

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIA FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

AMANDA LETÍCIA POLLI SILVESTRE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FILMES DE ALGINATO DE SÓDIO
CONTENDO CURCUMINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA ASSOCIADOS À TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O
TRATAMENTO DE BIOFILMES ORAIS

ARARAQUARA, SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIA FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS
E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

AMANDA LETÍCIA POLLI SILVESTRE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FILMES DE ALGINATO DE SÓDIO
CONTENDO CURCUMINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA ASSOCIADOS À TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O
TRATAMENTO DE BIOFILMES ORAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
para obtenção do grau de Mestra.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marlus Chorilli
COORIENTADORA: Profa. Dra. Andréia Bagliotti
Meneguín.

ARARAQUARA, SP

2020

S587a

Silvestre, Amanda Leticia Polli.

Avaliação do potencial de filmes de alginato de sódio contendo curcumina encapsulada em nanopartículas de quitosana associados à terapia fotodinâmica para o tratamento de biofilmes orais / Amanda Leticia Polli Silvestre. – Araraquara: [S.n.], 2020.

98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Biotecnologia Diagnóstica, Bioprodutos e Biofármacos.

Orientador: Marlus Chorilli.

Coorientadora: Andréia Bagliotti Meneguín.

1. Nanotecnologia Farmacêutica. 2. Nanopartículas Poliméricas. 3. Filmes bucais. 4. Curcumina. 5. Quitosana. 6. Alginato de sódio. 7. Biofilmes orais. 8. Terapia fotodinâmica. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Meneguín, Andréia Bagliotti, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação do potencial de filmes de alginato de sódio contendo curcumina encapsulada em nanopartículas de quitosana associados à terapia fotodinâmica para o tratamento de biofilmes orais.

AUTORA: AMANDA LETÍCIA POLLI SILVESTRE

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

COORIENTADORA: ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. ELENARA MARIA TEIXEIRA LEMOS SENNA (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. EDUARDO RICCI JÚNIOR (Participação Virtual)

Departamento de Medicamentos / Universidade Federal do Rio Janeiro

Araraquara, 27 de novembro de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, a minha família e ao meu orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli pela oportunidade e confiança em meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus**, por todas as bênçãos que tem colocado em minha vida, por ter me dado força e paciência nos momentos difíceis e muita fé para me levantar e continuar. Sem ele não teria como chegar até aqui, só tenho de agradecer a cada dia por tudo.

Agradeço aos meus pais, **Maria Aparecida e Cláudio** e ao meu irmão **Gustavo**, que nunca mediram esforços em oferecer a mim apoio, segurança, educação, conduta pessoal e profissional. Obrigada por todo o amor, incentivo e ativa participação em todos os momentos de minha vida.

A meu namorado e melhor amigo **Victor Felipe** pelo companheirismo, carinho, paciência, amor e principalmente apoio em todos os momentos.

Agradeço em especial ao meu querido orientador **Prof. Dr. Marlus Chorilli**, pela oportunidade e confiança em meu trabalho, sempre muito solícito, presente, atencioso e extremamente competente e inteligente. Agradeço por toda aprendizagem dada, amizade, paciência e cuidado durante esses anos.

À querida **Prof. Dra. Andréia Bagliotti Meneguim**, minha coorientadora, agradeço por toda contribuição e ensinamentos, pela paciência e apoio nos momentos confusos e por toda dedicação nesse trabalho sempre com muita boa vontade e inteligência.

A todas as colegas do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, em especial aos amigos, **Tais de Cássia, Bruna Furquim, Suzana Gonçalves, Aline Martins, Fernanda Borges, Leonardo Di Filippo, Jonatas Lobato, Victor Hugo e Bruno Fonseca**, que participaram dessa jornada comigo. Só tenho de agradecer pelas risadas, pela paciência, pelas palavras de conforto e principalmente pela aprendizagem compartilhada.

Ao **Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud, Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi** e a **Profa.Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça**, pelo auxílio no exame geral de qualificação, contribuindo para o aperfeiçoamento do trabalho.

À gentil **Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião**, por toda sabedoria compartilhada e apoio durante esses anos.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (PADC-FCF-UNESP)** e a todos os seus funcionários pela atenção e cuidado.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)** em especial as professoras Fernanda Brighenti e Alessandra Rastelli e aos alunos Analú Barros, João Besegato e Priscila Borges por todas as contribuições e parcerias.

Ao **Instituto de Química da UNESP** de Araraquara, pela realização das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG).

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia** e a todos os professores do programa.

À **Seção Técnica de Pós-Graduação** que sempre foram muito atenciosas e prestativas, em especial Cláudia Molina, Aniele Vilella e Denise Hatanaka.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**
– Código de Financiamento 001

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo nº 2018/23096-7 pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Mestrado.

RESUMO

A cavidade oral é colonizada por várias espécies de microrganismos, dentre eles *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* são os mais predominantes e podem ser encontrados organizados na forma de biofilme, podendo causar cáries e candidíase bucal. O tratamento convencional para remoção desses biofilmes orais consiste na sua remoção mecânica associada à administração sistêmica de antimicrobianos, que causa vários efeitos colaterais ao paciente, além de ser potencial causador de resistência microbiana. Diante desse contexto, terapias alternativas têm sido desenvolvidas para o tratamento de doenças na cavidade oral, dentre elas a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aTFD), que é realizada com a utilização de um fotossensibilizador, como a curcumina (CUR). No entanto, a CUR apresenta a limitação de ser um composto de baixa solubilidade aquosa e que sofre degradação quando exposto à luz, temperatura e condições alcalina. Uma estratégia para suprir essas limitações é sua incorporação em nanopartículas poliméricas (NPs), que oferecem importantes benefícios, como melhoria da solubilidade e proteção contra a degradação. A incorporação de NPs_CUR em filmes de alginato de sódio (FA) contribui para adesão do sistema na cavidade oral, otimizando a aplicação da aTFD e a ação antimicrobiana. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial de FA contendo CUR encapsulada em NPs de quitosana (QTS) e alginato de sódio (ALG) associados à aTFD para o tratamento de biofilmes orais. As NPs foram obtidas pelo método de complexação polieletrólítica através da concentração de 0,3 mg/mL de QTS e 0,5 mg/mL de ALG com proporções (m/m) de 0,05:1 até 1:1 e foram caracterizadas empregando análise de diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ), microscopia eletrônica de varredura (MEV), eficiência de encapsulação (EE) e análise térmica. Os FAs foram obtidos pelo método de evaporação do solvente utilizando 2% de ALG e 10% de glicerina e foram caracterizados por ensaios de absorção de líquidos, determinação da espessura, permeabilidade ao vapor de água (PVA), propriedades mecânicas e mucoadesão. Realizou-se ensaio de liberação *in vitro* do sistema final FA/NPs_CUR, CUR livre e NPs_CUR. Foram ainda determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida (CBM) frente ao *S. mutans*, avaliou-se o efeito fotodinâmico sobre os biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans* e a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). As NPs foram obtidas com sucesso obtendo-se resultados adequados para todas as proporções testadas, principalmente para amostra 0,30:1 com DHM de 181,6 nm, IPD de 0,23 e PZ de -30,6 mV. As fotomicrografias obtidas por MEV evidenciaram morfologia esférica das NPs. A incorporação da CUR manteve a NP esférica e com tamanho entre 200 e 300 nm, indicando que houve incorporação e isso pode ser afirmado pela EE, a qual obteve o valor de 32,91 a 80,23%. Os FA foram obtidos com sucesso e mostraram-se homogêneos, sem fissuras ou bolhas e com adequadas propriedades mecânicas e de espessura, além de apresentarem PVA e absorção de líquidos considerável e excelentes propriedades mucoadesivas. O ensaio de liberação *in vitro* indicou que a liberação foi controlada por difusão e intumescimento, com 92,31% de CUR liberada após 24 h a partir das FA/NPs_CUR, 47,77% para CUR livre e 50,79% para NP_CUR. No ensaio microbiológico de CIM e CBM obteve-se para CUR livre um valor de 2,175 µg/mL e para NPs-CUR de 8,7 µg/mL. Os resultados de UFC/mL nos ensaios de biofilme de *C. albicans* não demonstraram redução significativas de log entre os grupos testados com os tratamentos com luz e sem luz. Por outro lado, os ensaios de UFC/mL para o biofilme de *S. mutans* demonstraram redução de 3 log₁₀ para o grupo das NPs testadas quando comparadas com os tratamentos sem luz. Portanto, os resultados são promissores e sugerem que o sistema desenvolvido apresenta potencial para o tratamento de biofilme de *S. mutans*.

Palavras-chaves: Nanotecnologia Farmacêutica; Nanopartículas Poliméricas; Filmes bucais; Curcumina; Quitosana; Alginato de sódio; Biofilmes orais; Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

The oral cavity is colonized by several species of microorganisms, among them, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* are the most prevalent and can be found organized in the form of biofilm, which can cause cavities and oral candidiasis. The conventional treatment for the removal of these oral biofilms consists of their mechanical removal associated with the systemic administration of antimicrobials, which causes several side effects to the patient, in addition to being a potential cause of microbial resistance. In this context, alternative therapies have been developed to treat diseases in the oral cavity, including Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), which is performed using a photosensitizer, such as curcumin (CUR). However, CUR has the limitation of being a hydrophobic compound and that suffers degradation in light, temperature, and alkaline conditions. One strategy to overcome these limitations is their incorporation into polymeric nanoparticles (NPs), which offer important benefits, such as improved solubility and protection against degradation. The incorporation of NPs_CUR in sodium alginate films (FA) contributes to system adhesion in the oral cavity, optimizing the application of aPDT and the antimicrobial action. This work aims to evaluate the potential of FA containing CUR encapsulated in NPs of chitosan (CS) and sodium alginate (SA) associated with aPDT for the treatment of oral biofilms. The NPs were obtained by the polyelectrolytic complexation method through the concentration of 0.3 mg / mL of QTS and 0.5 mg / mL of ALG with proportions (w/w) of 0.05:1 to 1:1 and were characterized employing the analysis of average hydrodynamic diameter (DHM), polydispersion index (PDI), zeta potential (ZP), scanning electron microscopy (SEM), encapsulation efficiency (EE) and thermal analysis. The FAs were obtained by the solvent casting method using 2% SA and 10% glycerin and were characterized by liquid absorption tests, thickness determination, water vapor permeability (PVA), mechanical properties, and mucoadhesion. An in vitro release test of the final system FA/NPs_CUR, free CUR, and NPs_CUR was performed. The minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (CBM) concentrations against *S. mutans* were also determined and the photodynamic effect on the biofilms of *S. mutans* and *C. albicans* and the count of Colony Forming Units (CFU/mL) were evaluated. The NPs were successfully obtained, obtaining adequate results for all the proportions tested, mainly for 0.30: 1 sample with DHM of 181.6 nm, PDI of 0.23, and ZP of - 30.6 mV. The photomicrographs obtained by SEM showed the spherical morphology of the NPs. The incorporation of CUR kept the spherical NP with a size between 200 and 300 nm indicating that there was incorporation, and this can be affirmed by EE where it obtained the value of 32.91 to 80.23%. The FA were successfully obtained and proved to be homogeneous without fissures or bubbles and adequate mechanical and thickness properties, in addition to having PVA and considerable liquid absorption and excellent mucoadhesive properties. The in vitro release test indicates that the release is controlled by diffusion and swelling using the Korsmeyer Peppas model, with a 24-hour release profile of 92.31% for FA/NPs_CUR, 47.77% for free CUR, and 50.79 % for NP_CUR. In the MIC and CBM microbiological assay, a value of 2,175 µg / mL was obtained for free CUR and 8,7 µg / mL for NPs-CUR. The results of CFU / mL in the biofilm assays of *C. albicans* did not show significant log reduction between the groups tested with treatments with and without light. On the other hand, the UFC / mL assays for the *S. mutans* biofilm showed a reduction of 3 log₁₀ for the group of tested NPs when compared to treatments without light. Therefore, the results are promising and suggest that the developed system has the potential for the treatment of *S. mutans* biofilms.

