

Avaliação do efeito antisséptico de nanoemulsão com óleo essencial de canela sobre *Streptococcus mutans*

Evaluation of the antiseptic effect of nanoemulsion with cinnamon essential oil on *Streptococcus mutans*

Evaluación del efecto antiséptico de la nanoemulsión con aceite esencial de canela sobre *streptococcus mutans*

Recebido: 29/01/2022 | Revisado: 03/02/2022 | Aceito: 12/03/2022 | Publicado: 20/03/2022

Daniella Londero Silva Batisti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2371-2644>
Universidade Estadual de Maringá, Brasil
E-mail: dlatisti@hotmail.com

Ricardo Botelho Camargo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3960-1068>
Universidade Estadual de Maringá, Brasil
E-mail: ricardobotelhoc@gmail.com

Viviane Krominski Graça de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7773-932X>
Universidade Estadual de Maringá, Brasil
E-mail: krominskiviviane@gmail.com

José Renato Pattaro Júnior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3904-3919>
Universidade Estadual de Maringá, Brasil
E-mail: pattoze@gmail.com

José Eduardo Gonçalves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2505-0536>
Centro Universitário de Maringá, Brasil
E-mail: jose.goncalves@unicesumar.edu.br

Cristiane Mengue Feniman Moritz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9114-2156>
Universidade Estadual de Maringá, Brasil
E-mail: crisfeniman@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antibacteriana de nanoemulsão com óleo essencial (OE) de canela (*Cinamomum cassia*), como antisséptico bucal. Foram desenvolvidas duas formulações de enxaguatório bucal contendo OE de canela para o preparo de nanoemulsões com dois tipos de surfactantes, Tween 80 e lecitina de soja. Os tratamentos foram comparados com a clorexidina (controle) para as Concentrações Inibitórias e Bactericidas Mínimas (CIM e CBM, respectivamente), sinergismo entre os tratamentos e cinética de atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, além da quantificação da substantividade dos tratamentos. Conjuntamente, foi realizada a caracterização química do OE de canela e a caracterização das nanoemulsões. As nanoemulsões apresentaram atividade antimicrobiana na CIM e CBM de 0,625 mg mL⁻¹ contra o *Streptococcus mutans* e a clorexidina de 0,01 mg mL⁻¹ e não foi detectado sinergismo entre cada nanoemulsões de OE de canela e a clorexidina. Comparando a eficiência das nanoemulsões com a clorexidina a 0,12%, na quantificação da substantividade, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Produtos naturais; Enxaguatório; Biofilme dental; Cárie.

Abstract

The objective of this work was to verify the antibacterial activity of nanoemulsion with essential oil (EO) of cinnamon (*Cinamomum cassia*), as a mouthwash. Two formulations of mouthwash containing cinnamon EO were developed for the preparation of nanoemulsions with two types of surfactants, Tween 80 and soy lecithin. Treatments were compared with chlorhexidine (control) for Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC, respectively), synergism between treatments and kinetics of antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, in addition to quantifying the substantivity of the treatments. Together, the chemical characterization of cinnamon EO and the characterization of the nanoemulsions were carried out. The nanoemulsions showed antimicrobial activity in the MIC and CBM of 0.625 mg mL⁻¹ against *Streptococcus mutans* and 0.01 mg mL⁻¹ of chlorhexidine and no

synergism was detected between each cinnamon EO nanoemulsion and chlorhexidine. Comparing the efficiency of nanoemulsions with 0.12% chlorhexidine in quantifying substantivity, there was no significant difference between treatments.

Keywords: Antimicrobials; Natural products; Mouthwash; Dental biofilm; Caries.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue verificar la actividad antibacteriana de la nanoemulsión con aceite esencial (AE) de canela (*Cinamomum cassia*), como enjuague bucal. Se desarrollaron dos formulaciones de enjuague bucal con AE de canela para la preparación de nanoemulsiones con dos tipos de tensioactivos, Tween 80 y lecitina de soja. Se compararon los tratamientos con clorhexidina (testigo) para Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Bactericidas (MIC y CMB, respectivamente), sinergismo entre tratamientos y cinética de actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, además de cuantificar la sustentividad de los tratamientos. En conjunto se realizó la caracterización química del AE de canela y la caracterización de las nanoemulsiones. Las nanoemulsiones mostraron actividad antimicrobiana en CIM y CBM de 0.625 mg mL⁻¹ contra *Streptococcus mutans* y 0.01 mg mL⁻¹ de clorhexidina y no se detectó sinergismo entre cada nanoemulsión de AE de canela y clorhexidina. Comparando la eficiencia de las nanoemulsiones con clorhexidina al 0,12% en la cuantificación de la sustentividad, no hubo diferencia significativa entre tratamientos.

Palabras clave: Antimicrobianos; Productos naturales; Enjuague bucal; Biopelícula dental; Caries.

1. Introdução

O biofilme dentário é causa etiológica das principais doenças da cavidade bucal, como a cárie dentária e a doença periodontal. A desorganização ou a eliminação mecânica do biofilme contribui para a remissão dessas doenças bucais (Prasad *et al.*, 2015).

Como estratégias para a prevenção da cárie dentária estão as práticas de remoção do biofilme por meio do controle mecânico (escovação dentária e uso de fio dental), do controle na dieta e com o auxílio do controle químico pelo uso de soluções antimicrobianas (Gebran & Gebert 2002).

Os enxaguatórios bucais são recomendados para redução ou eliminação do biofilme dental, diminuindo a quantidade de bactérias, que quando se encontram em desequilíbrio populacional na cavidade bucal, podem causar infecções bucais (Zanatta & Rosing 2007).

Uma das substâncias mais efetivas e reconhecida na literatura é a clorexidina, que se encontra no grupo dos agentes catiônicos e apresenta um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e negativas e leveduras (Torres *et al.*, 2000; Soares & Fukushigue 2019; Souza *et al.*, 2019).

Embora a clorexidina seja uma substância segura e efetiva, apresenta alguns efeitos colaterais importantes, como a pigmentação extrínseca nos dentes, em restaurações e no dorso da língua, (Torres *et al.*, 2000; Van Strydonck *et al.*, 2012) sensibilidade oral e alterações no paladar (Arunachalam *et al.*, 2012) quando utilizada em protocolos de uso em períodos aproximados de sete a dez dias.

Considerando os efeitos colaterais do uso de enxaguatórios bucais com clorexidina, as biomoléculas de óleos essenciais (OEs) de plantas variadas têm se apresentado promissoras em estudos que demonstram interessantes resultados no controle e tratamento de doenças bucais (Alves *et al.*, 2008; Lemos *et al.*, 1990; Moreira *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2000). O OE de canela teve atividade antibiofilme (Kim *et al.*, 2013) e atividade antimicrobiana contra as principais bactérias cariogênicas o *Streptococcus mutans* e *Lactobacillos casei* (Wiwattanarattanabut *et al.*, 2017), sendo uma opção viável para o desenvolvimento de um enxaguatório bucal.

