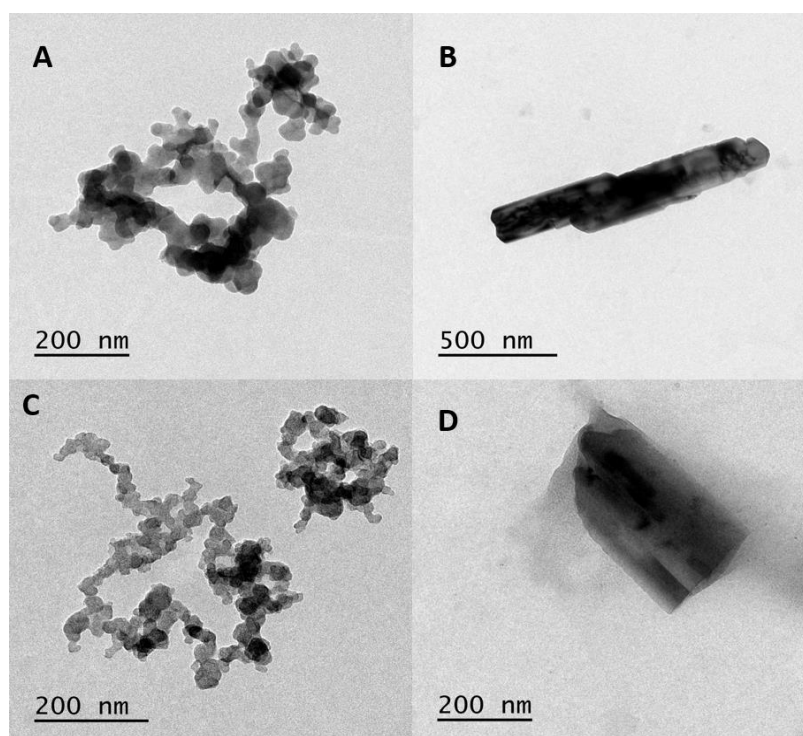


Figure 2: images of pva nanoparticles - *P. pubescens* Benth. obtained from transmission electron microscopy. A: 1% film nanoparticles; B: Crystals of the film 1%; C: 3% film nanoparticles; D: 3% film crystal.

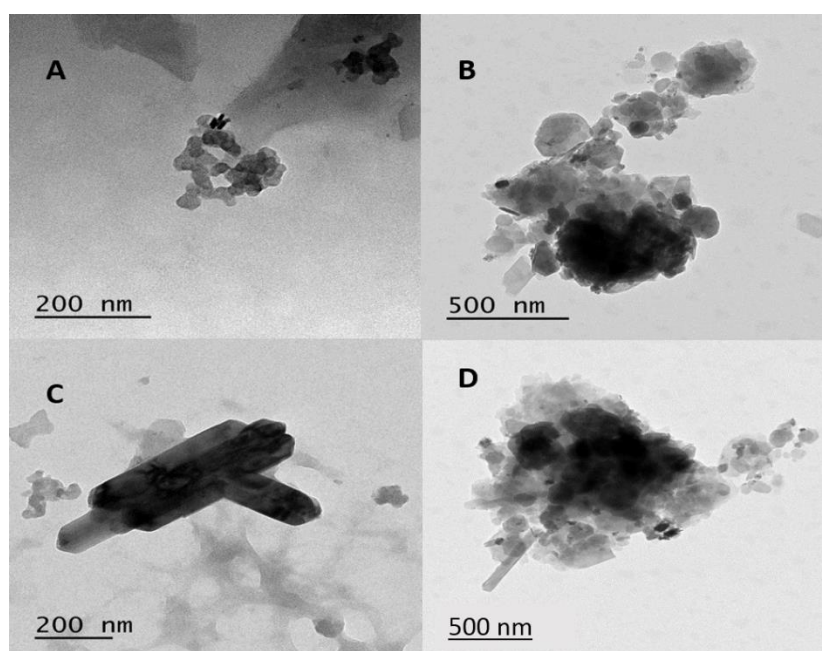


Figure 3: images from the 3% film with *P. pubescens* Benth. diluted obtained from transmission electron microscopy. A: nanoparticles; B: clustered nanoparticles; C: vouacapane crystal 404 (m/z) D: nanoparticles and crystal.

In the figure 3, we have the 3% concentration mucoadhesive film that was dry, diluted in distilled water (1: 100) and added to Formvar. It is observed that in 3 A and 3 B, the nanoparticles are presented with sizes of 200 nm, but we have the presence

of other nanoparticles bigger with size of 500 nanometers, remaining agglomerated with oval and spherical shape. Note the presence of crystals (3C and 3D).

4.2.4. Mechanical properties analysis

The film coating must have adequate mechanical strength to withstand packaging, storage and transport, ensuring the effectiveness of coating processes, as well as avoiding the formation of pores and fissures on the surface, which can accelerate desintegration and drugs release events, and facilitating instability reactions (Felton, 2007). The thickness of film has an important effect on the properties of thin films. (Wu et al, 2018).

The extract *Pterodon pubescens* in different concentrations on mechanical properties of mucoadhesivs films is presented in the table 3, characterized by high strength and low energy drilling. The tensile strength of the mucoadhesive film gradually increased, while the elongation at break first decreased.

The tensile strength of the mucoadhesive film gradually increased, while the elongation at rupture decreased first. When the concentration of *P. pubescens* was 3%, all parameters were increased (thickness, tensile strength, drilling energy), corresponding to 0.152 mm; 14.07 Mpa; 93.56 Kj m⁻³, when compared to film 1% extract. When comparing these parameters with the white film, it was observed that the 3% film showed an increase in thickness and tensile strength; but a decrease in drilling energy. This result can be attributed to the chemical interaction of the compounds present in the extract of *P. pubescens* and the hydroxyl groups of PVA.

Table 3: Mechanical properties of mucoadhesive films formulation (mean $\pm$ standard deviation, n = 3)

Sample	Thickness (mm)	P_s (Mpa)	Ep (Kj m ⁻³)
Blank	0.057 $\pm$ 0.02	10.49 $\pm$ 2.66	195.14 $\pm$ 59.60
Film 1%	0.064 $\pm$ 0.03	5.19 $\pm$ 1.31	88.41 $\pm$ 34.68
Film 3%	0.152 $\pm$ 0.01	14.07 $\pm$ 1.31	93.56 $\pm$ 17.60

An appropriate balance must be found among these evaluated parameters. The film should present acraacteristics as malleable so that it can be handled without breaking, but not very flexible, that easily extends and deforms during the cutting or packaging processes (Borges et al, 2015).

4.2.5. Mucoadhesion measurement

The great interest in the development of mucoadhesive systems lies in the fact that they provide a possible increase of bioavailability, which means that the use of reduced doses of drugs achieves the same therapeutic effect. Besides, it reduces the side effects occurrence, and finally, it contributes to reduce its cost. Interestingly, these systems also allow targeting the drug to specific organs and/or tissues using

specific polymers (Ameye et al., 2002; Andrews, Lavery, & Jones, 2009, Meneguín, 2017).

Table 4: Mucoadhesive force (mN), mucoadhesive films (control) and incorporated extract *Pterodon pubescens* (mean $\pm$ SD, n = 5).

Sample	Mucoadhesive force (mN)
Blank	0.0226 $\pm$ 0.015
Film 1%	0.0139 $\pm$ 0.008
Film 3%	0.0155 $\pm$ 0.014

The parameter evaluated in this test was mucoadhesion force (mN) as shown in table 4. This parameter is related to the force of maximum separation between the film and the mucosa of the porcine esophagus. The comparison among the samples prepared with PVA showed that the increase in the concentration from extract 1.0 - 3.0% do not led alteration to a raise of mN.

Therefore, this result may be related to the use of a single polymer such as PVA which is a non-ionic polymer and when compared to other polymers, such as cationic and anionic polymers that facilitate a strong interaction with mucus (Ludwig, 2005; Karki et al, 2016). Anionic polymers are well characterized due to the existence of carboxyl and sulfate functional groups, which create the negative charge at pH values higher than the pKa of the polymer (Karki et al, 2016).

4.3. Cytotoxicity study

The term cytotoxicity denotes the extent of an agent's potential to cause cell injury. In vitro cytotoxicity tests are useful for defining baseline cytotoxicity as well as establishing the concentration range at which the toxic agent acts. In order to verify the cytotoxicity of the formulations in mucoadhesive films, culture of HGF-1 cells that are human gingival fibroblasts (ATCC CRL-2014).

4.3.1. Cell viability in human gingival fibroblast (HGF-1)

In order to verify the cytotoxicity of mucoadhesivs films, *in vitro* tests were performed on culture of human gingival fibroblast cells. This assay utilized the methodology of sulfforrodamine B, which is a protein dye that binds to the basic amino acid residues of the cell proteins that were viable at the time of fixation. In this assay, cell viability was assessed by measuring the amount of SRB bound to the cell membrane, where the greater the amount of SRB bound to the compartment, the more viable cells there are.

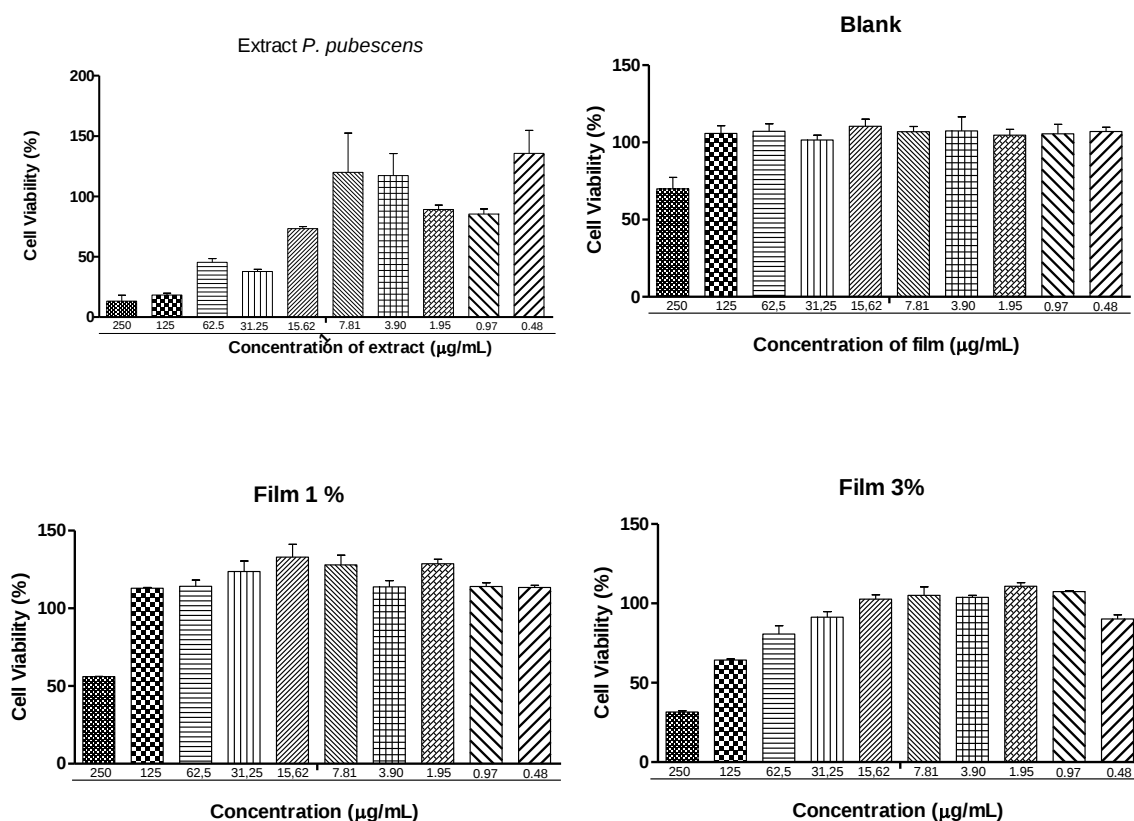


Figure 4: Cell viability indirect method in HGF-1 mucoadhesive films and extract of *P. pubescens* Benth at concentrations of 1 and 3%. method indirect. Blank film: white formulation with PVA; (Film 1%): formulation containing extract of *Pterodon pubescens* 1%; (Film 3%): formulation with containing extract of *Pterodon pubescens* 3%. Data reported as mean $\pm$ SD. * $p < 005$, one-way ANOVA with the Bonferroni *post-hoc*.

Figure 4 shows the cell viability of the extract, the control film (Blank), the formulations in mucoadhesive films with concentration of 1 and 3%. Through the graphs it can be observed that the free extract promoted a lower cell viability when incorporated in films, that is, the extract presented 73% viable cells in a concentration of 15.62 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and when incorporated in films presented more than 100% of cells viable in films at 1% extract and 70% viable cells in 3% extract films at concentrations of 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Our results corroborate with other results, such as Patil et al., 2018 that used polyvinyl alcohol (PVA), which is one of the polymers studied to improve mechanical properties and promote cell growth. The analyzed films containing SF-PVA composite were cytocompatible and showed no cytotoxicity when evaluated in L929 fibroblast cell culture.

4.4. In vitro Permeation Studies

In the permeability of the mucoadhesive films (1 and 3%), the major compound, vouacapane 404 m / z, present in the extract *Pterodon pubescens* Benth was monitored. Samples were collected from the recipient compartment for quantification of 404, and the results were expressed as $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ of 404 permeated.

Fig 5 shows the vouacapane 404 permeation profiles of the mucoadhesivs films across pig esophagus mucosa.

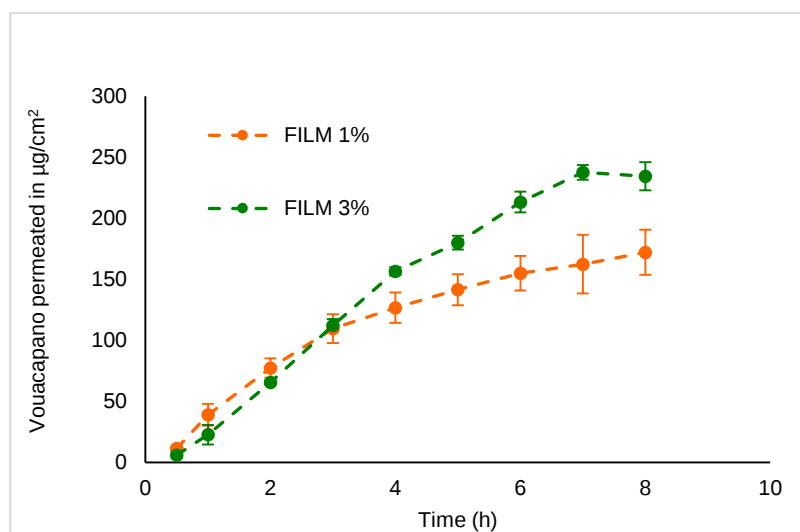


Figure 5: Permeation profile of Film 1% and Film 3%. The amount of drug loading was 0.71 mg (1%) and 1.04 mg (3%) of vouacapane 404 *m/z* in each formulation. Data is expressed as mean $\pm$ standard deviation of *n* = 6 samples.

The permeation values are presented in table 5 and can be observed that the mucoadhesive film at 3% of *P. pubescens* extract permeated more than the 1% film. A higher flux was observed in films with 3% ($33.84 \pm 3.14 \mu\text{g} / \text{cm}^2 / \text{h}$) compared to 1% film (21.14 ± 7.27). This result is relevant since the film 3% presents greater amount of vouacapans that are attributed the anti-inflammatory properties as a decrease of edema.

Table 5: Permeation parameter values obtained of vouacapane (404 *m/z*) (period: 1–8 h).

	Vouacapans	
	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Permeability coefficient ($\times 10^{-2} \text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)
Film 1%	21.14 ± 7.27	3.09 ± 0.01
Film 3%	33.84 ± 3.14	3.28 ± 0.30

Data is expressed as mean $\pm$ standard deviation of *n* = 6 samples.

4.5. Preliminary study of microbiology

4.5.1. Minimal inhibitory concentration (MIC)

After 24 h of bacterial contact with the extract and the mucoadhesive films, it was observed, as shown in Table 6, that the mucoadhesive formulations favored the antimicrobial activity of *P. pubescens* in relation to the free extract against the *Streptococcus buccal* strains.

The films in the concentration of 1.0 and 3.0% were more effective in relation to the extract, the action of these films is observed in other strains in which the free extract showed no activity (*S. sanguinis* SK 36, *S. salivarius* ATCC 7073, *S. gordonii* NCTC 7868; *S. mutans* UA 159).

Table 6: Result of visual reading of extract and mucoadhesive films formulation, in mg / mL in standard *Streptococcus* strains.

Microorganisms	Clorexidine (mg/mL)	Film Blank	Extract (mg/mL)	Film 1% (mg/mL)	Film 3% (mg/mL)
<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 12261	0,0037	*	2,5	1,56	0,78
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 10557	0,015	*	2,5	3,12	1,56
<i>Streptococcus sanguinis</i> SK 36	0,0075	*	*	*	*
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073	0,0037	*	*	2,5	1,25
<i>Streptococcus gordonii</i> NCTC 7868	0,0075	*	*	2,5	6,25
<i>Streptococcus mutans</i> UA 159	0,0037	*	*	2,5	1,25

*: growth bacterial.

Roque (2013) evaluated the compounds geranylgeraniol, 6 α ester, 7 β -dihydroxyivouacapane-17 β -oate methyl ester and the methyl iso-6 α -hydroxy-7 β -acetoxy-valeric-17 β -oate and acetoxy-7 β -hydroxy-valeric-17 β -methyl ester of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) technique in four species of *Candida* spp, and in the bacteria *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*. MIC of 2mg / mL was observed only in the four strains of *Candida* spp., not present activity against the bacteria. It can be seen from table 6 that the free extract was also was low active against bacteria,, but when incorporated into the film it promoted greater bacterial inhibition for *S. mitis* 0.78 mg / mL and *S. salivarius* and *mutans* of 1.25 mg / mL.

The crude ethanolic extract of *P. emarginatus* bark showed antimicrobial activity against sporulated and non-sporulated gram-negative bacteria and fungus *C. albicans* (Bustamante, 2010; Hoscheid, 2017).

4.5.3. Method of disk- diffusion

Plants and other natural sources can provide a huge range of complex and structurally diverse compounds. Recently, many researchers have focused on the investigation of plant and microbial extracts, essential oils, pure secondary metabolites and new synthesized molecules as potential antimicrobial agents (Nazzaro et al, 2013).

Table 7 shows the antibacterial activity of mucoadhesive films indicating correlation with MIC methodology, since the films inhibited at the same power.

Table 7: Activity antibacterial mucoadhesivs film formulation, in mm^a in standard *Streptococcus* strains using the disk diffusion method.

Microorganisms	Inhibition Halo (mm) ^a
<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 12261	4
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 10557	2
<i>Streptococcus sanguinis</i> SK 36	-
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073	-
<i>Streptococcus gordonii</i> NCTC 7868	2
<i>Streptococcus mutans</i> UA 159	1,5

a: Mean values of the experiment in triplicate.

4.5.4. Evaluation of the formulation action on Biofilm Formation

The microbial biofilm is a bacterial deposit adhered to the tooth surface composed of numerous species (Silva et al., 2006) predominantly facultative anaerobic Gram-positive cocci, especially by streptococcal genus (Davey, 2000).

Among *Streptococcus*, *S. mutans* is considered of greater relevance, being described as an etiological agent of dental caries due to the production of acids and the capacity to produce extracellular polysaccharides (PEC). Several plant derived compounds emerged with potential anti-biofilm effects against cariogenic bacteria, such as epigallocatechin-3-gallate and farnesol (da Silva et al, 2012; Guo et al, 2015).

In this experiment, a dilution of the control formulations (Blank) and film at 3% extract of *P. pubescens* were carried out. Figure 6 shows that the control formulation showed no toxicity on the *Streptococcus mutans* biofilm, but when compared to the 3% film formulation of the extract, a reduction in the amount of bacterial cells at the highest concentrations (25, 12.5 e 6.25 mg/mL), showed an inhibitory effect on biofilm formation (4.75%, 5.90% e 33.15%).

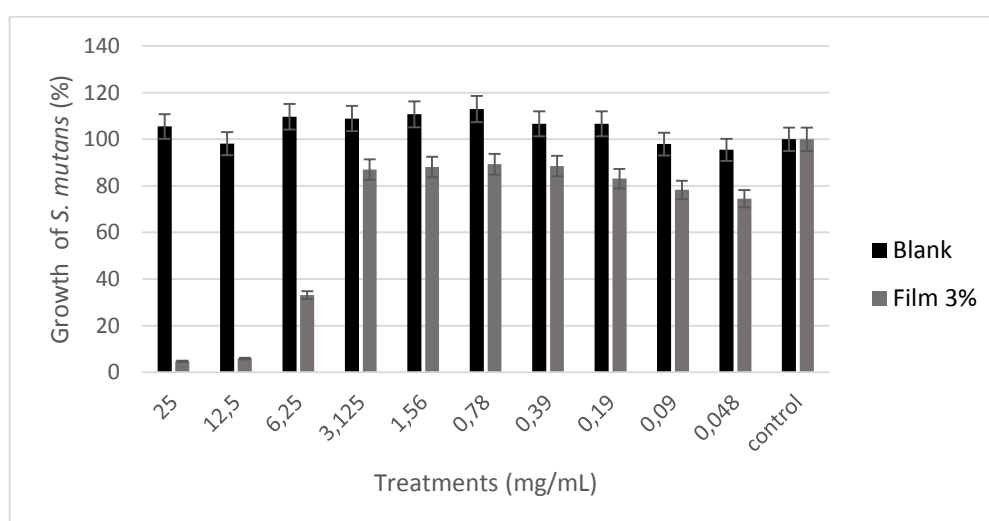


Figure 6: Effect of mucoadhesivs films in *Streptococcus mutans* adherence biofilm. Bacterial growth profile, presented by absorbance at 595 nm. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (n = 3).

4.5.5. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The SEM provides information on the morphology and identification of chemical elements in a solid sample. The image shown in figure 7 represents untreated streptococcus biofilm.

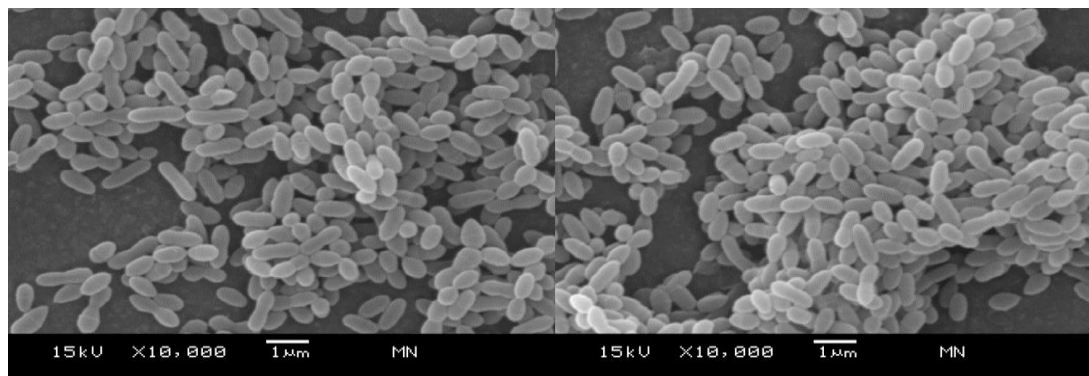


Figure 7: SEM images of *Streptococcus mutans* biofilm.

The images of figure 8, demonstrate the action of the Blank films in 3 different concentrations tested (3, 6 and 12µg). The formation of some cell agglomerates in the division process, a large number of monotypic cells, and the presence of extracellular matrix rupture, which represents an important characteristic of streptococci in biofilm formation, are observed.

The images, shown in Figure 9, which are formulations with the addition of the extract also tested in 3 different concentrations (3, 6 and 12µg), show a small reduction in the biomass of the extracellular matrix, however, decreasing the bacterial viability of *S. mutans*. This reduction in homogeneity can be explained by the compounds present in the extract that favor this inhibitory action of *P. pubescens* on the adherence of *S. mutans*, thus reducing the formation of a thick biofilm.

Alternatively, scientists worldwide are searching for natural products that can be used effectively to control microorganisms (Koo et al, 2003). The active compounds of the natural substances show bactericidal and bacteriostatic effects by preventing bacterial attachment to the surface of the pharynx, skin, and tooth mucosa; inhibition of glycolytic enzymes; pH reduction; reduction of biofilm and plaque formation; and reduction of the hydrophobicity of the cell surface (Abachi, 2016).

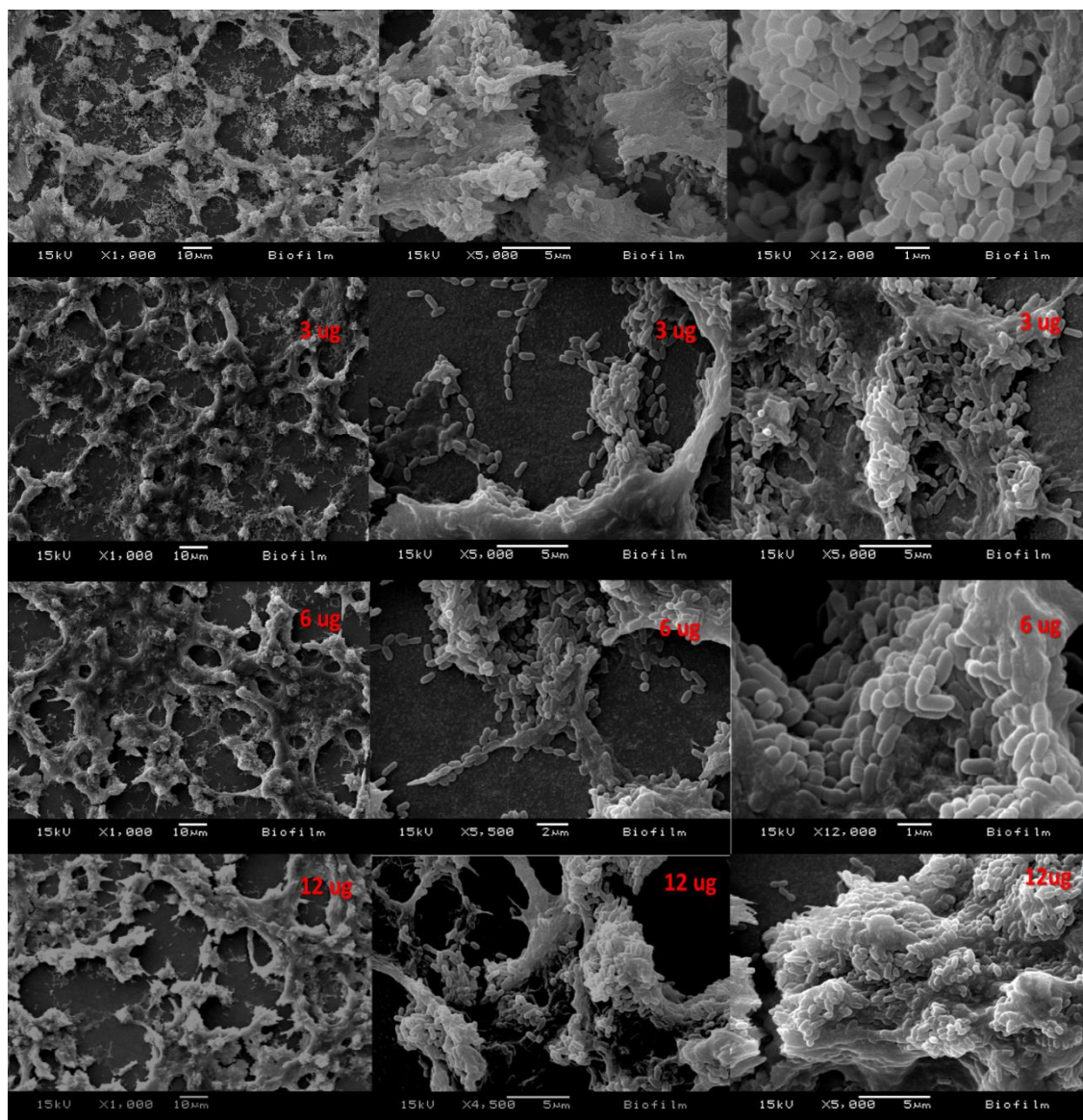


Figure 8: SEM images of *Streptococcus mutans* biofilm after treatment with mucoadhesive film (control).