Keywords: Pharmaceutical nanotechnology; Polymeric Nanoparticles; Oral films; Curcumin; Chitosan; Sodium alginate; Oral biofilms; Photodynamic therapy.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAL.....	26
3.1.1 Equipamentos e materiais	26
3.1.2 Reagentes.....	27
3.2 MÉTODO.....	27
3.2.1 Preparação de soluções e dispersões.	27
3.2.2 Análise do potencial zeta dos polímeros em função do pH.....	29
3.2.3 Preparação das NPs	29
4 Caracterização das nanopartículas.....	30
4.1 Análise de diâmetro hidrodinâmico médio e do índice de polidispersão das nanopartículas	30
4.2 Análise do potencial zeta das partículas	31
4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG).....	31
4.4 Análise térmica do sistema	31
5 Validação da Metodologia Analítica por CLAE	32
6. Eficiência de encapsulação (EE%).....	35
7. Preparação dos filmes.....	36
8. Caracterização dos filmes	37
8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37
8.3 Determinação da espessura dos filmes	37
8.4 Propriedades mecânicas dos filmes.....	37
8.5 Absorção de líquido.....	39

11. Ensaios Microbiológicos	42
11.1 Grupos testados e parâmetros da Terapia Fotodinâmica.....	42
11.2 Preparo da suspensão bacteriana padronizada	42
11.3 Preparo da suspensão fúngica padronizada	43
11.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Determinação da Concentração Bactericida (CBM)	43
11.5 Formação do biofilme bacteriano <i>in vitro</i> em fundo de placa de 96 poços.....	44
11.6 Avaliação quantitativa das células bacterianas viáveis dos biofilmes	45
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
12.1 Análise do potencial zeta dos polímeros em função do pH.....	46
12.2 Preparação das nanopartículas poliméricas	48
12.3 Caracterização das Nanopartículas	49
12.4 Influência de tensoativos na formação das Nps.....	52
11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG).....	55
12 Análise térmica.....	57
13 Validação da Metodologia Analítica por CLAE	58
15. Eficiência de Encapsulação (EE%)	64
16. Caracterização dos Filmes	66
16.1 Análise Macroscópica.....	66
16.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG).....	67
16.3 Determinação da espessura dos filmes	69
16.4 Propriedades mecânicas dos filmes.....	71
16.6 Mucoadesão.....	75
18. Ensaios Microbiológicos.....	80
19. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	88

1. INTRODUÇÃO

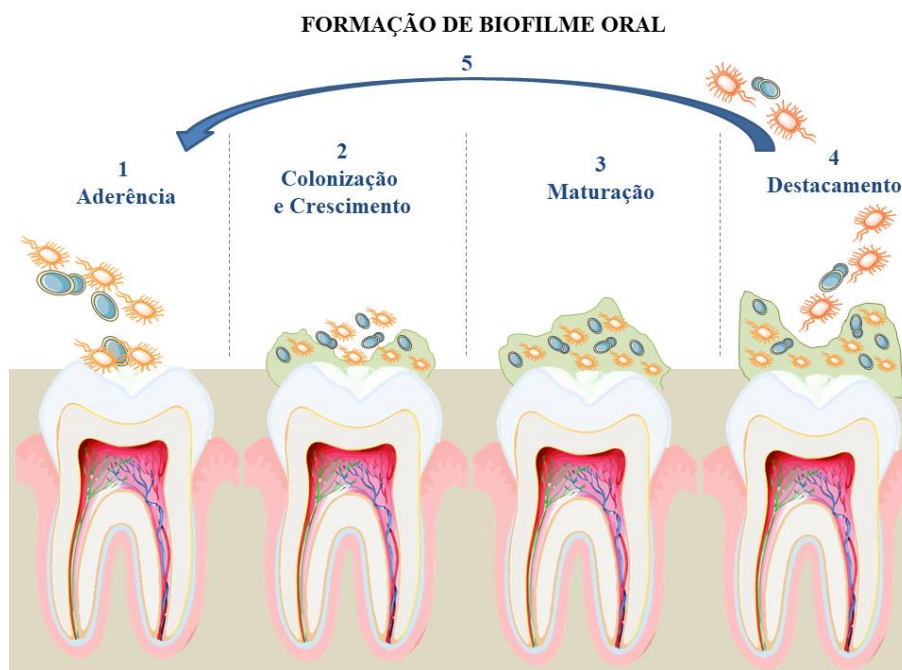
A cavidade oral abriga um sistema ecológico complexo constituído por mais de 700 espécies de microrganismos. É bem conhecido que muitas dessas espécies encontram-se organizadas na forma de biofilmes (KARYGIANNI et al., 2016; MARSH; HEAD; DEVINE, 2015). Os biofilmes podem ser classificados como uma comunidade de microrganismos que se fixam em superfícies bióticas ou abióticas, recobertos por uma matriz extracelular polimérica composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular e lipídeos. A matriz do biofilme garante uma série de vantagens para a colônia, como proteção celular, sobrevivência em ambientes desfavoráveis, maior adesão em ambientes não estáveis, melhor comunicação entre as células, o que facilita atividades bioquímicas e melhor proliferação, além de dificultar o acesso, que protege os microrganismos contra a ação de antibióticos e antifúngicos (ALBERS, 2018; BOWEN et al., 2017; DONLAN; COSTERTON, 2002).

É importante salientar que a película adquirida (proteínas e glicoproteínas salivares e do fluido gengival na superfície dentária) é a principal superfície de formação do biofilme oral. Porém, pode se aderir também em estruturas bucais sólidas, tais como próteses, aparelhos ortodônticos, restaurações e superfície de implantes (HUANG; LI; GREGORY, 2011).

Dessa forma, a formação do biofilme compreende cinco estágios e inicia-se com a aderência às células planctônicas de microrganismos por meio de forças de Van der Waals, forças elétricas de dupla camada, interações moleculares e celulares, resultando em um estágio reversível. Na segunda etapa ocorre uma adesão mais forte e a agregação e coagregação de outros microrganismos e a produção da matriz extracelular polimérica. Esta fase é considerada irreversível e ocorre por meio de ligações covalentes e interações dipolo-dipolo. Durante a fase de maturação (terceiro estágio), os microrganismos liberam

sinais auto-indutores para a comunicação entre eles, o que facilita a expressão dos genes formadores de biofilme. A fase final é a fase de dispersão (quarto estágio) que gera o desprendimento dos microrganismos do biofilme por meio de estresse mecânico e enzimas específicas capazes de quebrar os polissacarídeos da matriz (estrutura fundamental do biofilme). Com isso, os microrganismos retornam à fase planctônica, podendo iniciar a formação de um novo biofilme em outras superfícies (quinto estágio). A Figura 1 ilustra esse processo, as células destacadas, embora na forma planctônica, geralmente retêm algumas das propriedades da população do biofilme, principalmente a suscetibilidade reduzida a antimicrobianos (DONLAN; COSTERTON, 2002; FULAZ et al., 2019; JAMAL et al., 2017).

Figura 1. Formação de biofilme na cavidade oral



Fonte: própria autora.

Este sistema se mantém em equilíbrio quando presente em um ambiente bucal sadio, no qual os hábitos de higiene são praticados regularmente e com eficiência (AL-SHAMMERY et al., 2019); contudo, alterações na microbiota hospedeira (por exemplo, devido à utilização de antimicrobianos), alterações na resposta imune do hospedeiro (causados por estresse, infecção por outro microrganismo ou terapia imunossupressora) ou

variações no ambiente local (como mudanças no pH ou conteúdo nutricional) causam um desequilíbrio, resultando em cáries, doenças periodontais, candidíase, infecções endodônticas e ortodônticas (ALLAKER, 2010; LAMONT; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018).

As bactérias predominantes nos biofilmes dentários são os Estreptococos, sendo *Streptococcus mutans* considerado o principal agente etiológico no desenvolvimento da cárie. As células de *S. mutans* são Gram positivas, têm morfologia ovalada, medem cerca de 0,5 a 0,75 µm de diâmetro, agrupam-se aos pares ou em cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento, são anaeróbios facultativos e sua temperatura ótima de crescimento é de 37 °C (HOBDELL; CHHER, 2012; LEMOS et al., 2019).

Em razão disso, *S. mutans* é capaz de produzir enzimas denominadas glicosiltransferases, que hidrolisam o açúcar da dieta em glicose e frutose, e formam glicanos insolúveis. Esses glicanos conferem aos microrganismos a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz do biofilme dental. A aderência específica de *S. mutans* aos glicanos aderentes e a formação de ácidos promovem a desmineralização do esmalte dentário e o início das lesões de cárie (FORSSTEN; BJÖRKLUND; OUWEHAND, 2010; KLEIN et al., 2015).

A cárie é uma microcavidade que pode acometer o esmalte, dentina ou polpa do dente. Existem vários tipos de cáries que podem apresentar desde manchas brancas ou escuras até a formação microcavidades. Quando a cárie atinge a polpa do dente pode levar ao tratamento do canal, e quando não tratada pode ocorrer perda do dente. Apesar de todas as medidas de higiene conferir uma diminuição na incidência de cárie, ainda não conseguimos erradicá-las (LIMA, 2007).

As leveduras mais comuns na cavidade bucal são as do gênero *Candida* ssp da espécie *Candida albicans*. A levedura *C. albicans* por sua vez, possui morfologia extremamente versátil, podendo estar presente no meio bucal sem causar qualquer dano, porém quando em associação a fatores predisponentes é capaz de invadir tecidos causando

candidíase, que é uma infecção oportunista (KOO; ANDES; ID, 2018).

A candidíase bucal mais predominante é a pseudomembranosa também conhecida popularmente como “sapinho”. É a forma mais comum e se manifesta por placas ou nódulos branco-amarelados na mucosa, na língua ou qualquer parte do trato gastrointestinal superior.

Durante a maturação do biofilme, as leveduras desenvolvem novas propriedades fisiológicas e estruturais diferentes, como a transição de levedura para o morfotipo hifas, o que representa um passo crucial para a patogênese. As hifas fornecem integridade estrutural aos biofilmes, sendo assim um fator de virulência, além do biofilme trazer resistência a vários componentes antifúngicos que são rotineiramente utilizados no ambiente clínico (AL-FATTANI; DOUGLAS; DOUGLAS, 2006; MAYER et al., 2013).

Estudos demonstram que esses microrganismos podem desenvolver biofilmes dentários em associação. A interação entre *S. mutans* e *C. albicans* acontece quando *S. mutans* produz proteínas ancoradas na parede celular, facilitando a ligação à *C. albicans*, promovendo maior virulência e estabelecendo uma interação benéfica para ambos os microrganismos (KOO; BOWEN, 2014).

Ambas as doenças podem causar dor, desconforto para mastigar, sensibilidade e quando não tratadas podem levar infecções mais graves e crônicas. O tratamento convencional para remoção dos biofilmes orais consiste na sua remoção mecânica (processo físico), associado à administração sistêmica de antimicrobianos, o que frequentemente pode resultar na seleção de espécies resistentes e efeitos colaterais (BAPAT et al., 2019).

