

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de

Alimentos Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

e Bioprospecção



Dissertação

Desenvolvimento de duas formulações de enxaguante bucal à base de Cloramina T:
um estudo *in vitro*

Thobias Toniolo de Souza

Thobias Toniolo de Souza

Desenvolvimento de duas formulações de enxaguante bucal à base de Cloramina T:
um estudo *in vitro*

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Bioprospecção do Centro
de Ciências Químicas, Farmacêuticas e
de Alimentos da Universidade Federal
de Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Ciências (Área de Concentração:
Bioquímica e Bioprospecção)

Orientador: Rodrigo de Almeida Vaucher
Coorientação: Janice Luhering Giongo

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

S719d Souza, Thobias Toniolo de

Desenvolvimento de duas formulações de enxaguante bucal à base de Cloramina T [recurso eletrônico] : um estudo *in vitro* / Thobias Toniolo de Souza ; Rodrigo de Almeida Vaucher, orientador ; Janice Luhering Giongo, coorientadora. — Pelotas, 2024.

77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Periodontite. 2. Cárie. 3. Biofilmes. 4. Antissépticos Bucais. 5. Compostos Clorados. I. Vaucher, Rodrigo de Almeida, orient. II. Giongo, Janice Luhering, coorient. III. Título.

CDD 617.63

Thobias Toniolo de Souza

Desenvolvimento de duas formulações de enxaguante bucal a base de Cloramina T:
um estudo in vitro

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas

Data da defesa: 24/05/2024

Banca examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher (Orientador)
Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Profa. Dra. Cristiane Luchese
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria)



Prof. Dr. Clóvis Moreira Junior
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Marco Antônio e Eliana, e minha irmã, Giovanna, pelo apoio incondicional que obtive nesse processo. Vocês sempre estiveram comigo, e sou profundamente grato a isso;

Gostaria de agradecer também, aos meus tios Isabel e Alcione, e aos meus primos Matteo e Pietro. Agradeço todas as conversas e momentos que tivemos, e também sou grato por todo o carinho, cuidado e amor ao me acolherem;

A estes acima, eu dedico o sinônimo de Família.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Vaucher, pela paciência e pela sua orientação. Vou lembrar sempre dos seus conselhos e da sua parceria comigo, que se estende além do ambiente acadêmico.

Agradeço também a minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Janice Giongo, pelo carinho materno que cultivou em mim. Pelas palavras de conforto e pela orientação em tempos difíceis.

À equipe LAPEBBIOM, pela parceria em projetos, trabalhos, orientações e ajudas. Em especial, aos colegas Rafaely, Luíze, Matheus, Mikaelly, Milena e Vitor que sempre foram parceria para experimentos, conversas, orientações e risadas no laboratório. Nossa interação se estendia além do campo acadêmico, e cultivo hoje, em vocês, uma verdadeira amizade.

Às colegas Andressa, Carla e Patrícia, pelo carinho, pela compreensão e por toda ajuda na minha trajetória acadêmica. Sem vocês, tudo seria mais difícil.

Aos IC's Vithor, Moara, Nathalia e Analice, que sempre foram e me ajudaram quando precisei estar ausente ou realizando outras tarefas. A ajuda e o trabalho de vocês foram indispensáveis para a realização deste.

Agradeço também a Sílvia Hübner e Renata Gressler, que conseguiram atender às minhas demandas em tempo recorde. O trabalho de vocês será lembrado com muito carinho.

Agradeço ao Prof. Claudio Martin Pereira de Pereira e a Amanda

Leitzke; a Clarisse e Letícia pela ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço às minhas tias: Nélia e Lucilene, por sempre me incentivarem a seguir nessa carreira e nos estudos; e aos meus primos Adriano e Karla; o carinho e o incentivo de vocês comigo é lembrado até hoje.

Agradeço às demais pessoas que participaram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho; seja em ambiente acadêmico ou em ambiente pessoal.

"It's always darkest before the dawn"

(Florence Welch, 2011)

Resumo

SOUZA, Thobias Toniolo de. **Desenvolvimento de duas formulações de enxaguante bucal à base de Cloramina T: um estudo *in vitro***. 2024, 71f, Dissertação (Mestrado em Ciências Área de Concentração: Bioquímica e Bioprospecção) Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024

INTRODUÇÃO: Certas patologias bucais podem acarretar na perda dental, em destaque a cárie, uma patologia multifatorial que afeta os tecidos duros dos dentes, desmineralização e inflamação gengival. O desenvolvimento do biofilme dental e as cáries estão diretamente relacionados. A clorexidina consolidou-se como padrão outro como tratamento; no entanto, pesquisas sugerem preocupações quanto à resistência bacteriana ao medicamento, destacando a necessidade de alternativas. Faz-se necessário desenvolver novas composições e avaliar suas características. Este estudo propôs desenvolver duas formulações de enxaguante bucal com base em cloramina T, caracterizá-las e avaliar suas propriedades citotóxicas, antibacterianas e antibiofilme, bem como sua estabilidade. **METODOLOGIA:** Desenvolvemos duas formulações contendo Cloramina, uma projetada para o público infantil e outra para o público adulto. As formulações foram caracterizadas utilizando espectroscopia FT-IR, análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de varredura diferencial (DSC). Sua estabilidade foi pela medição de pH por 60 dias em 3 diferentes condições. A atividade antimicrobiana foi determinada por microdiluição em caldo, seguida da curva de morte. A atividade antibiofilme das formulações foram avaliadas utilizando o ensaio de quantificação por cristal violeta, dosagem de carboidratos totais e microscopia de força atômica (MFA). A atividade citotóxica foi realizada através de ensaios hemolíticos, MTT e vermelho neutro. **RESULTADOS:** Resultados indicam que ambas as formulações foram estáveis a 4°C. A caracterização sugere que a cloramina T se manteve presente após a preparação das formulações. Ambas foram eficazes quanto às atividades antibacterianas, com CIM e CBM de 3,125 mM para *S. mutans* e 0,875 mM para *S. aureus*, com característica bactericida. A curva de morte bacteriana corrobora a atividade contra as cepas utilizadas. Os ensaios antibiofilme demonstraram atividade contra todos os biofilmes formados, com quantificação reduzida por cristal violeta e dosagem de carboidratos quando há aplicação das formulações. A atividade antibiofilme é corroborada com os resultados demonstrados pela MFA. Citotoxicidade elevada foi demonstrada em todos os ensaios realizados, com média de IC50 das formulações de 0,849 mM (F1) e 1,106 mM (F2). **CONCLUSÃO:** Conclui-se que ambas formulações, apesar de demonstrarem elevada citotoxicidade, demonstraram resultados promissores em relação às atividades *in vitro* das atividades antibacteriana e antibiofilme de *S. aureus* e *S. mutans*, apresentando também certa estabilidade e suas caracterizações sugerem a presença estável do composto após a síntese das formulações. Portanto, sugere-se uma nova proposta de tratamento alternativo aos já utilizados comercialmente.

Palavras-chave: Periodontite; Cárie; Biofilmes; Antissépticos Buciais; Compostos Clorados

Abstract

SOUZA, Thobias Toniolo de. **Development of Two Chloramine T-Based Mouthwash Formulations: An *in vitro* Study**. 2024, 68f, Dissertation (master's degree in Biochemistry and Bioprospecting) Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting. Federal University of Pelotas, Pelotas - RS. 2024.

Introduction: Certain oral pathologies can lead to tooth loss, particularly dental caries, a multifactorial disease that affects the hard tissues of the teeth, causing demineralization and gingival inflammation. The development of dental biofilm is directly related to the occurrence of caries. Chlorhexidine has long been established as the gold standard for treatment; however, research suggests concerns regarding bacterial resistance to this medication, highlighting the need for alternatives. It is essential to develop new compositions and evaluate their characteristics. This study aimed to develop two chloramine T-based mouthwash formulations, characterize them, and assess their cytotoxic, antibacterial, and antibiofilm properties, as well as their stability. **Methodology:** Was developed two formulations containing chloramine T, one designed for children and the other for adults. The formulations were characterized using FT-IR spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA), and differential scanning calorimetry (DSC). Their stability was assessed by measuring pH over 60 days under three different conditions. Antimicrobial activity was determined by broth microdilution followed by a kill curve analysis. The antibiofilm activity of the formulations was evaluated using crystal violet quantification, total carbohydrate assay, and atomic force microscopy (AFM). Cytotoxicity was assessed through hemolytic assays, MTT, and neutral red uptake assays. **Results:** Results indicated that both formulations remained stable at 4°C. Characterization suggested that chloramine T was preserved after formulation preparation. Both formulations demonstrated effective antibacterial activity, with MIC and MBC values of 3.125 mM for *Streptococcus mutans* and 0.875 mM for *Staphylococcus aureus*, indicating bactericidal properties. The bacterial kill curve corroborated the activity against the tested strains. Antibiofilm assays showed activity against all formed biofilms, with reduced crystal violet staining and carbohydrate content when the formulations were applied. The antibiofilm activity was further supported by AFM results. High cytotoxicity was observed in all assays, with mean IC₅₀ values of 0.849 mM (F1) and 1.106 mM (F2). **Conclusion:** Despite demonstrating high cytotoxicity, both formulations showed promising *in vitro* results regarding antibacterial and antibiofilm activities against *S. aureus* and *S. mutans*. They also exhibited certain stability, and characterization indicated the stable presence of chloramine T after formulation synthesis. Therefore, these formulations suggest a potential alternative treatment to those currently available commercially.

Keywords: Periodontitis; Dental caries; Biofilms; Oral antiseptics; Chlorinated compounds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação de biofilme	18
Figura 2: Estrutura molecular da clorexidina	28
Figura 3: Estrutura molecular da cloramina T	37

Sumário

1. Introdução	10
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos	12
3. Revisão bibliográfica	13
3.1. Doenças orais	13
3.2. Biofilmes	15
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> : importância clínica	17
3.4. <i>Streptococcus mutans</i> : importância clínica	19
3.5. Tratamento de doenças periodontais	21
3.6. Citotoxicidade de novas formulações	24
3.7. Cloramina T	26
4. Manuscrito	30
5. Disucssão	63
6. Conclusões	64
7. Perspectivas	65
8. Referências	65

1. Introdução

Um dos elementos fundamentais correspondentes à saúde humana é a saúde bucal. Gill et al. (2022) define a saúde bucal como ausência de dor crônica no rosto e boca, câncer oral e de garganta, infecções e feridas bucais, doença periodontal, cárie dentária, perda de dentes e outros distúrbios que impactam a capacidade individual de morder, mastigar, sorrir e falar, influenciando diretamente o bem-estar psicossocial.

A periodontite é uma condição preocupante de saúde bucal. Kwon, Lamster e Levin (2021) demonstram que a periodontite é uma doença comum que afeta 40% dos cidadãos americanos. Além disso, os autores explicam a periodontite como uma inflamação persistente multifatorial, associada ao acúmulo de biofilme dental. A perda gradual dos tecidos de suporte dentais, como o osso alveolar e o ligamento periodontal, é o resultado final desta doença.

A cárie dentária, também conhecida como deterioração dentária, se define como uma doença que afeta os tecidos duros dos dentes. Inicialmente, a doença se manifesta por meio de desmineralização sub-superficial ou pequenas irregularidades na superfície. Em seguida, isso pode evoluir para cavitação, inflamação, comprometimento da polpa, formação de abscesso e sintomas sistêmicos (MATHUR et al., 2018). Vários microrganismos, com destaque os estreptococos e os lactobacilos, exibem diversos mecanismos cariogênicos e, dentre estes mecanismos, se faz presente a capacidade de formação de biofilme. (MATHUR et al., 2018).

Os biofilmes são comunidades bacterianas aderidas a uma superfície que, por meio de mecanismos intrínsecos mediados por expressões gênicas, sintetizam uma matriz polissacarídica. Esta matriz impede a ação antimicrobiana de antissépticos empregados no tratamento de doenças (SENEVIRATNE et al., 2011), portanto, o biofilme bacteriano é uma forma de resistência bacteriana. A aplicação de antissépticos para a prevenção e o tratamento de biofilmes maduros, portanto, se faz necessária.

Um antisséptico amplamente utilizado na odontologia é a clorexidina. Estudos recentes acerca da clorexidina confirmam o efeito significativo da

substância no biofilme dentário, sem muitas desvantagens. Porém, alguns trabalhos encontrados na literatura já relataram a perda da susceptibilidade ou a adaptação de certas cepas bacterianas à clorexidina. (KAMPF et al., 2016; DEMARCO et al., 2007; VAN LAGEMAAT et al., 2022; HUANG et al., 2016) Também é reportado em alguns estudos a pigmentação dentária após o uso da clorexidina (LIM, KAM, 2008; SHETTY et al., 2013). Faz-se necessário, portanto, o estudo de novas formulações como alternativa à clorexidina. Compostos como a cloramina T, que possuem sua atividade antimicrobiana consolidada, porém não ao todo elucidada, demonstram potencial para o desenvolvimento de novas alternativas para combate a periodontite e a cárie.

A cloramina T (CLT) é um composto que pertence à classe das clorinas, com alta capacidade de oxidação. Um dos primeiros relatos do seu uso, descrito por Dankin (1916), descreve características físico químicas da CLT, sendo proposta sua utilização em trabalhos posteriores (CHARLTON; LEVINE, 1935; CUNHA, 1952). Trabalhos recentes mostram que a CLT possui atividade contra a erradicação de biofilmes de *Candida* spp. (FERREIRA, 2017), *Pseudomonas* spp. (KEKEÇ et al., 2016) e *Staphylococcus* spp. (RAY, 2020). Além disso, a CLT é comumente empregada em setores odontológicos (BUSSADORI et al., 2011; NOGUEIRA et al. 2021; RANGEL, 2018; PITTEN, KRAMER, 1999) como enxaguantes bucais e cremes dentais contendo a substância, tendo como propósito o seu potencial contra biofilmes.

Apesar disso, a literatura carece de estudos dessa substância quando aplicada em formulações, podendo destacar a necessidade do desenvolvimento e dos estudos *in vitro* acerca dessas. Visto que comercialmente é disponibilizado enxaguantes também para o público infantil, o desenvolvimento e o estudo de uma formulação própria para o este público também faz-se necessário.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi desenvolver duas formulações para

enxaguante bucal à base de Cloramina T e avaliar sua estabilidade, atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1.** Desenvolver formulações de cloramina T baseadas em formulações comerciais já utilizadas no mercado;
- 2.2.2.** Realizar testes referentes à caracterização e à estabilidade das formulações realizadas;
- 2.2.3.** Avaliar as atividades antimicrobianas da cloramina T livre e as suas formulações;
- 2.2.4.** Avaliar a atividade da cloramina T livre e em formulações frente a um modelo de biofilme maduro de *S. mutans* e *S. aureus*.
- 2.2.5.** Realizar ensaios *in vitro* de citotoxicidade da Cloramina T livre e suas respectivas formulações.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Doenças orais

De acordo com a OMS (2022), 45% da população mundial sofre com doenças orais. A OMS também estima que 2 milhões de pessoas sofram de cárie em dentes permanentes (WHO, 2023). A periodontite é uma condição inflamatória desencadeada por mecanismos de bactérias orais, resposta inflamatória do hospedeiro e sob influência de fatores ambientais. A ausência de tratamento adequado resulta em danos nos tecidos moles, perda óssea e, por conta destes fatores, uma possível perda dos dentes; além disso a resposta do hospedeiro pode contribuir para o agravamento dos sintomas associados (SCANNAPIECO; GERSHOVICH, 2020; SHADDOX; MORFORD; NIBALI, 2021). O International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions (1999) classificou a periodontite em periodontite crônica e agressiva, e, adicionalmente a cada uma dessas formas, a periodontite pode ser classificada como localizada ou generalizada (ARMITAGE; CULLINAN; SEYMOUR, 2010).

Cáries dentárias são doenças geralmente associadas à infância, porém, estudos reportam um número crescente de adultos acometidos com esta doença (CHAN et al., 2021; SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). A cárie dentária se define como a destruição dos tecidos dentais duros, suscetíveis à ação de ácidos orgânicos produzidos pela fermentação bacteriana de açúcares e carboidratos presentes na dieta. Trata-se de uma doença reversível quando tratada corretamente. Porém, se não tratadas, as lesões cariosas progridem com o tempo e podem afetar o esmalte, o cemento, e a dentina. (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007).

Os mecanismos de cariogenicidade são geralmente associados à produção de ácidos orgânicos por bactérias presentes em biofilmes bucais. Estes ácidos, destacando o ácido lático, são produzidos após o metabolismo de carboidratos fermentáveis (principalmente açúcares), causando a desmineralização dental, que resulta em cáries na superfície do esmalte e, posteriormente, abaixo dele. Com o acúmulo de ácidos, o pH da mucosa oral reduz, resultando na perda de cálcio e íons fosfato da estrutura da

hidroxiapatita do esmalte dentário, o que causa a desmineralização parcial do dente. A porosidade e o afastamento dos cristais de esmalte são aumentados e, como resultado, os ácidos podem atingir o mineral abaixo da superfície, o que resulta na desmineralização subsuperficial dentária (PITTS et al., 2017).

Os biofilmes dentais, comumente conhecidos como placas bacterianas, são as principais causas de doenças periodontais, como gengivite e cárie (SCANNAPIECO; GERSHOVICH, 2020; SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). O biofilme faz parte da microbiota oral e é benéfico ao hospedeiro ao prevenir a colonização por patógenos exógenos, desde que não provoque respostas inflamatórias. No entanto, fatores de estresse podem romper essa homeostase, causando inflamação (LARSEN; FIEHN, 2017). Além disso, sem higiene dental adequada, o biofilme supragengival pode evoluir para o biofilme subgengival (LARSEN; FIEHN, 2017), portanto em condições adversas, o biofilme dental pode levar a infecções bucais, aderindo e acumulando-se especialmente em áreas protegidas como fissuras, entre dentes e ao longo da margem gengival. Dessa forma, o biofilme torna-se um mecanismo de resistência estratégico para o microrganismo, ao provocar alterações de células planctônicas para células sésseis. Estima-se que o biofilme está associado a 65% de infecções nosocomiais e contribuem em mais de 80% das infecções em humanos (HANCOCK; DAHL; KLEMM, 2010).

A formação do biofilme é promovida pelo ambiente favorável ao crescimento bacteriano anaeróbico. A adesão bacteriana e a colonização das superfícies dentárias também contribuem primordialmente para a formação do biofilme. Muitos estreptococos orais possuem a capacidade de ligar-se a certos tipos de proteínas presentes na cavidade oral, como a alfa-amilase. Tais bactérias são conhecidas como colonizadoras precoces, agindo na formação primordial do biofilme (HOJO et al., 2009). Posteriormente, bactérias capazes de formar uma ligação mais forte acabam maturando o biofilme, ligação essa que se dá por meio de pares de receptores de glicoproteínas na película formada. Exemplos de bactérias que formam a película e maturam o biofilme são dados por cepas de *Streptococcus*, como *S. mutans* e bacilos gram-positivos, como *Actinomyces* spp.,

respectivamente (HOJO et al., 2009).

Além dos fatores inflamatórios causados pelos biofilmes dentais, fatores sociais (como família, políticas de saúde e nível socioeconômico) e doenças como diabetes e tabagismo também influenciam a susceptibilidade a doenças periodontais. Esses fatores alteram o equilíbrio entre a defesa do hospedeiro e os patógenos na mucosa oral. As medidas preventivas e terapêuticas atuais, embora considerem fatores clínicos e sociais, focam principalmente no combate às bactérias orais e na prevenção da formação do biofilme (LARSEN; FIEHN, 2017; KWON; LAMSTER; LEVIN, 2021).

3.2. Biofilmes

O biofilme pode ser definido como comunidades bacterianas aderidas a superfícies, sejam abióticas ou bióticas, envoltas por uma matriz polimérica extracelular (MPE). Essas comunidades proporcionam um ambiente protetor para a sobrevivência das células bacterianas em condições hostis (DEL POZO, 2018; ERSKINE; MACPHEE; STANLEY-WALL, 2018).