The highest concentrations of the *M. pendans* terpenoid were tested for 1 min; they could destroy approximately 40% of the biofilms that had been formed. Terpenoids can influence the release of planktonic cells from biofilms. Terpenoids can also influence the membrane integrity of all organisms and eradicated most biofilm cells (Mastelic, 2005; Gartika et al, 2018)

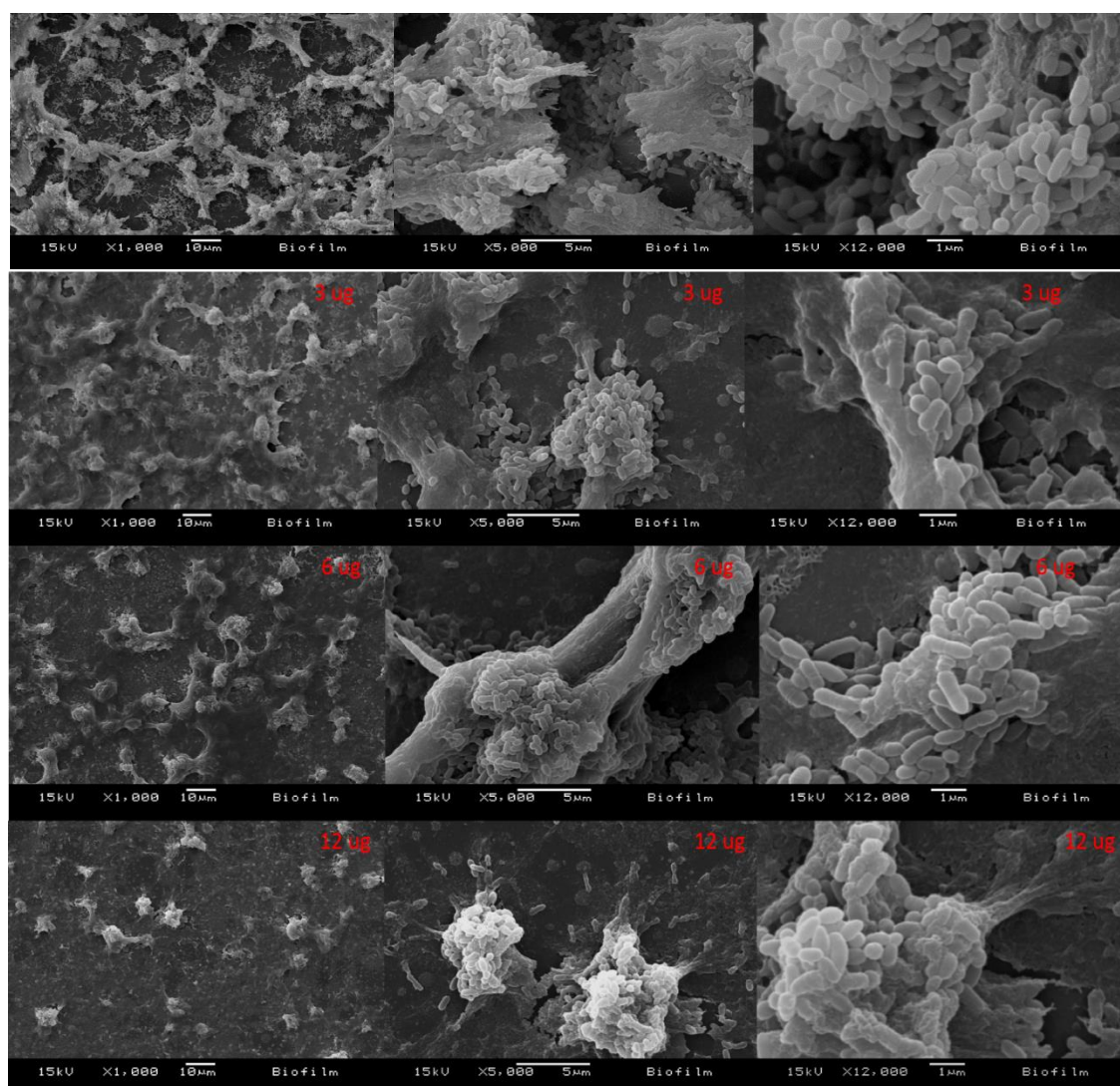


Figure 9: SEM images of the *Streptococcus mutans* biofilm after treatments mucoadhesive film containing sucupira ethanolic extract.

4.6. Pharmacologic Study

4.6.2. MPO

The present study is the first to evaluate the action of the extract *Pterodon pubescens* Benth in experimental model of periodontal disease in rats, which demonstrated a significant action (* $p < 0.0416$) of this phytotherapeutic in the reduction of the neutrophils infiltrated in gingival tissue, consequently decreasing inflammation in the gingival tissue. In figure 10, it can be seen that the extract also provided a similar decrease to the film. When compared to the satellite group, the two treatments promoted a decrease in neutrophil infiltrates, the mucoadhesive film being more effective precisely by its presentation, staying in place and promoting the action of the incorporated extract.

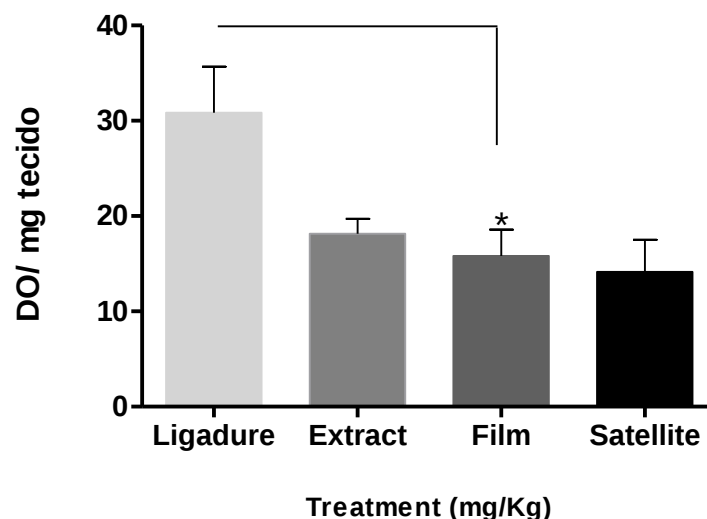


Figure 10: Myeloperoxidase dosage of gingival homogenates of animals submitted to periodontal disease in the 7 - day treatment period with 3% extract and 3% mucoadhesive films. The vertical lines indicate the SEM, the asterisk indicates level of significance, * $P < 0.05$, when compared to ligature. Statistical significance was determined by ANOVA one way followed by Bonferroni test. * $P < 0.0416$.

Among the commercially available substances, are the nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), these agents antagonize pro-inflammatory pathways and/or signaling, preventing the production arachidonic acid metabolites that are pro-inflammatory mediators implicated in a variety of bone resorptive and tissue degrading processes (Offenbacher, 1993; Benatti, 2012). The search for alternative products continues and natural phytochemicals isolated from plants used in traditional medicine are considered as good alternatives to synthetic chemicals (Prabu, 2006; Benatti, 2012).

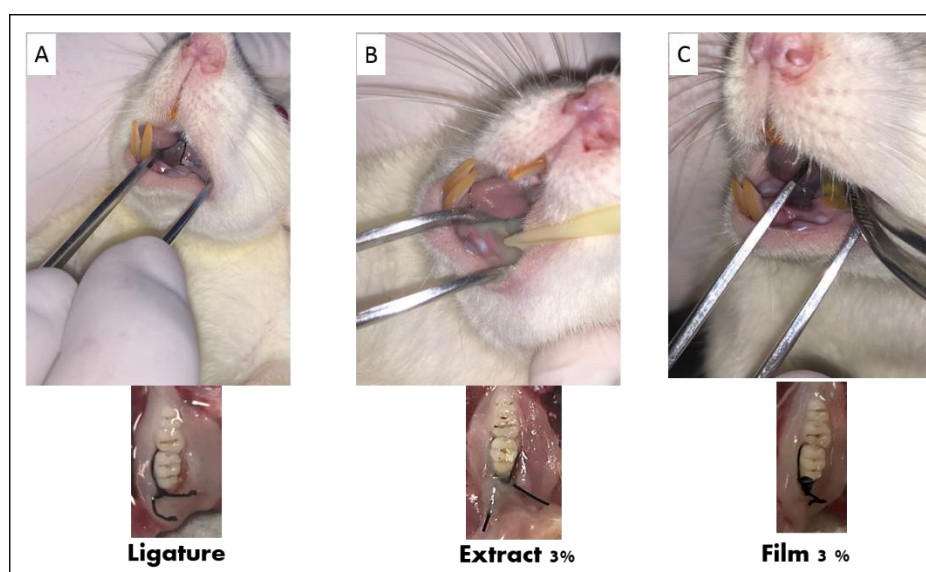


Figure 11: Image of animals receiving buccal treatments. A: only ligature, B: Extract 3%, C: Film 3%.

Observed in Fig 11, that the animals that received only the ligature (A) presented intense gingival volume and dental mobility. On the other hand, the animals that received the treatments buccal (B and C) 1 X a day, presented gingival regeneration, decreasing in gingival tissue edema, corroborating with a result presented above MPO. Sucupira decreased the inflammatory process as demonstrated herein.

4.6.3. Morphometric analysis

In the current investigation, morphometric analysis demonstrated that the therapy with extract *Pterodon pubescens* Benth. and mucoadhesivs films loaded with extract induced no significant difference in the evaluation of alveolar bone loss between the groups treated (Fig 12).

The sucupira extract used in our study has a small amount (approximately 6x less) compared to geraniolgeraniol (Sigma®) used in Koneski's studies. This compound is related to increase the migration capacity of fibroblasts, osteogenics and endothelial cells, thus favoring osseous repair.

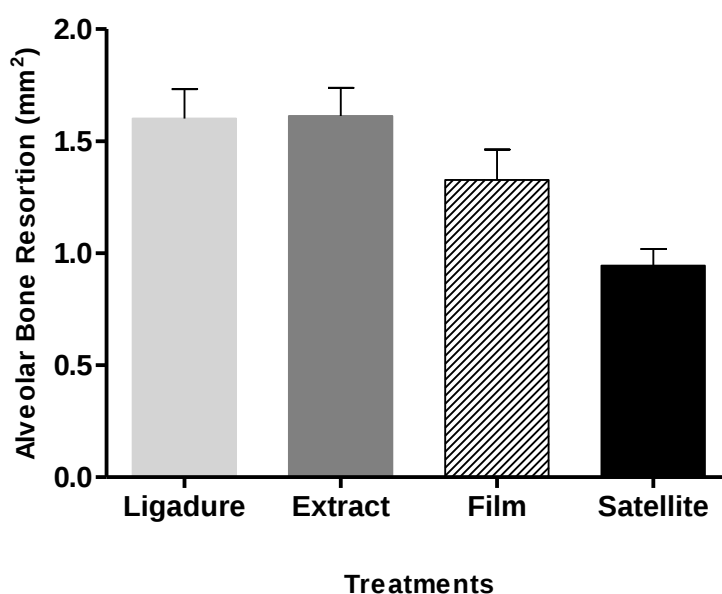


Figure 12: Effect of treatments buccal with extract and Mucoadhesivs Film 3% *P. Pubescens* Benth on Alveolar Bone Resorption of rats submitted to periodontal disease. Periodontal disease was induced by ligature around second right upper molars. The hemimaxillae were dissected, photographed and measured for alveolar bone resorption (mm²). Barrs represents the mean value $\pm$ standard error of the mean (SEM).

The study by Koneski et al (2018) evaluated the action of geraniolgeraniol and demonstrated positive influence on the clinical signs of wound healing process and decreased the score of inflammation, infection and exposed bone.

Many studies have reported the use of natural products in bone reabsorption, such as in the study by Toker et al (2008) who observed a reduction of alveolar bone loss with the use of propolis. More recently, studies using a similar methodology to

our study also demonstrated a protective effect of periodontal bone loss of two Brazilian plants, rosemary pepper (*Lippia sidoides*) and aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) (Botelho et al., 2007; Botelho et al., 2009).

The experimental model of periodontal disease induced by ligatures in rats has been widely used. Ligature favors a large accumulation of biofilm and promotes ulceration of the epithelium (Duarte et al., 2010). This is an important approach to understand the pathogenesis of the disease and the complex host microbe interactions underlying osteoclastogenic activation, recruitment of inflammatory cells, and production of cytokines and chemokines, and bone destruction (Oz & Puleo, 2011). However, this model, which is used to track new treatment modalities, also has notable flaws that should be taken into account when extrapolating the results, such as anatomical differences between the molars of rats and humans. Despite this, the changes observed in the diseased periodontal tissue do not differ from those observed in humans (Duarte et al., 2010).

5. Conclusion

The present investigation indicate that *P.pubescens* ethanolic extract may be useful to control progression gingivitis in rats experimental animal models. While our results are encouraging, further trials are needed before reaching clinical therapeutic benefits. Polyvinyl alcohol (PVA) is a synthesized polymer with good film-forming properties, producing elastic and strong films. PVA also provides good properties for biomaterials application, such as biocompatibility, hydrophilicity and desintegration. Further studies on new polymer blends are suggested to improve the properties required of a mucoadhesivs films.

6. Acknowledgments

We would like to thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for grant support n° 12/19661-4.

7. References

- Abachi S, Song L, Rupaisinghe H.P.V. Molecular mechanism of inhibition of Streptococcus species by phytochemicals. *Molecules*, 2016, 21:215.
- Ameye, D., Voorspoels, J., Foreman, P., Tsai, J., Richardson, P., Geresh, S., et al. Ex vivo bioadhesion and in vivo testosterone bioavailability study of different bioadhesive, formulations based on starch-g-poly (acrylic acid) copolymers and starch/poly (acrylic acid) mixtures. *Journal of Controlled Release*, 2002, 79, 173–182.
- Andrews, G. P., Laverty, T. P., & Jones, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 71, 505–518.

Basting, R.T; Spindola, H.M; Sousa, I.M.O; Queiroz, N.C.A; Trigo, J.R; Carvalho, J.E; Foglio, M.A. *Pterodon pubescens* and *Cordia verbenacea* association promotes a synergistic response in antinociceptive model and improves the anti-inflammatory results in animal models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 112 1-10.

Benatti BB, Campos-Junior JC, Silva-Filho VJ, Alves PM, Rodrigues IR, Uber-Bucek E, Vieira SM, Napimoga MH. Effects of a *Mikania laevigata* extract on bone resorption and RANKL expression during experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci*, 2012, 20(3):340-6.

Bradley, P.P; Christensen, R.D; Rothstein, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation, 1982, *Blood* 60. 618–622.

Bruschi, M.L; Freitas, O; Lara, E.H.G; Heitor Panzeri, Gremião, M.P.D & Jones, D.S. Precursor System of Liquid Crystalline Phase Containing Propolis Microparticles for the Treatment of Periodontal Disease: Development and Characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2008, 34:267–278.

Botelho MA, Rao VS, Carvalho CB, Bezerra-Filho JG, Fonseca SG, Vale ML, Montenegro D, Cunha F, Ribeiro RA, Brito GA. *Lippia sidoides* and *myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113(3): 471-8.

Botelho MA, Martins JG, Ruela RS, Santos JA, Soares JB França MC, Montenegro D. Protective effect of locally applied carvacrol gel on ligature-induced periodontitis in rats: a tapping mode AFM study. *Phytother Res*, 2009, 23(10): 1439-48.

Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 2016, 235, 337–351.

Borges, A.F; Silva, C; Coelho, J.F.J; Simões, S. Oral films: Current status and future perspectives I — Galenical development and quality attributes. *Journal of Controlled Release*, 2015, 206, 1–19.

Bustamante, K.G.L., Lima, A.D.F., Soares, M.L., Fiuza, T.S., Tresvenzol, L.M.F., Bara, M.T.F., Pimenta, F.C., Paula, J.R., Evaluation of the antimicrobial activity of the crude ethanolic extract of the white sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel) - Fabaceae. *Rev. Bras. Plantas Med*, 2010, 12, 341–345.

Carvalho, J.C.T., *Phytotherapics. Anti-inflammatory. Chemical, pharmacological and therapeutic applications*. São Paulo-SP, 2004, 384-400.

Ciancio, S. G. Medication as risk factors for periodontal disease. *J. Periodontol*, 1996, 67(10 suppl.), 1055–1059.

Coelho MGP, Reis PA, Castro FL, Gayer CRM, Lopes CS, Costa e Silva MC, et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. Seeds. *J. Ethnopharmacology*, 2005,98: 109–116.

CLSI (Institute of Clinical and Laboratory Standards). Methodology of Susceptibility Testing for Antimicrobial Agents by Dilution for Aerobic Growth Bacteria: Standard Approved - Sixth Edition. M2-A6 NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

Crawford JM, Taubman MA, Smith DJ. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *J Periodontal Res*; 1978, 13(4):316-25.

Davey, M.E. & O'Toole, G. Microbial biofilm: From ecology to molecular genetic. *Microbiol. Mol. Biol. Revs.* 2000, 64, 847–867.

Diaz Del Consuelo I, Pizzolato GP, Falson F, Guy R H, Jacques Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *J Pharm Sci*, 2005, 94: 2777-88.

Digman, M.A; Gratton, E. Lessons in fluctuation correlation spectroscopy, *Annu. Rev. Phys. Chem*, 2011, 62, 645–668.

Dzakpasu, R; Axelrod, D. Dynamic light scattering microscopy. A novel optical technique to image submicroscopic motions. I: theory, *Biophys. J.* 2004, 87 , 1279–1287.

Duarte, P. M., Tezolin, K. R., Figueiredo, L. C., Feres, M., & Bastos, M. F. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology*, 2010, 55, 142–147.

Felton, L. A. Characterization of coating systems. *AAPS PharmSciTech*, 2007, 8, E1–E9.

Güncüm, E; Işıklan, N; Anlaş, C; Ünal, N; Bulut, E & Bakirel, T. Development and characterization of polymericbased nanoparticles for sustained release of amoxicillin – an antimicrobial drug. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, pg 1-11.

Hoscheid, J; Outuki, P.M; Kleinubing, S.A; de Goes, P.R.N; Lima, M.M.S; Cuman, R.K.N; Cardoso, M.L.C. *Pterodon pubescens* oil nanoemulsions: physiochemical and microbiological characterization and in vivo anti-inflammatory efficacy studies. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2017,27. 375–383.

Karki, S; Kim, H; Na, S; Shin, D; Jo, K; Lee, J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian journal of pharmaceutical s c i e n c e s*, 2016,11 559–574.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. Review. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 22; 3: 1-14.

Koide M, Suda S, Saitoh S, Ofiji Y, Suzuki T, Yoshie H et al. In vivo administration of IL-1 accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *J Oral Pathol Med*, 1995, 24(9):420-34

Koneski, F; Popovic-Monevska, D; Gjorgoski, I; Krajoska, J; Popovska, M; Muratovska, I; Velickovski, B; Petrushevska, G; Popovski, V. In vivo effects of geranylgeraniol on the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2018, 46, 230– 236.

Koo H, Hayacicara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother*, 2003, v. 52, n.5, p. 782-9,

Lindhe, J., & Nyman, S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J. Clin. Periodontol*, 1984, 11, 504–514.

Lima, V; Vidal, F.D.P; Rocha, F.A.C; Brito, G.A.C; Ribeiro R.A. Effects of TNF- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J. Periodontol*, 2004, 75. p. 156-162.

Limmatvapirat, S., Limmatvapirat, C., Puttipipatkachorn, S., Nuntanid, J., & Luangtana-Anan, M. Enhanced enteric properties and stability of shellac films through composite salts formation. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, 2007,67, 690–698.

Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*; 2005,57:1595–1639.

Mazzarino, L.; Loch-neckel, G.; Bubniak, L. D. S.; Mazzucco, S.; Santos-silva, M. C.; Borsali, R.; Lemos-senna, E. Curcumin-Loaded Chitosan-Coated Nanoparticles as a New Approach for the Local Treatment of Oral Cavity Cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2015,v. 15, n. 1, p. 781-791.

Meneguín, A.B; Cury, B.S.F; dos Santos, A. M; Franco, D.F; Barudc, H. S; da Silva Filho; E.C. Resistant starch/pectin free-standing films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157. 1013–1023.

Mastelic J, Politeo O, Jerkovic I, Radosevic N. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chem Nat Comp*, 2005.41:35 –40.

Nazzaro, F. Fratianni, L. De Martino, et al., Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceutics*, 2013, 6,1451–1474.

Nucci C, Mazzardo-Martins L, Stramosk J, Brethanha LC, Pizzolatti MG, Santos ARS, Martins DF. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. *Journal of Ethnopharm*, 2012, V. 143, Issue 1, p. 170-8.

Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*, 1993, 64:432-44.

Oz, H. S., & Puleo, D. A. Animal models for periodontal disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 8. 2011.

Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guaijaverin - a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol*, 2006. 101: 487-95.

Qiu, Y; Qiu, L; Cui, J; Wei, Q. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. *Materials Science and Engineering C*, 2016, 59, 303–309.

Salamat-miller, N.; Chittchang, M.; Johnston, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, v. 57, n. 11, p. 1666-1691.

Sahoo, S.K; Panyam, J; Prabha, S; Labhasetwar, V. R esidual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-coglycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of Controlled Release*, 2002, 82, 105–114.

Spindola, H. M.; Grando, R; Figueiredo, M. C; Basting, R; Queiroz, N.C.A.; De Fátima, A; De Carvalho, João E.; Wang, ZAiJie J.; Foglio, M.A. Derivatives of furanditerpenes from *Pterodon* genus: Pharmacological studies disclose their potential as chronic pain relief in mice. *European Journal of Pharmacology*, 2017, v. 5, p:68-77.

Spindola HM. Antinociceptive activity of *Pterodon pubescens* Benth. [Dissertation], UNICAMP- FOP, 2006.

Sousa, V.H.S. Evaluation of non-clinical toxicity of extract and vouacapanes from fruits of the species *Pterodonpubescens* Benth. [Thesis], Campinas – UNICAMP, 2017.

Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery a promising option for orally less efficient drugs, *J. Contr. Release*; 2006,114: 15–40.

Toker H, Ozan F, Ozer H, Ozdemir H, Eren K, Yeler H. A morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*; 2008, 79(6):1089-94.

Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006,1(3):1112-6.

Wu, Z; Huang, Y; Xiao, L; Lin; Yang, Y; Wang, H; Yang, Y; Wu, Chen, H; Zhang, Q; Qin, W; Pu, S. Physical properties and structural characterization of starch/polyvinyl alcohol/graphene oxide composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123, 569–575.

6.2. Capítulo 2 - Liquid-crystalline systems loaded ethanolic extract *Pterodon pubescens* Benth: structural, rheological, mechanical, textural, mucoadhesive characterization and evaluation of *in vitro* cytotoxicity and microbiology

Mariana Cecchetto Figueiredo, Fabiana Volpe Zanutto, Ilza Maria de Oliveira Sousa, Rosanna Tarkany Basting, Tuany Z. Candido, Bruno da Fonseca Santos, Simone Nataly Busato de Feiria, Giovana Cláudia Boni, Ramiro Mendonça Murata, Jose Luis Davila, Marcos Akira d'Avila, Marlus Chorilli, Mary Ann Foglio.

Abstract

Periodontal disease is one of the most prevalent oral infectious diseases worldwide. Periodontitis and gingivitis constitute a group of diseases called periodontal disease, which is associated with the periodontium (structures supporting the teeth). Gingivitis is an inflammatory response resulted from the accumulation of microbial biofilm at the gingival margin. Recently, there has been growing interest in the application of phytochemicals for the modulation of inflammation and enhancement of healing in acute and chronic wounds. *Pterodon pubescens* Benth, known as sucupira, has anti-inflammatory and analgesic properties. Reports have described pharmacological activities describing efficacy, demonstrating antinociceptive, anti-inflammatory, anti-edematogenic, antiarthritis, antiproliferative and antiplatelet activities, confirming the logic of the plant's folk-use. Despite the highly promising perspectives for the therapeutic and preventive use of sucupira, the low solubility in water is a challenge. Among some strategies in the development of pharmaceutical forms for water-insoluble drugs, they include various alternative vehicle formulations, such as polymer micelles, nanoparticles, nanoemulsions, microparticles, among others. Thus, the proposed incorporation of sucupira into liquid crystal systems (LCS) for oral administration may be a strategy. In this study, LCS two systems were developed, consisting of oleic acid as the oily phase, PPG-5-CETETH-20 as the surfactant, and water as the water phase. Another system was studied, varying in the aqueous phase, where one of them contained polymeric 3% polyvinyl alcohol as the aqueous phase. The formulations were characterized by polarized light microscopy (PLM), oscillatory rheometry, texture profile analysis, and *in vitro* mucoadhesion. Furthermore, the antimicrobial and cytotoxic activity was evaluated *in vitro*. The PLM showed that an addition of the extract favored in the present formulations structures similar to the "Maltese cross" and characteristic streaks of lamellar and hexagonal LCS. The results of the mucoadhesive tests did not present differences in the mucoadhesive force with addition of the mucoadhesive polymer. Rheological analyzes suggested a pseudoplastic profile in both formulations. *In vitro* antimicrobial activity assays suggested that sucupira after LCS incorporation showed low antibacterial activity against *Streptococcus* spp and did not interfere in the formation of *S. mutans* biofilm. The results suggest that LCS is an alternative in the incorporation of sucupira extract with promising results for odontological use.

Keywords: *Pterodon pubescens* Benth, Natural product, Nanotechnology, liquid crystalline systems, polyvinyl alcohol.

1. Introduction

Periodontal disease include gingivitis and periodontitis that affect supporting structures of the teeth, gingiva, tissues, attachment loss, and alveolar bone destruction. Gingivitis is the inflammation of the gingiva, whereas extension of inflammation into deeper tissues is termed periodontitis (Lindhe, Haffajee, & Socransky, 1983; Bruschi, 2008). The inflammation is in response to plaque bacteria residing on both the tooth surface and beneath the gingiva (Woolfson, 2000). Treatment of the disease is mainly through the mechanical cleaning of the tooth surface to remove bacterial plaque and calculus (Lindhe & Nyman, 1984).