Outro dado relevante é que a resistência aos antimicrobianos é um problema gravíssimo de saúde pública ao nível mundial. O relatório da Organização Mundial da Saúde (2019) afirma que a resistência microbiana mata cerca de 700.000 pessoas de todas as idades anualmente no mundo. O cenário com o qual os especialistas trabalham é que esse número chegue a 10 milhões em 2050 (OMS, 2020).

Nesse contexto, pesquisas inovadoras estão surgindo para criar alternativas de

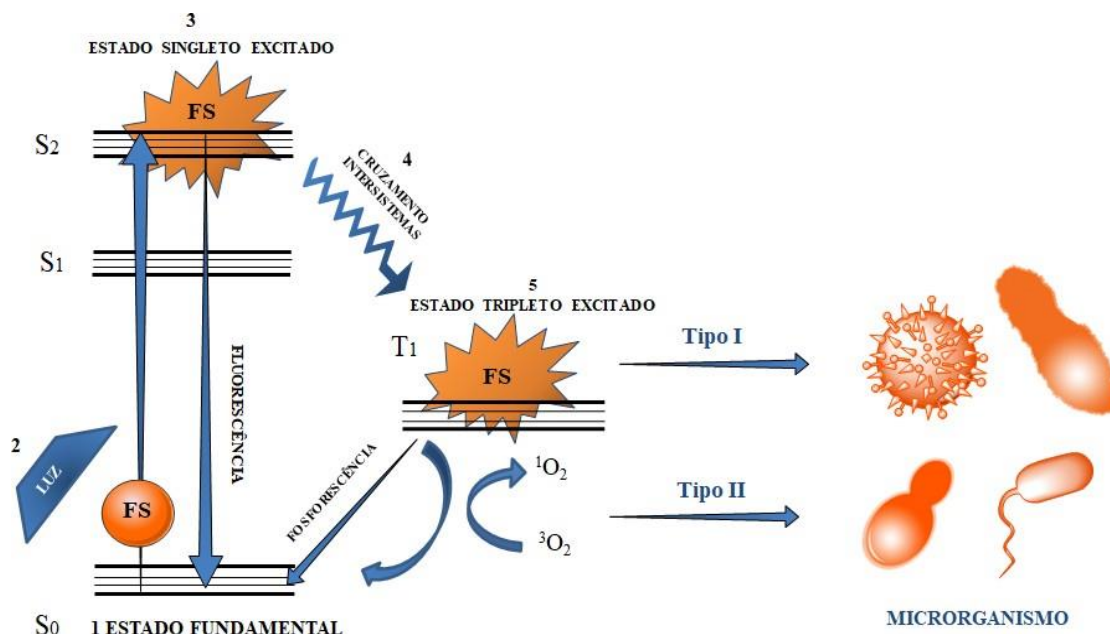
terapias menos invasivas para o tratamento de doenças bucais, com baixos efeitos colaterais e improvável resistência microbiana, como é o caso da (TFD) ou também conhecida como Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aTFD) (DINIZ et al., 2015; KIKUCHI et al., 2015; ONISZCZUK et al., 2016; SANTIN et al., 2014).

A aTFD é baseada em um fotossensibilizador (FS) ativado por uma fonte de luz sob um comprimento de onda específico que atua em uma célula-alvo. Durante a reação fotodinâmica, podem ser produzidas espécies reativas de oxigênio (EROs), que são extremamente tóxicas para os microrganismos e podem induzir a morte celular sem causar danos ao corpo humano (CARRERA et al., 2016; TAVARES et al., 2010). Além disso, aTFD tem atividade contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (COSTA et al., 2011; OZTURK et al., 2020; SANTOS et al., 2019; SEPÚLVEDA et al., 2020).

Outro ponto a evidenciar é o improvável desenvolvimento de resistência microbiana. Isso acontece, pois, a aTFD é mediada pela liberação de oxigênio singlete e EROs, os quais interagem rapidamente com uma diversidade de substratos e estruturas celulares, sem uma ação específica (LIU et al., 2015a). Também, a rápida aplicação não desencadeia efeitos colaterais e a cavidade oral torna-se um local de fácil aplicação da aTFD, já que é acessível para iluminação (BENOV, 2015).

O mecanismo químico da aTFD baseia-se no diagrama de Jablonski em que o FS no estado fundamental é irradiado por luz (sob o comprimento de onda adequado do FS), absorve um fóton (luz) gerando o FS no estado singlete excitado (breve vida útil que pode retornar ao estado fundamental por emissão de fluorescência) ou pode passar por um processo denominado cruzamento intersistema e gerar o FS no estado tripleto excitado (vida útil mais longa e pode retornar ao estado fundamental por fosforescência) que produz dois tipos de reações (TEDESCO; PRIMO; JESUS, 2017). Este mecanismo pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Mecanismo de ação da aTFD baseado no Diagrama de Jablonski, onde (1) corresponde ao fotossensibilizador (FS) no estado fundamental, (2) absorção de luz, (3) FS excitado em um estado singlete, ou (4) processo de cruzamento intersistema resultando em um estado excitado tripleto (5), gerando dois tipos de reações.



Fonte: própria autora.

Neste processo, o FS (no estado tripleto excitado) é passível de reagir com moléculas biológicas por dois principais mecanismos que são dependentes de oxigênio (consideradas indiretas), denominados de reação tipo I e reação tipo II. A reação de tipo I envolve reações de transferência de elétron entre o estado excitado do FS e o oxigênio molecular, produzindo espécies radicais como $OH \cdot$, $O_2 \cdot^-$, H_2O_2 e causando estresse oxidativo e morte celular. Na reação do tipo II, o FS transfere energia diretamente ao oxigênio em seu estado tripleto fundamental. Há a formação de oxigênio singlete (1O_2), que é altamente reativo e citotóxico, e que pode reagir com um grande número de substratos biológicos e induzir dano oxidativo na membrana celular e na parede celular (KWIATKOWSKI et al., 2018).

Acredita-se que ambas as reações (tipo I e II) possam ocorrer concomitantemente durante aTFD com proporções diferentes dependendo do tipo de FS, mas o oxigênio singlete (Tipo II) é o principal mediador fotodinâmico nos sistemas biológicos (LIU et al., 2015a).

Além dos mecanismos indiretos (que requerem oxigênio), existem os mecanismos diretos (independentes de oxigênio) de fotossensibilização na aTFD. Esses mecanismos vêm sendo discutidos na literatura científica e trata-se das reações de tipo III e reações de tipo IV, baseadas na ativação de FSs para induzir a morte celular sem a dependência do oxigênio para transferência de energia ou carga. A reação do tipo III envolve o estado de tripleto do FS e os radicais livres nativos do microrganismo que causam citotoxicidade. E, finalmente, há também a reação do tipo IV que, em suma, envolve uma mudança estrutural no estado singlete do FS quando irradiado, permitindo que ele se ligue ao alvo celular por fotoisomerização (SCHERER et al., 2017).

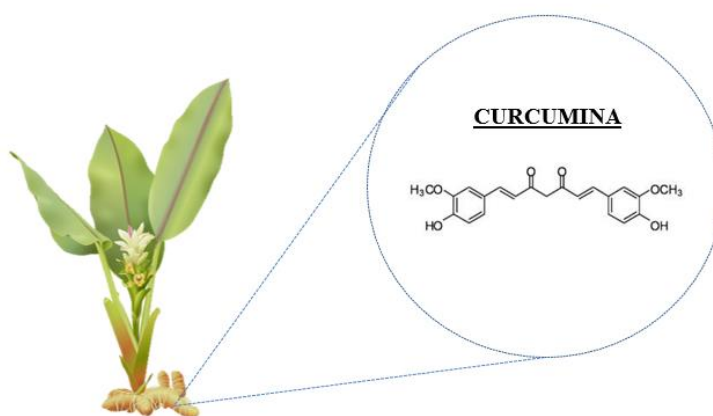
A irradiação durante a aTFD pode ser feita por diferentes fontes de luz, como lâmpadas de amplo espectro, lâmpadas de diodo (LEDs), lasers e também por quimioluminescência. A ação desses dispositivos depende do comprimento de onda, da dose de radiação (J cm^{-2}), da densidade de potência (W cm^{-2}), e também do tempo de incubação do FS (tempo de pré-irradiação) (DIAS et al., 2016; ETCHEVERRY; PASQUALE; GARAVAGLIA, 2016; FERRAZ et al., 2011).

Geralmente, os FS podem ter uma fórmula estrutural aromática ou linear e podem ser usados topicamente ou sistemicamente. Vários tipos de corantes e FS podem ser usados para aTFD. A curcumina (CUR), cuja estrutura química é demonstrada na Figura 3, é um corante amarelo-alaranjado, extraído do rizoma da planta *Curcuma longa*, comumente usada como tempero na tradicional culinária asiática e na medicina chinesa. A CUR possui diversas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatórias, antitumorais e antimicrobianas (ALVES et al., 2018). Algumas dessas propriedades são melhoradas com associação de ativação pela luz (AURELIO et al., 2013; AZIZI et al., 2019; MA et al., 2019; SANTEZI; REINA; DOVIGO, 2018)

No caso da CUR, a luz azul é uma opção interessante para sua fotoativação. A faixa azul do espectro de luz (450- 492nm) é capaz de promover efetiva ativação da CUR, além de

ser mais segura e estar numa faixa do espectro comumente utilizada nos consultórios odontológicos, por meio do uso de aparelhos do tipo LED ou de luz halógena (PAOLILLO et al., 2014; SERIES, 2018). Por outro lado, a CUR é um composto considerado hidrofóbico, insolúvel em água e que pode sofrer rápida degradação em várias condições (luz, temperatura, oxigênio, condições alcalinas). Apesar de solúvel em etanol e DMSO (dimetilsulfóxido), esses solventes orgânicos apresentam efeitos tóxicos dependendo da concentração utilizada, sendo necessário o desenvolvimento de novas estratégias para melhoria da solubilidade e estabilidade desta molécula (CODEVILLA et al., 2015).

Figura 3. Estrutura química da curcumina.



Fonte: ALVES et al., 2018

Nanossistemas (NS) associados a aTFD para infecções orais possuem potencial promissor para combater as limitações mencionadas acima e também tem o potencial de entregar FS no biofilme oral (FEKRAZAD; NEJAT; KALHORI, 2017; HU et al., 2018; LBOUTOUNNE, 2017). Além disso, biofilmes são estruturas complexas e os antimicrobianos convencionais têm demonstrado dificuldade em atuar sobre eles. O desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos é um processo demorado, portanto, o desenvolvimento de abordagens alternativas é fundamental (QAYYUM; KHAN, 2016). Nos últimos anos, tem havido um aumento significativo de estudos no campo da nanotecnologia farmacêutica para explorar NS para o tratamento de biofilmes (DE MELO et al., 2013; ELIZABETH; NÉSTOR; DAVID, 2019).

NS são estruturas nanométricas que podem ser divididas em nanopartículas orgânicas e inorgânicas (KHALID et al., 2020). Através da composição química tamanho de partícula, carga superficial e outras propriedades, os NS acabam direcionando a liberação, sendo que a interação do sistema com a matriz do biofilme promove aumento significativa na eficácia antimicrobiana (FULAZ et al., 2019; NAFEE, 2015).

Neste contexto, vários NS têm sido desenvolvidos para melhorar a biodisponibilidade, solubilidade e eficácia terapêutica da CUR e a liberação de fármaco, incluindo lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, ciclodextrinas, nanoemulsões, entre outros (CHOPRA et al., 2016; LIU et al., 2015b; MANGOLIM et al., 2014; SARI et al., 2015; WANG et al., 2017).

