



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022003196-7 A2

(22) Data do Depósito: 21/02/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
29/08/2023

(54) Título: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS (BIO)MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS PARA USO ODONTOLÓGICO

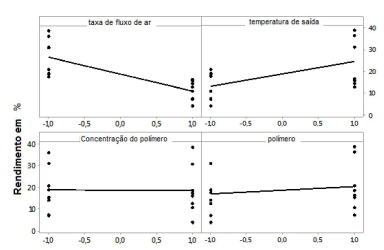
(51) Int. Cl.: A61K 8/34; A61K 8/73; A61K 6/20; A61K 6/50; A61Q 11/00.

(52) CPC: A61K 8/347; A61K 8/733; A61K 6/20; A61K 6/50; A61Q 11/00; (...).

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; ASSOCIAÇÃO SÃO BENTO DE ENSINO.

(72) Inventor(es): FERNANDA LOURENÇÃO BRIGHENTI; ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN; LUCIANA SOLERA SALES; HERNANE DA SILVA BARUD.

(57) Resumo: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS (BIO)MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS PARA USO ODONTOLÓGICO. O presente pedido de patente consiste no desenvolvimento, sintetização e caracterização, in vitro, de sistemas multiparticulados bio/mucoadesivos para liberação controlada de substâncias naturais. Esses sistemas foram obtidos a partir de polímeros naturais, alginato de sódio e goma gelana, por meio da técnica de preparo, secagem por aspersão (spray drying), aos quais foram adicionados a morina ou o carvacrol. A técnica de spray drying se baseia na produção de produtos secos a partir de líquidos, emulsões, soluções, óleos, com tamanho, forma, densidade e composição química ajustáveis. Essa técnica foi obtida por meio dos polímeros naturais alginato de sódio e goma gelana, gerando partículas menores (micrométricas) que os secadores convencionais. A técnica de spray drying foi padronizada para obtenção de um sistema com alto rendimento, liberação controlada dos compostos naturais e alta eficiência de encapsulação. Para otimização dessa técnica, foi realizado o planejamento fatorial 2⁴, tendo o rendimento em porcentagem como variável resposta. Quatro variáveis foram consideradas no planejamento fatorial, sendo elas: i) velocidade do fluxo de ar (1,0 e 1,8 m³/min); ii) temperatura de saída (80 e 120 °C) no spray drying; iii) polímeros utilizados (alginato de sódio ou goma (...)).



DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS (BIO)MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS PARA USO ODONTOLÓGICO

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente se baseia no desenvolvimento de sistemas multiparticulados (bio)mucoadesivo, a partir de polímeros naturais, para liberação controlada da morina e do carvacrol para obtenção de insumos para a fabricação de dentifrício e enxaguatórios bucais com atividade antimicrobiana.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A tecnologia está sendo desenvolvida para controlar o biofilme dentário patogênico, prevenindo a cárie dentária e a doença periodontal. Os sistemas desenvolvidos poderão ser incorporados em enxaguatórios bucais ou cremes dentais, auxiliando na remoção mecânica do biofilme, principalmente em pacientes negligentes a escovação dentária e pacientes com alto risco a cárie dentária e a doença periodontal. Como adicional ao existente no mercado, esse sistema, quando adicionado aos enxaguatórios ou aos cremes dentais irão liberar controladamente as substâncias antimicrobianas (morina ou carvacrol), permitindo um maior efeito de ambas e menor toxicidade. Além das propriedades bio/mucoadesivas desses sistemas, que permitirá que os compostos ativos permaneçam por um período maior na cavidade bucal. Além da prevenção e tratamento da cárie dentária, a presente invenção também poderá ser utilizada para o tratamento de outras infecções de relevância médica causadas, por exemplo, por leveduras, como *Candida spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* e por espécies da família *Enterobacteriaceae*.

ESTADO DA TECNICA

[003] A patente CN109430265 divulga um método para preparar micropartículas contendo o carvacrol para efeitos antimicrobianos. A encapsulação do carvacrol se faz necessária para aumentar a solubilidade nos fluidos bucais e evitar a volatilização do mesmo. Essas micropartículas são preparadas à base de alginato de sódio e quitosana e obtidas por separação e secagem. As micropartículas apresentam amplo espectro e alta eficiência antibacteriana. Não apresentam odor característico do carvacrol, e apresentam estabilidade térmica e alta durabilidade, podendo também ser aplicada na

indústria alimentícia para conservar melhor os alimentos. Apesar da utilização do carvacrol e dos polímeros naturais para desenvolvimento das micropartículas essa patente não se assemelha com a proposta elaborada por nós, uma vez que o objetivo dessa patente é ser aplicada na indústria alimentícia para conservação dos alimentos e a nossa será utilizada para controle de biofilme oral. Além disso, o método de desenvolvimento das micropartículas é diferente. Nós utilizamos a técnica de secagem por aspersão (spray-drying), um método simples, de baixo custo, alto rendimento e escalonável.

[004] A patente BR102016030321 refere-se à produção de hidrogéis de alginato de sódio contendo vitaminas do complexo B, resveratrol e carvacrol para liberação controlada dessas substâncias. O objetivo principal da produção desses hidrogéis é a cicatrização de ferimentos cutâneos. A liberação controlada do carvacrol se assemelha com a da nossa proposta, mas ressalta-se que as tecnologias desenvolvidas são diferentes. Na referida patente, foram produzidos hidrogéis e na nossa foi produzido um material multiparticulado (micropartículas) para uso oral e não para cicatrizações cutâneas.

[005] A patente WO2004/019802 desenvolveu produtos orais contendo carvacrol para limpeza oral, frescor do hálito e benefícios antimicrobianos. Os produtos desenvolvidos foram: dentífricos, gomas de mascar, colutórios, sprays para a boca e filmes comestíveis. Essas formulações diferem da nossa, tanto por utilizarem processos de obtenção diferentes do que propomos em nossa tecnologia, quanto em relação à composição desses produtos orais desenvolvidos. Nesse pedido de patente foram utilizados polímeros naturais, que são responsáveis pela liberação controlada do carvacrol e apresenta ação bio/mucoadesiva.

[006] A patente AU2010201754 desenvolveu um composto oral com atividade antibacteriana, antiplaca, anti-inflamatória, antioxidante e anti-halitose, contendo compostos ativos de um extrato de orégano, entre eles, carvacrol. Esse composto oral pode ser um enxaguatório bucal, um dentífrico, géis, ou um filme. Essas formulações também diferem da nossa. Os compostos utilizados para a fabricação e o processo de obtenção não são os mesmos que estamos propondo. Nossa proposta é a utilização de

polímero naturais, alginato de sódio e goma gelana para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada do carvacrol, com ação bio/mucoadesiva por meio da técnica *spray drying* para obtenção de micropartículas (produto final). Nosso produto final é o insumo para a produção de dentífrícios e enxaguatórios bucais.

[007] A patente EP1948126 refere-se ao desenvolvimento de uma composição oral contendo morina e um umectante (não especificado) para reduzir processos inflamatórios na cavidade oral, sendo considerado um método para prevenção ou tratamento de doenças dentárias inflamatórias, como a gengivite e a periodontite. Nessa patente, a morina foi utilizada como antioxidante, diferente do que estamos propondo, em que utilizaremos a morina como agente antimicrobiano. Além do mais, a formulação proposta não contém polímeros naturais para liberação controlada da morina e para efeito bio/mucoadesivo, sendo essas as principais características da tecnologia que estamos desenvolvendo.

[008] A patente TH92475 também utilizou a morina para reduzir processos inflamatórios na cavidade oral, por meio de uma mistura oral não especificada. A morina foi utilizada devido a seus efeitos antioxidantes. Liberação controlada e efeitos antibacterianos não foram mencionados na referida patente, o que comprova o grau de originalidade da nossa proposta.

[009] A patente CN102429897 refere-se a preparações farmacêuticas, fornecendo um método de utilização de um surfactante (não especificado) capaz de inibir a atividade da glicoproteína P na preparação de um medicamento usado para melhorar a biodisponibilidade oral da morina. Essa patente, apesar de conter a morina, difere bastante da nossa proposta, tanto na composição quanto no objetivo e nas técnicas utilizadas para produção da tecnologia.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA E DAS FIGURAS

[010] O presente pedido de patente de invenção refere-se aos sistemas que foram desenvolvidos pela técnica de *spray drying*.