As bactérias representam apenas 10% da massa total do biofilme, enquanto a MPE compõe entre 70 a 95% dessa massa. A distribuição do biofilme depende da difusão de oxigênio, onde bactérias nas camadas superficiais, em contato com O₂, são metabolicamente mais ativas, e as nas camadas profundas permanecem em estado de latência (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

A MPE é composta por lipídeos, ácidos nucleicos, polissacarídeos, proteínas e exopolissacarídeos (EPS), desempenhando funções estruturais, de coesão, integridade funcional e defesa contra estresses. Ela permite a entrada de água, nutrientes e genes de resistência através de canais proteicos para trocas gasosas e eliminação de toxinas (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018; MENOITA et al., [S.D.]).

A formação do biofilme (FIGURA 1) inicia-se com a adesão de bactérias planctônicas, denominadas colonizadoras primárias, a uma superfície, formando um filme primário que facilita a posterior adesão do biofilme. Fatores ambientais, como concentrações de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e substratos, além de características bacterianas como

flagelos, pili, adesinas e fímbrias, influenciam essa adesão (MENOITA et al., [S.D.]). A adesão inicial do biofilme é influenciada por lipopolissacarídeos (LPS) em bactérias Gram-negativas, e por peptidoglicanos espessos e glicopolímeros de superfície. Esses mecanismos podem sofrer alterações genéticas sob estresse, formando biofilmes mais resistentes (Ruhail; Kataria, 2021).

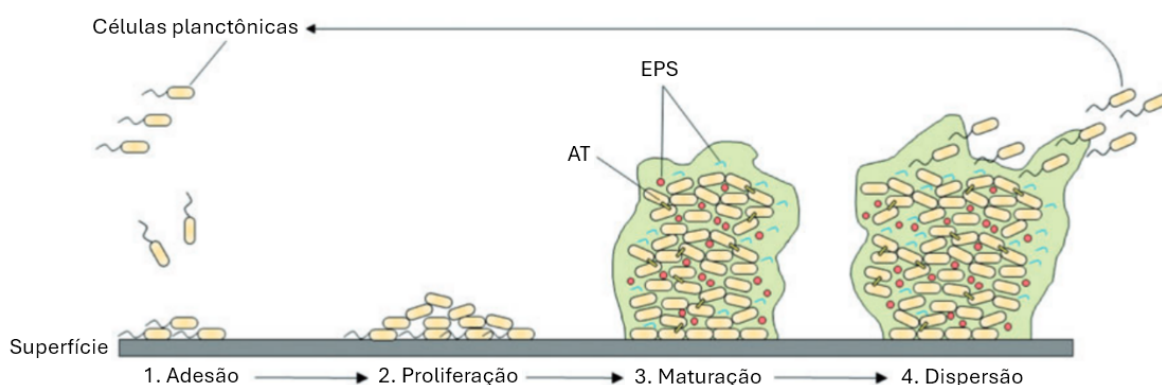


Figura 1: Imagem representando o diagrama da formação de biofilmes em superfícies.

Modificada de: Alav Sutton e Rahman (2018).

Em seguida, ocorre a formação de microcolônias e a maturação do biofilme, com produção de EPS que fixa e agrupa as células bacterianas. Forças de Van der Waals predominam na adesão ao EPS. Formam-se canais de água, permitindo a entrada de substâncias, culminando em um biofilme maduro (MENOITA et al., [S.D.]; JAMAL et al., 2018).

Após a maturação, células bacterianas são liberadas para formar biofilmes em novos sítios, reguladas por quorum-sensing, um sistema de comunicação célula-célula mediado por autoindutores. Esses autoindutores são moléculas químicas sinalizadoras, ligando-se a receptores específicos para a comunicação bacteriana em um grupo. Os autoindutores podem ser encontrados em bactérias gram-negativas, utilizando lactona homoserina acetilada, e em gram-positivas, que utilizam peptídeos secretados por transportadores de ATP tipo ABC (MILLER, 2001; RUTHERFORD; BASSLER, 2012). O quorum-sensing pode induzir células persisters, que apresentam resistência a diversos fármacos devido à latência metabólica, sendo mais virulentas que bactérias resistentes geneticamente (LEUNG; LÉVESQUE, 2012; CONLON; ROWE; LEWIS, 2015).

Clinicamente, biofilmes estão presentes em 80% das infecções microbianas, atuando como reservatórios de patógenos e prolongando infecções. São comuns em ambientes hospitalares, afetando pacientes com fibrose cística, lesões crônicas, dispositivos ortopédicos e cateteres intravenosos e urinários (Chernysh et al., 2018; Høiby et al., 2015). Biofilmes também resistem aos mecanismos de defesa do hospedeiro, dificultando a penetração de anticorpos e células inflamatórias devido à MPE (Stewart, 2014).

Na odontologia, como previamente mencionado, biofilmes estão relacionados a cáries e periodontites, e com o agravamento destas, associa-se a incidência de outras comorbidades, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, Alzheimer e câncer de pâncreas. Destaca-se, dentre as bactérias produtoras de biofilme, a presença de *Staphylococcus aureus*, relevante em biofilmes de implantes dentários, e *Streptococcus mutans*, uma das principais bactérias cariogênicas (Jönsson et al., 2011; Krishnan et al., 2007; Ruhai; Kataria, 2021).

3.3. *Staphylococcus aureus*: importância clínica

Dentre inúmeras cepas bacterianas que podemos encontrar na cavidade oral, destaca-se a presença de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Smith, Jackson e Bagg (2001), compilaram dados de outros autores e citaram que a presença de *S. aureus* na cavidade oral está mais associada a pacientes infantis.

O gênero *Staphylococcus* compõe bactérias gram-positivas com diâmetro de 0,5 a 1,5 micrômetros, e este gênero é marcado por bactérias imóveis e não esporuladas, que possuem colônias em ágar arredondadas, lisas e brilhantes. *S. aureus* são organismos com temperatura de crescimento variando de 7 e 47°C, portando, mesófilas (RAVEL, 1997; ZECCONI; HAHN, 2000; LEE et al., 2018), e colonizam, naturalmente, pele e mucosas principalmente no trato nasofaríngeo (CHAMBERS; DELEO, 2009).

São patógenos que atuam em infecções tanto na comunidade quanto no ambiente clínico e hospitalar (PASSARIELLO et al., 2012). Os mecanismos de patogenicidade e virulência descritos na literatura por *S.*

aureus são variados e amplos, como a liberação de toxinas, como hemolisinas, leucocidina de Panton-Valentine, Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), e, enterotoxinas, que induzem a intoxicação alimentar estafilocócica (AHMAD-MANSOUR et al., 2021). Mecanismos de resistência à antibacterianos também são associados à sua virulência. *S. aureus* resistentes à metilicina estão sendo observados desde o final da década de 50, e na década de 90, são relatados os primeiros casos de infecções associadas à comunidade. Sua resistência se dá pela modificação estrutural da proteína ligante de penicilina 2 (PBP 2), através da regulação do gene *mecA* (MUNITA; BAYER; ARIAS; 2015; GUDIOL et al., 2017 ARIAS; REYES; CARVAJAL, 2017).

O *S. aureus* está presente na microbiota bucal tanto como bactéria transeunte, quanto como bactéria presente em infecções como a periodontite. O estudo de Fritski, Albert-Kiszely e Persson (2008) demonstrou que, independente do diagnóstico de periodontite das amostras analisadas, os resultados demonstraram uma tendência para níveis mais altos de *S. aureus* em vários locais de coleta na cavidade oral de pacientes não fumantes. Porém, neste mesmo grupo populacional (não-fumantes) diagnosticado com periodontite agressiva, também foi sugerido que a presença da bactéria pode estar ligada com a gravidade da doença. (FRITSCHI; ALBERT-KISZELY; PERSSON, 2008).

O trabalho de Donkor e Kotey (2020) relata que a colonização por MRSA na mucosa oral pode levar a uma infecção cruzada com outros pacientes e/ou a colonização de outros lugares propícios para o crescimento bacteriano. A presença de *S. aureus* na microbiota oral, apesar de não ser um ambiente comum onde a bactéria está encontrada, é associada a formação e a maturação do biofilme dental. Além disso, a espécie é associada também a infecções crônicas em pacientes com implantes dentários, visto que a falha do implante pode fornecer um ambiente propício para a adesão da bactéria em diferentes superfícies (MINKIEWICZ-ZOCHNIAK et al., 2021).

A formação do biofilme dental, como explica o trabalho de Uribe-García et al. (2021), é ligada diretamente com a regulação genética da bactéria. Em seu trabalho, os autores identificaram, de um total de 268

pacientes com doença periodontal, 50 destes contendo cepas de *S. aureus*. Todas estas cepas eram resistentes à meticilina, além de serem carreadoras dos genes *spa*, *coa* e *icaAB*, respectivamente, genes que sintetizam a proteína estafilococal A, proteína de adesão ao colágeno (ambas proteínas que pertencem a família de Moléculas de Reconhecimento de Componentes de Superfície Microbiana que Aderem à Matriz), e este último que influencia diretamente na expressão dos genes anteriores, codificando também outros componentes do biofilme e toxinas (URIBE-GARCÍA et al., 2021).

3.4. ***Streptococcus mutans*: importância clínica**

Os estreptococos são parte integrante da microbiota oral residente, comumente encontrados na cavidade oral e no trato respiratório superior. Entre esses microrganismos, destaca-se o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), descrito como um coco gram-positivo, anaeróbio facultativo e catalase-negativo, podendo ser α -hemolítico ou não-hemolítico (Bittencourt, Barbosa, Damé-Teixeira, 2022), isolado pela primeira vez em 1924 (Clarke, 1924). *S. mutans* é classificado em quatro sorotipos (c, e, f e k), diferenciados pela estrutura do polissacarídeo ramnose-glicose presente na parede celular, sendo o sorotipo c o mais prevalente em isolados de placas bacterianas (Bittencourt, Barbosa, Damé-Teixeira, 2022).

Na odontologia, *S. mutans* é intimamente associado à cárie dentária, sendo predominante nas lesões de cárie devido à sua capacidade de formar biofilmes, metabolizar açúcares em ácidos orgânicos e sua acidogenicidade e aciduricidade (Lemos, Burne, 2008; Lin, Zhou, Li, 2021). A formação de biofilme pode ocorrer por mecanismos independentes de sacarose, através de proteínas de superfície como adesinas spaP (P1), que se ligam a proteínas salivares ou a outras bactérias (Petersen et al., 2002), ou por mecanismos sacarose-dependentes, envolvendo glicosiltransferases e frutossiltransferases, que produzem glucanos e frutanos a partir da sacarose (Bittencourt, Barbosa, Damé-Teixeira, 2022).

Os genes *gtfB* e *gtfC* são fundamentais na síntese de glucanos, sendo ativados em ambientes acidificados com excesso de glicose ou sacarose. *gtfB* está associado à produção de glucanos insolúveis em água e interação

bacteriana, enquanto *gtfC* produz glucanos solúveis e interage com a hidroxiapatita do esmalte dentário (Krzyściak et al., 2014). A síntese de frutanos, mediada pelo gene *sacB*, está relacionada à reserva de substratos para células formadoras de biofilmes, e as exoenzimas como frutanasas (gene *fruA*) hidrolisam frutanos para liberar monossacarídeos durante períodos de escassez de nutrientes (Nagasawa, Sato, Senpuku, 2017; Rozen, Steinberg, Bachrach, 2004; Wexler et al., 1992).

A formação de biofilme por *S. mutans* também está associada a mecanismos genéticos, mediante a expressão de genes responsáveis pela força de adesão da bactéria a superfícies. Wang et al. (2020) relata que os genes *brpA*, *gpbB* e *comDE* estão associados à fixação e a produção de EPS, sendo observada em células a uma distância de 20 a 30 µm acima de uma superfície. Esta distância é considerada essencial para a produção, liberação, detecção e resposta a gradientes de autoindutores de quorum-sensing, destacando a importância da interação ambiental e química entre bactérias produtoras de biofilme (WANG et al., 2020; LIN; ZHOU; LI, 2021).

Estas bactérias produzem os ácidos láctico, acético, fórmico e propiônico através da metabolização dos carboidratos ingeridos na dieta pelo hospedeiro humano. Como já mencionado, estes ácidos provocam a perda de minerais da superfície do dente, associados à uma dieta rica em açúcares (BITTENCOURT; BARBOSA; DAMÉ-TEIXEIRA, 2022; LOESCHE, 1986; SANTOS et al., 2021). A acidificação do ambiente, promove a ativação de genes que induzem a produção de polissacarídeos presentes na maturação de biofilmes (KRZYŚCIAK et al., 2014; SANTOS et al., 2021). Cepas de *S. mutans* podem ter até 14 tipos de sistemas de transporte de fosfotransferases, que são específicos para diferentes tipos de açúcares, prolongando a sobrevivência delas em meios com diferentes tipos de nutrientes, sejam ricos ou baixos nestes (AJDIĆ et al., 2002).

A capacidade de sobrevivência em meios extracelulares com pH baixo ocorre devido à ativação do gene *fabM*, que promove a formação de ácidos graxos monoinsaturados na membrana plasmática das células bacterianas, resultando em menor permeabilidade (FOZO; QUIVEY, 2004). Outros mecanismos estão relacionados a bombas translocadoras de prótons H⁺;

ao sistema ornitina carbamoiltransferase e a carbamatoquinas; ao maquinário de reparo induzível por ácido e a chaperonas moleculares, que regulam proteínas e enzimas que possivelmente, alteradas pelo pH, podem causar citotoxicidade à própria célula (BITTENCOURT; BARBOSA; DAMÉ-TEIXEIRA, 2022). Todos estes mecanismos celulares acabam por trabalhar simultaneamente, garantindo uma maior patogenicidade à bactéria.

3.5. Tratamento de doenças periodontais

Periodontites e cáries, portanto, são doenças infecciosas resultantes de agentes bacterianos, cuja patogenicidade está relacionada à formação do biofilme supra e subgengival. O tratamento atual de doenças periodontais visa principalmente a erradicação ou controle da infecção (Gomes et al., 2007; Meulman et al., 2012; Marsh, 2010). O método mais eficaz para prevenir e remover o biofilme dentário é o controle mecânico, que inclui o uso de escovas dentais e dispositivos de limpeza interproximal, essenciais para o controle da infecção (Gebran; Gebert, 2002). Estudos demonstram que o uso adequado do fio dental pode remover até 80% do biofilme sub e supragengival (Echeverria; Sanz, 2005). Contudo, nem sempre essas técnicas são executadas corretamente, podendo não interferir no controle da doença (ADDY, 2008; MARSH, 2010).

Diante dos desafios no controle mecânico do biofilme, a incorporação de antissépticos bucais consolidou-se na prática odontológica, tanto clínica quanto domiciliar. Esses antissépticos visam remover e prevenir o biofilme na cavidade bucal, atuando nas regiões supra e subgengival (Barnett, 2003; González et al., 2014). Devido ao seu mecanismo de ação antimicrobiano, os enxaguantes bucais são frequentemente recomendados como complemento aos métodos mecânicos. Particularmente úteis em condições específicas, atuam como controladores químicos do biofilme e potencializam a eficácia do controle mecânico (Gebran; Gebert, 2002).

Um dos principais anti sépticos usados no controle de biofilme é a clorexidina (FIGURA 2), uma bisbiguanida catiônica com ampla atividade antibacteriana, baixa toxicidade e alta afinidade pela pele, mucosa e membranas. Seu mecanismo de ação envolve danos à membrana

citoplasmática das bactérias, desestabilizando o equilíbrio osmótico, o que impede a regeneração da parede celular (Hortense et al., 2017; Kampf, 2016; Horner; Mawer; Wilcox, 2012). A clorexidina atua como bacteriostático em baixas concentrações e bactericida em concentrações elevadas, além de inibir glicosiltransferases de certas bactérias, como *S. mutans* (Davies et al., 1954; Ribeiro; Hashizume; Maltz, 2007).

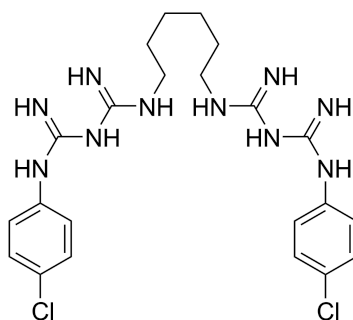


Figura 2: Estrutura molecular da clorexidina.

Utilizada há mais de três décadas, a clorexidina é considerada o padrão para avaliar a eficácia antimicrobiana em odontologia, devido à sua capacidade de prevenir a formação do biofilme dental e sua substantividade, permitindo sua atividade na mucosa oral por até 12 horas após aplicação (Van Strydonck et al., 2012). No entanto, seu uso apresenta efeitos adversos, como alterações no paladar, formação de cálculos supragengivais e manchas dentais, além de reações mais raras, como tumefação dos lábios, descamações na mucosa oral, urticária, dispnéia e choque anafilático (FLÖTRA et al., 1971; WATTS; ADDY, 2001; SAJJAN; LAXMINARAYAN, 2016).

Atualmente, relatos de resistência ou diminuição da susceptibilidade bacteriana à clorexidina têm sido reportados (KAMPF, 2016; WEBER; RUTALA; SICKBERT-BENNETT, 2007). Essa resistência está associada à formação de biofilmes, resistências intrínsecas da membrana, e bombas de efluxo como as encontradas em *S. aureus*, mediadas por genes como *qacA* (OPACIC; LEPSANOVIC; SBUTEGA-MILOSEVIC, 2010; REICH et al., 2016; KAMPF, 2016). *S. mutans* também pode desenvolver resistência à clorexidina, especialmente após exposição contínua, com o operon *dlt* sendo associado à susceptibilidade reduzida (HUANG et al., 2023). No entanto, os

mecanismos específicos de resistência em *S. mutans* ainda não estão completamente elucidados, embora a produção de biofilme seja sugerida como um fator principal (Grönroos et al., 1995).

Além da clorexidina, o fluoreto de sódio (NaF) é amplamente utilizado no tratamento de doenças periodontais. O uso benéfico de NaF no controle da cárie dental remonta ao início do século XX, oferecendo aplicações acessíveis à população (DOMINGOS; RICCI-DONATO; RUSSI, 2018). Em 2007, a OMS declarou que o acesso universal ao flúor deveria ser um direito básico à saúde humana. Atualmente, os métodos mais eficazes incluem a escovagem com dentifrícios fluoretados e a fluoretação da água (JULLIEN, 2021).

O NaF atua prevenindo a desmineralização dental, aumentando a remineralização e a resistência ao pH ácido promovido pela fermentação de sacarídeos por bactérias cariogênicas. Íons de flúor incorporam-se na apatita durante a remineralização, formando cristais de flúor-hidroxiapatita mais resistentes à variação de pH (ROŠIN-GRGET, 2013). Embora o flúor nos dentifrícios não tenha efeito direto nas bactérias cariogênicas, as formulações modernas incluem componentes como lauril sulfato de sódio, que possuem atividade antimicrobiana (RANDALL; SEOW; WALSH, 2015, CHIBA et al. (2019). Apesar disso, ZHANG et al. (2022) indicam que o NaF pode inibir o crescimento bacteriano e seu metabolismo através da supressão de enzimas como ATPase, sugerindo uma possível atividade antimicrobiana dose-dependente.

O efeito colateral significativo dos NaF é a fluorose dentária, caracterizada por hipomineralização dos tecidos dentais e aumento da porosidade, resultando em opacidade dental. A OMS recomenda uma ingestão diária de 0,05 a 0,07 mg de NaF por kg de peso corporal para prevenir cáries, mas exceder essa quantidade pode causar fluorose (GUTH et al., 2020).

Devido aos problemas associados aos princípios ativos nos enxaguantes bucais atuais, novas formulações estão sendo desenvolvidas. A pesquisa e desenvolvimento de novos produtos são essenciais para encontrar substitutos eficazes e seguros, sendo o estudo da citotoxicidade de novos enxaguantes bucais um passo importante para o desenvolvimento

destes.

3.6. Citotoxicidade de novas formulações

Estudos recentes estão focados no desenvolvimento de novas formulações de enxaguantes bucais, com destaque em propostas que incluem tanto princípios ativos já utilizados na odontologia quanto novos produtos de origem natural. Produtos que utilizam nanotecnologia também vem sendo estudados em ambos os casos. No entanto, o desenvolvimento destes dentifrícios levanta questões sobre citotoxicidade, um tema também relevante para os enxaguantes bucais atualmente em uso.

