



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

**JULIANA MARTINS DE FARIAS**

**FORMULAÇÃO DE PRODUTOS DE HIGIENE ORAL À  
BASE DE BIOSSURFACTANTE E QUITOSANA  
FÚNGICA**

**Recife  
2019**

**JULIANA MARTINS DE FARIAS**

**FORMULAÇÃO DE PRODUTOS DE HIGIENE ORAL À  
BASE DE BIODISSURFACTANTE E QUITOSANA  
FÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leonie Asfora Sarubbo

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Moura de Luna

**Recife**

**2019**

Farias, J.M.

**Formulação de produtos de higiene oral à base de biossurfactante e quitosana fúngica.** Recife, 2019. 141p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais. páginas.

1. Biossurfactantes; 2. Quitosana; 3. creme dental; 4. enxaguatório bucal; 5. biocompatibilidade; 6. produtos farmacêuticos. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

# **FORMULAÇÃO DE PRODUTOS DE HIGIENE ORAL À BASE DE BIOSURFACTANTE E QUITOSANA FÚNGICA**

**JULIANA MARTINS DE FARIAS**

**EXAMINADORES:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP**

---

**Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thayza Cristina de Montenegro Stamford  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus pela oportunidade de desenvolvê-lo, a meus pais Antonio Martins da Silva Filho e Elizama Gonçalves de Farias Silva (in memorian), ao meu esposo Vandson Soares Gonçalves e aos meus filhos Guilherme Martins Soares e Gustavo Martins Soares.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, ser supremo, pelo dom da vida e conhecimento, por iluminar meus caminhos e pensamento, pela saúde e sabedoria para conduzir e concluir este trabalho.

À Profª Drª Leonie Asfora Sarubbo, orientadora científica, pelo apoio, amizade, confiança e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

À Profª Drª Juliana Moura Luna, pela co-orientação, apoio e incentivo.

Às coordenadoras do curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Profª Drª Clarissa Dayse da Costa Albuquerque e Profª Drª Galba Campos Takaki, pelo apoio durante o curso.

Ao Reitor da UNICAP, Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S. J. pela oportunidade em desenvolver este trabalho nesta universidade.

À Profª Drª Thayza Cristina de Montenegro Stamford e à Profª. Drª. Jaciana dos Santos Aguiar da UFPE por toda ajuda na realização dos experimentos.

Aos técnicos de laboratório Lucas Ferreira da Rocha e Francisco das Chagas Souza dos Santos (Chicó) pela paciência e ajuda conferida na realização dos experimentos.

Ao grupo Biossurfactantes, em especial a Maria Isabel Silveira Pinto, Ivison Amaro da Silva e Ana Helena Mendonça Resende, pela compreensão, dedicação e disponibilidade em me ajudar no laboratório.

Aos meus queridos amigos da 13ª turma do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Karla Alessandra Villela da Silva, Rafaela dos Santos Nascimento e Rodrigo Melo Bezerra de Albuquerque pelo carinho, amizade, companheirismo e apoio durante todo o curso.

A CAPES-FACEPE pelo suporte financeiro no decorrer deste curso.

Ao meu esposo, Vandson Soares Gonçalves, por todo carinho, compreensão, apoio, por sempre acreditar em mim e não me deixar abater nos momentos de dificuldade e compartilhar deles assim como, os momentos felizes.

Aos meus filhos Guilherme Martins Soares e Gustavo Martins Soares, que com sua inocência e alegria, faziam com que os momentos de dificuldade fossem superados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>SUMÁRIO</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	xv
<b>RESUMO</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1.1 Introdução</b> .....	19
<b>1.2 Objetivos</b> .....	22
1.2.1 Objetivo Geral .....	22
1.2.2 Objetivos Específicos.....	22
<b>1.3 Revisão da Literatura</b> .....	23
1.3.1 Cárie dentária e placa bacteriana.....	23
1.3.2 Processo de desmineralização e remineralização do esmalte dentário .....	25
1.3.3 Cremes dentais e enxaguatórios bucais como formulações para a higiene oral .....	26
1.3.4 Polímeros e Biopolímeros .....	30
1.3.4.1 Quitina e Quitosana .....	31
1.3.4.2 Atividade antimicrobiana da quitosana .....	34
1.3.4.3 Quitosana na área odontológica.....	35

1.3.4.4 Aplicações industriais da quitosana .....	35
1.3.5 Biossurfactantes .....	36
1.3.5.1 Atividade antimicrobiana dos Biossurfactantes .....	41
1.3.5.2 Biossurfactantes como agentes anti-adesivos e inibidores de biofilmes.....	43
1.3.5.3 Aplicações dos Biossurfactantes na indústria de cosméticos .....	47
1.3.6 Óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> (OEM).....	48
1.3.7 Regulamentos de Segurança em Cosméticos .....	48
<b>1.4 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>50</b>

## **CAPÍTULO II**

Mouthwash containing a biosurfactant and natural products: Na ecosustainable option for the controlo f cariogenic microorganisms.....	69
Abstract .....	70
1 Introduction.....	70
2. Materials and Methods.....	73
2.1 Production, extraction and characterisation of chitosan .....	73
2.2 Obtainment of essential oil from <i>Mentha piperita</i> .....	74
2.3 Production and isolation of biosurfactants.....	74
2.4 Formulation of mouthwash.....	75
2.5 Determination of antimicrobial activity.....	76
2.5.1 Test substances and standardisation of microorganisms .....	76
2.5.2 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) .....	76
2.5.3 Analysis of fraction inhibitory concentration.....	77



2.6 Evaluation of toxicity of formulated mouthwashes .....	77
2.7 Statistical analyses .....	78
3. Results and Discussion.....	78
3.1 Production, extraction and characterisation of chitosan .....	78
3.2 Production of biosurfactants and determination of surface tension.....	80
3.3 Antimicrobial activity and analysis of fraction inhibitory concentration .....	80
3.4 Toxicity of mouthwash formulations .....	85
4. Conclusions .....	86
Acknowledgments.....	86
References .....	86
Figure Captions .....	98

### **CAPÍTULO III**

Citotoxicidade, ação antibacteriana e antibiofilme de creme dental biosustentável contendo biossurfactante e quitosana contra <i>Streptococcus mutans</i> .....	102
Resumo .....	103
1. Introdução.....	104
2. Materiais e métodos.....	106
2.1 Materiais .....	106
2.2 Produção, isolamento e determinação da tensão superficial dos biossurfactantes .....	106
2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	108
2.4 Fraction inhibitory concentration (FIC) .....	109

2.5 Formulação do creme dental .....	110
2.6 Determinação do pH, da consistência e da capacidade espumante das formulações.	110
2.7 Preparo da saliva artificial modificada (SAM) .....	111
2.8 Análise da inibição da formação de biofilme por <i>S.mutans</i> .....	111
2.9 Teste do MTT (Ensaio do 3-[4,5-dimetil-2-tiazol]-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium) .....	112
2.10 Análises estatísticas .....	113
3. Resultados e discussão .....	113
3.1 Concentração Inibitória Mínima e Análise da Fração de Concentração Inibitória.....	113
3.2 Formulação do creme dental e determinação do pH, da consistência e da capacidade espumante das formulações .....	116
3.3 Inibição da formação de biofilme por <i>S. mutans</i> pelas pastas de dente .....	119
3.4 Citotoxicidade das formulações das pastas de dente.....	120
4. Conclusões.....	121
Referências .....	121
Legendas das Figuras .....	133
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>Conclusões Gerais</b> .....	138
<b>Anexos</b> .....	139

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1 – Formação da placa bactéria pela produção de polissacarídeo extracelular. A- Esquema dos constituintes do processo de adesão. 1- Película adquirida, 2- Esmalte dentário, 3-Cocos, 4- Proteínas da parede celular bacteriana, 5- Glucosiltransferase, 6- Mutana, 7- Dextrana. B- Microscopia eletrônica de varredura x 7.000. Adesão in vitro de *S. mutans* (cultivo em meio base para dextrana). co- Cocos, MO- matriz orgânica.....24
- Figura 2 – Estrutura química da quitina e da quitosana.....33
- Figura 3 – Estrutura da micela .....36
- Figura 4 – Ilustração das regiões em que ocorre a formação de micelas (Concentração micelar crítica – CMC).....37

### CAPÍTULO II

- Figure 1 – Absorption spectrum in infrared region of chitosan extracted from cell wall of *Mucor javanicus* (UCP 69) grown in yam been broth at 28 °C for 48.....99
- Figure 2 – <sup>1</sup>H NMR spectrum of chitosan extracted from cell wall of *Mucor javanicus* (UCP 69) grown in yam been broth at 28 °C for 48..... 100

### CAPÍTULO III

- Figura 1 – Aparência da consistência, antes (1) e após (2) espalhamento dos cremes dentais: comercial contendo cloreto de cetilpiridínio e fluoreto de sódio (A), pastas de dente contendo biossurfactante extraído de *B. cereus* + fluoreto de sódio (B) ou + quitosana (C), biossurfactante extraído de *C. bombicola* + fluoreto de sódio (D) ou + quitosana (E) e biossurfactante extraído de *P. aeruginosa* + fluoreto de sódio (F) ou + quitosana (G) ..... 134

Figura 2 – Formação de espuma das formulações dos cremes dentais: comercial contendo cloreto de cetilpiridínio e fluoreto de sódio (A), pastas de dente contendo biossurfactante de *B. cereus* + quitosana (B) ou + fluoreto de sódio (C), biossurfactante de *C. bombicola* + quitosana (D) ou + fluoreto de sódio (E) e biossurfactante de *P. aeruginosa* + quitosana (F) ou + fluoreto de sódio(G) ..... 135

Figura 3 – Contagem de *S. mutans* viáveis no biofilme pré-formado durante 24h a 37<sup>a</sup>C em saliva artificial modificada após o tratamento por 30 segundos com pasta comercial contendo cloreto de cetilpiridínio e fluoreto de sódio, pastas de dente contendo biossurfactante de *C. bombicola* + fluoreto de sódio (BSCBF) ou + quitosana (BSCBC), biossurfactante de *B. cereus* + fluoreto de sódio (BSBCF) ou + quitosana (BSBCC) e biossurfactante de *P. aeruginosa* + fluoreto de sódio (BSPAF) ou +quitosana (BSPAC) e controle (solução salina 0,9%) ..... 136

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 – Função e quantidade dos componentes do creme dental .....26

Tabela 2 – Relação resumida dos biossurfactantes em aplicações relacionadas à boca.....46

### CAPÍTULO II

Tabela 1 – Componentsof eco-sustainable mouthwash and respective functions and quantities .....92

Tabela 2 – Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of chitosan (Ch), peppermint essential oil (POE) and biosurfactants extracted from *Candida bombicola* URM 3718 (CB), *Bacillus cereus* UCP1615 (BB) and *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (PB) isolated or in combination ( $\mu\text{g/mL}$ ) for inhibition of cariogenic microorganisms .....93

Tabela 3 – Determination of fraction inhibitory concentration of chitosan (Ch), peppermint essential oil (POE) and biosurfactants extracted from *Candida bombicola* URM 3718 (CB), *Bacillus cereus* UCP1615 (BB) and *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (PB) in combinations ( $\mu\text{g/mL}$ ) and effects of combinations on *Candida albicans* ATCC 1106, *Staphylococcus aureus* ATCC 15656, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and *S. mutans* ATCC 25175 .....94

Tabela 4 – Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of mouthwashes formulated with biosurfactant extracted from *Candida bombicola* + peppermint essential oil (CBPOE), biosurfactant extracted from *Bacillus cereus* + peppermint essential oil (BBPOE), biosurfactant extracted from *Pseudomonas aeruginosa* + peppermint essential oil (PBPOE), biosurfactant extracted from *Candida bombicola* + peppermint essential oil + chitosan (CBPOECh), biosurfactant extracted from *Bacillus cereus* + peppermint essential oil + chitosan (BBPOECh), biosurfactant extracted from *Pseudomonas aeruginosa* + peppermint

essential oil + chitosan (PBPOECh) for *Candida albicans* ATCC 1106, *Staphylococcus aureus* ATCC 15656, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and *S. mutans* ATCC 25175.....95

Tabela 5 – Percentage of inhibition of mouse fibroblast (L929) and mouse macrophage (RAW 264.7) cell lines exposed to mouthwashes formulated with biosurfactant extracted from *Candida bombicola* + peppermint essential oil (CBPOE), biosurfactant extracted from *Bacillus cereus* + peppermint essential oil (BBPOE), biosurfactant extracted from *Pseudomonas aeruginosa* + peppermint essential oil (PBPOE), biosurfactant extracted from *Candida bombicola* + peppermint essential oil + chitosan (CBPOECh), biosurfactant extracted from *Bacillus cereus* + peppermint essential oil + chitosan (BBPOECh), biosurfactant extracted from *Pseudomonas aeruginosa* + peppermint essential oil + chitosan (PBPOECh) and commercial mouthwash ..... 97

### **CAPÍTULO III**

Tabela 1 – Composição do creme dental formulado com biossurfactante e quitosana (CDBC) e creme dental com biossurfactante e fluoreto de sódio (CDBF) ..... 127

Tabela 2 – Determinação da Concentração inibitório mínima e da Fração de Concentração Inibitória para a quitosana (C), fluoreto de sódio (NaF) e os biossurfactantes produzidos por *Candida bombicola* URM 3718 (BC), *Bacillus cereus* UCP1615 (BB) e de *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (BP) em combinações (µg/mL) e os efeitos encontrados para as combinações frente *Streptococcus mutans* UA 159..... 128

Tabela 3 – Propriedades dos biossurfactantes produzidos por *Candida bombicola* URM 3718 (BC), *Bacillus cereus* UCP1615 (BB) e de *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (BP) e utilizados na formulação dos cremes dentais..... 129

Tabela 4 – pH e Capacidade de espalhamento (mm) dos cremes dentais. Valores expressos como médias ± desvio padrão ..... 130

Tabela 5 – Medição da espuma das formulações dos cremes dentais. Valores expressos como média ± desvio padrão ..... 131

Tabela 6 – Percentagem de inibição das linhagens celulares de fibroblastos de camundongos (L929) e de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) expostos às pastas de dente formuladas contendo como princípios ativos: biossurfactante de *C. bombicola* + Fluoreto de sódio (PDBCBNaF), biossurfactante de *B. cereus* + Fluoreto de sódio (PDBBCNaF), biossurfactante de *P. aeruginosa* + Fluoreto de sódio (PDBPANAf), biossurfactante de *C. bombicola* + quitosana (PDCBC), biossurfactante de *B. cereus* + quitosana (PDBCC), biossurfactante de *P. aeruginosa* + quitosana (PDPAC) e a pasta de dente comercial (PDC) .....132

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Celsius
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
ppm	parte por milhão
Rpm	Rotação por minuto
Kg	Quilograma
v/v	Volume por volume
mL	Mililitro
β	Beta
μg/mL	Micrograma por mililitro
mg/mL	miligrama por mililitro
%	Por cento
cm	Centímetros
g	Gramma
seg	Segundos
min	Minutos
mN/m	Mili Newton por metro
YMA	Yeast mold Ágar
YMB	Yeast mold Broth
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
g/ml	grama por mililitro
μL	Microlitro
mg mL/L	Miligrama mililitro por litro



## RESUMO

O uso de surfactantes químicos nos cremes dentais e enxaguatórios bucais, assim como o flúor e clorexidina, trazem um alerta devido à toxicidade desses compostos. Em busca de produtos alternativos, que sejam pouco tóxicos, a quitosana, potente agente antimicrobiano, e os biossurfactantes, que apresentam propriedades umectantes, espumantes e antimicrobianas, vêm despertando o interesse das indústrias na fabricação de produtos que atendam ao mercado atual e sejam biocompatíveis. No presente estudo, três biossurfactantes, dois deles produzidos pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (BP) e *Bacillus cereus* UCP 1615 (BB) e um pela levedura *Candida bombicola* URM 3718 (BC), bem como a quitosana de fungos mucorales, foram utilizados na formulação de cremes dentais e enxaguatórios bucais em substituição aos similares químicos. Para as formulações, a quitosana foi caracterizada e os biossurfactantes foram produzidos e isolados. O óleo essencial de *Mentha peperita* (OEM) e o fluoreto de sódio comerciais foram utilizados como princípios ativos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para as substâncias testes isoladas e nas formulações, assim como testes de toxicidade por MTT para as linhagens celulares L929 (fibroblasto de camundongos) e RAW 264.7 (macrófagos de camundongos). A quitosana teve rendimento em biomassa de 60,6 mg/g, apresentando bandas características ao polímero e grau de desacetilação de 80%. Os biossurfactantes BP, BB e BC reduziram a tensão superficial da água de 70 mN/m para 30, 29 e 26,5 mN/m, respectivamente. Todas as substâncias estudadas apresentaram atividade antimicrobiana para os micro-organismos cariogênicos testados nas formulações dos enxaguatórios. As combinações entre os BC e BP com a quitosana demonstraram efeito aditivo para a maioria dos micro-organismos. Já a associação entre os BC e BB com o OEM apresentou efeito aditivo apenas para *E. coli*. A toxicidade foi inferior ao enxaguatório comercial. As formulações de creme dental contendo os biossurfactantes, a quitosana ou o fluoreto de sódio como princípios ativos apresentaram CIM para *Streptococcus mutans*. As combinações entre os BC e BP com a quitosana demonstraram efeito aditivo para *S. mutans*, sendo indiferente para BB com quitosana. Todos os cremes dentais formulados apresentaram-se atóxicos. Todas as formulações inibiram a viabilidade celular de *S. mutans* no biofilme formado, sendo similar ao creme comercial testado. Os resultados obtidos validam que os enxaguatórios bucais e os cremes dentais com biossurfactantes em associação a quitosana são uma alternativa segura, eficaz e natural para o controle de micro-organismos orais em relação aos produtos comerciais disponíveis.

**Palavras-chave:** Biossurfactante, quitosana, creme dental, enxaguatório bucal, cosmético, atividade antimicrobiana, MTT.

## ABSTRACT

The use of chemical surfactants in dental creams and mouthwashes, as well as fluoride and chlorhexidine, brings an alert due to the toxicity of these compounds. Chitosan, a potent antimicrobial agent, and biosurfactants, which have moist, foamy and antimicrobial properties, have been interested in the manufacture of products that meet the current market and are biocompatible. In the present study, three biosurfactants, two of them produced by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (BP) and *Bacillus cereus* UCP 1615 (BB) and one by the yeast *Candida bombicola* URM 3718 (BC), as well as the mucosal fungi chitosan were used in formulation of dental creams and mouthwashes instead of similar chemicals. For the formulations, the chitosan was characterized and the biosurfactants were produced and isolated. *Mentha peperita* essential oil (OEM) and commercial sodium fluoride were used as active ingredients. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for the isolated test substances and for the formulation of mouthwashes and toothpastes, as well as MTT toxicity tests for L929 (mouse fibroblast) and RAW 264.7 (mouse macrophages) cell lines. The chitosan had a biomass yield of 60.6 mg/g, presenting characteristic bands to the polymer and degree of deacetylation of 80%. The biosurfactants BP, BB and BC reduced the water surface tension from 70 mN/m to 30, 29 and 26.5 mN/m, respectively. All the substances studied presented antimicrobial activity for the cariogenic microorganisms tested in the mouthwash formulations. The combinations between BC and BP with chitosan showed an additive effect for most of the microorganisms, being indifferent to *E. coli* and *C. albicans*. However, the association between BC and BB with the OEM had an additive effect only for *E. coli* and indifferent to the others. Toxicity was lower than commercial rinses. Toothpaste formulations containing biosurfactants, chitosan or sodium fluoride as active ingredients showed MIC for *Streptococcus mutans*. The combinations between BC and BP with chitosan showed an additive effect for *S. mutans*, being indifferent to BB with chitosan. All formulated toothpastes were non-toxic All formulations inhibited *S. mutans* cell viability in the formed biofilm, being similar to the commercial cream tested. The results validate that mouthwashes and dental creams with biosurfactants in association with chitosan are a safe, effective and natural alternative for the control of oral microorganisms in relation to commercial products available.

**Key words:** Biosurfactant, chitosan, toothpaste, mouthwash, cosmetic, antimicrobial activity, MTT.

# **CAPÍTULO I**

## 1.1 INTRODUÇÃO

A doença oral é um dos problemas de saúde pública mais comum em todo o mundo com impactos socioeconômicos significativos. As diretrizes atuais de saúde priorizam ações no nível primário de atenção e à prevenção de doenças, na tentativa de melhorar a qualidade de vida do indivíduo e evitar a necessidade de procedimentos invasivos de tratamento. A saúde bucal é muito importante para o bem-estar da população (BRUSCHI et al., 2006; MURRAY et al., 2012; JIN et al., 2016).

Dentre os produtos mais utilizados na higiene bucal, encontram-se os cremes dentais e enxaguatórios bucais. Os cremes dentais, pasta dental ou dentrífcio são projetados para o uso diário e formulados para proporcionar uma maior capacidade física e química de limpeza dos dentes, usando uma variedade de ingredientes, a fim de remover e prevenir manchas extrínsecas, bem como combater os principais problemas odontológicos, como cáries, gengivites, tártaro e manchas nos dentes. As opções de sabores do produto variam desde às mais comuns, como menta, até sabores exóticos, como chiclete, laranja ou limão (SILVA et al., 2001; TAO et al. 2017).

Um dentrífcio contém vários ingredientes, como aglutinante (que mantém os ingredientes juntos) como alginato de sódio, bicarbonato de sódio, um composto à base de espuma que ajuda a remover os restos de alimentos dos dentes, como o Lauril Sulfato de Sódio (SDS), um agente "umectante", que garante que a pasta de dentes seja úmida, um aromatizante como menta ou adoçante, fluoreto, água e um agente antibacteriano ou agente terapêutico. Algumas fórmulas contêm corantes em sua composição (BONDI et al., 2015).

Estudos indicam que o controle regular da placa por um dentista pode oferecer manutenção de um periodonto saudável. Além disso, os enxaguatórios bucais podem prevenir o crescimento de placas e melhorar a saúde bucal, inibindo a taxa de proliferação de bactérias ou impedindo a fixação delas às superfícies dentárias (ALSHEHRI, 2017). Alguns produtos podem conter doses extras de flúor e/ou agentes branqueadores dos dentes em sua composição. O uso prolongado dos antissépticos bucais que possuem álcool em sua fórmula pode agredir a mucosa, causando uma descamação, afetando as papilas linguais, interferindo na função gustativa e na coloração do elemento dental (BONDI et al., 2015).

A temperatura bucal constante (36°C), a umidade permanente pela presença da saliva e o fluxo de nutrientes originados dos alimentos torna a boca um ambiente ideal para a proliferação de micro-organismos, em especial de bactérias. A principal bactéria causadora da cárie é a *Streptococcus mutans*. As bactérias vão se unindo lentamente e se depositam na

superfície do dente formando um biofilme (TEXEIRA et al., 2010). Os biofilmes são consórcios de micro-organismos ligados a tecidos ou superfícies abióticas que são envolvidos por uma matriz extracelular (COSTA et al., 2017). Para eliminar o biofilme, são utilizados procedimentos de natureza mecânica, como a escovação dos dentes e o uso do fio dental, e procedimentos de natureza química, como a utilização de substâncias que tem função detergente, fungicida e bactericida, como os enxaguatórios bucais. Pesquisas recentes sobre a eficácia de produtos que interferem nas propriedades adesivas e na colonização da cavidade bucal por bactérias cariogênicas vêm sendo realizadas para prevenir a desmineralização do esmalte dentário e a formação do biofilme dental (SANO et al., 2003; TAO et al., 2017).

Nesse contexto, pesquisas têm avançado no sentido de desenvolver componentes alternativos, biocompatíveis e pouco tóxicos, em substituição aos produtos existentes nas formulações orais (BONDI et al., 2015; SANTOS et al., 2016). São exemplos desses compostos os biossurfactantes e a quitosana.

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas produzidas principalmente por micro-organismos como bactérias e leveduras que exibem vantagens sobre os surfactantes químicos, pois, não são tóxicos, são altamente biodegradáveis, apresentam melhor compatibilidade ambiental, alta capacidade de formação de espuma e atividade específica a temperaturas extremas, pH e salinidade (ALMEIDA et al., 2017). Características como detergência, emulsificação, dispersão, ação umectante e solubilização atribuem grande versatilidade a essas biomoléculas, tornando-as candidatas em potencial na substituição dos surfactantes sintéticos em várias áreas (CAMPOS et al., 2013).

Atualmente, os biossurfactantes, têm sido usados para aplicações ambientais, nas indústrias de alimentos, de petróleo, farmacêutica e em outros setores industriais em função das inúmeras propriedades desses agentes microbianos (SANTOS et al., 2016).

Pesquisas recentes relata a eficácia de produtos contendo quitosana, já que a mesma interfere nas propriedades adesivas e na colonização da cavidade bucal por bactérias cariogênicas, e por isso são bastante utilizadas para prevenir a desmineralização do esmalte dentário e a formação do biofilme dental (SANO et al., 2003). A quitosana é um copolímero que consiste em unidades de  $\beta$ - (1-> 4) -2-acetamido-D-glicose e  $\beta$ - (1-> 4) -2-amino-D-glicose obtidas da desacetilação de quitina (COSTA et al., 2017). São misturas de polissacarídeos com um grau variável de polimerização, grau de acetilação e padrão de acetilação (SMETS; RUDELSHEIM, 2018) e devem ser caracterizadas quanto a isso, uma vez que suas características podem influenciar nas suas propriedades físico-químicas (CARVALHO et al, 2011).

A quitosana é um biopolímero catiônico com propriedades biológicas únicas, como a regeneração de feridas, atividade antimicrobiana e biodegradabilidade. Possui estrutura única, incluindo grupos amino reativos, que lhe conferem alta reatividade e a torna um material perfeito para aplicações industriais (COSTA et al., 2017). É um polissacarídeo natural e devido às suas propriedades favoráveis, como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e biocompatibilidade, habilidade de quelação e capacidade adsortiva, as aplicações tecnológicas da quitosana abrangem as áreas alimentícia, cosmética, biomédica, têxtil e agrícola. (STAMFORD et al, 2007; PERINELLI et al., 2018). Apesar de apresentar algumas vezes as desvantagens de alta viscosidade e baixa solubilidade em água, as propriedades da quitosana levaram ao desenvolvimento de um grande conhecimento sobre seu uso como biomaterial, particularmente nos campos biomédico e biotecnológico (COSTA et al., 2017).

A quitosana tem reconhecida atividade antimicrobiana, sendo uma das principais propriedades do polímero. Vários pesquisadores relatam que ela tem ação antimicrobiana em uma grande variedade de micro-organismos, incluindo algas, fungos e bactérias (CARVALHO et al, 2011; AHSAN, et al., 2018). Este glicosaminoglicano diluído em ácido acético tem sido sugerido como material preventivo e terapêutico para a cárie dentária. Na prevenção de cárie, *in vivo*, com solução de bochecho contendo quitosana confirmou a eficácia deste produto para higiene oral, reduzindo a formação de placa bacteriana (SANO et al., 2003; YOUNES; RINAUDO, 2015). Com relação aos derivados hidrossolúveis da quitosana, alguns autores relatam a produção de sais de amônio quartenário de quitosana solúveis em água dotados de atividade antibacteriana (COSTA-SILVA et al., 2006; AHSAN, et al., 2018).

A utilização da quitosana em diferentes formulações, tais como pasta de dente (Chitodent®), enxaguatório e goma de mascar, é relatada na literatura. Em todas as formas, a quitosana apresenta ação antimicrobiana para bactérias do grupo *Streptococcus*, inibe a formação de placa bacteriana e estimula a salivagem, *in vivo*. Esses efeitos sugerem a aplicação da quitosana como agente terapêutico e preventivo para doença cárie (SANO et al., 2003; VERKAIK et al., 2011).

Assim, no presente estudo foram desenvolvidos dois produtos para higiene oral biocompatíveis e menos tóxicos, formulados com biossurfactantes como detergentes, espumantes e umectantes e quitosana como agente anticariogênico, com vistas ao fornecimento de produtos comerciais seguros para as industriais.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver produtos de higiene oral contendo biossurfactante e quitosana com vistas ao fornecimento de produtos comerciais biocompatíveis, eficazes e seguros.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Produzir e isolar biossurfactantes em meio de baixo custo previamente estabelecidos.
- Produzir e caracterizar a quitosana fúngica em meio de baixo custo previamente estabelecidos.
- Desenvolver diferentes formulações de um creme dental e de um enxaguatório bucal contendo os biossurfactantes previamente isolados e a quitosana fúngica como princípios ativos.
- Determinar a atividade antimicrobiana das formulações dos enxaguatórios e dos cremes dentais formulados.
- Avaliar a citotoxicidade das formulações dos enxaguatórios e dos cremes dentais formulados.
- Caracterizar os cremes dentais formulados quanto à consistência, capacidade espumante e potencial de redução do biofilme dental.

## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.3.1 CÁRIE DENTÁRIA E PLACA BACTERIANA

A cárie é uma enfermidade bacteriana, produzida principalmente por estreptococos, sendo uma doença complexa e multifatorial, geralmente de natureza crônica e progressiva (STAMFORD et al., 2000; CHÁVEZ et al., 2018). A expressão da doença nos dentes (lesões de cárie) é determinada pelo equilíbrio ou desequilíbrio entre fatores biológicos protetores (como fluxo salivar, capacidade tamponante, biofilme saudável, flúor, genética e imunidade do hospedeiro) e fatores patogênicos que aumentam os riscos aos dentes (como a exposição frequente a carboidratos na dieta, má higiene bucal, biofilme cariogênico e disfunção salivar, resultando em baixo pH salivar e / ou capacidade tamponante) (CHÁVEZ et al., 2018).

A placa dentária ou placa bacteriana é definida, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como uma entidade bacteriana proliferante com atividade enzimática que se adere firmemente à superfície dentária e que por sua atividade bioquímica e metabólica, tem sido proposta como o principal agente etiológico da cárie dental (WHO, 1997; STAMFORD et al., 2007; SIMÓN-SORO; MIRA, 2015). A placa dental é o principal fator de iniciação e progressão das doenças bucais (SBORDONE; BORTOLAIA, 2003; ALSHEHRI, 2017). Portanto, a remoção da placa é obrigatória para evitar o acúmulo de placa nos dentes e na superfície gengival adjacente (ALSHEHRI, 2017).

Segundo Stamford et al. (2005) *S. mutans* constitui a maior parte da flora total de *Streptococcus* da placa, sendo, no entanto, a principal bactéria cariogênica, devido às suas características acidogênicas e acidúricas e sua capacidade de se aderir à superfície lisa do dente. Uzeda (2003) relata que *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. mitis* são capazes de sintetizar polímeros de  $\alpha$ - glucana intracelular e extracelular, solúvel e insolúvel, pela degradação da sacarose pela ação das enzimas transferases. A glucana estabelece a ligação do microrganismo de forma irreversível ao dente, favorecendo a formação da placa bacteriana. A permanência da placa bacteriana na superfície do esmalte dentário acarreta perda de minerais do dente, pela ação dos ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano, ocasionando a instalação da doença cárie (CURY et al., 2000; DAWES, 2003; SIMÓN-SORO; MIRA, 2015).

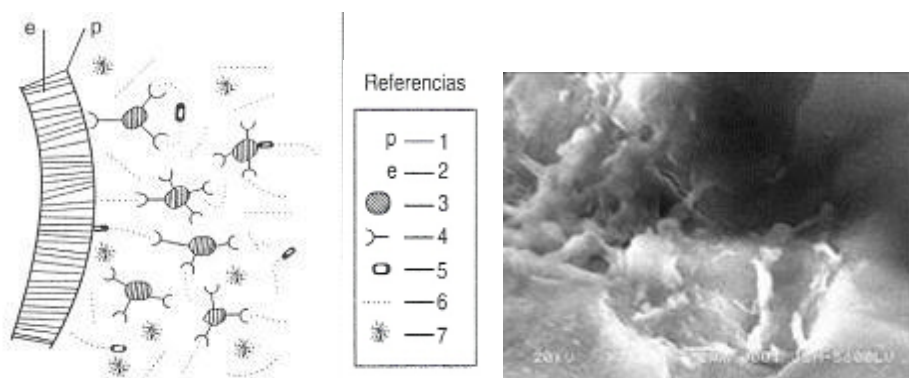
A superfície limpa do esmalte dentário tem predomínio de mais grupo fosfato disponível do que íons cálcio. A adesão de moléculas nesta superfície engloba a interação dos grupos fosfatos com os íons cálcio da saliva para formar pontes de carga negativa (carboxil-fosfato-



sulfato e ácido siálico). Os grupos com carga positiva dos componentes salivares, principalmente glicoproteínas ácidas, interagem de maneira direta com o fosfato na superfície do dente, formando a película adquirida. A presença elevada de grupamentos sulfato e carboxila na película adquirida aumenta a carga negativa da superfície do dente. Como as bactérias possuem cargas negativas ao se aproximam do dente, ocorre uma repulsão elétrica, entre a bactéria e a superfície dentária (MALTZ, 1996; THILSTRUP; FEJERSKOV, 2001; AL-HASANI et al., 2016).

A formação da placa bacteriana dental envolve uma combinação de forças físico-iônicas, hidrofóbicas, de Van der Waals e a fixação de hidrogênio entre a superfície dentária e os componentes orgânicos e inorgânicos da saliva. As forças de repulsão entre a bactéria e a película adquirida são anuladas pela ação do cálcio da saliva, que forma uma ponte de ligação entre o dente e a película. Desta forma se formam agregados de glucoproteínas-cálcio-bactéria. A adesão de bactérias ao dente ocorre também pela ação de vários componentes salivares que servem como receptores para proteínas de união da bactéria, principalmente *S. mutans*, como podemos visualizar na Figura 1. A produção de glucanas pelas bactérias reforça esta união (RODRIGUES et al, 2003; SIMÓN-SORO; MIRA, 2015).

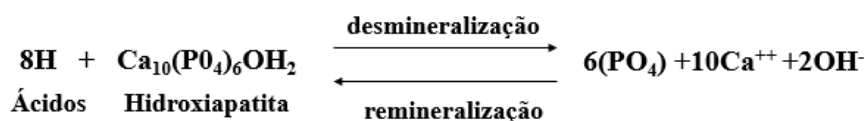
**Figura 1.** Formação da placa bactéria pela produção de polissacarídeo extracelular. A- Esquema dos constituintes do processo de adesão. 1- Película adquirida, 2- Esmalte dentário, 3-Cocos, 4- Proteínas da parede celular bacteriana, 5- Glucosiltransferase, 6- Mutana, 7- Dextrana. B- Microscopia eletrônica de varredura x 7.000. Adesão in vitro de *S. mutans* (cultivo em meio base para dextrana). co- Cocos, MO- matriz orgânica.



**Fonte:** MARCANTONI (1999)

### 1.3.2 PROCESSO DE DESMINERALIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO

O esmalte dentário, segundo Dawes (2003), é composto principalmente de sais de fosfato de cálcio dispostos em uma estrutura cristalina denominada hidroxiapatita. Em pH abaixo de 5,5 os cristais de hidroxiapatita se dissolvem liberando íons cálcio e fosfato para saliva, de acordo com o seguinte esquema:



O processo de desmineralização e remineralização do dente é dinâmico e envolve fenômenos físico-químicos. A reação de desmineralização ocorre em pH abaixo de 5,5 (pH crítico do esmalte dentário), quando íons hidrogênio deslocam os íons de cálcio e fosfato da porção mineral, liberando-os no meio bucal (FRAUNHOFER; ROGERS, 2004; ROSTAMI et al., 2017).

Em condições fisiológicas, tem se demonstrado que a saliva e a placa bacteriana encontram-se saturadas de íons cálcio e fosfato, o que favorece o estado cristalino da hidroxiapatita do esmalte dentário (SISSONS et al., 1998). Entretanto, a produção de ácidos decorrentes do metabolismo bacteriano atua reduzindo o pH da placa bacteriana, em uma velocidade maior do que a capacidade local de neutralização pela saliva (BURNE, 1998). Os ácidos ligam-se às hidroxilas da hidroxiapatita, favorecendo a formação de fosfato de cálcio e subsequente dissolução do esmalte dentário (ZAURA; CATEM, 2004; AL-HASANI et al., 2016).

Os principais ácidos produzidos pelas bactérias cariogênicas, durante a fermentação dos carboidratos da dieta, são os ácidos acético, láctico e fosfórico. Contudo, a desmineralização do esmalte dentário pode ocorrer também pela ingestão de alimentos ácidos. A maioria dos refrigerantes contém algum tipo de acidulante, como ácido cítrico, ácido fosfórico ou outros ácidos orgânicos. Esses ácidos polibásicos promovem a remoção de cálcio do dente por quelação, como também, mantém o pH ácido, pois apresentam capacidade tampão. O processo de desmineralização pode ser revertido com o aumento da concentração de íons cálcio ou pela normalização do pH (SOET et al., 2000; ROSTAMI et al., 2017).

A eficácia de produtos que interferem nas propriedades adesivas e na colonização da cavidade bucal por bactérias cariogênicas vem sendo realizadas com o objetivo de prevenir a desmineralização do esmalte dentário e a formação do biofilme dental (SANO et al., 2003; JHAJHARIA, et al., 2015).

### **1.3.3. CREMES DENTAIS E ENXAGUATÓRIOS BUCAIS COMO FORMULAÇÕES PARA A HIGIENE ORAL**

Os cremes dentais e os enxaguatórios bucais são os produtos mais utilizados na higiene bucal (MARTINS et al., 2012). Na galeria de pastas de dentes e dos enxaguatórios bucais são encontradas variedades enormes, destas, com diferentes cores, sabores e particularidades (TREVISAN, 2012). A composição pode variar de uma marca para outra, mas, mesmo que pareçam diferentes, todas têm os mesmos ingredientes essenciais para garantir uma boca saudável e um hálito fresco, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Função e quantidade dos componentes do creme dental

<b>Componente</b>	<b>Função</b>	<b>Quantidade (%)</b>
<b>Abrasivo</b>	Lixar e limpar os dentes	20 – 55
<b>Corante</b>	Fornecer cor ao dentífrico	1 – 2
<b>Espumante</b>	Formar espuma	1 – 2
<b>Umectante</b>	Umidade e consistência ao creme dental	20 – 35
<b>Aglutinante</b>	Une os componentes do creme dental	1 – 3
<b>Edulcorante</b>	Sabor ao dentífrico	1 – 2
<b>Solvente</b>	Dissolver os componentes do creme dental	15 – 25
<b>Agente terapêutico</b>	Terapêutica	0 – 1

Adaptado de: Trevisan (2012)

As funções dos componentes da pasta dental e do enxaguatório bucal podem ser resumidas como descrito a seguir (SILVA et al., 2001; CURY, 2002; LIMA et al., 2008; JIN et al., 2016; ALSHEHRI, 2017; SABHARWAL; SCANNAPIECO, 2017; CHÁVEZ et al., 2018):

- **Abrasivos:** são os compostos mais importantes presentes nas pastas de dentes e nos enxaguatórios. São compostos em pó, insolúveis em água e responsáveis pela limpeza adequada, aumentando o atrito com os dentes, raspando o filme do dente sem danificá-lo. Esta ação promove uma espécie de esfoliação da camada mais externa dos dentes, retirando toda a placa bacteriana. Os abrasivos mais utilizados são carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), sílica hidratada, pirofosfato de cálcio ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ), óxido de magnésio ( $\text{MgO}$ ), fosfato ácido de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), e óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), perlita e silicatos. Os produtos podem conter um ou mais abrasivos. O efeito colateral relacionado aos abrasivos é o desgaste da estrutura dentária, podendo ser potencializado com o modo de escovação inadequado e o tipo de escova.
- **Corantes:** conferem cor ao creme dental. A clorofila é um dos mais utilizados.
- **Flavorizantes:** são óleos com sabor que promovem um efeito refrescante. Eles proporcionam um sabor diferente aos dentífricos, sendo os responsáveis pelo hálito refrescante que perdura após a escovação. O efeito adverso relacionado é a gengivoestomatite, que se apresenta com sintomas de queimação na mucosa oral. Isso tem sido atribuído à grande quantidade de óleos aromáticos nas formulações dos dentífricos. Os flavorizantes que estão presentes com maior frequência nas formulações são hortelã, menta, canela e eucalipto.
- **Detergentes/Espumantes:** são surfactantes que agem reduzindo a tensão superficial da pasta, permitindo sua entrada nas fissuras dos dentes, removendo os detritos presentes. O detergente mais utilizado é o lauril sulfato de sódio (LSS), que tem natureza aniônica. Outro detergente encontrado nas formulações dos dentífricos é o Cocoamidopropil Betaine, menos irritante que o LSS para a mucosa bucal.
- **Umectantes:** têm a função de impedir que o dentífrico resseque rapidamente, por reter a sua umidade, melhorando o aspecto e a consistência do produto. Exemplos de umectantes utilizados nas formulações são a glicerina, o sorbitol e o polietilenoglicol.
- **Aglutinantes:** impedem a separação dos componentes líquidos e sólidos, proporcionando estabilidade do produto ao longo do tempo, além de uma viscosidade adequada. A carboximetilcelulose, a metilcelulose, a goma de xantana e a carragenina são exemplos de aglutinantes presentes nos dentífricos.
- **Edulcorantes:** O edulcorante elimina o sabor insípido provocado pelos abrasivos, corrige o sabor amargo e irritante proporcionado pelos detergentes e disfarça o sabor dos princípios

ativos. A sacarose e outros carboidratos não podem ser usados como edulcorantes nos dentífricos, porque eles são metabolizados por bactérias, originando ácidos que podem desmineralizar os dentes. O edulcorante mais utilizado é a sacarina sódica. O sorbitol, além de ser umectante, tem a função de agente edulcorante nos dentífricos.

- **Conservantes:** a elevada quantidade de água nas formulações dos dentífricos líquidos acarreta frequentemente em invasão por microrganismos, sendo necessário o uso de conservantes, como benzoatos, formaldeídos e parabenzos, para evitar a contaminação por bactérias e fungos.
- **Agentes terapêuticos:** são compostos com função antibacteriana. Dentre eles estão o flúor, o triclosan, a clorexidina e o cloreto de cetil piridíneo. O flúor presente nos dentífricos é considerado a principal razão do declínio da cárie observado em muitos países. Ele tem a capacidade de interferir no início e na progressão da doença cárie, além de manter o equilíbrio mineral dos dentes e alterar o metabolismo de alguns micro-organismos por inibição das enzimas glicolíticas. As principais formas de flúor usadas nos dentífricos são o fluoreto de sódio (NaF), o monofluorofosfato de sódio (MFP) e o fluoreto estanhoso (SnF<sub>2</sub>). Segundo o Ministério da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2000), o teor de 1500ppm (0,15%) de flúor é a concentração máxima permitida em qualquer formulação de dentífrico. Após um ano da data de fabricação, esse teor não deve ser menor que 600 ppm de flúor solúvel. O triclosan, presente nos dentífricos, apresenta concentrações de 0,2 a 0,5%, é um antimicrobiano não iônico, de baixa toxicidade, com largo espectro de ação antimicrobiana, que não provoca desequilíbrio da microbiota bucal. O seu principal sítio de ação é a membrana citoplasmática bacteriana. Por apresentar rápida liberação, sua substantividade é baixa, porém quando associado a outros produtos, como o copolímero polivinilmetil metacrilato e ácido maléico (PVM/MA – Gantrez), o tempo de retenção na cavidade bucal aumenta. A clorexidina é um dicatiônico, que apresenta um grande espectro de ação, agindo sobre bactérias grampositivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos. Age causando danos à membrana citoplasmática, levando à lise celular dos micro-organismos, sendo considerada bactericida ou bacteriostática. O cloreto de cetilpiridíneo (CPC) possui ação bacteriostática e bactericida contra microrganismos gram-positivos e alguns gram-negativos. A ação antiplaca dessa substância está relacionada com a ligação entre cargas elétricas, a carga positiva da substância e a negativa das células bacterianas, que alteram a barreira osmótica da membrana celular, aumentando a permeabilidade celular.

- **Dessensibilizantes:** quando expostas, as terminações nervosas dos odontoblastos, localizadas nos túbulos dentinários, passam a ser mais sensíveis a pequenos traumas e às variações de temperatura, ocasionando uma maior reação de hipersensibilidade. São exemplos de agentes dessensibilizantes o nitrato de potássio, o cloreto de estrôncio, a arginina, o citrato de potássio, o cloreto de sódio e o hidróxido de cálcio.
- **Anticálcicos:** os dentifrícios anticálcico interferem apenas no mecanismo de formação do cálculo dentário. Resultados significativos de redução de cálculo têm sido observados com dentifrícios contendo pirofosfatos, gantrez ou zinco. Estudos clínicos demonstram que a utilização de dentifrícios a base de pirofosfato resultam na estabilização das fases precursoras de calcificação da placa bacteriana, pois o pirofosfato se une aos cristais de cálcio, inibindo a formação do cálculo dentário. O citrato de zinco tem ação antimicrobiana, reduz a colonização e, conseqüentemente, a formação da placa bacteriana e do cálculo. O hexametáfostato de sódio ajuda a prevenir a mineralização do biofilme bacteriano.
- **Solventes:** solventes presentes na composição dos dentifrícios ou dos enxaguatórios são a água e o álcool. Eles são responsáveis pela dispersão ou solubilização dos componentes da fórmula, proporcionando uma consistência desejada e mantendo o produto fluido.

O incentivo ao consumo indiscriminado de enxaguatórios deve ser criticado. Observa-se um grande investimento na indução ao uso do produto. E é importante dizer que, ao contrário da pasta, da escova e do fio dental, o enxaguatório não tem indicação universal. É preciso concentrar a utilização para casos específicos, como pós-cirurgia. Além de não ser essencial à saúde oral, o uso frequente de enxaguatórios bucais com álcool aumenta os riscos de câncer de boca e da faringe. O álcool presente nos enxaguatórios contribui para o aumento das taxas de câncer oral de forma similar às bebidas alcoólicas --e sabe-se que o álcool é o segundo fator de risco para a doença, depois do tabagismo, aumentando de cinco a nove vezes os riscos. Dentistas recomendam o uso de enxaguatórios após cirurgias, raspagem de dente, casos de alta incidência de cárie, doenças da gengiva e para pessoas que não têm coordenação motora para realizar uma boa escovação (MOTA et al., 2004; PATEL; GALLAGHER; CHAPPLE, 2018).

A despeito das propriedades dos cremes dentais e dos enxaguatórios bucais na profilaxia da cárie, muitos dos componentes dessas formulações são tóxicos. O flúor, por ser uma substância reativa, pode causar efeitos adversos no organismo, a nível ósseo e neurológico, dependendo da concentração ingerida, sendo considerado tóxico a partir de

10mg/dia. No Brasil é considerado como padrão ótimo para administração o flúor na concentração de 0,7 ppm. Outra substância usada no controle do biofilme dental, com melhor efeito antimicrobiano e amplo espectro de ação, é a clorexidina, detergente catiônico, da classe das biguanidas. Infelizmente, o uso da clorexidina é limitado pelos efeitos adversos relacionados, como manchas nos dentes, restaurações, próteses e língua, alterações do paladar, principalmente para o sal, formação de cálculo supragengival e, raramente, tumefação reversível nos lábios ou glândulas parótidas, descamações na mucosa oral, urticária, dispneia e choque anafilático (ZANATTA; da MOTA, 2007; SABHARWAL; SCANNAPIECO, 2017).

Com relação aos corantes azuis FD&C Blue Dye # 1 & 2, estudos recentes indicam que estes corantes trazem problemas de comportamento, aprendizado, e saúde, incluindo câncer. Ainda que não ocorra a ingestão de creme dental, estes produtos são absorvidos em segundos apenas, através dos lábios ou da membrana mucosa oral, especialmente a sublingual. Estes agentes carcinogênicos entram na corrente sanguínea rapidamente. O triclosan, de acordo com a USEPA (United States Environmental Pollution Agency) é um pesticida perigoso de alto risco para a saúde humana e ambiental. A exposição prolongada ou uso frequente de uma série de pesticidas podem causar danos ao fígado, rins, coração e pulmões, supressão do sistema imunológico e hemorragias cerebrais. A sílica hidratada, por sua vez, é um abrasivo que danifica o esmalte dental e impede a remineralização natural do dente. A sacarina sódica ou ciclamato monossódico são adoçantes artificiais altamente cancerígenos. O Hipolaurilsulfato de sódio (SLS) constitui o ingrediente mais perigoso. Também encontrado em xampus, o SLS pode prejudicar o desenvolvimento normal dos olhos, causar cataratas em adultos, dificultar curas e danificar e enfraquecer o crescimento do cabelo (STEINMAN; EPSTEIN, 1995; MATHEW, 2015; WILSON; CONWAY, 2016).

### **1.3.4 POLÍMEROS E BIOPOLÍMEROS**

Os polímeros são macromoléculas de massa molecular elevada que consistem em unidades estruturais repetidas derivadas de seus respectivos monômeros, (ROCAYA et al., 2018) ligadas entre si, predominantemente, por ligações covalentes (PITTY; BOING; BARRO, 2011). A origem dos polímeros é uma classificação bem relevante que leva a dois grandes grupos de polímeros, naturais e sintéticos. Os polímeros naturais são aqueles sintetizados pela natureza e os polímeros sintéticos são sintetizados pelo homem (CANEVAROLO JR., 2006; COSTA et al., 2017). Nos países em desenvolvimento, a poluição ambiental por polímeros sintéticos tem provocado uma série de danos. Como resultado, esforços têm sido feitos para

resolver estes problemas acrescentando aos polímeros a biodegradabilidade através de pequenas modificações nas suas estruturas (BRITO et al., 2011).

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros derivados de plantas (amido, celulose, outros polissacarídeos e proteínas), produtos animais (proteínas e polissacarídeos), produtos microbianos (polihidroxitirato) e polímeros sintetizados quimicamente a partir de monómeros naturalmente derivados (ácido poliláctico) (KUMAR; KAUR; BHATIA, 2017). Observa-se um aumento no uso de polímeros naturais biodegradáveis devido as suas numerosas características biológicas e com a ação de micro-organismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas, podem ser consumidos em semanas ou meses sob condições favoráveis de biodegradação (VIEIRA et al., 2011). Os polímeros naturais, e em particular os polissacarídeos, atraíram a atenção de inúmeros pesquisadores nas últimas décadas, entre eles, podemos citar o quitosana, um biopolímero modificado obtido a partir da quitina (VARMA et al., 2004; KURITA, 2006, CRINI et al., 2017).

#### **1.3.4.1. QUITINA E QUITOSANA**

Quitina e quitosana são copolímeros naturais (CANELA; GARCIA, 2001; SIGNINI, 2002; SILVA et al., 2009; COSTA et al., 2017). A quitina, o segundo polímero natural mais importante, é um polissacarídeo que consiste de uma ligação  $\beta$  (1  $\rightarrow$ 4), obtida normalmente de camarões marinhos, crustáceos e caranguejos. É baixa em toxicidade, biodegradável, antibacteriana, hidrofílica e possui boa afinidade por proteínas. A quitosana é o derivado mais importante da quitina, que é feita tratando as conchas de crustáceos com o hidróxido de sódio alcalino (por acetilação da quitina), é composta principalmente de  $\beta$ - (1-4) -2-amino- 2-desoxi-Dglucopiranosose unidades de repetição com lotes de amino livre (-NH<sub>2</sub>) e grupos hidroxilo (-OH) servem como os locais de reação (Figura 2) (NASEERUTEEN et al., 2018).

A quitina está disponível abundantemente no exoesqueleto de crustáceos, insetos e vários fungos. A extração de quitosana da quitina envolve um mecanismo de desacetilação envolvendo a eliminação do grupo acetila via tratamento da quitina com hidróxido de sódio concentrado por um longo período deixando apenas a amina (-NH<sub>2</sub>). A estrutura da quitosana apresenta muita semelhança com a de celulose, diferindo apenas pela presença da hidroxila (-OH) no lugar da amina (-NH<sub>2</sub>) (AHMED et al., 2018). De acordo com o grau médio de acetilação (GA) pode-se obter quitosanas com propriedades físico-químicas diferenciadas com relação aos parâmetros de solubilidade e viscosidade (STAMFORD-ARNAUD et al., 2010). É



difícil a obtenção de quitosana com alto grau de desacetilação, pois na medida em que este aumenta a possibilidade de degradação do polímero também aumenta (COSTA-SILVA et al., 2006; COSTA et al., 2017).

A quitosana possui propriedades específicas que revelam seu potencial para inúmeras aplicações em vários produtos comerciais (HAMMAN, 2010). Este biopolímero tem grande potencial para fornecer materiais de adsorção ou afinidade devido à sua abundância de sítios de reação, que podem adsorver, quelar íons metálicos e interagir com moléculas bioativas. Além disso, a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e não toxicidade (NASEERUTEEN et al., 2018), apresenta alta bioatividade; atividade antimicrobiana e habilidade em formar gel e filme.

Estas propriedades peculiares conferem uma variedade de aplicações para a quitosana, tais como: carreador de drogas de liberação controlada (HAMMAN, 2010), antibacteriano (FENG; XIA, 2011) e antiácido (SHIBASAKI; KUMAGAI, 2018.); inibe a formação de placa bacteriana e descalcificação do esmalte dentário (SANO et al., 2003; STAMFORD-ARNAUD et al., 2010), promove a osteogênese, tem ação absorvente de gordura (CRAVEIRO et al., 1998) e promove a cicatrização de úlceras e lesões (MAIA et al., 2006).

As propriedades físico-químicas da quitosana são afetadas por vários fatores, ou seja, grau de desacetilação, peso molecular, etc (AHMED et al., 2018), uma vez que fontes de obtenção distintas (crustáceos, fungos, moluscos), processos diferentes de extração e purificação causam alterações (COSTA-SILVA et al., 2006; COSTA et al., 2017). Uma das características importantes da quitosana é a sua versatilidade estrutural devido à presença de aminoácidos reativos e grupo hidroxila na cadeia molecular. Devido à presença de dois grupos hidroxilo (posição C-3 e C-6) e um grupo amina (posição C-2) em cada unidade de repetição, torna-se flexível para modificação química. Diferentes novos materiais de suporte biológico a partir de quitosana podem ser fabricados através de alteração de superfície e liofilização. A quitosana oferece a vantagem de ser facilmente processável em diferentes formas funcionais, tais como géis, nanofibras, membranas, contas, nanofibrilas, nanopartículas, micropartículas, estruturas de suporte e estrutura esponjosa (AHMED et al., 2018).

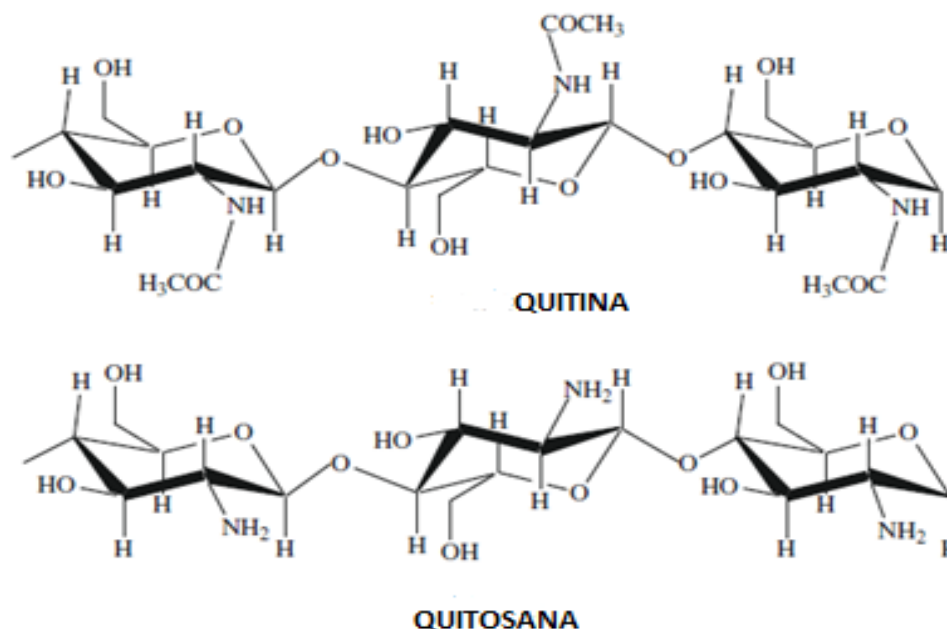
O grau de desacetilação (GD) é definido como a fração de grupos amino na cadeia polimérica. Este parâmetro juntamente com a massa molar são características determinantes das propriedades físico-químicas deste polissacarídeo (COSTA et al., 2012; VARUN et al., 2017).

Existem vários métodos para a sua determinação dentre eles a análise elementar, a titulação potenciométrica, espectroscopia no infravermelho, no ultravioleta. A ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  é uma técnica simples onde uma pequena quantidade da amostra é dissolvida em ácido clorídrico deuterado resultando em uma solução viscosa. O RMN  $^1\text{H}$  lê os picos referentes aos prótons do grupo acetoamido da quitina e os outros prótons, exceto o próton do carbono anomérico (STAMFORD-ARNAUD et al., 2010).