[011] Técnica de *Spray Drying*: o equipamento utilizado para essa técnica foi um mini *spray-dryer* modelo MSD 0.5 (LabMaq do Brasil Ltda). Para otimização dessa técnica, foi realizado o planejamento fatorial 2^4 , tendo o rendimento em porcentagem como

variável resposta. Quatro variáveis foram consideradas no planejamento fatorial, sendo elas:

- i) velocidade do fluxo de ar (1,0 e 1,8 m³/min);
- ii) temperatura de saída (80 e 120 °C) no spray drying;
- iii) polímeros utilizados (alginato de sódio ou goma gelana);
- iv) concentração dos polímeros (1% ou 2%).

[012] Dessa maneira, 16 experimentos, em triplicata, foram desenvolvidos e avaliados quanto ao rendimento em porcentagem. Essa variável foi escolhida por ser determinante no processo de secagem. Após a padronização da técnica, três sistemas contendo alginato de sódio e goma gelana, em três diferentes proporções (50:50; 25:75; 75:25 ALG:GG) com a morina foram desenvolvidos. Esses sistemas foram avaliados quanto ao: i) rendimento; ii) eficiência de encapsulação; iii) liberação in vitro das substâncias naturais; iv) triagem inicial da atividade antimicrobiana e antibiofilme; v) caracterização físico-química. A técnica descrita está detalhada na Figura 1 (Fluxograma da preparação detalhada e obtenção do sistema multiparticulado).

DIFERENCAL

[013] Desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada para melhorar a solubilidade e estabilidade dos compostos naturais, diminuindo as doses terapêuticas para atingir o efeito antimicrobiano desejado, aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo a toxicidade. Além disso, os polímeros naturais que foram utilizados para o desenvolvimento desses sistemas, apresentam propriedades bio/mucoadesivas, podendo aderir ao dente e aos tecidos moles bucais e impedindo sua remoção pela saliva. Outro diferencial desses sistemas é que eles apresentam tamanho reduzido, o que aumenta a interação na interface microorganismo-partícula bem como sua aplicabilidade clínica e melhora a aceitabilidade pelo paciente, aumentando, também, a aderência do paciente ao tratamento. Adicionalmente, não há no mercado dispositivo para uso oral que melhore a solubilidade de substâncias hidrofóbicas, e que libere de maneira controlada os compostos ativos e que possua propriedades bio/mucoadesivas. O *spray drying* proposto no processo de obtenção dos sistemas já é amplamente utilizado pela indústria alimentícia por fornecer alto rendimento e baixo custo na

obtenção dos produtos.

USOS POTENCIAIS DA TECNOLOGIA

[014] A tecnologia desenvolvida para controlar o biofilme dentário patogênico, prevenindo a cárie dentária e a doença periodontal. Os sistemas desenvolvidos poderão ser incorporados em enxaguatórios bucais ou cremes dentais, auxiliando na remoção mecânica do biofilme, principalmente em pacientes negligentes à escovação dentária e pacientes com alto risco a cárie dentária e a doença periodontal. Como adicional ao existente no mercado, esse sistema, quando adicionado aos enxaguatórios ou aos cremes dentais irão liberar controladamente as substâncias antimicrobianas (morina ou carvacrol), permitindo um maior efeito de ambas e menor toxicidade. Além das propriedades bio/mucoadesivas desses sistemas, que permitirá que os compostos ativos permaneçam por um período maior na cavidade bucal. Além da prevenção e tratamento da cárie dentária, a presente invenção também poderá ser utilizada para o tratamento de outras infecções de relevância médica causadas, por exemplo, por leveduras, como *Candida spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* e por espécies da família *Enterobacteriaceae*.

DESVANTAGENS

[015] Apesar das vantagens já mencionadas da tecnologia, ela apresenta algumas desvantagens. Pode ser citado a dificuldade de padronização dos parâmetros do spray drying para se alcançar alto rendimento.

PROBLEMA

[016] A cárie dentária, bem como a doença periodontal, ainda é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo, com alta prevalência (Kassebaum *et al.*, 2015; Peres *et al.*, 2019). Elas são consideradas uma doença biofilme dependente, sendo assim, o controle químico do biofilme bucal é uma estratégia importante, como auxiliar na remoção mecânica do biofilme, principalmente em pacientes com alto risco a cárie e a doença periodontal. A clorexidina é a substância mais reconhecida para essa finalidade, mas apresenta alguns efeitos colaterais (Karpiński e Szkaradkiewicz, 2015), além de não ser capaz de controlar biofilmes maduros (Saleem *et al.*, 2016). Nesse contexto nosso grupo de estudo, tem pesquisado como alternativa ao uso da

clorexidina, produtos naturais, como a morina e o carvacrol. Estudos já demonstraram que essas substâncias apresentam atividade antimicrobiana. Entretanto, ambas as substâncias apresentam estabilidade limitada, sendo degradadas facilmente ou metabolizadas em compostos inativos. Além disso, elas apresentam baixa solubilidade e biodisponibilidade, o que pode afetar a distribuição das substâncias no local desejado (Shoji e Nakashima, 2004). Para melhorar essas características nosso grupo de estudo desenvolveu recentemente sistemas de liberação controlada mucoadesivos, por meio de polímeros naturais (alginato de sódio e goma gelana), contendo morina ou carvacrol. Esses sistemas foram capazes de controlar a taxa de liberação, apresentaram mucoadesividade e demonstram capacidade em controlar fatores de virulência de biofilmes cariogênicos. No entanto, esses sistemas apresentam diâmetro de 10 a 15 mm e precisam ser aprimorados para aumentar sua aplicabilidade clínica e melhorar a aceitabilidade pelo paciente, aumentando, também, a aderência do paciente ao tratamento. Além da prevenção e tratamento da cárie dentária, a presente invenção também poderá ser utilizada para o tratamento de outras infecções de relevância médica causadas, por exemplo, por leveduras, como *Candida spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* e por espécies da família *Enterobacteriaceae*.

ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO

[017] A tecnologia se encontra em fase laboratorial, especificamente na fase de avaliação da capacidade dos sistemas desenvolvidos em interferir na maturação do biofilme e desenvolvimento da lesão cariosa. Até o momento, as seguintes etapas metodológicas foram realizadas:

- i) padronização da técnica spray drying por meio do planejamento fatorial 2^4 , tendo o rendimento em porcentagem como a variável resposta, para obtenção de sistemas com alto rendimento, liberação controlada dos compostos naturais e alta eficiência de encapsulação;
- ii) desenvolvimento dos sistemas de liberação controlada, por meio da técnica spray drying, com diferentes concentrações dos polímeros naturais (alginato de sódio e goma gelana), contendo morina;
- iii) cálculo do rendimento e eficiência de encapsulação desses sistemas desenvolvidos;

- iv) caracterização físico química dos sistemas desenvolvidos (liberação in vitro da morina, Microscopia eletrônica de Varredura por emissão de campo – MEV- e FTIR) e;
v) triagem inicial da atividade antimicrobiana e antibiofilme.

Os resultados obtidos até o momento estão descritos abaixo:

1. Padronização da técnica spray drying por meio do planejamento fatorial 2⁴

1.1 Técnica: spray dryer – planejamento fatorial

[018] Para o treinamento e padronização desta técnica, foi realizado um planejamento fatorial 2⁴ (4 variáveis e dois níveis), totalizando 16 experimentos. Os experimentos foram realizados em triplicata e estão apresentados na Tabela 1. As variáveis escolhidas foram: vazão de ar (1,0 e 1,8 m³ / min), temperatura de saída na secagem por spray (80 e 120 °C), concentração dos polímeros (1% ou 2 %) e polímeros utilizados (alginato de sódio ou goma gelana). O rendimento em porcentagem (%) foi escolhido como variável resposta.

Tabela 1. Descrição dos 16 experimentos realizados para o planejamento fatorial. Polímero A: alginato de sódio, Polímero B: goma gelana.