Considerando seu caráter lipofílico, os OEs podem ser aplicados na fase oleosa em sistemas de emulsão, permanecendo estáveis suas propriedades físicas e químicas (Pongsumpun *et al.*, 2020), além de oferecer a atividade biológica de interesse (Li *et al.*, 2017).

Emulsões são sistemas de liberação de substâncias à base de óleo contendo uma mistura de duas fases imiscíveis (como óleo e água), que são estabilizadas por surfactantes e co-surfactantes (Valizadeh *et al.*, 2018), fornecendo assim uma

maior área de superfície das partículas e energia livre, tornando-se um sistema mais eficaz de transporte pela membrana celular (Bhatt & Madhav 2010).

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antibacteriana de enxaguatório bucal com nanoemulsão de óleo essencial de canela, como alternativa ou ação sinérgica para a clorexidina, contra *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

2. Metodologia

Com base no método hipotético-dedutivo, que é baseado na construção de hipóteses a partir de um problema e por meio de experimentos são confirmadas ou refutadas as hipóteses (Lakatos & Marconi, 2010).

2.1 Material e Métodos

Foi utilizado o OE de canela (*Cinamomum cassia* – cascas/canela da China GT China) lote 2840, validade 10/2023, da marca Laszlo. Como controle de atividade e comparação de ação antimicrobiana foi utilizada a solução de digluconato de clorexidina a 20% (RN Laboratories India) lote 37577, validade 06/2023, emitido como material de referência certificado.

Utilizou-se a bactéria *Streptococcus mutans* INCQ 00446 (ATCC 25175) proveniente da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Caracterização química do OE de canela

A caracterização química foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa – CG/EM (Shimadzu, modelo GCMS-plus-QP2010), no qual utilizou-se uma coluna capilar HP-5 de 30 metros x 0,25 mm x 0,25 mm. A temperatura do injetor foi de 280 °C e da interface foi de 290 °C. O detector foi operado em modo Electron Impact (EI) a 70 e V utilizando hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas para o OE de canela foram de: temperatura inicial de 60 °C (1min.) em taxa de 4 °C min⁻¹, aquecimento até 290 °C por 5 min. e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 300 °C por 1 min. Injeção split 1:10 em clorofórmio e o volume injetado de 1 µL de amostra. Uma mistura de alcanos lineares (C9 a C30) foi injetada no cromatográfico nas mesmas condições utilizadas como padrão para os cálculos do índice de retenção com programação linear de temperatura. A identificação foi realizada por comparação de índice de retenção com bibliotecas (Adams 2017; Nist 2019).

Preparo e caracterização das formulações de emulsões com óleo essencial de canela

As formulações contendo OE de canela foram preparadas com base no modelo apresentado por Liew et al. 2020 para o preparo de nanoemulsões. Foram testados dois tipos de surfactantes, o polissorbato 80 (Tween 80, Inlab, São Paulo, SP, Brasil) e lecitina de soja orgânica (Gebana, Capanema, PR, Brasil).

A fase óleo correspondeu à 20% (p/p) da solução, sendo o surfactante na proporção de 1:4 partes. Para a fase óleo utilizou-se 450 mg de surfactante, 30 mg de óleo de girassol (Suavit, Maringá, PR, Brasil) e 120 mg de OE de canela, homogeneizados em um microtubo, por agitação em vórtex por 60 segundos.

Em uma microplaca de 12 poços pesou-se 2.400 mg de água destilada estéril em um poço e procedeu-se agitação a 1200 rpm em agitador magnético. Adicionou-se com o auxílio de uma pipeta de 1000 µL a fase óleo em gotículas na fase água. Agitou-se a mistura por 10 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

As emulsões foram então preparadas na concentração de 40 mg mL⁻¹. As emulsões foram armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração.

As nanoemulsões foram caracterizadas utilizando o analisador de partículas Litesizer 500 (Anton Paar), conforme os parâmetros estabelecidos por Liew et al. 2020.

Foi determinado o tamanho de partícula por medição da dispersão da luz dinâmica (*Dynamic Light Scattering* – DLS) e índice de polidispersão (*Polidispersity Index* – PDI) a 25°C, ângulo de 90°, 60 corridas, 10 segundos de equilíbrio e considerando o índice de transmitância mínimo de 70%. Para avaliar a estabilidade térmica da nanoemulsão, as amostras foram submetidas à medição de DLS nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C.

Para a comparação de maior estabilidade das nanopartículas foi medido o pH e potencial zeta por dispersão de luz eletroforética (*Electrophoretic Light Scattering* – ELS) a 25 °C e 60 corridas.

Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Foi utilizado o método da microdiluição em caldo (CLSI/NCCLS 2009) com adaptações, sendo testadas as concentrações seriadas 1:2 de 10,0 a 0,019 mg mL⁻¹ de OE de canela. Para o teste com a clorexidina (controle) foram testadas as concentrações seriadas 1:2 de 160 a 0,3125 µg mL⁻¹.

A partir das emulsões com o OE essencial de canela foram preparadas as concentrações mãe com 1000 µL de cada emulsão e 1000 µL de caldo Mueller Hinton duplo. Na microplaca essa concentração mãe foi adicionada no volume de 50 µL nas colunas 3 e 4, sendo a coluna 4 até a coluna 12 já contendo 50 µL de caldo Mueller Hinton com 0,5 % de tween 80. A diluição seriada foi realizada na própria microplaca e todos os poços ficaram com volume final de 50 µL.

Para a preparação do inóculo, a bactéria *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi ativada previamente em caldo BHI (37°C por 24 horas) foi estriada por esgotamento em placas de ágar nutriente (37°C por 24 horas) e padronizadas na escala 0,5 de MacFarland (1,0 . 10⁸ UFC mL⁻¹) com absorbância entre 0,08 e 0,10, utilizando espectrofotômetro (Kasuki, IL-227) com comprimento de onda de 625nm. Então o inóculo foi preparado com duas diluições seriadas, a primeira diluição na proporção de 1:10 em solução salina (1,0 . 10⁷ UFC mL⁻¹) e depois outra diluição 1:10 em caldo Mueller Hinton com 0,5 % de tween 80 (1,0 . 10⁶ UFC mL⁻¹).

Na microplaca foram adicionados 50 µL do inóculo em cada poço, obtendo-se então uma concentração celular de 5,0 . 10⁵ UFC mL⁻¹ e as concentrações do OE de canela e clorexidina testadas. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, em câmara úmida.

Para verificação da CIM foram adicionados 50 µL do indicador resazurina 0,01% em cada poço da microplaca e a mesma foi incubada sob refrigeração *over night* para a realização da leitura de cor. O desenvolvimento de coloração rosa indicou o crescimento bacteriano e a permanência da coloração azul do indicador indicou a inibição bacteriana. Os resultados de cor foram anotados e as microplacas também foram fotografadas em fotodocumentador (Ammrshom Imager 600 - GE) no modo UV-Vis com exposição de 0,5 minutos.