Em relação à citotoxicidade da clorexidina, o estudo de Coelho et al. (2020) avaliou o efeito citotóxico de um enxaguante bucal contendo clorexidina a 0,2%. Os resultados mostraram que o efeito citotóxico foi dose-dependente em linhagens de fibroblastos gengivais humanos, oriundos de pacientes que necessitavam de gengivectomia. Os ensaios de MTT revelaram uma IC50 de 9,4% após 24 horas de exposição por 5 minutos ao enxaguante bucal. Outros estudos também reportaram alta citotoxicidade da clorexidina em fibroblastos gengivais humanos (FLEMINGSON et al., 2008; WYGANOWSKA-ŚWIĄTKOWSKA et al., 2016), em fibroblastos (HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001) e em linhagens de condrócitos humanos (CAI et al., 2023). Contrariando esses resultados, Banerjee et al. (2017) demonstraram que a clorexidina não resultou em alterações significativas na contagem de micronúcleos de células mucosas bucais esfoliadas.

Um estudo comparou a citotoxicidade de diferentes enxaguantes bucais comerciais com a clorexidina em fibroblastos gengivais. Os principais ativos estudados foram álcool, cloreto de cetilpiridínio (CCP) e NaF, além de constituintes naturais como eucaliptol, timol e mentol. Após exposições de 30, 60 e 120 segundos, a viabilidade celular permaneceu acima de 90% com todos os enxaguantes avaliados, inclusive o controle positivo com clorexidina (DE OLIVEIRA et al., 2018). Tsourounakis et al. (2013) também verificaram a citotoxicidade de dois enxaguantes à base de óleos essenciais ou clorexidina em fibroblastos gengivais. Em concentrações mais baixas, foram observadas alterações morfológicas, diminuição da viabilidade celular e

perda de função celular; em concentrações de 25%, houve eliminação completa das células tratadas.

Quanto à citotoxicidade de NaF, esta é menos pronunciada que a da clorexidina. Martins et al. (2019) utilizaram extrato alcoólico de própolis vermelho para formular enxaguantes com e sem NaF, usando clorexidina a 0,12% como controle. Avaliaram a citotoxicidade em fibroblastos orais, relatando baixa citotoxicidade do NaF e alta citotoxicidade do extrato utilizado. Mladinic et al. (2022) avaliaram os efeitos citotóxicos e genotóxicos de pastas de dentes e enxaguantes contendo flúor em células escamosas da mucosa bucal, concluindo que não houve efeitos significativos. Tabatabaei et al. (2019) estudaram a citotoxicidade de ingredientes comuns em pastas de dente e enxaguantes bucais, concluindo que concentrações de até 400 ppm de NaF não apresentaram toxicidade em fibroblastos gengivais humanos, enquanto 1400 ppm resultaram em 53% de citotoxicidade.

Cunha et al. (2020) avaliaram a citotoxicidade de soluções à base de óleo de citronela comparadas a formulações comerciais sem álcool, uma contendo clorexidina a 0,12% e outra baseada em óleos essenciais, em linhagem celular HaCaT (células epiteliais). Embora todas as concentrações testadas tenham mostrado alta citotoxicidade, as diluições seriadas das soluções de citronela aumentaram a viabilidade celular em comparação com outros enxaguantes testados. Na diluição $\frac{1}{8}$, a viabilidade celular foi de cerca de 40%, enquanto a dos outros componentes testados foi inferior a 20%.

Müller et al. (2017) verificaram a atividade citotóxica de 12 enxaguantes bucais em fibroblastos humanos, células HSC-2 (carcinoma epitelial oral humano) e células L929 (fibrossarcoma aneuplóide murino). Os componentes dos enxaguantes incluíam clorexidina, etanol, CCP, NaF, dodecil sulfato de sódio e óleos de rícino hidrogenados peguilhados. A citotoxicidade foi avaliada pela viabilidade celular com azul de tripano. A maioria das formulações apresentou uma LC50 abaixo de 20%. Individualmente, a LC50 foi de 25,2% para o álcool, 0,02% para a clorexidina, 0,06 mM para o CCP e 45,7% para o óleo de rícino, revelando alta toxicidade dos principais compostos.

O estudo de dentifrícios à base de compostos oriundos da medicina tradicional e cultural também se faz presente na literatura. Shafiee et al.

(2014) avaliaram a atividade citotóxica da Anarbese, um composto derivado da fumaça de fezes de jumenta fêmea, em fibroblastos de ratos. Os resultados mostraram baixa citotoxicidade com dose-dependência, além de depender do tempo de exposição. A medicina *ayurveda*, praticada na Índia desde 400 a.C., oferece novas perspectivas para o uso de plantas medicinais. Radhakrishnan e Ramamurthy (2020) avaliaram a citotoxicidade do extrato aquoso de *Calotropis gigantea* em enxaguantes bucais, encontrando uma taxa de sobrevivência de 50% em volumes de 10 e 20 µL, sugerindo a viabilidade do uso em enxaguantes. Sagar et al. (2022) sintetizaram um enxaguante contendo *Ficus benghalensis*, *Azadirachta indica* e *Mentha piperita*, avaliando sua citotoxicidade por ensaio de letalidade de camarão de salmoura. Em todas as concentrações testadas, a toxicidade foi baixa, indicando o potencial de futuras aplicações de extratos naturais.

A nanotecnologia é relatada como uma solução potencial para problemas de citotoxicidade em enxaguantes bucais. Shanmugam et al. (2024) avaliaram a citotoxicidade de um enxaguante com nanopartículas de óxido de zinco mediadas por capim-limão e menta. Os resultados mostraram citotoxicidade menos pronunciada em comparação com a formulação comercial usada como controle, sugerindo uma alternativa viável.

Para o desenvolvimento de enxaguantes bucais, portanto, deve-se considerar também o estudo acerca da citotoxicidade destes novos produtos, visando obter dados para a comparação com produtos já existentes e para a utilização segura de novas formulações. Compostos como a cloramina T merecem destaque por conta da capacidade de atividade antimicrobiana; porém, o estudo científico acerca desse composto se demonstra um tanto escasso na literatura, apesar da utilização deste em dentifrícios já ser observada comercialmente.

3.7. Cloramina T

Para a prevenção da cárie dentária, estratégias incluem práticas de remoção mecânica do biofilme, como escovação e uso de fio dental, controle do consumo de carboidratos e controle químico com soluções

antimicrobianas (Batisti et al., 2022). Um destes antimicrobianos propostos é a cloramina T (Figura 3), já utilizada comercialmente em certos produtos.

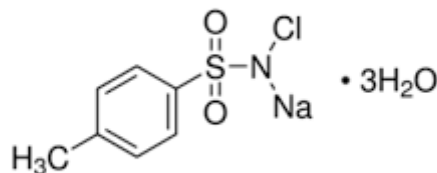


Figura 3: estrutura molecular da cloramina T tri-hidratada

A cloramina T tri-hidrato, também conhecida como N-Cloro-paratoluenosulfonamida de Sódio, de peso molecular de 281,69 g/mol (figura acima descreve sua forma molecular) é um sal sintético que não apresenta propriedades corrosivas mesmo em soluções concentradas e é praticamente atóxico. Sua ação germicida é equiparável ao hipoclorito de sódio, mas é menos irritante. Seu mecanismo de ação envolve reações oxidativas e de hidrólise proteica, causando a destruição das células bacterianas e interrompendo processos essenciais. Ela é eficaz contra diversos tipos de patógenos, incluindo bactérias, fungos, vírus e micobactérias, tanto em ambientes aeróbios quanto anaeróbios, mesmo em concentrações baixas (PANZERI et al., 2009).

Nos últimos 10 anos, certas pesquisas com cloramina T merecem destaque. Cincarova et al. (2016) demonstrou em seu estudo que concentrações sub-letais de cloramina T acabam por influenciar na formação de biofilmes por *S. aureus*, sendo observado um aumento na expressão proteínas associadas à adesão celular, pertencente ao grupo de Componentes de Superfície Microbianos Reconhecedores de Moléculas de Matriz Adesiva, tais como fator de aglutinação A (ClfA), proteínas ligadoras de fibronectina A e B (FnBPA e FnBPB) e enolase.

O estudo de Ferreira et al. (2017) avaliou a atividade antibiofilme da cloramina T frente ao biofilme produzido por *Candida* spp., e a citotoxicidade do composto. Em seus resultados, os autores relatam que a atividade antibiofilme da cloramina T foi similar ao hipoclorito de sódio, tendo esse

último o mesmo mecanismo de ação da cloramina T, afetando possivelmente a parede celular e a permeabilidade da membrana. O estudo de citotoxicidade foi conduzido em eritrócitos, e apresentaram resultados dose-independente, mostrando toxicidade em todas as concentrações testadas pelos autores. Ainda assim, a citotoxicidade da cloramina T apresentou-se ser significativamente menor do que a apresentada pelo hipoclorito de sódio.

A cloramina T, em pesquisas odontológicas, teve destaque no estudo de Mangal et al. (2022), que utilizou do composto para a síntese de gesso com atividade antibacteriana. Os autores, em seus resultados, demonstraram que em concentrações de 0,5 de cloramina T (p/p), os materiais apresentaram atividades frente à *C. albicans*. Al-Badri et al. (2023) realizaram a produção de uma formulação de dentifrício em gel contendo bromelaína, uma enzima proteolítica, na presença e ausência de clorexidina ou cloramina T. Os autores realizaram ensaios de atividade enzimática, caracterização por espectroscopia FT-IR (Fourier transform-infrared) e eficiência na remoção de dentina cariada. Apesar das formulações contendo bromelaína apresentarem atividades promissoras no gel testado, a adição da cloramina T à formulação promoveu um aumento significativo na atividade anticárie em todos os testes para a avaliação do gel. Tais achados ratificam a capacidade da cloramina T estar presente em novas formulações com diferentes finalidades.

Na odontologia, a Cloramina T destaca-se por fazer parte de um grupo de antissépticos orais que têm um forte efeito sustentável por pelo menos uma hora após a aplicação. Tem diversas indicações, como controle químico do biofilme dentário, tratamento de doenças periodontais, além de ser indicado como enxaguante bucal para pessoas imunossuprimidas. Estudos também avaliam sua aplicabilidade em diferentes contextos odontológicos, como descontaminação de elementos dentários, higienização de próteses dentárias e composição de bochechos e dentifrícios. Os seus principais mecanismos de ação se dão pela forte oxidação devido a subprodutos derivados da sua hidrólise, sendo principalmente grupos cloroativos, interagindo com a parede celular bacteriana (ROLLAND et al., 2007; PANZERI et al., 2009).

Pesquisas como a de Tirapelli et al. (2010) destacam os benefícios da cloramina T, incluindo sua eficácia contra microrganismos, sua substantividade que proporciona proteção prolongada ao aderir ao biofilme bacteriano, sua segurança para uso em humanos e sua baixa toxicidade e irritação em doses recomendadas (TIRAPELLI et al.; 2010). A cloramina T se adsorve fortemente sobre a hidroxiapatita, interagindo eletrostaticamente com íons cálcio da apatita e estruturas de carbono na placa bacteriana. Essa adsorção lenta proporciona tempo suficiente para agir sobre a microbiota existente, exercendo uma ação bacteriostática e biocida, e mantendo a inibição da formação e/ou crescimento da placa por um período prolongado (PANZERI et al., 2009; PITTEN; KRAMER, 1999).

Portanto, a cloramina T, na área odontológica, possui destaque pois já foi empregada em produtos como o papacárie, produto desenvolvido com o objetivo da remoção químico-mecânica da cárie dentária. Além disso, ela é o principal composto ativo do produto Trydal Clinical Pro, um enxaguante bucal à base de cloramina T recentemente lançado no mercado.

4. Manuscrito

A metodologia e os resultados obtidos nesta dissertação serão apresentados em forma de manuscrito e se apresentam na íntegra deste estudo. O presente manuscrito está formatado segundo as normas da revista a qual foi submetido: *Pharmaceutical research* (ISSN: 0724-8741).

Evaluation of the antimicrobial, antibiofilm, and cytotoxicity '*in vitro*' activity of two mouthwashes containing Chloramine T.

Thobias Toniolo de Souza¹ (Orcid ID 0000-0003-1543-7320), Luíze Garcia de Melo¹ (Orcid ID 0000-0002-5388-0799); Pedro Henrique Flores da Cruz¹ (Orcid ID 0009-0009-9770-5237); Rafaely Piccioni Rosado¹ (Orcid ID 0009-0008-4811-2235); Matheus Pereira de Albuquerque¹ (ORCID ID); Mikaele Valerio Tavares¹ (Orcid ID 0009-0004-5877-4479); Milena Mattes Cerveira¹ (Orcid ID 0000-0003-4235-1717), Cleiton Jesus Andrade Pereira¹ (ORCID ID 0000-0001-7887-884X), Bruno Nunes da Rosa² (Orcid ID 0000-0002-6196-5709), Claudio Martin Pereira de Pereira² (Orcid ID 0000-0002-2818-4281), Letícia Zibetti³ (0009-0007-8408-7818), Clarissa Piccinin Frizzo³ (0000-0002-1175-7880), Silvia de Oliveira Hübner⁴ (Orcid ID 0000-0003-0482-9599), Renata Marques Pierobom Gressler⁴ (Orcid ID 0000-0003-0842-0539), Janice Luehring Giongo¹ (Orcid ID 0000-0002-2199-0838), Rodrigo de Almeida Vaucher¹ (Orcid ID 0000-0003-3496-7335)

¹Center for Chemical, Pharmaceutical, and Food Sciences - Laboratory of Research in Microorganism Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

²Center for Chemical, Pharmaceutical, and Food Sciences - Lipidomics and Bioorganic Laboratory, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

³Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴Faculty of Veterinary Medicine - Virology and Immunology Laboratory, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

e-mail contact: rodvaucher@hotmail.com

Abstract

Introduction: Global oral health is crucial, yet 45% suffer, mainly from dental caries, linked to bacterial fermentation and biofilm formation. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* are notable biofilm contributors, exacerbating cariogenicity. Treatment focuses on biofilm control; Chlorhexidine, though effective, poses risks of resistance. Chloramine-T (CLT) emerges as a promising alternative, with comparable efficacy to sodium hypochlorite but less toxicity. Widely used in dentistry, CLT is indicated for biofilm control, treating periodontal diseases, and as a mouthwash for immunosuppressed individuals. Its efficacy is demonstrated in commercial products, highlighting its significance in oral healthcare. **Objective:** The study aims to assess the antibacterial and cytotoxic properties, physicochemical characterization, and evaluates stability of two CLT based mouthwash formulations. **Methodology:** Ph stability and FT-IR spectroscopy was realized to characterize the formulations. Antimicrobial activities were measured by MIC, MBC, time kill assay; biofilm treatment activities were conducted by crystal violet quantification and total carbohydrates measurement. Cytotoxicity was evaluated by hemolysis, MTT and neutral red assay. **Results:** pH stability measurement demonstrated stability in 4°C in 60 days; FT-IR spectroscopy demonstrated characteristic stretching bands of CLT present in both formulations; antimicrobial activity demonstrated encouraging findings in MIC, MBC and time kill assays, as well as the results from the biofilm assays. CLT and both formulations presented high cytotoxicity levels. **Conclusions:** Despite the high cytotoxicity was found in this study, the formulations showed promising biotechnological prospects for future therapeutic interventions, particularly in addressing biofilm-related conditions such as dental caries, as demonstrated in biofilm assays and antimicrobial assays.

Keywords: Periodontitis; Dental caries; Biofilms; Oral antiseptics; Chlorinated compounds

1. INTRODUCTION

Oral health is paramount for overall well-being, yet WHO data reveals that 45% of the global population grapples with oral diseases, with the most prevalent being dental caries (1). Dental caries, triggered by the fermentation of sugars by bacteria, affects both adults and children and is closely linked to the formation of dental biofilm, a complex microbial community adhering to the tooth surface (2).

Numerous bacteria are associated with the presence of oral biofilm. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a clinically relevant bacterial strain found in the oral cavity, primarily in patients with dental implants (3). The ability of *S. aureus* to form biofilm is a key virulence mechanism associated with a variety of infections, including dental infections (4). In addition, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) are closely associated with dental caries (5 – 8). The main mechanisms for their cariogenicity include the production of glycans and fructans from sucrose (5); genetic mechanisms regulating bacterial adhesion and production of extracellular polymeric matrix (5, 6) and acidogenicity and aciduricity, promoting demineralization of dental enamel (7). Therefore, their clinical importance in oral health is highlighted.

The treatment of dental caries involves the control of dental biofilm through mechanical methods, and the use of oral antiseptics can complement such practices (7). Chlorhexidine is recognized for its broad antimicrobial activity and its ability to prevent biofilm formation, being considered a standard treatment in dentistry (8). However, its use may lead to certain adverse effects and bacterial resistance to the compound (9, 10). In this context, well-known antimicrobial compounds such as chloramine T emerge as promising alternatives for the treatment of periodontal diseases, such as dental caries (11).

Chloramine-T (CLT) is a synthetic salt, with action comparable to sodium hypochlorite, but less irritating and virtually non-toxic (12). In dentistry, CLT is recognized for its prolonged effect after application, being indicated for dental biofilm control, treatment of periodontal diseases, and as a mouthwash for immunosuppressed individuals (12, 13). Its mechanisms of action involve oxidative reactions, with the release of the chloramine group, and protein hydrolysis, destroying bacterial cells and inhibiting biofilm formation (14), with prolonged action preventing its adhesion. It stands out in the dental field for its use in products such as Papacarie and as an active compound in the Trydal Clinical Pro mouthwash (14)

The present study aims to evaluate the antibacterial and cytotoxic activity, as well as to perform the physicochemical characterization and evaluate the stability of two mouthwashes formulations based on CLT. The new formulations may contribute to control and treatment measures of existing oral diseases, serving as an alternative to mouthwashes currently employed in dentistry.

2. METHODS

2.1. Formulations development

The Chloramine T trihydrate salt (CAS No.: 7080-30-4) was obtained from Sigma-Aldrich (FIGURE 1). The developed formulations are homogeneous aqueous solutions consisting of the active ingredient and components with co-solvent, viscosity agent, and flavoring functions. The formulations are described in **Table 1**. Formulation 1, referred to as F1, is designed specifically for use by children and contains the following excipients: glycerol 10% (Alpha Química - Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, BR), polysorbate 20 at a concentration of 2% (Fischer Bioreagents - Pittsburgh, Pennsylvania, US), sodium saccharin 0.6% (All Chemistry - Jabaquara, São Paulo, BR), peppermint flavor 0.5%, and water as the main vehicle. Formulation 2, referred to as F2, was designed for use by adults, contains the excipients: ethyl alcohol 2% (Êxodo Científica - Sumaré, São Paulo, BR), propylene glycol 10% (Alpha Química - Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, BR), polysorbate 20 at a concentration of 2%, peppermint flavor 0.5%, and water as the main vehicle. The pH of the formulations was adjusted to approximately 6.5, considered an ideal pH for products for use in the oral mucosa (pH meter Kasvi K39-2014B, China)

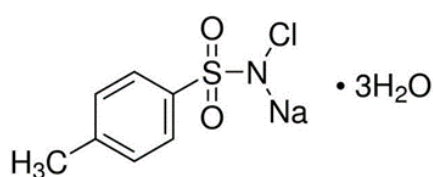


Figure 1: Molecular structure of chloramine T trihydrate

Table 1: Constituents and concentrations of each formulation

Excipients	Concentration	
	Formulation 1	Formulation 2
Chloramine T	To be determined	To be determined
Glycerol	10%	-
Sodium Saccharin	0,60%	-
Ethyl Alcohol	-	2%
Propylene Glycol	-	10%
Polysorbate 20	2%	2%
Peppermint Flavor	0,50%	0,50%
Water	q.s.p.	q.s.p.

2.2. Stability test (pH)

The stability testing of the formulations was conducted using the methodology adapted from Isaac et al. (2008) (15). Preparations of F1 and F2 were performed in nonuplicate, with triplicates distributed for different temperature exposure conditions, namely: 4°C, room temperature, and 40°C. The pH was measured using a pH meter for both triplicates of each formulation at predetermined time points after formulation, which included 0 days, 1 day, 7 days, 14 days, 21 days, 30 days, and 60 days.