Among the species found in Brazilian flora, one that stands out for its anti-inflammatory and analgesic properties is the genus *Pterodon*. The species *Pterodon pubescens* Benth., a tree of the *Leguminosae-Papillonoideae* family, popularly known as faveiro, sucupira, sucupira-branca or sucupira lisa, is native to the Brazilian cerrado, being found in states such as Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia and Sergipe (Carvalho et al, 2004). In the literature, several pharmacological activities are described, especially efficacy studies, the antinociceptive, anti-inflammatory, anti-edematogenic, antiarthritis, antiproliferative and antiplatelet activities, confirming the logic of the popular use of the plant (Coelho et al, 2005 Nucci-Martins et al., 2012, Spindola et al., 2007, Spindola et al. 2017). Safety studies (Sousa, 2017) evaluated the non-clinical toxicity of the dichloromethane extract (EBD) and the 6 α -hydroxy-7 β -acetoxo-valeric-17 β -oate isomers and 6 α -acetoxo-7 β -hydroxyivacapan-17 β - methyl ester; where the EBD did not show signs that inferred toxicity inherent to the sample.

In view of the advanced stage of non-clinical research of the research group, which has determined the parameters of efficacy, standardization and safety of the products obtained from sucupira, we sought to advance the development of a formulation for dental use, being a strategy clinically promising to enable the incorporation of this natural compound in mucoadhesive liquid crystalline systems.

The buccal mucosa has many properties that make it an interesting site of administration. It has excellent blood supply and has no first pass effect, avoiding the metabolism of the drug, which occurs pre-systemically in the gastrointestinal tract. (Calixto, 2018). However, this route has limitations, mainly due to the continuous secretion of saliva (0.5 to 2 L/day), which may lead to dilution, possible ingestion, and unintentional removal of the active drug (Sattar, 2014).

Research by Chorilli et al (2016) demonstrated the feasibility of penetration of crystalline liquid systems (CLS) in the mucosa and skin. These systems are classified as thermotropic or lyotropic, have an intermediate state between solid and liquid, and can be formed by polar lipids in contact with water (Cremonez et al, 2013). Some nanostructured platforms are promising for buccal administration of drugs, among which we can mention liquid crystal systems, microemulsions, polymer nanoparticles,

solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. These systems may protect the drug from degradation and increase the time the formulation remains in the oral environment, allowing controlled release of drugs at the site of the action. Among these systems, lyotropic liquid crystalline systems (LCSs) stand out because they are formed by surfactants that, following the gradual addition of solvents such as water, form lamellar, hexagonal, or cubic crystalline liquid mesophases (figure 1) (Patel & Patel, 2010).

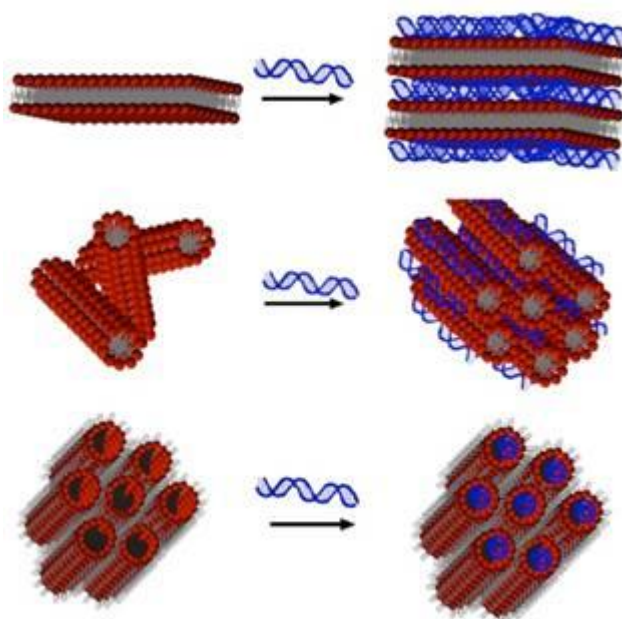


Figure 1: Schematic representation of lamellar cubic and hexagonal phase liquid lyotropic crystal systems (Adapted of Tresset, 2009).

Because of their larger indefinite surface area, lyotropic liquid crystals provide increased permeation of the drug and may be a promising vehicle for topical administration (Estrancanholi et al., 2014).

The mucoadhesive formulations use as the adhesive component the polymers, which form viscous liquids when hydrated, increase the retention time on the surface of the mucosa and provide adhesive interactions. Mucoadhesives polymers must have some physic-chemical properties including hydrophilicity, hydrogen-bonding groups, flexibility for mucus interpenetration and epithelial tissue, and viscoelastic properties. In addition, they should not be toxic, irritant, have good spread ability, be biodegradable and biocompatible by rapidly adhering to the oral mucosa (Sudhakar et al., 2006; Laffleur, 2014). In this study, the PVA polymer was used, which is a synthetic, hydrophilic, biodegradable polymer with good film-forming capacity (Faria et al., 2012). Due to its excellent properties, it has been used in a large number of industrial applications, such as in paper and fiber processing, as an emulsion stabilizer, besides the use as a drug carrier, due to its degradability properties and because it is biocompatible and not toxic (Aranha & Lucas, 2001).

The present study describes the development and physicochemical characterization of a novel precursor system for a liquid crystalline phase containing extract ethanolic *Pterodon pubescens* Benth. that may be applied easily at mucosa, representing a promising new approach for the management of periodontal diseases.

2. Experimental Data

2.1 Materials

Polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl alcohol was purchased from Volp Indústria Comércio (Osasco, São Paulo, Brazil); oleic acid was purchased from Synth (Diadema, São Paulo, Brazil) and polyvinyl alcohol (Dinamica, São Paulo, Brazil), Viscosity (20°C, 4% CP) 40 – 48, hidrolise level (% mol) 87 – 89. The other reagents were of pharmaceutical grade. Mucosa porcine were acquired from a local slaughterhouse (Piracicaba, São Paulo, Brazil).

2.2 Ternary-phase diagram

This diagram was constructed as described by Carvalho et al, by combining PPG-5- CETETH-20, oleic acid, and water (Carvalho, 2010, 2013). The percentages of these three components range from 10%–80% (w/w) and were calculated to obtain the points that defined the boundaries between the regions of the ternary phase diagram, generating 100% of a total formulation and after 24 hours the formulations were visually classified by using phase separation, opacity, viscosity systems, and by translucency. Two formulations were selected for further physicochemical characterization (Table 1). In these formulations, *Pterodon pubescens* Benth. crude ethanolic was loaded at a concentration of 30 mg/g.

Table 1: Composition (%) of water, the oil phase (oleic acid), and surfactant (PPG-5-CETETH-20) in the formulations.

Formulations	Components (%)				
	<i>P. Pubescens</i>	Water	PVA (3%)	Oleic acid	PPG-5-CETETH-20
F1	-	40	-	20	40
F2	-	30	10	20	40
F3	3%	40	-	20	40
F4	3%	30	10	20	40

Abbreviation: PPG-5-CETETH-20, polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl alcohol, PVA, poly (vinyl alcohol).

2.3 Polarized light microscopy

A small amount of the formulations was placed on a glass slide, covered with a coverslip, and examined by polarized light microscopy (PLM) to evaluate the homogeneity of the dispersion and detect the presence of anisotropy. Samples were examined under a polarized light using a polarized light microscope (Leica®, DMLM,

Cambridge – Inglaterra) at room temperature and photomicrographs were obtained at magnification of 50, 100 and 200×.

2.4. Continuous Shear Rheometry

The rheological characterization was performed using an Anton-Paar MCR-102 Modular Compact Rheometer. Tests were conducted using a plate-plate geometry (PP50-1) with 50 mm diameter and a gap of 1 mm. All tests were performed at 25 °C using a solvent trap to prevent evaporation. Measurements of viscosity were performed in the range of 0.01 to 100 s⁻¹. Amplitude sweep tests were carried out at an angular frequency of 10 rad s⁻¹ to obtain the linear viscoelasticity (LVE) range ($\gamma_0 = 0.1\%$ for all samples). Next, frequency sweep tests were conducted in the range of 0.1–240 rad s⁻¹. The consistency index and the flow index were determined using eq 1 for a quantitative analysis of flow behavior

$$\tau = \kappa \cdot \dot{\gamma}^{\eta} \quad (1)$$

Where τ is the shear stress, $\dot{\gamma}$ is the shear rate, κ is the consistency index, and η is the flow index (Calixto et al, 2015).

2.5. Mechanical properties analysis

Texture-profile analysis (TPA) was carried out to determine the mechanical properties of the formulations, such as hardness, compressibility, adhesion, and cohesion. Samples (50 g) were weighed and placed into 50 mL conical centrifuge tubes (Falcon). Then, they were centrifuged in a Sorvall TC6 centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 2,665× g for 4 minutes to ensure uniformity of surface and remove air bubbles. These tubes were then transferred to a thermostatic bath set at 32°C to mimic skin temperature. A TA.XT Plus texture analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK) was programmed to compress the sample uniaxially at 1 mm/s until a predefined depth (10 mm), and then return to the surface at a speed of 0.5 mm/second. After 5 seconds, a second compression was applied under the same conditions. All samples were analyzed in triplicate (Calixto et al, 2015).

2.6. Mucoadhesion measurement

The formulations were placed in conical centrifuge tubes, which were maintained in a thermostatic bath at 37°C. Fresh mucosas was fixed with elastic rubber to the cylindrical probe. The cylindrical probe was lowered to allow the mucosa to be in contact with the sample surface. Contact time was 60 seconds, then the probe was removed. The force required to detach the mucosa from the sample was determined from the force versus time curve. This experiment was performed in triplicate using texture-analysis equipment.

2.7. In vitro cytotoxicity

The human gingival fibroblasts HGF-1 (ATCC CRL-2014™) were cultured in RPMI 1640 (Gibco®) with 10% fetal bovine serum (Gibco®), 100 U/mL penicillin and

100 µg/mL streptomycin (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Cells were maintained in a humidified incubator at 37° C in 5% CO₂. Changes in cell viability caused by the contact with membranes were evaluated by indirect cytotoxicity tests of the SRB assay (Vichai, 2006; Qiu, 2016). The attachment of cells on the membranes was evaluated by direct cytotoxicity tests of the SRB assay.

2.7.1. Cell viability study indirect method

The indirect method was carried out by seeding HGF-1 (~ 6x10⁴ cells/mL) cells into 96-well plates followed by incubation overnight. The heavy formulations were sterilized by UV irradiation for 2 h. A certain amount of DMEM were used to incubate the sterilized formulations according to the Chinese standard ISO10993 (Qiu, 2016). After incubation, 100 µL of the media extract was transferred into each well. Cells from the indirect tests were incubated for 48 h and tested with the SRB assay. The spectrophotometric reading of the absorbance was performed on a microplate reader at 540 nm (Molecular Devices®, VersaMax model). At each time point, three samples were used to measure the number of the viable cells. The percentage of viable cells was calculated using the following formula (1):

$$\% \text{cell viability: } A_{\text{membrane}} = A_{\text{control}} \times 100 \quad (1)$$

2.8. *In vitro* Permeation Studies

In vitro permeation studies were carried out using Franz-type vertical diffusion cells with permeation area of 0.6-cm² and receptor compartment volume of 4.7 mL. The assays were performed using pig esophagus epithelium obtained from a local slaughterhouse (Frigorific Angelelli Ltda, located in Piracicaba, Sao Paulo St Brazil,), according to the method described by Diaz del Consuelo (2005). The use of pig esophageal epithelium was demonstrated to be an equivalent barrier model to buccal epithelium, since it has similar histological characteristics, permeability, and epithelium composition. Moreover, esophageal mucosa has some advantages including larger surface area, absence of damage caused by mastication and easy preparation. Briefly, within 2 h of slaughter, the pig esophageal mucosa was carefully separated from the surrounding tissue with a scalpel. Mucosa with any visual damage at the surface were discarded. The epithelium was separated from the connective tissue after immersion in deionized water at 60° C for 2 min and it was used immediately. This temperature was demonstrated to be unable to alter integrity or permeability of the tissue. The epithelium was placed over a 0.45 µm cellulose filter, with the connective side of the tissue facing the membrane filter, due to its fragility. The membrane filter avoids epithelium damage, without altering drug permeation. In addition, it reduces the release of impurities from the epithelium to the receptor solution. The mucoadhesive film, epithelium, and membrane filter were clamped between the donor and receptor compartments. Water - ethanol (50:50, v/v) solution was used in the receptor compartment in order to maintain the sink conditions. The experiment was performed at 37° C during 8 h, under magnetic stirring (400 rpm). Samples (300 µL) were periodically withdrawn from the receptor compartment and

immediately replaced by the same volume of solution, taking account of dilution effects. The samples were transferred to chromatography vials and stored in a refrigerator until HPLC analysis for quantification of vouacapano (404 *m/z*). After quantification by HPLC, the permeation parameters of sucupira ethanolic extract were calculated, such as: time required for initial permeation or time lag; flux and permeability coefficient. The experiments were carried out in six experiments. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 6$).

2. 9. Preliminary study of microbiology

2. 9.1. Minimal inhibitory concentration (MIC)

Strains of different species of *Streptococcus* were used as described: *Streptococcus mitis* (NCTC 12261); *Sptreptococcus oralis* (ATCC 10557); *Streptococcus sanguinis* (SK36), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073); *Streptococcus gordonii* (NCTC7868), *Streptococcus mutans* (UA159). All samples were stored in the Laboratory of Microbiology and Immunology of the School of Dentistry of Piracicaba / UNICAMP, following the recommendations of protocol M2-A6 (CLSI, 2003). The ethanolic extract and the Liquid Crystalline Systems were tested for antimicrobial activity, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract in different strains of *Streptococcus* spp. by means of microdilution technique in broth, in search of the minimum inhibitory concentration (MIC). The inoculum was transferred from the stock with glycerol kept frozen at -20° C to the culture medium *Mitis Salivarius Agar* (MSA) for 24 h in a 10% CO₂ greenhouse, and then transferred to the incubated BHI broth (*Brain Heart Infusion*) overnight under the same conditions.

2.9.2. Inoculum adjusted

The inoculum was adjusted with saline solution, comparing turbidity with the Mac Farland scale (0.5), equivalent to an absorbance of 0.08 to 0.10 to 625 nm in the spectrophotometer, followed by dilutions in saline and Müller –Hinton (Sigma-Aldrich®). The inoculum was standardized at 5.0×10^5 CFU / mL, following the recommendations of protocol M2-A6 (CSLI, 2003- standardization document developed by the Clinical Laboratory Standards Institute). 100 μ L of the Müller-Hinton medium, 100 μ L of the extract and films at the concentrations mentioned below were diluted in 0.05% Tween 80® + culture medium and 100 μ L of the adjusted inoculum were deposited on a sterile microplate. The plate was incubated at 37° C, 10% CO₂ for 24 hours. The groups tested were: NC: negative control, containing only the Müller Hinton culture medium; PC: positive control Clorexidine (Sigma-Aldrich®) at a concentration of 2.5 mg/mL ; F1: white formulation of the crystalline liquid system without PVA; F3: white formulation of the crystalline liquid system with PVA; F2: formulation with 3% sucupira extract in the crystalline liquid system without PVA; F4: formulation with 3% sucupira extract in the crystalline liquid system with PVA, with incubation of the microplates at 37° C $\pm$ 1° C, for 2 h. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of extract and films

capable of inhibiting visible growth of bacteria. Three independent experiments were carried out in triplicate.

2.9.3. Evaluation of the formulation action on Biofilm Formation

The formulations were tested on *Streptococcus mutans* biofilm (UA159). The culture was incubated overnight in BHI in 10% CO₂ at 37° C. The inoculum was adjusted to 0.05 of O.D. and added to the plate in BHI + 1% sucrose. In a microtiter plate were deposited 100 µl BHI medium, 100 µl of formulation in the concentration of 0.08ul / ml and then serial dilutions of concentration of the treatment group. Subsequently, 100 µL of adjusted inoculum and incubated 24 hours. After the incubation period, plate was washed 3 x with distilled water and 150 µl of Crystal violet in each well of the plate for 30 minutes. After this period, the plate was washed with 3x distilled water, complete drying was expected. The dye was then solubilized with 96° alcohol for 30 minutes and absorbance read at 575nm in microplate spectrophotometer. Three experiments were carried out independent of each test.

2. 9.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

After reading the biofilm formation, the samples were centrifuged to form pellets, then washed twice with phosphate buffer (pH 7.4) and then added to 2% glutaraldehyde for 30 min. The samples were then dehydrated using sequential ethanol rinses at concentrations of 50, 70, 90% and absolute ethanol. Each wash concentration was used twice. The samples were coated with gold for 120 seconds (BAL-TEC SCD 050, Balzers Liechtenstein). Sample analysis was performed using a scanning electron microscope operating at a 15 KV acceleration (JSM-5600 Lv; JEOL, Tokyo, Japan).

3. Statistical analysis

Data were expressed as mean±SD (standard deviation). Statistical comparisons between groups were made using ANOVA analysis of variance followed by Bonferroni test. Significance was accepted when the *p* value was ≤0.05. The statistical program used was *GraphPad Prism*® 5.

4. Results and discussion

4.1. Ternary-phase diagram

The formulations were visually characterized by using the following criterion: phase separation that is referred to as the segregation of components that results in the formation of two phases; liquid translucent systems that are liquid systems that have flow properties similar to water; a low-viscosity system that tends to be translucent and has a relatively low viscosity, as indicated by the fluidity in inverted vials; a high-viscosity system that tends to adhere to vials even after inversion; opaque and milky systems that were characterized as emulsions (Fonseca-Santos, 2016).

The pseudoternary phase diagram in Figure 2, shows that it was possible to obtain a high viscosity transparent system in the regions where the surfactant concentration, oil phase, and water concentration were 20%, 40%–60%, and 30%–50% s/ PVA; 30%, 30%–60%, and 30%–60% c/ PVA, respectively. Transparent liquid systems were formed only system without PVA (FA) when the concentrations of the surfactant, oil phase, and aqueous phase were 10%–60%, 30%–80%, and 10%–50%, respectively.

In formulation with PVA, phase separation took place when the oil phase concentration increased in the emulsion regions (>40%) and at aqueous concentrations 30%, indicating that dilution the polymer PVA with water resulted in poor stability. The different proportions of these phases can generate distinct systems, such as phase separation, microemulsion, emulsion, and liquid crystals (Lawrence, 2000; Calixto, 2013; Fonseca-Santos, 2016).

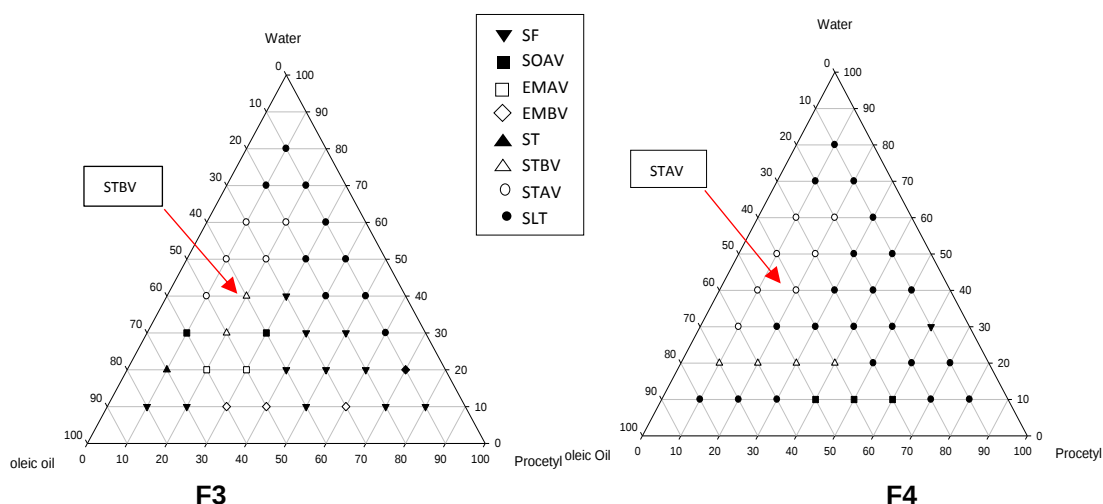


Figure 2: A pseudoternary phase diagram of oleic acid with 20%, PPG-5-CETETH-20 with 40%, water 40%. SF: phase separation; EMAV: emulsion high-viscosity; EMBV: emulsion low-viscosity; ST: translucent system; STBV: translucent system low-viscosity; STAV: translucent system high-viscosity; SLT: liquid translucent systems.

The main factors affecting the absorption of drugs by the oral route are the physicochemical properties of the drug, the biological processes involved in the oral cavity and the type of device delineated (Repka, Chen & Chan, 2010). Drugs can reach the local adjacent structures or the systemic circulation through the transcellular, paracellular or synergistic mechanisms using the two pathways simultaneously. The transport of molecules through the intracellular pathway is a complex phenomenon that is dependent on several physico-chemical parameters of the drugs, such as molecular weight, oil / water partition coefficient, ionic charge and structural conformation (Fonseca, 2016).

Different strategies may be used to increase drug transport through oral cavity tissues, such as the use of permeation promoters, such as fatty acids and surfactants (Ghosh & Pfister, 2005; Nicolazzo, Reed & Finnin, 2005; Repka, Chen & Chan, 2010) and the use of mucoadhesive polymers. Oleic acid can act as a permeator having a proposed mechanism of interaction with the carbonic chains of the membrane lipids,

causing a packaging perturbation in the region of the polar heads of the lipid bilayer, resulting in an increase in the fluidity of the membrane phospholipid domains (Turunen et al., 1994; Ganenm-Quintanar et al., 1998). Studies aiming to increase the oral permeability of drugs with oleic acid have been reported by Lee & Kellaway (2000), Morishita et al. (2001), Nakano et al. (2002) and Shiledar, Tagalpallewar & Kokare (2014).

4.2. Polarized light microscopy

After performing visual classification as shown in the diagram (Fig 2), the formulations were analyzed using PLM to verify the structures found in the crystalline liquid systems. Figure 3 shows the photomicrographs the formulations with extract *Pterodon pubescens* with and without PVA presented striated structures and Maltese cross-shapes, suggesting the formation of hexagonal and lamellar liquid crystalline mesophases, respectively. The formulations without the extract (with and without PVA) presented only structures striated.

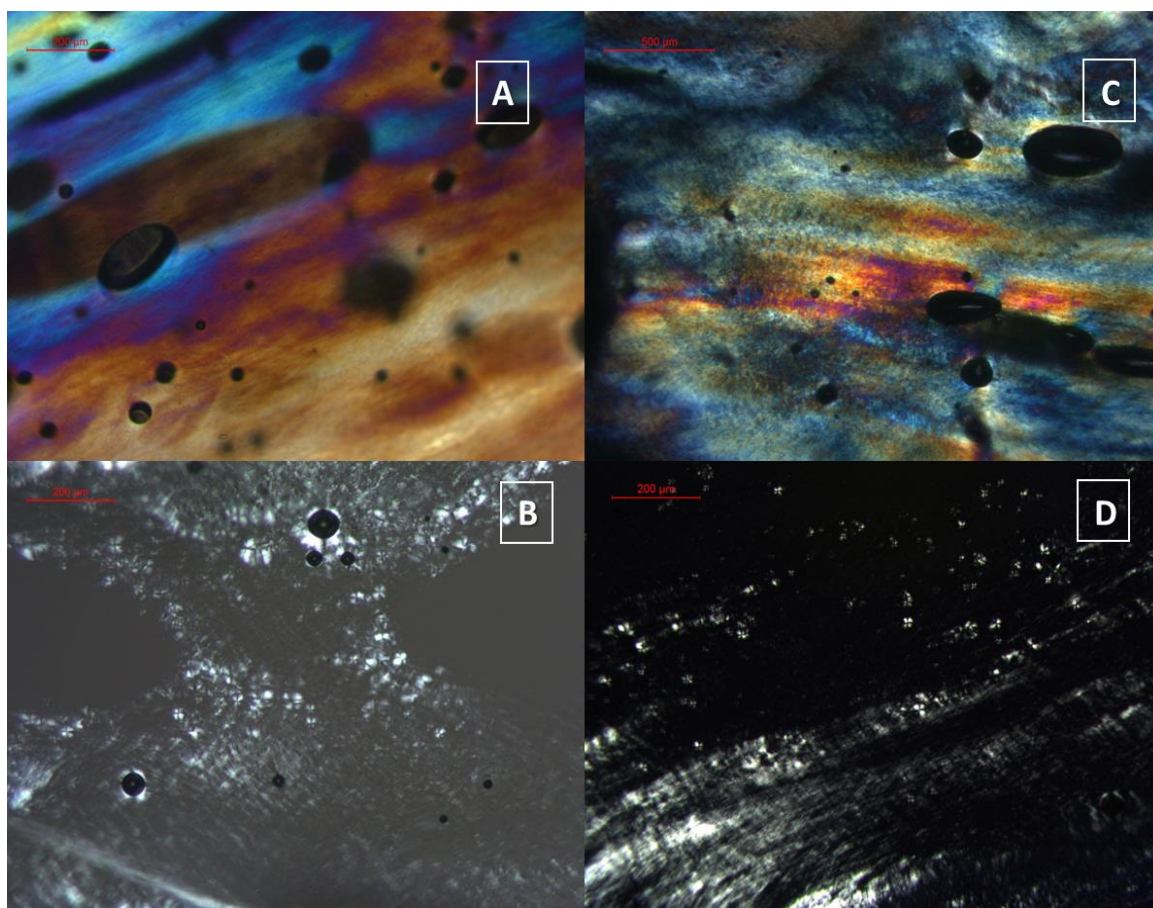


Figure 3: Polarized light microscopy obtained from the formulations containing extract of *Pterodon pubescens* Benth. with and without PVA. A (F1): white formulation without PVA; B (F3): formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth without PVA; C (F2): white formulation with PVA; D (F4): formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth with PVA.

A liquid crystalline system consisting of 40% surfactant, 20% oleic acid, and a 10% dispersion of PVA at 3.0% totalizing 40% water, for the buccal administration of sucupira for the treatment of periodontal disease, was previously developed.

The addition of 3.0% extract ethanolic *Pterodon pubescens* Benth in this system resulted in the formation of a high-viscosity lamellar and hexagonal liquid crystalline system with a high incidence of mucoadhesion to the buccal mucosa. The mesophase transition leads to increased viscosity of the formulation, which may promote fixation of the formulation at a desired site of action upon in situ administration. These properties may be an excellent strategy for the development of mucoadhesive systems (Carvalho, 2012; Fonseca, 2016).

The presences of the two phases may be related to the compounds present in the sucupira, and may act in several ways, for example: when a single compound can interact with several targets; various compounds acting on a single target (which may or may not involve synergy); and various compounds that interact with multiple targets. These interactions are the major advantages in the use of the herbal medicine in comparison to the use of the compound alone (Williamson, 2011).

Grando 2017 in his research presented the results of the isobologram analysis together with the correlation index, demonstrating the existence of synergic interactions among the compounds present in the dichloromethane extract of the fruits of *P. pubescens*.