A verificação da CBM foi determinada pelo repique de cada poço da microplaca em placas de petri 150 mm contendo Ágar Mueller Hinton, antes da leitura da CIM. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O não desenvolvimento de colônia bacteriana nos repiques de cada poço indicaram a atividade bactericida.

Além das concentrações de nanoemulsões com OE de canela e clorexidina testadas, foram preparados os controles negativos (apenas caldo Mueller Hinton, a maior e a menor concentração de nanoemulsão com OE de canela ou clorexidina) e controles positivos (culturas bacterianas sem os agentes antimicrobianos em teste). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para a CIM e a CBM foram consideradas as menores concentrações com inibição e morte bacteriana, respectivamente, em pelo menos duas replicatas.

Combinação de ativos pelo método de checkerboard

A avaliação da combinação de ativos entre as nanoemulsões com OE de canela e a clorexidina foi realizada utilizando a metodologia de *Checkerboard* (Pillai & Moellering 2005), na qual a concentração máxima das nanoemulsões com OE de canela e da clorexidina foi de 5 mg mL⁻¹.

Contra a cepa padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi calculado o índice de Concentração Inibitória Fracionária (*Fractional Inhibitory Concentration* – FIC) das CIMs e CBMs dos princípios ativos isolados e em conjunto (Equações 1 a 3). A interpretação do Índice FIC foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros: sinergismo, se $FIC \leq 0,5$; antagonismo, se $FIC > 4,0$; sem interação, se $0,5 < FIC \leq 4,0$ [24].

$$FIC_A = \frac{CIM \text{ ou } CBM_A \text{ combinado}}{CIM \text{ ou } CBM_A} \quad \text{Equação (1)}$$

$$FIC_B = \frac{CIM \text{ ou } CBM_B \text{ combinado}}{CIM \text{ ou } CBM_B} \quad \text{Equação (2)}$$

$$\text{Índice FIC} = FIC_A + FIC_B \quad \text{Equação (3)}$$

Cinética bactericida

Baseado no método descrito por Beckloff *et al.*, (2007) foi conduzido o experimento com adaptações para a cinética bactericida das concentrações a serem encontradas para a CIM do OE de canela, além do tratamento controle. Foram estabelecidas as concentrações igual a CIM, 2 x CIM e a maior concentração testada neste estudo, de 10,0 mg mL⁻¹.

A cultura ativada previamente de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi padronizada na escala 0,5 de MacFarland ($1,0 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹) em espectrofotômetro, com absorvância de 0,08 a 0,10 e posterior quatro diluições seriadas em solução salina, para alcançar a concentração celular de aproximadamente $1,0 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Após a adição dos tratamentos na cultura da última diluição e passado o tempo de contato, foram realizadas três diluições seriadas 1:10, sendo toda semeadas em placas de petri contendo *Plate Count Agar* (PCA), por semeadura em superfície de 0,1 mL de cada diluição. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e contadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹).

Foram considerados os tempos 0 (controle), 30, 60, 90 e 120 segundos de contato de cada tratamento e o experimento foi realizado em triplicata.

Quantificação da substantividade

A partir da emulsão preparada com o óleo essencial de canela (40 mg mL⁻¹), com os dois surfactantes testados (lecitina de soja e Tween 80), foram preparadas as formulações de enxaguatório bucal procedendo-se uma diluição em água destilada estéril, considerando as concentrações com melhores performances determinadas na CIM, CBM e cinética bactericida, quanto à atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*. Também foi testada uma solução de clorexidina a 0,12% e solução salina (controle).

Segundo a metodologia de Tomás *et al.*, (2010) com adaptações, um grupo de estudo foi selecionado a partir de anamnese prévia com quatro voluntários com idade entre 20 e 45 anos que apresentaram uma boa condição bucal, sendo essa etapa realizada após a aprovação do projeto no Comitê de Ética de Pesquisa, com certificado n. 46793221.6.0000.104 e parecer n. 4.826.913.

Foi aplicado a exclusão de alguns critérios no grupo de estudo: fumantes, portadores de próteses dentárias ou aparelhos ortodônticos, indivíduos que apresentem doenças sistêmicas que interfiram na produção de fluxo salivar (diabetes, depressão, hipertensão), de acordo com Millsop *et al.*, (2017), que tinham realizado tratamento com antibióticos ou que faziam uso de enxaguatórios bucais antissépticos durante os três meses anteriores. Foi solicitada aos voluntários a realização de escovação 5 minutos antes do início do experimento.

As amostras de saliva foram coletadas com auxílio de bochecho com 20 mL de solução salina por 10 segundos, sendo a solução recolhida em frascos estéreis. As coletas foram procedidas no tempo 0 antes da aplicação dos tratamentos de enxaguatório bucal e nos tempos posteriores de 5 minutos, 1, 2 e 3 horas.

A partir da saliva coletada em solução salina foram preparadas diluições seriadas e 100 µL de cada diluição foram semeados em placas de Petri contendo Plate Count Agar (PCA). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias formadas foram contadas em contador de colônia e expressas por Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL de saliva solubilizada.

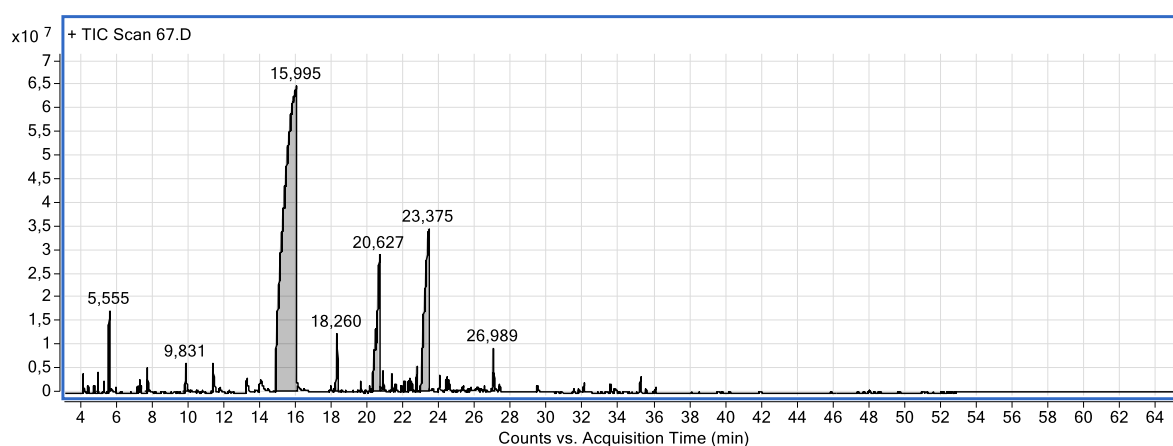
3. Resultados e Discussão

Caracterização química do OE de canela

A caracterização química do OE de canela foi realizada pela separação dos compostos por cromatografia gasosa (Figura 1) e espectrometria de massas para a identificação dos compostos (Tabela 1). O OE de canela apresentou os compostos majoritários cinamaldeído (Z) (72,50%), cinamato de metila (E) (12,85%), cinamaldeído α -metil (7,77%), álcool cinâmico (Z) (1,38%), cumeno (1,23%) e cariofileno 9-epi-(E) (0,93%).