2.3. Thermogravimetric Analysis (TGA)

The thermogravimetric analysis (TGA) was performed to evaluate the stability of the compound after the preparation of the formulations, as well as to serve as a method for their characterization. It was carried out using a TGA Q5000 (TA Instruments Inc., USA). The equipment was calibrated with CaC₂O₄H₂O (99.9%). In formulations analysis, before the heating ramp, an isotherm was carried out at 80 °C for 30 minutes to evaporate possible volatile interferences from the samples (residual solvents and/or water). The sample was heated at a rate of 10 °C/min up to 600 °C. The sample mass used was approximately 2 mg for free CLT and 5 mg for formulations. The inert atmosphere was N₂ at a flow rate of 50 mL min⁻¹ for free CLT, and 25 mL min⁻¹ for formulations. The data was processed using TA Universal Analysis 2000 software, version 4.5 (TA Instruments Inc., USA).

2.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The differential scanning calorimetry (DSC) was performed to evaluate the thermal stability and thermal transitions, as well as chemical reactions of the compound after the preparation of the formulations, as well as to serve as a method for their characterization. The phase transitions were obtained by Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry (MTDSC) on a DSC Q2000 (TA Instruments, USA). The sample mass used

was approximately 3 mg and was weighed on a Sartorius balance (M500P) with a precision of ± 0.001 mg. Each sample was subjected to three heating and cooling cycles; the analysis range was from -80°C to the initial decomposition temperature (155°C). The heating rate was $5^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ and N_2 was used as an inert gas with a flow rate of 50 mL min^{-1} . The data was analyzed using TA Universal Analysis 2000 software, version 4.5 (TA Instruments Inc., USA).

2.5. FT-IR

Infrared spectroscopy was performed using a Fourier-transform infrared (FTIR) spectrophotometer, model IR Spirit (Shimadzu, Kyoto, Japan). Free CLT, formulations, as well as the other excipients of each formulation, were analyzed in a range of 400 to 4000 cm^{-1} , with 45 scans in transmittance mode and a resolution of 4 cm^{-1} .

2.6. Antibacterial activity

2.6.1. Strains

The bacterial strains used in this study were: *Staphylococcus aureus* BAA1026, belonging to the bacterial collection of the Laboratory of Biochemical Research and Molecular Biology of Microorganisms (LAPEBBIOM) at the Federal University of Pelotas (UFPel); and *Streptococcus mutans* ATCC 25175, generously provided by Professor Roberto Christ Vianna dos Santos from the Oral Microbiology Laboratory at the Federal University of Santa Maria (UFSM).

2.6.2. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC)

The MIC was determined using the microdilution technique according to the M7-A6 method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (16). The assay was conducted in a 96-well plate containing $100\text{ }\mu\text{L}$ of Mueller-Hinton broth (MH - Himedia - Thane, Maharashtra, IN). The free compound and formulations were added to the MH broth, followed by serial dilutions (final volume: $100\text{ }\mu\text{L}$). Subsequently, $10\text{ }\mu\text{L}$ of strain suspension (0.5 McFarland, corresponding to 1.5×10^8 colony-forming units (CFU/mL)) were added to each well and incubated at 37°C for 18 - 24h. The MIC was defined as the lowest compound concentration at which there was no visible growth. The MBC was determined after subculturing $1\text{ }\mu\text{L}$ of the culture treated with $1/2\text{X}$ MIC, 1X MIC, and 2X MIC on MH agar (Himedia - Thane, Maharashtra, IN), incubated at 37°C for 24 hours. The test was performed in duplicate. The determination of the formulation's concentration for use was established based on the results obtained in the MIC and MBC tests.

2.6.3. Time-kill assay

The time kill assays were conducted according to the adapted protocol described by Tsuji (2007) (17) realized one time. The bacterial strains were cultured on Mueller Hinton agar (Himedia - Thane, Maharashtra, IN) 24 hours before the experiment. On the first day of experimentation, 0.5 McFarland scale inocula of the respective bacteria were added to test tubes containing 1mL of Mueller Hinton broth, under constant agitation at 37°C, using seven tubes: sterility control, bacterial positive control, F1, F2, 1/2X MIC, MIC, and 2X MIC (referring to the highest concentration against the tested strains), the latter three referring to CLT. For each tube, seeding was performed at different times, with inoculation times at 0h, 6h, 12h, 18h, and 24h. Each seeding was quantitative, for subsequent counting of each colony-forming unit (CFU), which corresponds to the amount of bacteria in each tube subjected to a specific amount of time.

2.6.4. Biofilm formation and treatment

The biofilm assay was performed with adaptation from the protocol described by Stepanović (2007) (18). Bacterial strains were seeded on Mueller Hinton agar (Himedia - Thane, Maharashtra, IN), and on the first day of the assay, bacterial inoculum (1.5×10^8 CFU/mL) was prepared. Afterwards, 180 µL of TSB broth supplemented with 1% glucose (g/mL) was pipetted into 96-well plates, followed by incubation for 24 hours at 37°C to allow biofilm formation. For treatment, the plate with formed biofilm was pre-washed with sterile saline after its formation, and then 100 µL of the formulations described above, and CLT at concentrations of 1/2X MIC, MIC, and 2X MIC (referring to the highest concentration against the tested strains) were added, followed by incubation for 18-24 hours at 37°C.

2.6.5. Biofilm quantification by Crystal Violet staining

The quantification of the formed biofilm was conducted following the methodology described by Stepanović (2007) (18). The contents of the wells were removed, and a wash with sterile saline was performed. Subsequently, the biofilm was fixed on the plate with methanol P.A. The biofilm was stained with 1% Crystal Violet, followed by the resolubilization of the biofilm in ethanol P.A. for 10 minutes at room temperature. The plate was then read using a microplate reader at a wavelength of 570 nm.

2.6.6. Measurement of total carbohydrates post-treatment in biofilm

The determination of lipopolysaccharide levels in the biofilms was conducted using the phenol sulfuric acid method, as described by Yang et al. (2006) (19). After removing the culture medium containing planktonic cells and washing with PBS, 40 µL of deionized water,

40 µL of 5% phenol solution followed by 200 µL of 95-97% sulfuric acid solution were added to the 96-well plate where the biofilm was formed. The plate was then incubated at room temperature for 30 minutes. The amount of polysaccharides in the biofilm was determined by measuring absorbance at 492 nm using a microplate reader (Celer Biotecnologia - Belo Horizonte, Minas Gerais, BR).

2.6.7. Atomic force microscopy (AFM)

The images were acquired using the Agilent Technologies Atomic Force Microscope 5500 (Santa Clara, CA, USA), in conjunction with the PicoView 1.14.4 software (Molecular Imaging Corporation - San Diego, CA, USA). Measurements were conducted in contact mode using PPP-Cont probes (Nanosensors - Neuchâtel, NE, CH), with a force constant of 0.1 N/m and a resonance frequency of 13 kHz. The captured images were analyzed using the Gwyddion software v. 2.55 (Czech Metrology Institute - Jihlava, Vysočina, CZ).

2.7. Cytotoxicity activity

2.7.1. Hemolytic assay

The hemolytic assay was conducted as described by Vaucher, Motta, and Brandelli (2018) (20), and was performed as a screening assay to determine the concentrations used in other cytotoxicity assays. Defibrinated sheep blood was used for the assay. The erythrocytes were suspended in PBS to a final concentration of 4% (v/v). Subsequently, 500 µL of the erythrocyte solution was added to each 1.5 mL microtube. For the assay with CLT, a concentration of 100 mM was used. Both tests were diluted 1:2 in erythrocytes, followed by serial dilutions. The assays were then incubated at 37°C for 1 hour with gentle agitation. Afterward, they were centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes, and 200 µL of the supernatants were aliquoted into 96-well plates, followed by measurement of absorbance at 405 nm using a microplate reader (Celer Biotecnologia - Belo Horizonte, Minas Gerais, BR). Sterile saline and Triton X-100 were used as negative and positive controls, respectively. Hemolytic activity was considered safe when it exhibited cellular viability above 600% compared to the negative control. The percentage of hemolysis was calculated using the following formula:

$$[(\text{ABS samples} - \text{ABS negative control}) / (\text{ABS positive control} - \text{ABS negative control})] * 100$$

2.7.2. MTT assay

The MTT assay was performed as described by Mosmann (1983) (21) with modifications. In a 96-well plate with adherent Vero cell line (African green monkey kidney cells), 100 µL of the compound and formulations were added. The first concentration of CLT

used was 4X MIC (14 mM - corresponding to the highest MIC found in the antimicrobial assays), followed by serial dilutions. Subsequently, the treatments were incubated for 24 hours at 37°C, 5% CO₂. Afterward, the total contents of the wells were discarded, and 50 µL of MTT solution diluted in 1 mg/mL minimum essential medium (MEM) or phosphate-buffered saline (PBS) was added. The plate was incubated again for 4 hours at 37°C, 5% CO₂, followed by the addition of 50 µL of absolute ethanol or DMSO per well, and subsequent reading at 540 nm.

2.7.3. Neutral red assay

The Neutral Red assay was performed as described by Fernandes et al. (2016) (22). The preparation of the plate with Vero cell line and the addition of compounds were carried out as previously described, including the concentration of CLT followed by serial dilutions. Subsequently, the cells were incubated for 24 hours at 37°C and 5% CO₂. After the incubation period, the contents of the wells were discarded, and 50 µL of Neutral Red solution, diluted 1/150 in MEM, was added to each well. After a further incubation for 2 hours at 37°C and 5% CO₂, the Neutral Red solution was removed. Following a wash with MEM, 100 µL of solubilizing solution was added to each well. After 10 minutes, the plate was read using a plate reader, with absorbance measured at 540 nm.

2.8. Statistical analysis

The statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test. The significance level was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism (California, USA). Data was expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) for pH stability, biofilm quantification assays and cytotoxicity assays. For TGA analysis, thermogravimetric curves in function of mass variation and temperature variations were analyzed. For DSC, transition peaks were analyzed due to melting and crystallization to demonstrate the thermal behavior of the samples. For time kill assay, curves representing the log (CFU * 1000) of colonies counted by quantitative seeding; for the last time analyzed, mean $\pm$ standard deviation were performed. For AFM, images were analyzed based on color intensity, representing the structural quantity of treated biofilm.

3. RESULTS

3.1. Formulations – Physicochemical characteristics and pH stability

In the infrared spectra (Figures 2A and 2B), it is possible to observe the respective bands of formulations F1 and F2. In both formulations, bands at 1081 cm⁻¹ and 1169 cm⁻¹ corresponding to the sulfonamide (O=S=O) present in CLT (Figure 2) can be observed, as

well as the C-N stretching of the tertiary amide at 1256 cm^{-1} . Additionally, the alcohols present in F1 and F2 are characterized by the elongated band in the range of 3090 to 3548 cm^{-1} indicating the -OH group. Tween 20 has characteristic bands at 2921, 2861, and 1092 cm^{-1} , but these bands are not identified in the formulations due to their low concentration. The same occurs for saccharin present in F1.

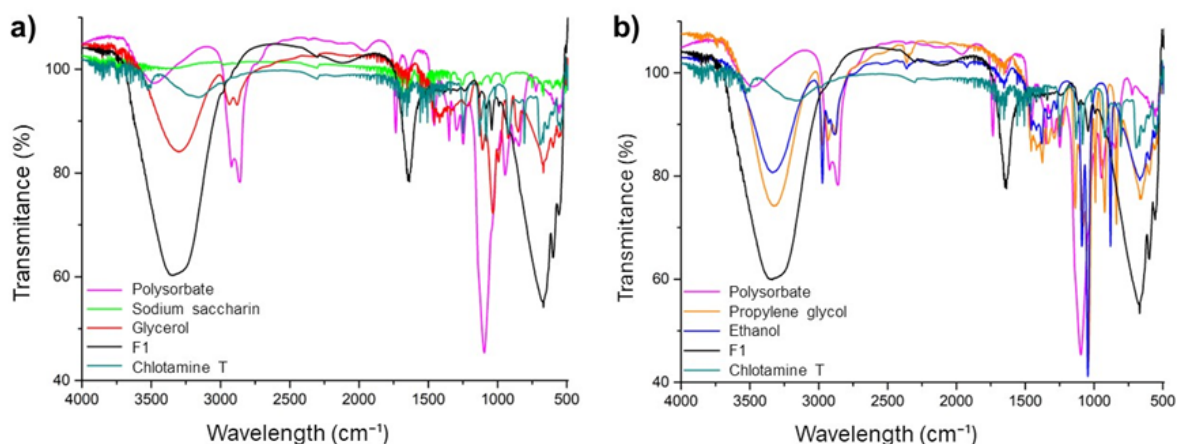


Figure 2: FT-IR spectra of the formulations and excipients. In the figure, in order: a) formulation 1 and its components, b) formulation 2 and its components. The stretching bands were separately marked, analyzed according to the functional groups present in each component.

The excipients of the formulations are described according to the table above (Table 1). The pH stability assays (Figures 3A and 3B) demonstrated a non-linear decrease over time at both 40°C and room temperature. Regarding the temperature of 4°C, a punctual increase in pH was observed in formulation 1 at time 1 (T1 - 24 hours after production). The other time points were characterized by a constant pH measurement at this temperature for both formulations.

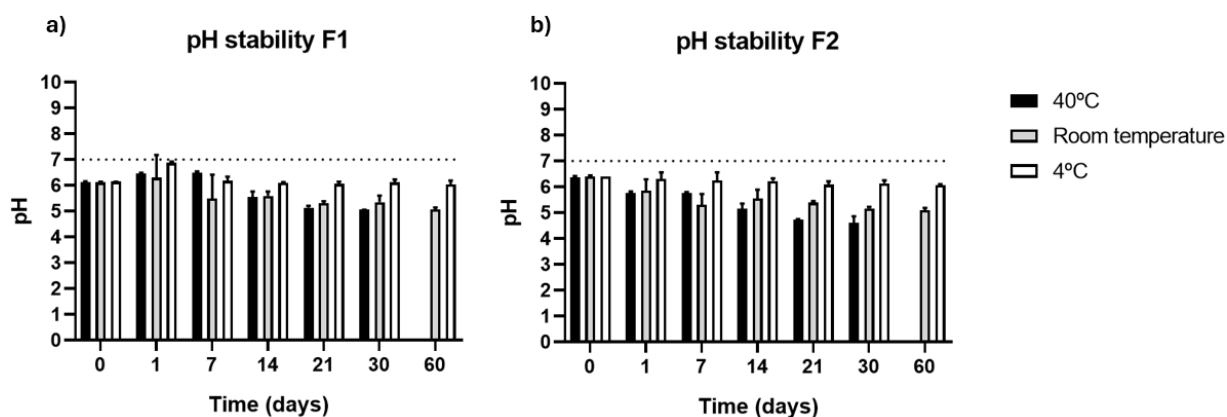


Figure 3: pH stability of the formulations over the evaluated period. In order: T0: 0 days; T1: 1 day; T2: 7 days; T3: 14 days; T4: 21 days; T5: 30 days; T6: 60 days. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

3.2. Thermogravimetric Analysis (TGA)

Figure 4, 5 and 6 shows the thermogram obtained for the free CLT, F1 and F2 samples, respectively. where the values on the X axis represent the temperature variation ($^{\circ}\text{C}$), on the Y axis the mass variation (%) and the derivative of the TG curve as a function of time ($\%/^{\circ}\text{C}$) on the Y2 axis. Thermogravimetric analysis showed that the thermal decomposition of this compound occurs in four main decomposition stages. At 44°C and 61°C there is a significant loss of mass of 19%, which may be related to the decomposition of volatile compounds and/or the humidity present in the sample. The maximum decomposition of the sample occurred in the other two stages, Td3 181°C and Td4 303°C , showing 44% mass loss between the two stages, totaling 63 % loss in the temperature range analyzed.

For formulations, thermogravimetric analysis showed that the thermal decomposition of the two formulations takes place in two main stages. Formulation 1 shows its Td_{5%} at 122°C and completes its decomposition (T_f) at 432°C . The maximum decomposition temperature of the first stage (T_{d1}) occurs at 164°C and the second decomposition stage (T_{d2}) at 373°C , with 100 % mass loss in the temperature range analyzed between the two stages. As for Formulation 2 (Figure 2), its Td_{5%} occurs at 175°C and its final decomposition (T_f) at 537°C . The maximum first stage decomposition temperature (T_{d1}) occurs at 165°C and the second stage decomposition (T_{d2}) at 372°C , with 95% mass loss in the temperature range analyzed between the two stages. The results for the two formulations can be correlated, since their main decomposition temperatures are similar and the formulations have similar components. Table 2 and 3 shows the data obtained from thermogravimetric analysis.

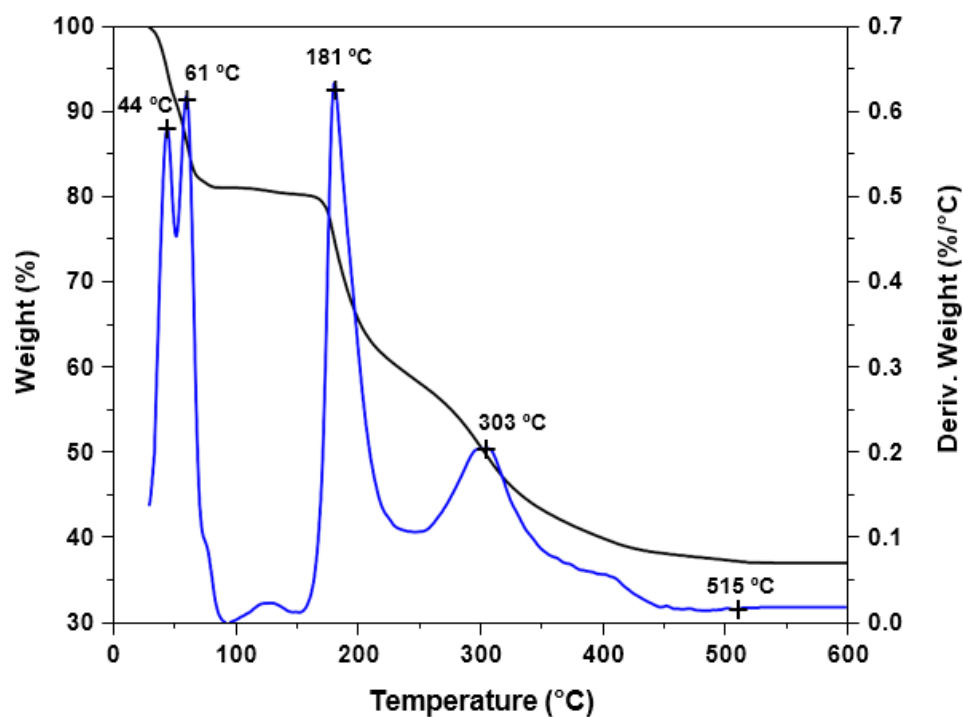


Figure 4: TGA curve obtained for free CLT, where the values on the X axis represent the temperature variation (°C), on the Y axis the mass variation (%) and the derivative of the TG curve as a function of time (%/°C) on the Y2 axis

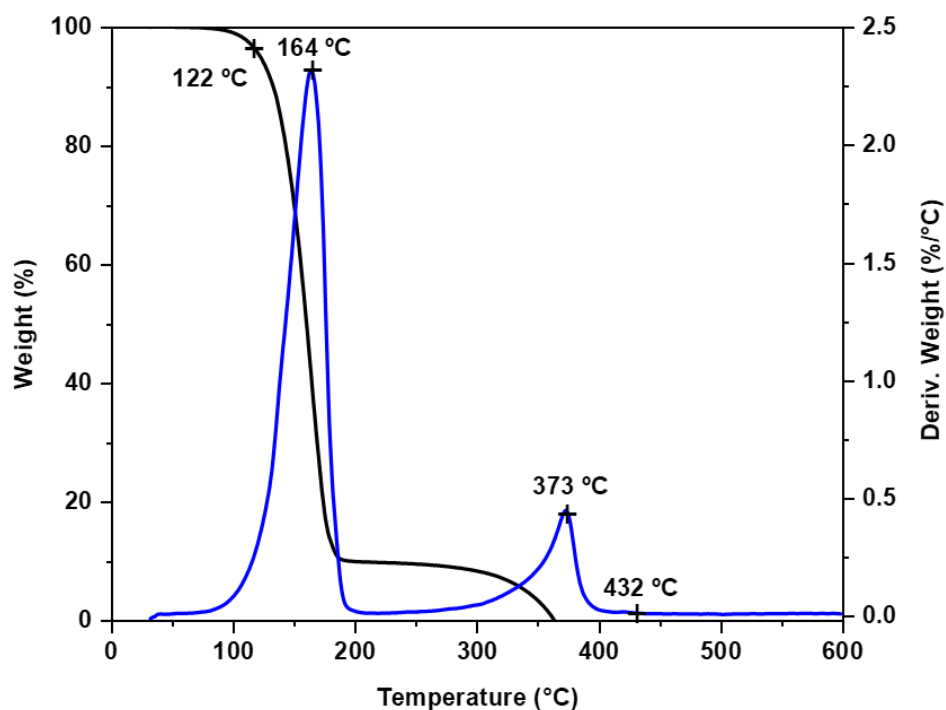


Figure 5: TGA curve obtained for F1, where the values on the X axis represent the temperature variation (°C), on the Y axis the mass variation (%) and the derivative of the TG curve as a function of time (%/°C) on the Y2 axis