Dentre os NS, é crescente o interesse no estudo e desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (NP) devido às vantagens de melhorar a biodisponibilidade, solubilidade, permeabilidade e seletividade dos fármacos (evitando a distribuição para outros tecidos que não o alvo e minimizando os efeitos colaterais). Além disso, oferecem proteção contra fatores externos (luz, umidade, oxigênio, temperatura) e internos (pH e degradação enzimática), permitem a incorporação de FSs hidrofílicos e hidrofóbicos, podem modificar o padrão de interação biológica do FS na biointerface, além da possibilidade de aumentar o tempo de residência no sítio alvo através da mucoadesão, atributo que pode contribuir para melhorar a interação biológica no sítio de ação/liberação (PEER et al., 2007). Além disso, podem ser funcionalizados por meio de preenchimentos, ligantes, enzimas, anticorpos e outros na superfície da estrutura (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SUN et al., 2019; TAN; CHOONG; DASS, 2010).

Nanopartículas poliméricas (NPs) são sistemas coloidais com tamanho nanométrico que pode variar de 5 nm a 1000 nm, embora geralmente sejam obtidos tamanhos entre 100 e 500 nm no campo farmacêutico e com morfologia esférica. PNs são constituídas por polímeros que podem ser sintéticos ou naturais e são classificadas em nanocápsulas

(sistemas reservatórios, constituídos de um ou mais núcleos internos, revestidos por uma membrana polimérica) e nanoesferas (sistemas matriciais, constituídas por uma matriz polimérica, na qual o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido no seu interior) (JARAI et al., 2020; LU et al., 2011).

As NPs podem ser obtidas através de diferentes metodologias, dentre elas por complexação polieletrólítica, a qual destaca-se pela simplicidade da técnica e baixa energia, sem envolver o uso de solventes orgânicos, com relativo baixo custo, além da utilização de biopolímeros. A técnica de complexação polieletrólítica tem por base a interação entre polímeros com cargas opostas, a qual pode acontecer através de interações eletrostáticas, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Usualmente a técnica se dá pelo gotejamento da solução de um polícatión, sobre a solução de um poliânion sob agitação (KIZILAY; KAYITMAZER; DUBIN, 2011; LUO; WANG, 2014)

A quitosana (QTS), cuja estrutura química é apresentada na Figura 4 (A), é um dos polissacarídeos que vem sendo mais explorado no desenvolvimento de NP, principalmente devido às suas propriedades favoráveis, como ser de origem natural, atóxico, biocompatível, biodegradável, seguro e de baixo custo. A QTS possui grupos amino e hidroxilas em sua estrutura, possui $pK_a \sim 6,5$, é solúvel em meios aquosos ácidos e possui alta carga positiva sobre os grupos $-NH_3^+$ (KUMAR et al., 2004; LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009). Além disso, a QTS possui outra importante propriedade que é a mucoadesão, que acontece principalmente, mas não somente através da interação eletrostática com o ácido siálico da mucina e com isso, tem sido amplamente relatada para o uso na mucosa (LA LEUR; RÖTTGES, 2019; MUMUNI et al., 2019; ŞENEL, 2010; SIMONOSKA CRCAREVSKA; GLAVAS DODOV; GORACINOVA, 2008)

Outra propriedade importante apresentada pela QTS é a atividade antimicrobiana, que ocorre através de vários mecanismos de interação sendo os componentes celulares externos e a membrana citoplasmática, não de forma exclusiva, uma vez que a inibição

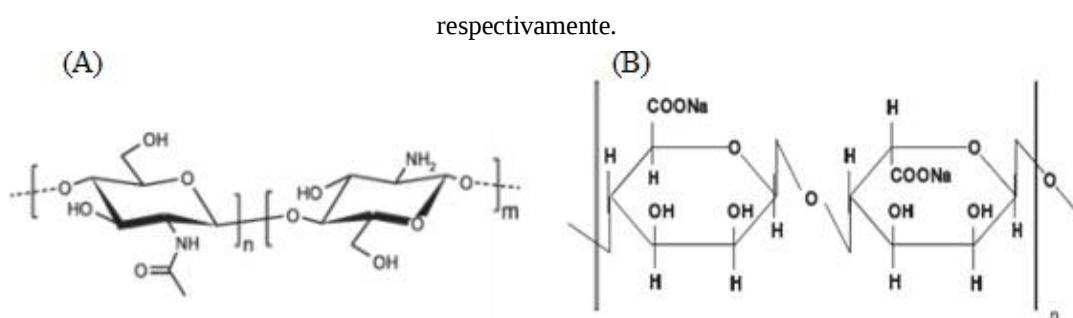
microbiana pela quitosana é considerada o resultado de uma sequência de processos moleculares que causam uma mudança na permeabilidade e nos componentes intercelulares, levando à morte celular (RAAFAT et al., 2009). A QTS possui um espectro de ação contra fungos e bactérias, principalmente bactérias Gram-positivas, como no caso *S. mutans*. Sendo assim, pode aumentar o efeito antimicrobiano do sistema e agir de forma sinérgica com a TFD e fármaco, de forma a obter melhores resultados para o tratamento dos biofilmes orais (FRADE et al., 2018).

A natureza catiônica da QTS tem sido convenientemente explorada para elaboração de sistemas nanoparticulados de liberação controlada, entre outros fatores, devido à sua capacidade de complexação eletrostática com polímeros aniônicos, como por exemplo, o polímero alginato de sódio (ALG) (EL MAGHRABY; ARAFA, 2019).

O ALG (Figura 4-B) é um polímero natural obtido de algas marrons, aniônico e solúvel em água, formado por ácidos carboxílicos compostos de subunidades de β -D-ácido manurônico (M) e α -L ácido gulurônico (G) interligados por ligações 1,4-glicosídicas. Pode estar associado a sais como sódio, cálcio ou potássio (LEE; MOONEY, 2012).

Entre as propriedades mais relevantes do ALG evidenciam-se a biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade. Além disso, o ALG tem a capacidade de criar ligações de hidrogênio com glicoproteínas do tipo mucina, promovendo o estabelecimento de importantes interações mucoadesivas, razão pela qual também tem sido usado na área farmacêutica para adesão na mucosa bucal (GONÇALVES et al., 2016; KILICARSLAN et al., 2018; MARTÍN et al., 2015; ZHOU et al., 2018).

Figura 4. Estrutura química da quitosana (A) e do alginato de sódio (B)



Fonte: SILVA et al.2006 e SOUSA et al. 2008

Os filmes bucais são modernas formas farmacêuticas sólidas representadas por películas finas flexíveis, de tamanho pequeno, que apresentam propriedades mucoadesivas, sabor e textura agradáveis, fácil transporte e manuseio. Além disso, não são invasivos e são facilmente dissolvidos favorecendo a absorção direta pela mucosa oral, sendo excelentes sistemas de liberação de fármacos, os quais inclusive podem melhorar a adesão do paciente ao tratamento (NAGARAJU et al., 2013; SILVA et al., 2015).

Os filmes poliméricos podem ser associados com sucesso à TFD. Ferreira et al. (2016) descreveram o desenvolvimento de filmes de QTS e polietilenoglicol contendo porfirina como FS, associados à TFD para o tratamento de câncer, obtendo resultados promissores, com alto rendimento de oxigênio singlete, forte ativação na luz e destruição das células cancerígenas após irradiação, além de baixa toxicidade no escuro (FERREIRA et al., 2016). Alvarez et al. (2012) descreveram a elaboração de filmes a base de polissilsesquioxanos incorporados com porfirina como FS, associados à TFD para a inativação de *C. albicans*, os quais levaram à uma diminuição de 2,5 log (99,7%) da sobrevivência celular da levedura supracitada (ALVAREZ et al., 2012). McCarron et al. (2005) desenvolveram filmes a base de metil éter vinílico e anidrido maleico, utilizando o ácido aminolevulínico como FS para o tratamento de lesões intra-epiteliais vulvares, registrando absorção cutânea com a ativação da luz, o que é um requisito para o sucesso da

TFD de lesões de natureza intra-epitelial (MCCARRON et al., 2005).

A produção dos filmes poliméricos é um método simples e rápido. Eles são constituídos de polímero, plastificante e o composto ativo de interesse, podendo ser incorporados outros componentes, como aromatizantes, corantes, entre outros, a fim de se obter filmes homogêneos, íntegros e com flexibilidade. Os filmes de ALG (FA) são finos, transparentes, uniformes e apresentam estabilidade à temperatura ambiente, flexibilidade e bioadesão. Com isso, tornam-se adequados para uso na cavidade oral (TURBIANI; KIECKBUSCH; GIMENES, 2011; SALAS-VALERO; KIECKBUSCH, 2008; SANTANA, 2010).

Em face ao exposto, é do nosso entendimento que o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas incorporadas com curcumina dispersas em filmes de alginato de sódio associados à TFD, deve representar uma promissora ferramenta nanobiotecnológica visando o tratamento de biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Objetivo principal do trabalho foi desenvolver e caracterizar dois sistemas para incorporação de curcumina como potencial tratamento de cárie e candidíase oral associado à aTFD, que seja mais eficiente, menos invasivo e que promova maior aderência do paciente ao tratamento.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar as PNs de QTS e ALG;
- Desenvolver e caracterizar os FA;
- Validar a metodologia analítica para quantificação de CUR;
- Avaliar a liberação *in vitro* do sistema final (FA/NP_CUR), CUR livre e NP_CUR;
- Determinar a (CIM) e (CBM) frente ao *Streptococcus mutans*;
- Avaliar o efeito fotodinâmico antimicrobiano da CUR livre e incorporada no sistema sobre os biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans* por meio de unidades formadoras de colônias – UFC/mL.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Equipamentos e materiais

- Balança analítica (Shimadzu, modelo AW220);
- Medidas volumétricas foram feitas usando vidrarias volumétricas de classe A e micropipetas Eppendorf® de 500 a 5000 µL.
- Filtros Amicon (100 kDa) (Milipore);
- Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments);
- Agitador magnético (Quimis);
- Peagômetro (Micronal);
- Chapa de aquecimento com agitação magnética (Quimis);
- Banho ultrassônico – Ultrasonic Cleaner (Unique);
- HPLC AGILENT modelo 1220 Infinity LC (Agilent Technologies);
- Bomba Peristáltica Pump-P1(GE Healthcare);
- Agitador mecânico (IKA® Eurostar 20 digital);
- Centrífuga (Sorvall TC);
- Analisador térmico do tipo DSC (*differential scanning calorimetry*) (TA Instruments);
- Microscópio Eletrônico de Varredura de emissão por campo (MEV-FEG), instalado no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) do Instituto de Química da UNESP (microscópio Jeol modelo JSM e série 7500F);
- Estufas de circulação forçada de ar e Estufas de controle de CO₂;
- Fluxo laminar ;
- Alças de inoculação microbiológicas (Kasvi);
- Microplacas de 96 poços ;

3.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram:

- Curcumina (Inlab);
- Quitosana de baixo peso molecular, grau de desacetilação de 90%. (Sigma Aldrich);
- Alginato de sódio (Sigma Aldrich);
- Metanol (J. T. Baker);
- Acetonitrila (J. T. Baker);
- Ácido acético glacial (Sigma Aldrich);
- Água purificada – Millipor , $\mu\text{m} = 8$, $\text{M}\Omega. \text{m} = 25^\circ \text{C}$;
- Glicerina (Synth);
- Tween 80[®] (Synth);
- Etanol Absoluto (Merck).
- Ágar Sabouraud (Kasvi)
- Ágar BHI (Kasvi)
- Caldo BHI (Kasvi)
- Caldo YNB (Difico)

3.2 MÉTODO

3.2.1 Preparação de soluções e dispersões.

- Solução de Ácido Acético

A solução de ácido acético 0,1 M foi preparada na capela transferindo-se 7 μL de ácido acético para um balão volumétrico de 250 mL e completado com água purificada até o menisco.