Dentre as várias aplicações da quitosana, destaca-se o emprego na indústria farmacêutica, mais especificamente relacionada com a clínica odontológica. Este polímero é usualmente obtido na forma de floco ou em pó, não possui porosidade elevada e é solúvel em meio ácido. Outras formas de apresentação da quitosana, como em gel, esponja, pasta e solução, vêm sendo estudadas (STAMFORD et al., 2007; COSTA et al., 2017).

A produção de biomateriais a base de quitosana tem sido foco de várias pesquisas, visto que este biopolímero e seus derivados tem se mostrado agentes promissores no tratamento e prevenção de diversas patologias por apresentarem inúmeras ações celulares (VENKATESAN; KIM, 2010; CHEUNG et al., 2015).

**Figura 2.** Estrutura química da quitina e da quitosana



**Fonte:** adaptado de (JAYAKUMAR, 2010; CHEUNG et al., 2015)

### 1.3.4.2. Atividade antimicrobiana da quitosana

Uma das características mais interessantes da quitosana é a sua atividade antibacteriana e antifúngica e, juntamente com seu excelente perfil de segurança em humanos, atraiu atenção considerável em várias disciplinas de pesquisa. A atividade antimicrobiana da quitosana depende de vários fatores, incluindo o seu peso molecular, grau de desacetilação, grau de substituição, forma física, bem como propriedades estruturais da parede celular dos micro-organismos alvo (PERINELLI, et al., 2018). Este glicosaminoglicano apresenta atividade antimicrobiana para vários microrganismos patógenos, destacando-se sua atuação contra bactérias gram-positivas e diversas espécies de *Candida* (YADAV; BHISE, 2004). Supõe-se que a quitosana age na parede celular do micro-organismo modificando o potencial elétrico da membrana celular (CHUNG et al., 2004). Este polissacarídeo também age potencializando outras drogas de inibição, como o gel de clorexidina, uma vez que aumenta o tempo de permanência da droga no local de ação (HAMEDÍ et al., 2018).

A ação antimicrobiana da quitosana e de seus derivados sofre influência de fatores, que dependendo do papel desempenhando podem ser classificados em quatro categorias principais: fatores microbianos (espécies microbianas, idade da célula); fatores intrínsecos da quitosana (densidade de cargas positivas, peso molecular, características hidrofílicas/hidrofóbicas, capacidade quelante); fatores estados físicos (estado solúvel e sólido) e fatores ambientais (pH, forças iônicas, temperatura, tempo) (ALI; AHMED, 2018).

O mecanismo de ação antimicrobiano da quitosana ainda não está totalmente elucidado, sendo vários mecanismos de ação são sugeridos na literatura. Alguns autores relatam que os grupos amínicos da quitosana em contato com fluidos fisiológicos são protonados e se ligam a grupos aniônicos dos microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento. Por outro lado, Yadav e Bhise (2004) reportam que ao interagir com a célula bacteriana, a quitosana, promove deslocamento de  $\text{Ca}^{++}$  dos sítios aniônicos da membrana, avariando-os. Outros estudos sugerem que a ação antimicrobiana está intimamente relacionada às propriedades físico-químicas do polímero e às características da parede celular do microorganismo (COSTA-SILVA et al., 2006; ALI; AHMED, 2018).

### **1.3.4.3. Quitosana na área odontológica**

O gel de quitosana obtido pela diluição do polímero em ácido acético tem sido sugerido como material preventivo e terapêutico para cárie dentária (TARSI et al., 1997; SANO et al., 2002; PAUL; GARBA; JAMES, 2018). Na prevenção de cárie, estudo, *in vivo*, com solução bochecho contendo quitosana confirmou a eficácia deste produto para higiene oral, reduzindo a formação de placa bacteriana (SANO et al., 2003; HAMED I et al., 2018).

Estudos de associação da quitosana com materiais dentários, tais como tetrafluoretileno e hidroxiapatita sugerem, que a quitosana aumenta a biocompatibilidade dos materiais, favorece a migração celular e inibe a adsorção de bactérias orais (*S. sanguis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*) ao dente. Em todas as formas a quitosana apresenta ação antimicrobiana para bactérias do grupo *Streptococcus*, inibe a formação de placa bacteriana e estimula a salivagem, *in vivo*. Esses efeitos sugerem a aplicação da quitosana como agente terapêutico e preventivo para doença cárie (TARSI et al., 1997; 1998; VERKAIK et al., 2011; ALI; AHMED, 2018).

A quitosana, devido às suas várias aplicações biomédicas, variando de suas propriedades bioadesivas, viscosas, permeabilizantes, antimicrobianas e anticariogênicas, regenerativas, suscetibilidade a fácil tratamento químico e biocompatibilidade, também pode ser usada no tratamento de tecidos danificados da cavidade oral. A sua capacidade antibacteriana e de indução de regeneração e potencial no tratamento de doenças periodontais/candidíases orais/mobilidade dentária e na redução da placa dentária, suportada pela alta biocompetência, faz com que seja um biomaterial promissor na medicina, incluindo a odontologia (DECKER et al., 2005; TAVARIA, 2013; AHSAN et al, 2017).

### **1.3.4.4. Aplicações industriais da quitosana**

A natureza policatítica da quitosana em meio ácido (nenhum outro polímero natural possui esta propriedade) e sua grande versatilidade abre caminho a inúmeras aplicações (CRINI et al., 2017). Esse biopolímero tem um alto potencial em várias áreas como no tratamento de água, na agricultura, como biopesticidas, na produção de vinho como agente de cura, como tratamento de cicatrização de feridas e no campo da medicina, a pesquisa está em andamento para uso com genes e reparo ósseo (SMETS; RÜDELSHEIM, 2018).

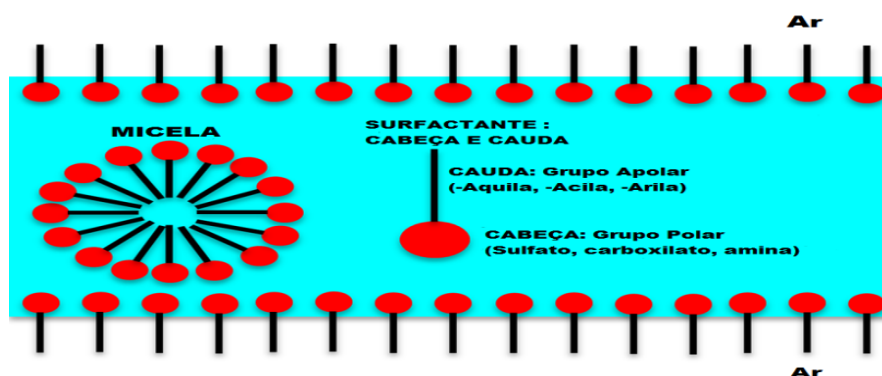
Pode ainda ser aplicada em corantes, compostos fenólicos e como membrana em processos de purificação; material de embalagem, estabilizantes e anti-colesterol na indústria

alimentícia (ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015), indústria alimentar (fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante, fungicida e bactericida, revestimento para frutos), cosmética (esfoliante para a pele, tratamento do acne, hidratante capilar, creme dental) e biofarmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante). No entanto, a sua maior aplicação é na área biomédica (suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada dos medicamentos, encapsulamento de materiais) (AZEVEDO et al., 2007; TAVARIA, 2013; HAMED I et al., 2018).

### 1.3.5 BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes são agentes anfífilos, atraídos simultaneamente pelas fases hidrofílica e hidrofóbica (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). Eles se dividem preferencialmente na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade. Essas moléculas reduzem a tensão superficial e tensão interfacial e criam microemulsões. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (Figura 3) (TAZDAÏT et al., 2018; SILVA et al., 2014).

**Figura 3.** Estrutura da micela



**Fonte:** adaptado de (UENO et al., 2016)

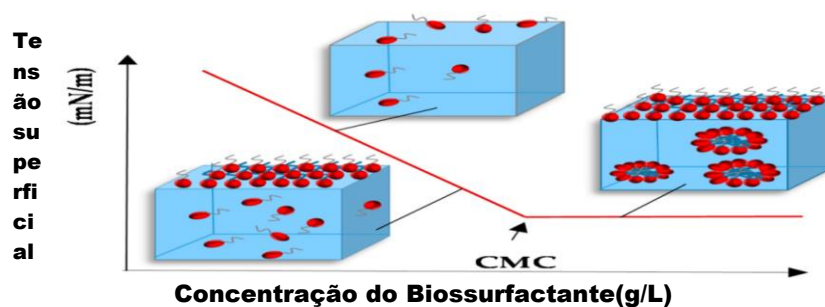
Os surfactantes químicos são um dos compostos amplamente utilizados em diferentes setores como, agregado familiar, limpeza, impressão e campo de petróleo como agente EOR. Eles são divididos em vários grupos com base na carga, polaridade, tamanho, etc. Com base

nas cargas de superfície, os surfactantes são divididos em três grupos principais - aniônico, catiônico e não-iônico (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018).

A eficiência de um surfactante é determinada pela habilidade de reduzir a tensão superficial, que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos (SANTOS et al., 2016). Eles reduzem a tensão interfacial óleo-água ao orientar a interação de grupos hidrofílicos com a fase aquosa e os grupos hidrofóbicos com óleo, e deprimindo a coalescência formando micro-emulsões estáveis. Tais microemulsões ocorrem espontaneamente e dependem principalmente do tipo e estrutura do surfactante (DOSHI; SILLANPÄÄ; KALLIOLA, 2018). Bons surfactantes conseguem reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m e a tensão interfacial (tensão entre líquidos polares e apolares) da água e n-hexadecano de 40 mN/m para 1 mN/m (SANTOS et al., 2016).

A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são estruturas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna. A concentração de micelas é conhecida como a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde ao ponto em que o agente tensoativo registra o menor valor de tensão superficial estável, ou seja, corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (Figura 4) (CAMPOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016).

**Figura 4.** Ilustração das regiões em que ocorre a formação de micelas (Concentração Micelar Crítica – CMC)



**Fonte:** adaptado de (SANTOS et al., 2016)

A maioria dos surfactantes produzidos atualmente é quimicamente derivada de petróleo. No entanto, estes agentes tensoativos sintéticos são geralmente tóxicos e dificilmente degradados por micro-organismos. Eles são, portanto, uma fonte potencial de contaminação e danos para o meio ambiente. Estes perigos associados têm, nos últimos anos, atraído a comunidade científica a buscar alternativas de obtenção de surfactantes mais compatíveis com o meio ambiente, como é o caso da produção microbiana de surfactantes (biossurfactantes) (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

Aliado ao interesse científico, a preocupação ambiental entre os consumidores, combinada a novas legislações de controle ambiental têm levado ao desenvolvimento de surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes.

Os biossurfactantes são agentes ativos de superfície biologicamente produzidos por seres humanos (surfactante pulmonar), plantas e micro-organismos, que, como suas contrapartes químicas, podem ser classificados com base na carga superficial e na massa molecular (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018) e têm despertado interesse industrial em função de suas características vantajosas, como diversidade estrutural, toxicidade reduzida, maior biodegradabilidade, capacidade de ação em ambientes extremos de pH, temperatura e salinidade, maior seletividade, menor CMC e habilidade de serem produzidos a partir de fontes renováveis/resíduos industriais e de subprodutos. A CMC dos biossurfactantes, ou seja, a menor concentração capaz de reduzir ao máximo a tensão superficial da água, que é de 72 mN/m, normalmente varia de 1 a 200 mg/l, enquanto que as tensões superficiais e interfaciais estão em torno de 30 mN/m e 1 mN/m, respectivamente. Já as massas molares se encontram entre 500 a 1500 Da (BURGHOFF, 2012).

Os biossurfactantes são classificados em cinco grupos principais: glicolipídios (por exemplo, ramnolipídeos, soporolipídios, trealfolipídeos), lipopeptídeos (por exemplo, surfactinas, líquenolisinas, iturinas, fengicinas), fosfolipídios (por exemplo, fosfatidiletanolamina), ácidos graxos (por exemplo, ácidos corinomuólicos) e biossurfactantes poliméricos (por exemplo, emulsion, liposan). *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., Leveduras (*Candida* sp.) e *Acinetobacter* sp., são alguns dos microrganismos mais conhecidos pela produção de biossurfactantes (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). Propriedades como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases são características importantes em um biossurfactante, as quais tornam possível a utilização desses agentes em diferentes setores industriais (ALMEIDA et al., 2016).

Os primeiros estudos na área dos biossurfactantes ocorreram na década de 80 e, desde então, as pesquisas permitiram o desenvolvimento e a comercialização de dois produtos: a Surfactina, uma lipoproteína produzida pela bactéria *Bacillus subtilis*, e os Raminolipídeos, grupo de glicolipídeos produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* comercializados pela Jeneil Biosurfactants Company (USA) (SANTOS et al., 2016).

A maioria dos biossurfactantes conhecidos é produzida em substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, embora muitos tenham sido obtidos a partir de substratos solúveis (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). A disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para a redução do custo de produção dos biossurfactantes. Estima-se que a matéria-prima represente de 10 a 30% do custo total de um produto biotecnológico, enquanto que as etapas de purificação contribuem com 60% do processo (SARUBBO et al., 2015). Por outro lado, milhões de desperdícios em resíduos poluentes são jogados a cada ano por todo o mundo. O tratamento e a remoção destes resíduos também representam um alto custo para várias indústrias (MARCHANT; BANAT, 2012).

Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes. Muitos biossurfactantes têm sido produzidos a partir de substratos agroindustriais, renováveis e de baixo custo. Óleos vegetais, resíduos de fritura de óleos vegetais, resíduos de destilaria de óleos, resíduos da indústria de laticínios (soro de leite), melação de cana e glicerina têm sido citados na literatura (SANTOS et al., 2016).

Os resíduos gerados a partir das refinarias de óleos vegetais e laticínios contêm grande quantidade de gorduras / gorduras e óleos que faz com que tais águas residuais não sejam facilmente degradadas. Os níveis elevados de gorduras e óleos em estes efluentes podem, ainda, causar poluição bruta de terra e água, devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (COD) (VESHAREH et al., 2018) Além disso, o elevado teor de gorduras e óleos frequentemente interfere com o procedimento normal de tratamento de águas residuais, resultando em aumento significativo do custo do processo e do tempo. Assim, a remoção ou o pré-tratamento destas gorduras e óleos é necessário antes de se submeter o efluente às operações de tratamento biológico. Um grande número de métodos de pré-tratamento são empregues para remover gorduras e óleos destas águas residuais (CHAPRÃO et al., 2018).



Esses tratamentos incluem separadores de placas inclinadas, sistemas de flotação por ar dissolvido e outros métodos de tratamento físico-químicos. No entanto, o custo destes métodos é considerado alto e a eficiência e remoção de gordura e óleo normalmente é limitada (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; FELIX et al., 2019). Há poucos relatos disponíveis para degradação de gorduras e óleos por hidrólise alcalina/ácida/enzimática, e esses métodos ainda não são muito rentáveis. Métodos alternativos para lidar com o elevado conteúdo de gorduras e óleos em águas residuárias tais como a utilização de surfactantes visa facilitar a biodegradação de gorduras e óleos principalmente através do aumento da sua solubilidade. De fato, a utilização de surfactantes para facilitar a emulsificação e remoção de óleos de águas residuais tem sido explorada e usada com sucesso para o tratamento de lavagem de águas residuais. (CHAPRÃO et al., 2018).

A seleção do substrato, entretanto, depende da seleção de resíduos com um balanço de nutrientes adequado para o crescimento do micro-organismo e a produção de biossurfactante. Os resíduos industriais com elevado valor de carboidratos ou lipídios encontrados são elementos necessários para o uso como substratos para produção de biossurfactantes (SANTOS et al., 2016).

A possibilidade de produção dos biossurfactantes a partir de substratos renováveis e de diferentes espécies microbianas, além da possibilidade de variação de inúmeros parâmetros culturais como tempo de cultivo, velocidade de agitação, pH do meio e nutrientes adicionados, possibilita a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência, embora os custos de produção ainda não permitam uma maior competitividade com os similares sintéticos (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; CHAPRÃO et al., 2018).

Outra condição essencial para o uso de biossurfactantes é que eles possam ser produzidos por micro-organismos não patogênicos. Além disso, eles podem ser produzidos através da utilização de matérias-primas fermentativas de baixo custo tais como gordura animal, soro de queijo desproteínizado, melão de soja, óleo residual de fritura, etc., a fim de reduzir o seu custo de produção (SANTOS et al., 2016). São considerados uma alternativa ecológica aos tensoativos químicos para inúmeros produtos comerciais, incluindo detergentes e produtos de limpeza, produtos para cuidados pessoais, cosméticos, têxteis, tintas, mineração, celulose, na limpeza de derramamento de óleos, na remoção de resíduos de óleo de armazenamento de tanques, na recuperação de petróleo, dispersantes para biorremediação de solos e da água e terapêuticos, aditivos alimentares, emulsificantes, produtos farmacêuticos

e em novas aplicações, como a nanotecnologia (ALMEIDA et al., 2016; PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018).

Nesse sentido, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias que permitam a produção e consequente aplicação dos biossurfactantes em escala industrial. Os substratos de baixo custo, a seleção de micro-organismos superprodutores e o aprimoramento dos processos de purificação têm sido utilizados com essa finalidade (MARCHANT; BANAT, 2012).

Mais recentemente, numerosas investigações levaram à descoberta de propriedades biológicas e químicas dos biossurfactantes para aplicações em produtos farmacêuticos. Em particular, a capacidade de perturbar a integridade das membranas microbianas, levando à lise celular e ao vazamento de metabólitos, bem como sua propensão em se dividir nas interfaces, modificando as propriedades superficiais e afetando a adesão de micro-organismos, são funções importantes para a aplicação desses agentes no tratamento antimicrobiano e como agentes anti-biofilme. Além disso, resultados experimentais sugerem que biossurfactantes são atóxicos ou menos tóxicos quando comparados com surfactantes sintéticos, uma característica valiosa para as aplicações na biomedicina (FRACCHIA et al., 2015).

### **1.3.5.1 Atividade antimicrobiana dos biossurfactantes**

A classe mais comumente relatada de biossurfactantes com atividade antimicrobiana são os lipopeptídeos (MARCHANT; BANAT, 2012). A atividade antimicrobiana dos biossurfactantes lipopeptídicos se deve à capacidade desses se auto-associarem e formar agregados micelares dentro da membrana lipídica. Devido a estas propriedades, os lipopeptídeos normalmente causam ruptura da membrana, aumento da permeabilidade da membrana, liberação de metabólitos e lise celular. Além disso, alterações na estrutura da membrana e destruição de conformações protéicas alteram as funções vitais da membrana, incluindo a geração e o transporte de energia (FRACCHIA et al., 2015).

No que se refere ao modo de ação dos biossurfactantes glicolipídicos, a exposição de micro-organismos provoca uma resposta multi-componente das células bacterianas caracterizada pela redução do teor total do lipopolissacarídeo celular, aumento da hidrofobicidade celular e alterações nas proteínas da membrana e da morfologia superficial. Da mesma forma, a atividade antimicrobiana envolve mecanismos que causam desestabilização e alteração da permeabilidade da membrana celular (SILVA, 2014; FRACCHIA et al., 2015).

Os lipopeptídeos antimicrobianos incluem surfactina, iturina, fengicina, micosubtilinas e bacillomicinas produzidas por *Bacillus subtilis* (VATER et al., 2002), lipopeptídeos cíclicos como a daptomicina, de *Streptomyces roseosporus* (BALTZ et al., 2005), polimixina B, pumilacidina e liquenisina produzida por *Bacillus Polymyxa*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis*, respectivamente (LANDMAN et al., 2008) e finalmente a viscosina, de *Pseudomonas* (SAINI et al., 2008). Glicolipídeos também foram relatados por exibir atividade antimicrobiana; em particular, os raminolipídeos de *P. aeruginosa* (BENINCASA et al., 2004) os soforolipídeos de *Candida bombicola* (KIM et al., 2002; DE RIENZO et al., 2015) e os lipídios do tipo manosileritritol (MEL-A e MEL-B) de *Candida antarctica* (KITAMOTO et al., 1993).

Mais recentemente, um lipopeptídeo produzido por *B. licheniformis* M104 foi investigado como agente antimicrobiano contra bactérias gram-positivas (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*), bactérias gram-negativas (*P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*) e *C. albicans* (ZAKARIA, 2013). Todos os micro-organismos testados, com exceção de *L. monocytogenes* e *K. pneumoniae*, foram afetados pelo biossurfactante, sendo o *S. aureus* o mais susceptível. O efeito antimicrobiano do lipopeptídeo foi dependente do tempo e da concentração. Verificou-se também que o lipopeptídeo 6-2 produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* possui uma atividade antifúngica interessante contra *C. albicans*, *Metschnikowia bicuspidate*, *C. tropicalis*, *Yarrowia lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae* (SONG et al., 2013).

Samadi et al. (2012) avaliaram algumas atividades biológicas de mono e di-raminolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* MN1 e relataram que a fração mono-raminolipídica era um agente antibacteriano mais potente do que a fração di-raminolipídica, em particular, contra bactérias gram-positivas que foram inibidas a uma concentração de 25 µg/mL.

Soforolipídeos de *C. bombicola* inibiram o crescimento de bactérias gram negativas e positivas com concentração mínima inibitória (CMI) de 30 e 1 g/mL após 2 e 4 horas de contato, respectivamente, para *E. coli* (ATCC 8739) e *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e 6 e 1 g/mL para *S. aureus* (ATCC 6358) e *B. subtilis* (ATCC6633), respectivamente, após 4 horas de contato (JOSHI-NAVARE; PRABHUNE, 2013). Em outros trabalhos, Luna et al. (2012) e Rufino et al. (2011) demonstraram a atividade antimicrobiana de dois biossurfactantes derivados, respectivamente, de *Candida sphaerica* UCP0995 e *Candida lipolytica* UCP 0988, contra estirpes gram-positivas como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. epidermidis*, *Streptococcus Oralis* e contra *C. albicans*.

Apesar do elevado número de publicações que descrevem a atividade antimicrobiana dos biossurfactantes e das patentes relacionadas com a sua utilização, as aplicações reais nas indústrias farmacêuticas, biomédicas e de higiene permanecem limitadas (FRACCHIA et al., 2014). Alguns lipopeptídeos atingiram um status de antibiótico comercial, como as equinocandinas (NGAI et al., 2011), a micafungina (FRACCHIA et al., 2014), a anidulafungina (GEORGE; REBOLI, 2012) e a daptomicina (ROBBEL; MARAHIEL, 2010).

A daptomicina, um lipopeptídeo cíclico ramificado isolado de culturas de *S. roseosporus* e produzido pela Cubist Pharmaceuticals sob o nome Cubicin® (ROBBEL; MARAHIEL, 2010), foi aprovado em 2003 para o tratamento de infecções cutâneas causadas por MRSA e outros patógenos gram-positivos e em 2006 pela endocardite E, bacteremia geralmente causada por *S. aureus*. A daptomicina também apresentou uma forte atividade antibacteriana contra outros agentes patogênicos importantes, tais como *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina, *Staphylococcus coagulase-negativo* (SNC), *S. aureus* susceptível ao intercepto de glicopeptídeo (GISA) e *Enterococci* resistente à vancomicina (VRE) (TALLY et al., 1999; YAN et al, 2019).

#### **1.3.5.2. Biossurfactantes como agentes anti-adesivos e inibidores de biofilmes**

Os biossurfactantes surgiram recentemente como uma nova geração de agentes anti-adesivos de maior biocompatibilidade. Os biossurfactantes têm demonstrado capacidade de interromper a formação de biofilmes, controlando a interação microbiana com interfaces e alterando a condição química e física dos ambientes de biofilmes em desenvolvimento (RODRIGUES et al., 2006; KIRAN et al., 2010; SATPUTE et al., 2018).

As taxas iniciais de micro-organismos que aderem às superfícies são determinados por interações complexas de hidrofobicidade (energias interfaciais livres), presença de locais receptores específicos nas superfícies celulares microbianas, interações eletrostáticas e tipos de biossurfactantes produzidos. A formação de biofilmes em superfícies sólidas é diretamente proporcional à hidrofobicidade da superfície, desde que a suspensão seja um simples tampão. A adesão microbiana em substratos hidrofóbicos pode estar relacionada a remoção da água interfacial existente entre o micro-organismo e a superfície, que facilita aproximação e adesão. Sugere-se também que os biossurfactantes reduzem as interações hidrofóbicas que diminuem a hidrofobicidade da superfície que acaba por impedir a adesão microbiana a superfícies e,

podem, interferir no desenvolvimento de biofilmes (BANAT et al., 2014; MNIF; GHRIBI, 2015; SATPUTE et al., 2016a).

Rivardo et al. (2011), relataram que um biossurfactante lipopeptídico produzido pelo *B. subtilis* V9T14 em associação com antibióticos, aumentou sinergicamente a eficácia de antibióticos contra a formação de biofilme de *E. coli* CFT073. Algumas das combinações utilizadas levaram à erradicação completa do biofilme. Esses resultados estão sendo usados na obtenção de uma patente internacional (CERI et al., 2010). As combinações de biossurfactante com biocidas para atuarem como coadjuvantes foram concebidas para prevenir eficazmente a formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas e / ou erradicar o crescimento bacteriano planctônico (SATPUTE et al., 2018).

Janek et al. (2012) investigaram o papel e as aplicações da Pseudofactina II, um biossurfactante do tipo lipopeptídeo cíclico produzido por *Pseudomonas fluorescens* BD5 como um composto anti-adesivo para aplicações terapêuticas e medicinais. A Pseudofactina II diminuiu a adesão de *Enterococcus hirae*, *Proteus mirabilis*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans* em vidro, poliestireno e silicone. O pré-tratamento de uma superfície de poliestireno com a Pseudofactina II (0,5 mg/mL) reduziu a aderência de *C. albicans* em 92-99% e outra adesão bacteriana em 36-90%. Também levou a uma maior capacidade de remoção de biofilme em biofilmes pré-existentes cultivados em superfícies não tratadas. A Pseudofactina II também causou uma inibição significativa na adesão inicial de estirpes de *E. coli*, *E. hirae*, *E. faecalis* e *C. albicans* em cateteres de silicone. Na concentração mais elevada testada (0,5 mg ml/L) observou-se uma inibição total de crescimento para *S. epidermidis* enquanto se verificaram inibições de crescimento parcial de outras bactérias e da levedura *C. albicans*.

Em outros trabalhos, biossurfactantes lipopeptídicos de *Paenibacillus polymyxa* foram capazes de inibir biofilmes de espécies únicas e mistas (QUINN et al., 2012; LEE; SONG, 2018). Este complexo de biossurfactante, composto principalmente de fusaricidina B e Polimixina D1, reduziu a biomassa do biofilme de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Micrococcus Luteus* e *Streptococcus bovis*. Sriram et al. (2011) também relataram atividade antimicrobiana e inibição de biofilme utilizando um biossurfactante lipopéptidico produzido por uma estirpe de solo de *Bacillus cereus* resistente a metais pesados chumbo, ferro e zinco. Também inibiu a formação de biofilmes em estirpes patogênicas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A inibição máxima de biofilme (57%) foi observada contra *S. epidermidis* a 15 mg ml/L.

Zeraik e Nitschke (2010) avaliaram as propriedades anti-adesivas e de ligação de *M. luteus*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* em superfícies de poliestireno a várias temperaturas

após tratamento com raminolípídeos e surfactina. Os raminolípídeos mostraram uma ligeira diminuição na ligação de *S. aureus*, mas geralmente não foram eficazes. A surfactina, em comparação, inibiu eficazmente a adesão de estirpes bacterianas testadas em todas as condições com actividade aumentada à medida em que a temperatura diminuía com uma redução máxima de 63-66% na aderência a 4°C.

Recentemente, observou-se que os raminolípídeos e outros extratos de óleo de plantas têm um papel significativo na inibição de biofilmes complexos e atuam como coadjuvantes que aumentam os inibidores microbianos de antibióticos selecionados (QUINN et al., 2013). Em outro estudo, um biossurfactante glicolípídico de *P. aeruginosa* DSVP20 foi avaliado quanto à sua capacidade para interromper o biofilme de *C. albicans*.

O tratamento com o di-raminolípídeo (RL-2) em concentrações que variavam entre 0,04-5,0 mg/mL reduziu significativamente a adesão de *C. albicans* em superfícies de poliestireno (PS). Os dados mostraram uma redução do número de células aderentes, após 2 h de tratamento, de cerca de 50% com 0,16 mg/mL de RL-2, a qual aumentou gradualmente até a inibição completa da aderência, a uma concentração de 5 mg/mL.

Além disso, o biofilme de *C. albicans* na superfície de PS foi interrompido entre 70% e 90% com o tratamento com RL-2 em concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL, respectivamente (SINGH et al., 2013).

Recentemente, Pradhan et al. (2014) relataram um novo glicolípídeo obtido de *Lysinibacillus fusiformis* S9 com notável atividade antibiofilme contra *E. coli* e *S. mutans* patogênicos, sem afetar a viabilidade celular microbiana. Em particular, o biotensoativo foi capaz de conter completamente a formação de biofilmes a uma concentração de 40 µg/mL.