Oleic acid was used as the oil phase and permeation agent, due to its mechanism of interaction with the carbonic chains of membrane lipids. This interaction disrupts the polar heads in the lipid bilayer and the fluidity of the membrane phospholipid domains, resulting in increased permeability of the drug. PPG-5-CETETH-20 was used as a surfactant, based on our very promising results in using it together with polymers mucoadhesivs (Rodero, 2018). A strategy used to increase mucoadhesion is the addition of polymers, in the aqueous phase a polymeric dispersion of PVA was performed, which improves the mucoadhesive capacity by establishing electrostatic interactions with the mucus.

Many polymers that are used as mucoadhesivs are predominantly hydrophilic polymers that swell and allow chain interactions with mucin molecules in the buccal mucosa. Examples of polymers include hydroxypropylcellulose (HPC), hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), hydroxyethylcellulose (HEC), sodium carboxymethylcellulose (SCMC), poly (vinylpyrrolidone) (PVP), and chitosan (Morales, 2011). Polyvinyl alcohol (PVA) is widely used in biomedicine because it is a biodegradable and biocompatible synthetic polymer and can form hydrogels through chemical or physical crosslinking (Güncüm, 2018).

4.3. Rheological oscillatory analysis

The formulations were subjected to several further characterizations to evaluate the effects of rheological forces. Continuous shear rheometry analyses for formulations F1, F2, F3 and F4 are shown in Figure 4 and Table 2. The flow curve revealed that all formulations exhibited non-Newtonian characteristics, since the sample underwent deformation when submitted to the shearing tension test.

It can be seen in table 2 that all values referring to viscosity (n) are less than one ($n < 1$), being classified as non-Newtonian pseudoplastic fluids (Jones et al, 2000;

Lee, 2001). It was concluded that the addition of the 3% PVA polymer in the aqueous phase did not influence the viscosity and the consistency of the formulations with sucupira ethanol extract.

Table 2. Flow Behavior (n) and Consistency Index (K) of the Systems

Formulation	n	K
F1	0.106 ± 0.010	34.47 ± 0.51
F2	0.135 ± 0.006	38.91 ± 1.68
F3	0.128 ± 0.010	31.73 ± 1.82
F4	0.166 ± 0.041	32.61 ± 3.75

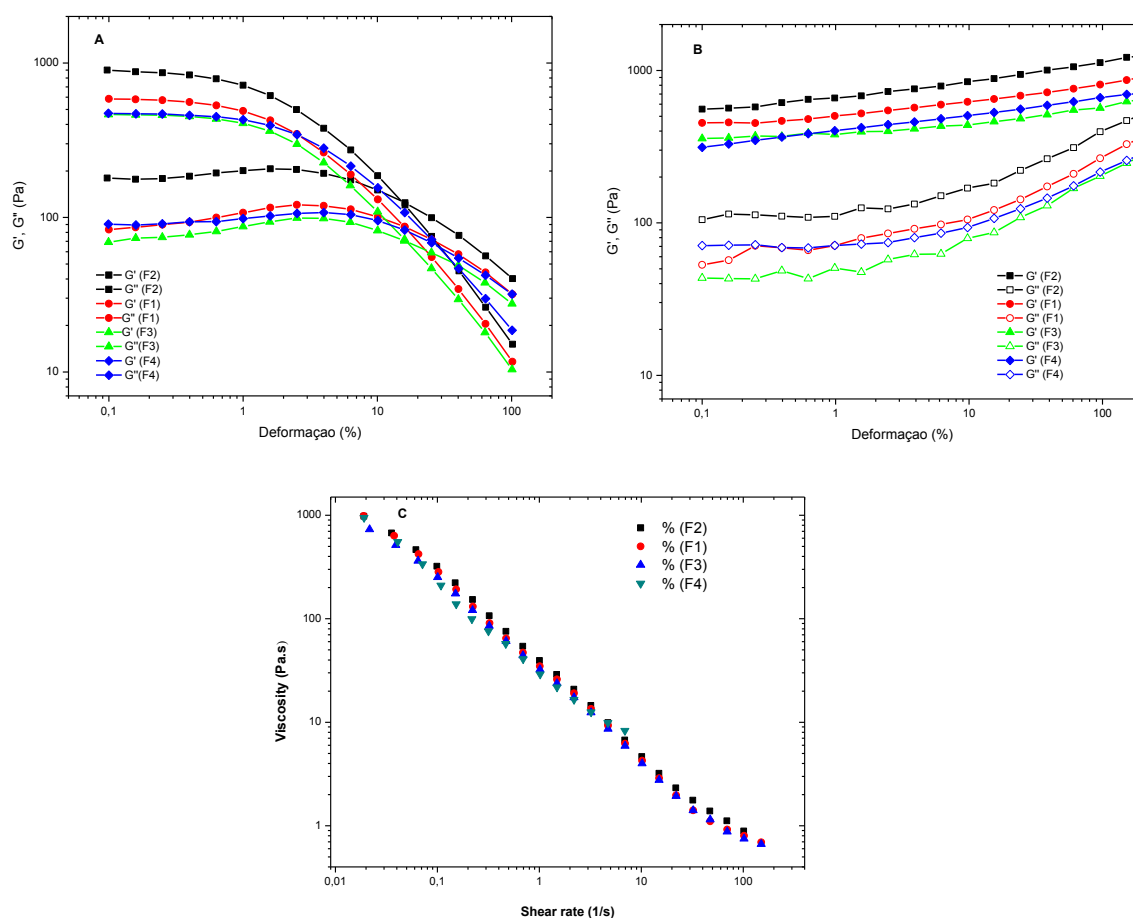


Figure 4: Continuous rheological behavior for formulations F1, F2, F3 and F4. Empty symbols indicate an upward curve, and full symbols, a downward curve. A: Amplitude, B: Frequency and C: Viscosity.

The oscillatory rheological analysis investigates the viscoelastic properties of the formulations, which provides information on the structural nature of the system, directly implying the performance of the formulation (Sharma et al, 2006).

According to the graphs in Figure 4, graph A and B (Amplitude and frequency graphs), all the samples presented similar results, that is, the presence of sucupira crude and PVA did not influence the results. All samples presented a more elastic

behavior (G' than G''), but with increasing tension, the samples presented G'' above G' , forming the so-called crossover, demonstrating that all samples, without exception, started flow. Graph C (Viscosity), all the samples showed a decrease in the viscosity value when subjected to shear, characterizing a non-Newtonian and pseudoplastic behavior, desirable for products to be applied topically, as they fluidize when rubbed. In addition, the presence of PVA and sucupira did not influence the behavior of the sample, as also observed in the other assays.

The elastic modulus (G') and the viscous modulus (G'') represents the energy stored during deformation when the stress increases, as well as the energy released when the tension is relaxed. G'' is the viscous element which can not store energy because the applied voltage dissipates in the form of irreversible deformation. In summary, all formulations presented as more elastic than viscous ($G' > G''$), with highly organized structures. This behavior has also been reported in other oscillatory rheological studies performed on liquid crystal systems. The hexagonal and lamellar crystalline mesophases generally have a G' greater than G'' , which reflects their high degree of structural organization (Cefali et al, 2015; Salmazi et al, 2015).

The formulations of SCL without PVA and with PVA can be classified as a non-Newtonian system, since they did not present linearity between stress and the shear rate, being that the profile of the flow curve is characteristic of a pseudoplastic fluid, that is, the viscosity decreases with the increase of the shear rate, verified in graph C (figure 4).

The SLC formulations without the PVA polymer (aqueous phase) did not show rheological differences even when added to the *Pterodon Pubescens* Benth extract. In comparison to the SLC formulations with the addition of the polymer PVA, this addition did not promote change in rheology as shown in Figure 4.

However, pseudoplasticity is due to the liquid-crystalline structure, which causes greater resistance to flow than microemulsions, which are colloidal systems (Carvalho, 2008). Such property is desirable for formulations developed for oral administration, for example, during application at high shear rates, deinterlacing of the polymer chains and subsequent thinning of the flow will occur, thereby facilitating administration of the formulation. However, upon withdrawal of this tension, the formulation will recover its initial viscosity, remaining longer in the buccal environment.

4.4 Mechanical properties analysis

The formulations were subjected to TPA to define their mechanical properties, allowing us to investigate and characterize useful parameters for the development of various types of pharmaceutical systems. These include the evaluation of the effects of stress found under physiological conditions and the structural characteristics of the formulations, which directly affect their clinical performance.

Thus, this technique is capable of evaluating the hardness (the maximum compressive deformation resistance), the compressibility (the work required to compress the formulation), and the adhesiveness (the work required to overcome the connections between the formulation and the probe) of the formulations. This final

parameter involves the breaking of cohesive bonds within the formulation and may be related to the cohesion of the formulation. Cohesion is measured from the division of the areas of adhesiveness and compressibility. A resulting value close to 1 indicates that our formulation is cohesive (Calixto, 2013).

Hardness and compressibility represent the ease of application and the ease of spreading of the formulation on the surface to be treated, respectively (Jones, 2000; Salmazi, 2015). The results obtained are shown in figure 5.

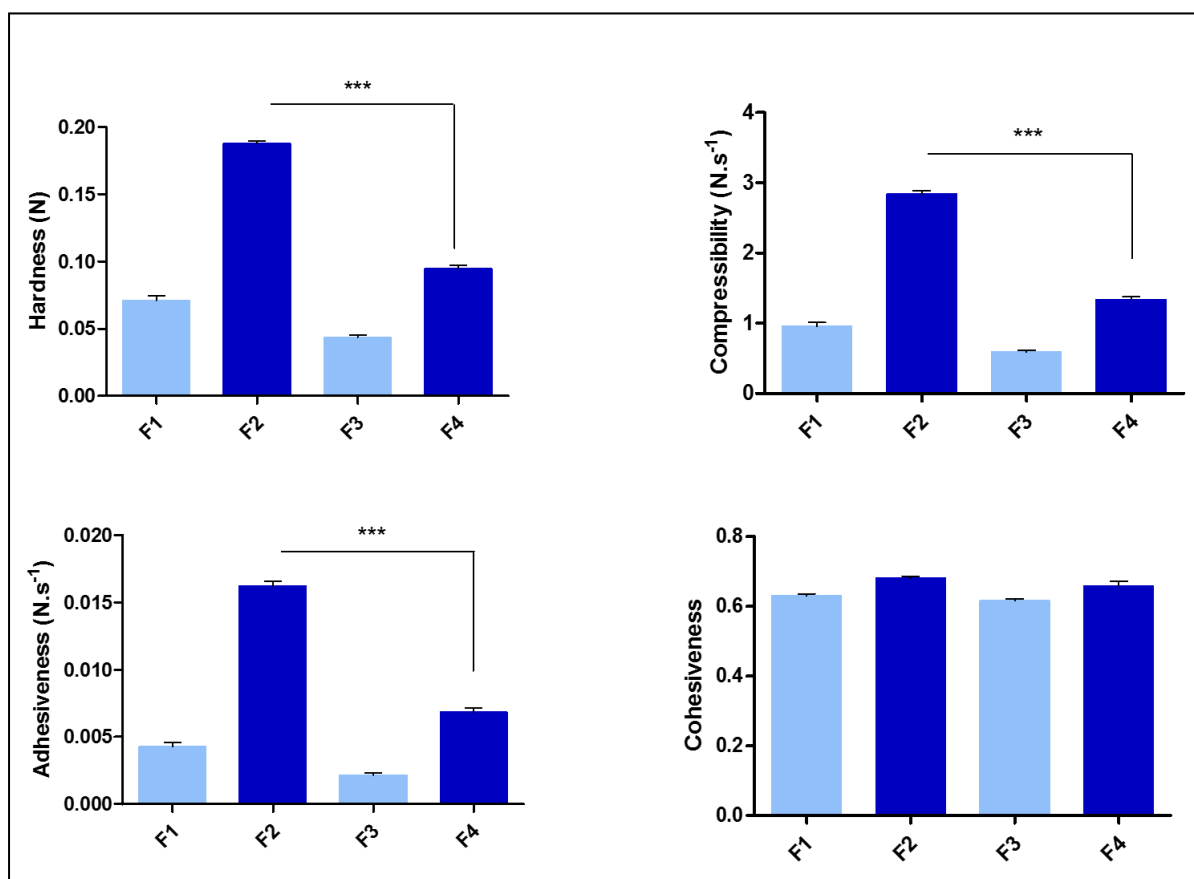


Figure 5: Bar graphs for the measurements of hardness, area of compression, area of adhesiveness and cohesion obtained by the TPA methodology. F1: white formulation without PVA; F2: white formulation with PVA; F3: formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth without PVA; F4: Formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth with PVA. Statistical significance was determined by ANOVA one way followed by Bonferroni test, level of significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

The analysis of the mechanical properties of both developed systems showed that sucupira extract influenced the parameters hardness, adhesiveness and compression. The analysis of the mechanical properties of both developed systems showed that the sucupira extract influenced the parameters hardness, adhesiveness and compression. This may be related to the compounds present in the extract, since the extract has many molecules that may be interacting in these analyzes.

Adhesiveness is an important parameter in the design of mucoadhesive dosage forms, since it is the strength that the sample exerts on the analytical probe, which indicates the ability of the formulation to adhere to a surface.

Observed that in the sample F2 has addition of polymer in the FA and promoted an increase in all the parameters of the texture. However, in the sample F4 that has the same constituents of F2 but with the addition of the Sucupira extract, presented a decrease in the parameters, suggested that the sucupira extract interfered in the physicochemical processes, such as hydrophobic interactions, hydrogen bonds and of van der Waals, since in the extract of the fruits of *P. pubescens* they have interactions between the sesquiterpene, geranilgeraniol and vouapapanic compounds, and that these interactions can influence.

4.5 Mucoadhesion measurement

The mucoadhesion assays in this study used the formulations F1, F2, F3 and F4, where F2 (table 3) showed a significant increase in mucoadhesive force in relation to all systems, due to the addition of PVA in the aqueous phase, making the system more viscous. Note that in both samples F3 and F4, the addition of the sucupira extract had similar values of mucoadhesion strength, and in the sample F4 also has polymer in the aqueous phase, that is, the addition of polymer did not favor the mucoadhesion.

Table 3: Mucoadhesion properties of the loaded unloaded formulation (n=3), the values represent the mean $\pm$ standard deviation.

Formulation	Mucoadhesive force (mN)
F1	0.010 $\pm$ 0.002
F2	0.037 $\pm$ 0.027
F3	0.008 $\pm$ 0.001
F4	0.010 $\pm$ 0.003

The results of mucoadhesion are related to physico-chemical processes, such as hydrophobic interactions, hydrogen and van der Waals connections, which are controlled by pH and ionic composition (Woodley et al., 2001). Therefore, this result may be related to the use of a single polymer such as PVA which is a non-ionic polymer and when compared to other polymers, such as cationic and anionic polymers that facilitate a strong interaction with mucus (Ludwig, 2005; Karki et al, 2016). Anionic polymers are well characterized due to the existence of carboxyl and sulfate functional groups, which create the negative charge at pH values higher than the pKa of the polymer (Karki et al, 2016).

4.6. *In vitro* cytotoxicity studies

In order to verify the cytotoxicity of crystalline liquid systems, *in vitro* tests were performed on culture of human gingival fibroblast cells. This assay utilized the

methodology of sulfforrodamine B, which is a protein dye that binds to the basic amino acid residues of the cell proteins that were viable at the time of fixation. In this assay, cell viability was assessed by measuring the amount of SRB bound to the cell membrane, where the greater the amount of SRB bound to the compartment, the more viable cells there are.

The degree of toxicity of polymers is strongly influenced by the biological conditions of the local environment, which can influence the rate of degradation or release (Nafee et al, 2004). On this basis, the physicochemical properties such as size distribution, surface charge and the presence of functional groups on the particle surface are considered key factors in judging the cytotoxicity (Nafee et al, 2004).

The biocompatibility of the formulations without and with PVA at water fase was examined by measuring cytotoxicity after indirect contact, and the result is shown in Fig. 6.

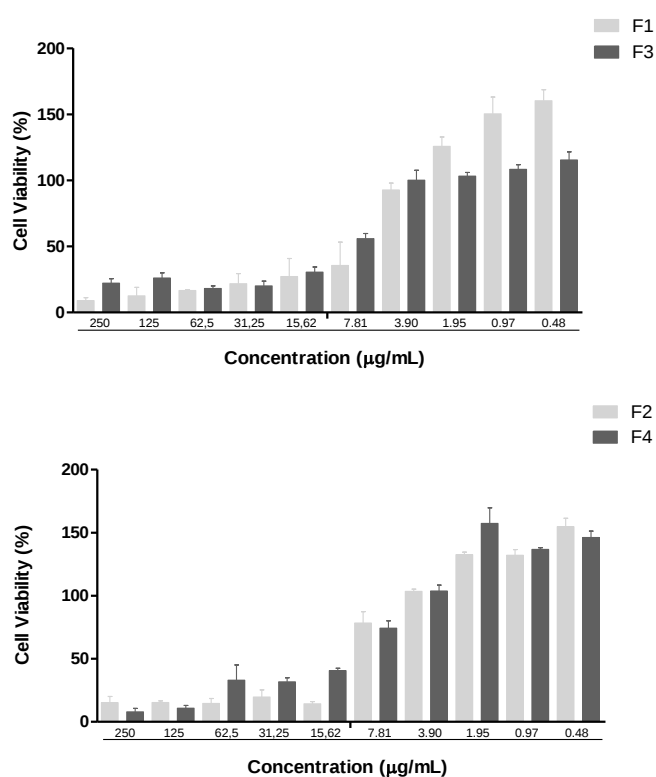


Figure 6: Cell viability indirect method in HGF-1 with liquid crystal system and *Pterodon pubescens* Benth formulations method indirect. (F1): white formulation without PVA; (F3): formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth without PVA; (F2): white formulation with PVA; (F4): formulation containing extract of *Pterodon pubescens* Benth with PVA. Data reported as mean±SD.

As shown in Fig. 6, the formulations without PVA at FA showed minor viability when comparing formulations with PVA in FA. After 24 h incubation with formulations, cell viability was 35.54% [7.81] - (F1); 55.91% [7.81] - (F3) for without PVA and 78.38% [7.81] - (F2); 74.22% [7.81] - (F4) with PVA in FA, respectively.

It can be observed that the formulations with PVA showed a greater cellular viability besides a slight cellular proliferation; while formulations that did not have PVA, when in the presence of the extract showed a reduction in cell viability.

As containing the properties of inherent non-toxicity, no carcinogenicity,

exceptional biocompatibility, desirable physical properties, and large swelling capacity in aqueous with high similarity to those of human tissues, poly (vinyl alcohol) (PVA) is one of the most extensively studied hydrogels (Holloway , 2011; Moura et al, 2013; Yang 2016).

4.7. *In vitro* Permeation Studies

In the permeability of the crystalline liquid systems (without and with PVA), the majority compound, vouacapan 404 m/z , was present in the extract *Pterodon pubescens* Benth. Samples were collected from the acceptor compartment for quantification of 404, and the results were expressed as the $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of 404 permeated.

Fig 7 shows the vouacapan 404 permeation profiles of the different crystalline liquid systems across pig esophagus mucosa.

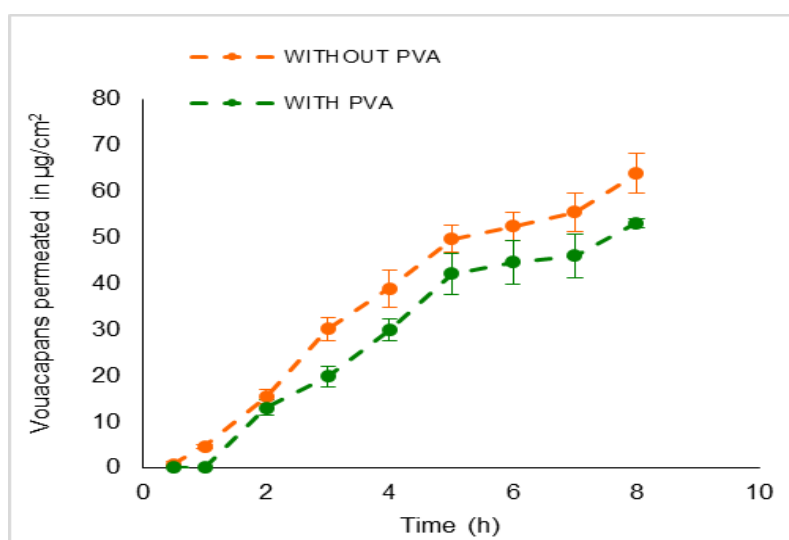


Figure 7. Permeation profile of F3 and F4. The amount of drug loading was 40, 32% F3 and 40, 56 F4, 1.22mg (F3) and 1.21 mg (F4) of vouacapan 404 m/z in each system. Data is expressed as mean $\pm$ standard deviation of $n = 6$ samples.

The permeation parameters (flux and permeability coefficient) obtained for the experiment illustrated in Fig 7 are provided in Table 4. In the systems described above, both remained retained in the mucosa and showed similar permeation profiles.

Table 4: Permeation parameter values obtained of vouacapan (404 m/z) (period: 1–8 h).

	Vouacapan	
	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Permeability coefficient ($\times 10^{-2}\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)
Without PVA (F3)	$8,31 \pm 1,39$	$0,68 \pm 0,11$
With PVA (F4)	$8,65 \pm 1,62$	$0,71 \pm 0,13$

Data is expressed as mean $\pm$ standard deviation of $n = 6$ samples.

4.8. Preliminary study of microbiology

The microbiological study was carried out with the objective of investigating the antimicrobial action of the formulations containing *Pterodon pubescens* extract and its action on the formation of *S. mutans* biofilm when incorporated into the release system.

The results obtained are presented in table 5, where we can observe that the formulations without addition of the extract (F1 and F3) presented equal values (0,015 mg / mL) for all strains tested, while adding the extract (F2 and F4) presented lower values (0,0075 mg / mL) but were equal among the other strains tested.

Table 5: Result of the visual reading of the crystalline liquid system and its white formulations in mg / mL in standard streptococcus strains.

Microorganisms	Clorexidine (mg/mL)	F1 (mg/mL)	F3 (mg/mL)	F2 (mg/mL)	F4 (mg/mL)
<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 12261	0,0037	0,015	0,0075	0,015	0,0075
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 10557	0,015	0,015	0,0075	0,015	0,0075
<i>Streptococcus sanguinis</i> SK 36	0,0075	0,015	0,0075	0,015	0,0075
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073	0,0037	0,015	0,0075	0,015	0,0075
<i>Streptococcus gordonii</i> NCTC 7868	0,0075	0,015	0,0075	0,015	0,0075
<i>Streptococcus mutans</i> UA 159	0,0037	0,015	0,0075	0,015	0,0075

F1: white formulation of the crystalline liquid system without PVA; F2: white formulation of the crystalline liquid system with PVA; F3: formulation with 3% sucupira extract in the crystalline liquid system without PVA; F4: formulation with 3% sucupira extract in the crystalline liquid system with PVA.

In the *S. mutans* biofilm formation inhibition assay, the same MIC concentration (0.05A) was tested. In figure 8, it shows the effect of the controls and the formulations content *Pterodon pubescens* extract in the formation of *S. mutans* biofilm.

The 3 formulations (F2, F3 and F4) tested showed similar values in relation to biofilm formation. Only the F1 formulation showed a decrease in the biofilm bacterial viability, but this formulation does not contain the active substance, however it contains 40% surfactant, 20% oleic acid, and this decrease may be related to the toxicity of this active. In the present study, the F1 control formulation was able to reduce the growth of viable cells of *S. mutans* in comparison with other formulations.

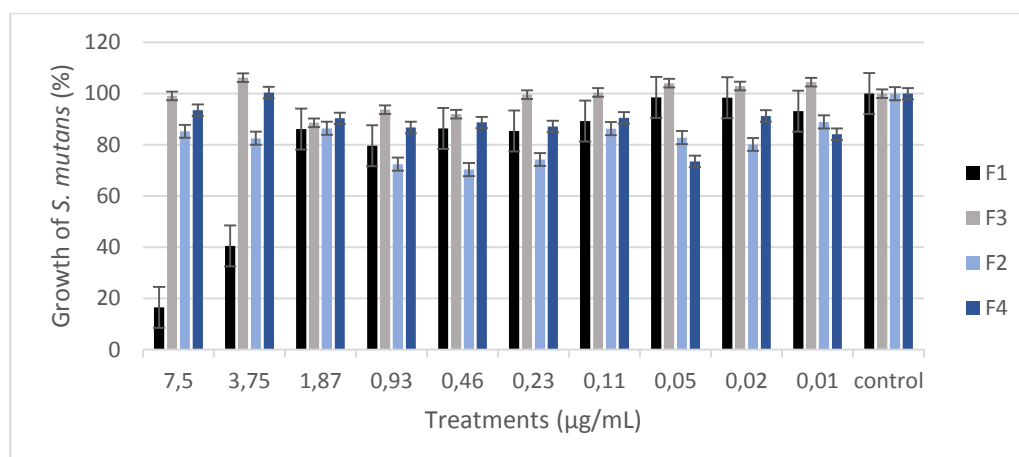


Figure 8: Effect of crystalline liquid system in *Streptococcus mutans* formation biofilm. Bacterial growth profile, presented by absorbance at 595 nm. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$).

The development stages of the dental biofilm comprise the adsorption of bacterial and host glycoproteins on the dental surface; passive transport of oral bacteria on the dental surface; co-accession of the late colonizers to the colonizers already adhered initially; multiplication of microorganisms adhered to the dental surface; and active separation of microorganisms from the dental surface (Marsh, 2004).

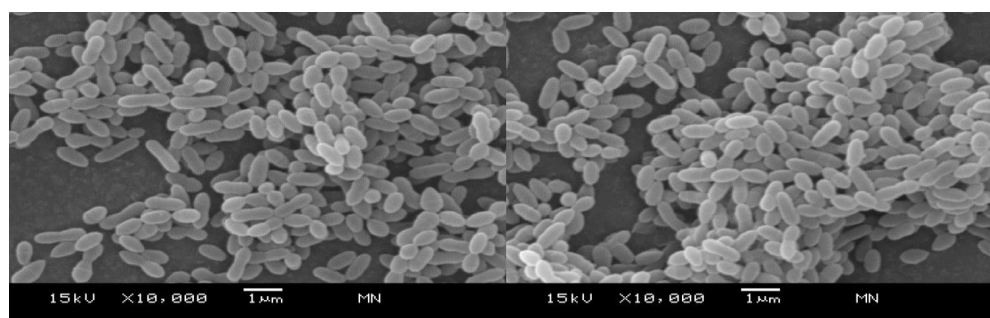


Figure 9: SEM images of *Streptococcus mutans* biofilm.

The image shown in figure 9 represents *streptococcus mutans* biofilm. The SEM images figure 10, show that the treatments of CLS without addition of PVA in the aqueous phase promoted a small reduction of the biomass of the extracellular matrix, forming some agglomerates and favoring the organization of the biofilm. This reduction in homogeneity can be mainly explained by an inhibitory action of the extract of *P. pubescens* on the adherence of *S. mutans*, therefore, decreasing the formation of a thick biofilm.