Experimento	Vazão de ar (m ³ /min)	Temperatura (°C)	Concentração (%)	Polímero
01	1,0 (-)	80 (-)	2,0 (+)	A (-)
02	1,8 (+)	80 (-)	2,0 (+)	B (+)
03	1,8 (+)	80 (-)	1,0 (-)	A (-)
04	1,0 (-)	120(+)	1,0 (-)	A (-)
05	1,0 (-)	120 (+)	2,0 (+)	B (+)
06	1,8 (+)	120 (+)	1,0 (-)	B (+)
07	1,0 (-)	120 (+)	1,0 (-)	B (+)
08	1,8 (+)	120 (+)	2,0 (+)	A (-)
09	1,8 (+)	80 (-)	2,0 (+)	A (-)
10	1,0 (-)	80 (-)	1,0 (-)	A (-)
11	1,0 (-)	80 (-)	1,0 (-)	B (+)
12	1,8 (+)	80 (-)	1,0 (-)	B (+)
13	1,0 (-)	120 (+)	2,0 (+)	A (-)
14	1,8 (+)	120 (+)	1,0 (-)	A (-)
15	1,0 (-)	80 (-)	2,0 (+)	B (+)
16	1,8 (+)	120 (+)	2,0 (+)	B (+)

[019] 1.2 Análise estatística dos dados obtidos a partir do planejamento fatorial

a. *Uso de um primeiro modelo na presença das quatro covariáveis (taxa de vazão de ar, temperatura de saída, concentração de polímero e polímeros) com rendimento em % como resposta*

[020] A Figura 1 mostra os gráficos de dispersão do rendimento da resposta em% (média das três repetições) contra cada fator (taxa de vazão de ar, temperatura de saída, concentração de polímero e polímeros). A partir dos gráficos da Figura 1, concluímos que aparentemente um aumento da taxa de fluxo de ar (-1 a +1) diminui o rendimento em %; da mesma forma, indo de -1 a +1 na temperatura de saída, concentração de polímero e tipo de polímero, há um aumento do rendimento em %.

[021] Como primeira análise estatística dos dados, assumimos apenas os dados do planejamento fatorial 2^4 (Tabela 1). Com este conjunto de dados, ajustamos um modelo de regressão linear múltipla de primeira ordem na presença dos quatro fatores e suas interações dois a dois afetando a resposta, rendimento em %. Usando o software Minitab®, a Tabela 2 mostra os estimadores de mínimos quadrados (EMQ) dos parâmetros de regressão, os erros padrão (EP) dos estimadores, os valores da estatística t de student e seus respectivos valores de p. Os pressupostos necessários para as inferências usando o modelo de regressão linear (normalidade e variância constante para os resíduos) foram verificados a partir de gráficos de resíduos.

Tabela 2. EMQ e valores de p (planejamento fatorial 2^4)

Factor	LSE	SE	T-Stat	P-Value
Constant	18.826	0.505	37.25	0.000
air flow rate	-7.812	0.505	-15.46	0.000
outlet temperature	5.687	0.505	11.25	0.000
polymer concentration	-0.091	0.505	-0.18	0.865
polymer	1.747	0.505	3.46	0.018
air flowxtemp	-1.981	0.505	-3.92	0.011
air flowxconc	0.072	0.505	0.14	0.892
air flowxpolymer	-0.253	0.505	-0.50	0.638
tempXcon	0.303	0.505	0.60	0.575
tempXpolym	0.463	0.505	0.92	0.402
concXploim	0.663	0.505	1.31	0.247

[022] O modelo de regressão múltipla linear ajustado é dado pelo rendimento em % = $18,826 - 7,812 \text{ taxa de vazão de ar} + 5,687 \text{ temperatura de saída} - 0,091 \text{ concentração de polímero} + 1,747 \text{ polímero} - 1,981 \text{ vazão de ar} \times \text{temp} + 0,072 \text{ vazão de ar} \times \text{conc} -$

0,253 vazão de ar x polímero + 0,303 temp x con + 0,463 temp x polym + 0,663 conc x polym (modelo estatístico 1).

[023] A partir dos resultados da Tabela 2, observa-se que três fatores (vazão de ar, temperatura de saída e polímeros) têm efeitos lineares significativos no rendimento da resposta em% ($p < 0,05$). Observamos também que a interação vazão de ar x temperatura de saída também apresenta efeito significativo no rendimento da resposta em % ($p < 0,05$). Todas as outras interações dois a dois não mostram efeitos significativos na resposta em rendimento (%) ($p > 0,05$).

[024] A Figura 2 mostra os gráficos da interação significativa (taxa de vazão de ar x temperatura de saída) de onde, é possível ter a seguinte interpretação: o efeito da taxa de vazão de ar é negativo (o rendimento em % diminui quando a taxa de vazão de ar diminui (-1) para níveis mais altos (+1), mas o efeito é maior em temperaturas de saída mais altas (1).

[025] *b. Uso de um modelo de segunda ordem na presença de três covariáveis (taxa de vazão de ar, temperatura de saída, polímero) com resposta o rendimento em%*

[026] Uma vez que um dos objetivos deste estudo é também obter a previsão de respostas máximas (rendimento em %), nesta seção fixamos a goma gelada de polímero denotada por +1 (B) na Tabela 1 (resultados com pesos maiores e respostas maiores) e consideramos um planejamento com composto central com três fatores (planejamento fatorial 2^3 com dois níveis adicionando pontos centrais). Com esta classe de projetos experimentais, é possível obter resultados de inferência mais precisos incluindo fatores de curvatura na superfície de resposta (efeitos quadráticos de covariáveis). Desta forma, consideramos os dados replicados obtidos a partir de um planejamento fatorial 2^3 (16 experimentos) somados a outros nove experimentos adicionais no centro da variabilidade dos fatores (um total de 25 observações). Os dados obtidos deste planejamento de composto central são apresentados na Tabela 3. Ou seja, estamos usando um planejamento composto central, que é um planejamento fatorial ou fatorial fracionário com pontos centrais, acrescido de um grupo de pontos axiais que permite a estimativa da curvatura. Com o uso do planejamento composto central, obtemos uma estimativa eficiente dos termos de primeira e segunda ordem e o

modelo de uma variável de resposta com curvatura adicionando pontos centrais e axiais a um projeto fatorial feito anteriormente.

Tabela 3. Resultados de um planejamento de composto central com três fatores (taxa de vazão de ar, temperatura de saída, concentração de polímero) com rendimento em % como resposta.

Row	air flow rate	outlet temperature	polymer concentration	yield in %	estimated yield %
1	-1,0	-1,0	-1,0	21,70	19,8231
2	1,0	-1,0	-1,0	9,00	7,8485
3	-1,0	1,0	-1,0	34,90	37,4997
4	1,0	1,0	-1,0	12,00	14,5000
5	-1,0	-1,0	1,0	19,10	19,4225
6	1,0	-1,0	1,0	12,50	9,5895
7	-1,0	1,0	1,0	36,50	38,2240
8	1,0	1,0	1,0	15,50	17,3660
9	-1,0	-1,0	-1,0	15,70	19,8231
10	1,0	-1,0	-1,0	7,00	7,8485
11	-1,0	1,0	-1,0	41,20	37,4997
12	1,0	1,0	-1,0	19,00	14,5000
13	-1,0	-1,0	1,0	20,85	19,4225
14	1,0	-1,0	1,0	9,50	9,5895
15	-1,0	1,0	1,0	40,50	38,2240
16	1,0	1,0	1,0	14,25	17,3660
17	-1,0	-1,0	-1,0	25,40	19,8231
18	1,0	-1,0	-1,0	6,00	7,8485
19	-1,0	1,0	-1,0	32,70	37,4997
20	1,0	1,0	-1,0	15,40	14,5000
21	-1,0	-1,0	1,0	15,65	19,4225
22	1,0	-1,0	1,0	10,70	9,5895
23	-1,0	1,0	1,0	39,45	38,2240
24	1,0	1,0	1,0	19,25	17,3660
25	0,0	0,0	0,0	33,10	29,8545
26	0,0	0,0	0,0	34,90	29,8545
27	0,0	0,0	0,0	31,80	29,8545
28	-0,5	0,0	0,0	27,50	25,9152
29	0,5	0,0	0,0	12,40	17,7071
30	0,0	-0,5	0,0	22,50	29,5295
31	0,0	0,5	0,0	39,20	35,8928
32	0,0	0,0	-0,5	29,50	32,4030
33	0,0	0,0	0,5	32,20	33,0193

[027] Com esse conjunto de dados, ajustamos um modelo de regressão linear múltipla de segunda ordem na presença dos três fatores, suas interações dois a dois e os efeitos quadráticos dos três fatores que afetam a resposta em rendimento (%) replicada. Usando o software Minitab®, a Tabela 4 mostra os estimadores de mínimos quadrados (EMQ) dos parâmetros de regressão, os erros padrão (EP) dos estimadores, os valores da estatística t de student e seus respectivos p-valores. Os pressupostos necessários para as inferências usando o modelo de regressão linear

(normalidade e variância constante para os resíduos) foram verificados a partir de gráficos de resíduos.