- Dispersão de ALG

A dispersão de ALG na concentração de 1 mg mL^{-1} foi preparada pesando-se 0,250 g do polímero, o qual foi disperso em 250 mL de água purificada, seguido de agitação magnética por aproximadamente 24 horas.

- Dispersão de QTS

A dispersão de QTS na concentração 1 mg mL^{-1} foi preparada pesando-se 0,250 g de polímero, o qual foi disperso em 250 mL da solução de ácido acético 0,1 M seguido por agitação magnética por aproximadamente 24 horas.

- Solução de CUR

A solução de CUR a 1 mg mL^{-1} foi preparada pesando-se aproximadamente 0,025 g do ativo, o qual foi dissolvido em etanol absoluto. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com etanol até o menisco.

- Soluções para método cromatográfico

Para quantificação da CUR pelo método cromatográfico proposto por FONSECA-SANTOS et al (2016) foi preparada uma solução estoque de $1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de CUR em um balão de 25 mL, pesando-se 0,025 g de CUR seguida pela sua dissolução em metanol. Em seguida, a solução foi colocada no ultrassom por 5 min e, após isso, o menisco aferido. Posteriormente, foram acrescentadas alíquotas da concentração estoque em balões de 10 mL para obtenção da curva analítica, adquirindo uma faixa de trabalho entre $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ a $75 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (FONSECA-SANTOS; GREMIÃO; CHORILLI, 2016).

3.2.2 Análise do potencial zeta dos polímeros em função do pH

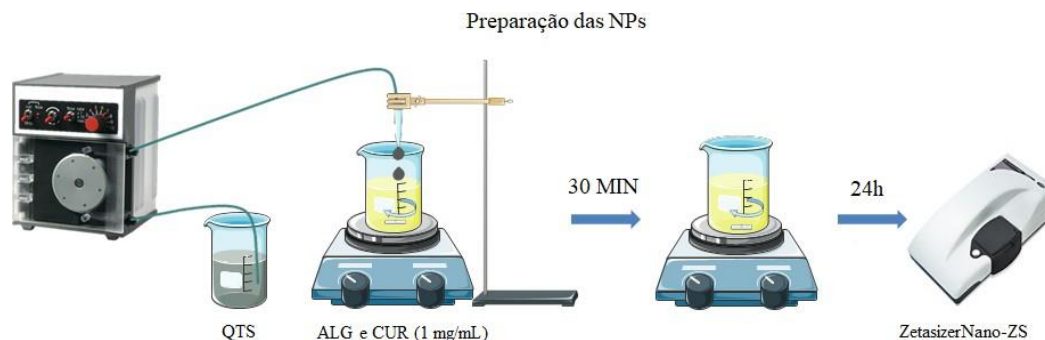
Realizou-se a titulação ácido-base dos polímeros empregando equipamento Zetasizer Nano-ZS[®], acoplado ao autotitulador MPT-2 com um ângulo de detecção de 173° com intuito de determinar a melhor condição de pH para a reação de complexação polieletrólítica. O pH foi ajustado automaticamente usando soluções de NaOH (0,05 e 0,5 M) e HCl (0,5 M). A temperatura da célula de espalhamento foi fixada em 25°C. Avaliou-se o potencial zeta dos polímeros em diferentes valores de pH, a partir de uma curva de titulação com valores de pH de 2,0 a 8,0 (em $0,7 \pm 0,1$ unidades por medida). As curvas foram avaliadas em triplicata.

3.2.3 Preparação das NPs

As NPs foram preparadas pela técnica de complexação polieletrólítica, conforme descrito pela metodologia de Bhunchu et al. (2015) com modificações. A QTS foi dispersa em solução de ácido acético ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e o ALG em água purificada, obtendo-se uma concentração de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente. A partir disso, foi ajustado os valores de pH da dispersão de QTS e ALG para 4 e 6, respectivamente (BHUNCHU; ROJSITTHISAK; ROJSITTHISAK, 2015). Para o desenvolvimento das NPs, foram testadas diferentes proporções (m/m) de cada dispersão (0,05:1 até 1:1). A dispersão de QTS foi gotejada na dispersão de ALG com auxílio de uma bomba peristáltica a uma taxa de fluxo de 20 mL h^{-1} com agitação magnética constante por 30 minutos, como ilustrado na Figura 5.

O desenvolvimento das NPs com o fármaco foi feito nas mesmas condições que as NPs controle, adicionando-se 1 mg mL^{-1} de CUR na dispersão de ALG contendo 1% do tensoativo: Tween 80[®]. Em seguida, foram gotejados volumes diferentes de QTS conforme as proporções citadas sob agitação de 30 minutos.

Figura 5. Representação ilustrativa para obtenção das nanopartículas poliméricas.



Fonte: próprio autora.

4 Caracterização das nanopartículas

4.1 Análise de diâmetro hidrodinâmico médio e do índice de polidispersão das nanopartículas

O diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e o índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, no equipamento Zetasizer Nano-ZS® à 25°C, em um ângulo de detecção de 173°.

O equipamento é capaz de medir coeficiente de difusão translacional da partícula em movimento browniano (aleatório) convertendo esse resultado no diâmetro hidrodinâmico das partículas e em distribuição de tamanhos, a partir da equação de Stokes-Einstein (Equação 1). Todas as amostras foram realizadas em triplicata (3n).

$$Dh = \frac{KT}{3\pi\eta D} \quad \text{Equação 1}$$

em que: Dh= diâmetro hidrodinâmico, K= constante de Boltzman, T= temperatura absoluta, η = viscosidade do meio de dispersão e D= coeficiente de difusão.

4.2 Análise do potencial zeta das partículas

O potencial zeta (PZ) das nanopartículas foi determinado pela técnica de mobilidade eletroforética, por meio da equação de Smoluchowski (Equação 2), em equipamento Zetasizer Nano-ZS, em um ângulo de detecção de 173°. Todas as medidas foram realizadas em triplicata (3n).

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\varepsilon} \quad \text{Equação 2}$$

em que: ζ = potencial zeta, μ = mobilidade eletroforética, η = viscosidade do meio de dispersão e ε = constante dielétrica.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

O equipamento utilizado para a obtenção das imagens foi um microscópio Jeol modelo JSM e série 7500F, que é um microscópio eletrônico de varredura de emissão por campo (MEV-FEG), instalado no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) do Instituto de Química da UNESP.

As amostras obtidas foram diluídas na proporção 1:30 (v/v) em uma dispersão de Tween 20[®] (0,5%), para evitar a aglomeração das partículas durante o processo de secagem. A amostra foi colocada sobre suporte metálico (7μL) e acomodada dentro de dessecador sob vácuo e com agente secante. Após a secagem, o suporte foi revestido com material condutor (carbono) e levado ao microscópio. O software Image J foi utilizado para medir o tamanho das NPs a partir das fotomicrografias.

4.4 Análise térmica do sistema

A técnica de termogravimetria (TG/DTA) foi utilizada para determinar a avaliação da estabilidade térmica do material. Os polímeros, FS e NPs acrescidas ou não de CUR foram analisadas no termoanalisador SDT 2960 da TA Instruments. A faixa de

temperatura estudada foi de 30- 800 °C, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, em atmosfera de gás inerte de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹. A massa de amostra utilizada foi da ordem de 7,0 mg em cadinho de α - alumina de 9 μ L.

5. Validação da Metodologia Analítica por CLAE

A validação foi realizada utilizando um método previamente desenvolvido por FONSECA-SANTOS et al. (2016) seguindo os parâmetros de linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão e exatidão, avaliados conforme as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Farmacopéia Americana (BRASIL, 2017; FONSECA-SANTOS; GREMIÃO; CHORILLI, 2016; USP, 2011).

O equipamento utilizado para validação da metodologia foi o HPLC AGILENT, que se trata de um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção no ultravioleta sob as condições cromatográficas da metodologia utilizada para quantificação de CUR descritas na Tabela 1. As análises foram realizadas à temperatura ambiente controlada ($23,0 \pm 1,0$ °C) e as soluções foram filtradas em membrana de PTFE 0,45 μ m antes do início das leituras.

Tabela 1. Condições cromatográficas para quantificação de CUR.

Variável	Condição
Fase estacionária	C18 - 5 μ m
Coluna (dimensões)	250 mm x 4.6 mm
Fase móvel	50:50*
Vazão da fase móvel	1,2 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	33 °C
Tempo de análise	14 min
Volume de injeção	20 μ L
Deteção	425 nm

*50:50= Proporção de Acetonitrila e Água com 2% de ácido acético.

Fonte: Própria autora

5.1 Conformidade do sistema cromatográfico

A análise de conformidade tem como função afirmar se os parâmetros cromatográficos averiguados são aptos a fornecer resultados aceitáveis e confiáveis.

A análise foi realizada através de cinco injeções da solução de CUR ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) preparada a partir da solução estoque. A partir dos picos cromatográficos de cada injeção, avaliou-se o desvio padrão relativo percentual (DPR%) das áreas, dos tempos de retenção (tR), dos números de pratos teóricos (N), do fator de cauda (FC) e da assimetria do pico, fornecidos pelo software do equipamento (USP, 2011).

5.2 Seletividade

A seletividade é um parâmetro que analisa a interferência dos componentes da matriz sobre o analito. Para demonstrar que os componentes da formulação não interferem nas análises quantitativas da CUR, a seletividade do método foi avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos pelas análises do fármaco livre, componentes da fase móvel e os componentes da formulação sem o fármaco, dos quais são: QTS, ALG, Tween80[®], glicerina e NPs. Estas amostras foram diluídas para o ponto de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ da curva analítica para verificação de interferência.

5.3 Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela média da construção de três curvas analíticas de área do pico em função da concentração de CUR. As soluções da faixa de trabalho 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas a partir da solução estoque de CUR ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) em triplicata (3n). Os resultados de linearidade foram avaliados por meio de análise de variância ANOVA a nível de significância $\alpha = 0,05$ (95 % do intervalo de confiança).

5.4 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é considerado a menor quantidade do analito que pode ser detectado. Essa medida é determinada a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas construídas, conforme a equação 3:

$$AR = \frac{(Amido total - ARD - ALD)}{Amido total} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

em que IC é a inclinação da curva analítica e σ é o desvio padrão.

5.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é considerado a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Essa medida é determinada a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas construídas, conforme a equação 4:

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{I_c} \quad \text{Equação 4}$$

em que IC é a inclinação da curva analítica e σ é o desvio padrão.

5.6 Precisão

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão foi avaliada por meio de ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. A determinação da repetibilidade deve avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo operador e mesmo equipamento em um único dia utilizando três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível. Já a determinação da

precisão intermediária é feita no mesmo laboratório sob a mesma condição, utilizando a mesma amostra, porém em dois dias diferentes por operadores distintos. A proximidade entre os resultados obtidos foi verificada, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), conforme a equação 5:

$$Precisão = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que: DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

5.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão deve ser verificada a partir de três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível. Deve ser calculado o desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração. O grau de concordância entre os resultados obtidos em relação aos valores teóricos foi avaliado por meio do cálculo de recuperação (Equação 6):

$$Recuperação = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

6. Eficiência de encapsulação (EE%)

Para determinação da EE%, cada amostra foi colocada em um filtro amicon com membrana Ultracel-100 (100 kDa, Millipore Corporation, Billerica, MA) e centrifugada a 6,200 g por 15 minutos para separar o fármaco livre que não foi incorporado nas NPs (MAZZARINO; BORSALI; LEMOS-SENNA, 2014).