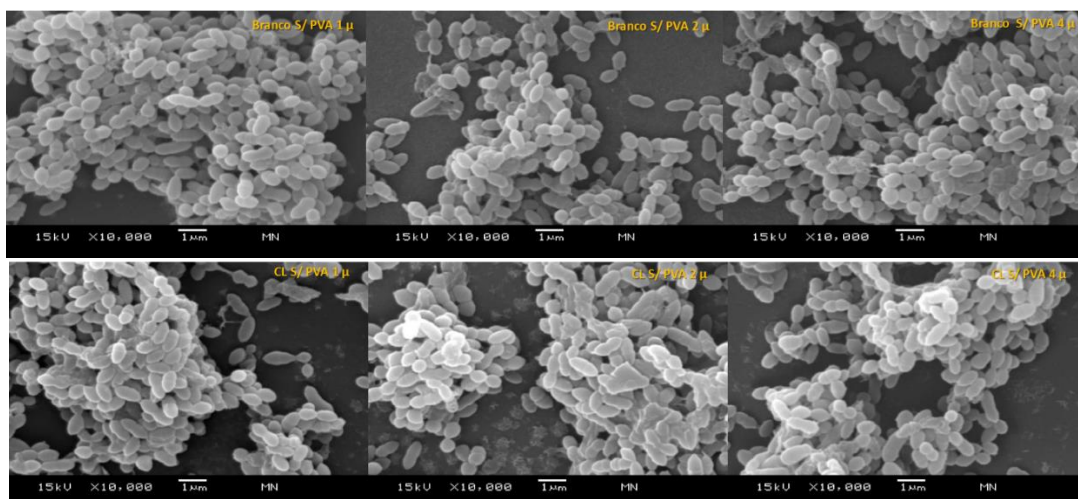


Figure 10: SEM images of the *Streptococcus mutans* biofilm after treatments F1 (A) and with the formulation F3 (B). without PVA in the aqueous phase.

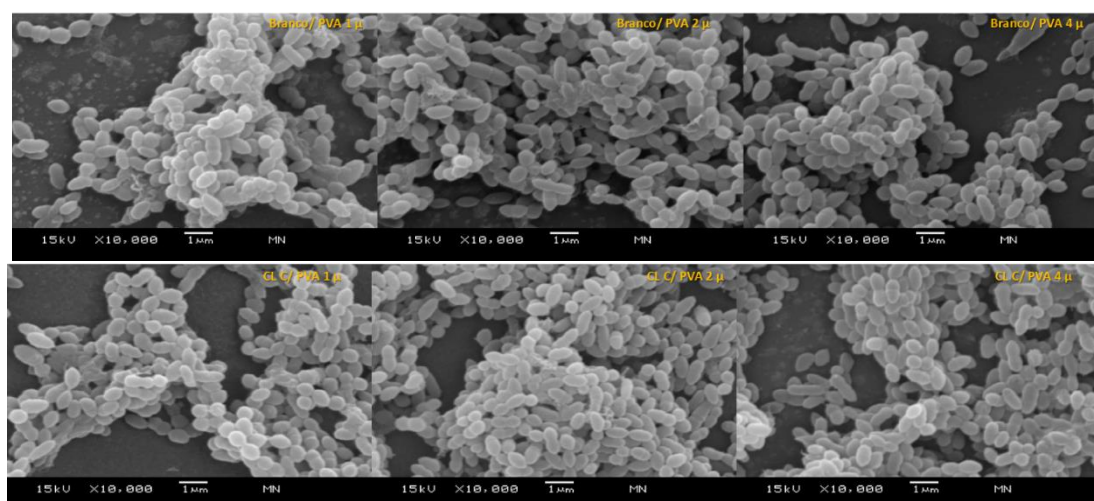


Figure 11: SEM images of the *Streptococcus mutans* biofilm after treatments F2 (A) and with the formulation F4 (B) with PVA in the aqueous phase.

The images, shown in Figure 11, show that the treatments with addition of the polymer dispersion (PVA) in the aqueous phase promoted a discrete increase in extracellular matrix, however without affecting the bacterial viability of *S. mutans*. Through the images, it is possible to observe a cluster of cocci in the process of division, a large number of monotypic cells, besides the presence of extracellular matrix rupture, which represents an important characteristic of streptococci in biofilm formation.

The other species of the genus *Streptococcus* have low cariogenic potential, such as the streptococcus of the mitis and salivarius group, but their interactions in the dental biofilm may be important for the establishment and maintenance of the oral microbiota and biofilm cariogenicity (Nyvad and Kilian 1990).

Streptococcus mutans, a microorganism constantly associated with dental caries (Silva et al, 2008), has developed over time and successfully, multiple mechanisms for its survival, colonization and continuous presence in the human oral cavity. These bacteria produce lactic, acetic, formic and propionic acids through the metabolism of carbohydrates ingested in the diet by the human host (Loesche, 1986;

Carlsson and Hamilton, 1994). These acids cause loss of minerals from the tooth surface (Feartherstone, 1990), with lactic acid being most closely related to the dissolution of the dental structure of healthy elements (Margolis and Moreno, 1990).

The results obtained show that the *P. pubescens* extract, when incorporated into the CLS, favors a discrete reduction of *S. mutans* biofilm formation, suggesting a lower adsorption of bacterial and host glycoproteins on the dental surface. However, other tests are necessary to complement, such as the action of these systems on glycoproteins, among others.

6. Conclusion

Herein *P. pubescens* extracts incorporated with CLS containing PPG-CETETH-20 (40% w / w), oleic acid (20% w / w), purified water (40% w / w), and polymer dispersion with PVA where provided hexagonal and lamellar phases for drug delivery. The rheological and TPA data showed that only F2 (Blank) without sucupira extract had adequate characteristics for mucosal administration, such as pseudoplasticity and adhesiveness. These results may be related to the compounds present in this extract, promoting a decrease in the evaluated parameters. Regarding the mucoadhesive force, the sucupira extract did not alter the mucoadhesion, even in CLS with PVA in the aqueous phase. In the permeation profile, both systems showed a continuous and similar profile, where the PVA did not interfere in the permeation. In the cytotoxicity activities, CLS with PVA was shown to be non-toxic in fibroblastic cells and, in the microbiological action, addition of sucupira did not interfere in the microbial viability of *Streptococcus* spp strains. Therefore, other tests are necessary for these systems (CLS) to enable a product for dental area.

Funding: We would like to thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for grant support nº 12/19661-4.

References

- Abu-Huwaij, R.; Assaf, S.; Salem, M.; Sallam, A. Potential mucoadhesive dosage form of lidocaine hydrochloride: II. In vitro and in vivo evaluation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2007, 33, 437–448.
- Bruschi, M.L.; Freitas, O.; Lara, E.H.G.; Heitor Panzeri, Gremião, M.P.D & Jones, D.S. Precursor System of Liquid Crystalline Phase Containing Propolis Microparticles for the Treatment of Periodontal Disease: Development and Characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2008, 34:267–278.
- Calixto, G.M.F.; Victorelli, F.D.; Dovigo, L.N and Chorilli, M. Polyethyleneimine and Chitosan Polymer-Based Mucoadhesive Liquid Crystalline Systems Intended for Buccal Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, Vol. 19, No. 2, 2018.

Calixto, G. M. F. Development and characterization of bioadhesive nanostructured systems containing peptide analogous to the adhesin of *Streptococcus mutans*. [Dissertation]. UNESP, Araraquara. 2013.

Calixto G, Yoshii AC, Rocha e Silva H, Stringhetti Ferreira Cury B, Chorilli M. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. *Pharma Develop Tech*, 2015, 20(4):490–496.

Carvalho FC, Sarmiento VHV, Chiavacci LA, Barbi MS, Gremião MPD. Development and in vitro evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. *J Pharma Sci*, 2010, 99(5): 2367–2374.

Carvalho, F. C.; E Silva, H. R.; Da Luz, G. M.; Da Silva Barbi, M.; Landgraf, D. S.; Chiavacci, L. A.; Sarmiento, V. H. V.; Gremiao, M. P. D. Rheological, Mechanical and Adhesive Properties of SurfactantContaining Systems Designed as a Potential Platform for Topical Drug Delivery. *J. Biomed. Nanotechnol*, 2012, 8 (2), 280–289.

Carvalho FC, Campos ML, Peccinini RG, Gremião MPD. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. *Eur J Pharma Biopharma*, 2013, 84(1): 219–227.

Carvalho, J.C.T., *Phytotherapics. Anti-inflammatory. Chemical, pharmacological and therapeutic applications*. São Paulo-SP, 2004, 384-400.

Cefali, L.C; Moreira,T.M.S; Corrêa, M.A.C; Salgado, H.R.N; Isaac, V.L.B. Development and evaluation of an emulsion containing lycopene for combating acceleration of skin aging. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, vol. 51, n. 3.

Ciancio, S. G. Medication as risk factors for periodontal disease. *J. Periodontol*. 67(10 suppl.), 1996,1055–1059.

Coelho MGP, Reis PA, Castro FL, Gayer CRM, Lopes CS, Costa e Silva MC, et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodonpubescens* Benth. Seeds. *J. Ethnopharmacology*, 2005, 98: 109–116.

Chorilli M, Rigon RB, Calixto G, et al. Rheological characterization and safety evaluation of non-ionic lamellar liquid crystalline systems containing retinyl palmitate. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12 (2): 394–403.

CLSI (Institute of Clinical and Laboratory Standards). *Methodology of Susceptibility Testing for Antimicrobial Agents by Dilution for Aerobic Growth Bacteria: Standard Approved - Sixth Edition*. Documento M2-A6 NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

Cremonez, C. P.; Bentley, M. V. L. B.; Lara, M. G. Characterization of swelling of lamellar phases of monoolein and water containing polyhexamethylene biguanide. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, 2013, v. 34, n. 4, p. 545-553.

Diaz Del Consuelo I, Pizzolato GP, Falson F, Guy R H, Jacques Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. J Pharm Sci, 2005, 94: 2777-88.

Eren, Y; Özata, A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of Limonium globuliferum aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests, Rev. Bras. Farm, 2014, 24 51–59.

Estrancanhalli, E. A.; Praca, F. S. G.; Cintra, A. B.; Pierre, M. B. R.; Lara, M. G. Liquid Crystalline Systems for Transdermal Delivery of Celecoxib: *In Vitro* Drug Release and Skin Permeation Studies. AAPS PharmSciTech, 2014, v. 15, n. 6, p. 1468-1475.

Featherstone JD, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. Caries Res, 1981,15:377-385.

Fonseca-Santos B, Santos AM, Rodero CF, Gremião MPD, Chorilli M, Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. International Journal of Nanomedicine, 2016.11:4553-62.

Güncüm, E; Işıklan, N; Anlaş, C; Ünal, N; Elif Bulut & Tülay Bakirel. Development and characterization of polymeric-based nanoparticles for sustained release of amoxicillin - an antimicrobial drug. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology. 2018, 46(sup2):964-973.

Grando, R. *Pterodon pubescens* Benth: Evaluation of the synergistic effect of vouacapans and geraniol on anti-inflammatory, antinociceptive and antiulcerogenic activity in vivo [Thesis], Campinas – UNICAMP, 2017.

Ghosh, T. K.; Pfister, W. R. Drug delivery to the oral cavity: molecules to market. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005, 307 p.

Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 6:16–28.

Holloway, J.L; Spiller, K.L. ; Lowman, A.M. ; Palmese, G.R. Analysis of the *in vitro* swelling behavior of poly (vinyl alcohol) hydrogels in osmotic pressure solution for soft tissue replacement. Acta Biomaterial, 2011, 7 (6), 2477-2482.

Jeon, J.G; Pandit, S; Xiao, K; Gregoire, S; Falsetta, M.L; Klein, M.I and Koo, H. Influences of *trans* farnesol, a membrane-targeting sesquiterpenoid, on streptococcus mutans physiology and survival within mixed-species oral biofilms. Int. J. Oral.Sci, 2011, 3, 98-106.

Jones, D. S. et al. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and Carbopol® 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, v. 373, p. 49-58,

Kim, D-H; Jahn, A.; Cho, S-J.; Kim, J. S.; Ki, M-H.; Kim, D-D. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery: a review. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2015, v. 45, n. 1, p. 1-11.

Koo H, Hayacicara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother*, 2003, v. 52, n.5, p. 782-9.

Laffleur, F. Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2014, v. 40, n. 5, p. 591-598.

Lawrence, M. J.; Rees, G. D. Microemulsion-Based Media as Novel Drug Delivery Systems. *Adv. Drug Delivery Rev*, 2000, 45 (1), 89–121.

Lee, J.; Young, S. a.; Kellaway, I. W. Water Quantitatively Induces the Mucoadhesion of Liquid Crystalline Phases of Glyceryl Monooleate. *J. Pharm. Pharmacol*, 2000, 53 (5), 629–636.

Lindhe, J., & Nyman, S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 1984. 11, 504–514.

Lindhe, J., Haffajee, A. J., & Socransky, S. S. Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. *J. Clin.Periodontol.*, 1983, 10, 433–442.

Loesche, W.J Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev*, 1986, 50, 353- 380.

Manganaro, A.M.; Wertz, P.W. The effects of permeabilizers on the in vitro penetration of propranolol through porcine buccal epithelium. *Mil. Med*, 1996, 161, 669–672.

Margolis HC, Zhang YP, Lee CY, Kent RL Jr, Moreno EC. Kinetics of enamel demineralization in vitro. *J Dent Res*. 1999. Jul;78(7):1326-35.

Marsh, P.D. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Research*, 2004, v. 38, p. 204-211.

Morales, J.O.; McConville, J.T. Novel strategies for the buccal delivery of macromolecules. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2014. 40, 579–590.

Morishita, M.; Barichello, J.M.; Takayama, K.; Chiba, Y.; Tokiwa, S.; Nagai, T. Pluronic F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin. *Int. J. Pharm.* 2001.212, 289–293.

Moura, L.I.F; Dias, A.M.A; Carvalho, E; de Sousa, H.C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment: a review. *Acta Biomater.* 2013. 9, p. 7093.

Nafee NA, Ismail FA, Boraie NA, et al. Mucoadhesive delivery systems. I. Evaluation of mucoadhesive polymers for buccal tablet formulation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2004. 30:985–993.

Nicolazzo, J. A.; Reed, B. L.; Finnin, B. C. Assessment of the effects of sodium dodecyl sulfate on the buccal permeability of caffeine and estradiol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, v. 93, n. 2, p. 431-440.

Nyvad, B.; Kilian, M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* 1990. 24: 267-272.

Nucci C, Mazzardo-Martins L, Stramosk J, Brethanha LC, Pizzolatti MG, Santos ARS, Martins DF. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. *Journal of Ethnopharm.* 2012. V. 143, Issue 1, p. 170-8.

Patel, R.; Patel, T. N. Liquid crystals and their application in the field of drug delivery. In: Fanun, M. *Colloids in Drug Delivery*. Boca Raton: CRC Press. 2010. P.311-336.

Qiu, Y; Qiu, L; Cui, J; Wei, Q. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. *Materials Science and Engineering C.* 2016. 59, 303–309.

Repka, M. A.; Chen, L.-L.; Chan, R. S. Buccal Drug Delivery. In: Willson, C. G; Crowley, P. J. *Controlled Release in Oral Drug Delivery*. 2010. P.329-359.

Rodero, C.R; Calixto, G.M.F; dos Santos, K.C; Sato, M.R; Ramos, M.A.S; Miro, M.S; Rodríguez, E; Vigezzi, C; Bauab, T.M; Sotomayor, C.E; and Chorilli, M. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Mol. Pharmaceutics.* 2018. 15, 4491–4504.

Salmazi, R.; Calixto, G.; Bernegossi, J.; dos Santos Ramos, M. A.; Bauab, T. M.; Chorilli, M. A Curcumin-Loaded Liquid Crystal Precursor Mucoadhesive System for the Treatment of Vaginal Candidiasis. *Int. J. Nanomed.* 2015. 10, 4815–4824.

Sattar, M.; Sayed, O. M.; Lane, M. E. Oral transmucosal drug delivery – Current status and future prospects. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, v. 471, n. 1–2, p. 498-506.

Şenel S, Kremer MJ, Kaş S, Wertz PW, Hincal AA, Squier CA. Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. *Biomaterials*. 2000. 21, 2067–71.

Shah A, Amini-Nik S. The role of phytochemicals in the inflammatory phase of wound healing. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5):1068.29.

Sharma, C.; Kaur, J.; Shishodia, S.; Aggarwal, B. B.; Ralhan, R. Curcumin down Regulates Smokeless Tobacco-Induced NF-KB Activation and COX-2 Expression in human oral premalignant and cancer cells. *Toxicology*, 2006, 228: 1–15.

Spindola, H. M.; Grando, R; Figueiredo, M. C; Basting, R; Queiroz, N.C.A.; De Fátima, A; De Carvalho, João E.; Wang, Zaijie J.; Foglio, M.A. Derivatives of furanditerpenes from *Pterodon* genus: Pharmacological studies disclose their potential as chronic pain relief in mice. *European Journal of Pharmacology*, 2017, v. 5, p: 68-77.

Spindola HM. Antinociceptive activity of *Pterodon pubescens* Benth. [Dissertation], UNICAMP- FOP, 2006.

Silva, A.C.B; Cruz, J.S; Sampaio, F.C; Araujo, D.A.M. Detection of oral streptococcus in dental biofilm from caries-active and caries-free children. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008. 39: 648-651.

Sousa, V.H.S. Evaluation of non - clinical toxicity of extract and vouacapans from fruits of the species *Pterodon pubescens* Benth. [Thesis], Campinas – UNICAMP, 2017.

Tresset, G. The multiple faces of self-assembled lipidic systems. *PMC Biophysics*, 2009, 2.

Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006. 1(3):1112-6.

Williamson, E. M. Chapter 8: Phytocomplexes versus Single-Entity Drugs in: Bagetta et al., *Herbal Medicines Development and Validation of Plant- derived Medicines for Human Health*. 2011. 147–160.

Woolfson, D. S; Brown, A. D; Coulter, A. F; McClelland, W. A; Irwin, C; R. C. Design, Characterization and Preliminary Clinical Evaluation of a Novel Mucadhesive Topical Formulation Containing Tetracycline for the Treatment of Periodontal Disease. *J. Controlled Release*. 2000. 67, 357–368.

Yang, J.M; Yang, J.H; Tsou, S.C; Ding, C.H; Hsu, C.C; Yang, K.C; Yang, C.C; Chen, K.S; Chen, S.W; Wang, J.S. Cell proliferation on PVA/sodium alginate and PVA/poly (γ -glutamic acid) electrospun fiber. *Materials Science and Engineering*. 2016. 66. P.170-177.

7. DISCUSSÃO GERAL

A pesquisa com produtos naturais vem crescendo significativamente e são importantes na descoberta de novos fármacos, fornecendo estruturas químicas inéditas de grande interesse na área farmacológica (Cragg & Newman, 2016).

Como mencionado anteriormente, o nosso grupo de pesquisas estuda a espécie *Pterodon pubescens* Benth. desde (1999), trazendo abordagens nas área tecnológica, química e farmacológica para obtenção de dados pré-clínicos de segurança, eficácia e reprodutibilidade que contribuam para a produção de um medicamento fitoterápico. Nessas pesquisas, o líquido extrator utilizado era o diclorometano (DCM), por ser um solvente que promovia maior rendimento. No entanto, o DCM está associado à toxicidade aguda e crônica em humanos, incluindo toxicidade respiratória, toxicidade do sistema nervoso central, toxicidade cardiovascular, carcinogenicidade e genotoxicidade (Taygerly et al, 2012). Por esses motivos, a substituição do diclorometano por outro solvente com menor toxicidade e maior segurança foi imprescindível.

A química verde ou química sustentável apresenta um objetivo de reduzir ou eliminar a geração de substâncias nocivas à saúde e ao ambiente (Lenardão et al., 2003; USEPA, 2013). Além dos benefícios ambientais, tal pensamento apresenta também um impacto econômico graças à diminuição de gastos com o armazenamento e tratamento de resíduos, a descontaminação e o pagamento de indenizações (Tundo et al, 2000; Prado, 2003).

Pesquisas com o extrato etanólico de sucupira (Hoscheid, 2013) avaliaram as propriedades desta espécie administrado por via oral em dois modelos inflamatórios *in vivo*, como reação inflamatória induzida por carragenina na cavidade pleural e artrite induzida por CFA, sendo que os dados confirmaram atividade anti-inflamatória.

Grando (2017) avaliou as propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias *in vivo* do extrato de diclorometano de frutos de sucupira em comparação com o extrato aquoso tradicionalmente utilizado na medicina popular. Os modelos experimentais corroboram a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato aquoso, com menor potência em comparação com o extrato de diclorometano, devido à ausência do composto geranilgeraniol, dentre os responsáveis pela função analgésica.

Na busca pelo desenvolvimento de fito medicamentos, da Silva Santos et al (2016), por diferentes métodos extrativos, desenvolveram uma nanoemulsão que utilizou o extrato obtido por fluido supercrítico e promoveu o melhor índice de seletividade e atividade significativamente melhorada para tratamento de leishmaniose.

Tendo em vista os resultados anteriormente apresentados com os avanços na pesquisa com a sucupira, no presente estudo foram abordadas diferentes etapas necessárias para o desenvolvimento de um produto fitoterápico para uso odontológico, especificamente para doenças de caráter inflamatório como a gengivite. Para isso estudos direcionados foram realizados desde a triagem fitoquímica (teor dos compostos presentes na amostra), avaliação de citotoxicidade em fibroblastos gengivais humanos, incorporação do extrato em formulações mucoadesivas, avaliação microbiológica e verificação da melhor formulação em modelo de doença periodontal experimental em ratos.

Inicialmente, para o desenvolvimento dos estudos, avaliou-se o perfil cromatográfico, observado por CG/EM, HPLC do extrato bruto produzido a partir do óleo dos frutos de *P. pubescens*, provenientes do estado de Minas Gerais. Este extrato se mostrou rico em compostos vouacapanos como apresentado anteriormente por Servat (2010), que tem propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Spindola, 2010, 2011; Grando, 2017).

Visando a aplicação desse extrato, iniciou-se o estudo farmacotécnico, onde a quantidade de extrato vegetal utilizado nas formulações foi entre 1 e 3%, definida de acordo com levantamento realizado no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2011). A literatura também apresenta a utilização de extrato vegetal na faixa de 2 a 5%, sendo possível verificar comprovação de atividade farmacológica utilizando a concentração média de 2,5% em formulações semissólidas (Camelo, 2010; Costa, 2010; Alonso, 2011; Sousa, 2012).

Existem algumas tecnologias que auxiliam a preservar as características do material vegetal, além de prolongarem o tempo de estocagem de produtos alimentícios e farmacêuticos em regiões específicas, entre elas podemos citar: lipossomas, micro e nano partículas, favorecendo sua interação com diferentes sistemas biológicos (Heinrich et al., 2007, Borges et al., 2015). Nossos estudos foram focados em sistemas de administração mucoadesivos de fármacos englobando sistemas bucais.

Para o desenvolvimento dos **filmes mucoadesivos**, a escolha do polímero que confere as propriedades mucoadesivas e de controle de liberação é imprescindível, sendo neste caso utilizado o polímero PVA, que é um polímero sintético, hidrofílico, biodegradável e não iônico, que apresenta boa capacidade de formação de filmes (Faria et al., 2012). Em razão às suas excelentes propriedades, como de desintegração e por ser biocompatível, tem sido utilizado em aplicações industriais, como em processamento de papel e fibras, como estabilizante de emulsão, e também como carreador de fármacos (Aranha & Lucas, 2001, Yang et al., 2016). Atualmente tem sido utilizado em vários dispositivos médicos, como lentes de contato e órgãos artificiais (Yang et al., 2016).

Após a obtenção da nanodispersão, foi realizada a microscopia de transmissão, onde se demonstrou que o material nanoparticulado possui superfície predominantemente esférica com tamanhos diferentes entre as diferentes formulações. Foi possível observar a presença de outras nanoestruturas multicompartimentadas e com possível formação de nanocristais, que é característico da precipitação dos compostos vouacapanos da espécie. Essa característica corrobora o que foi descrito por Servat (2010).

Para verificar as propriedades físico-químicas das nanodispersões foi utilizada a técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS), técnica simples que auxilia na investigação do tamanho, distribuição e carga de superfície das nanopartículas. Na comparação do branco da formulação (somente dispersão polimérica de PVA) entre a dispersão com 1 e 3% de extrato nos filmes mucoadesivos, foi possível observar que os tamanhos das partículas foram semelhantes quando acrescidas do extrato 1.0 % (379,1 nm) e 3.0 % (359,06 nm) em relação ao branco (27,87 nm), com polidispersidade iguais (0,3 *PDi*) e branco (0,7) e apresentaram o potencial zeta semelhantes de 1.0% (- 17,96 mV) e 3.0% (- 19,86 mV).

Para moléculas e partículas suficientemente pequenas, um potencial zeta alto (negativo ou positivo) conferirá estabilidade, isto é, as partículas resistirão à agregação. Quando o potencial é baixo, a atração excede a repulsão e as partículas tendem a agregar-se. Assim, as partículas com potencial zeta alto (negativo ou positivo) são eletricamente estabilizadas, enquanto as partículas com potenciais zeta baixos tendem a coagular ou a flocular (Schultz et al, 2008; Doostmohammadi et al, 2011).

Nosso resultado corrobora com dados experimentais de nanoemulsões obtidas com extrato diclorometano de *P. pubescens* realizado pelo nosso grupo (Basting, 2016), onde observou-se que o uso da sonda ultrassônica resultou em um menor tamanho (355 a 157 nm - redução de cerca de 40%) e aumento dos valores de potencial zeta (- 4,7 a - 42,6 mV). Partículas acima de ± 30 mV mostraram-se estáveis em suspensão (Singh, 2009) e as nanoemulsões após ultrassonicação mostrou ZP indicativo de estabilidade. Este estudo sugere que estas nanoemulsões podem ser um promissor veículo de entrega tópica para inflamação e artrite reumatoide.

De acordo com a literatura (Mashru et al 2005; Wu, 2019), quando se trata de formulações destinadas a aplicação na cavidade bucal, devem apresentar elasticidade, flexibilidade e moderada resistência à tração. Quando a abordagem são filmes (mucoadesivos ou orodispersíveis), devem possuir propriedades mecânicas de materiais macios e fortes além dos mencionados anteriormente. Bem como a avaliação da mucoadesão que representa o grau de sua interação com o epitélio bucal.

Os filmes desenvolvidos apresentaram propriedades mecânicas adequadas para aplicação bucal, porém apresentou menor mucoadesão quando comparado ao filme sem extrato. Alguns pesquisadores relataram que uma menor mucoadesão pode estar relacionada ao uso de polímeros não iônicos (como no caso PVA), que podem ser interessantes em formulações de liberação imediata de fármacos, pelo fato de impossibilitarem interações de carga entre os fármacos e a matriz polimérica (Puratchikody et al., 2011; Couto, 2015).