Tabela 4. EMQ e valores de p (modelo de regressão múltipla de segunda ordem)

Factor	LSE	SE	T-Stat	P-Value
Constant	29.85	1.32	22.68	0.000
air flow rate	-8.208	0.754	-10.89	0.000
outlet temperature	6.363	0.754	8.44	0.000
polymer concentration	0.616	0.754	0.82	0.422
air flowXtemp	-2.756	0.762	-3.62	0.001
air flowlXconc	0.535	0.762	0.70	0.489
tempXconc	0.281	0.762	0.37	0.715
air flow**2	-32.17	8.63	-3.73	0.001
temp **2	11.43	8.63	1.32	0.199
conc**2	11.43	8.63	1.32	0.199

[028] O modelo de regressão múltipla linear de segunda ordem ajustado é dado pelo rendimento em% = 29,85 - 8,208 taxa de vazão de ar + 6,363 temperatura de saída + 0,616 concentração de polímero - 2,756 vazão de ar x temp + 0,535 vazão de ar x con + 0,281 temp x conc - 32,17 fluxo de ar ** 2 + 11,43 temp ** 2 + 11,43 conc ** 2 (modelo estatístico 2)

[029] A partir dos resultados da Tabela 4, conclui-se que:

- Os efeitos lineares da taxa de vazão de ar e da temperatura de saída são significativos no rendimento de resposta em% ($p < 0,05$).
- A interação de dois por dois, taxa de vazão de ar x temperatura de saída é significativa na resposta em rendimento (%) ($p < 0,05$). Todas as outras interações não são significativas ($p > 0,05$)
- O efeito quadrático da taxa de vazão de ar (taxa de fluxo de ar ao quadrado) tem um efeito significativo na resposta em rendimento (%) ($p < 0,05$).

[030] A partir do modelo estimado de segunda ordem (2) podemos obter as previsões de interesse fixando diferentes valores para os três fatores (vazão de ar, temperatura de saída, concentração dos polímeros). A Figura 3 mostra os gráficos do rendimento observado em % de respostas e as médias estimadas utilizando o modelo (2) versus ordem, de onde se observa excelente ajuste do modelo ao conjunto de dados.

[031] A Tabela 4 também mostra que para a combinação de valores codificados (x_1, x_2, x_3) = (-1,1,1) para os fatores (taxa de vazão de ar, temperatura de saída,

concentração dos polímeros) o rendimento máximo estimado em % de resposta dentro o intervalo das três covariáveis consideradas nos experimentos. Esses valores correspondem a (taxa de vazão de ar, temperatura de saída, concentração dos polímeros) = (1,0; 120; 2,0) na escala original. Com base no exposto, para se obter o máximo de rendimento possível, os seguintes parâmetros serão utilizados no preparo dos sistemas microparticulados por spray-dryer: vazão de ar (1,0 m³ / min), temperatura de saída (120 °C), teor de sólidos (2%).

[032] A Figura 3 apresenta a resposta em rendimento (%) e rendimento estimado em% usando o modelo de segunda ordem ajustado (2).

[033] *2. Desenvolvimento do sistema multiparticulado mucoadesivo contendo morina (técnica: spray-drying)*

[034] Três sistemas contendo morina à base de alginato de sódio e goma gelana a 2% (p/v), em diferentes proporções (1:1 / 1:3 / 3:1; ALG:GG), foram desenvolvidos. As micropartículas preparadas foram caracterizadas e avaliadas quanto ao rendimento, eficiência de encapsulação e atividade antimicrobiana.

[035] *2.1 Avaliação de rendimento (R), eficiência de encapsulação (EE) e dose do fármaco*

[036] O rendimento foi muito semelhante para os três sistemas desenvolvidos. O sistema 25:75 ALG: GG apresentou o valor mais alto (45,92%) para o rendimento do processo. Esses valores de rendimento estão dentro da faixa esperada para equipamentos de spray-dryer de pequeno porte (para uso laboratorial) (tabela 5).

[037] Para a eficiência de encapsulação, os valores encontrados foram elevados, variando de 46,4% a 66,89%. A amostra 75:25 ALG:GG apresentou o maior valor (66,89%) quando comparada às outras duas (tabela 5).

[038] *2.2 Liberação in vitro da morina*

[039] A liberação *in vitro* da morina dos sistemas desenvolvidos estão representados na Figura 4. Após 30 minutos de teste, cerca de 11%, 13% e 25% da morina foi liberada nos sistemas 50:50 ALG:GG, 75:25 ALG:GG e 25:75 ALG:GG, respectivamente. Tal comportamento mostra a influência da proporção de ALG na liberação rápida da morina, sendo a proporção intermediária (50:50 ALG:GG) a mais adequada para

valores decrescentes. Por outro lado, a partir de 240 min, um comportamento diferente foi observado. A amostra contendo a maior proporção de GG foi capaz de manter uma taxa de liberação constante ao longo do tempo, enquanto as contrapartes tiveram um perfil de liberação crescente.

Tabela 5. Valores de eficiência de encapsulação da morina (EE; %), dose do fármaco e rendimento em massa (R; %) dos sistemas desenvolvidos. ALG: alginato de sódio; GG: goma gelana.

Amostra	EE (%)	Dose do fármaco (mg morina/100 mg pó)	R (%)
50:50 ALG:GG	46,4	11,6	44
25:75 ALG:GG	61,2	15,2	45,92
75:25 ALG:GG	66,89	16,8	40,96

[040] Após 480 min, os sistemas 75:25, 50:50 e 25:75 (ALG: GG) liberaram $99,86\% \pm 9,36$; $85,45\% \pm 8,31$; $86,87\% \pm 3,83$ de morina, respectivamente. Em 30 horas, todos os sistemas já haviam liberado 100% da morina (dados não mostrados).

[041] A Figura 4 apresenta a média $\pm$ desvio padrão da liberação controlada da morina dos sistemas desenvolvidos. A figura mostra o perfil de liberação da morina em tampão fosfato (0,2 M, pH 7,4), a 37 °C, por 8 horas (n = 3). ALG: alginato de sódio; GG: goma gelana.

[042] Os modelos matemáticos e seus coeficientes de correlação são apresentados na Tabela 6. A partir dos valores do coeficiente de correlação (r^2), os modelos matemáticos que melhor se correlacionaram com os dados de liberação da morina para três sistemas desenvolvidos foram Korsmeyer-Peppas e Weibull. Além disso, para os sistemas ALG: GG 75:25 e 50:50, os modelos matemáticos de Hixson-Crowell e First order também se correlacionaram com os dados de liberação da morina, respectivamente.

Tabela 6. Coeficientes de correlação (r^2) dos modelos matemáticos (Baker-Lonsdale, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, First order, Hixson-Crowell and Weibull) aplicados aos dados de liberação dos sistemas desenvolvidos.

Modelos de liberação	Amostras		
	25:75	75:25	50:50

		ALG:GG	ALG:GG	ALG:GG
Baker-Lonsdale	<i>K</i>	0,0007	0,0005	0,0003
	<i>r</i> ²	0,9699	0,9035	0,9161
Higuchi	<i>K</i>	4,7656	4,3916	3,6590
	<i>r</i> ²	0,8981	0,9619	0,9595
Korsmeyer-Peppas	<i>K</i>	2,6567	1,1213	0,8416
	<i>r</i> ²	0,9966*	0,9942*	0,9964*
	<i>n</i>	0,6726	0,7617	0,7839
First order	<i>K</i>	0,0077	0,0052	0,0038
	<i>r</i> ²	0,9408	0,9883	0,9984*
Hixson-Crowell	<i>K</i>	0,0022	0,0015	0,0011
	<i>r</i> ²	0,8793	0,9975*	0,9927
Weibull	<i>K</i>	93,3185	163,4889	128,1622
	<i>r</i> ²	0,9959*	0,9940*	0,9959*
	<i>B</i>	0,9210	0,9274	0,9287

*Modelos matemáticos que melhor se correlacionaram com o perfil de liberação da morina (valor de *r*² próximo de 1).

K = liberação constante, *r*² = coeficiente de correlação, n = liberação expoente para formas geométricas, B = parâmetro de forma.