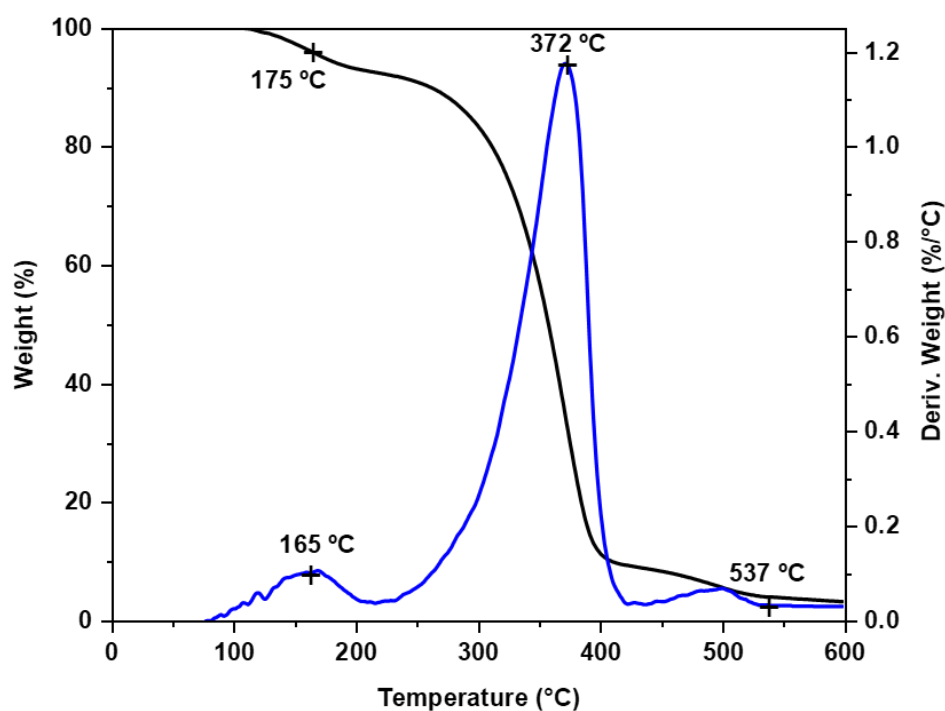


Figure 6: TGA curve obtained for F2, where the values on the X axis represent the temperature variation (°C), on the Y axis the mass variation (%) and the derivative of the TG curve as a function of time (%/°C) on the Y2 axis.

Table 2: TGA analysis results of free CLT

Sample	Td ₁ ^a	Td ₂ ^b	Td ₃ ^c	Td ₄ ^d	Tf ^e	Mass Loss
CLT	44 °C	61 °C	181 °C	303 °C	515 °C	63%

^aMaximum decomposition temperature of the first stage; ^bMaximum decomposition temperature of the second stage; ^cMaximum decomposition temperature of the third stage; ^dMaximum decomposition temperature of the fourth stage; ^eFinal decomposition temperature.

Table 3: TGA analysis results of formulations

Sample	Td _{5%} ^a	Td _{1B}	Td ₂ ^c	Tf ^d	Mass Loss
F1	122 °C	164 °C	373 °C	432 °C	100%
F2	175 °C	165 °C	372 °C	537 °C	95%

^aTemperature of 5% mass loss; ^bMaximum decomposition temperature of the first stage; ^cMaximum decomposition temperature of the second stage; ^dFinal decomposition temperature.

3.3. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

In order to determine its thermal behavior and phase transition temperatures, the samples were subjected to a DSC analysis (FIGURE 7, 8 and 9). Based on the results, in the first cycle, the free CLT (FIGURE 7) showed two melting temperatures, at -21.71 °C and 79.01 °C, these exothermic transitions showed an enthalpy variation of 6.10 J/g and 83.13 J/g, respectively. For formulations results, in F1 analysis, it was possible to observe melting peaks (-5.21 °C ± 0.752) and crystallization peaks (-27.59 °C ± 0.505) in the three heating and cooling cycles (FIGURE 8); these endothermic and exothermic transitions had an enthalpy variation of 167.63 J/g ± 0.624 and 181.63 J/g ± 8.944, respectively. Formulation 2 (FIGURE 9) had a melting temperature of -4.78 °C in the first cycle, and this exothermic transition had an enthalpy variation of 214 J/g. In subsequent cycles, the absence of first-order thermal events (melting) was observed, which is directly linked to the complete amorphization of the sample, indicating that Formulation 2 is amorphous in this temperature range.

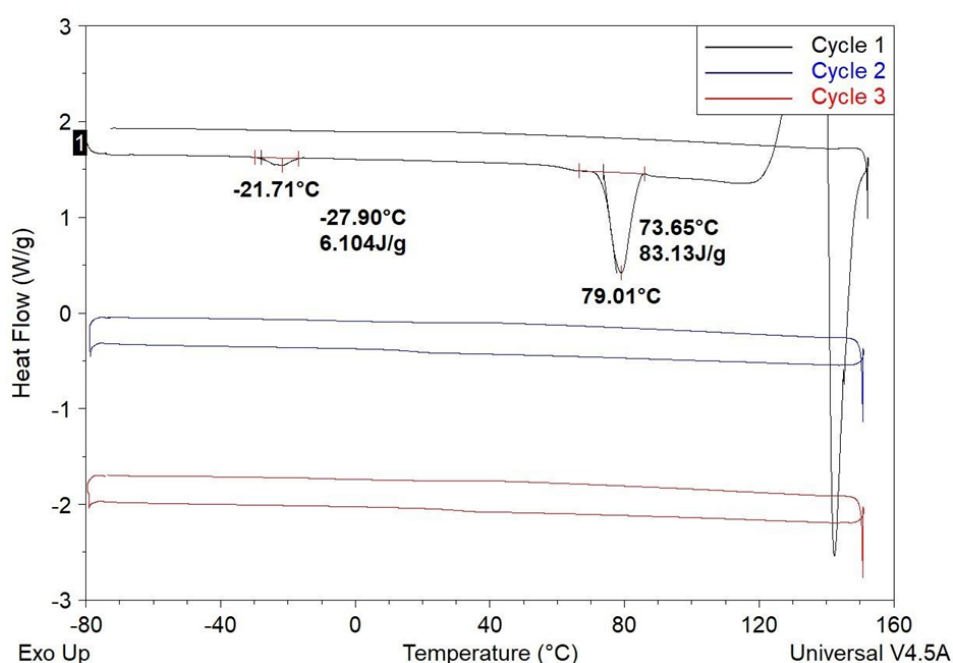


Figure 7: DSC curve obtained for free CLT.

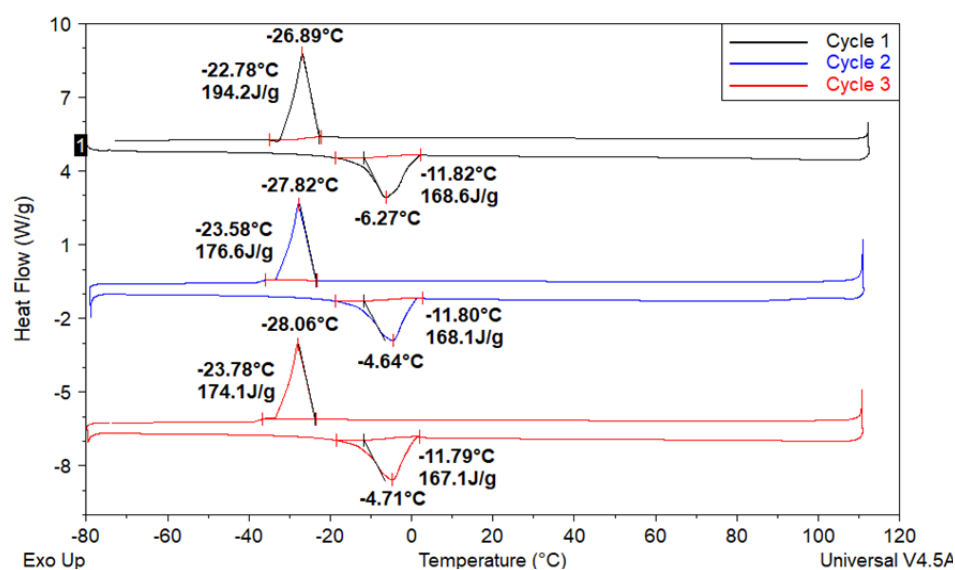


Figure 8: DSC curve obtained for F1.

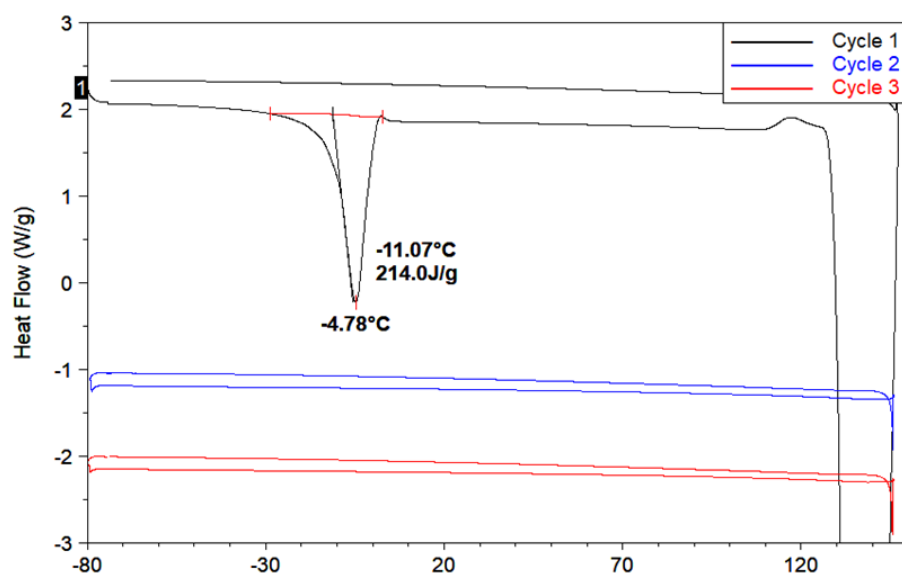


Figure 8: DSC curve obtained for F2.

3.4. Antimicrobial Activity

The results of the antibacterial assays of CLT and its respective formulations are described in **Table 4**. The MIC results showed a concentration of 0.781 mM, with bactericidal characteristics against *S. aureus*. For *S. mutans*, the observed MIC was 3.125 mM, indicating bactericidal activity at twice this concentration (6.25 mM). The results of the antimicrobial activities of the formulations showed similar outcomes to free CLT. The results reflect lower concentrations due to methodological limitations of the assays. The results

were calculated based on the concentration of CLT in the formulations starting from 3.5 mM. It is also noted that the formulations exhibited bactericidal characteristics against *S. mutans*, suggesting that the compound's bactericidal property lies between concentrations of 3.125 and 3.5 mM.

Table 4: MIC and MBC of bacterial strains evaluated.

Strains	CLT		F1		F2	
	MIC (mM)	MBC (mM)	MIC (mM)	MBC (mM)	MIC (mM)	MBC (mM)
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	3.125	6.25	3.5	3.5	3.5	3.5
<i>S. aureus</i> BAA 1026	0.781	0.781	0.875	0.875	0.875	0.875
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	6.25	6.25	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6.25	12.5	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15.625	15.625	-	-	-	-

3.5. Time kill assay

The results of the bacterial killing curve for free CLT and its formulations are shown in the figures below (FIGURE 10A, 10B, 10C, and 10D). CLT exhibited more pronounced activity against *S. aureus* compared to *S. mutans*. However, it is observed that there is no bacterial growth in either strain at the MIC and 2X MIC concentrations. In the killing curve assay of the formulations, a decrease in bacterial activity against *S. aureus* is observed, with none of the formulations yielding satisfactory results in antimicrobial activity, although there is a noticeable decrease in the total CFU count. In contrast, in tests with *S. mutans*, total antimicrobial activity against the cells was observed, with no bacterial growth since 0h (the moment when the bacteria were inoculated in the culture medium).

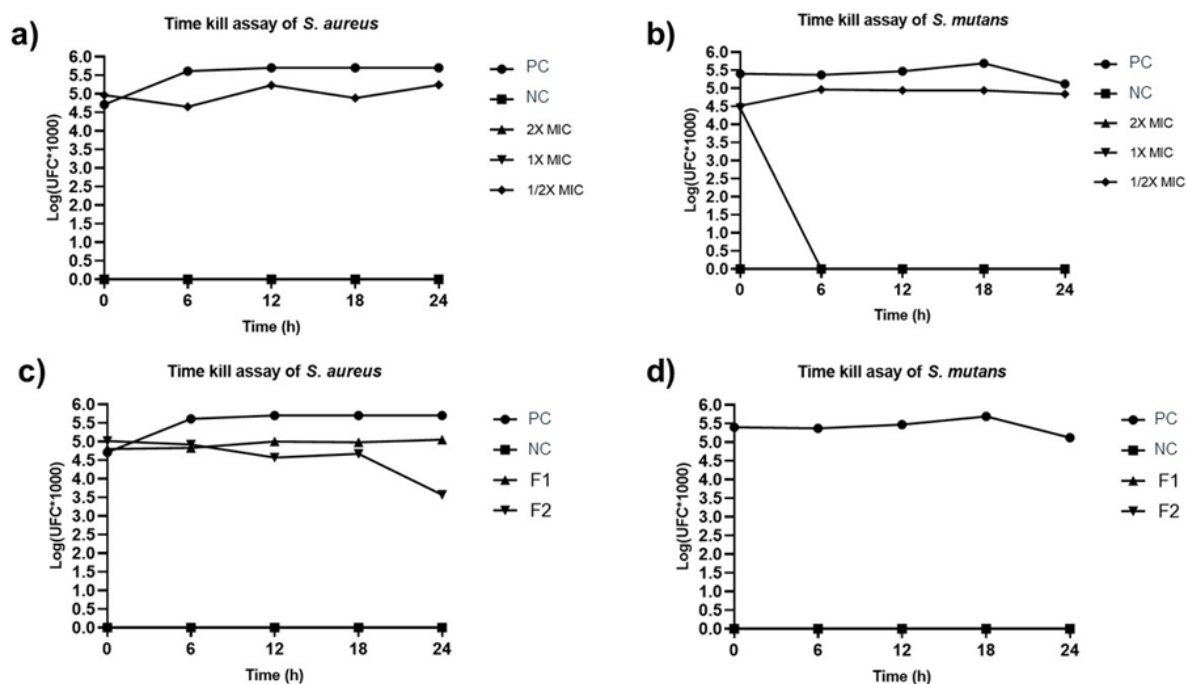


Figure 10: Bacterial killing curve of free CLT and formulations against the tested strains. In the figure, in order: a) killing curve of *S. aureus* with free CLT; b) killing curve of *S. mutans* with free CLT; c) killing curve of *S. aureus* with formulations; d) killing curve of *S. mutans* with formulations. Positive control and negative control were, respectively, medium with bacterial inoculum and medium with saline solution. The data are expressed as curves representing the Log (CFU*1000) of colonies counted by quantitative seeding.

3.6. Biofilm quantification by Crystal Violet staining

The activity against pre-formed biofilms was assessed by quantification using crystal violet (FIGURE 11A, 11B, 11C, and 11D). It was observed that even at the concentration of 1/2X MIC of CLT, biofilm formation was significantly reduced in both bacterial species. The antibiofilm activity against *S. mutans* was superior compared to hydrogen peroxide, the main compound used in hospital environments for biofilm treatment. Only the concentration of 1/2X MIC in the treatment of *S. aureus* showed a smaller statistical difference compared to the negative control. Both formulations 1 and 2 exhibited pronounced activity against the formed biofilm. The activity of formulation 2 against *S. aureus* stands out, as it achieved better results compared to the hydrogen peroxide treatment control, being also significantly effective against the biofilm formed by *S. mutans*.

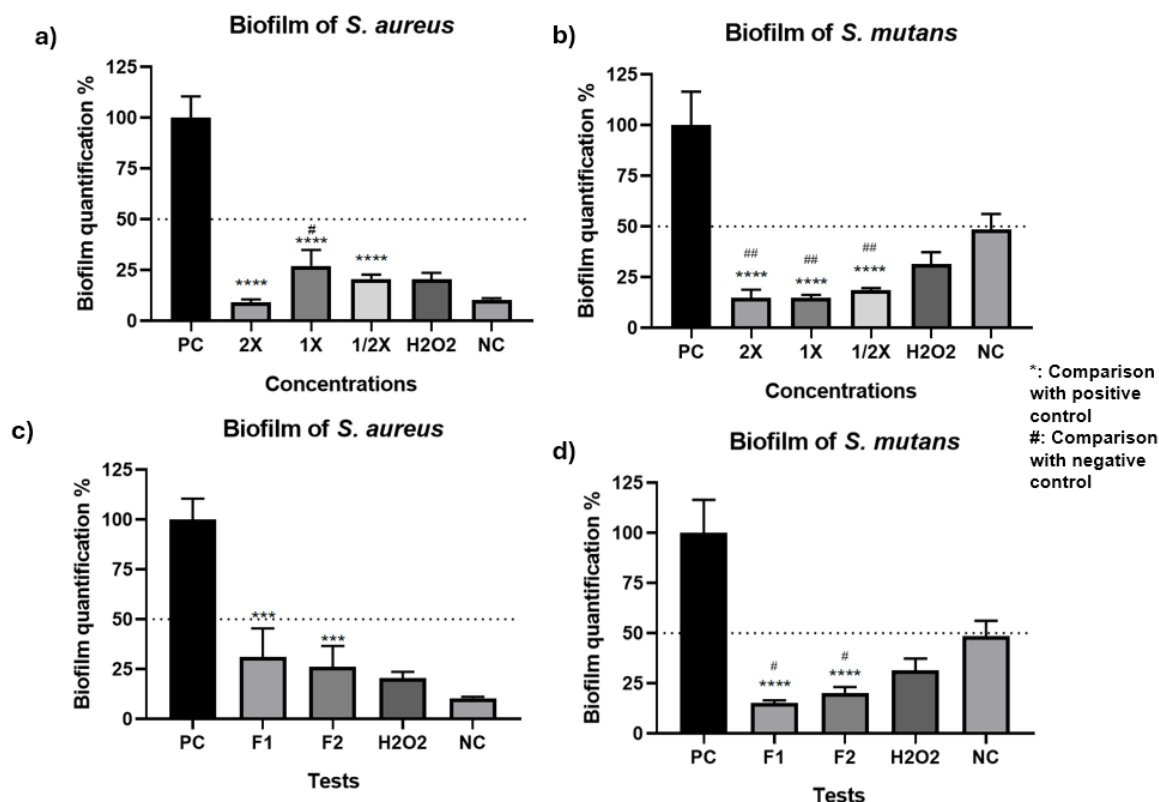
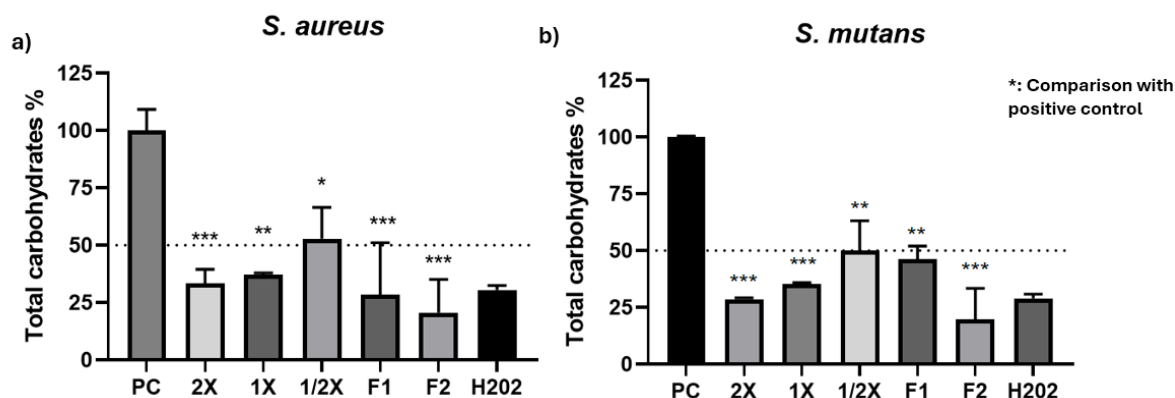


Figure 11: Crystal violet quantification of treated biofilm. In the figure, in order: a) treatment of *S. aureus* biofilm with free CLT; b) treatment of *S. mutans* biofilm with free CLT; c) treatment of *S. aureus* biofilm with formulations; d) treatment of *S. mutans* biofilm with formulations. The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The level of significance where ** $p < 0.0001$, $p < 0.01$, and * $p < 0.05$ compared to the positive control (PC) was conducted through one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test.