Os terpenóides são os fitoquímicos mais abundantes na *Cinnamomum cassia* e os fenilpropanóides são os componentes bioativos, onde o cinamaldeído é o representante principal (Zhang *et al.*, 2019).

Figura 1 – Cromatograma do óleo essencial de canela.



Fonte: Autores.

A atividade antimicrobiana do OE da canela depende da concentração de seus compostos majoritários, que são característicos da parte da planta que é utilizada para a extração do OE, além das condições edafoclimáticas (Ribeiro-Santos *et al.*, 2017). O OE extraído das cascas da canela tem um teor de cinamaldeído mais elevado (65-80%) (Yanakiev 2020), o que corrobora com o valor encontrado neste estudo, que foi de 72,50%. Firmino *et al.*, (2018) identificaram o cinamaldeído como o principal composto do OE da canela (*Cinnamomum cassia*), que representou 90,22% dos componentes totais, Zhang *et al.*, (2019) encontraram no OE de canela (*C. cassia*) como componentes principais o cinamaldeído (86,07%), o ácido cinâmico

(11,04%) e o benzaldeído (1,28%). Já Jose *et al.*, (2019) encontraram o cinamaldeído como o composto majoritário em 23 amostras de OE de canela (*C. cassia*) extraído de distintas árvores, com variação de 75 a 97% desse composto no total de componentes das amostras.

Tabela 1 – Caracterização química do óleo essencial de canela (amostra ATPN 067) por cromatografia gasosa com espectrometria de massas.

Pico	Tempo de retenção (min.)	Índice de Retenção Linear ^a	Composto ^b	Fórmula molecular	Área (%) ^c
1	4,105		Não identificado		0,22
2	4,932		Não identificado		0,18
3	5,555	930	Cumene	C ₉ H ₁₂	1,23
4	7,680		Não identificado		0,48
5	9,831		Não identificado		0,70
6	11,351		Não identificado		0,49
7	15,995	1208	Cinnamaldehyde <(Z)->	C ₉ H ₈ O	72,50
8	18,26	1260	Cinnamyl alcohol <(Z)->	C ₉ H ₁₀ O	1,38
9	20,627	1315	Cinnamaldehyde <α-methyl->	C ₁₀ H ₁₀ O	7,77
10	20,824		Não identificado		0,51
11	21,327		Não identificado		0,33
12	22,707		Não identificado		0,45
13	23,375	1379	Methyl cinnamate <(E)->	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	12,85
14	26,989	1467	Caryophyllene <9-epi-(E)->	C ₁₅ H ₂₄	0,93
Total de compostos identificados					96,66

^aÍndice de retenção calculado usando n-alcanos C9-C30 na coluna HP-5. ^bCompostos listados na ordem de eluição na coluna HP-5. ^cPorcentagem de área relativa à área ocupada pelos compostos no cromatograma. Fonte: Autores.

Caracterização das emulsões

Emulsões são sistemas que contém duas fases imiscíveis compostas minimamente por três componentes: fase aquosa, fase oleosa e surfactante (Yukuyama *et al.*, 2016). Quando a fase oleosa é dispersa na fase aquosa, o sistema é chamado de emulsão óleo em água (O/W), mas quando a fase aquosa é dispersa na fase oleosa é chamada de emulsão água em óleo (W/O) (Komaiko & McClements 2016).

As nanoemulsões testadas neste estudo foram caracterizadas e seus parâmetros estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização das nanoemulsões com OE de canela e surfactantes.

Surfactante	Temperatura (°C)	Tamanho da partícula (nm)*	Índice de polidispersão (%)*	Potencial zeta (mV)**
Lecitina de soja	25	376,75 ad ± 13,36	27,17 a ± 2,39	-33,33 a ± 1,16
	30	535,40 dc ± 106,02	27,37 a ± 0,40	
	35	660,63 bc ± 139,20	30,27 a ± 6,07	
	40	611,93 bc ± 63,53	30,87 a ± 4,14	
Tween 80	25	225,58 a ± 40,90	27,83 a ± 1,87	-23,3 b ± 1,15
	30	233,13 a ± 15,78	27,23 a ± 0,47	
	35	269,47 a ± 2,97	27,17 a ± 3,70	
	40	281,17 a ± 33,95	27,63 a ± 0,35	

*Letras iguais na mesma linha indicam igualdade a 95% de significância. **Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade a 99% de significância. Fonte: Autores.

As emulsões podem ser caracterizadas de acordo com o diâmetro das partículas, mas diferentes autores sugerem classificações distintas (Bhatt & Madhav 2010; Komaiko & McClements 2016; Valizadeh *et al.*, 2018).

Segundo Gupta *et al.*, (2014) as emulsões são denominadas macroemulsões quando possuem partículas com diâmetro entre 1 e 100 μm , nanoemulsões entre 20 e 500 nm e microemulsões entre 10 e 100 nm. No entanto, Valizadeh *et al.*, (2018) consideraram nanoemulsões quando as partículas possuem diâmetro menor que 100 nm e com tamanho acima de 100 nm até alguns microns são consideradas microemulsões. Bhatt e Madhav (2010) classificaram as nanoemulsões com diâmetros médios de partícula com variação de 50 a 1000 nm, sendo que normalmente o tamanho médio está entre 100 e 500 nm.

Ainda há a classificação proposta por Komaiko e McClements (2016) que relacionam o diâmetro das partículas e a sua estabilidade termodinâmica, sendo as emulsões do tipo emulsão e nanoemulsão (com diâmetros de partícula maior e menor que 200 nm, respectivamente) consideradas metaestáveis termodinamicamente. Já as microemulsões (com diâmetro de partícula menor que 100 nm) considerada estável.

As duas emulsões preparadas e testadas neste estudo apresentaram um tamanho de partícula de 225,58 e 376,75 nm a 25°C, com os surfactantes Tween 80 e lecitina de soja, respectivamente. Conforme a classificação proposta por Gupta *et al.*, (2014) e Bhatt e Madhav (2010), elas foram consideradas como nanoemulsões.

Todavia, se fosse considerada a classificação proposta por Valizadeh *et al.*, (2018) elas seriam microemulsões. E ainda seriam apenas emulsões convencionais de acordo com Komaiko e McClements (2016).