Padmapriya e Suganthi (2013) purificaram dois biossurfactantes produzidos por *C. tropicalis* e *C. albicans* e testaram sua atividade anti-adesiva em diferentes tipos de patógenos clínicos. Os resultados mostraram uma redução das células aderentes na superfície do cateter urinário pré-revestido com biossurfactantes e uma maior atividade do biossurfactante sintetizado por *C. tropicalis* em comparação com o biossurfactante sintetizado por *C. albicans*.

**Tabela 2.** Relação resumida dos biossurfactantes em aplicações relacionadas à boca.

Biossurfactante	Produtor	Principais conclusões	Referências
<b>Glicoproteína</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Estudo investiga o efeito do tipo de biossurfactante na expressão de genes de <i>S. mutans</i> de genes de glucosiltransferase (gtfB e gtfC) e fructosiltransferase (ftf) (genes importantes para a formação de matriz de biofilmes). Todos os genes encontrados foram regulados após a aplicação do biossurfactante.	Savabi <i>et al.</i> (2014)
<b>Não caracterizado</b>	<i>L. casei</i> / <i>L. reuteri</i> / <i>L. fermentum</i>		Tahmoures pour, Salehi e KasraKermanshahi (2011)  Salehi <i>et al.</i> (2014)
<b>Descaracterizado</b>	<i>Candida lipolytica</i>	O biossurfactante é capaz de induzir inibição visível de vários biofilmes de cepa de <i>Lactobacillus</i> e <i>S. mutans</i> HG985 em diferentes concentrações.	Rufino <i>et al.</i> (2011)
<b>Descaracterizado</b>	<i>Lactobacillus paracasei</i>  A20	As atividades antimicrobianas e anti-aderentes do extrato bruto de biossurfactante foram investigadas nas concentrações entre 25 e 50 mg/ml contra vários agentes patogênicos que demonstrou boa eficácia <i>in vitro</i> .	Gudiña <i>et al.</i> (2010)
<b>Caracterização parcial lipoproteína</b>	<i>Lactococcus lactis</i> 53	Estudar a eficácia do biossurfactante extraído contra micro-organismos isolados de uma prótese de voz explantada.	Rodrigues <i>et al.</i> (2006)
<b>Não caracterizado</b>	<i>Robinia pseudoacacia</i> e <i>N.oleandae</i> )	Prevenção da formação de biofilmes de silício e resina acrílica para próteses dentárias.	Cochis <i>et al.</i> (2012)
<b>Lipopeptídeo</b>	<i>Bacillus tequilensis</i>	Inibição do biofilme de <i>S. mutans</i> a uma concentração de 50 µg ml <sup>-1</sup> em diferentes superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas.	Pradhan <i>et al.</i> (2013)
<b>Rhamnolípido não caracterizado</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50% e 67% de inibição da formação de biofilme <i>Y. lipolytica</i> fúngica na superfície da placa de 96 poços e superfície de vidro.	Dusane <i>et al.</i> (2012)
<b>Emulsan</b>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Controle da placa dentária e cárie	US 4737359 A. Patente

### **1.3.5.3. Aplicação dos biossurfactante na indústria de Cosméticos**

Os biossurfactantes são utilizados da mesma forma que os tensoativos quimicamente sintetizados. As ações incluem detergência, emulsificação, desemulsificação, formação de espuma, dispersão, solubilização de substâncias hidrofóbicas ou para modificar superfícies, entre outras atividades (HOLMBERG, 2001; BANAT et al., 2010; MARCHANT; BANAT, 2012). Os biossurfactantes apresentam vantagens sobre os surfactantes sintéticos, no que se refere a ausência de efeitos irritantes ou até mesmo efeitos anti-irritantes, melhores propriedades hidratantes e compatibilidade com a pele (MASARU et al., 2007). Os glicolipídeos mais utilizados em cosméticos são os sofrorlipídeos, os raminolipídeos e os manosileritritol lipídeos. Os sofrorlipídeos têm boa compatibilidade com a pele e excelentes propriedades hidratantes, enquanto que os raminolipídeos são bons emulsificantes e podem substituir os surfactantes na maioria dos produtos cosméticos (MASARU et al., 2007; KHAN; BUTT, 2016).

A função emulsionante é provavelmente a propriedade mais importante dos biossurfactantes na formulação de cosméticos, porque emulsões têm vantagens consideráveis em relação a outros tipos de preparações. Portanto, eles são de fácil aplicação, apresentam um custo relativamente reduzido (devido à sua elevada proporção de água), e permitem simultaneamente a utilização de substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis (MARCHANT; BANAT, 2012; VECINO et al., 2017).

Tensoativos não naturais podem interagir com proteínas, remover lipídios da superfície epidérmica, desorganizando a estrutura intercelular desses lipídios, e afetam as células vivas na pele. Esses efeitos podem potencialmente ser evitados ou reduzidos usando biossurfactantes, como, por exemplo, os produzidos por agentes lácticos ((ELSHIKH; MARCHANT; BANAT, 2016; KHAN; BUTT, 2016). Na indústria cosmética vários parâmetros estão relacionados à composição de biossurfactantes, como a concentração micelar crítica (CMC), o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), bem como o desempenho iônico, entre outros, uma vez que estas propriedades determinarão o tipo ou o uso de biossurfactantes em formulações cosméticas (SATPUTE, 2010; RODRIGUES, 2015).



### **1.3.6. ÓLEO ESSENCIAL DE *MENTHA PIPERITA* (OEM)**

Além dos biossurfactantes e da quitosana, os óleos essenciais, que são compostos aromáticos voláteis complexos, compostos às vezes de mais de uma centena de componentes químicos e extraídos de plantas por processos de destilação, compressão de frutos ou extração com o uso de solventes (RIOS, 2016), têm sido utilizados por suas propriedades antimicrobianas.

*Mentha piperita L.*, é uma planta medicinalmente importante pertencente à Família Lamiaceae (*African pharmacopoeia*, 1985; *The Wealth of India*, 1962) e comumente conhecida como hortelã-pimenta. A hortelã-pimenta produz 0,1 a 1% de óleo volátil (LEUNG, 1980) composto principalmente de mentol (29-48%), mentona (20 a 31%), mentofurano (6,8%) e acetato de mentila (3 a 10%). O óleo de hortelã-pimenta e seus constituintes são comercialmente usados em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. O mentol é utilizado como matéria-prima em pastas de dente, dentífrico, tabaco de mascar, confeitaria, purificadores de boca, bálsamos analgésicos, tosse, perfumes, gomas de mascar, doces e indústria do tabaco (SINGH; SHUSHNI; BELKHEIR, 2015)

O óleo essencial de *Mentha piperita L.* (EO) é empregado para uso externo como antipruriginoso, adstringente, rubefaciente e antisséptico. Vários estudos demonstraram suas propriedades antivirais, antifúngicas e antibacterianas significativas (ROSATO et al., 2018). O óleo de hortelã-pimenta e o mentol têm efeitos antibacterianos moderados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SINGH; SHUSHNI; BELKHEIR, 2015).

### **1.3.7 REGULAMENTOS DE SEGURANÇA EM COSMÉTICOS**

O Regulamento de Produtos Cosméticos, Regulamento (CE) n.º 1223/2009 regulamenta os produtos cosméticos no seu conjunto para garantir a livre circulação no mercado interno, garantindo simultaneamente um elevado nível de proteção para os consumidores (SMETS; RÜDELSHEIM, 2018). Ele abrange os tensoativos como ingredientes de produtos; no entanto, não há menção neste documento sobre os biossurfactantes. Entretanto, ambos os tensoativos (quimicamente sintetizados) e biossurfactantes (produzidos biologicamente) são compostos tensoativos que devem seguir os mesmos regulamentos como se o seu uso fosse estabelecido a ingredientes cosméticos (BUZEK; ASK, 2009).

Por outro lado, o artigo 33. do Regulamento n.1223/2009 inclui um inventário com nomenclatura comum para os ingredientes cosméticos denominados International

Nomenclature Cosmetic Ingredient (INCI). O INCI estabelece o uso de normas uniformes, sistemáticas e nomes internacionais para identificar ingredientes cosméticos. Desta forma, os nomes INCI são atribuídos aos ingredientes com base na sua estrutura química e composição ((BUZEK; ASK, 2009; VECINO et al., 2017). Os ingredientes naturais devem ter as mesmas avaliações de segurança rigorosas que as exigidas para "compostos não naturais" na legislação cosmética. Hoje em dia, é evidente o nível significativo de interesse em produtos naturais pela indústria cosmética, principalmente devido à crescente preocupação dos consumidores com a sustentabilidade ambiental e a saúde. Portanto, a indústria de cosméticos está buscando produtos mais sustentáveis e saudáveis (HOLMBERG, 2001; VECINO et al., 2017).

## 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. et al. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

AHSAN, S.M. et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, v. 110, p. 97-109, 2018.

AL-HASANI, M.M. et al. Effectiveness of egyptian propolis on dental plaque formation in high caries risk children. **Alexandria Dental Journal**, v. 41, p. 194-198, 2016.

ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 273-286, 2018.

ALMEIDA, D.G. et al. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 1718, 2016.

ALSHEHRI, F.A. The use of mouthwash containing essential oils (LISTERINE®) to improve oral health: Statement of the Saudi Dental Society. **The Saudi Dental Journal**, 2017.

ARAÚJO, L.J.F.B.; MARTINS I.; DANTAS, E.D.V. A Política nacional da saúde bucal e suas reverberações na qualidade da saúde bucal: o caso do psf I centro de Natuba/PB. **Revista Científica da Escola da Saúde**. A. 5, v. 1, p. 61-72, 2016.

AZEVEDO, V.V.C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.23, p.27-34, 2007.

BALTZ, R.H.; MIAO, V.; WRIGLEY, S.K. Natural products to drugs, daptomycin and related lipopeptide antibiotics. **Natural Products Report**, v. 22, p.717–741, 2005.

BANAT, I.M.; DE RIENZO, M.A.D.; QUINN, G.A. Microbial biofilms: Biosurfactants as antibiofilm agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 9915–9929, 2014.

BANAT, I.M. et al. Production, applications and future potential of microbial biosurfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v.87, n.2, p. 427 – 444, 2010.

BENINCASA, M. et al. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Anton Van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1–8, 2004.

BONDI, C. A. et al. Human and environmental toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): evidence for safe use in household cleaning products. **Environmental Health insights**, v. 9, p. 27-32, 2015.

BRITO, G.F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, p. 127–139, 2011.

BURGHOFF, B. Foam fractionation applications. **Journal of Biotechnology**. v.161. p.126-137, 2012.

BURNE, R.A. Oral *Streptococci* products of their environment. **Journal of dental research**, v. 77, p. 445-452, 1998.

BUSSCHER, H.J.; VAN DER MEI, H.C. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. **Advances in dental research**, v. 11, n. 1, p. 24-32, 1997.

BUZEK, J.; ASK, B. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. **Official Journal of the European Union L**, v. 342, 2009.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195–2210, 2006.

CAMPOS, J. M. et al. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology progress**, v.29, n.5, p.1097-1108, 2013.

CANELLA, K.M.N.C.; GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel influência do método de preparação e do solvente. **Quimica Nova**, v. 24, p. 13-17, 2001.

CANEVAROLO JR., S.V. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2. ed. **São Paulo: Artliber Editora Ltda.**, 2006.

CARVALHO, M. M. S. G. et al. Chitosan as an oral antimicrobial agent. In: **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Microbiology Book Series, v. 1, n.3, p.142-150, 2011.

CERI, H.; TURNER, R.; MARTINOTTI, M.G. Biosurfactant composition produced by a new *Bacillus licheniformis* strain, uses and products thereof. **World Patent WO2010067345A1**, 2010.

CHAPRÃO, M.J. et al. Formulation and application of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* as collector in the flotation of oily water in industrial environment. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 15-22, 2018.

CHÁVEZ, E.M. et al. Dental Care for Geriatric and Special Needs Populations. **Dental clinics of North America**, v. 62, n. 2, p. 245-267, 2018.

CHEUNG, R.C.F. et al. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 8, p. 5156-5186, 2015.

CHUNG, Y. C. et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, p. 932-936, 2004.

COCHIS, A. et al. L. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 113, n. 6, p. 755-761, 2012.

COCHRANE, S.A. et al. Studies on tridecaptin B(1), a lipopeptide with activity against multidrug resistant Gram-negative bacteria. **Organic & biomolecular chemistry**, v.13, n.21, p. 6073-6081, 2015.

COSTA, E.M.et al. A review of chitosan's effect on oral biofilms: Perspectives from the tube to the mouth. **Journal of Oral Biosciences**, v. 59, n. 4, p. 205-210, 2017.

COSTA, E. M. et al. Evaluation and insights on the antimicrobial activity of chitosan against oral anaerobic pathogens. **Anaerobe**, v.18, n.3, p. 305-309, 2012.

COSTA, E. M. et al. Chitosan mouth wash: toxicity and *in vivo* validation. **Carbohydrate Polymers**. v.111 p. 385-392, 2014.

COSTA-SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, p. 776-785, 2006.

CRAVEIRO, Q. **Quitosana a fibra do futuro**. Fortaleza: Editora Universitária, p.108-109. 1998

CRINI, G. et al. Removal of metal from aqueous media by polymer-assisted ultrafiltration with chitosan. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10, p. S3826-S3839, 2017.

CURY, J.A. Dentifrícios: como escolher e como indicar. *In*: **Associação Paulista dos Cirurgiões-Dentistas**. Odontologia. São Paulo: Artes Médicas – Divisão Odontológica; 2002.

CURY, L. A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Research**, v. 34, p. 491-497, 2000.

DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **Journal-Canadian Dental Association**, v. 69, p. 722-725, 2003.

DECKER, E.M. et al. A synergistic chlorohexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. **Journal of Periodontal Research**. v.40, p.373-377, 2005.

DÍAZ DE RIENZO, M. A. D. et al. Sophorolipid biosurfactants: possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. **New biotechnology**, v.32, n.6, p.720-726, 2015.

DÍAZ DE RIENZO, M. A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm disruption using microbial surfactants. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n.4, p.868-876, 2016a.

DÍAZ DE RIENZO, M. A. et al. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and-negative bacteria. **FEMS microbiology letters**, v.363, n.2, fnv224, 2016b.

DÍAZ DE RIENZO, M. A. et al. Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5773-5779, 2016c.

DOSHI, B.; SILLANPÄÄ, M.; KALLIOLA, S. A review of bio-based materials for oil spill treatment. **Water research**, v. 135, p. 262-277, 2018.

DUSANE, D.H. et al. Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant. **Aquatic biosystems**, v. 8, n. 1, p. 17, 2012.

EIGEN, E.; SIMONE, A. J. **Control of dental plaque and caries using emulsan**. U.S. Patent n. 4,737,359, 12 abr. 1988.

ELSHIKH, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: promising bioactive molecules for oral-related health applications. **FEMS microbiology letters**, v.363, n.8, fnw213, 2016.

FELIX, A.K.N. et al. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 256-263, 2019.

FENG, Y.; XIA, W. Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble O-fumaryl-chitosan **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1169-1173, 2011.

FRACCHIA, L. et al. Industrial applications of biosurfactants, In: KOSARIC, N.; SUKAN F.V. (Eds), **Biosurfactant—Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics**, Boca Raton: CRS Press—Taylor & Francis Group, pp. 245–267, 2014.

FRAUNHOFER J. A. V.; ROGERS, M. M. Dissolution of dental enamel in soft drinks. **General Dentistry**, v. 52, p. 308-312, 2004.

GEORGE, J.; REBOLI, A.C. Anidulafungin, When and how? The clinician's view. **Mycoses**, v. 55, p.36–44, 2012.

GEETHA, S. J.; BANAT, Ibrahim M.; JOSHI, Sanket J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2018.

GUDIÑA, E.J. et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p. 419 – 424, 2010.

HAMED, H. et al. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. **Carbohydrate polymers**, 2018.

HAMMAN, J. H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1305-1322, 2010.

HOLMBERG, K. *Natural surfactants*. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.6, n.2, p.148–159, 2001.

JANEK, T.; ŁUKASZEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 24, 2012.

JAYAKUMAR, R. et al. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 55, n. 7, p. 675-709. 2010.

JHAJHARIA, K. et al. Biofilm in endodontics: a review. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.



JIN, L.J. et al. Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. **Oral diseases**, v. 22, n. 7, p. 609-619, 2016.

JOSHI-NAVARE, K.; PRABHUNE, A. A Biosurfactant-Sophorolipid Acts in Synergy with Antibiotics to Enhance Their Efficiency. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 8, 2013.

KIM, H.S. et al. Surface and physic-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1637–1641, 2002.

KIRAN, G.S.; SABARATHNAM, B.; SELVIN, J. Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*. **FEMS Immunology and Medicinal Microbiology**, v. 59, p. 432–438, 2010.

KITAMOTO, D. et al. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Journal of Biotechnology**, v. 29, p. 91–96, 1993.

KONG, M. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51–63, 2010.

KUMAR, N.; KAUR, P.; BHATIA, S. Advances in bio-nanocomposite materials for food packaging: a review. **Nutrition & Food Science**, v. 47, n. 4, 2017.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers of crustaceans. **Marine Biotechnology**, v.8, n.3, p. 203 – 226, 2006.

LANDMAN, D. et al. Polymyxins revisited. **Clinical and Microbiology Reviews**, v. 21, p. 449–465, 2008.

LARANJEIRA, M. C. M.; DE FÁVERE, V. T. Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. **Química Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.

LEE, Da-Sol; SONG, Hong-Gyu. Antimicrobial activity by *Paenibacillus elgii* DS381 and its antimicrobial substances against microbial residents on human skin and pathogenic bacteria. **The Microbiological Society of Korea**, v. 54, n. 3, p. 244-253, 2018.

LI, B.; MU, X. Recent Progress in the Utilization of Chitin/Chitosan for Chemicals and Materials. **Fuels, Chemicals and Materials from the Oceans and Aquatic Sources**, p. 151-187, 2017.

LIMA, T.J. et al. Low-fluoride dentifrice and caries lesions control in children with different caries experience: a randomized clinical trial. **Caries Research**, v. 42, p. 46-50, 2008.

LUNA, J.M. et al. Properties of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 67–72, 2012.

MAIA, R.C.C. et al. Chitin produced by *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) and applied to wound healing. **Asian Chitin Journal**, v. 2, p. 11-20, 2006.

MALTZ, M. Prevenção das doenças cárie e periodontal. In: TOLEDO, A.O. Odontopediatria: **Fundamentos para a prática clínica**. 2.ed, São Paulo: Panamericana, 1996.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, v.34, p.1597-1605, 2012.

MARCHANT, R.; BANAT, I. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 558-565, 2012.

MARTINS, R.S. et al. Composição, princípios ativos e indicações clínicas dos dentifrícios: uma revisão da literatura entre 1989 e 2011. **Journal of Health and Science Institute**, v. 30, p. 287-91, 2012.

MASARU, K.; MICHIKO, S.; SHUHEI, Y. Skin care cosmetic and skin and agent for preventing skin roughness containing biosurfactants (World Patent 2007/060956). **Toyo Boseki Kabu Shiki Kaisha and National Industrial Science and Technology**, Osaka, Japan, 2007.

MATHEW, S.T. Alcohol-containing mouthwash and oral cancer risk: A systematic review. **International Journal of Dental and Medical Speciality**, v. 2, n. 3, p. 21, 2015.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Microbial derived surface active compounds: Properties and screening concept. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1001–1020, 2015.

MOTA, M.V.A. et al. Estudo comparativo *in vivo* da eficácia de dois enxaguatórios bucais sobre a formação da placa bacteriana supragengival – plano pitolo. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 16, p. 247-54, 2004.

MURRAY, C.J.L et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2197-2223, 2012.

NASEERUTEEN, F. et al. Adsorption of malachite green from aqueous solution by using novel chitosan ionic liquid beads. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1270-1277, 2018.

NGAI, A.L. et al. Overview of safety experience with caspofungin in clinical trials conducted over the first 15 years, A brief report. **International Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 540–544, 2011.

PACWA-PLOCINICZACK, M. et al. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.633-654, 2011.

PADMAPRIYA, B.; SUGANTHI, S. Antimicrobial and anti adhesive activity of purified biosurfactants produced by *Candida* species. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 14, p. 1359–1369, 2013.

PATEL, R.; GALLAGHER, J.; CHAPPLE, I. Question from practice: How to select the right mouthwash. **Lung cancer**, v. 15, p. 05, 2018.

PAUL, E. D.; GARBA, Z. N.; JAMES, D. O. Chitosan: A Natural Polymer for Health. **ATBU Journal of Science, Technology and Education**, v. 6, n. 4, p. 183-193, 2018.

PEDRO, A.S.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Chitosan: an option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 501-508, 2009.

PERFUMO, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R. Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications. **Trends in biotechnology**, 2018.

PERINELLI, D.R. et al. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018.

PITT, F.D.; BOING, D.; BARROS, A.A.C. Desenvolvimento histórico, científico e tecnológico de polímeros sintéticos e de fontes renováveis. **Revista da UNIFEBE**, v.1, n. 09, 2011.

PRADHAN, A. K. et al. Application of lipopeptide biosurfactant isolated from a halophile: *Bacillus tequilensis* CH for inhibition of biofilm. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 6, p. 1362-1375, 2013.

PRADHAN, A.K.; PRADHAN, N.; SUKLA, L.B. Inhibition of pathogenic bacterial biofilm by biosurfactant produced by *Lysinibacillus fusiformis* S9. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 139–149, 2014.

QUINN, G.A. et al. A comparison of effects of broad-spectrum antibiotics and biosurfactants on established bacterial biofilms. **Current Microbiology**, v. 67, p. 614–623, 2013.

QUINN, G.A. et al. Lipopeptide biosurfactants from *Paenibacillus polymyxa* inhibit single and mixed species biofilms. **Biofouling**, v. 28, p.151–1166, 2012.

RAAFAT, D. et al. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p. 3764-3373, 2008.

RÍOS, José-Luis. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. p. 3-10, 2016.

RIVARDO, F. et al. Synergistic effect of lipopeptide bio surfactant with antibiotics against *Escherichia coli* CFT073 biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 324–331, 2011.

ROBBEL, L.; MARAHIEL, M.A. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 27501–27508, 2010.

RODRIGUES, C.R.M.D.; FERNANDES, F.R.C.; GUEDES-PINTO, A.C. Carie dentária. In: GUEDES-PINTO, A.C. **Odontopediatria**. São Paulo, Santos, 2003.

RODRIGUES, L. et al. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.46, p.107–112, 2006.

RODRIGUES, L. R. et al. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.49, n.1, p.79-86, 2006.

RODRIGUES, L.R. Microbial surfactants: fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. **Journal of colloid and interface science**, v. 449, p. 304-316, 2015.

ROKAYA, D. et al. Polymeric Materials and Films in Dentistry: An overview. **Journal of Advanced Research**, 2018.

ROSATO, Antonio et al. Elucidation of the synergistic action of *Mentha Piperita* essential oil with common antimicrobials. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0200902, 2018.

ROSTAMI, N. et al. A critical role for extracellular DNA in dental plaque formation. **Journal of dental research**, v. 96, n. 2, p. 208-216, 2017.

RUFINO, R.D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p.1–5, 2011.

SABHARWAL, A.; SCANNAPIECO, F.A. Baking soda dentifrice and periodontal health: a review of the literature. **The Journal of the American Dental Association**, v. 148, n. 11, p. S15-S19, 2017.

SAINI, H.S. et al. Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. **Journal of Natural Products**, v.71, p.1011–1015, 2008.

SALEHI, R.; SAVABI, O.; KAZEMI, M. Effects of Lactobacillus reuteriderived biosurfactant on the gene expression profile of essential adhesion genes (gtfB, gtfC and ftf) of Streptococcus mutans. **Advanced biomedical research**, v. 3, p. 169 – 176, 2014.

SAMADI, N. et al. Structural characterization and surface activities of biogenic rhamnolipid surfactants from *Pseudomonas aeruginosa* isolate MN1 and synergistic effects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiology**, v. 57, p. 501–508, 2012.

SMETS, Greet; RÜDELSHEIM, Patrick. Biotechnologically produced chitosan for nanoscale products. A legal analysis. **New biotechnology**, v. 42, p. 42-47, 2018.

SANO, H. et al. Effect of molecular mass and degree of deacetylation of chitosan on adsorption of *Streptococcus sobrinus* 6715 to saliva treated hydroxyapatite. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 43, p. 75-82, 2002.

SANO H. et al. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 44, p. 9-16, 2003.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n.3, p.401, 2016.

SATPUTE, S. K. et al. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Review in Biotechnology**, v.30, n.2, p.127–144, 2010.

SATPUTE, S.K. et al. Multiple roles of biosurfactants in biofilms. **Current pharmaceutical design**, v. 22, n. 11, p. 1429-1448, 2016a.

SATPUTE, S. et al. Lactobacillus acidophilus Derived Biosurfactant as a Biofilm Inhibitor: A Promising Investigation Using Microfluidic Approach. **Applied Sciences**, v. 8, n. 9, p. 1555, 2018.

SAVABI, O. et al. Effects of biosurfactant produced by Lactobacillus casei on gtfB, gtfC, and ftf gene expression level in S. mutans by real-time RT-PCR. **Advanced biomedical research**, v. 3, 2014.

SBORDONE, L.; BORTOLAIA, C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. **Clinical oral investigations**, v. 7, n. 4, p. 181-188, 2003.

SHIBASAKI, M.; KUMAGAI, N. Chiral Bimetallic Lewis Acids. **Chiral Lewis Acids**, p. 27-50, 2018.

SIGNINI, R. **Estudo das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana**. Tese (Doutorado em Físico-Química). Instituto de Química de São Carlos- USP- São Paulo 2002.

SILVA, M.C.F. et al. Effect of phenanthrene on germination, radial growth and chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* Lendner. p. 219-222. In: **Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**: proceedings of the II International Conference on Environmental, Industrial and applied microbiology (BioMicroWorld 2007). Editor Antonio Mendez-Vilas. World Scientific, 2009.

SILVA, R.R. et al. Química e conservação dos dentes. **Química Nova na Escola**, 13, 2001.

SILVA, S.N.R.L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v.79, p.174 - 183, 2010.

SILVA, R.C.F.S. et al. A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 12523-12542, 2014.

SIMÓN-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 2, p. 76-82, 2015.

SINGH, N. et al. *Candida* biofilm disrupting ability of di-rhamnolipid (RL-2) produced from *Pseudomonas aeruginosa* DSVP20. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.169, p.2374–2391, 2013.

SINGH, Rajinder; SHUSHNI, Muftah AM; BELKHEIR, Asma. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 322-328, 2015.

SISSONS, C.H. et al. Factors affecting the resting pH of in vitro human microcosm dental plaque and *Streptococcus mutans* biofilms. **Archives of oral biology**, v. 43, p. 93-102, 1998.

SHUKLA, S.K. et al. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.59, p. 46-58, 2013.

SILVA, S.N.R.L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v.79, p.174 - 183, 2010.

SILVA, E. J. et al. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 36–41, 2014.

SOET, J.J.; NYVAD, B; KILIAN, M. Strain-related acid-production by oral streptococci. **Caries research**, v. 34, p. 486-490, 2000.

SONG, B. et al. Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p.7141–7150, 2013.

SRIRAM, M.I. et al. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p.174–181, 2011.

STAMFORD, T.C.M. et al. Risco de cárie e grau de conhecimento da saúde oral em gestantes do Instituto Materno Infantil de Pernambuco –IMIP. **Revista IMIP**, v. 14, p. 73-8, 2000.



STAMFORD, T.C.M. et al. Parâmetros bioquímicos e microbiológico e sua relação com a experiência de cárie em adolescentes sádios. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 5, p. 71-76, 2005.

STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; BARROS-NETO, B.D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.D. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 61-68, 2007.

STAMFORD-ARNAUD, T.M.; BARROS-NETO, B.; DINIZ, F. B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. **Journal of dentistry**, v. 38, p. 848-852, 2010.

STEINMAN, D.; EPSTEIN, S. S. **The Safe Shoppers Bible: Guide to Nontoxic Household Products, Cosmetics, and Food**. John Wiley and Sons, 1995.

TAHMOURESPOUR, A. et al. The antibiofouling effect of *Lactobacillus fermentum*-derived biosurfactant against *Streptococcus mutans*. **Biofouling**, v. 27, n. 4, p. 385-392, 2011.

TAKEI, T. Synthesis of a chitosan derivative soluble at neutral pH and gellable by freeze-thawing, and its application in wound care. **Acta Biomater**. v.8, n.2, p.686-93, 2012.