Ao se tratar de permeação de fórmulas farmacêuticas em mucosa bucal, verifica-se que a mucosa possui natureza lipofílica e fármacos hidrofílicos apresentam dificuldades de permear devido ao seu baixo coeficiente de partição (Ghost & Pfister, 2005). E essa permeação de fármacos através das células epiteliais envolve o transporte, dependendo do caráter do fármaco. No caso de fármacos lipofílicos o percurso é realizado pela bicamada lipídica e, para fármacos hidrofílicos, ocorre uma interação associada com as regiões aquosas adjacentes aos grupos polares da cabeça dos fosfolipídios presente nas bicamadas lipídicas (Veuilleux et al, 2001, Fonseca, 2016).

No perfil de permeação dos ativos presentes nas formulações de filme de PVA, observa-se que o fluxo permanece contínuo, demonstrando que existe

quantidade infinita sendo fornecida à mucosa e que a velocidade de cedência do fármaco provavelmente se mantém constante, ou seja, a quantidade de fármaco presente na mucosa, mesmo que pequenas concentrações, são absorvidas, sendo que o filme de PVA a 3 % foi superior que ao filme PVA 1 %. Para o filme 3 % $J=33,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e para filme 1 % é $21,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, durante 8 horas, o que corresponde a 0,71 mg (1%) e 1,04 mg (3%) de vouacapano (m/z 404), respectivamente.

Outra alternativa para a incorporação do EBE foi o desenvolvimento dos **sistema cristais líquidos (SLC) ou cristal líquido (CL)**, que apresenta uma promissora opção de aplicação para a via bucal. Podem ser apresentados em líquidos, facilitando a administração da formulação, pois ao entrar em contato com o ambiente bucal, o CL tem a capacidade de incorporar à saliva, tornando-se uma mesofase líquido-cristalina mais viscosa (Malmsten, 2007).

Essas características CL, permite a transição de estruturação de uma fase lamelar para uma mesofase hexagonal ou cúbica, (Lee, Young & Kellway, 2001; Boyd et al, 2006; Bruschi et al, 2008; Carvalho et al, 2013), o que pode promover liberação controlada e, conseqüentemente, resultar em maior retenção da forma farmacêutica no ambiente bucal (Lee, Young & Kellaway, 2001; Bruschi & de Freitas, 2005; Malmsten, 2007; Bruschi et al., 2008; Gilhotra et al., 2014) e maior tempo de residência no local (Malmsten, 2007; Boddupalli et al., 2010; Gilhotra et al, 2014; Fonseca-Santos et al, 2016).

No desenvolvimento do CL, foram utilizados quatro sistemas, F1, F2, F3 e F4, onde nos sistemas F2 e F4 foram adicionados na fase aquosa 10% de PVA na intenção de deixa-lo mais mucoadesivo. Foram construídos 2 diagramas de fases pseudoternários, sendo que um foi com ácido oleico, PPG-5-CETETH-20 e água mais a adição do extrato de sucupira 3 % e o outro diagrama foi com ácido oleico, PPG-5-CETETH-20, água, dispersão polimérica de PVA e extrato de sucupira 3 %.

Quando os diagramas foram construídos sem dispersão polimérica na fase aquosa, pode-se observar que uma região de SF no vértice inferior, como também formação de sistemas emulsivos. Com a presença do polímero na fase aquosa foi possível observar a transição de STBV para STAV, caracterizando uma região com presenças das fases lamelares e hexagonais. Este resultado se assemelha com o descrito por Fonseca (2015), onde foram utilizadas dispersões poliméricas de poloxamer e quitosana com a incorporação da curcumina para o tratamento do câncer bucal.

A caracterização por MLP possibilita classificar os sistemas quanto à isotropia e anisotropia. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar. Cristais líquidos liotrópicos lamelares e hexagonais são anisotrópicos e sua organização estrutural resulta em campos de visualização característicos, como as cruzes de malta no caso da fase lamelar ou estrias no caso da fase hexagonal. Já a fase cúbica, ou mesmo sistemas micelares, microemulsões e emulsões, são isotrópicos e apenas um campo escuro é observado (Hyde, 2002; Malmsten, 2007; Patel & Patel, 2010).

Na comparação dos dois sistemas, pode-se observar que com o acréscimo do extrato de *P. pubescens* no F3 e F4 favoreceu a presença das fases lamelares e hexagonais. As presenças das duas fases podem estar relacionadas aos compostos presentes na sucupira, podendo atuar de diversas formas: interagir em um único alvo (que pode ou não envolver sinergia) ou em vários compostos atuando em um único alvo, entre outros fatores relacionados.

Na presença da fase lamelar se observa em geral aspecto mais liquefeito que viscoso e na microscopia de luz polarizada exibem estruturas na forma de cruz de malta. Já os sistemas de fase hexagonal com luz polarizada exibem estruturas na forma de estrias, como está bem evidenciado em ambos os sistemas (figura 3 – capítulo 2) (Formariz et al, 2005; Chorilli et al, 2011; Kim et al, 2015; Fonseca-Santos et al, 2016).

Interessante perspectiva para o desenvolvimento de formulações são as dispersões coloidais óleo em água, que são utilizadas como veículos para liberação de fármacos pouco solúveis em água, como o caso do extrato de *P. pubescens*, que possui uma baixa solubilidade em água. Outro fator importante é o tamanho e a polaridade, que promovem o balanço hidrofílico e lipofílico do tensoativo, pois a variação dessa polaridade influencia a incorporação do fármaco e do tensoativo na interface, alterando a propriedade de liberação do fármaco (Itoh et al., 2002).

Os fármacos, quando incorporados em sistemas estruturados liotrópicos anisotrópicos (fases lamelar e hexagonal), podem modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e absorção e controle da biodisponibilidade de fármacos. Como sistemas reservatórios, podem alterar os parâmetros farmacocinéticos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica de fármacos.

A reologia de formulações farmacêuticas para uso tópico têm se tornado cada vez mais frequente nas pesquisas, sendo parâmetro importante na estabilidade física de uma formulação, fundamental para o controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia da mesma (Ansel et al, 2000). Estudos reológicos geralmente envolvem relações entre taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento e os sistemas podem ser denominados Newtonianos e não Newtonianos (Miura, 2012).

O modelo utilizado neste trabalho foi o de *Ostwald de Waele* entre outros como *Hershel-Bulkley* e *Casson*, apesar de não levarem em consideração a dependência com o tempo, têm sido bem aplicados para descrever o comportamento reológico (Tonelli et al, 2005; Mullineux e Simmons, 2007; Oliveira et al, 2008).

Neste trabalho, a reologia foi realizada para os quatro sistemas (F1, F2, F3 e F4). O acréscimo da dispersão polimérica do PVA na fase aquosa não interferiu na reologia dos sistemas, e mesmo o extrato adicionado também não alterou viscosidade.

Pode ser observado na tabela 2 – capítulo 2, que todos os valores referentes a viscosidade (n) são menores que um, sendo classificados como fluidos não newtonianos pseudoplástico. As formulações apresentaram comportamento não-newtoniano, isto reflete sua tendência pseudoplástica, um comportamento reológico desejável nestas preparações, ou seja, mostram uma mudança na viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento.

Os gráficos apresentados na figura 4 – capítulo 2 abordam comportamentos reológicos de amplitude, frequência e viscosidade. Nota-se em ambos os gráficos A (amplitude) e B (frequência), que todas as amostras apresentaram comportamento elástico (G' mais evidente em comparação ao comportamento viscoso G''), porém, com o aumento da tensão, as amostras começaram a apresentar G'' acima de G' , formando o chamado *crossover*, referindo-se que o comportamento elástico das amostras se mantém superior ao comportamento viscoso.

Entretanto, após um maior cisalhamento, as amostras começam a fluir, sendo desejável para uma aplicação topica, e a sucupira e o PVA não influenciaram no comportamento das amostras. No gráfico C (viscosidade), as amostras apresentaram queda no valor de viscosidade quando submetidas ao aumento no cisalhamento, caracterizando um comportamento não-newtoniano e pseudoplástico, desejável para produtos a serem aplicados topicamente, pois fluidificam ao serem

friccionados. Neste ensaio, a presença de PVA e sucupira não influenciaram no comportamento das amostras, assim como observado nos outros ensaios.

A análise de textura mostrou que a adição de polímeros na FA influenciou nos parâmetros dureza, adesividade e compressão. A adesividade é um parâmetro importante no delineamento de formas farmacêuticas mucoadesivas, pois é a força que a amostra exerce na sonda analítica, que indica a capacidade de aderência da formulação sobre uma superfície. Porém, quando adicionado o extrato de sucupira, promoveu diminuição nos parâmetros, onde no extrato temos vários componentes (compostos) que podem estar interferindo de forma sinérgica nas propriedades físicas químicas como, por exemplo, ligações de hidrogênio, *Van der Waals* entre outras propriedades. O delineamento de SLC pode ser explorado, pois no diagrama pseudoternário de fases são mostradas regiões que, com o aumento de FA, aumentam a viscosidade e transitam de uma fase lamelar para hexagonal.

As amostras que continham polímeros na FA exibiram uma maior força e trabalho de mucoadesão quando comparados com as formulações sem polímeros na FA. Esse fenômeno sugere que haja uma interação entre as cargas positivas da quitosana com a carga negativa dos grupamentos da mucina presente na mucosa. A adição de polímeros na FA exibe uma ação sinérgica sobre a propriedade mucoadesiva, sendo interessantes para sistemas de liberação mucoadesivos.

Outra abordagem foi a avaliação microbiológica do extrato, filmes e sistema líquido cristalino nos parâmetros de concentração inibitória mínima (CIM), formação do biofilme bacteriano e caracterização por MEV dos biofilmes.

Sabe-se que a formação do biofilme bacteriano é o desencadeador dos processos patológicos que acometem a estrutura do elemento dental e o tecido de suporte dentário, assim o controle da formação do filme bacteriano é imprescindível quando se quer controlar o desenvolvimento da periodontite (Juiz, 2010). O tratamento para a eliminação da formação do biofilme dental é por meio de escovação diária e por profilaxias, com uso de antissépticos incluindo clorexidina, favorecendo a redução e/ou eliminação de acumulações bacterianas nos sítios remanescentes na parte superior dos dentes (superfícies oclusais) (Loeche, 2001; Alviano, 2009).

Na comparação entre o extrato livre, os filmes mucoadesivos e os sistemas líquido cristalinos na análise microbiológica, observou-se que a incorporação do extrato nos filmes favoreceu a atividade de inibição das cepas de

Streptococcus comparado ao extrato livre e ao sistema líquido cristalino. Sugere-se que as nanopartículas formadas além de melhorar a ação, podem ser uma alternativa para a viabilização do extrato bruto.

Neste experimento, a solubilidade do extrato foi fator desafiador uma vez que a concentração de tensoativo (Tween 80®) é baixa (0.1%), dificultando, assim, a completa dissolução. Para isso, maiores quantidades de extrato foram utilizadas, permitindo, assim, aumentar a proporção do extrato e tensoativo. Isso se aplicou para o extrato e filme mucoadesivo, uma vez que o sistema líquido cristalino se mostrou facilmente solúvel no tensoativo.

Este resultado se mostra muito promissor, pois envolve uma técnica simples, barata, que, além de viabilizar o extrato, apresentou uma concentração inibitória microbiana de 1.56 mg/mL e 0.78 mg/mL nas formulações de 1.0% e 3.0% respectivamente, em relação ao extrato livre que foi de 2.5 mg/mL em cepas bacterianas da camada primária. Já no sistema líquido cristalino, observou-se uma concentração inibitória microbiana de 0.015 mg/mL e quando a sucupira foi adicionada apresentou CIM de 0.0075 mg/mL. Com estes resultados, nota-se que a sucupira quando incorporada promove uma ação microbiana inibitória em cepas de *Streptococcus* ssp.

Essas formulações foram avaliadas na formação de biofilme de *S. mutans*, e pode-se verificar que os filmes se apresentaram mais promissores em comparação com o SLC. Isso pode ser explicado, pois no sistema líquido cristalino existe uma maior concentração de tensoativo e em contato com a solução bacteriana pode promover uma diferença na pressão osmótica celular, podendo interferir na viabilidade bacteriana. Neste caso, outras proporções com menos tensoativo destas formulações podem ser avaliadas quanto à atividade antimicrobiana.

ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material. Esses testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células. Para o método direto, as formulações desenvolvidas seriam colocadas em contato direto com as células. Como possuem grande quantidades de excipientes equivalentes do extrato nas formulações, poderiam provocar alterações de pressão osmótica e de concentração iônica que poderiam ser tóxicos para a célula, obtendo uma toxicidade inespecífica, não obtendo o real efeito dessas formulações sobre as células.

Neste caso, a citotoxicidade do extrato e das formulações tanto em filme e SLC, foram analisados pelo método indireto em cultura de fibroblastos gengivais humanos, onde a metodologia de Monks e Shoemaker foi adaptada como citado anteriormente, que consistiu em colocar as formulações em contato com meio de cultura por 24 horas e o que foi liberado para o meio de cultura foi analisado. Verificou-se, onde pode-se observar que o extrato livre apresentou viabilidade celular de 73,39% na [15,62 µg/mL], porém quando incorporado nas formulações em filmes promoveu maior viabilidade celular (>70), sendo para filme 1% [125 µg/mL] uma viabilidade de >100% e no filme de 3% na mesma concentração apresentou viabilidade >70%. Nas formulações do tipo sistema líquido cristalino, foi observada uma menor viabilidade em relação aos filmes. Onde nos sistemas sem PVA foi de 35,54% [7,81 µg/mL] - (F1); 55,91% [7,81 µg/mL] - (F3) e nos sistemas com PVA 78,38% [7,81 µg/mL] - (F2); 74,22% [7,81 µg/mL] - (F4).

A presença do PVA nos SLC demonstrou aumento na viabilidade celular, enquanto os SLC que não tiveram o polímero apresentaram uma redução na viabilidade celular. Como mencionado anteriormente, o PVA, além das propriedades não tóxicas, biodegradáveis, é um dos hidrogéis mais estudados e quando incorporado nos materiais, como: quitosana, alginato de sódio, colágeno e outros polímeros sintéticos têm sido utilizados em aplicações biomédicas, como curativo de feridas, lentes de contato, sistemas de administração de fármacos e na engenharia de tecidos (Millon et al., 2012).

Os estudos relacionados à viabilidade celular corroboram com a literatura; Yang et al, (2016), que desenvolveram nanofibras de PVA, PVA com alginato de sódio e PVA com poly (δ – ácido glutâmico) pelo método eletrospinning e foi feita a viabilidade das três nanofibras na linhagem de fibroblastos 3T3, observaram viabilidade similar entre elas e uma proliferação celular com o aumento do tempo para todos os grupos.

Esse conjunto de resultados da avaliação de mucoadesão, tempo de permanência e propriedade mecânicas, associadas aos perfis e parâmetros cinéticos de permeação, bem como avaliação antimicrobiana e citotoxicidade, nos levou a selecionar a formulação filme mucoadesivo com 3% de extrato etanólico de *P. pubescens* para dar continuidade no desenvolvimento desta proposta.

Para a aplicação da formulação em filme mucoadesivo, foi utilizado o **modelo experimental animal de doença periodontal**. Este modelo foi implantado

durante o doutorado e funciona como modelo de tendências biológicas e fornece informações importantes, onde o animal possui um metabolismo mais acelerado, o que nos permite ter um estudo longitudinal em menor tempo comparado com outras espécies. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade no 1º dia ocorrer alterações inflamatórias decorrentes do próprio procedimento de colocação da ligadura (Klausen, 1991; Duarte et al, 2010).

O presente estudo avaliou a melhor formulação farmacêutica no modelo experimental de doença periodontal em ratos. Após a indução experimental, foram realizados os tratamentos por sete dias; e após o período experimental, os animais foram eutanasiados, suas mandíbulas removidas e avaliadas quanto à análise da enzima MPO e avaliação de perda óssea. O modelo experimental de doença periodontal induzida por ligadura em ratos tem sido amplamente utilizado, sendo uma abordagem importante para entender a patogênese da doença. A ligadura favorece um grande acúmulo de biofilme e promove a ulceração do epitélio (Duarte et al, 2010).

A inflamação no processo inicial corresponde ao recrutamento e migração de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (primeira linha de defesa) ao local, onde os neutrófilos são importantes na proteção do periodonto contra certas infecções bacterianas. Estas células, além de realizarem fagocitose, liberam substâncias inflamatórias e antibacterianas capazes de eliminar os microrganismos, como, por exemplo, a lisozima, fosfatase alcalina, proteínas catiônicas e também, mieloperoxidase (MPO) (Over et al, 1993; Bretz, 1996; Miyasaki; Nemirovskiy, 1997).

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que está presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e reage com as espécies reativas geradas a partir do sistema MPO-H₂O₂-haletos (Bradley et al, 1982; Over et al, 1993; Yamalik et al, 2000). Pelo fato da MPO poder ser detectada tanto enzimaticamente como espectrofotometricamente com certa facilidade, ela pode ser usada no diagnóstico clínico da doença periodontal (Over et al, 1993; Miyasaki & Nemirovskiy, 1997).

Com a análise realizada da MPO, pode-se observar que os níveis estavam mais elevados no período de sete dias, correspondendo à fase aguda da inflamação que envolve uma cascata de eventos mediados por proteínas plasmáticas que escapam da microcirculação, incluindo proteínas defensoras, como anticorpos, componentes do sistema do complemento e inibidores de protease, além de outras macromoléculas que localizam patógenos invasores ou tecido danificado, alerta e

recruta outras células e moléculas, elimina os agentes ofensivos e, finalmente, restaura o equilíbrio do corpo (Marshall, 2001).

A atividade aumentada de MPO foi observada no grupo somente ligadura quando comparada ao satélite e aos dois tratamentos bucais tópicos ($p < 0.05$). Os grupos submetidos à ligadura tratados com o extrato e o filme apresentaram uma redução nas concentrações de MPO comparados ao grupo somente ligadura ($p < 0.05$), sugerindo uma redução nos números dos PMN.

O nosso resultado corrobora com outros estudos que utilizam produtos naturais na odontologia. Podemos citar o óleo de copaíba, que é rico em diterpenos e sesquiterpenos (Bardají et al., 2016), e com inúmeras propriedades potenciais para uso na medicina, como sua ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antisséptica, sendo utilizado na prevenção e no tratamento da doença periodontal (Mendonça, 2009).

A literatura tem relatado as propriedades da Malva (*Malva sylvestris*) como potente anti-inflamatório, antioxidante, propriedades anticancerígenas e antiulcerogênicas (Gasparetto et al., 2012). É comercializada como nome de Malvatricin®, sendo indicado para aftas, gengivites, amidalites, faringites, estomatites. Possui em sua composição fitoquímicos, incluindo várias classes de terpenóides, incluindo monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos (Barros et al., 2010; Cutillo et al., 2006).

O estudo de Benso et al (2015) investigou a atividade antimicrobiana e antiinflamatória *in vitro* de *Malva sylvestris* em células subepiteliais infectadas por *A. actinomycetemcomitans*, que é um dos importantes agentes de lesões periodontais agressivas. Nesta pesquisa observaram que, a *Malva sylvestris* e sua fração clorofórmica foram capazes de minimizar o processo de infecção e inflamação, apresentando potencial candidato à fármaco para uso como uma nova abordagem terapêutica no tratamento da doença periodontal.

Na avaliação da perda óssea, uma diminuição na inflamação, consequentemente uma inibição de citocinas pró-inflamatórias, poderia contribuir para a diminuição do influxo de neutrófilos nos tecidos gengivais e, portanto, impedir a reabsorção do osso alveolar e cemento (Freires et al. 2018).

Notam-se muitos estudos relacionando vias inflamatórias associadas à perda óssea, porém necessita de estudos mais aprofundados, desde propriedades físico químicas como atividades farmacológicas, para o desenvolvimento de uma

formulação fitoterápica eficaz com propriedades antimicrobianas, antioxidantes e protetoras dos ossos alveolares.

O estudo de Koneski et al (2018) avaliou a ação do geranilgeraniol, que demonstrou influência positiva nos sinais clínicos do processo de cicatrização de feridas e diminuiu o escore de inflamação, infecção e osso exposto. O resultado obtido na avaliação da perda óssea do extrato e do filme não se mostraram eficazes nestas concentrações testadas. O extrato de sucupira usado em nosso estudo tem uma pequena quantidade de geranilgeraniol, (aproximadamente 6x menos) comparado ao geranilgeraniol (Sigma®) usado nos estudos da Koneski. Este composto está relacionado ao aumento da capacidade de migração de fibroblastos, osteogênicos e células endoteliais, favorecendo o reparo ósseo.

No estudo de Botelho et al (2007), a aplicação local do gel combinado de *M. urundeuva* (5%) e *L. sidoides* (0,5%) por período de 11 dias diminuiu a lesão do tecido periodontal, apresentou propriedades antibacterianas, uma vez que impediu o crescimento de bactérias periodontais, além de diminuir a atividade da mieloperoxidase e inibiu significativamente a produção de TNF- α e IL-1 β nos tecidos gengivais. Ainda se faz necessário no nosso estudo a avaliação das citocinas presentes no desenvolvimento da doença periodontal.

Diante desse problema de saúde pública como a doença periodontal e o potencial farmacológico dos frutos da *Pterodon pubescens* Benth., esta tese contribui com dados para o desenvolvimento de um produto fitoterápico aplicados em estudos *in vivo* e *in vitro* para compreensão desta patogênese.

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta resultados com a espécie vegetal *Pterodon pubescens* Benth., contribuindo com dados dos parâmetros exigidos para viabilizar o desenvolvimento de um produto final (eficácia, segurança e reprodutibilidade).

Os resultados apresentados no desenvolvimento de filmes mucoadesivos mostraram uma formulação eficaz no controle microbiano, principalmente sobre bactérias formadores de biofilme bacteriano (*S. mutans*); foi possível observar diminuição significativa em fibroblastos expostos à dose mais alta testada (250 µg/mL), no tempo de 48 h para ambos os filmes (1 e 3%).

No modelo animal de doença periodontal experimental, apresentaram propriedades anti-inflamatórias, diminuindo a migração da enzima MPO presentes nos neutrófilos, consequentemente diminuição de edema e inflamação; além de se mostrar uma formulação com características físico químicas interessantes para aplicação bucal.

No desenvolvimento dos sistemas líquidos cristalinos, nota-se que, os dados da reologia, propriedades mecânicas e de medida da força mucoadesiva; mostraram que apenas o F2 (formulação branca) sem o extrato de sucupira apresentou características adequadas para a administração da mucosa, como pseudoplasticidade e adesividade. A adição do polímero não iônico PVA na fase aquosa nos sistemas trifásicos (F4) formados por Procetyl® AWS como tensoativo e ácido oleico como fase oleosa e o extrato de sucupira, não se mostrou muito adesivo uma vez que a formulação bucal necessita dessa adesividade, quando comparado ao sistema que não teve o polímero.

No perfil de permeação, ambos os sistemas apresentaram um perfil contínuo e semelhante, onde o PVA não interferiu na permeação e não houve diferença na quantidade permeada de vouacapanos. Nas atividades de citotoxicidade, o CLS com PVA (F2 e F4) mostraram-se não tóxico nas células fibroblásticas e, na ação microbiológica, a adição de sucupira não interferiu na viabilidade microbiana das cepas de *Streptococcus ssp* na formação do biofilme de *S. mutans*.

Portanto, conclui-se que, foi possível desenvolver uma formulação promissora para uso odontológico (Filmes) e que para os sistemas líquidos cristalinos, são necessários outros testes como *in vivo* para fundamentar a aplicação na área odontológica.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Serão realizados experimentos complementares com o extrato separadamente e incorporado em formulações do tipo filme mucoadesivos na determinação dos níveis de citocinas (TNF, IL-17A e IL-10, IL-8) por PCR nas gengivas dos ratos, auxiliando na compreensão de como o extrato da sucupira está agindo na resposta anti-inflamatória.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese de doutorado contribuiu para elaboração de um pedido de patente depositado junto a INOVA-UNICAMP no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), com título “Dispositivo para imobilização animal durante procedimentos experimentais sob o processo: BR 1020160113695 (anexo 3). Esta patente também foi depositada internacionalmente, processo número: WO 2017/197475 AI (anexo 4).

11. REFERÊNCIAS

Abd El Azim H, Nafee N, Ramadan A, Khalafallah N. Liposomal buccal mucoadhesive film for improved delivery and permeation of water-soluble vitamins. *Int J Pharm.* 2015. 488:78–85.

Almeida RF, Pinho MM, Lima C, Faria I, Santos P, Bordalo C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Rev Por Clin Geral.* 2006. 22:379-90.

Anatas, P. T.; Kirchhoff, M. M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Acc. Chem. Res.* 2002.35, 686.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia. Brasil. 2011.

Ansel, H.C.; Popovich, N.G.; Allen, L.V. *Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos.* 6º ed., São Paulo: Editorial Premier, 2000. p. 398-400.

Aral, C. A. et al. Alveolar bone protective and hypoglycemic effects of systemic propolis treatment in experimental periodontitis and diabetes Mellitus. *Journal of Medicinal Food.* 2015. v. 18, n. 2, p. 195-201.

Aranha, I. B.; Lucas, E. F. - Poli (álcool vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: Avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2001. vol. 11, n. 4, p. 174-181.

Arora, N; Mishra, A; Chugh, S. Microbial role in periodontitis: Have we reached the top? Some unsung bacteria other than red complex. *J Indian Soc Periodontol*, 2014. v. 18, n. 3, p. 9-13.

Bardají, D.K.R; da Silva, J.J.M; Bianchi, T.C; Souza Eugênio, D.S; de Oliveira, P.F; Leandro, L.F; Hervé Rogez, L.G; Venezianni, R.C.S; Ambrosio, S.R; Tavares, D.C; Bastos, J.K; Martins, C.H.G. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. *Anaerobe*, 2016, 40, 18 e 27.

Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food Chem Toxicol.* 2010. 48(6):1466–72.

Basting, R.T. Avaliação da associação do extrato bruto diclorometânico de frutos de *Pterodon pubescens* Benth. e do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. [Tese]. Campinas – UNICAMP, 2018.

Basting, R.T; Spindola, H.M; Sousa, I.M.O; Queiroz, N.C.A; Trigo, J.R; Carvalho, J.E; Foglio, M.A. *Pterodon pubescens* and *Cordia verbenacea* association promotes a

synergistic response in antinociceptive model and improves the anti-inflammatory results in animal models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019.112 1-10.

Basting, R.T.; Sousa, I.M.O.; Queiroz, N.C.A.; Servat-Medina, L.; Foglio, M.A. Nanostructured pharmaceutical systems with *Pterodon pubescens* Benth. extract. *Planta Med*, 2016, 82(S 01): S1-S381.

Bradley, P.P.; Christensen, R. D.; Rothstein, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*. 1982. v.60, n.3,p. 618-622.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Formulário de Fitoterápicos – Farmacopeia Brasileira, 1ª Edição, Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

Bruschi, M. L.; Jones, D.S.; Panzeri, H.; Gremiao, M.P.D.; Freitas, O.; Lara, E.H.G. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. *J. Pharm. Sci.*, 2008. v. 96, p. 2074–2089.

Boddupalli BM, Mohammed ZN, Nath RA, Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *J Adv Pharm Technol Res*. 2010. 1(4):381-7.