3.7. Total carbohydrates quantification

The results of lipopolysaccharide quantification are demonstrated in the figure below (FIGURE 12A and 12B). It can be observed that the lipopolysaccharide levels in both formulations, when used to treat the biofilms formed by the tested strains, resulted in a significant decrease compared to the positive control. Additionally, through the methodology used, it was found that both formulations, as well as the free compound, obtained results without significant variation when compared to hydrogen peroxide.



"Figure 12: Quantification of total carbohydrates after treatment. In the figure, in order: a) Total carbohydrates quantification of *S. aureus*. b) Total carbohydrates quantification of *S. mutans*. The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The level of significance where ** $p < 0.0001$, $p < 0.01$, and * $p < 0.05$ compared to the positive control (PC) was conducted through one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test."

3.8. AFM

The images (FIGURE 13A - 13H and 14A - 14H) of the treatments were captured and analyzed. It can be observed that the treatment proved to be effective for both biofilms formed by the strains, with F1 standing out against the biofilm formed by *S. aureus*. However, formulation 2, on the other hand, demonstrated not to have been as effective in reducing the total biofilm. Regarding *S. mutans*, all concentrations of CLT and their respective formulations showed a reduction in the amount of biofilm formed.

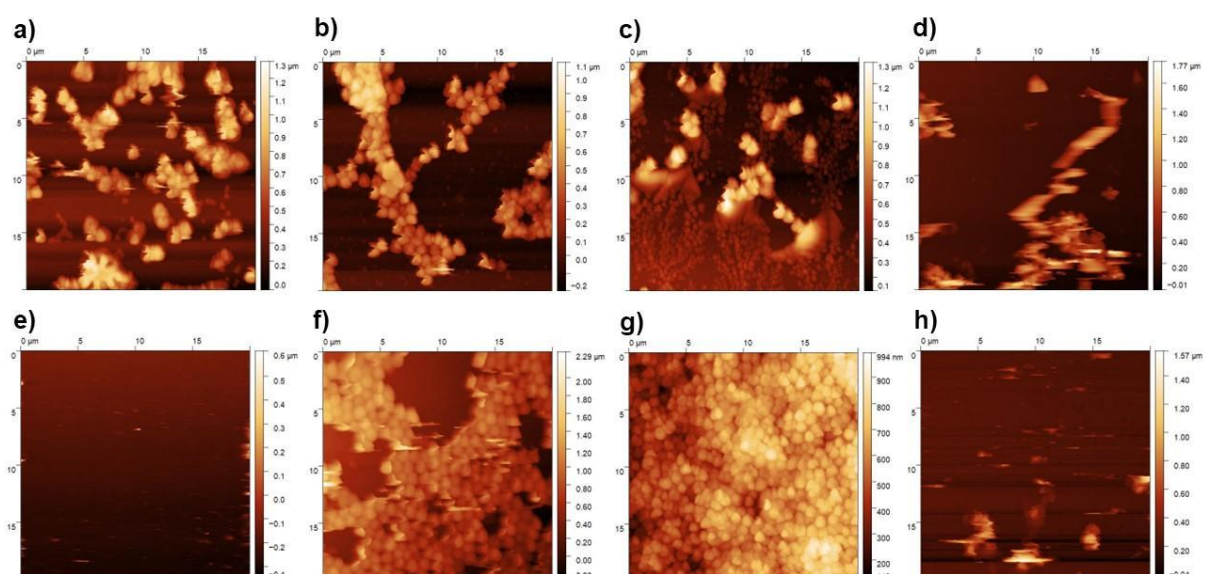


Figure 13: AFM images of *S. aureus* biofilm treatment. Data expressed in color gradation, representing the structure of the biofilm on the surface of the coverslips. a) free CLT in 7 mM concentration; B) free CLT in 3,5 mM concentration; C) free CLT in 1,75 mM concentration; d) hydrogen peroxide treatment; e) F1 treatment; f) F2 treatment; g) positive control; h) negative control

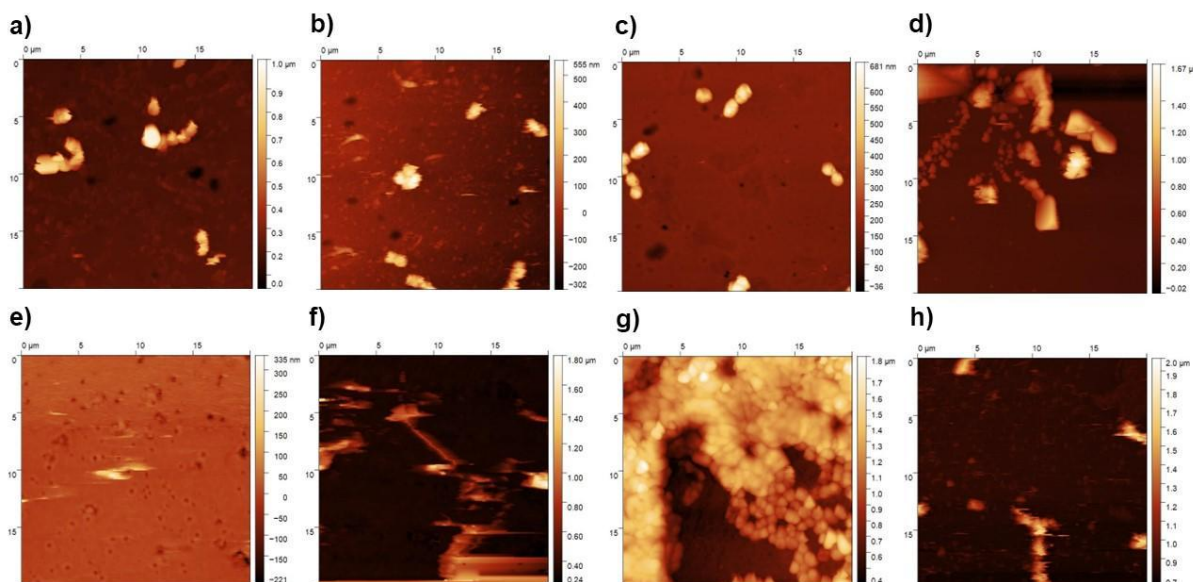


Figure 14: AFM images of *S. mutans* biofilm treatment. Data expressed in color gradation, representing the structure of the biofilm on the surface of the coverslips. a) free CLT in 7 mM concentration; B) free CLT in 3,5 mM concentration; C) free CLT in 1,75 mM concentration; d) hydrogen peroxide treatment; e) F1 treatment; f) F2 treatment; g) positive control; h) negative control

3.9. Hemolytic assay

In relation to cytotoxic activities, the hemolytic assays (FIGURE 15A, 15B and 15C) were initially conducted with free CLT, with initial concentrations starting from 100 mM. The results showed cellular viability observed only from the concentration of 1.5625 mM, with an IC₅₀ of 1.181 mM. Hemolytic assays of the formulations started with an initial concentration of 3.5 mM. Both formulations demonstrated high hemolytic activity, contrasting with the hemolytic activity of free CLT.

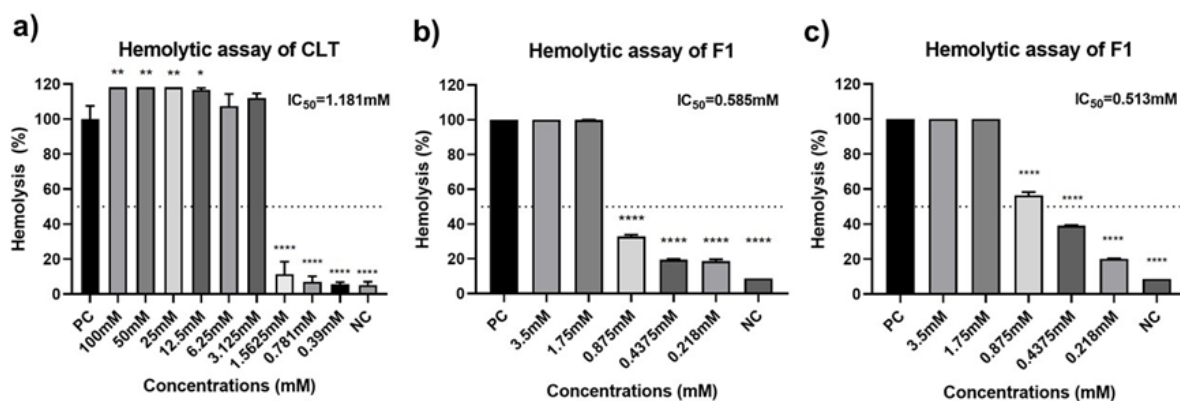


Figure 15: Cell viability of erythrocytes in hemolytic assay. In the figure, in order: a) Free CLT, b) F1, c) F2. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The level of significance where **** $p < 0.0001$, compared to the positive control (NC) was conducted through one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. The inhibitory concentration (IC_{50}) value was calculated from a concentration of 6.25 mM, using the nonlinear regression method based on concentration and percentage of activity

3.10. MTT assay

The MTT assays (FIGURE 16A, 16B, and 16C) started from the concentration of 28 mM for CLT, considering the activity at concentrations approaching 4 times the MIC of *S. mutans* (14 mM). It was observed that cell viability remained below 60% at almost all concentrations, with an increase in viability observed from 0.4375 mM, with 64% viability. The assays of the formulations started at 3.5 mM, as described previously in the hemolytic assay. Cytotoxicity was observed up to the concentration of 0.218 mM, with cell viability below 50%. At the concentration of 0.109 mM, it was observed that both formulations showed no cytotoxic activity. The concentration of 3.5 mM resulted in cellular viability of only 12% in formulation 1 and 11.5% in formulation 2.

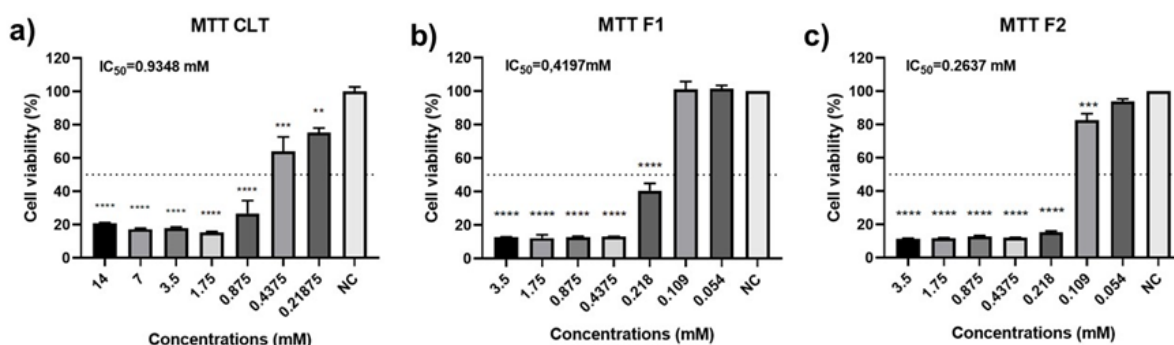


Figure 16: Cell viability of Vero cells in MTT assay. In the figure, in order: a) Free CLT, b) F1, c) F2. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The level of significance where **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, and ** $p < 0.01$ compared to the negative control (NC) was conducted through one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. The value of the inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated using the nonlinear regression method, based on concentration and percentage of activity.

3.11. Neutral red assay

The Neutral Red assays (FIG. 17A, 17B, and 17C) were conducted similarly to the MTT assay. For free CLT, increases in cell viability at lower concentrations were observed. The concentration of 0.4375 mM showed a viability of approximately 94%, a considerable improvement compared to the 59% cell viability at 1.75 mM. Regarding the formulation assays, comparing the cell viability of formulation 2 with the negative control, a cell viability of 66.7% at the concentration of 0.218 mM was observed, a 10% increase compared to the same concentration for formulation 1. Concentrations of 0.109 and 0.054 mM were the only ones that showed cell viability comparable to the negative control, suggesting the cytotoxic action of the formulations. **Table 5** contains the mean and median IC₅₀ values of the assays conducted.

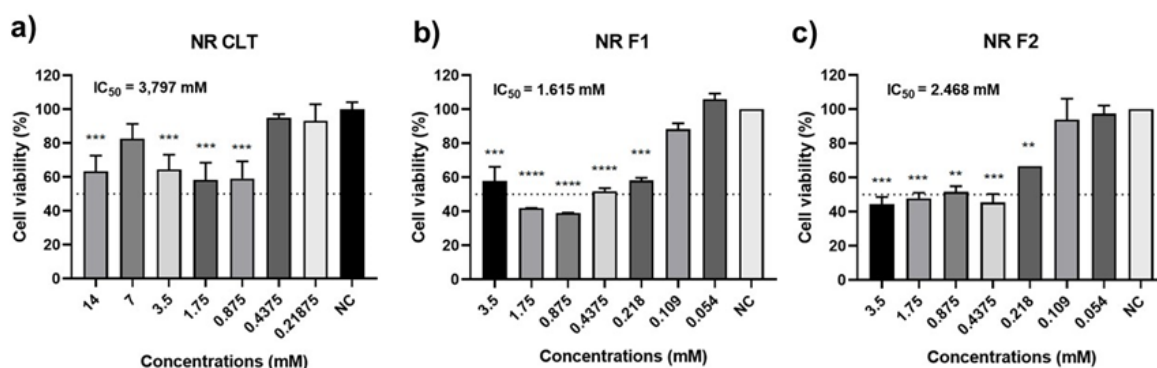


Figure 17: Cell viability of Vero cells in Neutral Red assay. In the figure, in order: a) Free CLT, b) F1, c) F2. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The level of significance where **** $p < 0.0001$, * $p < 0.001$, and $p < 0.01$ compared to the negative control (NC) was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. The inhibitory concentration (IC₅₀) value was calculated using the non-linear regression method, based on concentration and percentage of activity.

Table 5: Mean and Median of IC₅₀ values of the assays.

Assay	IC50 (Mm)		
	CLT	F1	F2
Haemolytic assay	1.181	0.513	0.585
MTT assay	0.935	0.420	0.264
Neutral red assay	3.737	1.615	2.468
Mean IC50	1.951	0.849	1.106
Median IC50	1.181	0.513	0.585

4. Discussion

Caries are strongly related to overall human health and can interfere in various areas beyond the oral cavity. The development of new products can contribute to combating and/or reducing the prevalence of this disease. It is noteworthy the importance of the evaluation of different types of properties of these formulations, as well as their characterization and stability.

The formulation's initial pH was approximately 8.0, according to the product's sheet information. After adjustment to $\text{pH} \cong 6,5$, Periodic pH measurement was employed to evaluate the stability of both formulations at different temperatures. At 4°C, pH was stable; however, at other temperatures tested, the solution was alkaline. Abed et al. (2007) (23) observed that the pH of a chlorhexidine gluconate formulation was stable during the entire period. In contrast with the author's findings, at 40 °C both of our formulations showed a pH decay in the time frame, possibly because of the presence of hypochlorous acid formation.

Formulation development can be compared to the findings of Rajendiran et al. (2021) (24), who reviewed various ingredients used in mouthwashes, including chlorhexidine and fluorides. Formulations containing chloramine T are currently found in the market; however, there is a lack of scientific studies regarding chloramine T in these materials. CLT has been incorporated into oral product formulations, as demonstrated by Al-Badri et al., (2023) (25). In their study, CLT was used as an adjunct component for removing deteriorated tissues affected by cavities and exhibited antimicrobial properties. However, their study evaluated CLT in combination with an enzymatic compound, rather than focusing solely on isolated CLT or formulations based solely on CLT.

Regarding the FT-IR analysis, CLT and its formulations exhibited absorption bands at 1081 cm^{-1} and 1169 cm^{-1} , indicating the sulfonamide ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) stretch. Shafieyoon,

Mehdipour, and Michalski (2019) (26) obtained similar results identifying the sulfonamide stretch, which was observed at 1157 cm^{-1} . The tertiary amine (C-N) stretch was observed at 1256 cm^{-1} , a region where it is common to identify stretches of tertiary amides (27). Results regarding the characterization of the formulations also can be compared to Al-Badri et al. (2023) (25), where similar results were obtained regarding the identification of the sulfonamide (1161.15 cm^{-1}) and tertiary amide (1211.29 cm^{-1}) stretches in CLT. Our FT-IR results confirm that CLT is indeed present in both formulations since its characteristic stretches can be found in them.

The TGA and DSC analysis from free CLT showed that the behavior of the compound may be related to polymorphism, since the occurrence of two simultaneous events in DSC analysis may be associated with solid-solid transitions and the presence of more than one crystalline phase. In the subsequent cycles, the absence of first-order thermal events (melting) was observed, which is directly linked to the complete amorphization of the sample, indicating that CLT is amorphous in this temperature range, as the F2. No other results regarding CLT were observed in the literature of DSC and TGA; therefore, there are no results available for comparison with those of this study.

Antimicrobial activity of our formulations can be compared to that described by Arnitz et al. (2009) (28), where bactericidal concentrations of CLT were dose-dependent and exhibited higher efficacy against *S. aureus*. There are three steps involved in how CLT acts as an antimicrobial agent: the formation of a chlorine envelope on the bacterial surface; penetration into the cells, and the destruction of vital components necessary for the microorganism's survival. The rapid action of CLT against *S. aureus* and *S. mutans* can be explained by the higher hydrophilic content present in these microorganisms. These studies provide valuable insights into the potential of CLT as a potent antibacterial compound (29).

This study also evaluated antimicrobial activity against *S. mutans* strains. CLT showed bacteriostatic behavior at 3.125 mmol/L and the MBC obtained was 6.25 mmol/L . Strains were more susceptible to the formulations, which exhibited the same MIC and MBC, $3,5\text{ mmol/L}$, for both formulations, suggesting that the formulations performed better against this microorganism.

This study presents novel findings regarding the activity of CLT directly against strains of *S. mutans*. CLT exhibited bacteriostatic behavior at a concentration of 3.125 mmol/L , with the MBC being 6.25 mmol/L . However, the strains demonstrated greater susceptibility to the formulations, with both formulations showing identical MIC and MBC of 3.5 mmol/L . This suggests that the formulations performed more effectively against this

microorganism. In contrast, Akhlaghi et al. (2016) (30) reported a MIC and MBC of 0.125 mg/mL for a formulation containing 0.2% of chlorhexidine, highlighting its efficacy against *S. mutans*. Although the MIC of chlorhexidine was lower than that of CLT, an improvement in the MBC was observed for the formulations compared to pure CLT, suggesting their potential as an alternative to chlorhexidine.

CLT demonstrated significant antimicrobial activity in the time-kill assay against *S. aureus*, proving its effectiveness against the tested strain at concentrations of 3.5 mmol/L and 7 mmol/L. Martini et al. (2012) (31) conducted a study evaluating similar compounds, such as n-chlorotaurine (NCT), which also exhibited antimicrobial activity against this microorganism. The compounds investigated by Martini shared a common main mechanism of action: the release of the oxidative group chloride, similar to the CLT molecule.