TALLY, F. P. et al. Daptomycin: a novel agent for gram-positive infections. **Expert Opinion in Investigative Drugs**, v. 8, p.1223-1238, 1999.

TAO, D. et al. In vitro and clinical evaluation of optical tooth whitening toothpastes. **Journal of dentistry**, v. 67, p. S25-S28, 2017.

TARSI, R.; PRUZZO; C.; GUZMAN, P. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosan **Journal of Dental Research**, v. 76, p. 665-672, 1997.

TARSI, R.; CORBIN, B.; PRUZZO, C. Effect of low-molecular-weight chitosans on the adhesive properties of oral streptococci. **Oral microbiology and immunology**, v. 13, n. 4, p. 217-224, 1998.

TAVARIA, F. K. et al. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. **Revista Brasileira Engenharia Biomédica**, v. 29, n. 1, p. 110-120, 2013.

TAZDAÏT, D. et al. Preliminary evaluation of a new low-cost substrate (amurca) in production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fuel-contaminated soil. 2018.

TEIXEIRA, K. I. R.; BUENO, A. C.; CORTÉS, M. E. Processos Físico-Químicos, no biofilme dentário, relacionados à produção de cárie. **Química Nova na Escola**, v.3, 2010.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 3.ed; São Paulo: Ed. Santos, 2001.

TREVISAN, M. C. **Saúde bucal como temática para um ensino de química contextualizado**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

TSAI, T. et al. Chitosan augments photodynamic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p. 1883-1890, 2011.

UENO, M. et al. Practical Chemistry of Long-Lasting Bubbles. **World Journal of Chemical Education**, v.4, n. 2, p. 32-44, 2016.

UZEDA, M. **Microbiologia Oral**. MEDSI, Rio de Janeiro, p.104, 2003.

VARMA, A.J.; DESHPANDE, S.V.; KENNEDY, J.F. Chitosan metal complexes and their derivatives: a review. **Carbohydrate polymers**, v.55, n.1, p. 77 – 93, 2004.

VARUN, T. K. et al. Extraction of chitosan and its oligomers from shrimp shell waste, their characterization and antimicrobial effect. **Veterinary World**, v.10, n. 2, p. 170, 2017.

VATER, J. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6210–6219, 2002.

VECINO, X. et al. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, p.1-16, 2017.

VENKATESAN, J; KIM, S.K. Chitosan compounds for bone tissue engineering - An overview. **Marine Drugs**, v.8, n.8, p.2252-2266, 2010.

VERKAIK, H.J. et al. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. **Journal of Dentistry**, v.39, p. 218-224, 2011.

VESHAREH, M.J. et al. Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactant characterization, production optimization and wetting effect on carbonate surfaces. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, p. 1-13, 2018.

VIEIRA, M. G. A. et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254-263, 2011.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Research Journal of Microbiology**, v.10, p.181–192, 2015.

WILSON, Gavin; CONWAY, David I. Mouthwash use and associated head and neck cancer risk. **Evidence-based dentistry**, v. 17, n. 1, p. 8, 2016.

WHO. World and Health Organization, Geneva, 1997.

XIA, W. et al. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p.170–179, 2011.

YADAV, A.V.; BHISE, B. Chitosan: a potencial biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, v. 87, p. 1176-1178, 2004.

YAN, X. et al. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. **Microbial pathogenesis**, v. 127, p. 12-20, 2019.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.

ZAKARIA, G. E. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 59, p. 425—36, 2013.

ZANATTA, E.A.; da MOTTA, M. DA G. Mothers' knowledge and practices in 0 to 6-month-old infant care. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 28, p. 556-63, 2007.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204–226, 2015.

ZAURA, E.; CATEM J.M. Dental plaque as a biofilm: a pilot study of the effects of nutrients on plaque pH and dentin demineralization. **Caries Research**, v. 38, p. 9-15, 2004.

ZERAIK, A.E.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces, effect of temperature and hydrophobicity. **Current Microbiology** v.61, v. 554–559, 2010.

# **CAPÍTULO II**

## **Artigo aceito para publicação na Revista International Journal of Biological Macromolecules**

**Mouthwash containing a biosurfactant and natural products: An eco-sustainable option  
for the control of cariogenic microorganisms**

**Juliana M. Farias<sup>a</sup>, Thayza Christina M. Stamford<sup>b</sup>, Ana Helena M. Resende<sup>a,c</sup>, Jaciana S.  
Aguiar<sup>d</sup>, Raquel D. Rufino<sup>a,c</sup>, Juliana M. Luna<sup>a,c</sup>, Leonie A. Sarubbo<sup>a,c\*</sup>**

<sup>a</sup> *Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900,  
Recife, Pernambuco, Brazil*

<sup>b</sup> *Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de  
Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, n. 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife,  
Pernambuco, Brazil*

<sup>c</sup> *Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Rua Joaquim de Brito, n.216, Boa Vista,  
CEP: 50070-280, Recife, Pernambuco, Brazil*

<sup>d</sup> *Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de  
Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, n. 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife,  
Pernambuco, Brazil*

\* *Corresponding author. Tel.: +55 81 21194084; fax: +55 81 21194000.*

**E-mail address:** *leonie.sarubbo@unicap.br (L. Sarubbo)*

## **Abstract**

The aim of the present study was to determine the antimicrobial action and toxicity of mouthwashes formulated with a biosurfactant, chitosan of a microbial origin and peppermint (*Mentha piperita*) essential oil (POE). Chitosan was extracted from the biomass of a fungus from the order Mucorales grown in yam bean broth. Three biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (PB), *Bacillus cereus* UCP 1615 (BB) and *Candida bombicola* URM 3718 (CB) were tested. Six mouthwashes were prepared, the active ingredients of which were the biosurfactant, chitosan and POE. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for the test substances separately, in combinations and in the mouthwash formulas. The toxicity of the mouthwashes was tested using MTT for the L929 (mouse fibroblast) and RAW 264.7 (mouse macrophage) cell lines. All substances tested had a MIC for cariogenic microorganisms. The combinations of the CB and PB biosurfactants with chitosan demonstrated an additive effect on the majority of microorganisms tested. The toxicity of the mouthwashes was significantly lower than that of the commercial mouthwash. The present findings demonstrate that mouthwashes containing a biosurfactant in combination with other natural products constitute a safe, effective, natural alternative to commercially available mouthwashes for the control of oral microorganisms.

Keywords: Biosurfactant, chitosan, *Mentha piperita* essential oil, cosmetic, antimicrobial activity.

## **1. Introduction**

The industry of formulated products, such as cosmetics, has attempted to develop bio-sustainable technologies to meet the need for products and processes that have fewer harmful impacts on human health and the environment. Therefore, aspects and principles of green chemistry have been incorporated on the industrial level [1]. The cosmetics industry has particular interest in research involving more bio-sustainable natural products, since many

cosmetics are made for daily use and a large portion end up in sewage systems or discarded directly into the environment. The formulation industry uses hundreds of chemical products and each ingredient is selected to offer a specific benefit or function. As soon as more data on health and environmental safety become available, some ingredients need to be substituted for not fitting the desired environmental, health or safety profile. Such substitutions should maintain the effectiveness of the product in a similar or better manner compared to the original ingredients while also having a competitive price [2,3].

Consumers are currently more focused on health and beauty and have a renewed interest in natural cosmetic products. This has created a demand for novel products with enhanced functional ingredients and a better marketing image of the end product. Essential oils play an important role as bioactive ingredients with antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and other properties and are used in a variety of cosmetics, phytotherapeutic products and pharmaceuticals [3,4,5].

Surfactants are widely used in industry due to their wide range of applications in the field of personal care products, such as detergents, lubricants, dyes, pomades and drug-delivery systems. In these applications, surfactants play a role in the reduction of static, cleaning, emulsification, solubilisation, the formation of foam and hair conditioning, which explains the wide use of this product in the industrial sector and its broad distribution in the environment. However, studies have been developed for the obtainment of more sustainable surfactants (not derived from petroleum) with minimal impact on the environment. Surfactants produced from renewable resources can be obtained from plants, animal fat and microorganisms. Biosurfactants have high surface activity and a low critical micelle concentration and are therefore promising replacements for synthetic surfactants. However, the high cost of production is the major drawback of the natural biomolecules. To diminish the production cost of biosurfactants of a microbial origin, studies have been conducted using alternative culture media containing industrial waste products [6-13].



Studies on the interaction between polymers and tensioactive agents, such as polyelectrolytes and tensioactive agents with opposite charges, have demonstrated a range of uses in different applications, such as paper, food, cosmetics, water-based formulations (paints, mud logging activities, oil recovery) and biomedical applications (drug delivery and release systems, DNA isolation and purification) as well as to promote stability and regulate the rheology of composites. These polymer-surfactant systems have complex physicochemical properties that can affect a large number of properties, such as fluid rheology, wetting, emulsification and wettability. Among the different types of systems of this type, polyelectrolytes are of particular interest due to their important role in polymer charges. The interest in natural polymers, such as polysaccharides, is related to their origin and chemistry as well as the possibility of use in industrial applications that are restricted by environmental legislation. Unlike petroleum-based polymers, polysaccharides are renewable and generally both biocompatible and biodegradable. Moreover, due to the presence of functional groups, polysaccharides may have functionalities and properties to be explored in specific applications [14-16].

Chitosan is a natural copolymer composed of units of 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose and 2-acetamide-2-deoxy-D-glucopyranose interlinked by  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds in different proportions. In nature, chitosan is found in the cell wall of fungi and is commercially obtained through the chemical or enzymatic deacetylation of chitin extracted from crustaceans. This polysaccharide exhibits excellent biocompatibility, low toxicity to humans, animals and the environment, high bioactivity, biodegradability, reactivity of the deacetylated amino group, selective permeability, polyelectrolytic action, broad-spectrum antimicrobial activity, the ability to form gels and films, chelation ability and adsorptive capacity. Such characteristics enable the application of chitosan in different fields [17-19].

Considering the aforementioned aspects, the aim of the present study was to formulate mouthwashes that meet the principles of green chemistry, evaluate the antimicrobial potential of these products for the control of cariogenic oral microorganisms and determine the toxicity of

mouthwash formulations containing different biosurfactants, the essential oil from *Mentha piperita* and fungal chitosan.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Production, extraction and characterisation of chitosan

The cultivation of the fungus from the order Mucorales for the production of biomass and the extraction of chitosan were based on the methods described by Stamford et al. [20]. Chitosan was extracted from the cell wall of *Mucor javanicus* (UCP 69) deposited at the Culture Bank of the Centre for Research in Environmental Sciences of the Catholic University of Pernambuco. Briefly, the fungus was grown in an alternative medium [yam bean (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) broth] for 48 h at 28 °C. The biomass was filtered, rinsed in distilled water and lyophilised. The extraction process involved de-proteinisation by sodium hydroxide 2% (p/v) for 2 h at 90 °C, followed by centrifugation, acid hydrolysis with 10% acetic acid (v/v) for 6 h at 60 °C and precipitation of the polymer at pH 9 by the addition of NaOH 4 M.

Chitosan was characterised following the method described by Signini et al. [21]. Briefly, the structural characterisation of the polysaccharide was performed by vibrational spectroscopy in the infrared region in a Fourier transform spectrophotometer (Bruker model IF66) between 4000  $\text{cm}^{-1}$  and 400  $\text{cm}^{-1}$ . The spectrum of the polymer was obtained using a KBr pellet support. The degree of deacetylation of chitosan was determined by nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR) using the Varian Unity Plus equipment operating at 300 MHz. Chitosan was initially solubilised in a 1% HCl/D<sub>2</sub>O solution (v/v) and an aliquot of the solution was analysed at 50°C, with a relaxation time of 6 seconds and pulse of 90°.

## 2.2 Obtainment of essential oil from *Mentha piperita*

Peppermint (*Mentha piperita*) essential oil was acquired from FERQUIMA *Indústria e Comercio Ltda.* (São Paulo, Brazil), Lot 197. The technical specifications report that the oil was extracted by vapour distillation of the leaves (origin: India), has a density of 0.890 to 0.910 at 20 °C, a refraction index of 1.450 to 1.470 at 20 °C, optic rotation of -30° to -10° and the main components are menthol (35%), menthone (26%), 1,8-cineole (6%), isomenthon (5%), menthyl acetate (5%) and neomenthol (4%).

## 2.3 Production and isolation of biosurfactants

Biosurfactant production was performed with the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 and *Bacillus cereus* UCP1615 deposited at the Culture Bank of the Centre for Research in Environmental Sciences of the Catholic University of Pernambuco and the yeast *Candida bombicola* URM3718 deposited at the Culture Bank of the Micology Department of the Federal University of Pernambuco.

Colonies of bacteria previously grown in nutrient agar for 24 hours at 28 °C were transferred to an Erlenmeyer flask containing 50 mL of nutritive broth, which was kept under orbital agitation at 150 rpm for 12 hours at 28 °C, obtaining an optical density of 0.7 (corresponding to an inoculum of  $10^7$  colony-forming units/mL) at 600 nm. This reading was used with the inoculum at a concentration of 5% (v/v) for *Bacillus cereus* and 3% (v/v) for *Pseudomonas aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* was grown in a distilled water medium containing 4% dregs from a vegetable oil refinery and 0.5% corn steep liquor (pH 7.0) under agitation at 220 rpm for 120 hours at 28°C [12]. *Bacillus cereus* was grown in mineral medium composed of 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.02%  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and 0.005%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , with the addition of 2% waste soybean frying oil and 0.12%  $\text{KNO}_3$  as the carbon and nitrogen

sources, respectively (pH 7.0). The flasks were kept under orbital agitation at 200 rpm for 72 hours at 28 °C [13].

The yeast kept in yeast mould agar was transferred to flasks containing 50 mL of yeast mould broth and incubated under agitation at 180 rpm for 24 hours at 28 °C. Dilutions were then performed until obtaining a final concentration of  $10^6$  cells/mL, which were used at a concentration of 5% (v/v). The fermentations for the production of the biosurfactant by *Candida bombicola* were performed under orbital agitation at 180 rpm for 120 hours at 28 °C in a medium formulated with distilled water containing 5% sugarcane molasses, 5% waste frying oil and 3% corn steep liquor with the pH adjusted to 6.0 [7].

The biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* were isolated following the method described by Silva et al. [12] and the biosurfactant from *Candida bombicola* was isolated following the method described by Silva et al. [13].

Surface tension of the biosurfactants was measured in the cell-free broth using a KSV Sigma 700 (Finland) tensiometer with a Du Noüy ring.

#### *2.4 Formulation of mouthwash*

For the preparation of the mouthwash, chitosan was diluted in 1% acetic acid and prepared at a concentration of 20 mg/ml. The solid components (sodium benzoate and sodium saccharine) were blended and macerated until obtaining a fine powder. The biosurfactant, peppermint essential oil and chitosan solution were then added, followed by distilled water to complete 100 mL. The pH of the formulation was adjusted to 7.0 with NaOH 1N. Table 1 lists the components used in the formulation of the mouthwash as well as the respective functions and quantities.

**Table 1**

## 2.5. Determination of antimicrobial activity

### 2.5.1. Test substances and standardisation of microorganisms

To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), the microdilution test was performed in a flat-bottom 96-well microplate. The following were the test substances and respective initial concentrations: fungal chitosan diluted in 1% acetic acid and prepared at an initial concentration of 1000 µg/ml with the pH adjusted to 5.8 with NaOH 1N; biosurfactants diluted in sterile distilled water at a concentration of 100 µg/mL; peppermint essential oil diluted in sterile distilled water and Tween 80 at a concentration of 100 µg/mL; and the mouthwash formulations. A commercial mouthwash was used for the purposes of comparison. The commercial mouthwash had no alcohol or fluoride and contained eucalyptol, thymol, menthol and *Camellia sinensis* leaf extract as the bioactive agents.

The test microorganisms were *Streptococcus mutans* (UA159), which was obtained from the Microbiology Laboratory of UNICAMP, *Streptococcus sanguis* (ATCC 15300), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Lactobacillus casei* (ATCC 9595) and *Candida Albicans* (ATCC 1106), which were obtained from FIOCRUZ, Rio de Janeiro. The bacteria were inoculated in 5 ml of brain heart infusion broth and *C. albicans* was inoculated in Sabouraud broth for 18 hours. The inoculum was then standardised by spectrophotometry for the obtainment of the pre-inoculum. Readings were performed at 530 nm in the range from 0.140 to 0.150, which corresponds to a suspension of approximately  $1.5 \times 10^8$  colony-forming units/ml.

### 2.5.2. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The microplates were prepared such that each compartment had a final volume of 100 µL, with varied proportions of the culture medium and test substance to obtain different concentrations of the test products (0 to 600 µg/mL for chitosan and 0 to 60 µg/mL for the other test substances). A total of 100 µL of the medium were added for the control of sterility and 80

$\mu\text{L}$  of the medium were added for the control of microbial viability. All wells, except the sterility control well, then received 20  $\mu\text{L}$  of the microbial inoculum. The assay was conducted in triplicate.

After the preparation of the wells containing the culture medium, test substance and microbial inoculum, the microorganisms were incubated at 37 °C for 24 hours for the cultivation of the bacteria and at 28 °C for 48 hours for the cultivation of the yeast. After the incubation period, 30  $\mu\text{L}$  of resazurin were added to the wells to determine the cell viability of the microorganisms. The blue-violet colour indicated the absence of microbial growth, whereas pink-red variations indicated the presence of viable cells. The colour reading was performed one hour after the addition of resazurin.

### 2.5.3. Analysis of fraction inhibitory concentration

The analysis of the combination of chitosan or peppermint essential oil and the biosurfactants was performed based on the fraction inhibitory concentration (FIC) for the determination of synergistic, antagonistic or indifferent action in the combination of the compounds. The FIC is evaluated considering the values obtained for the MIC and was obtained by the following equation (Eq. 1).

(Eq. 1)      FIC (I): MIC A in combination/MIC A in isolated compound

                 FIC (II): MIC B in combination/MIC B in isolated compound

The  $\text{FIC}_{\text{final}} = \text{FIC (I)} + \text{FIC (II)}$ .  $\text{FIC} < 0.5$  denotes a synergistic effect,  $\text{FIC} = 0.5$  to  $1.0$  denotes an indifferent effect and  $\text{FIC} > 4.0$  denotes an antagonistic effect.

### 2.6 Evaluation of toxicity of formulated mouthwashes

Cytotoxic activity was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [22,23]. The L929 (mouse fibroblast) and RAW 264.7 (mouse macrophage) cell lines were acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de

Janeiro, Brazil). The cells were kept in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% foetal bovine serum and a 1% antibiotic solution (penicillin and streptomycin). The cells were kept in a chamber at 37 °C in a humid atmosphere enriched with 5% CO<sub>2</sub>. The L929 and RAW 264.7 cells (10<sup>5</sup> cells/mL) were then transferred to 96-well plates and incubated for 24 h. Next, 10 µL of the test solutions were added to the well at a final concentration of 1.25 mg/L. The commercial mouthwash (10 µL directly in the plate) was used as the positive control. After 72 h of re-incubation, 25 µL of MTT (5 mg/mL) was added, followed by 3 h of incubation. The culture medium with MTT was then aspirated and 100 µL of DMSO were added to each well. Absorbance was measured in a microplate reader at a wavelength of 560 nm.

The intensity scale was used to evaluate the cytotoxic potential of the samples. Strong toxicity was defined as 90 to 100% cell inhibition, moderate toxicity was defined as 51 to 89.99% cell inhibition and non-toxicity was defined as less than 50% growth inhibition [24].

The experiments were conducted in quadruplicate and the percentage of inhibition was calculated using *GraphPad Prism 7.0 demo*.

## 2.7. Statistical analyses

Mean and standard deviation (SD) values were calculated. All experiments were conducted in quadruplicate and differences were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA), with the level of significant set at 5% ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Production, extraction and characterisation of chitosan

The production of biomass by *Mucor javanicus* (UCP 69) grown in yam bean broth for 48 h at 28 °C and the production of chitson led to yields of 26.43 ( $\pm 2.13$ ) g/L and 60.6 mg/g, respectively. These results are in agreement with data described by Fai et al. [17] and Stamford

et al. [20], who obtained biomass yields of 20.7 g/L and 24.3 g/L and chitsan yields of 64 mg/g and 66 mg/g, respectively, using *Mucor circinelloides* and *Cunninghamella elegans* grown in yam bean broth.

The compositions and chemical groups of a sample can be determined by the presence of bands related to specific vibrations that are characteristic of different functional groups using vibrational spectroscopy in the infrared region. Fig. 1 displays the infrared spectrum of chitosan extracted from the *M. javanicus* biomass. Among the trials of characteristic attributions found in chitosan, amide bands are found at 1665, 1555 and 1313  $\text{cm}^{-1}$ , which exhibited perpendicular dichroism attributed to the coupling interaction, respectively with C=O, the deformation of N–H on the CONH plane and the CN bond with the displacement of  $\text{CH}_2$ . C-O stretching referring to the primary alcohol group ( $-\text{CH}_2 - \text{OH}$ ) is seen at 1386  $\text{cm}^{-1}$ . The peak at 1513  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to the axial deformation of C-N of the amide. A polymer chain generally has two amide-type adsorption bands that correspond to the symmetrical and asymmetrical deformation of amide I and II seen respectively at 1599 and 1660.02  $\text{cm}^{-1}$ . A broad band is also seen centred between 3483 and 3305  $\text{cm}^{-1}$  in the region of the axial deformation of OH, which appears overlapping the band of the axial deformation of NH, indicating the formation of an intermolecular hydrogen bond, and the displacement of the band to a higher frequency, indicating an increase in the structural order. These results are in agreement with reports in the literature on chitosan of a fungal origin [17-19].

### **Figure 1**

$^1\text{H}$  NMR was performed to determine the degree of deacetylation of chitosan (Fig. 2), which was calculated using the equation proposed by Signini et al. [21]. This equation (Eq.2) uses the area of the peak in the 2 ppm region attributed to hydrogen nuclei of the acetamide group ( $\text{H}^{\text{ac}}$ ) (8,19) and the area of the peak at 3.4 ppm referring to the hydrogen nucleus in position 2 of the glucopyranoside ring ( $\text{H}^2$ ) (13, 60). The degree of deacetylation for the chitosan



used in the present study was determined by substituting the  $H^{ac}$  and  $H^2$  values in the following equation:

$$DD\% = \left( 1 - \left( \frac{H^{ac}}{3H^2} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

The degree of deacetylation is an important parameter with regard to the physicochemical properties of chitosan, since it is directly related to the cationic nature of the polymer [17,19]. The chitosan obtained in the present study had a fungal biomass with an 80% degree of deacetylation.

### **Figure 2**

#### *3.2 Production of biosurfactants and determination of surface tension*

Three surfactants previously produced in our laboratory by microorganisms known to be good biosurfactant producers (*C. bombicola*, *B. cereus* and *P. aeruginosa*) were tested in the mouthwash formulations to evaluate the performance of each biomolecule as a foaming, tensioactive and antimicrobial agent. The biosurfactants were produced by the microorganisms in low-cost media using dregs from a vegetable oil refinery, corn steep liquor and waste soybean frying oil. The biosurfactants obtained from *C. bombicola*, *B. cereus* and *P. aeruginosa* (respectively designated CB, BB and PB) were capable of reducing the surface tension of water from 70 mN/m to 30, 29 and 26.5 mN/m, respectively.

#### *3.3. Antimicrobial activity and analysis of fraction inhibitory concentration*

The present study describes for the first time the use of biosurfactants associated with a natural polymer and/or essential oil as active ingredients in mouthwashes for the control of cariogenic oral microorganisms. The MICs of the biosurfactants, fungal chitosan and peppermint essential oil alone, in combination and mouthwash formulations were also calculated for the oral

microorganisms. Moreover, the interactions of these active ingredients when combined were investigated.

Table 2 lists the MICs of the test substances alone and in combinations for the oral microorganisms tested. The peppermint essential oil was the most effective at inhibiting the yeast *Candida albicans* (MIC: 20 µg/mL) and *Lactobacillus acidophilus* was the most effective at inhibiting the bacteria (MIC: 30 µg/mL). Chitosan had a similar effect on *Candida albicans*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. salivarius* and *S. mutans* (MIC: 200 µg/mL), whereas a much higher concentration of chitosan was needed to inhibit *Lactobacillus acidophilus* (MIC: 300 µg/mL). Among the biosurfactants, the PB was the most effective at inhibiting *S. aureus*, *E. coli* and *S. salivarius* (MIC: 20 µg/mL). PB and CB had similar effects on *S. mutans* (MIC: 20 µg/mL). All biosurfactants had the same effect on *Candida albicans* and *Lactobacillus acidophilus* (MIC: 40 µg/mL).

When combined with chitosan, the MIC of the biosurfactants was lowered for all microorganisms tested. The same occurred with chitosan, except when combined with the BB, for which reductions in the MIC of chitosan only occurred for *S. aureus* and *L. acidophilus*.

Regarding the combination of the biosurfactants and peppermint essential oils, the MIC of the oil for *Candida albicans* either increased (MIC of CB + POE and BB + POE: 30 µg/mL) or remained unaltered (MIC of PB + POE: 20 µg/mL). For *L. acidophilus*, the only combination for which a low MIC occurred (20 µg/mL) was the peppermint essential oil with PB. For the other microorganisms tested, the MIC of the peppermint essential oil diminished with all combinations. For *S. mutans*, however, the CB + POE combination was the only one in which the biosurfactant maintained its MIC when combined with the essential oil, whereas reductions in the MIC were found with all other combinations.

Table 3 displays the FIC for chitosan, the peppermint essential oil and the biosurfactants produced by *Candida*, *Bacillus* and *Pseudomonas* in combinations (µg/mL) and the effect of the combinations of the test substances on the cariogenic microorganisms. The combinations of the

CB and PB with chitosan demonstrated an additive effect on the majority of microorganisms tested and an indifferent effect on *E. coli* and *C. albicans*. The findings suggest an interaction between chitosan and these biosurfactants that resulted in an enhanced antimicrobial effect on the Gram-positive bacteria *S. aureus*, *L. acidophilus*, *S. salivarius* and *S. mutans*. In contrast, the combinations of CB and BB with the peppermint essential oil exhibited an additive effect only on the Gram-negative bacterium *E. coli* and an indifferent effect on the other microorganisms tested.

Regarding the mouthwash formulations, the bioactive compounds demonstrated greater effectiveness at inhibiting all oral microorganisms tested when compared to the MICs of the isolated and combined substances, with the greatest effectiveness toward the Gram-positive bacteria *S. aureus*, *S. salivarius* and *S. mutans*, as demonstrated by the lower MICs (Table 4). The formulations in which three compounds were combined demonstrated greater inhibitory action against all microorganisms tested, also with greater specificity for the Gram-positive cocci. These results suggest that the formulations exhibited stability, without negatively interfering with the compounds and bioactive substances (Tables 2 and 4).

The results of the present study confirm the effectiveness of chitosan as an antimicrobial agent. Costa et al. [25] found that high and low molecular weight chitosan had an MIC ranging from 1 to 5 mg/mL for anaerobic Gram-negative bacteria, which are higher than the values in the present study (150 µg/mL to 300 µg/mL). However, it is important to point out that the present study used facultative anaerobic or microaerophilic Gram-positive and Gram-negative bacteria and the yeast *Candida albicans*. The action of chitosan may be affected by differences in the microbial respiratory metabolism as well as the characteristics of the polymer, such as molecular weight and degree of deacetylation.

Studies have shown that the MIC of chitosan ranges from 0.5 to 5 mg/mL for *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* and *Prevotella intermedia*. Authors have postulated that the mechanism of action of chitosan stems from the interaction between positive

charges in the chitosan chain ( $\text{NH}_3^+$ ) and the negatively charged cell wall and/or cytoplasm membrane of the microbial surface, which is believed to cause the breakdown of these structures and the loss of intracellular material [25-28].

Sun et al. [29] used gas chromatography-mass spectrometry to analyse samples of peppermint oil extracted from the leaves of the plant and identified 51 volatile compounds, with a predominance of menthol (33% to 66%), menthanone (15% to 32%), isomenthanone (2% to 8%), menthofuran (6.8%) and menthyl acetate (3 to 10%), which is in agreement with the description of the manufacturer (Ferquima) of the essential oil used in the present study. The authors report that menthol is used as a raw material in toothpastes, cigarettes, chewing gum, baked goods, analgesics, cough drops, perfumes, mouthwashes, teas, beverages, syrups, candy and ice cream. The cigarette industry accounts for 40% of the total consumption of this oil, followed by the pharmaceutical industry. According to Hafsa et al. [30] and Souza [5], the antimicrobial action of essential oils is due to the bond between the oil and the phospholipid bilayer of the microbial cell membrane, causing damage to proteins, the loss of cytoplasm constituents, metabolites and ions, the depletion of the proton motor force, the interruption of enzymatic systems (enzyme inactivation), the impairment of genetic material and the formation of fatty acid hydroperoxidase.