[043] 3. *Triagem da atividade antimicrobiana e antibiofilme do sistema contendo morina (técnica:spray drying)*

[044] Para essa etapa, foi avaliado o efeito antibiofilme e antimicrobiano do sistema, contendo morina, desenvolvido por meio da técnica spray-dryer. Os resultados dessas análises estão descritos nas figuras 5 e 6, respectivamente. A biomassa (figura 5) e a viabilidade (figura 6) do biofilme polimicrobiano foram menores na presença de morina em comparação com seus respectivos controles, independentemente do sistema. Por outro lado, os três sistemas analisados se comportaram de maneira semelhante, sem diferença entre eles.

[045] A Figura 5 apresenta a quantificação da biomassa do biofilme polimicrobiano (média ± DP - intensidade de absorbância -A570) após a exposição do biofilme aos sistemas com ("tratamento") ou sem ("controle") morina.

[046] A Figura 6 apresenta a viabilidade do biofilme polimicrobiano (média ± DP - Log 1 + UFC/mL) após a exposição do biofilme aos sistemas com ("tratamento") ou sem ("controle") morina. A: estreptococos do grupo mutans. B: bactérias totais. C: Bactérias acidúricas.

[047] A acidogenicidade do meio de cultura a cada troca também foi avaliada e está representada na Figura 7. Os sistemas contendo morina apresentaram um valor de pH maior quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, não teve diferença nos valores de pH quando comparado os três sistemas, mostrando não haver diferença entre eles.

[048] A Figura 7 apresenta a acidogenicidade no meio de cultura (média pH $\pm$ dp) após exposição do biofilme polimicrobiano a diferentes sistemas com morina ou controle. A: Sistema 50ALG: 50GG. B: Sistema 25ALG: 75GG. C: Sistema 75ALG: 25GG.

[049] 4. *Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV)*

[050] As imagens dos sistemas desenvolvidos estão apresentadas na figura 8. Os sistemas desenvolvidos apresentam micropartículas com 5–9 μ m de tamanho, formato esférico e superfície rugosa.

[051] A Figura 8 apresenta as fotomicrografias MEV dos três sistemas desenvolvidos. A: Sistema 75ALG: 25GG com morina. B: Sistema 75ALG: 25GG controle. C: Sistema 25ALG: 75GG com morina. D: Sistema 25ALG:75 GG controle. E: 50ALG: 50GG com morina. F: 50ALG: 50GG controle. X 5.000.

[052] 7.2 *Espectroscopia infravermelha (FTIR)*

[053] A análise de espectroscopia infravermelha foi realizada com o intuito de identificar os grupos funcionais característicos dos principais compostos presentes na composição dos sistemas desenvolvidos. Os resultados desta análise estão descritos na figura 9. O espectro FTIR dos sistemas desenvolvidos apresentam bandas entre 3000 e 3500 cm^{-1} referente a presença de grupamentos OH. A banda 2900 cm^{-1} está relacionada à ligação C-H. As bandas entre 1400 e 1600 cm^{-1} estão relacionadas ao grupo carboxila. A banda em 1000 cm^{-1} corresponde às ligações C-C e C-O. No geral, as mesmas bandas foram identificadas para as micropartículas, indicando que a adição de morina não promoveu mudanças na estrutura química, de maneira que os espectros representam a soma das bandas características de cada composto isolado.

[054] A Figura 9 apresenta a FTIR dos três sistemas desenvolvidos.

[055] Para o término da tecnologia, a fase laboratorial ainda precisa ser finalizada, sendo assim as etapas faltantes são:

- i) avaliação da capacidade dos sistemas em interferir na maturação de biofilmes polimicrobiano e no desenvolvimento da lesão cáriosa. Para essa etapa será utilizado blocos de esmalte bovino;
- ii) avaliação da citotoxicidade dos sistemas desenvolvidos e;
- iii) desenvolvimentos dos sistemas contendo carvacrol.

[056] Os sistemas serão avaliados quanto a desmineralização do esmalte (dureza de superfície e microtomografia computadorizada por Raios-X), atividade antimicrobiana (concentração microbiana - bactérias totais, estreptococos do grupo mutans e bactérias acidúricas) e antibiofilme (quantificação da biomassa) e a citotoxicidade.

[057] Adicionalmente será avaliado a acidogenicidade dos biofilmes (leitura do pH e produção de ácido lático).

[058] Finalizada as etapas laboratoriais, os resultados serão avaliados e será discutida a realização das próximas etapas como, por exemplo, a realização de estudos *in situ* ou clínicos.

[059] A Figura 10 mostra todas as etapas especificadas da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BIO/MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS,

a tecnologia se baseia no desenvolvimento de sistemas multiparticulados bio/mucoadesivos **caracterizado por** ser desenvolvida pela técnica *spray drying* em que o equipamento utilizado para essa técnica foi um mini *spray-dryer* modelo MSD 0.5 (LabMaq do Brasil Ltda); em que, para otimização dessa técnica, foi realizado o planejamento fatorial 2^4 , tendo o rendimento em porcentagem como variável resposta em que quatro variáveis foram consideradas no planejamento fatorial, sendo elas: i) velocidade do fluxo de ar (1,0 e 1,8 m³/min); ii) temperatura de saída (80 e 120 °C) no *spray drying*; iii) polímeros utilizados (alginato de sódio ou goma gelana); iv) concentração dos polímeros (1% ou 2%); em que dessa maneira, 16 experimentos, em triplicata, foram desenvolvidos e avaliados quanto ao rendimento em porcentagem; Após a padronização da técnica, três sistemas contendo alginato de sódio e goma gelana, em três diferentes proporções (50:50; 25:75; 75:25 ALG:GG) com a morina ou carvacrol foram desenvolvidos; Esses sistemas foram avaliados quanto ao: i) rendimento; ii) eficiência de encapsulação; iii) liberação in vitro das substâncias naturais; iv) triagem inicial da atividade antimicrobiana e antibiofilme; v) caracterização físico-química; Os sistemas que apresentarem os melhores resultados serão avaliados quanto à capacidade em interferir na maturação do biofilme e desenvolvimento da lesão cariosa; em que além disso, serão avaliados a citotoxicidade.

2. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BIO/MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS,

de acordo com a reivindicação 1 , **caracterizado pela** obtenção de um sistema com alto rendimento, liberação controlada dos compostos naturais e alta eficiência de encapsulação em que após essa etapa de desenvolvimento dos sistemas, eles serão avaliados quanto à desmineralização do esmalte, atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotoxicidade para futuro desenvolvimento de um produto para uso bucal.

3. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BIO/MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS, de acordo com a reivindicação 1 , os sistemas multiparticulados bio/mucoadesivos para liberação controlada de substâncias naturais foram caracterizados pelos mecanismos de liberação *in vitro*, bio/mucoadesividade e morfologia de superfície.

4. USO DO DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BIO/MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS, caracterizado por ser para uso odontológico, de acordo com as condições apresentadas nas reivindicações 1 a 3.