A quantidade de fármaco incorporada foi analisada por meio do método cromatográfico validado. A EE% foi determinada empregando a equação 7.

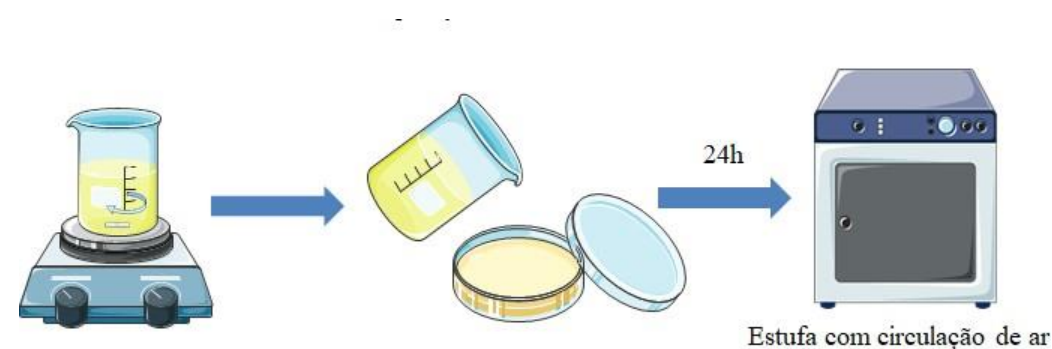
$$EE(\%) = \frac{\text{Quantidade total do FS adicionado} - \text{Quantidade livre no sobrenante}}{\text{Quantidade total do FS adicionada}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

7. Preparação dos filmes

Os filmes de alginato de sódio (FA) foram obtidos pela técnica de evaporação do solvente (*casting*) (Figura 6). Para obtenção dos filmes foi utilizado ALG (2%,m/v) e glicerina (10%,m/v em relação à massa de polímero seco) como plastificante, os quais permaneceram em agitação magnética por aproximadamente 60 minutos ou até a dispersão manter-se homogênea. Em seguida, a dispersão obtida foi vertida em placas de Pétri (9 cm de diâmetro e uma área de 63,5 cm²), as quais foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 ° C durante 24 horas aproximadamente.

Para a preparação dos filmes com as NPs, foram testadas NPs de CUR obtidas nas proporções 0,05:1(A); 0,10:1(B); 0,30:1(C) (m/m). Incorporou-se 8 mL das suspensões de NPs (A, B e C) na dispersão de 2% de ALG com 10% de glicerina, seguido de agitação magnética por 1 minuto. Em seguida, a dispersão obtida foi vertida em placas de Pétri (9 cm de diâmetro e uma área de 63,5 cm²), as quais foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 ° C durante 24 horas aproximadamente.

Figura 6. Representação ilustrativa para obtenção dos filmes.



Fonte: próprio autora.

8. Caracterização dos filmes

8.1. Análise macroscópica dos filmes

Os filmes foram avaliados macroscopicamente quanto à transparência, flexibilidade e presença de bolhas ou fissuras, com objetivo de selecionar somente os filmes com boa homogeneidade e ausência de imperfeições.

8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os filmes foram analisados por microscópio eletrônico de varredura de emissão por campo (MEV-FEG). O equipamento utilizado para a obtenção das imagens foi um microscópio Jeol modelo JSM e série 7500F, instalado no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) do Instituto de Química da UNESP. As amostras foram cortadas em pequena parte e colocada sobre suporte metálico e o suporte foi revestido com material condutor (carbono) e levado ao microscópio. Foram analisadas a superfície dos filmes e a seção transversal para determinação da espessura.

8.3 Determinação da espessura dos filmes

A espessura dos filmes também foi avaliada com auxílio de micrômetro Digital MDC-Lite (Mitutoyo®), sendo as medidas obtidas em 5 pontos aleatórios de cada filme (n = 6).

8.4 Propriedades mecânicas dos filmes

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas em analisador universal de textura TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems) equipado com sonda em aço

inoxidável com ponteira esférica ($D=2,5\text{cm}$). Seções dos filmes ($n=6$) foram fixadas sobre um suporte metálico com um orifício circular ($D= 5\text{cm}$) a uma distância de 25mm da sonda. A sonda metálica desceu perpendicularmente à superfície do filme com velocidade constante de 1mm s^{-1} , em direção ao centro do orifício circular, sendo que durante a perfuração do filme a velocidade foi de $0,10\text{mm s}^{-1}$. A força de gatilho foi de 0,005kg. Curvas de força *versus* deslocamento foram registradas até o momento da ruptura do filme e utilizadas para determinar suas propriedades mecânicas, como resistência à perfuração (R_p), alongamento durante a perfuração (A_p) e energia na perfuração por unidade de volume (E_p), de acordo com as equações 8, 9 e 10:

$$R_p = \frac{F}{A} \quad \text{Equação 8}$$

em que F é a força requerida para a ruptura do filme e A é a área da seção transversal do filme ($A= 2rd$ onde r é o raio do orifício e d a espessura do filme).

$$A_p\% = \frac{\sqrt{r^2 + d^2} - r}{r} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

em que r é o raio exposto no orifício da placa e o d é o deslocamento do dispositivo do ponto de contato até a ruptura do filme.

$$E_p = \frac{AUC}{V} \quad \text{Equação 10}$$

em que AUC é a área sob a curva (força *versus* deslocamento) e o V é o volume de filme ($V=\pi r^2 h$) localizado no orifício da placa.

8.5 Absorção de líquido

A absorção de líquido dos filmes foi determinada em dispositivo de Enslin adaptado. Uma seção de cerca de 1 cm² de cada FA foi precisamente pesada e colocada sobre a placa de vidro sinterizada do funil do dispositivo. O sistema foi fechado com auxílio de filme de policloreto de vinila e papel alumínio. O volume de líquido absorvido pelo FA foi avaliado após 1, 2, 5, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos. Foi utilizada solução de saliva simulada (2,38 g Na₂HPO₄, 0,19 g KH₂PO₄ e 8,00g NaCl por litro de água destilada com pH 6,75) como meio de intumescimento (PEH; WONG, 1999). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de líquido absorvido em relação à massa inicial da amostra, de acordo com a equação 11:

$$\% \text{Absorção de líquido} = \frac{V}{m} \quad \text{Equação 11}$$

em que V é o volume em mL do meio absorvido e m é a massa em g do filme.

8.6 Análise de permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

A permeabilidade dos filmes ao vapor de água foi determinada pelo método gravimétrico. Seções circulares dos FA foram firmemente fixadas no topo de recipientes de vidro de 20 mL com abertura de 1,1 cm contendo 10 mL de água destilada. Os FA foram também fixados em frascos vazios (sem água), como referência. Ambos foram previamente pesados e colocados no interior de um dessecador contendo sílica gel. Em intervalos específicos (24, 48, 72, 96 e 120h), o perfil de perda de massa foi obtido para cada amostra e a PVA calculada através da equação 12:

$$PVA = \frac{TTVA \times x}{A \times P_0 \times (RH_1 - RH_2)} \quad \text{Equação 12}$$

em que: TTVA é a taxa de transmissão de vapor d'água obtido da inclinação da

curva (massa *versus* tempo), x é a espessura do filme em μm , A é a área de superfície do filme exposta ao permeante (m^2), P_0 é a pressão de vapor de água pura (3,159 kPa a 25°C) e $(RH_1 - RH_2)$ é o gradiente de umidade relativa.

8.7 Mucoadesão *in vitro*

A mucoadesão *in vitro* foi avaliada em um analisador universal de textura TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems). As análises foram feitas em discos de mucina (4cm^2) pré-hidratados por 1min em solução de saliva artificial para mimetizar os fluidos da região bucal.

Os discos foram colocados sobre um suporte para teste de mucoadesão e os filmes foram cuidadosamente fixados a uma sonda cilíndrica de 10 mm com fita dupla-face. A sonda metálica foi movida perpendicularmente em direção ao disco de mucina com velocidade constante de 10 mm min^{-1} até força de compressão pré-determinada (0,5N). Para garantir o contato com o disco, a amostra foi introduzida 1 mm de profundidade a partir da superfície do disco e mantida por 60 s sem a aplicação de força durante a fase de contato. Em seguida, a sonda foi removida com velocidade de 20 mm min^{-1} e a força de destacamento máxima (N) foi determinada para cada amostra.

9. Ensaio de solubilidade

O estudo de solubilidade do fármaco é parâmetro imprescindível para garantia das condições *sink* durante o ensaio de liberação *in vitro*, em que o volume do meio de dissolução deve ser de pelo menos 3x o necessário para solubilizar toda a massa de fármaco. Dessa maneira, impede-se que o passo limitante da liberação seja a solubilidade do fármaco (saturação do meio), permitindo melhor avaliar a habilidade do sistema de liberação desenvolvido em controlar as taxas de liberação (EMMANUEL,2010). Para tanto,

primeiramente foi feito o teste de solubilidade da CUR em saliva simulada (pH= 6). Incorporou-se 1% e 2% (m/v) dos tensoativos Tween 80®, Span 20 e PEG na saliva simulada e selecionou-se uma condição em que o fármaco apresentou mais afinidade com o meio de liberação, sendo mais facilmente solubilizado. As medidas das concentrações foram determinadas após incubação das amostras por 48 horas a 37 °C e sob agitação em HPLC.

10. Ensaio de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado para o sistema final (FAS@NP-CUR) e também para as NP_CUR e CUR livre como método comparativo. Para realização dos experimentos de liberação *in vitro* foram utilizadas células verticais de difusão de Franz com área difusional de 1,77 cm², volume de 7,0 mL no compartimento receptor e membrana artificial de polietersulfona (PES) com poros de 0,45 µm da Millipore®. Cada membrana foi colocada na parte superior do compartimento receptor que foi preenchido com uma solução de saliva artificial pH 6 contendo 2% de Tween 80®. Este meio foi mantido em banho- maria termostatizado a 37 °C, sob agitação constante em agitador magnético por um período de 24 h para perfil cinético de liberação. Após isso, no compartimento doador foram aplicadas na parte superior da membrana 1000 µL das NPs-CUR, CUR livre em solução, e 1,77 cm² do FA-CUR e do sistema final (FA@NP-CUR). Posteriormente, foram coletadas automaticamente alíquotas de forma individual e em intervalos pré determinados (5 minutos até 24 horas) e analisadas pelo método validado.

Os dados da liberação foram aplicados em diferentes modelos matemáticos (Primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas), para a avaliação do que melhor representasse a cinética e o mecanismo de liberação.

11. Ensaios Microbiológicos

11.1 Grupos testados e parâmetros da Terapia Fotodinâmica

Neste estudo foram avaliados sete grupos experimentais G1: bactéria em meio de cultura; G2: CUR livre; G3: NPs livres +TFD; G4: NPs@CUR + TFD; G5: FAS@NPs/CUR +TFD, G6: filmes controles + TFD e G7: filmes apenas com CUR sem NP. Todos os grupos foram tratados com e sem luz e estão descritos na Tabela 2.

Os parâmetros para realização da TFD foram pré irradiação de 5 min, irradiação dos poços por sistema de luz LED azul 460 nm (Biotable, MMO) com dose de energia de 15 J/cm² por 11 minutos e 53 segundos.

Tabela 2. Grupos testados para terapia fotodinâmica.

Grupos	Descrição
G1	Bactéria em suspensão
G2	CUR livre
G3	NPs livres
G4	Nanopartícula com CUR
G5	FAS@NPs/CUR*
G6	Filmes controles
G7	Filmes com CUR

*FAS@NPs/CUR: Sistema final (nanopartículas com curcumina dispersas em filmes de alginato de sódio.