Para McClements (2012) um tamanho de partícula reduzido normalmente torna o sistema mais estável termodinamicamente (para evitar a agregação de partículas e separação gravitacional). As microemulsões (de acordo com a classificação desse autor) apresentam essa vantagem e diferenciam-se na estabilidade termodinâmica, na qual as microemulsões são mais estáveis em relação às nanoemulsões e às macroemulsões.

Macroemulsões e nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, sugerindo que em um determinado tempo ocorrerá uma separação das fases (Gupta *et al.*, (2014); Komaiko e McClements (2016). Em um sistema termodinamicamente instável a energia livre das fases separadas, óleo e água, são inferiores ao da própria emulsão. Nessa situação as emulsões que assim se apresentam sempre têm a tendência a se decomporem ao longo do tempo, por diferentes mecanismos físico-químicos, tais como separação gravitacional, floculação, coalescência, degradação química e amadurecimento de Ostwald (McClements & Rao, 2011).

No momento do preparo das nanoemulsões a 25°C com diferentes surfactantes obteve-se partículas consideradas estatisticamente iguais quanto ao diâmetro hidrodinâmico.

O aumento da temperatura favoreceu a coalescência das partículas para a nanoemulsão preparada com a lecitina de soja como surfactante. Já para a nanoemulsão preparada com o surfactante Tween 80 houve o aumento do diâmetro hidrodinâmico, conforme a amostra foi sendo aquecida. No entanto, esse aumento não teve diferença estatística com o intervalo de confiança de 0,05%, o que pode sugerir maior estabilidade termodinâmica da nanoemulsão do óleo essencial de canela utilizando o Tween 80 como surfactante.

Apesar do PDI não ter se diferenciado estatisticamente para os dois surfactantes e em diferentes temperaturas de aquecimento da amostra, o aumento da temperatura na nanoemulsão com lecitina de soja induziu maior heterogeneidade na dispersão das partículas, variando de 27,17% a 25°C até 30,87% a 40°C.

O índice de polidispersão fornece informações sobre a homogeneidade do sistema. Para Rigon *et al.*, (2017) quanto menor o valor obtido ($\leq 0,2$) maior o grau de homogeneidade no tamanho das partículas. Todavia, Nemen e Lemos-Senna (2011) consideraram que dispersões obtidas em seu estudo, com $\text{PDI} < 0,3$, formaram sistemas monodispersos. Desse modo, é possível considerar que a nanoemulsão de óleo essencial de canela com Tween 80 permaneceu homogênea mesmo com o aumento da temperatura. Essa constatação é importante para a fase de desenvolvimento do produto, mostrando que mesmo

com oscilações da temperatura, que podem ocorrer durante o armazenamento e transporte de produtos cosméticos (como é o caso do enxaguatório bucal), o sistema manteve-se homogêneo, contribuindo para a sua estabilidade física.

Complementarmente, foi medido o pH das amostras de nanoemulsões de OE de canela, sendo que a amostra preparada com lecitina de soja e Tween 80 apresentaram o pH de 5,15 e 4,29, respectivamente. Apesar do tratamento de nanoemulsão com a lecitina de soja ter apresentado um pH maior, o potencial zeta foi mais aniônico que o tratamento de Tween 80 (Tabela 2). Possivelmente, a lecitina de soja exerceu um efeito tamponante na nanoemulsão de OE de canela, pois a lecitina de soja é considerada um tensoativo zwitteriônico ou anfótero, por possuir fosfolipídios em sua composição (Hasmann *et al.*, 2007).

No entanto, os dois tratamentos foram considerados estáveis, pois de acordo com Bath e Madhav (2010) em uma nanoemulsão *Drug Delivery System* é desejável encontrar um potencial zeta de ± 20 mV. Os autores consideraram que o potencial zeta desempenha um importante papel na estabilidade física das emulsões, medindo suas propriedades de carga superficial (repulsão ou atração eletrostática).

Atividade antimicrobiana

As nanoemulsões de OE de canela com ambos os surfactantes testados apresentaram CIM e CBM de 0,625 mg mL⁻¹ contra *Streptococcus mutans*. Como controle de atividade antimicrobiana, a clorexidina apresentou CIM e CBM de 0,01 mg mL⁻¹.

Wiwattanarattanabut *et al.*, (2017) consideraram a classificação de atividade antimicrobiana dos OEs como forte (CIM $\leq 0,1\%$ (v/v)), moderado (CIM $\leq 1,0\%$ (v/v)) e fraco (CIM $> 1,0\%$ (v/v)). Já Hovijitra *et al.*, (2016) consideraram a ação antifúngica de OEs como forte a CIM $< 0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ (ou 0,05% v/v), moderada $0,5 \mu\text{L mL}^{-1} \leq \text{CIM} \leq 1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ (ou 0,1% v/v) e fraca para CIM $> 1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$. De acordo com essas classificações, a atividade das nanoemulsões de OE de canela deste estudo foi considerada moderadas/forte contra o *Streptococcus mutans*.

No estudo de Freire *et al.*, (2014) o OE *C. cassia* contra as cepas de *S. mutans* apresentou CIM e CBM de 1,125 mg mL⁻¹. Wiwattanarattanabut *et al.*, (2017) encontraram CIM de 0,08% (v/v) e CBM de 0,16% (v/v) para o OE das cascas de *Cinnamomum zeylanicum* contra *S. mutans* e *L. casei*.

Ambos autores utilizaram o método de microdiluição em caldo e os seus resultados foram maiores que a CIM e CBM deste estudo. As preparações das maiores concentrações nos estudos citados foram realizadas apenas procedendo a diluição em fase aquosa com surfactante, caldo BHI com DMSO 10% e Tween 80 na proporção de 0,8:0,05, respectivamente nos estudos citados. A agitação foi realizada posteriormente à adição, o que difere do preparo de uma nanoemulsão, em que a fase óleo é adicionada na fase aquosa sob agitação, para formação das nanopartículas.

Paudel *et al.*, (2019) encontraram CIMs de nanoemulsão com OE de canela (espécie não citada) contra as cepas de *Salmonella enterica* (0,039% v/v) e *Listeria monocytogenes* (0,078% v/v), além de CBM de 0,078% (v/v) para ambas as bactérias. Esses resultados corroboram com os valores de CIM e CBM das nanoemulsões testadas neste estudo.

O OE de cascas de canela (*Cinnamomum cassia*) também foi avaliado contra microrganismos presentes na cavidade oral que produzem compostos de enxofre voláteis (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*), causadores da halitose. A CIM variou de 50 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a clorexidina teve efeito bactericida contra todas as bactérias com CIM de 0,18 a 0,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Veloso *et al.*, 2020).