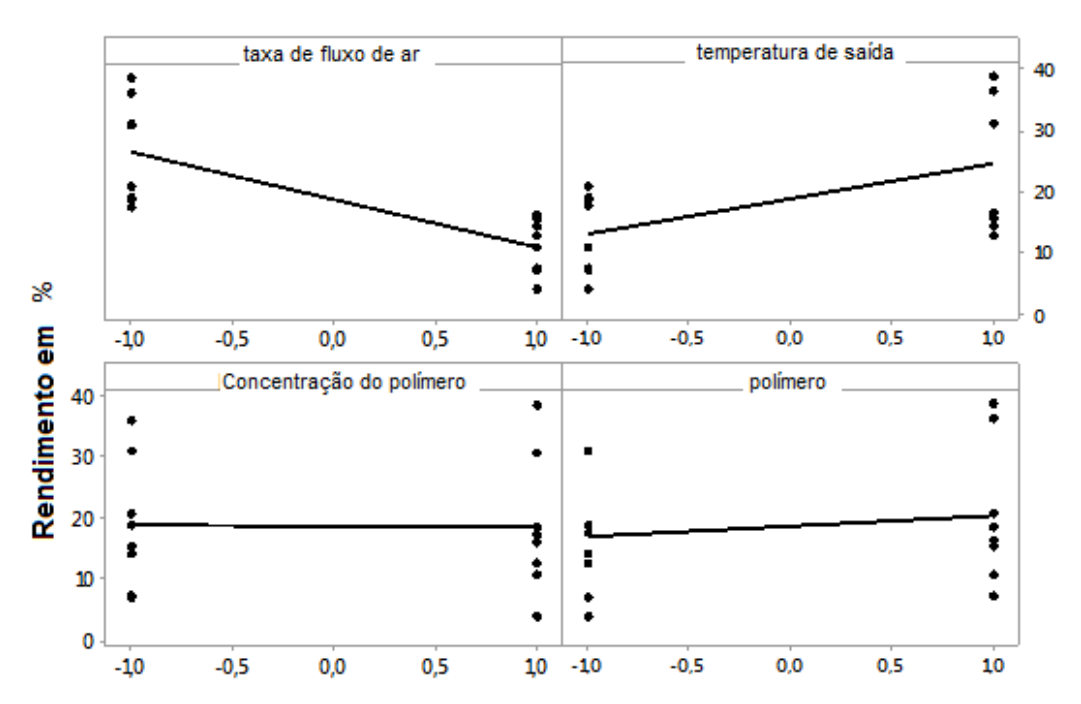


FIGURA 1

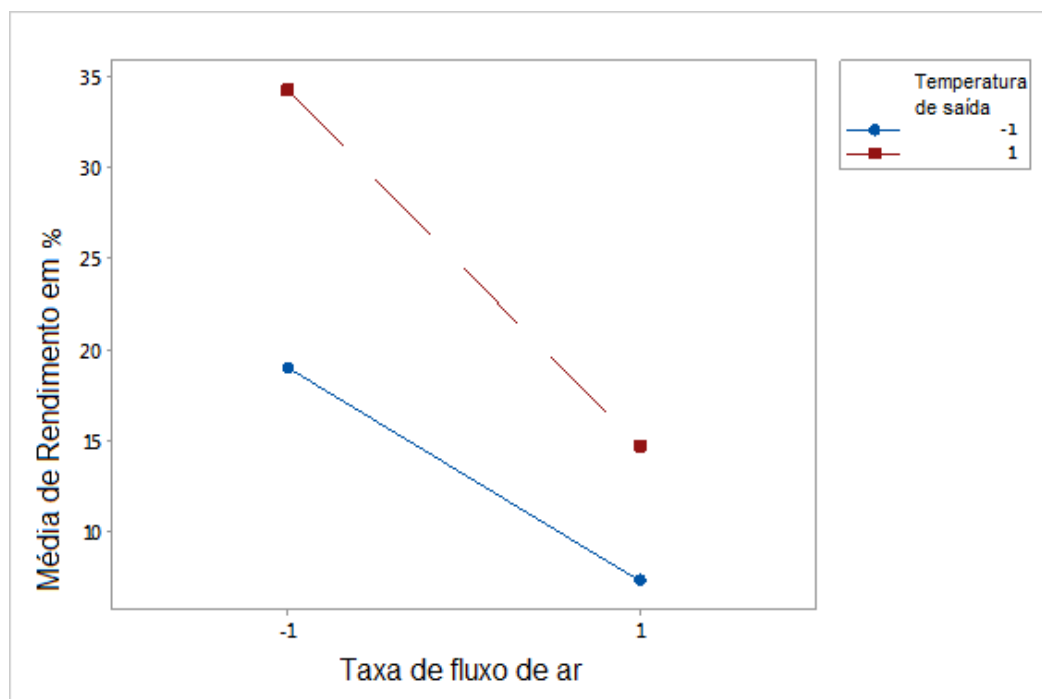


FIGURA 2

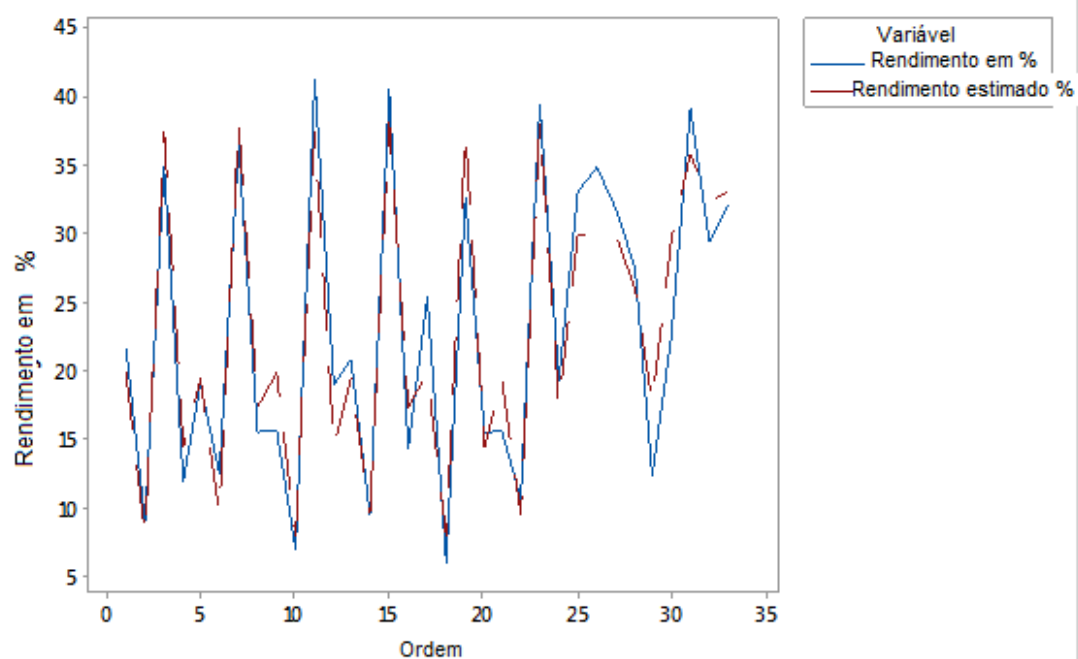