Abolfazl et al. [31] studied the *in vitro* antibacterial activity and phytochemistry of medicinal plants and describe the antimicrobial action of peppermint (*M. piperita*) oil as being the most effective at inhibiting *Staphylococcus aureus* (PTCC:1431), *Listeria monocytogenes* (PTCC:1163), *Streptococcus pneumoniae* (PTCC:1240), *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC:1430), *Klebsiella pneumoniae* (PTCC:1053), *Escherichia coli* (PTCC:1329) and *Salmonella typhi* (PTCC:1609), with MICs ranging from 0.5 to 8  $\mu\text{g/mL}$ . According to the authors, the plants studied can be used as replacements for synthetic antibiotics in the prevention and cure of certain diseases. Menthone and menthol were reported to be responsible for the antimicrobial action of *M. piperita*.

Rufino et al. [6] describe the antimicrobial activity of biosurfactants against different microorganisms. The authors report the microbial inhibition activity of surfactin and iturin, which are biosurfactants produced by strains of *Bacillus subtilis*, rhamnolipids produced by *Pseudomonas* and mannosylerythritol lipids extracted from *C. antarctica*. The biosurfactants were effective against the microorganisms tested, but at higher concentrations than the biosurfactants in the mouthwash formulations in the present study. The need for lower concentrations of bioactive compounds in the test mouthwashes to achieve microbial inhibition is due to the interaction (additive or indifferent effect) between the biosurfactants and chitosan or peppermint essential oil, which enhances the antimicrobial activity.

Regarding the combination of chitosan and biosurfactant, the literature described that the polymer increases its cationic charge in an acidic solution, which enables an intermolecular hydrophobic interaction with surfactants, especially anionic surfactants. The polymer-surfactant association may occur due to an electrostatic bond between the sulphate groups in the surfactant and the protonated amine group in the chitosan chain. These bonds are generally cooperative at the critical aggregation concentration of the surfactant, which is lower than the critical micelle concentration [14-16].

According to Chiappisi and Gradzielski [16] and Burr et al. [14], the association between chitosan and a low concentration of SDS may involve non-cooperative bonds, which tend to neutralise the charge, making the complexes soluble and without turbidity. At intermediate concentrations of SDS, the polymer-surfactant aggregation occurs at the critical aggregation concentration due to cooperative bonds, which results in micelle-type bonds formed along the chain of the polymer, with the occurrence of turbidity in the complexes. An additional increase in the concentration of SDS results in the saturation of the polymer chain and the complexes become negatively charged.

Senra et al. [15] report the obtainment of soluble and insoluble aggregates from the chitosan-surfactant interaction, since the stoichiometry of the system is affected by a large

number of variables, such as hydrophobicity, the rigidity of the polymer skeleton, density of the charge and length of the surfactant chain. The authors explain that a self-association may occur in anionic surfactants, with the formation of micelles under appropriate conditions. However, the surfactant can also associate strongly to the polymer, which generally leads to the occurrence of micellisation at lower concentrations of the tensioactive agent.

### **Tables 2, 3 and 4**

#### **3.4. Toxicity of mouthwash formulations**

Biosurfactants, peppermint essential oil and chitosan are natural compounds with recognised antimicrobial activity, biocompatibility and low toxicity. Such properties make these compounds potential candidates for the development of pharmaceutical products with dental applications. However, there is a need to evaluate the toxicity of natural compounds, especially in interactions that have not previously been studied. The present study reports, for the first time, the toxicity of mouthwash formulations containing a biosurfactant, chitosan and/or peppermint essential oil as the active ingredients. The cytotoxicity of the six formulations and a commercial mouthwash was tested using the MTT method (Table 5). The results demonstrate that the test mouthwashes were classified as non-toxic to the fibroblast line, with cell inhibition rates lower than 20%. However, the mouthwash containing the biosurfactant extracted from *Candida bombicola* + peppermint essential oil + chitosan exhibited moderate toxicity to the macrophage line (66% inhibition). The other mouthwash formulations were classified as non-toxic to this cell line. In contrast, the alcohol-free, fluoride-free commercial mouthwash containing eucalyptol, thymol, menthol and *Camellia sinensis* leaf extract as the active ingredients exhibited high toxicity to the two cell lines, with cell inhibition rates higher than 90%. In a complementary test, the commercial mouthwash was diluted by 50% and even this concentration was classified as toxic to the fibroblast line (92.50% inhibition) and moderately toxic to the macrophage line (72.7% inhibition).

Costa et al. [27], Chen and Chung [32] and Stamford et al. [33] report similar findings, stating that the toxicity of chitosan is dose dependent, with its toxicity tending to increase significantly at concentrations higher than 2%. However, when chitosan is contained in mouthwash formulations, its toxicity is much lower than that of commercial mouthwashes.

#### **Table 5**

#### **4. Conclusions**

The present findings validate the *in vitro* antimicrobial effectiveness and toxicological safety of mouthwashes containing biosurfactants and natural products. Therefore, biosurfactant-based mouthwashes constitute a safe, valid, viable alternative to commercially available mouthwashes.

#### **Acknowledgments**

This study was funded by the following Brazilian fostering agencies: State of Pernambuco Assistance to Science and Technology Foundation (FACEPE), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Advancement of Higher Education Personnel (CAPES) and the National Electrical Energy Agency (ANEEL).

#### **References**

- [1] H.M. Mohamed, Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis, *Trends in Analytical Chemistry* 66 (2015) 176–192. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.010>
- [2] P.G. Jessop, F. Ahmadpour, M.A. Buczynski, T.J. Burns, M.B. Green li, R. Korwin, D. Long, S.K. Massad, J.B. Manley, N. Omidbakhsh, R. Pearl, Opportunities for greener alternatives in chemical formulations, *Green Chemistry* 17 (2015) 2664–2678. <https://doi.org/10.1039/C4GC02261K>

- [3] M. Secchi, V. Castellani, E. Collina, N. Mirabella, S. Sala, Assessing eco-innovations in green chemistry: Life Cycle Assessment (LCA) of a cosmetic product with a bio-based ingredient, *Journal of Cleaner Production* 129 (2016) 269-281. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.04.073>
- [4] I.T. Carvalho, B.N. Estevinho, L. Santos, Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products – a review, *International Journal of Cosmetic Science* 38 (2016) 109–119. <https://doi.org/10.1111/ics.12232>
- [5] E.L. Souza, The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review, *Trends in Food Science & Technology* 56 (2016) 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.012>
- [6] R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, L.R.R. Rodrigues, J.A. Teixeira, G.M. Campos-Takaki, Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 84 (2011) 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.045>
- [7] B.G. Freitas, J.G.M. Brito, P.P.F. Brasileiro, R.D., Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. *Frontiers in Microbiology* 7 (2016) 1646. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01646>
- [8] J.M. Luna, A.S. Santos Filho, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Production of biosurfactant from *Candida bombicola* URM 3718 for environmental applications, *Chemical Engineering Transactions* 49 (2016) 583–588. <https://doi.org/10.3303/CET1649098>
- [9] D.K.F. Santos, J.M. Luna, R.D. Rufino, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (2016) 401-430. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>



- [10] A.H.M. Resende, N.M.P. Rocha E Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A., Sarubbo, Biosurfactant production by bacteria isolated from sea water for remediation of environments contaminated with oil products, *Chemical Engineering Transactions* 57 (2017) 1555-1560. <https://doi.org/10.3303/CET1757260>
- [11] K.G.O. Bezerra, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics, *Biotechnology Progress* 34 (2018) 1482-1492. <https://doi.org/10.1002/btpr.2682>
- [12] E.J. Silva, P.F. Correa, D.G. Almeida, J.M. Luna, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Biosurfactant-enhanced bioremediation: a strategy for the recovery of contaminated marine environments, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 172 (2018) 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.034>
- [13] I.A. Silva, A.H.M. Resende, N.M.P. Rocha E Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Application of biosurfactants produced by *Bacillus cereus* and *Candida sphaerica* in the bioremediation of petroleum derivative in soil and water, *Chemical Engineering Transactions*, 64 (2018) 553–558. <https://doi.org/10.3303/CET1864093>,
- [14] S.J. Burr, P.Q. Williams, I. Ratcliffe, Synthesis of cationic alkylated chitosans and an investigation of their rheological properties and interaction with anionic surfactant, *Carbohydrate Polymers* 201 (2018) 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.105>
- [15] T.D.A. Senra, S.P. Campana-Filho, J. Desbrières, Surfactant-polysaccharide complexes based on quaternized chitosan. Characterization and application to emulsion stability, *European Polymer Journal* 104 (2018) 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.05.002>
- [16] L. Chiappisi, M. Gradzielski, Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: Thermodynamics, structures, interfacial properties and applications, *Advances in Colloid and Interface Science* 220 (2015) 92–107. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.03.003>

- [17] A.E.C. Fai, T.C.M. Stamford, T.M. Stamford-Arnaud, P.D.A. Santa-Cruz, M.C.F. Silva, G.M. Campos-Takaki, T.L.M. Stamford, Physico-Chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate, *Molecules* 16 (2011) 7143-7154. <https://doi.org/10.3390/molecules16087143>.
- [18] L. Berger, T. Stamford, T. Stamford-Arnaud, L. De Oliveira Franco, A. Do Nascimento, H. Cavalcante, R. Macedo, G. Campos-Takaki, Effect of Corn Steep Liquor (CSL) and Cassava Wastewater (CW) on Chitin and Chitosan Production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity, *Molecules* 19 (2014) 2771-2792. <https://doi.org/10.3390/molecules1903277>
- [19] L.R.R. Berger, T.C. Montenegro Stamford, K.A.R. De Oliveira, A.P.P. De Miranda, M.A.B. De Lima,; M.M. Estevez Pintado, M.P. Saraiva Câmara, L. De Oliveira Franco, M. Magnani, E.L. De Souza, Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. *International Journal of Biological Macromolecules* 102 (2018) 635-641. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.178>
- [20] T.C.M. Stamford, T.L.M. Stamford, N.P. Stamford, B.B. Neto, G.M. Campos-Takaki, Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology* 10 (2007) 61-68. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue1-fulltext-1>
- [21] R. Signini, S.P. Campana Filho, Characteristics and properties of purified chitosan in the neutral, acetate and hydrochloride forms, *Polímeros* 11 (2001) 58-64.
- [22] M.C. Alley, D.A. Scudiero, A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski D.L. Fine B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker, M.R. Boyd, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Research*, 48 (1988) 589- 601.

- [23] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods* 65, (1983) 55–63.
- [24] F.A.R. Rodrigues, I.D.S. Bomfim, B.C. Cavalcanti, C. Pessoa, R.S.B. Goncalves, J. L. Wardell, de M.V.N. Souza, Mefloquine–Oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. *Chemical Biology & Drug Design* 83 (2014) 126–131. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12210>
- [25] E.M. Costa, S. Silva, C. Pina, F.K. Tavaría, M.M. Pintado, Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens, *Anaerobe* 18 (2012) 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.009>
- [26] E.M. Costa, S. Silva, A.R. Madureira, A. Cardelle-Cobas, F.K. Tavaría, M.M. Pintado, A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro, *Carbohydrate polymers* 101 (2014) 1081–1086. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.041>
- [27] M. Costa, S. Silva, M.R. Costa, M. Pereira, D.A. Campos, J. Odila, A.R. Madureira, A. Cardelle-Cobas, F.K. Tavaría, A.S. Rodrigues M.M. Pintado, Chitosan mouthwash: Toxicity and in vivo validation, *Carbohydrate Polymers* 111 (2014) 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.046>
- [28] K. Bae, E.J. Jun, S.M. Lee, D.I. Paik, J.B. Kim, Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality, *Clinical Oral Investigations* 10 (2006) 102. <https://doi.org/10.1007/s00784-006-0038-3>
- [29] Z. Sun, H. Wang, J. Wang, L. Zhou, P. Yang, Chemical composition and anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of essential oil from leaves of *Mentha piperita* grown in China, *PloS One* 9 (2014) 1147–1167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114767>
- [30] J. Hafsa, M.A. Smach, M. Raâfet, B. Khedher, B. Charfeddine, K. Limem, H. Majdoub, S. Rouatbi, Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing

- Eucalyptus globulus* essential oil. LWT - Food Science and Technology 68 (2016) 356-364. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.050>
- [31] M. Abolfazl, A. Hadi, M. Frhad, N. Hossein, In vitro antibacterial activity and phytochemical analysis of some medicinal plants, Journal of Medicinal Plants Research 8 (2014) 186-194. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.1298>
- [32] C.Y. Chen, Y.C. Chung, Antibacterial effect of water – soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*, Journal of Appl Oral Science 20 (2012) 620-627. PMID: PMC3881855
- [33] T.C.M., Stamford T.M., Arnaud-Stamford, H.M.M. Cavalcante, R.O. Oliveira, G.M. Campos-Takaki, Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent, In Practical Applications in Biomedical Engineering.1 ed, InTech (2013) 229-244. <https://doi.org/10.5772/54453>

**Table 1**

Components of eco-sustainable mouthwash and respective functions and quantities

<b>Component</b>	<b>Function</b>	<b>Quantity</b>
Chitosan	Active ingredient	1%
Peppermint essential oil	Refreshing sensation/flavour	0.02%
Biosurfactant	Active ingredient and surfactant	0.02%
Sodium benzoate	Conservative	0.1%
Sodium saccharine	Sweetener	0.2%
Distilled water	Solvent	Pps 100mL

**Table 2**

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of chitosan (Ch), peppermint essential oil (POE) and biosurfactants extracted from *Candida bombicola* URM 3718 (CB), *Bacillus cereus* UCP1615 (BB) and *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (PB) isolated or in combination ( $\mu\text{g/mL}$ ) for inhibition of cariogenic microorganisms

Microorganisms	MIC of test substances in $\mu\text{g/mL}$																
	CB	BB	PB	Ch	POE	CB+Ch	BB+Ch	PB+Ch	CB+POE	BB+POE	PB+POE						
						CB	Ch	BB	Ch	PB	Ch	CB	POE	BB	POE	PB	POE
<i>C. albicans</i> ATCC 1106	40	40	40	200	20	15	150	20	200	15	150	30	30	30	30	20	20
<i>S. aureus</i> ATCC 15656	30	30	20	200	50	10	100	15	150	10	100	20	20	20	20	15	15
<i>E. coli</i> ATCC 25922	40	40	20	200	50	15	150	20	200	15	150	20	20	20	20	20	20
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	40	40	40	300	30	15	150	20	200	15	150	30	30	30	30	20	20
<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	30	30	20	200	50	10	100	20	200	10	100	20	20	20	20	15	15
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	20	30	20	200	50	10	100	20	200	10	100	20	20	20	20	15	15



**Table 4**

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of mouthwashes formulated with biosurfactant extracted from *Candida bombicola* + peppermint essential oil (CBPOE), biosurfactant extracted from *Bacillus cereus* + peppermint essential oil (BBPOE), biosurfactant extracted from *Pseudomonas aeruginosa* + peppermint essential oil (PBPOE), biosurfactant extracted from *Candida bombicola* + peppermint essential oil + chitosan (CBPOECh), biosurfactant extracted from *Bacillus cereus* + peppermint essential oil + chitosan (BBPOECh), biosurfactant extracted from *Pseudomonas aeruginosa* + peppermint essential oil + chitosan (PBPOECh) for *Candida albicans* ATCC 1106, *Staphylococcus aureus* ATCC 15656, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and *S. mutans* ATCC 25175

Microorganisms	Minimum inhibitory concentration of test mouthwashes ( $\mu\text{g/mL}$ )														
	CBPOE		BBPOE		PBPOE		CBPOECh			BBPOECh			PBPOECh		
	CB	POE	BB	POE	PB	POE	CB	POE	Ch	BB	POE	Ch	PB	POE	Ch
<i>C. albicans</i>	10	10	10	10	8.0	8.0	8.0	8.0	40	8.0	8.0	40	8.0	8.0	40
<i>S. aureus</i>	8.0	8.0	8.0	8.0	6.0	6.0	4.0	4.0	20	4.0	4.0	20	4.0	4.0	20
<i>E. coli</i>	10	10	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	40	8.0	8.0	40	8.0	8.0	40
<i>L. acidophilus</i>	10	10	10	10	8.0	8.0	8.0	8.0	40	8.0	8.0	40	8.0	8.0	40
<i>S. salivarius</i>	8.0	8.0	8.0	8.0	6.0	6.0	4.0	4.0	20	4.0	4.0	20	4.0	4.0	20
<i>S. mutans</i>	8.0	8.0	8.0	8.0	6.0	6.0	4.0	4.0	20	4.0	4.0	20	4.0	4.0	20



\*Biosurfactants extracted from *Candida bombicola* URM 3718 (CB), *Bacillus cereus* UCP1615 (BB) and *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (PB); Chitosan (Ch) and peppermint essential oil (POE)

**Table 5**

Percentage of inhibition of mouse fibroblast (L929) and mouse macrophage (RAW 264.7) cell lines exposed to mouthwashes formulated with biosurfactant extracted from *Candida bombicola* + peppermint essential oil (CBPOE), biosurfactant extracted from *Bacillus cereus* + peppermint essential oil (BBPOE), biosurfactant extracted from *Pseudomonas aeruginosa* + peppermint essential oil (PBPOE), biosurfactant extracted from *Candida bombicola* + peppermint essential oil + chitosan (CBPOECh), biosurfactant extracted from *Bacillus cereus* + peppermint essential oil + chitosan (BBPOECh), biosurfactant extracted from *Pseudomonas aeruginosa* + peppermint essential oil + chitosan (PBPOECh) and commercial mouthwash

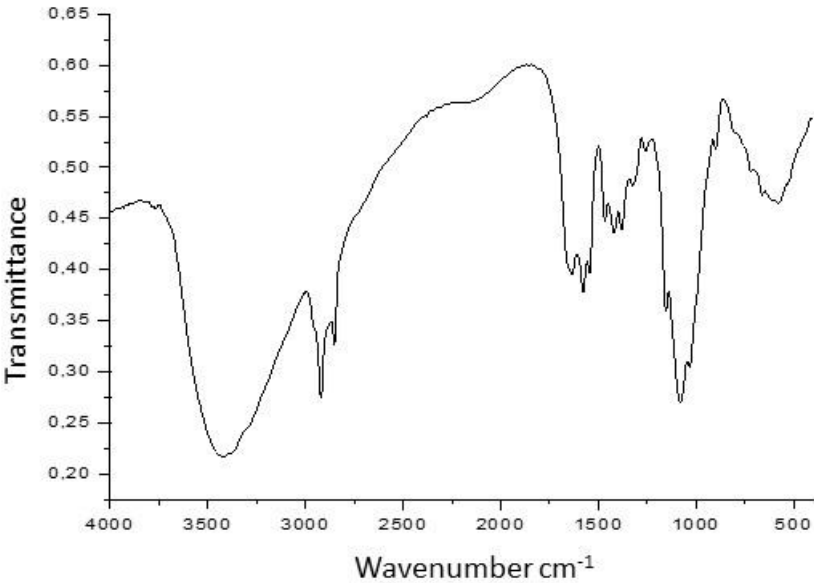
Mouthwashes	Percentage of cell inhibition			
	L929	SE	RAW 264.7	SE
CBPOE	9.14	5.45	12.00	2.17
CBPOECh	17.31	2.92	66.02	1.50
CBPOE	8.58	2.13	21.87	3.94
CBPOECh	19.57	2.51	42.01	2.73
BBPOE	0.0	0.0	31.02	3.65
BBPOECh	23.47	1.94	27.66	0.97
Pure commercial mouthwash	93.06	2.05	94.69	1.02
Diluted commercial mouthwash (50%)	92.50	0.30	72.70	5.19

\*SE = standard error

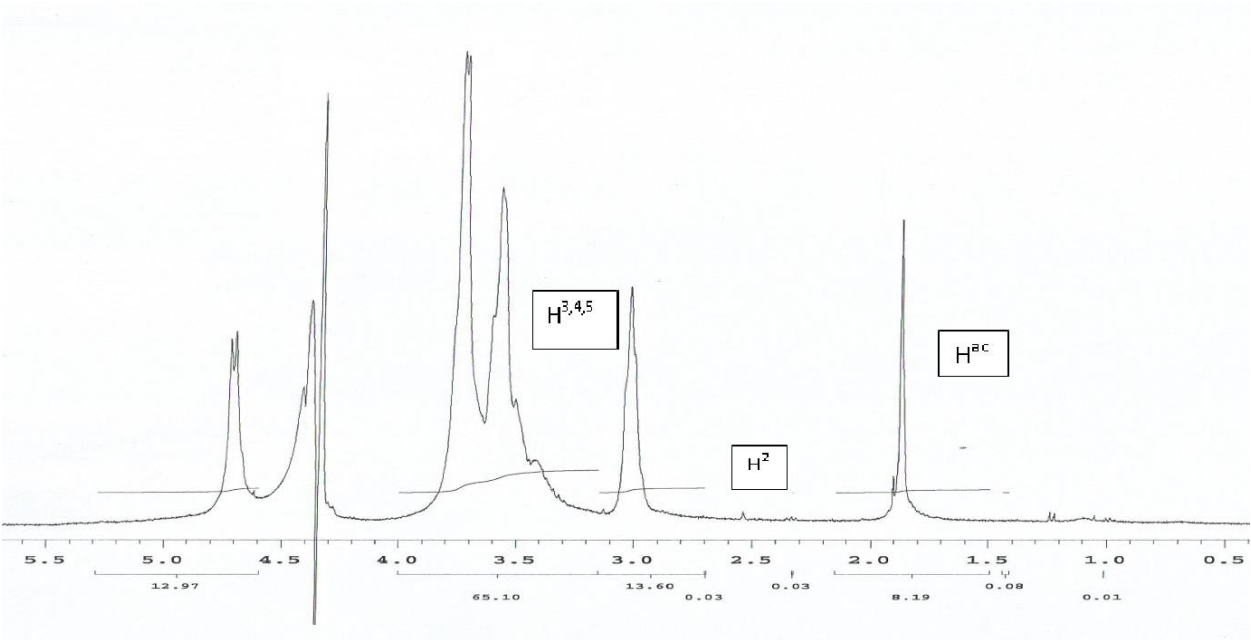
**FIGURE CAPTIONS**

**Fig. 1.** Absorption spectrum in infrared region of chitosan extracted from cell wall of *Mucor javanicus* (UCP 69) grown in yam been broth at 28 °C for 48.

**Fig. 2.** <sup>1</sup>H NMR spectrum of chitosan extracted from cell wall of *Mucor javanicus* (UCP 69) grown in yam been broth at 28 °C for 48.



**Figure 1**



**Figure 2**

# **CAPÍTULO III**

**Artigo a ser submetido para publicação na Revista International  
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**

**Citotoxicidade, ação antibacteriana e antibiofilme de creme dental biosustentavel  
contendo biossurfactante e quitosana contra *Streptococcus mutans***

**Ana Helena M. Resende<sup>a</sup>, Juliana M. Farias<sup>a</sup>, Dhanilo D. B. Silva<sup>b</sup>, Raquel D. Rufino<sup>a,c</sup>,  
Juliana M. Luna<sup>a,d</sup>, Thayza Christina M. Stamford<sup>b</sup>, Leonie A. Sarubbo<sup>a,d\*</sup>**

<sup>a</sup> *Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil*

<sup>b</sup> *Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, n. 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil*

<sup>c</sup> *Faculdade de Integração do Sertão (FIS), Rua João Luiz de Melo, 2110, Tancredo Neves, 56.909-205, Serra Talhada, Pernambuco, Brasil*

<sup>d</sup> *Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Rua Joaquim de Brito, n.216, Boa Vista, CEP: 50070-280, Recife, Pernambuco, Brasil*

\* Corresponding author. Tel.: +55 81 21194048; fax: +55 81 21194043.

E-mail address: leonie.sarubbo@unicap.br (Leonie A. Sarubbo)

## Resumo

O presente estudo teve por objetivo formular pastas de dentes contendo biossurfactantes associados à quitosana fúngica ou ao fluoreto de sódio e avaliar a citotoxicidade, ação antimicrobiana e o potencial de inibição de biofilme formado por *S. mutans*. A quitosana utilizada foi extraída da biomassa de fungo Mucorales, grau de desacetilação de 83% ( $\pm 2$ ) e peso molar de  $5.08 \times 10^3$  g/mol ( $\pm 0.4$ ). Foram testados três biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992(BP), *Bacillus cereus* UCP1615(BB) e *Candida bombicola* URM3718(BC). O fluoreto de sódio foi de origem comercial. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição para as substâncias testes isoladas e em combinação, realizada a análise da fração de concentração inibitória para determinar o tipo de interação entre os compostos. Foram preparadas 6 pastas de dente tendo como princípios ativos os biossurfactantes, a quitosana ou o fluoreto de sódio. Para as formulações foi realizado o teste de citotoxicidade por Ensaio do MTT para as linhagens celulares L929 (fibroblasto de camundongos) e RAW264.7 (macrófagos de camundongos). As formulações foram testadas quanto ao pH, consistência e capacidade espumante. Todas as substâncias estudadas apresentaram CIM para *Streptococcus mutans*. As combinações entre os BC e BP com a quitosana demonstraram efeito aditivo para *S. mutans* e indiferente para BB com quitosana. As associações dos biossurfactantes com o fluoreto de sódio apresentaram efeito indiferente. Todas as pastas de dentes apresentaram-se atóxicas com inibição celular inferior a 7%, pH em torno de 9, capacidade de espalhamento entre 8-17mm, capacidade espumante entre 63-95 e inibiram a viabilidade celular de *S. mutans* no biofilme formado, sendo similar a pasta comercial testada. Os resultados obtidos mostram que as formulações sugeridas são promissoras quando comparadas ao creme dental comercial.

**Palavras-chave:** Tensoativos, biopolímero, dentífrico, MTT, checkerboard, concentração inibitória mínima.



## 1. Introdução

A cárie e as doenças periodontais apresentam como principais fatores etiológicos a presença de biofilme na superfície do dente e uma higiene bucal inadequada [1,2]. *S. mutans* é considerada uma das principais bactérias cariogênicas por ser acidogênica e acidúrica, por produzir proteínas na superfície celular que colabora com a aderência do microrganismo à estrutura dentária, culminando com a formação de biofilme, e a produção de polissacarídeos intra (PICs) e extracelulares (PECs) [3,4]. Os PECs atuam como pontos de ancoragem para que outras bactérias, colonizadoras secundárias, possam se aderir ao biofilme. Em acréscimo, a presença de matriz polimérica extracelular em biofilmes reduz a sensibilidade dos sistemas de defesa do hospedeiro, antibióticos e outras drogas, possibilitando a persistência da infecção bacteriana que tende a se tornar crônica [5,6].

A higienização bucal, geralmente obtida pela escovação dentária associada ao controle químico é de suma importância para a manutenção da saúde oral. Creme dental é um produto cosmético bastante utilizado para controle de biofilme dental, assim como para obtenção de uma estética oral condizente com os padrões almejados pela população [7]. Estes produtos apresentam diferentes formulações, contudo alguns ingredientes estão presentes na maioria dos cremes dentais e tem funções definidas. Pode-se destacar glicina e água, como umectante, alginato de sódio (aglutinante), agente aromatizante (sabor e refrescância), bicarbonato de sódio (agente abrasivo), surfactante aniônico, geralmente o Lauril Sulfato de Sódio (LSS) ajuda a remover os restos de alimentos dos dentes. A presença de compostos bioativos tais como fluoreto de sódio (composto antimicrobiano e remineralizador do esmalte dentário) e outros agentes antimicrobianos, como o triclosan, cloreto de cetil piridínio e alguns compostos naturais, como óleos essenciais que promovem os benefícios para a manutenção da saúde. Dessa forma é relevante a escolha de um creme dental com efetiva ação antimicrobiana [1,6-8].

O Lauril Sulfato de Sódio é um dos os principais componentes dos dentífricos. Além de espumante, confere propriedades sensoriais e exibe atividade antimicrobiana. No entanto, o uso freqüente dessa substância pode causar múltiplas reações alérgicas e tóxicas que incluem dermatite da pele, inflamação, irritação das mucosas e úlceras [9,10]. Além disso, a ingestão de LSS pode exercer um efeito carcinogênico [11,12]. Devido a estes efeitos adversos o interesse mundial pelos biossurfactantes microbianos, considerados produtos de tecnologia “verde”, como substitutos ecosustentáveis e biocompatíveis aos surfactantes sintéticos, vem aumentando a cada ano [1,13]. Várias pesquisas indicam que os biossurfactantes microbianos podem ser utilizados da mesma forma na detergência, emulsificação, umedecimento, formação de espuma, dispersão, solubilização de substâncias hidrofóbicas ou para modificar superfícies. Os biossurfactantes ainda apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes sintéticos, incluindo compatibilidade com a pele, toxicidade e irritabilidade reduzidas e maior biodegradabilidade [10]. Além disso, a literatura indica que, graças às suas atividades antiadesiva, anti-fúngicas, anti-virais e antibacterianas contra vários patógenos, os biossurfactantes tornam-se muito interessantes para aplicações cosméticas e em produtos de higiene pessoal [14].