Carvalho *et al.*, (2020) avaliaram em seu estudo a utilização do OE de *Cinnamomum zeylanicum* na formulação de um creme dental contra bactérias cariogênicas (*Streptococcus mutans*). A CIM do OE foi de 0,056 mg mL⁻¹ e o gluconato de clorexidina como controle apresentou CIM de 0,05 mg mL⁻¹. No estudo de Celik *et al.*, (2016) o digluconato de clorexidina contra *S. mutans* teve CIM e CBM de 70 mg L⁻¹ e 150 mg L⁻¹, respectivamente.

Teste de combinação de ativos

A avaliação da combinação de ativos das nanoemulsões com OE de canela e a clorexidina foi realizada utilizando o cálculo do índice FIC para cada poço com resultado negativo de crescimento do *Streptococcus mutans*. As combinações de clorexidina e nanoemulsões de óleo essencial de canelas preparadas com lecitina de soja e Tween 80, apresentaram os índices FIC de 1,5 e 0,625, respectivamente. Considerando a classificação do Índice FIC proposta por Odds (2003), neste estudo não foi detectado sinergismo da clorexidina com as nanoemulsões de OE de canela, preparadas com os dois tipos de surfactantes. Interpretando os valores de índice FIC, sugere-se que houve efeito antimicrobiano, mas sem interação entre os ativos testados.

No entanto, Carvalho *et al.*, (2020) e Atki *et al.*, (2019) propuseram a classificação de FIC como: sinérgica ($FIC \leq 0,5$), aditiva ($0,5 < FIC < 1,0$), nula ($1,0 < FIC < 4,0$) e antagonista ($FIC \geq 4,0$). Por essa classificação, as concentrações testadas resultariam em um efeito aditivo da clorexidina ($0,0049 \text{ mg mL}^{-1}$) com a nanoemulsão de OE de canela preparada com o surfactante Tween 80 ($0,156$ e $0,078 \text{ mg mL}^{-1}$).

Cinética bactericida

A cinética bactericida das nanoemulsões de OE de canela, em concentrações e tempos diferentes, contra *S. mutans* foi interpretada como a redução logarítmica da concentração populacional inicial (Tabela 3). Pela comparação de médias (ANOVA e teste de Tukey) não houve diferença significativa, tanto com o fator tempo de contato bactéria e ativo, quanto na concentração do ativo. A única exceção foi para o tratamento de nanoemulsão com lecitina de soja na concentração de $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ e no tempo de 60 segundos, mas possivelmente pela elevada variação das repetições, justificada pelo valor do desvio padrão.

Tabela 3 – Redução logarítmica de *Streptococcus mutans* em diferentes tempos de contato com nanoemulsões de óleo essencial de canela.

Tempo (segundos)	Lecitina MIC (0,625 mg mL ⁻¹)	Tween MIC (0,625 mg mL ⁻¹)	Lecitina 2X MIC (1,25 mg mL ⁻¹)	Tween 2X MIC (1,25 mg mL ⁻¹)	Lecitina (10,0 mg mL ⁻¹)	Tween (10,0 mg mL ⁻¹)
30	0,28aA ± 0,05	0,38aA ± 0,09	0,84aA ± 0,31	0,45aA ± 0,11	0,55aA ± 0,17	0,93aA ± 0,04
60	0,24aA ± 0,03	0,38aA ± 0,01	1,06bA ± 0,58	0,52aA ± 0,24	0,83aA ± 0,01	0,91aA ± 0,04
90	0,37aA ± 0,02	0,34aA ± 0,05	0,63aA ± 0,01	0,56aA ± 0,10	0,95aA ± 0,04	0,90aA ± 0,03
120	0,39aA ± 0,15	0,39aA ± 0,06	0,60aA ± 0,08	0,64aA ± 0,12	0,94aA ± 0,20	0,84aA ± 0,13

*Letras iguais na mesma linha indicam igualdade a 95% de significância. **Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade a 95% de significância. Fonte: Autores.

Quantificação da substantividade

A capacidade de uma substância manter-se retida e ativa na cavidade bucal é considerada como a propriedade substantividade. Essa retenção para antimicrobianos é importante para manter a inibição ou morte dos microrganismos (Hortense *et al.*, 2010; Zanatta & Rosing 2007). Neste estudo, a quantificação da substantividade foi para comparar a eficiência

dos tratamentos de nanoemulsão com o OE de canela com a clorexidina a 0,12%, convencionalmente utilizada como enxaguatório bucal.

Na Tabela 4 são apresentados os valores da média de redução logarítmica da concentração populacional inicial dos voluntários. Na comparação de médias (ANOVA e teste de Tukey) não houve diferença significativa entre os tratamentos juntamente com o controle no tempo de cinco minutos após a aplicação, mas a clorexidina teve a média mais distante em relação ao controle, além disso ela manteve a sua redução logarítmica inicial da população microbiana, mesmo após três horas de aplicação do enxaguatório bucal, ou seja, ela se apresentou maior substantividade em relação aos tratamentos de nanoemulsão de OE de canela.

Tabela 4 – Redução logarítmica da contagem total de aeróbios mesófilos em solução salina de bochecho bucal após contato com enxaguante bucal.

Tempo	Nanoemulsão Lecitina de soja	Controle	Clorexidina 0,12%	Nanoemulsão Tween 80
T5 min.	0,078aA ± 0,184	-0,395aA ± 0,344	0,637aA ± 1,141	0,015aA ± 0,418
T1h	-0,090abA ± 0,163	-0,650bA ± 0,289	1,243aA ± 1,691	-0,388abAB ± 0,114
T2h	-0,315aA ± 0,471	-0,335aA ± 0,636	0,530aA ± 1,348	0,440aAB ± 0,191
T3h	-0,438aA ± 0,242	-0,313aA ± 0,094	0,633bA ± 0,824	-0,645aB ± 0,207

*Letras iguais na mesma linha indicam igualdade a 95% de significância. **Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade a 95% de significância. Fonte: Autores.

Na técnica de quantificação da substantividade utilizada neste estudo houve variações desiguais entre as médias, o que pode ter contribuído para a igualdade estatística. Ressalta-se que seria mais robusta a análise com maior número de voluntários. No entanto, foram seguidos os critérios de seleção dos voluntários conforme Millsop *et al.*, (2011), o que restringiu o número amostral principalmente pelo critério de exclusão de os indivíduos não apresentassem doenças sistêmicas que interfeririam na produção de fluxo salivar (diabetes, depressão, hipertensão).