The time-kill assay results presented in this study demonstrate that CLT and its formulations interfere with the growth and survival of *S. mutans* strains. In contrast, Dong et al. (2012) (32) evaluated the efficacy of chlorhexidine against *S. mutans* using a bacterial growth curve at a concentration of 1.25 mg/mL (2.473 mmol/L) and found no antimicrobial activity at this concentration. These findings suggest that CLT exhibits superior activity compared to chlorhexidine against *S. mutans*, with observable antibacterial effects as early as 6 hours.

Results regarding CLT action against *S. aureus* biofilms were positive and can be compared to those obtained by Cincaro et al., (2016) (33). They found that the best concentration against these biofilms was 623 µg/mL (2.21 mmol/L). In the present study, results were obtained regarding the same bacterial species at concentrations of 1x and 2x MIC, noting a significant decrease compared to the positive control in the quantification of biofilm formed by crystal violet.

In this study, biofilm formation by *S. mutans* was found to be less than that of *S. aureus*. The antibiofilm activity of CLT was significantly higher than that of hydrogen peroxide. André et al. (2018) (34) employed CLT as a disinfectant and reported that its antibiofilm activity against *S. mutans* biofilms was effective when using a 1% CLT solution (35.5 mmol/L) for 1 minute, followed by rinsing with water, which aligns with our findings.

Formulations' antibiofilm activity were compared to results of studies using chlorhexidine (RUIZ-LINARES et al., 2014) (8). This study obtained satisfactory results for F1 regarding *S. mutans*, exhibiting antibiofilm activity superior to H₂O₂. Regarding *S. aureus* biofilms, promising results were obtained in both formulations. Studies with lower

concentrations of chlorhexidine against biofilm formation by *S. aureus* are observed in the literature. Wang & Ren (2017) (3) observed activity at concentrations ranging from 200 to 5 µg/mL (395 µM to 9.89 µM). Therefore, even if a higher compound concentration in the formulations is needed, compared to the referenced study, they are still viable for the tested strains due to the significant decrease in biofilm quantification using crystal violet.

In our study, we measured total carbohydrates in biofilms treated with CLT and its formulations. Total carbohydrates reduction was observed in both microorganisms tested, compared to growth control (positive control - PC). Farias et al. (2016) (35) found in their study that the application of chlorhexidine on *S. mutans* is capable of reducing the total levels of carbohydrates, potentially acting on glycosyltransferases, enzymes synthesizing polysaccharides. Vijayakumar et al. (2020) (36) reported in his study that the reduction of EPS in *S. aureus* decreased when using the compound under investigation, which may decrease the formation of mature MRSA biofilms. It is assumed that the significant reduction in polysaccharides measured in the present study represents a significant treatment for the biofilm formed by both tested strains.

This study yields favorable results for the treatment of biofilms formed by *S. aureus* and *S. mutans*. As depicted in Figures 7 and 8, AFM results confirm findings obtained previously (Crystal Violet and Total Carbohydrates measurement). CLT exhibited efficacy against both bacterial strains at all concentrations; the same results were observed in formulations, showing promising results for biofilm treatment of both strains. Zmantar et al. (2017) (37) study evaluated the antibiofilm activity of *Lactobacillus plantarum* extract against *S. aureus* in combination with chlorhexidine. Their results reported strong antibiofilm activity of the extract with the addition of chlorhexidine. Li et al. (2015) (38) study assessed the antimicrobial activity of chlorhexidine acetate and a nanoemulsion containing it against biofilm formed by *S. mutans*. Their findings indicated that while both free chlorhexidine acetate and nanoemulsified forms exhibited activity in preventing biofilm formation, the nanoemulsion was more effective in the tests conducted. Both outcomes are comparable to those obtained in this study, with both formulations demonstrating similarity to chlorhexidine in treating biofilms produced by the tested strains.

Our study evaluated the cytotoxicity of CLT and our formulations (F1 and F2) through hemolytic activity, MTT reduction, and NR uptake assays. Our findings show that the CLT exhibited high cytotoxic activity, even at low concentrations, as demonstrated by the hemolytic and MTT assays. However, Ferreira et al. (2017) (39) demonstrated dose-dependent hemolytic activity with a range of 61 to 67% across all tested concentrations of CLT, ranging from 25 to 762.25 µg/ml. Kloth et al. (2007) (29) observed that in human

fibroblasts, a concentration of 100 ppm (0.355 mM) did not cause significant morphological changes and had cell viability above 90% at different exposure times. The same authors demonstrated persistent morphological changes at 200 ppm (0.71 mM) and lower cell viability at concentrations of 300 ppm (1.065 mM). Nagl et al. (2003) (40) also verified these morphological alterations, and no cell viability in 0,0001% (0,00355 mM), 0,1% and 1% of CLT in human squamous carcinoma cells (A431 lineage).

Our study found that formulations exhibited cytotoxicity starting from 109 μ M, suggesting a very high cytotoxicity. Ebrahimi et al., (2014) (41) evaluated CLT's antiviral activity in Vero cells and found a 50% cytotoxic concentration (CC50) at 0.003 % (59.3 μ M). Coelho et al., (2020) (42) recently assessed the metabolic activity of gingival fibroblasts exposed to a commercial formulation of 0.2% chlorhexidine. These authors observed a metabolic activity lower than 5% after 24 hours of exposure. In comparison, our study demonstrated that CLT has a higher cytotoxicity compared to chlorhexidine.

5. Conclusions

After determining the antimicrobial and antibiofilm activities of the CLT-containing formulations, it was demonstrated that both formulations containing the active ingredient exhibited potential inhibition of *S. aureus* and *S. mutans* bacteria. The formulations remained stable at a temperature of 4°C throughout the observed period. Through FT-IR analysis, it was possible to verify that CLT in both F1 and F2 formulations remained present in both, acting as the active principle of the formulations. The observed cytotoxicity in Vero cells at the tested concentration (7 mM) can be considered high, indicating that such formulations should be administered with caution, even though their primary route is oral or topical. Further characterization and toxicity studies are necessary, as well as broader evaluation of the formulations using bacteria isolated from clinical specimens of patients with oral health issues. The formulations tested in the study demonstrate biotechnological potential for future applications and are considered promising for the treatment of biofilms influencing diseases such as dental caries.

References

1. World Health Organization. WHO highlights oral health neglect affecting nearly half of the world's population. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/18-11-2022-who-highlights-oral-health-neglect-affecting-nearly-half-of-the-world-s-population>. Access in: 24 fev. 2024.
2. Chan AKY, et al. A Systematic Review on Caries Status of Older Adults. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021 Oct 12;18(20):10662.
3. Wang H, Ren D. Controlling *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus* biofilms with direct current and chlorhexidine. *AMB express*. 2017;7(1):1-9.
4. Wang C, et al. *Streptococcus mutans* adhesion force sensing in multi-species oral biofilms. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2020 Jun 24;6(1):25.
5. Fozo EM, Quivey RG. Shifts in the Membrane Fatty Acid Profile of *Streptococcus mutans* Enhance Survival in Acidic Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004 Feb;70(2):929–936.
6. Bittencourt PFS, Barbosa CB, Damé-Teixeira N. *Streptococcus mutans* e seu metabolismo a nível molecular no contexto ecológico da doença cárie. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*. 2022 Sep 15;63(1):106–120.
7. Santos VRD, et al. Effect of *S. mutans* combinations with bifidobacteria/lactobacilli on biofilm and enamel demineralization. *Brazilian Oral Research*. 2021;35:e030.
8. Ruiz-Linares M, et al. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2014;13:1-
9. Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an ‘antiseptic stewardship’ initiative? *Journal of Hospital Infection*. 2016 Nov;94(3):213–227.
10. Huang S, et al. The *dlt* operon contributes to the resistance to chlorhexidine in *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2022;59:106540.

11. Liu Y, Sakaguchi N, Iijima M, Islam MRR, Zhang J, Islam R, et al. Effects of Short-Term Exposure of Chloramine-T Solution on the Characteristics of Light-Cured and Chemical-Cured Adhesives. *Polymers*. 2023 Oct 5;15(19):3995.
12. Tirapelli C, Landi F, Ribas JP, Panzeri H, Lara EHG. Evaluating an Experimental Dentifrice Containing Chloramine-T: a preliminary study. *Oral Health And Preventive Dentistry*. 2010 Dez 17;8(4):375-381.
13. Rolland S, et al. Dentin decontamination using chloramine T prior to experiments involving bacteria. *Dental Materials*. 2007 Dez;23(12):1468–1472.
14. Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *European Journal Of Clinical Pharmacology*. 1999 Abr 13;55(2):95-100
15. Isaac VLB, Cefali LC, Chiari BG, Oliveira CCLG, Salgado HRN, Corrêa MA. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2008;29(1):81-96.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved standard., Wayne, Pennsylvania, 2003.
17. Tsuji BT, et al. In vitro pharmacodynamics of novel rifamycin ABI-0043 against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(1):156–160.
18. Stepanović S, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8):891–899.
19. Yang Y, Sreenivasan PK, Subramanyam R, Cummins D. Multiparameter assessments to determine the effects of sugars and antimicrobials on a polymicrobial oral biofilm. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:6734e42.
20. Vaucher RA, da Motta SA, Brandelli A. Evaluation of the in vitro cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34. *Cell Biol Int*. 2010;34(3):317–323.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.

22. Fernandes MHV, et al. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO P34. Sci Anim Health. 2016;1(1):02.
23. Abed HH. Long-term stability study of chlorhexidine gluconate mouth wash in experimental formula. MDJ. 2007;4(2):136–43.
24. Rajendiran M, Trivedi HM, Chen D, Gajendrareddy P, Chen L. Recent Development of Active Ingredients in Mouthwashes and Toothpastes for Periodontal Diseases. Molecules. 2021 Apr 1;26(7):2001.
25. Al-Badri H, Al-Shammaree SA, Banerjee A, Al-Tae LA. The in-vitro development of novel enzyme-based chemo-mechanical caries removal agents. J Dent. 2023 Nov;138:104714.
26. Shafieyoon P, Mehdipour E, Michalski J. Synthesis, Characterization, and Biological Investigation of Alanine-Based Sulfonamide Derivative: FT-IR, ¹H NMR Spectra: MEP, HOMO–LUMO Analysis, and Molecular Docking. Russ J Phys Chem. 2019 Jul;93(7):1285–96.
27. Sizeland et al. Nanostructure of electrospun collagen: Do electrospun collagen fibers form native structures? Materialia. 2018 Nov;3:90–6.
28. Arnitz R, Nagl M, Gottardi W. Microbicidal activity of monochloramine and chloramine T compared. Journal of Hospital Infection. 2009 Oct;73(2):164–70.
29. Kloth LC, Berman JE, Laatsch LJ, Kirchner PA. Bactericidal and Cytotoxic Effects of Chloramine-T on Wound Pathogens and Human Fibroblasts In Vitro. Advances in Skin & Wound Care. 2007 Jun;20(6):331–45.
30. Akhlaghi N, Sadeghi M, Fazeli F, Akhlaghi S, Mehnati M, Sadeghi M. The antibacterial effects of coffee extract, chlorhexidine, and fluoride against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus plantarum*: An in vitro study. Dent Res J. 2019;16(5):346.
31. Martini C, et al. Antimicrobial and anticoagulant activities of N-chlorotaurine, N, N-dichloro-2, 2-dimethyltaurine, and N-monochloro-2, 2-dimethyltaurine in human blood. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(4):1979-1984.

32. Dong L, et al. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. International journal of antimicrobial agents. 2012;39(5):390-395.
33. Cincarova L, et al. Changes in the expression of biofilm-associated surface proteins in *Staphylococcus aureus* food-environmental isolates subjected to sublethal concentrations of disinfectants. BioMed Research International. 2016.
34. André CB, et al. Evaluation of three different decontamination techniques on biofilm formation, and on physical and chemical properties of resin composites. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2018;106(3):945-953.
35. De Sousa Farias SS, Nemezio MA, Corona SAM, Aires CP, Borsatto MC. Effects of low-level laser therapy combined with toluidine blue on polysaccharides and biofilm of *Streptococcus mutans*. Lasers Med Sci. 2016 Jul;31(5):1011–6.
36. Vijayakumar K, Bharathidasan V, Manigandan V, Jeyapragash D. Quebrachitol inhibits biofilm formation and virulence production against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbial Pathogenesis. 2020 Dec;149:104286.
37. Zmantar T, Ben Slama R, Fdhila K, Kouidhi B, Bakhrouf A, Chaieb K. Modulation of drug resistance and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of Tunisian children. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2017 Jan;21(1):27–34.
38. Li YF, Sun HW, Gao R, Liu KY, Zhang HQ, Fu QH, et al. Inhibited biofilm formation and improved antibacterial activity of a novel nanoemulsion against cariogenic *Streptococcus mutans* in vitro and in vivo. IJN. 2015 Jan;447.
39. Ferreira et al. Antibiofilm Activity and Mechanism of Action of the Disinfectant Chloramine T on *Candida spp.*, and Its Toxicity against Human Cells. Molecules. 2017 Sep 17;22(9):1527.
40. Nagl M, Nguyen VA, Gottardi W, Ulmer H, Hopfl R. Tolerability and efficacy of N-chlorotaurine in comparison with chloramine T for the treatment of chronic leg ulcers with a purulent coating: a randomized phase II study. Br J Dermatol. 2003 Sep;149(3):590-7.
41. Ebrahimi H, et al. A Comparative In Vitro Study of the Effects of Irsha and Chlorhexidine Mouthwashes and Acyclovir on HSV-1. Journal of Dental School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. 2014;32(1).

42. Coelho AS, et al. Cytotoxic effects of a chlorhexidine mouthwash and of an enzymatic mouthwash on human gingival fibroblasts. *Odontology*. 2020;108(2):260-27

5. Disucssão

Neste estudo, investigamos a eficácia da cloramina T, um sal sintético conhecido por sua atividade antibacteriana, como um princípio ativo em formulações de enxaguante bucal. A necessidade dessa pesquisa surge das desvantagens associadas às formulações atualmente disponíveis no mercado e dos relatos de resistência bacteriana aos agentes ativos comerciais, como a clorexidina (KAMPF, 2016; WEBER, RUTALA, SICKBERT-BENNETT, 2007). Para tal, sintetizamos duas formulações de enxaguantes bucais, uma desenvolvida para público infantil e outra para público adulto, e avaliamos suas atividades antimicrobianas, citotóxicas e antibiofilme. Além disso, realizamos a caracterização dessas formulações utilizando espectroscopia FT-IR, termogravimetria e calorimetria, e avaliamos a estabilidade das mesmas, monitorando o pH regularmente ao longo de dois meses.

Um estudo recente (RAJENDIRAN et al., 2021) destacou a necessidade de novas formulações de enxaguantes bucais para tratar diversas doenças orais, devido à crescente resistência bacteriana (HUANG et al., 2022; VAN DE LAGEMAAT et al., 2022). Por exemplo, cepas de *Staphylococcus aureus* têm mostrado resistência transitória ou persistente à clorexidina (PASSARIELLO et al., 2012). Donkor e Kotey (2020) também relataram a presença de MRSA na mucosa oral, complicando o tratamento de doenças periodontais associadas a próteses dentárias. *Streptococcus mutans*, além de sua característica cariogênica que instiga a novos estudos (Lin, Zhou, Li, 2021), também apresentam resistência transitória à clorexidina (Huang et al., 2022). Há, portanto, uma vasta literatura recente sobre novas formulações de enxaguantes bucais para tratar patologias da mucosa oral (GUANDALINI CUNHA et al., 2020; MARTINS et al., 2019; PUIZINA MLADINIC et al., 2022; SHANMUGAM et al., 2024).

Esses estudos frequentemente investigam novas formulações contendo produtos naturais, como óleos essenciais e extratos. Cunha (2020) avaliou a atividade citotóxica e antimicrobiana do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) em comparação com enxaguantes bucais comerciais para materiais prostéticos. Os autores também realizaram a caracterização do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, um procedimento metodologicamente

semelhante ao utilizado. Ambos os estudos observaram alta citotoxicidade dos compostos testados.

Li et al. (2015) investigaram a atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotoxicidade de nanoemulsões contendo acetato de clorexidina. Os autores caracterizaram as nanoemulsões com base em propriedades físico-químicas e estabilidade a longo prazo, além de realizar ensaios de MIC, MBC e *time-kill* para avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme, e a integridade da membrana celular. Embora as metodologias utilizadas referente aos métodos de caracterização em ambos os estudos sejam comparáveis, o estudo apresentado se concentra em resultados da cloramina T, tendo alguns resultados inéditos na literatura. Este estudo também incluiu ensaios de estabilidade a curto prazo, realizados ao longo de 60 dias. Observamos alta estabilidade a 4°C, porém alterações de pH em temperatura ambiente e evaporação a altas temperaturas. Shafieyoon, Mehdipour e Michalski (2019) e Sizeland et al. (2018) relataram características semelhantes para compostos livres de cloramina T.

Al-Badri et al. (2023) combinaram cloramina T com bromelina para criar uma formulação de enxaguante bucal com atividade enzimática. A bromelina, uma enzima proteolítica extraída do caule do abacaxi, é utilizada devido à sua ação sobre ligações peptídicas e propriedades antibacterianas. A caracterização das formulações por espectroscopia infravermelha mostrou resultados consistentes com os nossos. O estudo também utilizou *docking* molecular para avaliar a afinidade da bromelina com colágeno tipo-1 e a eficiência na remoção de dentina cariada. Além disso, avaliaram a atividade enzimática da bromelina e diversos aspectos *in vitro* da formulação. O presente trabalho complementa este estudo anterior ao focar em aspectos *in vitro* não abordados previamente, oferecendo uma visão abrangente sobre a eficácia e estabilidade de novas formulações de enxaguantes bucais contendo cloramina T.

6. Conclusões

Como conclusão deste trabalho, as formulações contendo cloramina T como princípio ativo necessitam de mais estudos e metodologias, como por exemplo, estudos de caracterização das formulações e do composto. Apesar disso, supõe-se que a utilização de formulações baseadas em Cloramina T, principalmente a

formulação 2, obteve um resultado antibacteriano frente a cepas de interesse odontológico estudadas, sendo estas *S. aureus* e *S. mutans*, com atividades expressivas em características como a diminuição do biofilme maduro formado por estas bactérias. A avaliação citotóxica foi elucidada, porém, apesar da alta citotoxicidade, destaca-se novamente que a utilização proposta para estas formulações é somente tópica.

7. Perspectivas

Espera-se que este trabalho contribua para instigar novas pesquisas acerca de novos enxaguantes bucais, tendo em vista os problemas acerca de enxaguantes bucais já empregados relatados neste trabalho. Também se espera que este estudo continue a desenvolver novos resultados, aprimorando e utilizando de novas metodologias para a diminuição da citotoxicidade e o aumento da estabilidade, como a nanoestruturação da CLT, além de novos ensaios para avaliação da citotoxicidade e da caracterização do composto, além da utilização desse mesmo composto frente à outras cepas de interesse odontológico.

8. Referências

World Health Organization. **WHO highlights oral health neglect affecting nearly half of the world's population.** Disponível em: <https://www.who.int/news/item/18-11-2022-who-highlights-oral-health-neglect-affecting-nearly-half-of-the-world-s-population>. Acesso em: 24 fev. 2024.

WHO. **Oral health.** 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>. Acesso em: 24 fev. 2024.

SCANNAPIECO, F. A.; GERSHOVICH, E. The prevention of periodontal disease—An overview. **Periodontology 2000**, v. 84, n. 1, p. 9–13, out. 2020.

SHADDOX, L. M.; MORFORD, L. A.; NIBALI, L. Periodontal health and disease: The contribution of genetics. **Periodontology 2000**, v. 85, n. 1, p. 161–181, fev. 2021.

ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnosis and classification of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 34, p. 9 - 21. 2004

ARMITAGE, G. C.; CULLINAN, M. P.; SEYMOUR, G. J. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis: introduction. **Periodontology 2000**, v. 53, n. 1, p. 7–11, jun. 2010.