FIGURA 3

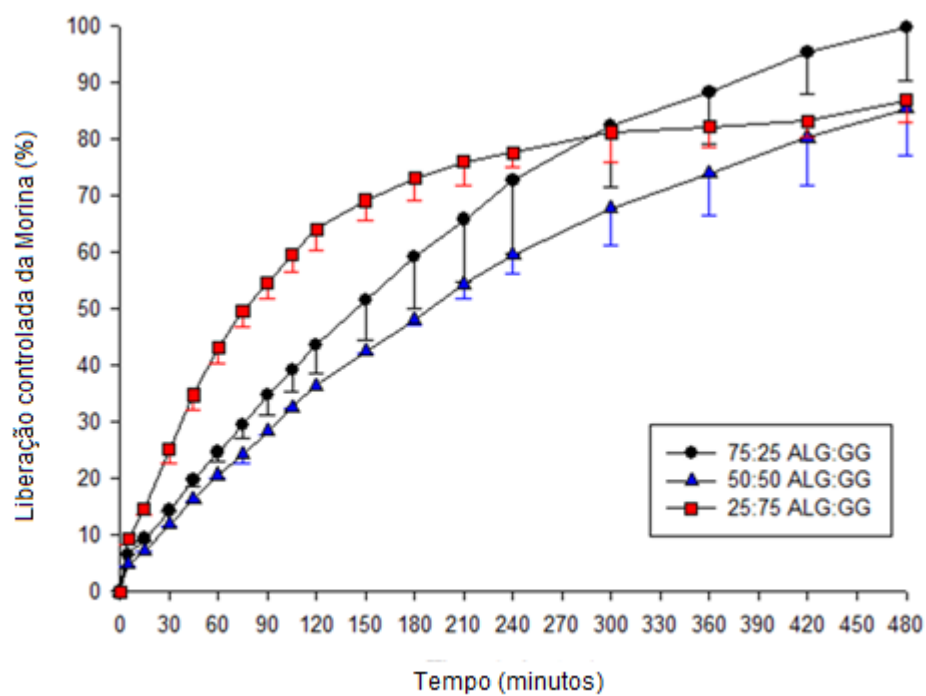
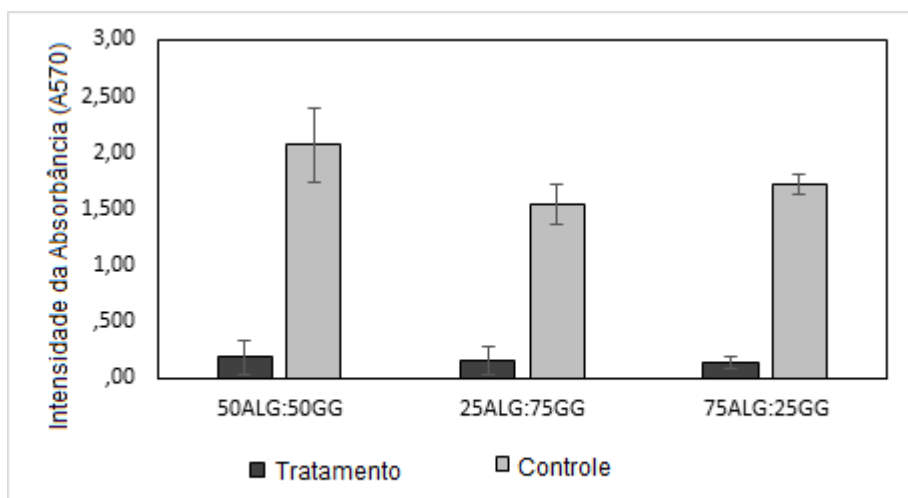
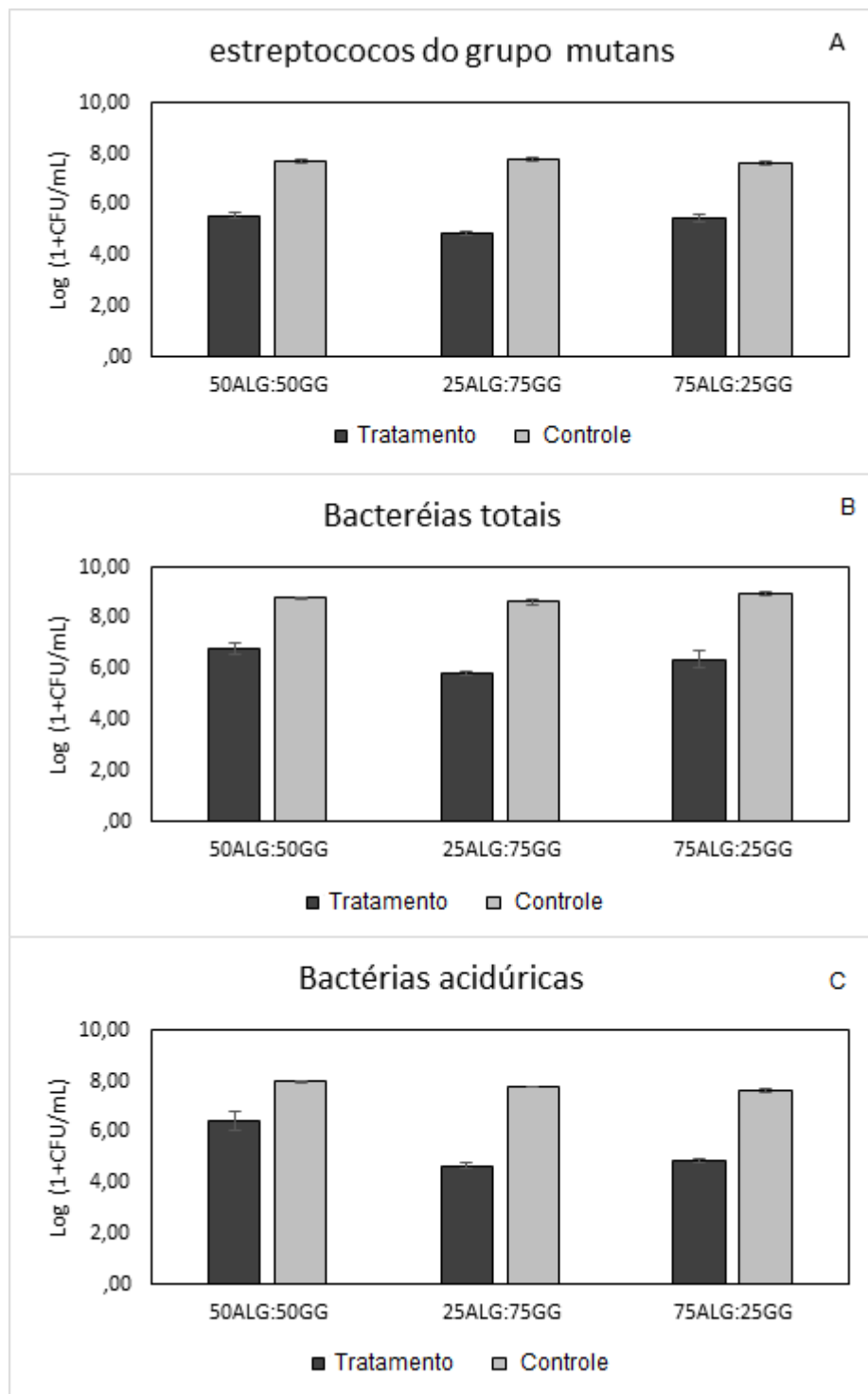