Tomás *et al.*, (2010) avaliaram em seu estudo (*in vivo*) o efeito antimicrobiano e a atividade da clorexidina (substantividade) na biota salivar (por indução de salivação) de dez voluntários, utilizando o método de microscopia de epifluorescência em tempos de aplicação de 30 segundos e 1 minuto (nos intervalos de 1, 3, 5 e 7 horas), concentração do enxaguatório (0,12 e 0,2%) e volume do enxaguatório (10 e 15 mL). A concentração de 0,2% de clorexidina mostrou uma maior substantividade, o aumento no volume do enxaguatório bucal não interferiu na atividade antimicrobiana na biota salivar por até 7 horas e o aumento na duração do bochecho de 30 segundos para um minuto aumentou acentuadamente a substantividade do produto. Comparando os resultados desses autores como redução logarítmica, foram obtidas as diminuições populacionais bacterianas de 0,34 e 0,66 log para a clorexidina a 0,12%, após três horas de aplicação do enxaguatório. Desse modo, foi possível verificar que as reduções encontradas pelos autores corroboraram com a redução logarítmica (0,633) que a clorexidina demonstrou neste estudo, a 0,12% após três horas de aplicação.

Outros autores avaliaram diferentes antissépticos na redução da contaminação por aerossol e recomendaram o uso da clorexidina como padrão ouro (Balagopal & Arjunkumar 2013; Gupta *et al.*, 2014; Logothetis & Martinez-Welles 1995), no entanto o cetilpiridínio mostrou-se tão eficaz quanto a clorexidina na redução das bactérias em aerossóis dentais (Feres *et al.*, 2010).

Retamal-Valdes *et al.*, (2017) mostraram que os aerossóis produzidos por uma profilaxia ultrassônica em 15 voluntários que utilizaram um enxaguatório bucal pré procedimento contendo 0,075% de cloreto de cetilpiridínio, 0,28% de

lactato de zinco e 0,05% de fluoreto de sódio foi tão eficaz quanto o enxaguatório bucal usado como controle positivo (clorexidina 0,12%) na redução de bactérias viáveis nos aerossóis, que foi de 70% ou equivalente a 0,52 log.

4. Conclusão

Verificou-se que as duas emulsões testadas como enxaguatório bucal foram consideradas nanoemulsões, apresentando características de estabilidade e homogeneidade. As nanoemulsões apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* considerada moderada/forte contra *Streptococcus mutans* e não houve interação sinérgica entre ambas as nanoemulsões de OE de canela e a clorexidina.

Na quantificação da substantividade não foi detectada redução microbiana das nanoemulsões com OE de canela após o uso do enxaguatório bucal. Apesar de igualdade significativa dos tratamentos, a clorexidina ainda se mostrou com maior atividade antisséptica que as formulações propostas. No entanto, concentrações maiores que a CIM e CBM podem apresentar a mesma atividade antimicrobiana que a clorexidina, demonstrando a necessidade de novas pesquisas onde concentrações maiores sejam testadas com um número amostral mais significativo.

Agradecimentos

A Anton Paar por ter disponibilizado o equipamento Litesizer 500 *in locu* para as análises de DLS e potencial zeta.

Referências

- Adams, R. P. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. (4a ed.), Allured Publishing Corporation.
- Alves, P. M., Pereira, J. V., Hígino, J. S., Pereira, M. S. V. & Queiroz, L. M. G. (2008). Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) sobre microrganismos cariogênicos. *Arquivos em Odontologia*, 44(2), 53-58.
- Arunachalam, I. T., Merugu, S. & Sudhakar, U. (2012). Comparison of intraoral distribution of two commercially available chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol at three different rinsing periods. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 2(1), 20-24.
- Atki, Y., Aouam, I., El kamari, F., Taroq, A., Nayme, K., Timinouni, M., Lyoussi, B. & Abdellaoui, A. (2019). Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 10(2), 63-67.
- Balagopal, S. & Arjunkumar, R. (2013). Chlorhexidine: the gold standard antiplaque agent. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 5(12), 270-274.
- Beckloff, N., Laube, D., Castro, T., Furgang, D., Park, S., Perlin, D., Clements, D., Tang, H., Scott, R. W., Tew, G. N. & Diamond, G. (2007). Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4125-4132.
- Bhatt, P. & Madhav, S. (2010). A detailed review on nanoemulsion drug delivery system, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(10), 2482-2489.
- Carvalho, I. O., Purgato, G. A., Pícollo, M. S., Pizzolo, V. R., Coelho, R. R., Diaz-Muñoz, G. & Diaz, M. A. N. (2020). *In vitro* anticariogenic and antibiofilm activities of toothpastes formulated with essential oils. *Archives Oral Biology*, 117,1-8.
- Celik, E.U., Tunac, A. T., Ates, M. & Sem, B. H. (2016). Antimicrobial activity of diferente disinfectants against cariogenic microorganisms. *Brazilian Oral Research*, 30,1-6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee For Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS), (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne: CLSI/NCCLS document M7-A8.
- Feres, M., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Stewart, B. & Vizio, W. (2010). The effectiveness of a preprocedural mouthrinse containing cetylpyridinium chloride in reducing bacteria in the dental office. *The Journal of the American Dental Association*, 141(4), 415-422.
- Firmino, D. F., Cavalcante, T. T. A., Gomes, G. A., Firmino, N. C. S., Rosa, L. D., Carvalho, M. G. & Catunda Junior, F. E. A. (2018). Antibacterial and antibiofilm activities of Cinnamomum sp. óleo essencial e cinnamaldeído: atividades antimicrobianas. *The Scientific World Journal*, 2018, 1-9.
- Freire, I. C. M., Pérez, A. L. A. L., Cardoso, A. M. R., Mariz, B. A. L. A., Almeida, L. F. D., Cavalcanti, Y. W. & Padilha, W. W. N. (2014). Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16, 372-377.
- Gebran, M. P. & Gebert, A. P.O. (2002). Controle químico e mecânico de placa bacteriana. Tuiuti: *Ciência e Cultura*, 3(26), 45-58.
- Gupta, G., Mitra, D., Ashok, K. P., Gupta, A., Soni, S., Ahmed, S. & Arya, A. (2014). Efficacy of preprocedural mouth rinsing in reducing aerosol contamination produced by ultrasonic scaler: a pilot study. *Journal of Periodontology*, 85(4), 562-568.