Outro produto natural que tem despertado interesse na indústria de cosméticos é a quitosana. Um biopolímero composto por unidades de  $\beta$ - (1- $\rightarrow$  4) -2-acetamido-D-glicose ligadas a resíduos de  $\beta$ - (1- $\rightarrow$  4) -2-amino-D-glicose. Quitosana pode ser extraída da parede celular de alguns fungos Mucorales em menos etapas e utilizando menos solventes do que a quitosana obtida da desacetilação da quitina extraída de crustáceos, sendo considerada uma tecnologia ecosustentável. A quitosana fúngica apresenta melhor padronização de suas propriedades e características químicas tais como grau de desacetilação e peso molar, além de não ter resíduos de proteínas que podem ocasionar reações alérgicas [15]. Pesquisas sugerem que a quitosana apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro, interfere nas propriedades adesivas e na colonização da cavidade bucal por bactérias cariogênicas, e assim como o flúor,

pode prevenir a desmineralização do esmalte dentário e a formação do biofilme dental [2,6,16-19].

Mediante o exposto o presente trabalho tem por objetivo avaliar a citotoxicidade, a ação antimicrobiana e o potencial de inibição de biofilme formado por *S. mutans* frente a formulações de pasta de dentes contendo biossurfactantes associados à quitosana fúngica ou ao fluoreto de sódio.

## **2. Materiais e Métodos**

### *2.1. Materiais*

A quitosana fúngica extraída da biomassa de fungo Mucorales, geneticamente não modificado, foi gentilmente cedida pelo Grupo de Pesquisas da Profa. Dra. Thayza Cristina de Montenegro Stamford, do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco. A quitosana fúngica apresenta grau de desacetilação de 83% ( $\pm 2$ ) e peso molar de  $5.08 \times 10^3$  g/mol ( $\pm 0.4$ ). O cultivo do fungo e extração do polímero foi realizado como descrito por Berger et al. [17]. Os demais reagentes utilizados na formulação dos cremes dentais foram obtidos de fontes comerciais.

### *2.2. Produção, isolamento e determinação da tensão superficial dos biossurfactantes*

As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 e *Bacillus cereus* UCP1615, depositas no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco e a levedura *Candida bombicola* URM 3718, depositada na Coleção de Culturas do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, foram utilizadas na produção dos biossurfactantes.

Culturas jovens das bactérias obtidas após 24 horas de cultivo em caldo Nutriente a 28°C foram transferidas para Erlenmeyer contendo o mesmo meio de cultura, sendo mantidas

sob agitação orbital de 150 rpm durante 14 h a 28°C. Culturas jovens da levedura, *C. bombicola*, foram obtidas após 24 horas de cultivo em caldo Yeast Mold (YMB), a 28°C foram transferidas para Erlenmeyer contendo o mesmo meio de cultura, sendo mantidas sob agitação orbital de 180 rpm por 24 h a 28°C. O inóculo a ser utilizado na produção do biossurfactante foi padronizado para uma D.O. (Densidade Óptica) de 0.7 (correspondente a um inóculo de 10<sup>7</sup> U.F.C./mL) a 600 nm.

Para produção dos biossurfactantes, 3% (v/v) do inóculo previamente obtido de *P. aeruginosa* foi cultivado em meio de água destilada contendo 4% de resíduo de borra de refinaria de óleo vegetal e 0,5% de milhocina (pH 7,0) sob 220 rpm durante 120 h, à 28°C [20], enquanto que 5% (v/v) do inóculo de *B. cereus* foi adicionado ao meio mineral composto por 0,1% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,02% de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02% de CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O e 0,005% de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, contendo 2% de óleo residual de soja após fritura e 0,12% de KNO<sub>3</sub> como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (pH 7,0). Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 200 rpm durante 72 h, à 28°C [21]. Para a produção do biossurfactante de *C. bombicola* foi utilizado 5% (v/v) do inóculo previamente obtido por fermentação sob agitação orbital de 180 rpm durante 120 h, à 28°C em meio formulado com água destilada contendo 5% de melão de cana, 5% de óleo de fritura residual e 3% de milhocina, sendo o pH ajustado para 6,0 [22].

Para o isolamento do biossurfactante de *P. aeruginosa*, o líquido metabólico livre de células teve inicialmente seu pH ajustado para 2 com uma solução 6M de HCl. Em seguida, o mesmo volume de clorofórmio/metanol (2:1, v/v) foi adicionado ao líquido metabólico, sendo a mistura agitada vigorosamente durante 15 minutos e deixada em repouso para separação das fases. A fase orgânica foi removida e a operação foi repetida mais duas vezes. O produto obtido na fase orgânica foi concentrado em rotoevaporador a 45°C até peso constante [20].

Para o isolamento do biossurfactante de *B. cereus*, o líquido metabólico foi extraído diretamente com acetato de etila numa proporção de (4:1, vol/vol), sendo o procedimento

repetido por três vezes. A fase orgânica foi recolhida e lavada com solução saturada de cloreto de sódio. A solução saturada foi descartada, o solvente transferido para um béquer, e o rendimento em biossurfactante produzido foi determinado por gravimetria [21].

Para o isolamento do biossurfactante de *C. bombicola*, o líquido metabólico livre de células foi extraído utilizando acetato de etila, repetindo-se três vezes o processo. Em seguida, o solvente foi transferido para um funil separação, descartando a fase aquosa e a fase do solvente foi seca com sulfato de sódio e, em seguida, filtrada e evaporada [21].

A tensão superficial dos biossurfactantes produzidos foi medida no líquido metabólico livre de células em tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY.

### 2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) foi procedido o teste de microdiluição de acordo com o preconizado por Freire et al [23]. As substâncias testes e suas respectivas concentrações iniciais foram: quitosana fungica diluída em ácido acético a 1% e preparada a uma concentração inicial de 1000 µg/ml com pH ajustado para 6,0 com NaOH 1N; biossurfactantes diluídos em água destilada estéril a uma concentração de 100 µg/mL; solução de fluoreto de sódio foi diluído em água deionizada para obtenção de uma concentração inicial de 2400 µg/mL, com pH ajustado para 5.0.

Como micro-organismo teste foi usado *Streptococcus mutans* (UA159), fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da UNICAMP. Os inóculos utilizados nos ensaios experimentais foram obtidos a partir de culturas crescidas por 18 horas em caldo BHI (DIFCO® Laboratories, Detroit, MI, EUA) a 37 °C. Após a incubação, as células bacterianas foram separadas do meio de cultivo por centrifugação a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C, lavadas três vezes em solução salina a 0,9%. A após as lavagens *S. mutans* foi suspenso em solução salina 0,9% até obter densidade óptica (OD) de 1,5 a 660nm, equivalente a aproximadamente 5 x 10<sup>8</sup> unidades

formadoras de colônias/mL (UFC/mL) em espectrofotômetro (FLUOR estrela OPTIMA, BMG LABTECH, Alemanha).

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada por microdiluição em microplacas com 96 orifícios. Cada orifício foi preenchido com proporções variadas do caldo BHI acrescido de 20% de sacarose e das substâncias, atingindo ao final, diferentes concentrações dos produtos testes (0 a 600µg/mL para quitosana, 0 a 1200µg/mL para fluoreto de sódio e de 0 a 60µg/mL para os biossurfactantes), perfazendo volume final nos poços de 100 µL. Para o controle de viabilidade microbiana foi utilizado 80 mL do meio. Em todos os orifícios foram adicionados 20 µL do inóculo microbiano, com exceção do controle de esterilidade, o qual só continha 100 µL do caldo BHI acrescido 20% sacarose. O ensaio foi realizado em quadruplicata. O sistema montado foi incubado a 37°C por 24 h, sendo posteriormente adicionados 30 µL de resazurina aos orifícios para evidenciar a viabilidade celular microbiana. A coloração azul-violeta indicou ausência de crescimento microbiano enquanto que as variações de rosa-vermelho indicaram a presença de células viáveis. A leitura da cor foi realizada após 1 hora da adição da resazurina.

#### 2.4 Análise da Fração de Concentração Inibitória (FIC)

O índice FIC foi utilizado para analisar o efeito da combinação entre a quitosana ou o fluoreto de sódio e os biossurfactantes, sendo o efeito classificado como de ação sinérgica, antagônica, aditiva ou indiferente na combinação entre os compostos. A FIC foi estabelecida segundo a Eq. 01.:

$$(Eq. 01) \quad FIC = \frac{MIC A \text{ na combinação}}{MIC A \text{ isolado}} + \frac{MIC B \text{ na combinação}}{MIC B \text{ isolado}}$$

O índice  $FIC_{\text{final}} = FIC (I) + FIC (II)$ . Quando  $FIC \leq 0,5$  efeito sinérgico;  $> 0.5 FIC \leq 1$  efeito aditivo;  $1 < FIC \leq 4$  efeito indiferente, e  $FIC > 4,0$  é definido como antagonismo

### *2.5. Formulação do creme dental*

Os cremes dentais foram formulados em condições asépticas e todo material foi previamente esterilizado. A formulação dos cremes dentais contendo os biossurfactantes associados à quitosana ou ao fluoreto de sódio pode ser visualizada na Tabela 1. Num recipiente de vidro estéril, foram adicionados os compostos sólidos, os quais foram macerados até obtenção de um pó. Depois foram acrescentados a glicerina e o alginato de sódio. Após completa homogeneização foram acrescentados os componentes ativos em solução. Todos os componentes foram misturados até a mistura adquirir, aproximadamente, a mesma consistência de uma pasta de dente comercial [7]. Um creme dental comercial também foi utilizado para fins de comparação.

#### ***Inserir Tabela 1***

### *2.6. Determinação do pH, da consistência e da capacidade espumante das formulações*

Para determinação do pH das formulações foi utilizado pHmetro. 2 g de cada formulação, assim como a pasta comercial foi colocada em um Becker de 250 ml, no qual foram adicionados 80 ml de água destilada e a solução foi vigorosamente agitada. Após 30 minutos, os pHs das soluções foram medidos.

A consistência das pastas de dente foi determinada, colocando 1g de cada amostras no centro de uma placa de vidro e outra placa foi posicionada sobre a amostra, sendo aplicado 1 kg de peso sobre as placas de vidro. Após 10 min, o peso foi removido e o diâmetro da pasta medido em centímetros, a fim de demonstrar a consistência da pasta ou a capacidade de espalhamento [11].

A capacidade espumante das amostras foi determinada adicionando 5 mL de água destilada e 0,5 g da pasta dental formulada e comercial em um tubo de ensaio. O tubo de ensaio foi selado e agitado em vórtex por 30 seg. A estabilidade da espuma formada foi estudada e a altura da espuma medida [24].

### 2.7. Preparo da saliva artificial modificada (SAM)

A composição da saliva artificial para 1000 mL de água deionizada consistiu de: 1,0 g/L Extrato de carne (Himedia<sup>®</sup>); 2,0 g/L Extrato de levedura (Himedia<sup>®</sup>); 5,0 g/L Peptona Protease (Himedia<sup>®</sup>); 2,5 g/L Mucina gástrica de porco tipo III (Sigma<sup>®</sup>); 0,2 g/L Cloreto de Sódio (Sigma<sup>®</sup>); 0,2 g/L Cloreto de Potássio (Synth<sup>®</sup>); 0,3 g/L Cloreto de Cálcio (Sigma<sup>®</sup>); 1,25 mL/L Solução de Uréia a 40% (Sigma<sup>®</sup>). Solução de uréia a 40% foi esterilizada por filtração com filtro 0,2 µm, e utilizada para ajustar o pH da saliva após sua esterilização em autoclave. A saliva artificial modificada (SAM) consiste de uma mistura na proporção de 60:40 (v:v) de saliva artificial e caldo Brain Heat Infusion-BHI (DIFCO<sup>®</sup>) suplementado com 15% de sacarose, respectivamente [23].

### 2.8. Análise da inibição da formação de biofilme por *S. mutans*

Inicialmente foi realizada a obtenção e a calibração do pré-inoculo de *S. mutans* para o teste de biofilme. Resumidamente, *S. mutans* foi inoculado em 10 mL de SAM à 37°C por 18 horas em anaerobiose. Completado o tempo de incubação foi realizada leitura em espectrofotômetro a 530 nm, sendo procedidos ajustes na concentração até obtenção de densidade ótica (DO) na faixa de 0,140 a 0,150, equivalente a suspensão de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.

O biofilme foi formado em lamínulas de vidro circulares (75mm x 25 mm) que foram colocadas em placa de 24 poços. Foram adicionados 1,8ml de SAM e 0,2ml do inoculo microbiano padronizado. O sistema foi então incubado à 37°C/24h. Após esse período as lamínulas foram lavadas gentilmente com solução salina 0,9% estéril e transferidas para novas placas de 24 poços para serem expostas as pastas de dentes formuladas e comercial. Para o controle foi utilizado solução salina 0.9% estéril. As lamínulas ficaram imersas em 2ml de solução salina (controle) ou em solução de cada pasta de dente, previamente diluídas em água destilada numa proporção de 1:3 (w/v), por 30 segundos, sendo depois transferidas para tubos falcons contendo solução salina



0.9% estéril. O biofilme foi desprendido por agitação em vortex por 30 segundos. Para a contagem das bactérias viáveis foram realizadas diluições seriadas onde as suspensões bacterianas obtidas foram diluídas as concentrações de  $10^{-1}$  até  $10^{-6}$ . De cada diluição foi retirada alíquotas de 100µl e plaqueadas em Mitis Salivarius Ágar por técnica de pour plate e incubadas a 37°C /24 horas. Cada colônia visível foi considerada uma unidade formadora de colônia (UFC/ml). O experimento foi realizado em triplicata.

A quantificação de microrganismo viável no biofilme foi determinada por contagem de Unidades Formadoras de Colônias- UFC, sendo calculada pela equação:

$$\text{UFC/DO}_{\text{ligados ao esmalte}} = \text{UFC/DO}_{\text{inicial}} - \text{UFC/DO}_{\text{final}}$$

### 2.9. Teste do MTT (*Ensaio do 3-[4,5-dimetil-2-tiazol]-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium*)

O efeito citotóxico das pastas de dentes foi avaliado pelo Ensaio do MTT (Ensaio do 3-[4,5-dimetil-2-tiazol]-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium) [25,26]. Foram utilizadas as linhagens celulares L929 (fibroblasto de camundongos) e RAW 264.7 (macrófagos de camundongos). As linhagens celulares foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, sendo mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO<sub>2</sub>. As células L929 e RAW 264.7 ( $10^5$  células/mL) foram colocadas em placas de 96 poços contendo meio DMEM e incubadas por 24 h. Em seguida 10 µL das soluções testes foram adicionadas aos poços na concentração final de 500 mg/L para as pastas dentais. Uma pasta de dente comercial (10 µL direto na placa) foi utilizada como controle positivo. Após 72 h de incubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os

experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism 7.0 demo*.

Para determinação da toxicidade foi usada uma escala de intensidade, sendo considerado tóxico as amostras com atividade inibitória entre 95 a 100 %, com atividade moderada as que apresentaram inibição variando de 70 a 90% e não tóxicas as com inibição menor que 50 % [27].

### 2.10. Análises estatísticas

As médias e os desvios padrão (média  $\pm$  DP) foram calculados. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e as diferenças foram calculadas usando análise estatística de variância unidirecional (ANOVA) para uma significância de  $p < 0,5$ .

## 3. Resultados e Discussão

O presente estudo apresenta pela primeira vez a utilização de biossurfactantes associados à quitosana fúngica ou a fluoreto de sódio como princípios ativos em pasta de dente para controle de micro-organismos na forma de biofilme. Também são descritas as concentrações inibitórias mínimas dos biossurfactantes, da quitosana fúngica e do fluoreto de sódio, isolados, em combinação, bem como o tipo de interação que tais princípios ativos apresentam quando combinados.

### 3.1. Concentração Inibitória Mínima e Análise da Fração de Concentração Inibitória

No presente trabalho foi possível determinar a concentração inibitória mínima das substâncias testes (quitosana, biossurfactantes e fluoreto de sódio), usadas na formulação das pastas de dentes propostas, contra *S. mutans*. Obteve-se CIM de 400  $\mu\text{g/mL}$  para o fluoreto de sódio, 150  $\mu\text{g/mL}$  para quitosana fúngica, 30  $\mu\text{g/mL}$  para os biossurfactantes produzidos por *C. bombicola* e *B. cereus* e de 20  $\mu\text{g/mL}$  para o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa*.

Contudo, ao se realizar as combinações entre as substâncias bioativas pode-se verificar alteração da CIM para valores inferiores aos obtidos com as substâncias isoladas. Os três biossurfactantes ao serem associados com quitosana apresentaram CIM numa concentração de 10 µg/mL e a quitosana apresentou CIM de 100 µg/mL na associação. Por sua vez, ao combinar o fluoreto de sódio com os biossurfactantes produzidos por *C. bombicola* e *P. aeruginosa*, estes apresentaram CIM numa concentração de 15 µg/mL, enquanto que o fluoreto de sódio apresentou CIM com 300 µg/mL. Contudo, a junção entre biossurfactante produzido por *B. cereus* e o fluoreto de sódio apresentaram CIM, respectivamente de 20 µg/mL e 400 µg/mL.

A Fração de Concentração Inibitória e o tipo de interação entre a quitosana ou o fluoreto de sodio com os biossurfactantes extraídos de *C. bombicola* (BC), *B. cereus* (BB) e de *P. aeruginosa* (BP) frente *S. mutans* podem ser visualizados na Tabela 2. As combinações entre os biossurfactantes extraídos de *C. bombicola* e de *P. aeruginosa* com a quitosana demonstraram efeito aditivo para *S. mutans*, enquanto que para as demais associações o efeito foi referido como indiferente.

Chang et al. [18] extraíram quitosana de *Auricularia* sp e verificaram sua atividade antimicrobiana para *S. aureus* e *E. coli*, sendo relatada CIM de 250 µg/mL para quitosana fúngica contra *S. aureus* e *E. coli*. Estes autores sugerem que a ação antimicrobiana da quitosana está relacionada com a composição de sua parede celular e interação eletrostática entre a estrutura policatiónica do polímero e componentes aniônicos de sua superfície celular. Bactérias Gram positivas tem ácido teicoico ligado covalentemente ao peptidoglicano, principal componente da parede celular, responsável por tornar toda a superfície celular da bactéria carregada negativamente. A quitosana, por ser um policatión, se liga não covalentemente a ácidos teicóicos incorporados na camada de peptidoglicano, ocasionando alterações na função do peptidoglicano, o que pode resultar na morte celular. Por outro lado, a parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa, apresentando uma membrana externa

semipermeável sobre uma camada de peptidoglicano. Essa membrana externa consiste em uma bicamada lipídica assimétrica de lipopolissacarídeo (LPS), tendo o glicolípido como seu principal componente. A quitosana também interage eletrostaticamente com as cargas negativas do LPS o que acarreta em mudanças na permeabilidade, podendo se verificar o aumento da captação de 1-N-fenilnaftilamina, que sugere danos a membrana. Contudo, as interações eletrostáticas de quitosana com LPS não afetam significativamente a dinâmica da membrana citoplasmática, uma vez que a quitosana é ligada à membrana externa, tornando o peptidoglicano e a membrana periplasmática menos afetados e todo o envelope intacto. Isto pode explicar porque as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis a quitosana do que as bactérias Gram-negativas [3].

### ***Inserir Tabela 2***

Rufino et al. [28] verificaram a inibição de microrganismos envolvidos na formação de biofilme em próteses e dispositivos médicos, incluindo *S. mutans*, *S. mutans* NS e *S. mutans* HG 985 por biossurfactante extraído de *Candida lipolytica*. Os autores relatam inibição de *S. mutans* HG (64.9%); *S. mutans* (58%) e *S. mutans* NS (46%), pelo biossurfactante numa concentração de 0.75 mg/L. Apesar de na presente pesquisa ter se obtido concentrações mais elevadas dos biossurfactantes brutos para inibição do crescimento de *S. mutans*, entre 20-30µg/mL, é importante salientar que essas concentrações correspondem a 99% de inibição da multiplicação microbiana (efeito bacteriostático), sendo a inibição superior ao relatado por Rufino e colaboradores (2011).

Na literatura é relatada que a quitosana em solução ácida fraca apresenta carga positiva (polication) o que permite que haja uma interação com a molécula do biossurfactante, principalmente os aniônicos (carga negativa) por ligação eletrostática intermolecular entre os grupos sulfato do surfactante e o grupo amina protonado do polímero. Em uma concentração crítica de surfactante (concentração de agregação crítica) tais ligações intermoleculares são normalmente cooperativas, formando agregados do tipo micelar, sendo visualizada turbidez

[29-31]. Contudo, há relatos de presença de ligações não cooperativas da quitosana com surfactante sintético (SDS) em baixa concentração. Contudo, há relatos de presença de ligações não cooperativas da quitosana com surfactante sintético (SDS) em baixa concentração. Os complexos apresentam-se solúveis e límpidos (não turvos) uma vez que as ligações não cooperativas tendem a neutralizar as cargas [29,31]. Senra et al. [30] descrevem que a estequiometria do sistema, surfactante-quitosana, é influenciada por várias variáveis, tais como hidrofobicidade, rigidez do esqueleto do polímero e densidade de carga, comprimento da cadeia de surfactante. Tais variáveis irão influenciar na obtenção de agregados solúveis ou insolúveis da interação quitosana-surfactante.

### *3.2. Formulação do creme dental e determinação do pH, da consistência e da capacidade espumante das formulações*

Os cremes dentais são considerados um produto cosmético que tem sido usado ao longo de muitos anos e provou ser uma ferramenta importante para melhorar a saúde bucal e a estética. Esses produtos são usados diariamente, mas pouca informação está disponível sobre os mesmos. Basicamente, os cremes dentais executam três funções principais: removem as manchas no dente por abrasão, desagregam/inibem microrganismos presentes nos biofilmes (dentes e mucosas) e auxiliam na remoção de alimentos através de detergentes e atuam como um transportador de compostos terapêuticos [32].

As formulações testadas nessa pesquisa foram preparadas com uma mistura de bicarbonato de sódio/ carbonato de cálcio e cloreto de sódio como abrasivos, fluoreto de sódio ou quitosana fúngica como princípio ativo antimicrobiano e remineralizador, biossurfactante como espumante e princípio ativo antimicrobiano, alginato de sódio como agente ligante e a glicerina como umectante (Tabela 1).

As propriedades dos biossurfactantes produzidos por *C. bombicola*, *B. cereus* e *P. aeruginosa* cultivados em meios de baixo custo estão resumidas na Tabela 3. Vale ressaltar

que todos os biossurfactantes foram obtidos em meios de cultivo de baixo custo, formulados com resíduos industriais.

### ***Inserir Tabela 3***

O pH é uma das características mais importantes das pastas de dente e, de acordo com a norma internacional utilizada, o produto deve estar dentro de uma faixa, considerada de segurança, que vai de 5,5 a 10,5 [35]. Nas pastas formuladas o pH foi básico variando de 9-9.16, sendo similar ao pH da pasta comercial a base de cloreto de cetilpiridínio e fluoreto de sódio (pH 9.26), como pode ser visualizado na Tabela 4. Na literatura é relatado que dentifrícios com pH ácido pode promover a desmineralização do esmalte dentário, bem como é visualizada maior alteração na superfície do dente contudo se o pH estiver acima do pH crítico do dente (5,5) a acidez pode aumentar a ligação do flúor ao esmalte dentário promovendo a formação da fluorhidroxidoapatita. De forma geral, considera-se as pastas de dente ácidas mais abrasivas, podendo ocasionar lesão a dentina. Sendo assim, os melhores dentifrícios são os neutros ou básicos [36-38].

Conforme relatado na literatura por Bouassida [7], o dentifrício formulado com biossurfactante de *B. subtilis* também apresentou valores de pH próximos a 9. Das et al. [11] descrevem resultados semelhantes para duas formulações de pasta de dente que utilizaram o biossurfactante extraído de actinobactérias marinhas (*Nocardiopsis*), mostrando que o produto formulado foi mais básico e mais eficiente em comparação com um creme dental comercial.

### ***Inserir Tabela 4***

Uma propriedade muito exigida em uma formulação de creme dental é o seu aspecto e consistência, não devendo haver separação em parte líquida e sólida. Deve ser expulso do tubo flexível com um aspecto homogêneo e com facilidade, ou seja, sob ação de uma força normal [39]. A capacidade de espalhamento pode refletir a consistência de um creme dental, pois uma grande área de espalhamento equivale a uma melhor consistência [11].

Os resultados de consistência dos cremes dentais formulados em comparação com o creme dental comercial também estão descritos na Tabela 4. O teste de habilidade de espalhamento mostrou que todos os cremes dentais formulados apresentaram consistência inferior ao creme dental comercial, destacando-se as formulações com *C. bombicola* e *P. aeruginosa* na presença de fluoreto. Observou-se também que as formulações com quitosana são menos fluidas e mais resistentes ao espalhamento (Fig.1).

### ***Inserir Figura 1***

Bouassida et al. [7] descreve que o teste de capacidade de espalhamento em pasta de dente formulado com o biossurfactante apresentou um valor semelhante ao produto comercial, da ordem de 20 mm. Em contrapartida, Das et al. [11] relata que a formulação do creme dental do biossurfactante extraído de actinobactérias marinhas (*Nocardiosis*) apresentou maior consistência em relação ao creme dental comercial.

A formação de espuma é outra característica desejável de qualquer dentífrico, pois está associada a um melhor espalhamento do produto por toda a cavidade bucal durante a escovação. Os consumidores também preferem composições com boa capacidade de formação de espuma, geralmente obtidas empregando agentes tenso-ativos [7]. Graças à sua propriedade espumante, a inclusão de biossurfactantes em uma formulação de pasta de dentes, pode reduzir significativamente o uso dos surfactantes químicos [11]. Além da capacidade espumante, os surfactantes reduzem a tensão superficial do ambiente líquido em torno da cavidade oral, permitindo que os ingredientes do creme dental entrem em contato com os dentes e mucosas mais facilmente. Essa ação facilita a limpeza, além de dispersar os flavorizantes contidos na fórmula [40].

Os resultados de espumação estão descritos na Tabela 5 e ilustrados na Fig. 2. É possível observar que tanto todas as formulações produziram espuma. Este resultado indica que os biossurfactantes atuam como um bom detergente na pasta de dente, corroborando os resultados obtidos por Das et al. [11], que testaram o biossurfactante produzido por

*Nocardiosis* VITSISB em pasta de dentes em substituição ao Lauril sulfato de sódio, um surfactante muito usado nas formulações comerciais

O creme dental comercial e a formulação com o biossurfactante de *B. cereus* mostraram resultados superiores ao creme dental comercial (85%) no teste de capacidade de formação de espuma, destacando-se a formulação contendo quitosana (95%). Estes resultados indicam que os biossurfactantes são eficientes e comparáveis ao surfactante químico, e que os biossurfactantes também atuam como um bom detergente no dentífrico. Bouassida et al. (2017) relatam a capacidade de formação de espuma para os dentífricos formulados com o biossurfactante de *B. subtilis* de 33%, enquanto que o creme dental comercial apresentou uma emulsificação em torno de 90%.

### ***Inserir Tabela 5/ Inserir Figura 2***

#### ***3.3. Inibição da formação de biofilme por S. mutans pelas pastas de dente***

O controle da higiene bucal por ação mecânica, complementada com agentes químicos é de fundamental importância e, para tal, é necessário o uso de um creme dental com formulação adequada que auxilie na desorganização do biofilme dental. Um fator chave para selecionar o dentífrico é sua eficácia antibacteriana. A adição de agentes antimicrobianos aos dentífricos convencionais visa reduzir o crescimento microbiano e sua colonização na superfície do dente [1,5,6,8,41]. Na Fig. 3 pode-se observar uma diminuição de 2 a 3 Log na viabilidade de *S. mutans* nas superfícies tratadas com as pastas de dentes por 1 minuto em relação ao controle. Pode-se verificar uma eficácia similar entre os produtos formulados e o comercial, o que sugere eficácia dos biossurfactantes associados ao fluoreto de sódio ou a quitosana para compor pasta de dente. Contudo, como os resultados foram obtidos em experimentos in vitro, é fundamental a realização de experimentos in vivo para que se possa determinar a eficácia dos produtos em sistema biológico.