FIGURA 4

**FIGURA 5**

**FIGURA 6**

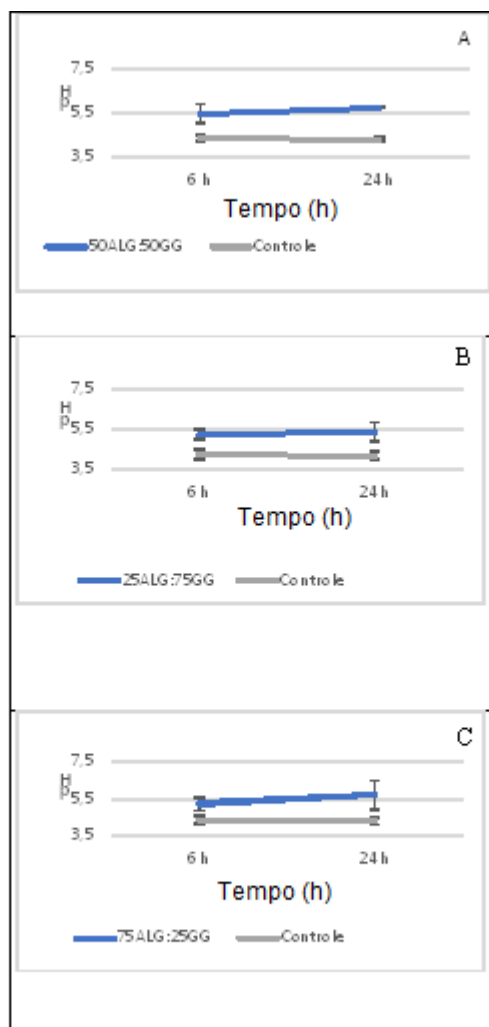


FIGURA 7

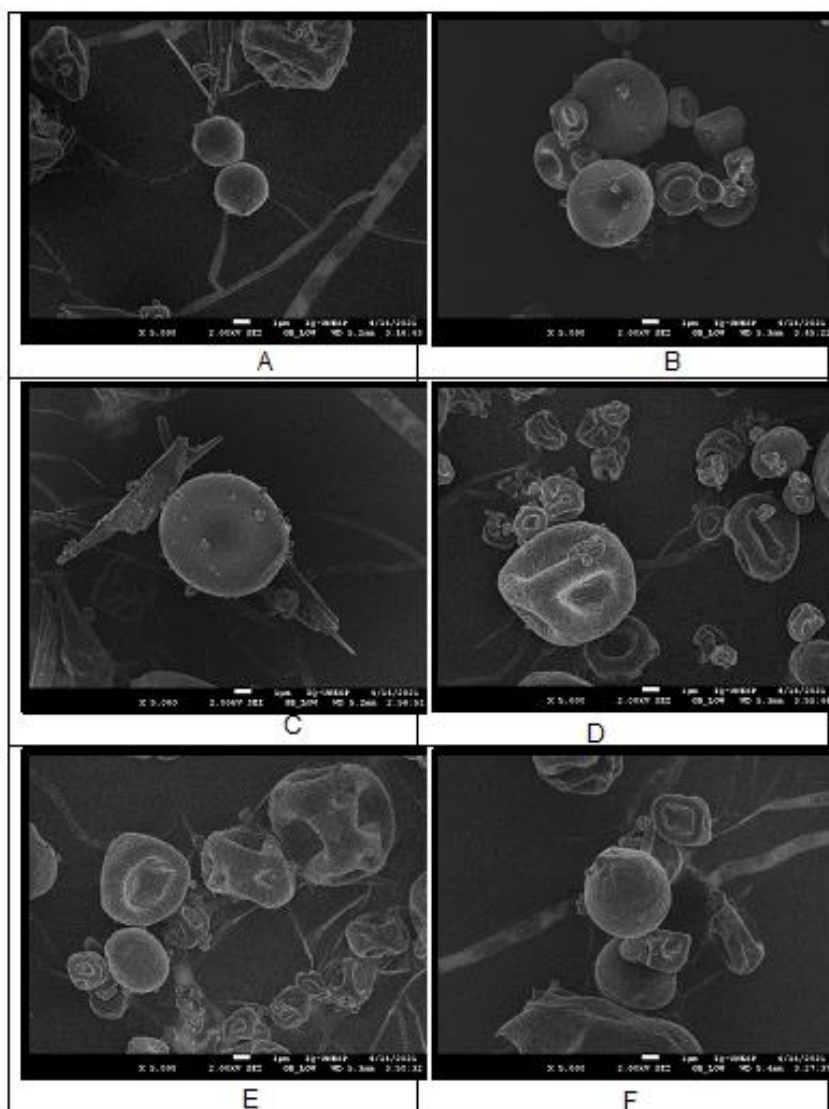
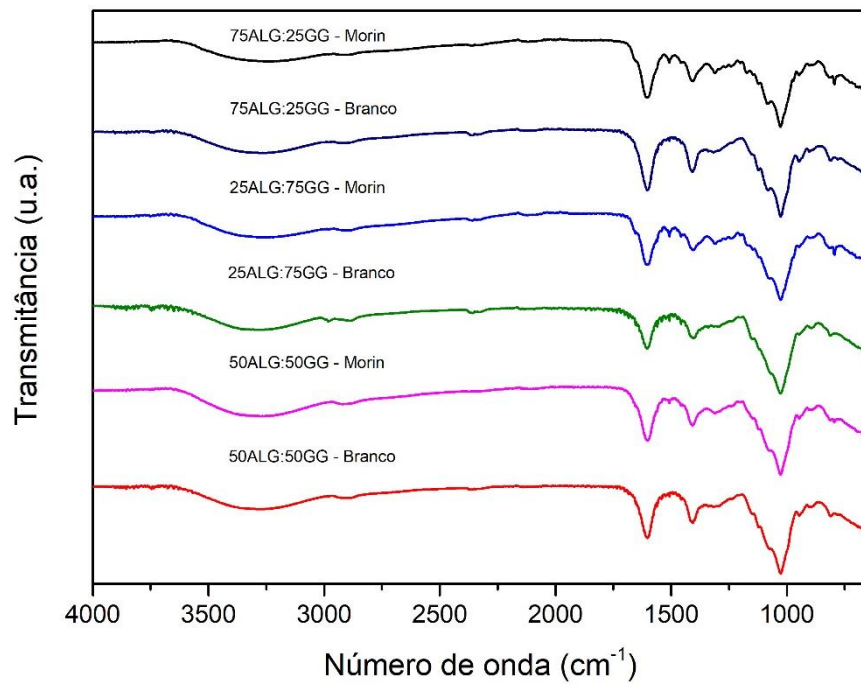


FIGURA 8

**FIGURA 9**

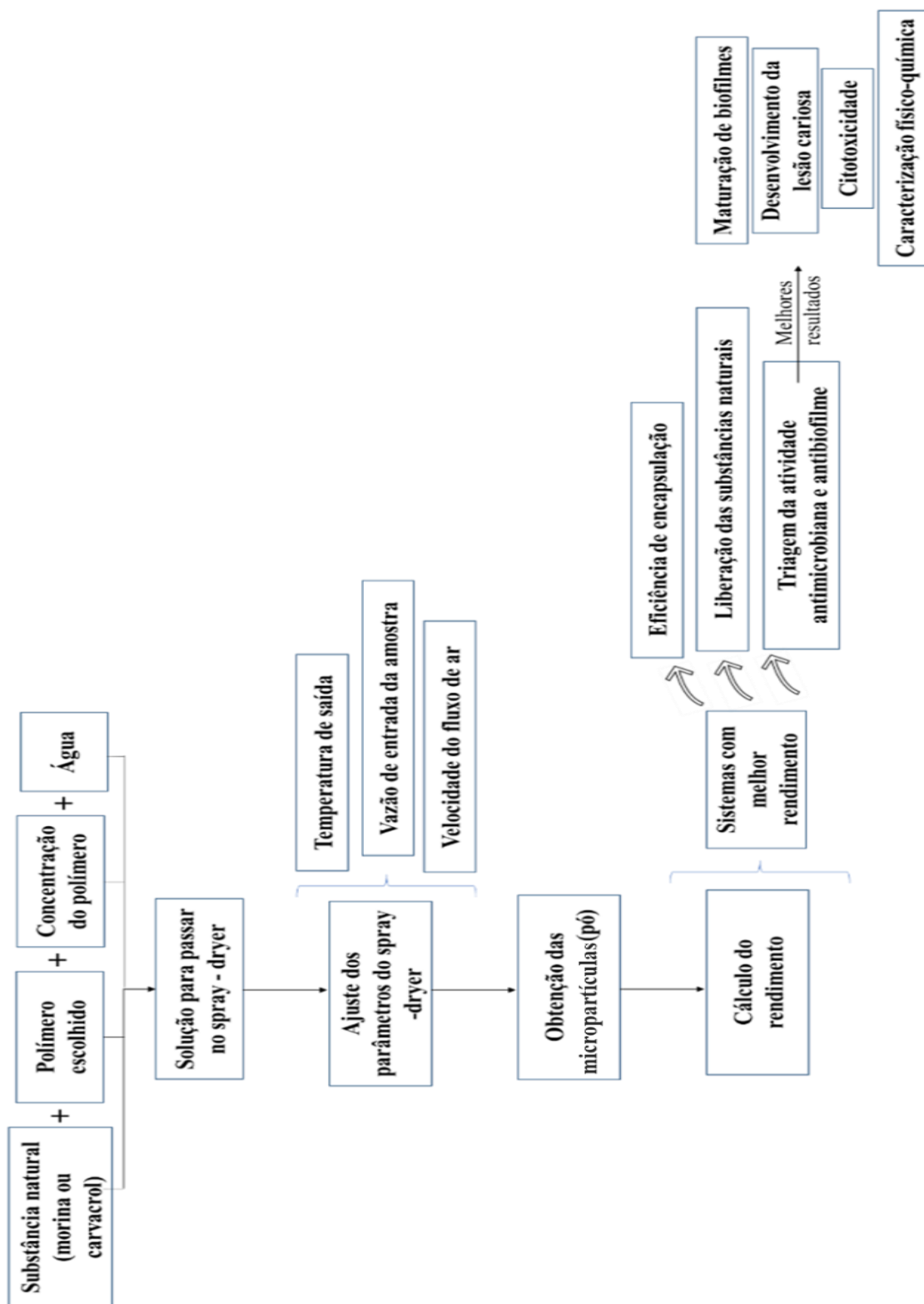


FIGURA 10

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS (BIO)MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS PARA USO ODONTOLÓGICO

O presente pedido de patente consiste no desenvolvimento, sintetização e caracterização, *in vitro*, de sistemas multiparticulados bio/mucoadesivos para liberação controlada de substâncias naturais. Esses sistemas foram obtidos a partir de polímeros naturais, alginato de sódio e goma gelana, por meio da técnica de preparo, secagem por aspersão (*spray drying*), aos quais foram adicionados a morina ou o carvacrol. A técnica de *spray drying* se baseia na produção de produtos secos a partir de líquidos, emulsões, soluções, óleos, com tamanho, forma, densidade e composição química ajustáveis. Essa técnica foi obtida por meio dos polímeros naturais alginato de sódio e goma gelana, gerando partículas menores (micrométricas) que os secadores convencionais. A técnica de *spray drying* foi padronizada para obtenção de um sistema com alto rendimento, liberação controlada dos compostos naturais e alta eficiência de encapsulação. Para otimização dessa técnica, foi realizado o planejamento fatorial 2⁴, tendo o rendimento em porcentagem como variável resposta. Quatro variáveis foram consideradas no planejamento fatorial, sendo elas: i) velocidade do fluxo de ar (1,0 e 1,8 m³/min); ii) temperatura de saída (80 e 120 °C) no *spray drying*; iii) polímeros utilizados (alginato de sódio ou goma gelana); iv) concentração dos polímeros (1% ou 2%). Após essa etapa de desenvolvimento dos sistemas, eles foram caracterizados quanto aos mecanismos de liberação *in vitro*, bio/mucoadesividade e morfologia de superfície. E por fim serão avaliados quanto à desmineralização do esmalte, atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotoxicidade para futuro desenvolvimento de um produto para uso bucal.