- Hasmann, A., Cortez, D. V., Gurgilhares, D. B., Roberto, I. C. & Pessoa Júnior, A. (2007). Micelas reversas de lecitina de soja - uma alternativa para purificação de proteínas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43,481-487.
- Hortense, S.R., Carvalho, E. S., Carvalho, F. S., Silva, R. P. R., Bastos, J. R. M. & Bastos, R. S. (2010). Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. *Revista odontológica universidade cidade de São Paulo*, 22,178-84.
- Hovijitra, R. S., Choonharuandej. S. & Srithavaj, T. (2016). Effect of essential oils prepared from Thai culinary herbs on sessile *Candida albicans* cultures. *Journal of Oral Science*, 58(3), 365-371.
- Jose, A. J., Leela, N. K., Zachariah, T. J. & Rema, J. (2019). Evaluation of coumarin content and essential oil constituents in *Cinnamomum cassia* (Nees & T. Nees), 28, 43-51.
- Kim, Y. G., Kim, S. I., Baek, K. H. & Lee, J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 195, 30-39.
- Komaiko, J. S. & McClements, D. J. (2016). Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 15(2), 331-352.
- Lakatos, E. V. & Marconi, M. A. (2010) *Fundamentos de metodologia científica*. (7a ed.), Atlas
- Lemos T. L. G., Matos, F. D. A., Alencar, J. W., Craveiro, A. A., Clarkl, A. M. & McChesney, J. D. (1990). Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytotherapy Research*, 4(2), 82-84.
- Li, J., Chang, J. W., Saenger, M. & Deering, A. (2017). Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 232,191-197.
- Liew, S. N., Utra, U., Alias, A. K., Tan, T. B., Tan, C. P. & Yussof, N. S. (2020). Physical morphological and antibacterial properties of lime essential oil nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification method. *Food Science Technology*, 128,1-8.
- Lim, J. (2011). Hedonic Scaling: a review of methods and theory. *Food Quality and Preference*, 22(8), 733-747.
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719-1729.
- McClements, D. J. & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation fabrication properties performance biological fate and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285-330.
- Millsop, J. W., Wang, E. A. & Fazel, N. (2017). Etiology evaluation and management of xerostomia. *Clinics in Dermatology*, 35(5), 468-476.
- Moreira, M. J. S., Ferreira, M. B. C. & Hashizume, L. N. (2012). Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana dos componentes de um enxagatório bucal contendo malva. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 12(4), 505-509.
- National Institute Of Standards And Technology (NIST). (2019). Nist Livro de Química na web. SRD 69. Available from: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>.
- Nemen, D. & Lemos-Senna, E. (2011). Preparação e Caracterização de Suspensões Coloidais de Nanocarreadores Lipídicos Contendo Resveratrol Destinados à Administração Cutânea. *Química Nova*, 34(3), 408-413.
- Odds, F.C. (2003) Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1-6.
- Paudel, S. K., Bhargava, K. & Kotturi, H. (2019). Antimicrobial activity of cinnamon oil nanoemulsion against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* on melons. *Lebensmittel-wissenschaft + [i.e. Und] Technologie. Food Science Technology International*, 111, 682-687.
- Pillai, S.K & Moellering, R.C. (2005). Antimicrobial combinations. *Ann Lab Med*. Lippincott Williams & Wilkins. New York, 365-400.
- Pongsumpun, P., Iwamoto, S. & Siripatrawan, U. (2020). Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60,104604.
- Prasad, K. A., John, S., Deepika, V., Dwijendra, K. S., Reddy, B. R. & Chincholi, S. (2015). Anti-Plaque Efficacy of Herbal and 0.2% Chlorhexidine Gluconate Mouthwash: A Comparative Study. *Journal of International Oral Health*, 7(8), 98-102.
- Retamal-Valdes, B., Soares, G. M., Stewart, B., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Miller, S., Zhang, Y. P. & Feres, M. (2017). Effectiveness of a pre-procedural mouthwash in reducing bacteria in dental aerosols: randomized clinical trial. *Brazilian Oral Research*, 31,1-10.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Madella, D., Martinazzo, A. P., Moura, L. A. G., Melo, N. R. & Sanches-Silva, A. (2017). Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 154-69.
- Rigon, C., Giuliani, L. M., Stangarlin, M. F. L., Mattiazzi, J., Gomes, F. P., Pegoraro, N. S., Cruz, L. & Ferreira, L. M. (2017). Sistemas nanoestruturados contendo óleo de linhaça: desenvolvimento tecnológico e caracterização físico-química de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas. *Saúde (Santa Maria)*, 43(1),153-161.
- Silva, D. S. M. A., Reis, J. J., Brandão, H. N., Neves, M. S., Branco, C. R. C., Andrade, A. P. E. N. & Oliveira, M. C. (2016). Avaliação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no tratamento da mucosite oral induzida pela radioterapia exclusiva ou associada a quimioterapia: estudo piloto. *Revista de Saúde Coletiva UEFS*, 6(2), 59-65.

- Soares, A. K., Bonvini, B. & Fukushigue, C. Y. (2019). Avaliação do potencial antimicrobiano profilático de enxaguatórios bucais contendo em sua formulação clorexidina e óleos essenciais. *Revista Salusvita*, 38(1), 87-96.
- Souza, F. B., Marques, A. E. L. R., Oliveira, K. M. S., Bezerra, G. M., Marques, I. R. C. & Sobrinho, C. R. W. (2019). Influence of chlorhexidine mouthwashes on air contamination of dental offices. *Journal of Dental Health Oral Disorders & Therapy*, 10(1), 23-26.
- Tomás, I., Cousido, M. C., García-Caballero, L., Rubido, S., Limeres, J. & Diz, P. (2010). Substantivity of a single chlorhexidine mouthwash on salivary flora: Influence of intrinsic and extrinsic factors. *Journal of Dentistry*, 38(7), 541-546.
- Torres, C. R. G., Kubo, C. H., Anido, A. A. & Rodrigues, J. R. (2000). Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. *Revista Faculdade de Odontologia de São José Dos Campos*, 3(2), 43-52.
- Valizadeh, A., Shirzad, M., Esmaceli, F. & Amani, A. (2018). Increased antibacterial activity of cinnamon oil microemulsion in comparison with cinnamon oil bulk and nanoemulsion. *Nanomedicine Research Journal*, 3(1), 37-43.
- Van Strydonck, D. A., Slot, D. E., Van Der Velden, U. & Van Der Weijden, F. (2012). Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(11), 1042-1055.
- Veloso, D. J., Abrão, F., Martins, C. H. G., Bronzato, J. D., Gomes, B. P. F. A., Higino, J. S. & Sampaio, F.C. (2020). Potential antibacterial and anti-halitosis activity of medicinal plants against oral bacteria. *Archives Oral Biology*, 110, 104585,1-21.
- Wiwattanarattanabut, K., Choonharuandej, S. & Srithavaj, T. (2017). In vitro anti-cariogenic plaque effects of essential oils extracted from culinary herbs. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(9), DC30-DC35.
- Yanakiev, S. (2020). Effects of Cinnamon (*Cinnamomum* spp.) in Dentistry: A Review. *Molecules*, 25(18), 1-17.
- Yukuyama, M. N., Ghisleni, D. D. M., Pinto, T. J. A. & Bou-Chacra, N. A. (2016). Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics – a review. *International Journal of Cosmetics Science*, 38(1), 13–24.
- Zanatta, F. B. & Rösing, C. K. (2007). Chlorhexidine: actions's mechanisms and recent evidences of it's efficacy over supragingival biofilm context. *Scientifica*, 1(2), 35-43.
- Zhang, C., Fan, L., Fan, S., Wang, J., Luo, T., Tang, Y., Chen, Z. & Yu, L. (2019). *Cinnamomum cassia* Presl: A Review of Its Traditional Uses. Phytochemistry. Pharmacology and Toxicology. *Molecules*, 24(19), 1-24.