Boyd, B. J.; Whittaker, D. V.; Khoo, S. M.; Davey, G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. *Int J Pharm*, 2006. v. 309, n. 1-2, p. 218-226.

Borrell, L. N. & Papapanou, P. N. Analytical epidemiology of periodontitis. *J. Clin. Periodontol*. 2005. 32 (Suppl. 6), 132–158.

Calixto, G. M. F. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do *Streptococcus mutans*. [Dissertação]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2013.

Camelo, S.R.P. Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. [Dissertação], Universidade Federal do Pará, UFPA, Belém, 2010.

Carvalho, F.C. Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian journal of Pharmaceutical sciences*. 2010. V. 46, n.1, p. 1-18.

Carvalho, J. C. T. *et al.* Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999. 64, p.127–133.

Carvalho, J.C.T., Fitoterápicos. Anti-inflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas, Tecmedd Editora. São Paulo-SP. 2004. 384-400.

Carvalho FC, Chorilli M, Gremião MPD. Plataformas Bio (Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos - Propriedades, Metodologias e Aplicações Polímeros. 2014. 24: 203-13.

Cetin, E.O; Buduneli, N; Atlihan, E; Kirilmaz, L. *In vitro* studies of a degradable device for controlled-release of meloxicam. J. Clin. Periodontol. 2005. V. 32, n. 7, p. 773-777.

Cetin, E.O; Buduneli, N; Atlihan, E; Kirilmaz, L. *In vitro* studies on controlled-release cellulose acetate films for local delivery of chlorhexidine, indomethacin, and meloxicam. J. Clin. Periodontol. 2004.V. 31, n. 12, p. 1117-1121.

Ciancio, S.G. Medication as risk factors for periodontal disease. J. Periodontol. 1996. v. 67, n. 10S, p. 1055-1059.

Cid., P. Y. Desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos para o celecoxibe na quimioprevenção do câncer oral: influência da azona como promotor de penetração. [Dissertação] UFRJ, 2009.

Colombo, A.V; Silva, C.M; Haffajee, A; Colombo, A.P.V. identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. Journal of Medical Microbiology. 2006.V.55, p. 609-615.

Coutinho, H. D. M.; Bezerra, D. A. C.; Lobo, K.; Barbosa, I. J. F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. 2004. p. 78-85.

Correa AG, Zuin VG. Princípios fundamentais da química verde. In: Correa AG, Zuin VG, editoras. Química verde: fundamentos e aplicações. 1. reimpressão. São Paulo: EdUFSCar; 2012. p.9-22.

Coelho MGP, Reis PA, Castro FL, Gayer CRM, Lopes CS, Costa e Silva MC, et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. Seeds. J. Ethnopharmacology. 2005. 98: 109–116.

Costa, R.S. Estudos de pré-formulação e formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae). [Dissertação], Universidade Federal do Pará – UFPA, Belém, 2010.

Chorilli, M. ; Rigor, R. B. ; Calixto, G. ; Cartezani, P. M. F. ; Ribeiro, M. C. A. P. ; Polacow, M. L. O. ; Cerri, P.S. ; Sarmento, V. H. V. ; Scarpa, M.V. Rheological characterization and safety evaluation of non-ionic lamellar liquid crystalline systems containing retinyl palmitate. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2016.v. 12, n. 2, p. 394-403.

Chorilli, M. et al. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2011. v.85, n: 2, p. 182-188.

Coelho, M.G.P., Marques, P.R., Gayer, C.R.M., Vaz, L.C.A., Neto, J.F.N., Sabino, K.C.C., Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis, Journal of ethnopharmacology. 2005. 77, 159-64.

Clark, J. H.; Macquarrie, D. J. Environmentally friendly catalytic methods Chem. Soc. Rev. 1996.303.

CLSI (Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais). Metodologia dos Testes de Suscetibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. Documento M2-A6 NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

Crawford, J.M; Taubman, M.A; Smith, D.J. The natural history of periodontal bone loss in germ free and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. J. Periodontal. Res. 1978. V.13, n. 4, p. 316-325.

Cragg GM & Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochimica e Biophysica Acta. 2013.1830; 3670–3695.

Cragg GM & Newman DJ. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod. 2016. 79:629-61.

Cremonese, C. P.; Bentley, M. V. L. B.; Lara, M. G. Characterization of swelling of lamellar phases of monoolein and water containing polyhexamethylene biguanide. Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada, 2013. v. 34, n. 4, p. 545-553.

Cutillo F, D'Abrosca B, Dellagreca M, Fiorentino A, Zarrelli A. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. Phytochemistry. 2006. 67(5):481–5.

Da Silva Santos É; Garcia FP; Outuki PM; Hoscheid J; Nunes de Goes PR; Cardozo-Filho L; Nakamura CV; Carvalho Cardoso ML. Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* benth. fruit extracts. Exp Parasitol. 2016. 170: 252-260.

De Souza, J.F; Pontes, K, S; Alves, T,F.R; Amaral, V.A; Rebelo, M.A; Hausen, M.A and Chaud, M.V. Spotlight on Biomimetic Systems Based on Lyotropic Liquid Crystal. Molecules 2017, 22, 419.

Denny C. Atividade Anti-inflamatória do óleo de Sucupira *Pterodon pubescens* Benth. [Dissertação] Piracicaba: FOP Piracicaba, 2002.

Diaz Del Consuelo I, Pizzolato GP, Falson F, Guy R H, Jacques Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. J Pharm Sci. 2005. 94: 2777-88.

Doostmohammadi A, Monshi A, Salehi R, Fathi MH, Golniya Z, Daniels AU. Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential *Ceramics International*. 2011. 37: 2311–6.

Dunn PJ. The importance of Green Chemistry in process research and development. *Chem Soc Ver*. 2012. 41: 1452-61.

Dutra RC, Pittella F, Ferreira AS, Larcher P, Farias RE & Barbosa NR. Efeito Cicatrizante das Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em Modelos de Úlceras Dérmicas Experimentais em Coelhos. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2009.28.

Dutra RC, Campos MM, Santos ARS, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*. 2016. Volume 112, Pages 4-29.

Estrancanhalli, E. A.; Praca, F. S. G.; Cintra, A. B.; Pierre, M. B. R.; Lara, M. G. Liquid Crystalline Systems for Transdermal Delivery of Celecoxib: *In Vitro* Drug Release and Skin Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech*. 2014. v. 15, n. 6, p. 1468-1475.

Eto, F. S, Raslan, S.A, Cortelli, J.R. Características Microbianas na Saúde e doença periodontal. *Rev. Biociênc*. 2003. V.9, n.2, p.45-51.

Faria, F. O; Vercelheze, A.E.S; Mali, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. *Quim. Nova*, 2012. Vol. 35, No. 3, 487-492.

Falcão, H.S.; Lima, I.O.; Santos, V.L.; Dantas, H.F.; Diniz, M.F.F.M.; Barbosa Filho, J.M.; Batista, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, 2005. 15: 381-391.

Fiehn, N.E; Klausen, B; Evans, R.T. Periodontal bone loss in *Porphyromonas gingivalis* – infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous *Streptococcus sanguis*. *J Periodont Res*.v.27, 1992. n.6, p.609-14.

Filippou O, Bitas D, Samanidou V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017.Feb 1; 1043:44-62.

Fonseca-Santos B, Chorilli M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: state of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. *Materials Science & Engineering*. 2018. 1; 86:129-143.

Fonseca-Santos B, Santos AM, Rodero CF, Gremião MPD, Chorilli M, Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2016. 11:4553-62.

Fonseca-Santos B. Sistemas Precusores de Cristais Líquidos Mucoadesivos para Administração Bucal de Curcumina no Tratamento do Câncer Bucal. 2015. 116 f. [Dissertação], Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2015.

Formariz, T.P.; Urban, M.C.C.; Junior, A.A.D.A.; Gremiao, M.P.D.; Oliveira, A.G.D. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2005.v.41, n.3.

Francisco, K.S.F. Fitoterapia: Uma opção para o tratamento odontológico. Revista Saúde. 2010. v. 4, n.1, p. 18-24.

Friedman, M; Steinberg, D. Sustained release delivery systems for treatment of dental diseases. Pharm. Res. 1990. V. 7, n. 4, p. 313-317,

Furness S, Worthington HV, Bryan G, Birchenough S, McMillan R. Interventions for the management of dry mouth: topical therapies. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2011.

Galceran CB, Sertie JA, Lima CS, Carvalho JC. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 α , 7 β -dihydroxy-vouacapan-17 β -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. Inflammopharmacology. 2011.19(3):139-43.

Garant, P.R; CHO, M.I. Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. I. Histometric and histologic study. J Periodont Res. 1979.v.14, n.4, p. 297-309.

Gasparetto JC, Martins CA, Hayashi SS, Otuky MF, Pontarolo R. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. J Pharm Pharmacol. 2012 Feb; 64(2):172–89.

Giovino C, Ayensu I, Tetteh J, et al. Development and characterisation of chitosan films impregnated with insulin loaded PEG-b-PLA nanoparticles (NPs): a potential approach for buccal delivery of macromolecules. Int J Pharm. 2012. 428(1–2):143–151.

Guo, C.; Wang, J.; Cao, F.; Lee, R. J.; Zhai, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. Drug Discovery Today. 2010. V.15, n.24/25.

Gyorfi, A. et al. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. J Clin Periodontol. 1994. v.21, n.9, p.601-5.

Grando, R. “*Pterodon pubescens* Benth.: avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso e atividade anti-artrite reumatoide do extrato diclorometano em modelos animais” [dissertação], UNICAMP – Biociencias e Tecnologia de Produtos Bioativos – IB, 2013.

Grando, R. *Pterodon pubescens* Benth: Avaliação do efeito sinérgico dos vouacapanos e geranilgeraniol sobre atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antiulcerogênica in vivo [Tese], Campinas – UNICAMP, 2017.

Haffajee, A.D. et al. Controlling the plaque biofilm. *International Dental Journal*, 2003a. v. 53, n. 3, p. 191-199,

Hansen D, Haraguchi M, Alonso A. Pharmaceutical's properties of Sucupira (*Pterodon* spp.). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010. vol. 46, n. 4.

Harvey AL. Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chem. Biol*. 2007. 11:480–484.

Harris, D; Robinson, J.R. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity, *J. Pharm. Sci*. 1992. 81; 1–10.

Hearden, V.; Sankar, V.; Hull, K.; Juras, D. V.; Grennberg, M.; Kerr, A. R.; Lockart, P. B.; Patton, L. L.; Porter, S.; Thornhill, M. H. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 2012. 64, n. 1, p. 16-28.

Heinrich, M.; Barnes, J.; Gibbons, S.; Williamson, E.M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 4^a Edição. Elsevier, 2007.

Hyde, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: Holmberg, K., ed. *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. New York: John Wiley & Sons. 2001. 16, p.299-332.

Ikeuchi-Takahashi Y, Kobayashi A, Onishi H. Development of Polyethylene Glycol and Hard Fat-Based Mucoadhesive Tablets Containing Various Types of Polyvinyl Alcohols as Mucoadhesive Polymers for Buccal Application. *Biol. Pharm. Bull*. 2017. 40: 867–77.

Jain N, Jain GK, Javed S, Iqbal Z, Talegaonkar S, Ahmad FJ, et al. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Dis Today*. 2008. 13:932–43.

Junginger, J.A. Hoogstraate, J.C. Verhoef, Recent advances in buccal drug delivery and absorption — in vitro and in vivo studies, *J. Control. Release*. 1999. 62,149–159.

Juiz PJL; Alves RJC; Barros TF. Use of natural products as adjuvant in the treatment of periodontal disease. *Braz. J. of Pharmacognosy*. 2010. 20(1): 134-139.

Klausen, B. Microbiological and immunological aspects of experimental disease in rats: a review article. *J. Periodontol*. 1991. V.62, n.1, p. 59-73.

Klausen, B; Fiehn, N.E; Evans, R.T. Periodontal bone loss in *Porphyromonas gingivalis* – infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous *Streptococcus sanguis*. *J Periodont Res*, 1992. v.27, n.6, p.609-14.

Kraisit P, Limmatvapirat S, Nunthanid J, et al. Preparation and characterization of hydroxypropyl methylcellulose/ polycarbophil mucoadhesive blend films using a mixture design approach. *Chem Pharm Bull.* 2017. 65(3):284–294.

Kraisit, P; Limmatvapirat, S; Luangtana-Anan, M; Sriamornsak, P. Buccal administration of mucoadhesive blend films saturated with propranolol loaded nanoparticles. *Asian journal of pharmaceutical sciences.* 2018. 13, 34–43.

Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol.* 1999. (1):54-64.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. Review. *Nat Rev Dis Primers.* 2017. Jun 22; 3: 1-14.

Kim, D-H; Jahn, A.; Cho, S-J.; Kim, J. S.; Ki, M-H.; Kim, D-D. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery: a review. *Journal of Pharmaceutical Investigation.* 2015. v. 45, n. 1, p. 1-11.

Koide, M. *In vivo* administration of IL-1 β accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *L. Oral Pathol. Med.* 1995. V.24, n.9,p. 420-434,

Koneski, F; Popovic-Monevska, D; Gjorgoski, I; Krajoska, J; Popovska, M; Muratovska, I; Velickovski, B; Petrushevsk, G; Popovski, V. In vivo effects of geranylgeraniol on the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* 2018. 46. 230 e 236.

Kundu J, Patra C, Kundu SC. Design, fabrication and characterization of silk fibroin-HPMC-PEG blended films as vehicle for transmucosal delivery. *Mater Sci Eng C;* 2008. 28(8):1376–1380.

International standard: Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. 1992. ISO 10993-5.

Itoh, K.; Matsui, S.; Tozuka, Y.; Oguchi, T.; Yamamoto, K. Improvement of physicochemical properties of N-4472. Part II: characterization of N-4472 microemulsion and the enhanced oral absorption. *Int. J. Pharm., Amsterdam,* 2002. v.246, p.75-83.

Laffleur, F. Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 2014.v. 40, n. 5, p. 591-598.

Landová. H. Mucoadhesive films as perspective oral dosage form. *Czech and Slovak Pharmacy,* 2013.v.62, p. 4-11.

Lenardão EJ, Freitag RA, Dabdoub MJ, Batista ACF, Silveira CC. “Green chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quim. Nova;* 2003. 26(1):123-9.

Lee, J; Young, S. A; Kellaway, I. W. Water quantitatively induces the mucoadhesion of liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. *J Pharm Pharmacol*, 2001. v. 53, n. 5, p. 629-636.

Lim, H.C. Kim, C.S. Oral signs of acute leukemia for early detection. *J Periodontal Implant Sci*. 2014. v. 44, n. 2, p. 293-9.

Lima Jr, J.F.; Dimenstein, M. A Fitoterapia na Saúde Pública em Natal/RN: visão do odontólogo. *Saúde de Rev*. 2006. 8:1937-44.

Litsgarten, M.A. Pathogenesis of periodontitis. *J. Clín. Periodontal*. 1986. v.13, n. 5, p. 418-430.

Lohinai, Z. et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Brit J Pharmacol*. 1998. v.123, n.3, p.353-60.

Lorenzi H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 1998. 368p.

Lopez, N.J; Socransky, S.S; Silva, I; Japllit, M.R; Haffajee, A.D. Effects of metronidazole plus amoxicilina as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2006. V.33, n.9, p. 648-60.

Lyra, M.A.M; Soares-Sobrinho, J.L; Brasileiro, M.T; de La Roca, M.F; Barraza, J.A; Viana, O. S; Rolim-neto, P.J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. *Lat. Am. J. Pharm*. 2007. 26 (5): 784-93.

Malmsten, M. Phase Transformations in Self-Assembly Systems for Drug Delivery Applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2007. v. 28, n. 1, p. 63-72.

Mashru, R.C. Development and Evaluation of fast-dissolving film of salbutamol sulfate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2005.V.31, n.1, p. 25-34.

Medeiros, G. V. P.; Dias, K. S. P. A. A influência do tabagismo na doença periodontal: Uma Revisão de Literatura. *Id on Line Rev.Mult. Psic*. 2018. vol.12, n.40, p.470-479.

Menna-Barreto RF, Laranja GA, Silva MC, Coelho MG, Paes MC, Oliveira MM, de Castro SL. Anti-Trypanosoma cruzi activity of Pterodon pubescens seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol. Research*. 2008. 103(1):111-7.

Mendonça, D.E; Onofre, S.B. Atividade antimicrobiana do _oleo-resina produzido pela copaiba e Copaifera multijuga Hayne (Leguminosae), *Rev. Bras. Farmacogn*. 2009. 19 577e581.

Meneguín, A. B., Cury, B. S. F., & Evangelista, R. C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 2014.

99, 140–149.

Meneguim, A. B; Cury, B.S.F; dos Santos, A. M; Franco, D.F; Barud, H.S; da Silva Filho, E.C. Resistant starch/pectin free-standing films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release. *Carbohydrate Polymers*. 2017. 157. 1013–1023.

Michalowicz, B. S. *et al.* Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J. Periodontol.* 2000. 71, 1699–1707.

Miyasaki, K.T; Nemirovskiy, E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 1997. V. 12, p. 27-32.

Miura, D.Y. Desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade de géis de papaína destinados ao tratamento de feridas. [Dissertação], Universidade Federal Fluminense – Niterói. 2012.

Mohamad, S.A, Sarhan, H.A.; Abdelkader, H; Mansour, H.F. Vitamin B12–Loaded Buccoadhesive Films as a Noninvasive Supplement in Vitamin B12 Deficiency: *In Vitro* Evaluation and *In Vivo* Comparative Study with Intramuscular Injection, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017. 106. 1849-1858.

Mombelli, A., Casagni, F. & Madianos, P. N. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J. Clin. Periodontol.* 2002. 29 (Suppl. 3), 10–21.

Mombelli, A; Schmid, B; Rutar, A; Lang, N.P. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 2000. v. 71, p.14-21.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D; et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991.83 (11):757-766.

Monteiro, A.F. Estudo Químico e avaliação do potencial efeito biológico das folhas e flores de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae). [Dissertação] – Goiás –UFG. 2014.

Morales JO, Fathe KR, Brunaugh A, Ferrati S, Li S, MontenegroNicolini M et al. Challenges and future prospects for the delivery of biologics: oral mucosal, pulmonary, and transdermal routes. *AAPS J.* 2017.19:652–668.

Mors WB, Fascio M, Gilbert B, Mahajan IR, Monteiro MB, Dos Santos Filho D, Vichnewski W. Diterpenoid furans from *Pterodon* species. *Phytochem.* 1966.15, 201–203.

Mors WB, Pellegrino J, Santos Filho MF. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira branca (*Pterodon pubescens* Benth.) contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. An. Acad. Bras. Ciênc. Suppl. 1996.38, p.325-330.

Nafee NA, Ismail FA, Boraie NA, et al. Mucoadhesive delivery systems. I. Evaluation of mucoadhesive polymers for buccal tablet formulation. Drug Dev Ind Pharm. 2004. 30:985–993.

Nazir, M.A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. International Journal of Health Sciences. 2017. Vol. 1, Issue 2.

Nucci C, Mazzardo-Martins L, Stramosk J, Brethanha LC, Pizzolatti MG, Santos ARS, Martins DF. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. Journal of Ethnopharm. 2012. V. 143, Issue 1, p. 170-8.

Nucci-Martins C, Martins DF, Nascimento LF, Venzke D, Oliveira AS, Frederico MJ, Silva FR, Brighente IM, Pizzolatti MG, Santos AR. Ameliorative potential of standardized fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth on neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanisms of action. J Ethnopharmacol. 2015. 175: 273-86.

Otto, A.; Plessis, J. D.; Wiechers, J. W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. Int J Cosmet Sci, 2009. v.31, p. 1–19.

Over, C; Yamalik, N; Yavuzylmaz, E; Ersoy, F; Eratalay, K. Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease. J. Nihon Univ. Sch. Dent. 1993. V.35, p. 235-240.

Papapanou, P.N. The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told. J. Dent.Res. 2012.91, 907-908.

Patel, R.; Patel, T. N. Liquid crystals and their applicattion in the field of drug delivery. In: FANUN, M. Colloids in Drug Delivery. Boca Raton: CRC Press, 2010. P.311-336.

Patel, V. F.; Liu, F.; Brown, M. B. Modeling the oral cavity: In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. Journal of Controlled Release, 2012. v. 161, n. 3, p. 746-756.

Pedrazzi V., Sistemas bioadesivos intrabuciais para a liberação programada de fármacos: avaliação da resistência à remoção de um dispositivo acrílico e outro polimérico. [Tese] Riberão Preto-USP 1999.

Pessanha, A.F.V; Rolim, L.A; Peixoto, M.S; da Silva, R.M.F; Rolim-Neto, P.J. Influência dos excipientes multifuncionais no desempenho dos fármacos em formas farmacêuticas. Rev. Bras. Farm. 2012. 93(2): 136-145.

Prado, A. G. S. Green chemistry, the chemical challenges of the new millennium. Quim. Nova, Vol. 2003. 26, No. 5, 738-744.

Pinto, E.; Salgueiro, L. R.; Cavaleiro, C. *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. Ind. Crops Produc. 2007. 26: 135-141.

Puratchikody A, Prasanth VV, Sam TM, Ashok KB. Buccal Drug Delivery: Past, Present and Future-A Review. Int. J. Drug Deliv. 2011. 3(2): 171-184.

Rana P, Murthy RS. Formulation and evaluation of mucoadhesive buccal films impregnated with carvedilol nanosuspension: a potential approach for delivery of drugs having high first-pass metabolism. Drug Deliv. 2013. 20(5):224-35.

Ribeiro, M.R.G.; Gualberto, A.M.; Silva, M.A.S.; Souza, S.F.C.; Souza, E.M.; Silva, V.C. Resultados da aplicação tópica do extrato de própolis na redução da progressão da doença periodontal. Rev. Bras. Pl. Med., 2015. v.17, n.4, supl. II, p.915-921.

Robinson, M.; Hart, D.; Pigott, G.H. The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. Lab Anim, 1991.v.25, n.3, p. 247-53.

Sabino KCC, Castro FA, Oliveira JCR, Dalmau SRA, Coelho MGP. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcohol extract of seeds of *Pterodon pubescens*. Phytotherapy Research. 1999 (a).V. 13, Issue 7, p 613-15.

Sandri, G.; Rossi, S.; Ferrari, F.; Bonferroi, M. C.; Muzzarelli, C.; Caramella, C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. v. 21, n. 2–3, p. 351-359.

Sastravaha G, Gassmann G, Sangtherapitikul P, Grimm WD. Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts in supportive periodontal therapy. J Int Acad Periodontol. 2005. 7: 70-79.

Şenel, S.; Hincal, A. A. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. Journal of Controlled Release, 2001. v. 72, n. 1–3, p. 133- 144.

Silva, M.C.C.; Gayer, C.R.M.; Lopes, C.S.; Calixto, N.O.; Reis, P.A.; Passeas, C.P.B.; Paes, M.C.; Dalmau, S.R.; Sabino, K.C.C.; Todeschini, A.R.; Coelho, M.G.P. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. Pharmacy and pharmacology, 2004. 55, 135-41.

Servat L, Spindola HM, Rodrigues RAF, Sousa IMO, Ruiz ALTG, Carvalho JE, Foglio MA. *Pterodon pubescens* Benth. Stability Study of Microencapsulated Extract and Isolated Compounds Monitored by Antinociceptive Assays. J. Braz. Chem. Soc. 2012. P. 1- 10.

Servat-Medina, L. *Arrabidaea chica* Verlot: Formulações de liberação sustentada para aplicação em úlceras de mucosa e pele. [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2014.

Servat, L. Atividade Antinociceptiva e Anticâncer In Vitro de Microencapsulados Produzidos do Extrato Bruto e Vouacapanos Obtidos das Sementes de *Pterodon pubescens* Benth. [Dissertação], UNICAMP- FOP, 2010.

Singh, S. Phase transitions in liquid crystals. *Physics Reports*, 2008. v. 324, n. 2–4, p. 107-269.

Sousa, I.M.O. Avaliação da estabilidade do extrato seco e formulações de base semisólidas, contendo *Arrabidaea chica* Verlot, para uso em cicatrização. [Dissertação], Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2012.

Sousa, V.H.S. Avaliação da toxicidade não clínica de extrato e vouacapanos oriundos dos frutos da espécie *Pterodonpubescens* Benth. [Tese], Campinas – UNICAMP, 2017.

Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery a promising option for orally less efficient drugs, *J. Contr. Release*; 2006. 114: 15–40.

Schlosser PM, Bale AS, Gibbons CF, Wilkins A, Cooper GS. Human health effects of dichloromethane: key findings and scientific issues. *Environ Health Perspect.* 2015. 123(2):114-9.

Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer.* 2006. 6(10):813-23.

Spindola HM. Atividade antinociceptiva do óleo das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. [Dissertação], UNICAMP- FOP, 2006.

Spindola HM, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Rodrigues RAF, Denny C, Sousa IMO, Tamashiro JY, Foglio MA. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with Selective in vitro Anticancer Activity for Prostate Cell Line. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009. 20: 3, 569-575.

Spindola HM, Servat L, Denny C, Rodrigues RAF, Eberlin MN, Cabral E, Sousa IMO, Carvalho JE, Foglio MA. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl éster isolated from *P. pubescens* BMC Pharm. 2010. 10:1.

Spindola HM. Atividade antinociceptiva e antitumoral de compostos isolados da *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae- Papillonoidea). [Tese], UNICAMP- FOP 2010.

Spindola HM, Servat L, Rodrigues RA, Sousa IM, Carvalho JE, Foglio MA. Geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth.: Further investigation on the antinociceptive mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2011. 10; 656(1-3):45-51.

Stratton CF, Newman DJ, Tan DS. Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2015. 25, 4802–4807.

Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J*. 2010. 4 (1): 37-47.

Taygerly JP, Miller LM, Yee A, Peterson EA. A convenient guide to help select replacement solvents for dichloromethane in chromatography. *Green Chem*. 2012. n14:3020.

Tonetti S, Kornman K.S, Page; R.C. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol*. 2000. 14: 33-53.

Tundo, P.; Anastas, P.; Black, D. S.; Breen, J.; Collins, T.; Memoli, S.; Myiamoto, J.; Polyakoff, M.; Tumas, W.; *Pure Appl. Chem*. 2000. 72, 1207.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. Green Chemistry. [Acesso 2018 novembro] Disponível em: <http://www2.epa.gov/green-chemistry>.

Veloza, L. S.M.; Martino, T.; Vigliano, M. V.; Pinto, F. A.; Silva, P. G.; Justo, M. G. S.; Sabino, K. C. C.; Coelho, M.G.P. *Pterodon polygalaeiflorus* Essential Oil Modulates Acute Inflammation and B and T Lymphocyte Activation. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2013.v. 41, n. 3, p. 545–563.

Veuillez, F.; Kalia, Y. N.; Jacques, Y.; Deshusses, J.; Buri, P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2001. v. 51, n. 2, p. 93-109.

Vettore, M.V, Marques, R.A de A, Peres, M.A. Desigualdades sociais e doença periodontal. *Rev Saúde Pública*;47(Supl 3):29-39.