CHAN, A. K. Y. et al. A Systematic Review on Caries Status of Older Adults. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 20, p. 10662, 12 out. 2021.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **Lancet**, v. 369, p. 51-59, 2007.

SCANNAPIECO, F. A.; GERSHOVICH, E. The prevention of periodontal disease—An overview. **Periodontology 2000**, v. 84, n. 1, p. 9–13, out. 2020.

SENEVIRATNE, C. J.; ZHANG, C. F.; SAMARANAYAKE, L. P. Dental Plaque Biofilm in Oral Health and Disease. **The Chinese Journal of Dental Research**, v. 14, n. 2, 2011.

LARSEN, T.; FIEHN, N. Dental biofilm infections – an update. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 376–384, abr. 2017.

HANCOCK, V.; DAHL, M.; KLEMM, P. Abolition of Biofilm Formation in Urinary Tract *Escherichia coli* and *Klebsiella* Isolates by Metal Interference through Competition for Fur. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 12, p. 3836–3841, 15 jun. 2010.

LINDHE, J. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.

OFFENBACHER S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*, Estados Unidos, 1, p. 821-878, 1996.

HOJO, K. et al. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 11, p. 982–990, nov. 2009.

KWON, T.; LAMSTER, I. B.; LEVIN, L. Current Concepts in the Management of Periodontitis. **International Dental Journal**, v. 71, n. 6, p. 462–476, dez. 2021.

PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17030, 25 maio 2017.

MENOITA, E. et al. BIOFILMES: CONHECER A ENTIDADE. v. 1, [s.d.].

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 16, n. 1, p. 51–65, 2 jan. 2018.

ERSKINE, E.; MACPHEE, C. E.; STANLEY-WALL, N. R. Functional Amyloid and Other Protein Fibers in the Biofilm Matrix. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 20, p. 3642–3656, out. 2018.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003–2020, 1 ago. 2018.

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, jan. 2018.

CADAVID, E.; ECHEVERRI, F. The Search for Natural Inhibitors of Biofilm Formation and the Activity of the Autoinductor C6-AHL in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, p. 49, 30 jan. 2019.

MILLER, M. B. QUORUM SENSING IN BACTERIA. 2001.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. a012427–a012427, 1 nov. 2012.

LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. A Stress-Inducible Quorum-Sensing Peptide Mediates the Formation of Persister Cells with Noninherited Multidrug Tolerance. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 9, p. 2265–2274, maio 2012.

CONLON, B. P.; ROWE, S. E.; LEWIS, K. Persister Cells in Biofilm Associated Infections. Em: DONELLI, G. (Ed.). **Biofilm-based Healthcare-associated Infections**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 831p. 1–9.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi – a review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 337–345, maio 2012.

RUHAL, R.; KATARIA, R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. **Microbiological Research**, v. 251, p. 126829, out. 2021.

CHERNYSH, S. et al. Biofilm infections between Scylla and Charybdis: interplay of host antimicrobial peptides and antibiotics. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 11, p. 501–514, abr. 2018.

HØIBY, N. et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, p. S1–S25, maio 2015.

STEWART, P. S. Biophysics of biofilm infection. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 212–218, abr. 2014.

JÖNSSON, D. et al. Gingival tissue transcriptomes in experimental gingivitis: Transcriptomes in experimental gingivitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 7, p. 599–611, jul. 2011.

KRISHNAN, K.; CHEN, T.; PASTER, B. A practical guide to the oral microbiome

and its relation to health and disease. **Oral Diseases**, v. 23, n. 3, p. 276–286, abr. 2017.

SMITH, A. J.; JACKSON, M. S.; BAGG, J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 940–946, 1 nov. 2001.

RAVEL, R. Laboratório Clínico: Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 162-163, 1997.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. Bulletin of the International Dairy Federation, Bruxelas, v. 345, p.15-18, 2000.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18033, 31 maio 2018.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, set. 2009.

PASSARIELLO, C. et al. Isolation of *Staphylococcus aureus* and Progression of Periodontal Lesions in Aggressive Periodontitis. **European Journal of Inflammation**, v. 10, n. 3, p. 501–513, set. 2012.

AHMAD-MANSOUR, N. et al. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins**, v. 13, n. 10, p. 677, 23 set. 2021.

MUNITA, J.M.; BAYER, A.S.; ARIAS, C.A.; Evolving resistance among Gram-positive pathogens. **Clin Infect Dis.**, n.15, v.61, p.48-57, 2015.

GUDIOL, C.; CUERVO, G.; SHAW, E.; PUJOL, M.; CARRATALÀ, J.; Pharmacotherapeutic options for treating *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Expert Opin Pharmacother.** n.18, v.18, p.1947-1963. 2017

ARIAS, C. A.; REYES, J.; CARVAJAL, L.P.; Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. **Antimicrob Agents Chemother.** v.61, n.22, p.10, 2017

FRITSCHI, B. Z.; ALBERT-KISZELY, A.; PERSSON, G. R. *Staphylococcus aureus* and Other Bacteria in Untreated Periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 6, p. 589–593, jun. 2008.

DONKOR, E. S.; KOTEY, F. C. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Oral Cavity: Implications for Antibiotic Prophylaxis and Surveillance. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 13, p. 117863372097658, jan. 2020.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 31 dez. 2021.

MINKIEWICZ-ZOCHNIAK, A. et al. Biofilm Formation on Dental Implant Biomaterials by *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis. **Materials**, v. 14, n. 8, p. 2030, 17 abr. 2021.

URIBE-GARCÍA, A. et al. Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, n. 2, p. 267–275, abr. 2021.

BEDOYA-CORREA, C. M.; RODRÍGUEZ, R. J. R.; PARADA-SANCHEZ, M. T. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans*. **Journal of Oral Biosciences**, v. 61, n. 1, p. 22–31, mar. 2019.

RIBEIRO, L. G. M.; HASHIZUME, L. N.; MALTZ, M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 35, n. 5, p. 359–370, maio 2007.

BITTENCOURT, P. F. S.; BARBOSA, C. B.; DAMÉ-TEIXEIRA, N. *Streptococcus mutans* e seu metabolismo a nível molecular no contexto ecológico da doença cárie. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 63, n. 1, p. 106–120, 15 set. 2022.

CLARKE, J. K. ON THE BACTERIAL FACTOR IN THE ETIOLOGY OF DENTAL CARIES. 1924.

SHANMUGAN, K.T., et. al Dental Caries Vaccine – A Possible Option? **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2013.

LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3247–3255, 1 nov. 2008.

LIN, Y.; ZHOU, X.; LI, Y. Strategies for *Streptococcus mutans* biofilm dispersal through extracellular polymeric substances disruption. **Molecular Oral Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 1-8, 22 nov. 2021.

SANTOS, V. R. D. et al. Effect of *S. mutans* combinations with bifidobacteria/lactobacilli on biofilm and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, v. 35, p. e030, 2021.

TAKAHASHI, H.; NADRES, E. T.; KURODA, K. Cationic Amphiphilic Polymers with Antimicrobial Activity for Oral Care Applications: Eradication of *S. mutans* Biofilm. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 1, p. 257–265, 9 jan. 2017.

PETERSEN, F. C. et al. Functional Variation of the Antigen I/II Surface Protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 249–256, jan. 2002.

KRZYŚCIAK, W. et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 499–515, abr. 2014.

NAGASAWA, R.; SATO, T.; SENPUKU, H. Raffinose Induces Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* in Low Concentrations of Sucrose by Increasing Production of Extracellular DNA and Fructan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 15, p. e00869-17, ago. 2017.

ROZEN, R.; STEINBERG, D.; BACHRACH, G. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase interactions with glucans. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 1, p. 39–43, mar. 2004.

WEXLER, D. L. et al. Characteristics and Cariogenicity of a Fructanase-Defective *Streptococcus mutans* Strain. v. 60, 1992.

WANG, C. et al. *Streptococcus mutans* adhesion force sensing in multi-species oral biofilms. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 6, n. 1, p. 25, 24 jun. 2020.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. **MICROBIOL. REV.**, v. 50, 1986.

SANTOS, V. R. D. et al. Effect of *S. mutans* combinations with bifidobacteria/lactobacilli on biofilm and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, v. 35, p. e030, 2021.

AJDIĆ, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14434–14439, 29 out. 2002.

FOZO, E. M.; QUIVEY, R. G. Shifts in the Membrane Fatty Acid Profile of *Streptococcus mutans* Enhance Survival in Acidic Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 929–936, fev. 2004.

GOMES, S. C. et al. Effect of Supragingival Plaque Control in Smokers and Never-Smokers: 6-Month Evaluation of Patients With Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 8, p. 1515–1521, ago. 2007.

MEULMAN, T. et al. Impact of supragingival therapy on subgingival microbial profile in smokers versus non-smokers with severe chronic periodontitis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 8640, jan. 2012.

MARSH, P. D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**, v. 38, p. S11–S15, jun. 2010.

GEBRAN, M. P.; GEBERT, A. P. O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Ciência e Cultura**, n. 26, 2002.

ECHEVERRIA, J.J.; SANZ, M. Controle mecânico da placa supragengival. In: Lindhe J, Lang NP Tratamento de periodontia clínica e implantologia bucal. 4 ed. São Paulo: Guanabara Koogan. 2005; Cap.21. p. 435-49.

ADDY, M. Oral hygiene products: potential for harm to oral and systemic health? **Periodontology** 2000, v. 48, n. 1, p. 54–65, out. 2008.

BARNETT, M. L. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice. **The Journal of the American Dental Association**, v. 134, n. 6, p. 699–704, jun. 2003.

GONZÁLEZ, L. L. et al. Introducción a los antisépticos. **Atención Primaria**, v. 46, p. 1–9, maio 2014.

HORTENSE, S. R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 22, n. 2, p. 178, 8 dez. 2017.

KAMPF, G. Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an ‘antiseptic stewardship’ initiative? **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 3, p. 213–227, nov. 2016.

HORNER, C.; MAWER, D.; WILCOX, M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2547–2559, 1 nov. 2012.

DAVIES, G. E. et al. 1:6-DI-4'-CHLOROPHENYLDIGUANIDOHXANE (“HIBITANE”[®]). LABORATORY INVESTIGATION OF A NEW ANTIBACTERIAL AGENT OF HIGH POTENCY. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 9, n. 2, p. 192–196, jun. 1954.

RIBEIRO, L. G. M.; HASHIZUME, L. N.; MALTZ, M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 35, n. 5, p. 359–370, maio 2007.

VAN STRYDONCK, D. A. C. et al. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 11, p. 1042–1055, nov. 2012.

FLÖTRA, L. et al. Side effects of chlorhexidine mouth washes. **European Journal of Oral Sciences**, v. 79, n. 2, p. 119–125, abr. 1971.

WATTS, A.; ADDY, M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. v. 190, 2001.

SAJJAN, P.; LAXMINARAYAN, N. Chlorhexidine as an Antimicrobial Agent in Dentistry – A Review. **ORAL HEALTH AND DENTAL MANAGEMENT**, v. 15, 2016.

FARRAND, R. J.; WILLIAMS, A.. Evaluation of Single-Use Packs of Hospital Disinfectants. **Lancet**, p. 591-593, 1973.

CIEPLIK, F. et al. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria – Is There Cause for Concern? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 587, 22 mar. 2019.

ROZEN, R.; STEINBERG, D.; BACHRACH, G. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase interactions with glucans. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 1, p. 39–43, mar. 2004.

OPACIC, D.; LEPSANOVIC, Z.; SBUTEGA-MILOSEVIC, G. Distribution of disinfectant resistance genes qacA/B in clinical isolates of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* in one Belgrade hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, n. 3, p. 266–267, nov. 2010.

REICH, P. J. et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in the neonatal intensive care unit: an infection prevention and patient safety challenge. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 7, p. 645.e1-645.e8, jul. 2016.

ZHANG, M. et al. Prevalence of antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. **Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 2, p. 113–117, jun. 2011.

HUANG, S., WU, M., LI, Y., DU, J., CHEN, S., JIANG, S., HUANG, X., & ZHAN, L. (2022). The *dlt* operon contributes to the resistance to chlorhexidine in *Streptococcus mutans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 59, 106540.

JÄRVINEN, H.; TENOVUO, J.; HUOVINEN, P. In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1158–1159, maio 1993.

KASPAR, J. R. et al. Spontaneously Arising *Streptococcus mutans* Variants with Reduced Susceptibility to Chlorhexidine Display Genetic Defects and Diminished Fitness. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 7, p. e00161-19, jul. 2019.

GRÖNROOS, L. et al. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 894–898, abr. 1995.

DOMINGOS, P. A. D. S.; RICCI-DONATO, H. A.; RUSSI, A. K. F. D. Riscos do uso do flúor sistêmico - revisão de literatura. **Journal of Research in Dentistry**, v. 6, n. 4, p. 86, 23 jul. 2018.

JULLIEN, S. Prophylaxis of caries with fluoride for children under five years. **BMC Pediatrics**, v. 21, n. S1, p. 351, set. 2021.

LEAL, S. D.; CARVALHO, F. S. D.; CARVALHO, C. A. P. D. Conhecimento de alunos do Curso de Odontologia sobre o uso racional do flúor. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 44, n. 1, p. 51–58, fev. 2015.

GUTH, S. et al. Toxicity of fluoride: critical evaluation of evidence for human developmental neurotoxicity in epidemiological studies, animal experiments and in vitro analyses. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1375–1415, maio 2020.

ROŠIN-GRGET, K. The cariostatic mechanisms of fluoride. **Acta Medica Academica**, v. 42, n. 2, p. 179–188, 15 nov. 2013.

CHELLAIAH, E. R.; RAVI, P.; UTHANDAKALAIPANDIAN, R. Isolation and identification of high fluoride resistant bacteria from water samples of Dindigul district, Tamil Nadu, South India. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100038, dez. 2021.

RANDALL, J.; SEOW, W.; WALSH, L. Antibacterial activity of fluoride compounds and herbal toothpastes on *Streptococcus mutans*: an *in vitro* study. **Australian Dental Journal**, v. 60, n. 3, p. 368–374, set. 2015.

CHIBA, F. Y. et al. Effect of Chlorhexidine and Fluoride Varnishes on *Streptococcus mutans* Count and Dental Plaque Index. **Journal of Health Sciences**, v. 21, n. 4, p. 371–375, 20 dez. 2019.

ZHANG, K. et al. Influence of Fluoride-Resistant *Streptococcus mutans* Within Antagonistic Dual-Species Biofilms Under Fluoride In Vitro. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 801569, 28 fev. 2022.

STRECKFUSS, J. L. et al. Fluoride Resistance and Adherence of Selected Strains of *Streptococcus mutans* to Smooth Surfaces After Exposure to Fluoride. **Journal of Dental Research**, v. 59, n. 2, p. 151–158, fev. 1980.

STRECKFUSS, J. L. et al. Fluoride Resistance and Adherence of Selected Strains of *Streptococcus mutans* to Smooth Surfaces After Exposure to Fluoride. **Journal of Dental Research**, v. 59, n. 2, p. 151–158, fev. 1980.

VAN LOVEREN, C. et al. Acidogenesis in relation to fluoride resistance of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 6, n. 5, p. 288–291, out. 1991.

LIAO, Y. et al. Fluoride resistance in *Streptococcus mutans*: a mini review. **Journal of Oral Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1344509, 1 jan. 2017.

FLEMINGSON ; EMMADI, Pamela; AMBALAVANAN, N.; RAMAKRISHNAN, T.; VIJAYALAKSHMI, R. Efeito de três enxaguantes bucais comerciais em fibroblastos gengivais humanos cultivados: um estudo in vitro. *Indian Journal of Dental Research*, v. 19, n. 1, p. 29-35, jan.-mar. 2008.

WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA, M. et al. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, n. 6, p. 1594–1600, jun. 2016.

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ, C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 4–5, p. 271–276, ago. 2001.

BANERJEE, S. et al. Cytotoxic effect of chlorhexidine gluconate mouthwash – A micronuclei-assay. **International Journal of Applied Dental Sciences**, [s.d.].

DE OLIVEIRA, J. R. et al. Mouthwashes: an in vitro study of their action on microbial biofilms and cytotoxicity to gingival fibroblasts. **GENERAL DENTISTRY**, 2018.

TSOUROUNAKIS, I. et al. Effect of Essential Oil and Chlorhexidine Mouthwashes on Gingival Fibroblast Survival and Migration. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 8, p. 1211–1220, ago. 2013.

MARTINS, M. L. et al. Cytotoxic and antibacterial effect of a red propolis mouthwash, with or without fluoride, on the growth of a cariogenic biofilm. **Archives of Oral Biology**, v. 107, p. 104512, nov. 2019.

PUIZINA MLADINIC, E. et al. Clinical Prospective Assessment of Genotoxic and Cytotoxic Effects of Fluoride Toothpaste and Mouthwash in Buccal Mucosal Cells. **Biomedicines**, v. 10, n. 9, p. 2206, 6 set. 2022.

TABATABAEI, M. H. et al. Cytotoxicity of the Ingredients of Commonly Used Toothpastes and Mouthwashes on Human Gingival Fibroblasts. **Frontiers in Dentistry**, 29 jun. 2020.

SHANMUGAM, R. et al. Preparation of a Herbal Mouthwash With Lemongrass and Mint-Mediated Zinc Oxide Nanoparticles and Evaluation of Its Antimicrobial and Cytotoxic Properties. **Cureus**, 5 fev. 2024.

PANZERI, H. et al. In vitro and clinical evaluation of specific dentifrices for complete denture hygiene. **Gerodontology**, v. 26, n. 1, p. 26–33, mar. 2009.

ROLLAND, S. et al. Dentin decontamination using chloramine T prior to experiments involving bacteria. **Dental Materials**, v. 23, n. 12, p. 1468–1472, dez. 2007.

TIRAPELLI, C.; LANDI, F.; RIBAS, J. P.; PANZERI, H.; LARA, E.H.G. Evaluating an Experimental Dentifrice Containing Chloramine-T: a preliminary study. **Oral Health And Preventive Dentistry**, v. 8, n. 4, p. 375-381, 17 dez. 2010.

PITTEN, F. A.; KRAMER, A.. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. **European Journal Of Clinical Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 95-100, 13 abr. 1999.

CINCAROVA, L. et al. Changes in the Expression of Biofilm-Associated Surface Proteins in *Staphylococcus aureus* Food-Environmental Isolates Subjected to Sublethal Concentrations of Disinfectants. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–12, 2016.

FERREIRA, G. et al. Antibiofilm Activity and Mechanism of Action of the Disinfectant Chloramine T on *Candida* spp., and Its Toxicity against Human Cells. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1527, 17 set. 2017.

MANGAL, K. et al. Evaluation of Effective Chloramine-T Concentration to Be Incorporated in Dental Stone for Antimicrobial Activity. **Cureus**, 31 dez. 2022.

AL-BADRI, H. et al. The in-vitro development of novel enzyme-based chemo-mechanical caries removal agents. **Journal of Dentistry**, v. 138, p. 104714, nov. 2023.

RADHAKRISHNAN, S.; RAMAMURTHY, J. Evaluation of Cytotoxic Activity of Calotropis Gigantea Mouthwash-An In Vitro Study. **International Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. sp1, 2 out. 2020.

GUANDALINI CUNHA, B. et al. Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. **Archives of Oral Biology**, v. 109, p. 104577, jan. 2020.

MOTAMEDI, M. H. et al. Evaluation of cytotoxic effects of Anbarnesa on fibroblast L929: Can it be used as a mouthwash? **Ancient Science of Life**, v. 33, n. 4, p. 203, 2014.

MÜLLER, H.-D. et al. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

SAGAR, S. Cytotoxic and Antimicrobial Effects of Herbal Formulation (*Ficus benghalensis*, *Azadirachta indica* and *Mentha piperita*) Based Mouthwash. v. 13, n. 2, 2022.

Anexos

Anexo A: Comprovante de submissão do manuscrito à revista *Pharmaceutical Research*

Dear Sr. Vaucher,

Thank you for submitting your manuscript,

"Evaluation of the antimicrobial, antibiofilm, and cytotoxicity 'in vitro' activity of two mouthwashes containing Chloramine T.", to Pharmaceutical Research

The submission id is: PHAM-D-24-00395

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript.

Please log in as author at the Editorial Manager (EM) system:

Your username is: rodvaucher

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/pham/>.

If you have any questions, please contact us.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Pharmaceutical Research

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.