Fonte: Própria autora

11.2 Preparo da suspensão bacteriana padronizada

Utilizou-se a cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) fornecida pela Fundação FioCruz. O *S. mutans* foi reativado e cultivado em placas de Pétri contendo ágar BHI por 48h sendo incubados em atmosfera de microaerofilia a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Posteriormente, foram colocadas cerca de 3 a 5 colônias em tubo Falcon contendo 10 mL de caldo Bacto™ BHI +1% de sacarose, agitados em vórtex até atingir a turvação

aproximada de 0,5 da escala de Mc Farland com quantidade de células da ordem de 10^8 células bacterianas/mL.

11.3 Preparo da suspensão fúngica padronizada

Utilizou-se a cepa *Candida albicans* (ATCC 18804), fornecida pela Fundação Fio Cruz, sendo cultivada em placas de Pétri em ágar Sabouraud durante 48h. Após reativar e realizar a cultura inicial, foi feito o pré-inóculo contendo 10 mL de caldo YNB (Yeast Nitrogen Base) com 100 mM de glicose e 3 colônias, os quais foram incubados por 16 horas. Após isto, foi feito o inóculo através de 500 μ L do pré-inóculo e 9,5 mL de caldo YNB com 100 mM de glicose. Essa suspensão foi agitada em vórtex até atingir a turvação aproximada de 0,5 da escala de Mc Farland com quantidade de células da ordem de 10^8 células fúngicas/mL.

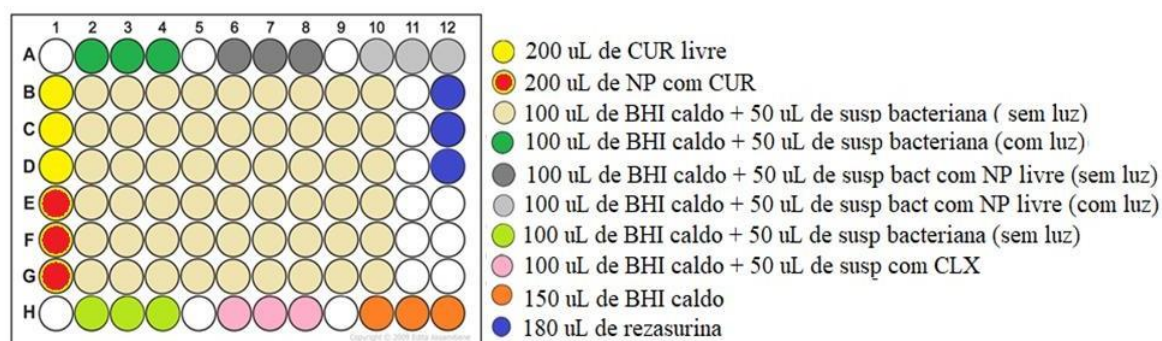
11.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Determinação da Concentração Bactericida (CBM)

A determinação da CIM e CBM foi feita apenas para os grupos G1 até G4. Poços para cada grupo, controle e experimental, foram utilizados para determinação da CIM por meio do método da microdiluição em caldo de acordo com as normas da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de 2013. Cada poço de uma placa de 96 poços contendo 100 μ L de caldo BHI e sacarose a 1% recebeu 100 μ L de CUR livre (solução etanólica 99%) e poços com o FS incorporado às NPs utilizado nas concentrações de 69,6 μ g/mL. Uma suspensão contendo 50 μ L de *S. mutans* foi adicionada separadamente em cada poço da placa obtendo-se concentração final da ordem de 1×10^5 células/mL.

O estudo também foi realizado utilizando-se como controle positivo de crescimento clorixidina (padrão ouro para inibição de bactérias) e também o controle negativo por meio de poços contendo apenas bactéria, como ilustrado na Figura 7. Após,

realizou-se a adição de 30µL de rezasurina a 0,10%, com incubação das placas a 37°C ± 1°C, sob agitação de 75 r.p.m na incubadora com agitação orbital por 3 horas. Para a CIM, a presença de bactérias viáveis foi observada pela mudança de coloração nos poços. Os poços com coloração em azul não tiveram crescimento bacteriano visível e para os poços com coloração violeta observou-se crescimento bacteriano. Já a CBM foi determinada após o plaqueamento dos orifícios que não mostraram crescimento visível (coloração azul), ou seja, DO 600nm ≤0.05, sendo retirados 10µL, os quais foram plaqueados em meio de cultura específico para crescimento de *S. mutans* (água BHI). As placas foram mantidas a 37°C (±1°C) por 48 horas em estufa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 7. Representação da disposição das amostras na placa de 96 poços para determinação da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM).



Fonte: própria autora.

A CIM foi definida como a menor concentração de CUR sem crescimento visível (atividade bacteriostática), e a CBM como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a ≥ 99,9% (atividade bactericida).

11.5 Formação do biofilme bacteriano *in vitro* em fundo de placa de 96 poços.

Foi utilizado o método de formação de biofilmes no fundo de placa de microtitulação com 96 poços (FONTANA et. al., 2009). Inicialmente foi acrescentado 100 µL de água qual? no fundo da placa de cada poço. Para induzir a formação de biofilme foi colocado um

volume de 100 μL das suspensões bacterianas e fúngicas preparadas de acordo com o descrito no item 10.2 e 10.3 respectivamente em cada poço das placas. Para o biofilme de *S. mutans* após 24 horas, os meios de cultura antigos foram aspirados e renovados com 100 μL do meio de cultura (BHI caldo) para cada poço, até completar 48 horas de crescimento em ambiente de microaerofilia a 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Para o biofilme de *C. albicans*, após 1 hora e 30 minutos os meios de cultura antigos foram aspirados e renovados com 100 μL do meio de cultura (RPMI 1640) após 24 horas, novamente os meios de cultura antigos foram aspirados e renovados com 100 μL de RPMI 1640 para cada poço, até completar 48 horas de incubação.

11.6 Avaliação quantitativa das células bacterianas viáveis dos biofilmes

Após a irradiação das amostras foi feita a contagem das colônias através de diluições seriadas a partir da suspensão resultante após o desprendimento do biofilme. Sendo assim, essas suspensões foram diluídas em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} para cada poço. Em cada diluição foram pipetados 5 μL de cada poço utilizando-se a técnica da gota em placas de Pétri (90x15mL) nos biofilmes. Para calcular o número de UFC/mL, multiplicou-se a quantidade de colônia encontrada pelo fator da diluição, sendo assim, obteve-se o valor de UFC/mL. As colônias microbianas formadas foram contadas após 48 h de incubação.

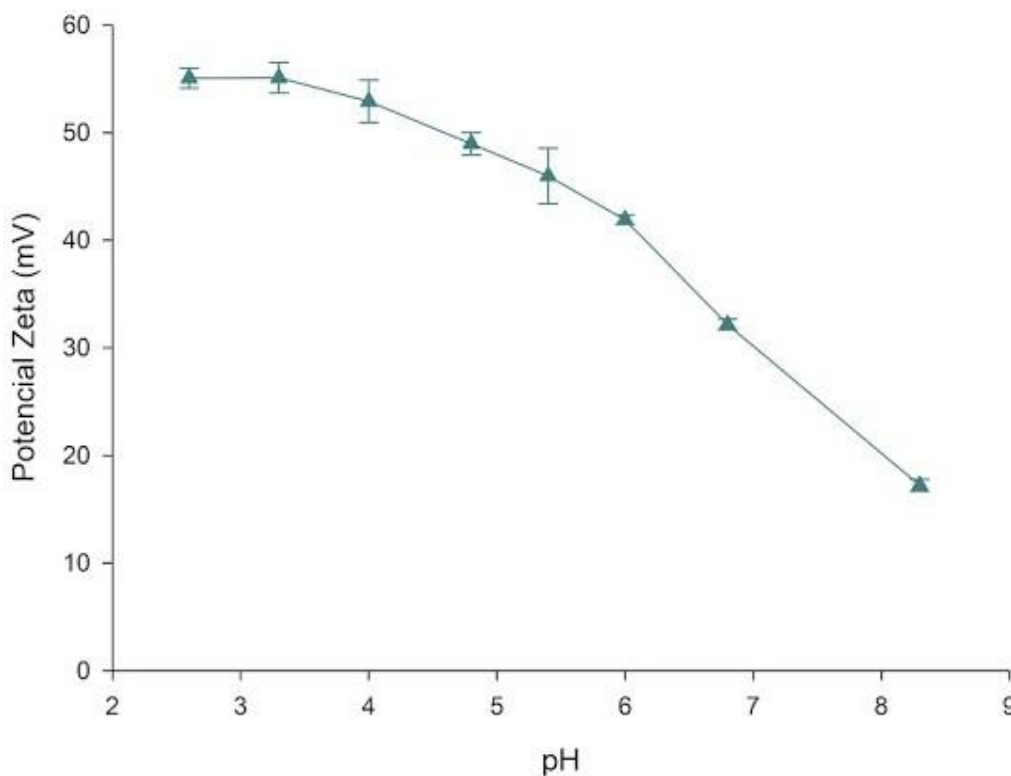
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

12.1 Análise do potencial zeta dos polímeros em função do pH

É importante saber que a escolha do pH é fundamental para a preparação das NPs, pois para que ocorra a reação de complexação eletrostática, os polímeros precisam de uma determinada densidade de cargas para que ocorra uma forte interação entre os grupamentos ionizados dos polímeros (BUCHHAMMER; MENDE; OELMANN, 2003).

A densidade de carga do polímero está relacionada à sua ionização, a qual pode ser controlada pelo pH do meio de dispersão. Dessa forma, realizou-se o estudo do potencial zeta dos polímeros separadamente e em função do pH do meio, resultando no perfil representado nas Figuras 8 e 9.

Figura 8. Gráfico do Potencial Zeta em função do pH da QTS.

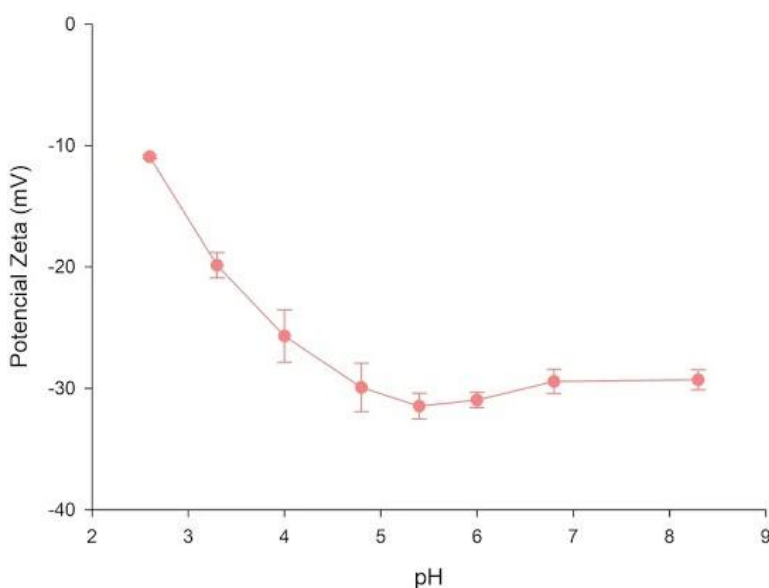


Fonte: Dados da pesquisa.