Alguns trabalhos que estudaram o desenvolvimento de cremes dentais à base de quitosana relataram o desenvolvimento de formulações com propriedades melhores no que se refere a atividade antimicrobiana sendo de maior espectro de ação e com efeito residual mais prolongados do que os cremes dentais tradicionais contendo triclosan e fluoreto de sódio [42,43]. Bouassida et al. [7], por sua vez, demonstrou que o creme dental à base do biossurfactante produzido por *B. subtilis* apresentou atividade antimicrobiana efetiva contra os micro-organismos testados.

***Inserir Figura 3***

***3.4. Citotoxicidade das formulações das pastas de dente***

Biossurfactantes e quitosana são compostos naturais com reconhecida baixa toxicidade, atividade antimicrobiana e biocompatibilidade, o que torna esses compostos fortes candidatos em potencial para o desenvolvimento de produtos odontológicos. No entanto, há uma necessidade de se avaliar a toxicidade de compostos naturais contidos em formulações, principalmente em interações não antes estudadas, como o caso dos biossurfactantes com o fluoreto de sódio.

Mediante o exposto, o presente estudo referi pela primeira vez na literatura a toxicidade de formulações de pasta de dente tendo como princípios ativos biossurfactante, quitosana e fluoreto de sódio. As seis formulações das pastas de dentes tiveram sua citotoxicidade avaliada pelo método de MTT (Tabela 6). Os resultados demonstram que as pastas de dente testes foram classificadas como não tóxicas para a linhagem de fibroblastos e de macrófagos apresentando inibição celular abaixo de 7%. Tais resultados sugerem o uso seguro das formulações apresentadas.

***Inserir Tabela 6***

#### 4. Conclusões

Os biossurfactantes testados apresentam resultados promissores como possíveis substituintes dos surfactantes químicos em formulações de produtos de higiene oral, podendo agir não só como agentes espumantes, como também atuar como agente antimicrobiano. A associação dos biossurfactantes com a quitosana ou o fluoreto de sódio apresentou efeito aditivo ou indiferente, comprovando uma interação positiva entre os compostos. As formulações das pastas de dentes foram efetivas para inibir o biofilme formado por *S. mutans*. A presença da quitosana nas formulações também se mostrou importante para aumentar a inibição do biofilme dental. As formulações propostas apresentaram-se atóxicas, o que sugere segurança de seu uso. Mediante aos resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, é fundamental dar continuidade aos estudos aplicando ensaios *in vivo* em sistemas biológicos.

#### Referências

- [1] A. Ali, X.Y. Lim, P.F. Wahida, The fundamental study of antimicrobial activity of Piper betle extract in commercial toothpastes, *J Herbal Med* 14 (2018) 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.08.001>
- [2] E.M. Costa, S. Silva, F.K. Tavarina, M.M. Pintado, Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation, *Anaerobe* 20 (2013) 27-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.002>
- [3] W. Tachaboonyakit, Antimicrobial applications of chitosan, in J.A. Jennings and J.D. Bumgardner, (Eds.), *Chitosan Based Biomaterials*, Vol. 2, *Tissue Eng Therapeutics*. Woodhead Publishing, United Kingdom. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100228-5.00009-2> .
- [4] J.A. Teixeira, A.V.C. Silva, V.E. Santos Júnior, P.C. Melo Júnior, M. Arnaud, M.G. Lima, M.A.P. Flores, T.C.M. Stamford, J.R.D. Pereira, A.G.R. Targino, A. Galembeck, A.

- Rosenblatt, effects of a new nano-silver fluoride-containing dentifrice on demineralization of enamel and *Streptococcus mutans* adhesion and acidogenicity. *Int J Dent* (2018) 1351925. <https://doi.org/10.1155/2018/1351925>
- [5] X. Yan, S. Gu, X. Cui, Y. Shi, S. Wen, H. Chen, J. Ge, Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003, *Microb Pathogen* 127 (2019) 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.039>
- [6] M.J. Verkaik, H.J. Busscher, D. Jager, A.M. Slomp, F. Abbas, H.C Van Der Mei, Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. *J Dent* 39 (2011) 218–224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2010.12.007>
- [7] M. Bouassida, N. Fourati, F. Krichen, R. Zouari, S. Ellouz-Chaabouni, D. Ghribi, Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptides in toothpaste, *J Adv Res* 8 (2017) 425-433. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2010.12.007>
- [8] H. Yuliani, M.S. Perdani, I. Savitri, M. Manurung, M. Sahlan, A. Wijanarko, H. Hermansyah, Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19, *Energy Procedia* 153 (2018) 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.043>
- [9] K. Iqbal, M. Asmat, S. Jawed, A. Mushtaque, F. Mohsin, S. Hanif, Papel de diferentes ingredientes de pastas dentárias e enxaguatórios bucais em saúde bucal. *JPDA*, 20 (2011) 163-170.
- [10] X. Vecino, J.M. Cruz, A.B. Moldes, L.R. Rodrigues, Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. *Critical Rev Biotechnol* 37 (2017) 911-923. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1269053>
- [11] I. Das, S. Roy, S. Chandni, L. Karthik, G. Kumar, K.V.B. Rao, Biosurfactant from marine actinobacteria and its application in cosmetic formulation of toothpaste, *Der Pharmacia Lettre*, 5 (2013) 1-6.

- [12] M. Ersoy, J. Tanalp, E. Ozel, R. Cengizlier, M. Soyman, The allergy of toothpaste: a case report, *Allergol Immunopathol*, v. 36, n. 6, p. 368-370, 2008.
- [13] R. Sahnoun, I. Mnif, H. Fetoui, R. Gdoura, K. Chaabouni, F. Makni-Ayadi, C. Kallel, S. Ellouze-Chaabouni, D. Ghribi, Evaluation of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant toxicity towards mice, *Int J Pep Res Therapeutics* 20 (2014) 333-340. <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9400-5>
- [14] M. Ongena, P. Jacques, *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, *Trends Microbiol* 16 (2008) 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- [15] E.M. Costa, S. Silva, M. Veiga, F.K. Tavarina, M.M. Pintado, A review of chitosan's effect on oral biofilms: Perspectives from the tube to the mouth, *J Oral Biosci*, 59 (2017) 205-210. <https://doi.org/10.1016/j.job.2017.07.001>
- [16] T.M.S. Arnaud, B. Barros Neto, F.B. Diniz, Chitosan effect on dental enamel remineralization: An in vitro evaluation, *J Den* 38 (2010) 848–852. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2010.06.004>
- [17] L.R.R. Berger, T.C. Montenegro Stamford, K.A.R. De Oliveira, A.P.P. De Miranda, M.A.B. De Lima, M.M. Estevez Pintado, M.P. Saraiva Câmara, L. De Oliveira Franco, M. Magnani, E.L. De Souza, Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species, *Int J Biol Macromol* 102 (2018) 635-641. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.178>
- [18] A.K.T. Chang, R.R. Frias Jr., L.V. Alvarez, U.G. Bigol, J.P.M.D. Guzman, Comparative antibacterial activity of commercial chitosan and chitosan extracted from *Auricularia* sp., *Biocatal Agric Biotechnol* 17 (2019) 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.016>
- [19] D.R. Perinelli, L. Fagioli, R. Campana, J.K.W. Lam, W. Baffone, G.F. Palmieri, L. Casettari, G. Bonacucina, Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *Eur J Pharm Sci*, 117 (2018) 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.046>

- [20] E.J. Silva, P.F. Correa, D.G. Almeida, J.M. Luna, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation, *Colloids Surf B: Biointerfaces* 172 (2018) 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.034>
- [21] I.A. Silva, A.H.M. Resende, N.M.P. Rocha E Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Application of biosurfactants produced by *Bacillus cereus* and *Candida sphaerica* in the bioremediation of petroleum derivative in soil and water, *Chem Eng Trans* 64 (2018) 553–558. <https://doi.org/10.3303/CET1864093>
- [22] B.G. Freitas, J.G.M. Brito, P.P.F. Brasileiro, R.D., Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans, *Front Microbiol* 7 (2016) 1646. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01646>
- [23] P.L.L. Freire, A.J.R. Albuquerque, I.A.P. Farias, T.G. Silva, J.S. Aguiar, A. Galembeck, M.A.P. Flores, F.C. Sampaio, T.C.M. Stamford, A. Rosenblatt, Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan – silvernanoparticles – fluoride nanocomposites, *Int J Biol Macromol* 93 (2016) 896–903. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.052>
- [24] D.G. Cooper, B.G. Goldenberg, Surface active agents from two *Bacillus* species, *Appl Environm Microbiol*, 53 (1987) 224-229.
- [25] M.C. Alley, D.A. Scudiero A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine, B.J. Abbott J.G. Mayo, R.H. Shoemaker, M.R. Boyd, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res*, 48 (1988) 589- 601.
- [26] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, *J Immunol Methods*, 65 (1983) 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [27] F.A.R. Rodrigues, I.D.S. Bomfim, B.C. Cavalcanti, C. Pessoa, R.S.B. Goncalves, J. L. Wardell, de M.V.N. Souza, Mefloquine–Oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents, *Chem Biol Drug Design* 83 (2014) 126–131. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12210>

- [28] R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, L.R. Rodrigues, J.A. Teixeira, G.M. Campos-Takaki, Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988, *Colloids Surf B: Biointerfaces* 84 (2011) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.045>
- [29] S.J. Burr, P.A. Williams, I. Ratcliffe, Synthesis of cationic alkylated chitosans and an investigation of their rheological properties and interaction with anionic surfactant, *Carbohydr Polym* 201 (2018) 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.105>
- [30] T.D.A. Senra, S.P. Campana-Filho, J. Desbrières, Surfactant-polysaccharide complexes based on quaternized chitosan. Characterization and application to emulsion stability, *Eur Polym J* 104 (2018) 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.05.002>
- [31] L. Chiappisi, M. Gradzielski, Co-assembly in chitosan–surfactant mixtures: thermodynamics, structures, interfacial properties and applications, *Adv Colloid Int Sci* 220 (2015) 92–107. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.03.003>
- [32] S.C.S. Pinto, S.P. Hilgenberg, D.S. Wambier, P.V. Farago, M.C. Bandéca, F.A. Santos, Characterization of dentifrices containing desensitizing agents, triclosan or whitening agents: EDX and SEM analysis, *Brazilian Dent J*, 25 (2014) 153–159. <https://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201302209>
- [33] A.H.M. Resende, N.M.P. Rocha E Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Biosurfactant production by bacteria isolated from sea water for remediation of environments contaminated with oil products, *Chem Eng Trans* 57 (2017) 1555–1560. <https://doi.org/10.3303/CET1757260>
- [34] J.M. Luna, A.S. Santos Filho, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Production of biosurfactant from *Candida bombicola* URM 3718 for environmental applications, *Chem Eng Trans*, 49 (2016) 583–588. <https://doi.org/10.3303/CET1649098>
- [35] INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Relatório de análise de pasta de dente (uso adulto e uso infantil), 2000.

- <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/pastaDente.asp>>. Accessed in 05 dec 2018.
- [36] S.P. Hilgenberg, S.C.S. Pinto, P.V. Farago, F.A. Santos, D.S. Wambier, Physical-chemical characteristics of whitening toothpaste and evaluation of its effects on enamel roughness. *Brazilian Oral Res*, 25 (2011) 288-294. <https://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242011005000012>
- [37] G. Johannsen, G. Tellefsen, A. Johannsen, A. Liljeborg, The importance of measuring toothpaste abrasivity in both a quantitative and qualitative way. *Acta Odontol Scand* 71 (2013) 508–517. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.696693>
- [38] A. Lussi, B. Megert, D. Eggenberger, T. Jaeggi, Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. *Caries Res*, 42 (2008) 62–67. <https://doi.org/10.1159/000112517>
- [39] Herbal toothpaste. *CONSUMER VOICE* (2013) 17–24.
- [40] E. Vranic, A. Lacevic', A. Mehmedagik, A. Uzunovic', Formulation ingredients for toothpastes and mouthwashes, *Bosn J Basic Med Sci*. 4 (2004) 51–58. <https://doi:10.17305 / bjbms2004.3362>
- [41] M. Prasanth, Antimicrobial efficacy of different toothpastes and mouth rinses: an in vitro study, *Dental Res J*, 8 (2011) 85–94.
- [42] A. Yadav, N. Mohire, Chitosan-based polyherbal toothpaste: As novel oralhygiene product, *Indian J Dental Res*, 21 (2010) 380–384. <https://doi:10.4103 / 0970-9290.70808>
- [43] H. Liu, B. Chen, Z.W. Mao, C.Y. Gao, Chitosan nanoparticles for loading of toothpaste actives and adhesion on tooth analogs, *J Appl Pol Sci* 106 (2007) 4248–4256. <https://doi.org/10.1002/app.27078>

**Tabela 1**

Composição do creme dental formulado com biossurfactante e quitosana (CDBC) e creme dental formulado com biossurfactante e fluoreto de sódio (CDBF)

Componente	Função	Quantidades	
		CDBC	CDBF
Carbonato de sódio	Abrasivo	--	1,5%
Carbonato de cálcio	Abrasivo	1,5 %	--
Cloreto de sódio	Abrasivo	1,5 %	1,5 %
Glicerina	Umectante	4,0%	4,0%
Alginato de sódio	Agente ligante	1,0 %	1,0 %
Flavorizante	Sabor e refrescância	0,5%	0,5%
Fluoreto de Sódio	Princípio ativo	--	0,75%
Quitosana	Princípio ativo	0,75%	--
Biossurfactante	Espumante/tensoativo/ Princípio ativo	0,05%	0,05%
Água deionizada	solvente	4,0%	4,0%



**Tabela 2**

Determinação da Concentração inibitório mínima e da Fração de Concentração Inibitória para a quitosana (C), fluoreto de sódio (NaF) e os biossurfactantes produzidos por *Candida bombicola* URM 3718 (BC), *Bacillus cereus* UCP1615 (BB) e de *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (BP) em combinações ( $\mu\text{g/mL}$ ) e os efeitos encontrados para as combinações frente *Streptococcus mutans* UA 159.

Combinações	Fração de Concentração Inibitória	Tipo de interação
	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
BC + C	0,84	Aditivo
BB + C	1,67	Indiferente
BP + C	1,00	Aditivo
BC + NaF	1,25	Indiferente
BB + NaF	1,67	Indiferente
BP + NaF	1,50	Indiferente

**Tabela 3**

Propriedades dos biossurfactantes produzidos por *Candida bombicola* URM 3718 (BC), *Bacillus cereus* UCP1615 (BB) e de *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (BP) e utilizados na formulação dos cremes dentais.

<b>Biossurfactante</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Tensão superficial</b>	<b>CMC</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	3,6 g/L	29,0 mN/m	1,0 g/L	[21,33]
<b><i>Candida bombicola</i></b>	8,4 g/L	30,0 mN/m	0,5 g/L	[22,34]
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	26,0 g/L	26,5 mN/m	0,6 g/L	[20]

**Tabela 4**

pH e Capacidade de espalhamento (mm) dos cremes dentais, Valores expressos como médias  $\pm$  desvio padrão,

<b>Tipo de creme dental</b>	<b>pH</b>	<b>Capacidade de espalhamento (mm)</b>
<b>Comercial</b>	9,26	24,0 $\pm$ 0,5
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>B, cereus</i> + fluoreto</b>	9,16	10,1 $\pm$ 0,2
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>B, cereus</i> + quitosana</b>	9,13	08,2 $\pm$ 0,1
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>C, bombicola</i> + fluoreto</b>	9,09	17,0 $\pm$ 0,3
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>C, bombicola</i> + quitosana</b>	9,08	12,1 $\pm$ 0,4
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>P, aeruginosa</i> + fluoreto</b>	9,14	17,0 $\pm$ 0,5
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>P, aeruginosa</i> + quitosana</b>	9,00	11,1 $\pm$ 0,5

**Tabela 5**

Medição da espuma das formulações dos cremes dentais, Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão,

<b>Tipo de creme dental</b>	<b>Formação de espuma (%)</b>
<b>Comercial</b>	85,00 $\pm$ 0,00
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>B, cereus</i> + fluoreto</b>	90,00 $\pm$ 3,72
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>B, cereus</i> + quitosana</b>	95,12 $\pm$ 5,31
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>C, bombicola</i> + fluoreto</b>	66,63 $\pm$ 6,73
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>C, bombicola</i> + quitosana</b>	63,71 $\pm$ 7,05
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>P, aeruginosa</i> + fluoreto</b>	65,55 $\pm$ 5,91
<b>Formulado com o biossurfactante de <i>P, aeruginosa</i> + quitosana</b>	75,64 $\pm$ 6,42

**Tabela 6**

Percentagem de inibição das linhagens celulares de fibroblastos de camundongos (L929) e de macrófagos de camundongos (RAW 264,7) expostos às pastas de dente formuladas contendo como princípios ativos: biossurfactante de *C. bombicola* + Fluoreto de sódio (PDBCBNaF), biossurfactante de *B. cereus* + Fluoreto de sódio (PDBBCNaF), biossurfactante de *P. aeruginosa* + Fluoreto de sódio (PDBPANAf), biossurfactante de *C. bombicola* + quitosana (PDCBC), biossurfactante de *B. cereus* + quitosana (PDBCC), biossurfactante de *P. aeruginosa* + quitosana (PDPAC) e a pasta de dente comercial (PDC),

Enxaguatórios	% inibição celular			
	L929	EP	RAW 264,7	EP
PDBCBNaF	0,0	0,0	0,0	0,0
PDBBCNaF	0,0	0,0	0,0	0,0
PDBPANAf	6,83	2,31	0,0	0,0
PDCBC	0,0	0,0	0,0	0,0
PDBBC	4,91	3,58	0,0	0,0
PDPAC	0,0	0,0	0,0	0,0
PDC pura				
PDC 50%				

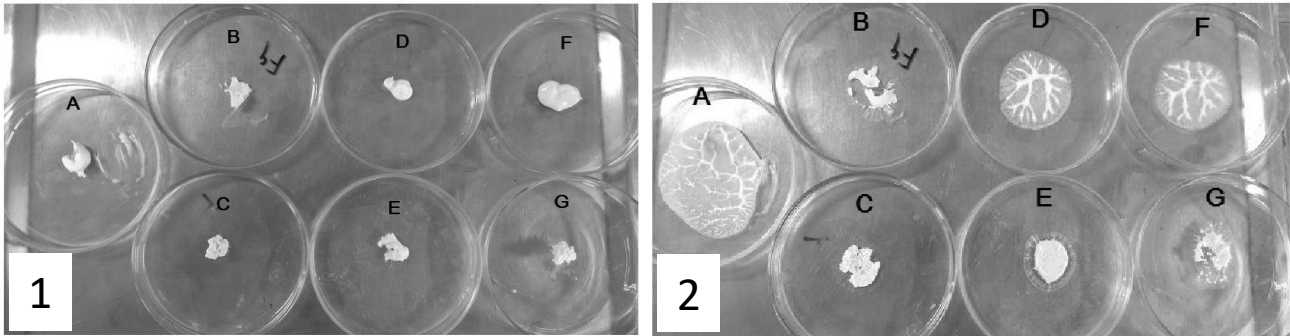
\*EP = erro padrão

## LEGENDAS DAS FIGURAS

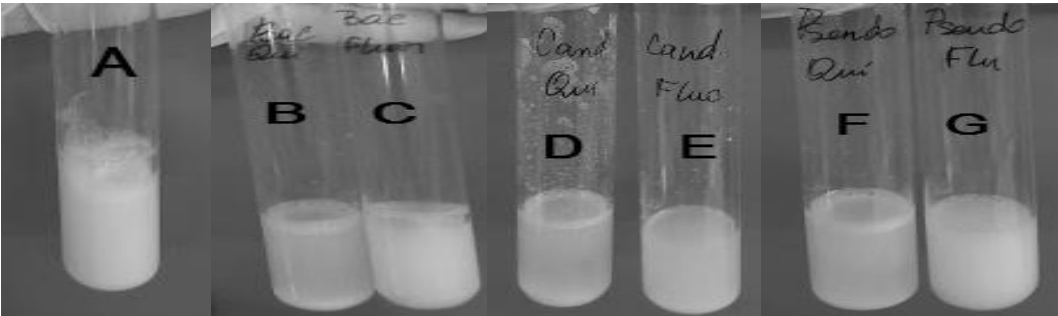
**Fig, 1,** Aparência da consistência, antes (1) e após (2) espalhamento dos cremes dentais: comercial contendo cloreto de cetilpiridínio e fluoreto de sódio (A), pastas de dente contendo biossurfactante extraído de *B, cereus* + fluoreto de sódio (B) ou + quitosana (C), biossurfactante extraído de *C, bombicola* + fluoreto de sódio (D) ou + quitosana (E) e biossurfactante extraído de *P, aeruginosa* + fluoreto de sódio (F) ou + quitosana (G),

**Fig, 2,** Formação de espuma das formulações dos cremes dentais: comercial contendo cloreto de cetilpiridínio e fluoreto de sódio (A), pastas de dente contendo biossurfactante de *B, cereus* + quitosana (B) ou + fluoreto de sódio (C), biossurfactante de *C, bombicola* + quitosana (D) ou + fluoreto de sódio (E) e biossurfactante de *P, aeruginosa* + quitosana (F) ou + fluoreto de sódio (G),

**Fig, 3,** Contagem de *S, mutans* viáveis no biofilme pré-formado durante 24h a 37°C em saliva artificial modificada após o tratamento por 30 segundos com pasta comercial contendo cloreto de cetilpiridínio e fluoreto de sódio, pastas de dente contendo biossurfactante de *C, bombicola* + fluoreto de sódio (BSCBF) ou + quitosana (BSCBC), biossurfactante de *B, cereus* + fluoreto de sódio (BSBCF) ou + quitosana (BSBCC) e biossurfactante de *P, aeruginosa* + fluoreto de sódio (BSPAF) ou +quitosana (BSPAC) e controle (solução salina 0,9%),

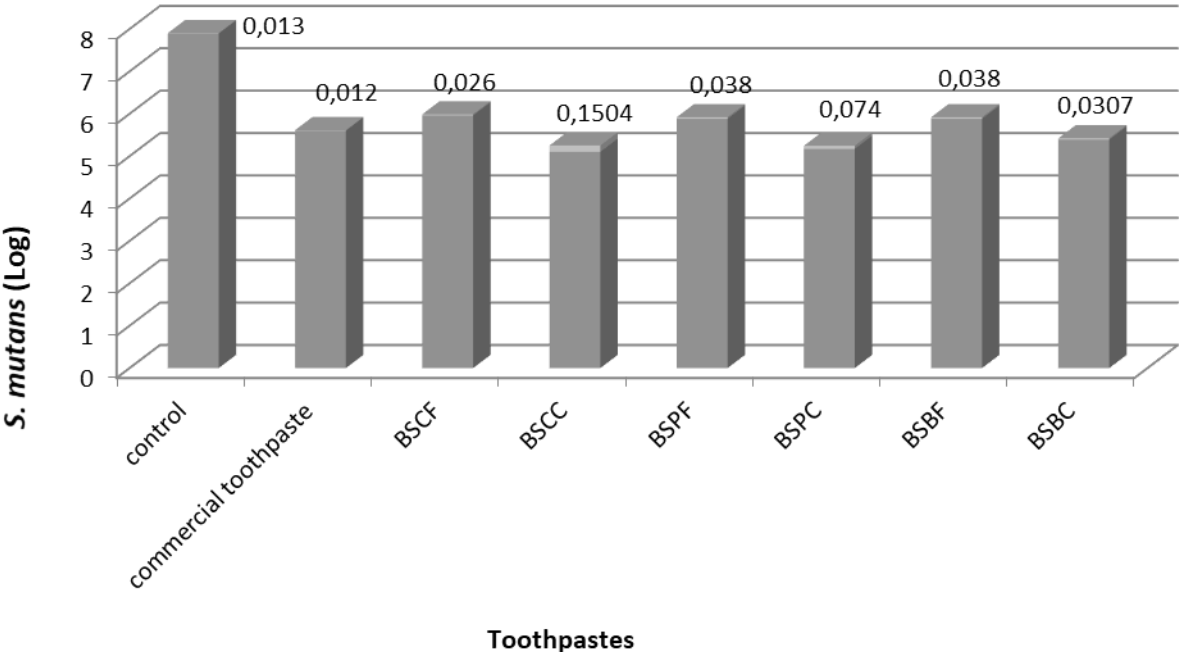


Fig, 1



Fig, 2





**Fig, 3**

# **CAPÍTULO IV**

## CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados nessa pesquisa permitem as seguintes conclusões:

- Os biossurfactantes obtidos dos micro-organismos *Bacillus cereus*, *Candida bombicola* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentam adequação nas formulações dos produtos de higiene oral,
- Os biossurfactantes, associados ou não à quitosana, mostram eficiência e semelhança nos testes comparativos com uma pasta comercial,
- Todas as substâncias estudadas apresentam propriedades antimicrobianas para os micro-organismos cariogênicos,
- Os enxagatários testes apresentaram toxicidade significativamente inferior ao enxagatário comercial,
- A presença de quitosana nos enxagatários bucais aumenta a capacidade antimicrobiana se comparado aos enxagatários contendo apenas os biossurfactantes,
- As formulações de creme dental são atóxicas e efetivas para inibir o biofilme formado por *S. mutans*,
- As formulações do creme dental contendo quitosana apresentam resultados superiores quanto à atividade antimicrobiana em relação às formulações contendo apenas os biossurfactantes,
- Os biossurfactantes testados, bem como a quitosana, são promissores como possíveis substituintes de surfactantes químicos em formulações e produtos de higiene oral, podendo agir não só como agentes espumantes, como também atuar como agentes antibacterianos,
- Os produtos naturais e biodegradáveis utilizados nessa pesquisa são candidatos promissores como substitutos dos similares químicos usados nas indústrias do país,

## ANEXOS

From: **International Journal of Biological Macromolecules** <[EviseSupport@elsevier.com](mailto:EviseSupport@elsevier.com)>

Date: dom, 7 de fev de 2019 às 18:18

Subject: Revision requested for IJBIOMAC\_2019\_127

To: <[leonie@unicap.br](mailto:leonie@unicap.br)>

*This message was sent automatically,*

Ref: IJBIOMAC\_2019\_127

Title: Mouthwash containing a biosurfactant and natural products: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms

Journal: International Journal of Biological Macromolecules

Dear Dr, Sarubbo,

Thank you for submitting your manuscript to International Journal of Biological Macromolecules, I have completed the review of your manuscript and a summary is appended below, The reviewers recommend reconsideration of your paper following major revision, I invite you to resubmit your manuscript after addressing all reviewer comments,

When resubmitting your manuscript, please carefully consider all issues mentioned in the reviewers' comments, outline every change made point by point, and provide suitable rebuttals for any comments not addressed,

To submit your revised manuscript:

- Log into EVISE® at:  
[http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL\\_ACR=IJBIOMAC](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=IJBIOMAC)
- Locate your manuscript under the header 'My Submissions that need Revisions' on your 'My Author Tasks' view
- Click on 'Agree to Revise'
- Make the required edits
- Click on 'Complete Submission' to approve

### What happens next?

After you approve your submission preview you will receive a notification that the submission is complete, To track the status of your paper throughout the editorial process, log in to Evise® at:

[http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL\\_ACR=IJBIOMAC](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=IJBIOMAC),

**Enrich your article to present your research with maximum impact**, This journal supports the following [Content Innovations](#):

Data in Brief (optional)

We invite you to convert your supplementary data (or a part of it) into a Data in Brief article, Data in Brief articles are descriptions of the data and associated metadata which are normally buried in supplementary material, They are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and freely available to all upon publication, Data in Brief should be uploaded with your revised manuscript directly to International Journal of Biological Macromolecules, If your International Journal of Biological Macromolecules research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to our new, fully Open Access journal, Data in Brief, where it will be editorially reviewed and published as a separate data article upon acceptance, The Open Access fee for Data in Brief is \$500, This fee applies to Data in Brief articles submitted via International Journal of Biological Macromolecules between July 1st and December 31st, 2017,

Please just fill in the template found here:

[http://www.elsevier.com/inca/publications/misc/dib\\_data%20article%20template\\_for%20other%20journals.docx](http://www.elsevier.com/inca/publications/misc/dib_data%20article%20template_for%20other%20journals.docx), Then, place all Data in Brief files (whichever supplementary files you would like to include as well as your completed Data in Brief template) into a .zip file and upload this as a Data in Brief item alongside your International Journal of Biological Macromolecules revised manuscript, Note that only this Data in Brief item will be transferred over to Data in Brief, so ensure all of your relevant Data in Brief documents are zipped into a single file, Also, make sure you change references to supplementary material in your International Journal of Biological Macromolecules manuscript to reference the Data in Brief article where appropriate,

Questions? Please send your inquiries to [dib@elsevier.com](mailto:dib@elsevier.com), Example Data in Brief can be found here: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/23523409>

I look forward to receiving your revised manuscript as soon as possible,

Kind regards,

Professor Kennedy  
Editor  
International Journal of Biological Macromolecules