Wang, Z.; Zhou, W. Lamellar liquid crystals of brij 97 aqueous solutions containing different additives. *J Solution Chem*, 2013. v. 38, p. 659–668, 2009.

Welton T. Solvents and sustainable chemistry. *Proc Math Phys Eng Sci*. 2015. 8; 471 (2183).

Weinberg, M. A.; Bral, M. Laboratory animal models in periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, 1999. v. 26, n. 6, p. 335–340.

World Health Organization. WHO Global Oral Health Data; 2005. Available from: http://www.who.int/oral_health/databases/niigata/en. [Acessado em 04 dez 18].

Wu, Z; Huang, Y; Xiao, L; Lin; Yang, Y; Wang, H; Yang, Y; Wu, Chen, H; Zhang, Q; Qin, W; Pu, S. Physical properties and structural characterization of starch/polyvinyl alcohol/graphene oxide composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. 123. 569–575.

Yang, J.M; Yang, J.H; Tsou, S.C; Ding, C.H; Hsu, C.C; Yang, K.C; Yang, C.C; Chen, K.S; Chen, S.W; Wang, J.S. Cell proliferation on PVA/sodium alginate and PVA/poly (γ -glutamic acid) electrospun fiber. *Materials Science and Engineering C*, 2016, 66, 170 – 177.

Yariv, D.; Efrat, R.; Libster, D.; Aserin, A.; Garti, N. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010. v. 78, p. 185–192.

Yamalik, N; Çağlayan, F; Kiliç, K; Kiliç, A; Tumer, C. the importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *J. Periodontol.* 2000. V. 71, n. 3, p. 460-467.

12. ANEXOS

Anexo 1: Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 4378-1)




CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Desenvolvimento de formulações contendo o extrato de *Pterodon pubescens*. Benth para uso odontológico, registrada com o nº 4378-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Ann Foglio e Mariana Cecchetto Figueiredo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de 03 de outubro de 2016.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/11/2016-20/12/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/11/2016-20/12/2018
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	60
Peso / Idade:	02 meses / 150g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 03 de outubro de 2016.



Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Anexo 2: SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A0FC528

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A0FC528**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Pterodon pubescens

Título da Atividade: **Desenvolvimento de formulações contendo o extrato de Pterodon pubescens. Benth para uso odontológico.**

Equipe

Mariana Cecchetto Figueiredo	UNICAMP
Lucia Elaine de Oliveira Braga	FOP - Unicamp
Humberto Moreira Spindola	Universidade Sao Francisco
Rosanna Tarkany Basting	Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unicamp
Fabiana Volpe Zanutto	Unicamp (Prog pós graduação em biociências e tecnolo
Mary Ann Foglio	Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unicamp
Ilza Maria de Oliveira Sousa	FCM/ UNICAMP
Bruno da Fonseca dos Santos	Universidade Estadual Paulista - UNESP
Marius Chorilli	Universidade Estadual Paulista - UNESP

Data do Cadastro: **15/02/2018 18:45:02**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **18:47 de 15/02/2018.**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo 3: Depósito de Patente Nacional**DISPOSITIVO PARA IMOBILIZAÇÃO ANIMAL DURANTE PROCEDIMENTOS
EXPERIMENTAIS****CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção refere-se a um dispositivo para imobilização de animal durante procedimentos experimentais.

[002] A invenção tem aplicações na área de experimentação animal, mais especificamente, odontológica como no modelo experimental de doença periodontal e mucosite entre outros.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] A seguir são citados os principais documentos do estado da técnica envolvendo dispositivos para manipulação e imobilização animal.

[004] Segundo a literatura, é conhecido o aparato de doku, citado no artigo *The effect of epsilon aminocaproic acid on the healing of extraction wounds in hamsters* - 1966, entretanto neste não se encontram as medidas ou fotos referentes ao dispositivo. Imagens fotográficas referentes ao aparato de doku com adaptações segundo as necessidades podem ser encontradas em (https://issuu.com/ebcampagnoli/docs/tcc_-_terapia_fotodin_mica_e_trata). O aparato de doku citado é confeccionado de madeira dificultando sua higienização, não possui nenhum conforto para o animal, como suporte para região bucal e meios para imobilização que promove segurança ao animal.

[005] O documento de patente EP1695617_A1 descreve um dispositivo para imobilizar animal de grande porte e mantê-lo confortável durante a manipulação.

[006] O documento de patente US4261295-A refere-se a um dispositivo para limitar a movimentação de animais de pequeno porte em experimentos, entretanto esta tecnologia permite apenas a imobilização do animal em decúbito dorsal, o que poderia comprometer a respiração deste.

[007] A tecnologia descrita do documento de patente US5184604_A trata de um dispositivo para manter as mandíbulas superior e inferior separadas durante um procedimento de entubação de animais de grande porte.

[008] O documento CN201279198U refere-se a um modelo de utilidade, em formato de lábio, para experimentos em que é necessário manter a abertura bucal, entretanto este dispositivo não trata de bem-estar animal.

[009] O dispositivo descrito no documento de patente CN203169357U refere-se a uma tecnologia que permite manter a abertura bucal de animais de grande porte.

[010] Os dispositivos do estado da técnica destinados a animais de pequeno porte referem-se apenas a imobilização do animal e manutenção da abertura bucal, sem, no entanto, se preocupar em proporcionar o conforto e bem-estar ao animal durante a imobilização.

[011] Enquanto os dispositivos destinados aos animais de grande porte tratam em sua maioria da imobilização animal e da abertura bucal, estes não descrevem cuidados com o bem-estar do animal, lhe garantindo uma imobilização confortável, minimizando qualquer desconforto. Apesar do documento de patente EP1695617_A1 permitir o bem-estar animal, este não se aplica a animal de pequeno porte como na tecnologia proposta, que visa exclusivamente o acesso e a manipulação precisa da região orofacial. A patente EP1695617_A1 proporciona a imobilização do animal por meio de uma barreira lateral minimizando espaços livres. Na tecnologia proposta, o animal é imobilizado diretamente sobre campo de trabalho através de meios para imobilização que promove segurança ao animal, tendo seus membros inferiores totalmente imobilizados sem comprometer seu bem-estar.

[012] Diante do exposto na literatura seria útil que a técnica dispusesse de um dispositivo para imobilização animal capaz de facilitar a manipulação, preparação e

administração de amostras e reagentes envolvidos no modelo experimental sob teste. O animal pode ser contido de forma confortável, sem sofrimento e de acordo com os padrões de boas práticas de testes com animais para estudos experimentais. A arquitetura do equipamento viabiliza boas práticas de manipulação animal aliado a eficiência de produção das medidas de análise. A presente invenção permite que o animal fique em decúbito ventral, permanecendo com a mandíbula inferior separada da mandíbula superior, possibilitando tratamentos odontológicos e oftalmológicos facilitando a manipulação sem comprometer o bem-estar animal.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[013] A presente invenção refere-se a um dispositivo para imobilização de animal durante procedimentos experimentais.

[014] O dispositivo para imobilização animal durante procedimentos experimentais compreende:

- uma base de apoio (1) em formato geométrico de trapézio retângulo, formado por uma barra chata lisa dobrada e suas junções soldadas; sapatas (5) de apoio e parafusos de elevação (6);
- uma base de trabalho (2) de acrílico transparente dobrada a 90° graus, fixada a base de apoio (1) por parafusos; que compreende um campo de trabalho (7);
- apoio mandibular (10); e
- meios para imobilização.

[015] A base de apoio (1) compreende ajuste de altura variável entre 20° e 25°.

[016] Os meios para imobilização podem ser selecionados do grupo Velcro®, barbante e elástico.

[017] A presente invenção tem aplicação na experimentação animal odontológica e oftalmológica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: Trata-se de um esquema do dispositivo em sua modalidade construtiva e perspectiva isométrica, onde:

- 01-Base de Apoio Barra Chata Lisa Aço 13 mm x 3 mm;
- 02-Base de Trabalho Acrílico Transparente 4 mm;
- 03-Parafuso de Fixação e Apoio 1/8" x 11/16" BSW;
- 04-Parafuso de Apoio 1/8" x 9/16" BSW;
- 05-Sapata de Borracha;
- 06-Parafuso de Elevação 1/4" x 1 1/2" BSW;
- 07-Orifício de Trabalho;
- 08-Orifício Oblongo para Fixação com Velcro®;

Figura 2: Trata-se de um esquema do dispositivo em sua modalidade construtiva e vista Frontal, onde:

- 01-Base de Apoio Barra Chata Lisa Aço 13 mm x 3 mm;
- 05-Sapata de Borracha;
- 07-Campo de Trabalho;

Figura 3: Trata-se de um esquema do dispositivo em sua modalidade construtiva e vista Superior, onde:

- 02-Base de Trabalho Acrílico Transparente 4 mm;
- 03-Parafuso de Fixação e Apoio 1/8" x 11/16" BSW;
- 04-Parafuso de Apoio 1/8" x 9/16" BSW;
- 08-Orifício Oblongo para Fixação com Velcro®;
- 10- Apoio mandibular em perfil cilíndrico de Silicone
Ø 19 mm x 80 mm;

Figura 4: Trata-se de um esquema do dispositivo em sua modalidade construtiva e vista lateral, onde:

- 01-Base de Apoio Barra Chata Lisa Aço 13 mm x 3 mm;
- 02-Base de Trabalho Acrílico Transparente 4 mm;
- 03-Parafuso de Fixação e Apoio 1/8" x 11/16" BSW;
- 04-Parafuso de Apoio 1/8" x 9/16" BSW;
- 05-Sapata de Borracha;
- 06-Parafuso de Elevação 1/4" x 1 1/2" BSW;
- 09-Porca 1/4" BSW;
- 09-Apoio mandibular em perfil cilíndrico de Silicone Ø
19 mm x 80 mm;

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[018] A presente invenção refere-se a um dispositivo para imobilização animal durante procedimentos experimentais que compreende:

- uma base de apoio (1) em formato geométrico de trapézio retângulo, formado por uma barra chata lisa dobrada e suas junções soldadas; sapatas (5) de apoio e parafusos de elevação (6);
- uma base de trabalho (2) de acrílico transparente dobrada a 90° graus, fixada a base de apoio (1) por parafusos; que compreende um campo de trabalho (7);
- apoio mandibular (10); e
- meios para imobilização.

[019] A presente invenção em sua modalidade construtiva compreende uma base de apoio (1) na qual estão inseridos em sua parte inferior duas sapatas de borracha (5) e dois parafusos de elevação (6); sobre a base de apoio (1) está a base de trabalho (2) que é fixada a base de apoio (1) por meio de parafusos de fixação e apoio (3). Na base de trabalho (2) conforme pode ser visualizado na figura 2, há um campo de trabalho (7), no qual é inserida a cabeça do animal durante a experimentação. Na figura 1 é possível visualizar na base de trabalho (2) parafusos de apoio (4), e orifício oblongo para fixação (8). Na figura 4 está representado sobre a base de apoio (1) e ligada ao parafuso de elevação (6), uma porca (9) para a fixação deste.

[020] O dispositivo compreende uma base de apoio (1) em formato geométrico de trapézio retângulo, onde uma barra chata lisa de aço com 13 mm x 3 mm foi dobrada e suas junções foram soldadas, contendo aresta lateral maior de 110 mm, aresta da base 245 mm, aresta lateral menor 20 mm e aresta superior ou base de trabalho (2) 260 mm, o ângulo de inclinação da base de trabalho (2) em relação à base de apoio (1) é de 20° graus e em relação à aresta lateral maior é de 70° graus. Anexo à base de apoio (1) uma placa de acrílico transparente com espessura de 4 mm dobrada a 90° graus

contendo 260 mm por uma largura de 155 mm (2), possui 8 furos oblongo (8) de 30 mm x 5 mm, dispostos 4 em cada lado, a base de apoio (1) e a placa de acrílico (2) fixada com 8 parafusos 1/8" x 11/16" BSW sendo 4 parafusos (6) em cada lado, onde os mesmos mantem as peças unidas e uma sobra entre a porca (9) e a cabeça do parafuso proporciona os ressaltos necessários que garantem os pontos auxiliares de amarração da cobaia sobre a base. Nesta superfície de acrílico contém meios para imobilização para segurar o animal, deixando o confortavelmente imóvel. A placa frontal (elevação de 90° graus), contém 145 mm x 155 mm, estão dispostos 10 parafusos (4) 1/8" x 9/16" BSW distribuídos ao redor da placa, sendo 5 parafusos (4) em cada lado da placa, garantindo o posicionamento do animal para execução do procedimento, seguindo os mesmos aspectos construtivos da base. A placa frontal possui ainda os cantos arredondados com raio de 18 mm e furos distribuídos no centro, campo de trabalho (7), partindo do topo a 50 mm, com raio de 25,5 mm (diâmetro 2") e a 90 mm do topo outro furo com raio de 38 mm (diâmetro de 3"), eliminando as sobras com corte tangencial no perímetro das circunferências. O aparelho possui sapatas de borracha (5) com diâmetro de 12 mm x 6 mm de espessura, coladas sob a aresta de apoio para garantir fixação e eficiência perante a possibilidade de derrapagem. As sapatas (5) frontais do aparelho foram fixadas sob parafuso (6) 1/4" x 1/12;" BSW, tornando ajustável a inclinação da aresta superior ou base de apoio, podendo passar de 20° para 25°, de acordo com a necessidade do pesquisador.

[021] O dispositivo possui um acessório que é o apoio para a mandíbula do animal fabricado de silicone (10), deixando-o confortável e garantindo o bem-estar animal.

[022] O dispositivo objeto desta invenção compreende um meio para imobilização que promove segurança ao animal para fixação na superfície da base de trabalho (2) de forma

confortável. O dispositivo é confeccionado de acrílico e possui facilidade de limpeza e possibilidade de autoclavar.

[023] Também é objeto da presente invenção o uso do dispositivo na experimentação animal, principalmente nas áreas odontológica e oftalmológica.

Exemplo de concretização

[024] Os testes realizados com o dispositivo foram realizados em 20 ratos adultos, pesando entre 300 e 450g para tratamento de mucosites, doenças periodontais e oftalmológicas, sendo considerado para os testes o peso dos animais entre 200g a 500g.

Doença periodontal

[025] Os animais foram submetidos ao teste com extratos e frações de *Pterodon pubescens* Benth.; *Artemisia annua* e *Arrabidaea chica* para tratar a doença periodontal, que apresentavam a doença há 1 dia.

[026] O animal foi anestesiado e após 30 minutos foi colocado em decúbito ventral, suas patas foram imobilizadas com uma fita de barbante; seu corpo imobilizado com uma cinta de Velcro® e embaixo da mandíbula foi colocado um apoio mandibular a base de silicone (10), proporcionando conforto e bem-estar animal.

[027] Os dentes incisivos superior e inferior foram fixados com uso de barbante e elástico, respectivamente. O uso do elástico na mandíbula proporciona maior conforto e evita lesões no sistema estomatognático, tais como: gengiva, língua ou mesmo na articulação temporomandibular. A angulação do aparelho e as possibilidades de ajustes na altura permitem o perfeito posicionamento da região orofacial.

[028] Todos os animais utilizados durante o experimento apresentaram total recuperação (alimentação, ganho de peso e locomoção).

Mucosite

[029] Os animais foram submetidos ao teste com extratos e frações de *Pterodon pubescens* Benth.; *Artemisia annua* e *Arrabidaea chica* para tratar a mucosite, que apresentavam a doença a 6 dias.

[030] O animal foi anestesiado e após 30 minutos foi colocado em decúbito ventral, suas patas foram imobilizadas com uma fita de barbante; seu corpo imobilizado com uma cinta de Velcro® e embaixo da mandíbula foi colocado um apoio mandibular (10) a base de silicone, proporcionando conforto e bem-estar animal.

[031] Nos dias 1 a 5 os animais receberam extratos e frações administrados por gavagem. Nos dias 4 e 6 foi feita a indução da mucosite com injeção intraperitoneal de 5-fluorouracil (5-FU). No dia 6 foi realizada ranhura com fio ortodôntico 0.20 de aço em ambas mucosas. Nos dias 1, 8, 10, 12, 15 os animais foram pesados, anestesiados e todas as mucosas evertidas para fotografia. Após a experimentação os animais foram submetidos a eutanásia e seus órgãos analisados.

Doença Oftalmológica

[032] Os animais foram submetidos ao teste com extratos e frações de *Pterodon pubescens* Benth.; *Artemisia annua* e *Arrabidaea chica* para tratar doenças oftalmológicas, que apresentavam a doença a 7 dias.

[033] O animal foi anestesiado e após 30 minutos foi colocado em decúbito ventral, suas patas foram imobilizadas com uma fita de barbante; seu corpo imobilizado com uma cinta de Velcro® e embaixo da mandíbula foi colocado um apoio mandibular a base de silicone, proporcionando conforto e bem-estar animal.

[034] O animal recebe instilação tópica de 5 µl cloreto de benzalcônio (promovendo o olho seco) a 0,2% sem aditivos, 2 vezes por dia (7 e 19h) durante 7 dias no olho direito. O olho contralateral foi preservado para ser utilizado como controle. Após o tratamento foi realizada a avaliação da

osmolaridade do filme lacrimal, o teste de fenol vermelho e a coloração com fluoresceína e lisamina verde. O animal é submetido a eutanásia e os tecidos extraídos para o estudo histológico da córnea, por microscopia óptica, corada com hematoxilina eosina (H&E).

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo para imobilização animal durante procedimentos experimentais caracterizado por compreender:
 - uma base de apoio (1) em formato geométrico de trapézio retângulo, formado por uma barra chata lisa dobrada e suas junções soldadas; sapatas (5) de apoio e parafusos de elevação (6);
 - uma base de trabalho (2) de acrílico transparente dobrada a 90° graus, fixada a base de apoio (1) por parafusos; que compreende um campo de trabalho (7);
 - apoio mandibular (10); e
 - meios para imobilização.
2. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da base de apoio (1) compreender ajuste de altura variável entre 20° e 25°.
3. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelos meios para imobilização poderem ser selecionados do grupo Velcro®, barbante e elástico.
4. Uso do dispositivo conforme definido nas reivindicações de 1 a 3 caracterizado por ter aplicação na experimentação animal odontológica e oftalmológica.

1/2

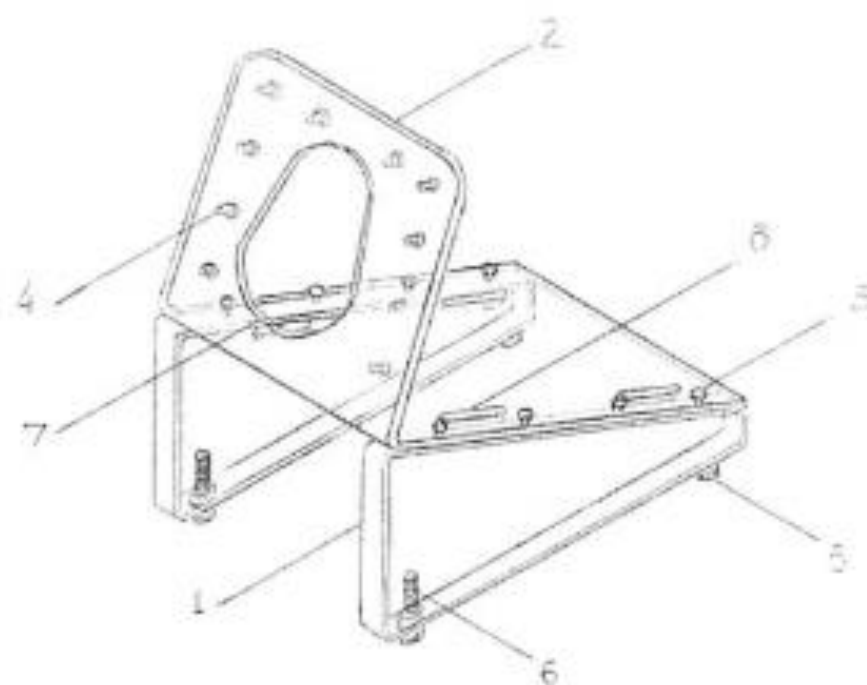


Figura 1

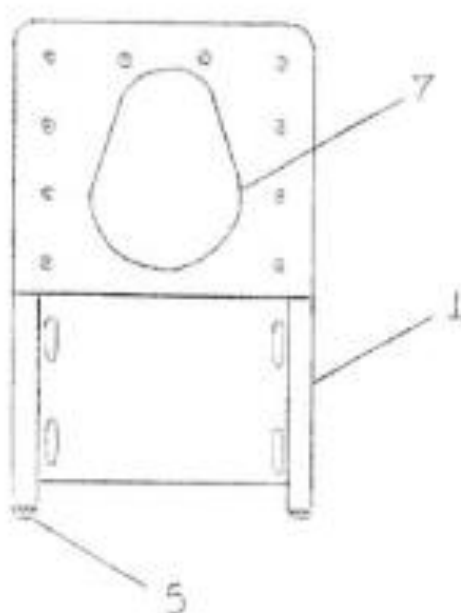


Figura 2

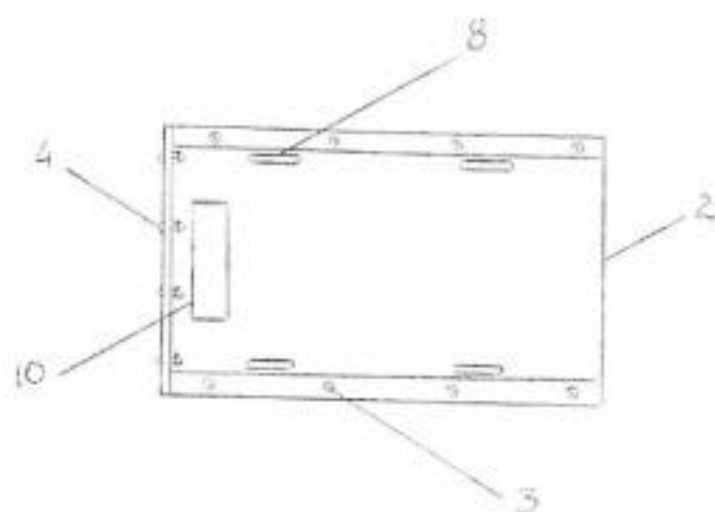


Figura 3

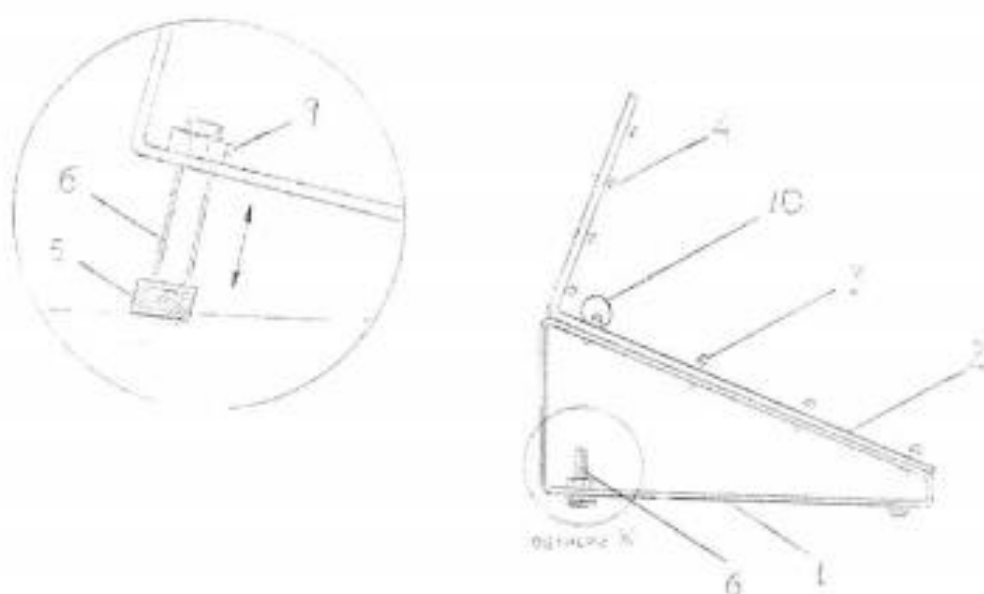


Figura 4

RESUMO**DISPOSITIVO PARA IMOBILIZAÇÃO ANIMAL DURANTE PROCEDIMENTOS
EXPERIMENTAIS**

A presente invenção refere-se a um dispositivo para imobilização de animal durante procedimentos experimentais. A invenção tem aplicações na área de experimentação animal, mais especificamente, odontológica como no modelo experimental de doença periodontal e mucosite, entre outros.

Anexo 4: Depósito de Patente Internacional

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES
(PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional

WO 2017/197475 A1

(43) Data de Publicação Internacional
23 de Novembro de 2017 (23.11.2017) **WIPO IPCT**

- (51) Classificação Internacional de Patentes:
A61D 3/00 (2006.01) *A61D 15/00* (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional:
PCT/BR20 17/000048
- (22) Data do Depósito Internacional:
11 de Maio de 2017 (11.05.2017)
- (25) Língua de Depósito Internacional: Português
- (26) Língua de Publicação: Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade:
BR 10 2016 0 11369 5
19 de Maio de 2016 (19.05.2016) BR
- (71) Requerente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP [BR/BR]; Rua Roxo Moreira 1831 - Cidade Universitária, "Zeferino Vaz" - Distrito de Baão Geraldo, Caixa postal 6.131, CEP 13083-970 Campinas - SP (BR).
- (72) Inventores: FIGUEIREDO, Mariana Cecchetti; Rua Riachuelo, 320, Bairro do Bosque, CEP: 13015-320 Campinas, SP (BR). FOGLIO, Mary Ann; Rua Rafael Luporini, 345, Jd. Chapadão, Bairro Betel, CEP: 13070-122, Campi-
- nas - SP (BR). DE LIMA, André Luis Pires; Rua José Paulino, 2212, Vila Itapura, CEP: 13023-102 Campinas - SP (BR). RUIZ, Ana Lúcia Tasca Góis; Rua Dr. Ruberlei Boneto da Silva, 230, Cidade Universitária, CEP: 13083-705 Campinas - SP (BR). TINTI, Sirlene Valério; Rua Coatiara, 66, Parque Universitário, CEP: 13056-492 Campinas - SP (BR).
- (74) Mandatário: SILVADO, Fernanda Lavras Costallat; Rua Roxo Moreira 1831 - Cidade Universitária, "Zeferino Vaz" - Distrito de Baão Geraldo, Caixa postal 6.131, CEP 13083-970 Campinas - SP (BR).
- (81) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: DEVICE FOR IMMOBILISING ANIMALS DURING PROCEDURES

(54) Título: DISPOSITIVO PARA IMOBILIZAÇÃO ANIMAL DURANTE PROCEDIMENTOS

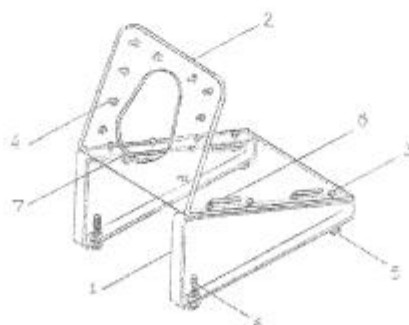


Figura 1

9745 A1