É sabido que a QTS é um polímero catiônico que possui grupos aminos ($-\text{NH}_3^+$) em sua estrutura e $\text{pK}_a \sim 6,5$, sendo solúvel em meios aquosos ácidos e possuindo alta carga positiva (DASH et al., 2011). Através do gráfico da Figura 7, nota-se qual é a maior densidade de carga dentre a faixa de pH de 2,0 a 8,0 para dispersão de QTS. Para os valores de pH entre 3,0 e 4,0, a QTS apresentou valores de potencial zeta entre +52,9 mV e +50,0 mV, respectivamente. Pode-se também observar uma redução da densidade de carga a partir do valor de pH 7,0, alcançando +32,2 mV. Essa redução ocorre devido aos valores próximos de pK_a ($\sim 6,5$), onde ocorre a desprotonação dos grupamentos amino da QTS. Sendo assim, o pH de escolha para dispersão de QTS foi o valor de pH 4, pois observou-se uma grande densidade de carga (+50,0 mV).

Diferentemente, o ALG é um polímero aniônico, solúvel em água e possui valores de pK_a de 3,38 e 3,65 (LEE; MOONEY, 2012). Com isso, a construção do gráfico de que? é de suma importância para determinar qual a maior densidade de carga sobre essa faixa de pH, ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Gráfico do Potencial Zeta em função do pH da ALG.



Fonte: Dados da pesquisa.

Como pode ser observado na Figura 9, para os valores acima do valor de pKa do ALG (~3,38 e 3,65), houve aumento significativo da densidade de carga negativa, principalmente a partir de pH 5, resultando em PZ de -29,9 mV, o qual se manteve constante até pH 10 (-29,3 mV). Esse comportamento está de acordo com os dados da literatura, os quais mostram que o ALG é quimicamente estável em valores de pH entre 5,0 e 10,0 (LEE; MOONEY, 2012). O pH escolhido para ALG foi o valor de pH 6, com maior densidade de carga (-31,5 mV), o que sugere que ocorrerá uma forte interação entre os polímeros, desejável para formação das NPs.

12.2 Preparação das nanopartículas poliméricas

A obtenção das NPs foi realizada pela técnica de complexação polieletrólítica empregando polímeros com cargas opostas (QTS e ALG). Primeiramente, foi feito um estudo de pré-formulação para encontrar a concentração mais adequada para as dispersões dos polímeros supracitados. Com isso, foram testadas diferentes concentrações de dispersões de QTS (0,15; 0,30 e 0,45 mg mL⁻¹) e ALG (0,5; 0,6; 0,7 mg mL⁻¹) de acordo com a metodologia proposta por Bhunchu et al. (2015) com modificações. A fim de aprimorar os resultados, novas amostras foram desenvolvidas explorando diferentes proporções QTS:ALG de 0,05:1 (A) a 1:1 (F) e posteriormente foram caracterizadas no equipamento Zetasizer Nano[®] obtendo resultados de DHM, IPD e PZ (BHUNCHU; ROJSITTHISAK; ROJSITTHISAK, 2015).

12.3 Caracterização das Nanopartículas

Diversos parâmetros podem influenciar a formação das partículas como por exemplo os polímeros, sua massa molecular, densidade de carga, pH do meio e um desses parâmetros são a determinação das concentrações e razão dos componentes, os quais influenciam na força de atração entre as cadeias e na formação do complexo através das ligações químicas (iônicas, de hidrogênio, hidrofóbicas e forças de Van der Waals) (MAKHLOF et al., 2011).

Diante disto, o estudo de pré-formulação mostrou a melhor condição para as concentrações das dispersões QTS e ALG e a concentração escolhida foi 0,30 mg mL⁻¹ de QTS e 0,5 mg mL⁻¹ de ALG (amostra 4), conforme descrito na Tabela 3. A escolha foi baseada no parâmetro IPD (0,41), pois evidencia a homogeneidade da distribuição de tamanho e o parâmetro PZ (-42,0 mV), indicando estabilidade coloidal, uma vez que a repulsão entre partículas evita a ocorrência de agregação, além de fornecer um tamanho adequado para nanopartícula (351,0 nm).

Tabela 3. Estudo de pré formulação das dispersões de QTS e ALG.

Amostra	Dispersão de QTS (mg mL ⁻¹)	Dispersão de ALG (mg mL ⁻¹)	DHM (nm)	PZ (mV)	IPD
1	0,15	0,60	238,5	-25,2	0,53
2	0,30	0,60	308,9	-27,7	0,42
3	0,45	0,60	356,8	-29,2	0,54
4	0,30	0,50	351,0	-42,0	0,41
5	0,30	0,70	323,8	-26,4	0,59

Fonte: Própria autora

A fim de aprimorar os resultados, novas amostras foram desenvolvidas explorando diferentes proporções de QTS:ALG de 0,05:1 (A) a 1:1 (F) em razão m/m mantendo o conteúdo de sólidos totais em 5 mg. Estas proporções podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização das NPs sem o fármaco em diferentes proporções

0,05:1 (A) a 1:1 (F).

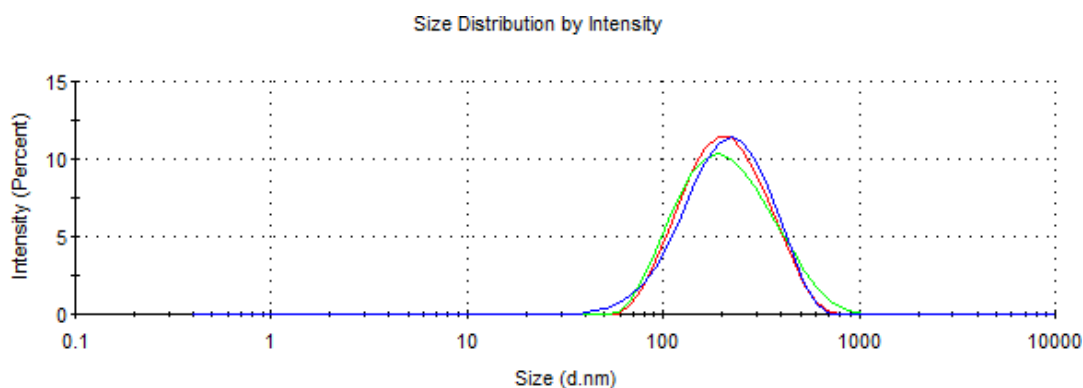
Amostra (QTS:ALG)	DHM (nm)	IPD	PZ (mV)	Característica Visual*
A - 0,05:1	278,6± 0,018	0,39± 0,020	-43,0± 0,029	O
B - 0,10:1	384,1± 0,035	0,47± 0,047	-44,1± 0,071	O
C- 0,30:1	181,2± 0,002	0,22± 0,044	-31,1± 0,030	O
D- 0,40:1	186,2± 0,011	0,22± 0,049	-30,3± 0,041	O
E- 0,50:1	201,2±0,006	0,23± 0,076	-26,2± 0,012	O
F- 1:1	184,1±0,004	0,24± 0,026	-26,4± 0,006	O

* O= opalescente.

Fonte: Própria autora

Conforme descrito na Tabela 4, nota-se que as proporções utilizadas para as amostras de C até F foram adequadas e conferiram DHM e IPD menores e PZ adequados para estabilidade coloidal. Entretanto, a Amostra C foi escolhida para continuidade nas aplicações *in vitro* e ensaios biológicos, pois mostrou a melhor condição para os parâmetros de DHM, IPD e PZ.

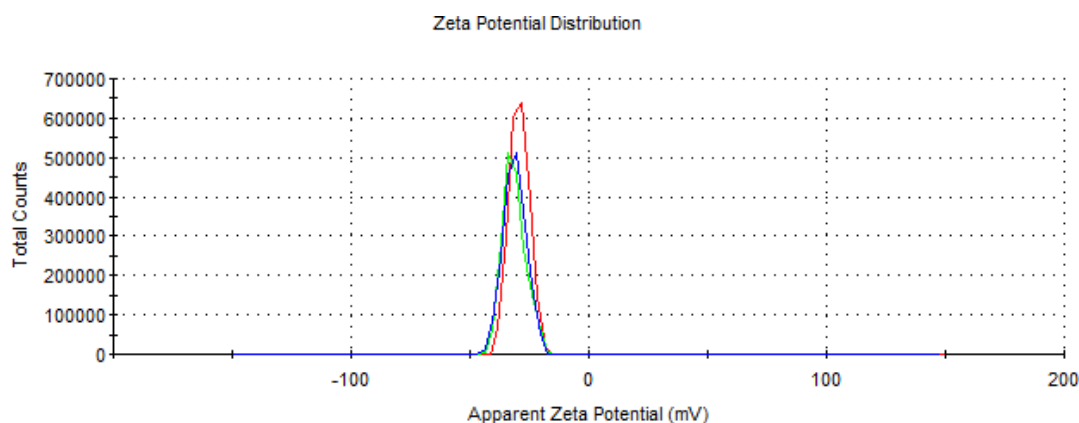
Na Figura 10, nota-se o gráfico de tamanho de distribuição por intensidade da amostra C em triplicata, evidenciando um sistema monodisperso e de acordo com trabalhos da literatura (CHO et al., 2012; SOARES et al., 2016; XU et al., 2019).

Figura 10. Ilustração do gráfico de tamanho de distribuição por intensidade da amostra C em triplicata (3n).

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados na literatura mostram que valores iguais ou maiores que ± 30 mV de PZ conferem maior repulsão eletrostática, o que diminui a possibilidade de agregação, garantindo maior estabilidade ao sistema nanoestruturado (TITUS; JAMES JEBASEELAN SAMUEL e ROOPAN, 2019). Dessa forma, o valor obtido de PZ (Figura 11) da amostra C foi de -31,1 mV (média) e mostrou-se satisfatório e de acordo com dados bibliográficos (MUKHOPADHYAY et al., 2018; MUMUNI et al., 2019; RAFIEE et al., 2014).

Figura 11. Ilustração do gráfico de potencial zeta da amostra C em triplicata (3n).



Fonte: Dados da pesquisa.

O IPD evidencia a homogeneidade da distribuição de tamanho, expressa em números que podem variar entre 0 e 1, sendo que valores entre 0,05 e 0,5 indicam uma estreita distribuição de tamanho e quanto mais estreita, maior a homogeneidade do produto. Valores de IPD superiores a 0,5 indicam ampla distribuição de tamanho, ou seja, não é um sistema considerado homogêneo (CHO et al., 2013). Deste modo, para a amostra C obteve-se um IPD de 0,22, indicando homogeneidade no tamanho de partículas da formulação, estando de acordo com trabalhos na literatura (LIU et al., 2018; MATOS et al., 2019; YONCHEVA et al., 2019).

12.4 Influência de tensoativos na formação das Nps

A incorporação de CUR (um composto de baixa solubilidade aquosa) em NPs de QTS e ALG leva à formação de agregados, considerando o caráter hidrofílico dos polímeros utilizados, os quais não apresentam afinidade por agentes lipofílicos, como pode ser visto na Figura 12.

Figura 12. Nanopartículas incorporadas com CUR sem tensoativos.



Fonte: Dados da pesquisa.

Assim, é de extrema importância utilizar ferramentas que possibilitem a solubilização do agente ativo na formulação, e entre elas, destaca-se a adição de compostos tensoativos. Esses são compostos anfifílicos com capacidade de diminuir a tensão interfacial e, portanto, solubilizar a CUR, fornecendo um sistema estável (YEKEEN et al., 2019).

A Tabela 5 descreve os resultados obtidos para diferentes tensoativos utilizados na preparação de NPs contendo CUR.

Tabela 5. Caracterização de NPs (0,30:1) contendo diferentes tensoativos para incorporação de CUR 1 mg mL⁻¹.

Amostra	Tensoativo (1%)	DHM (nm)	IPD	PZ (mV)	Característica Visual*
A	Pluronic F127 [®]	225,0	0,30	-7,49	P
B	Tween 80 [®]	229,7	0,44	-22,5	O
C	Span 20 [®]	1.466	0,74	-42,0	P

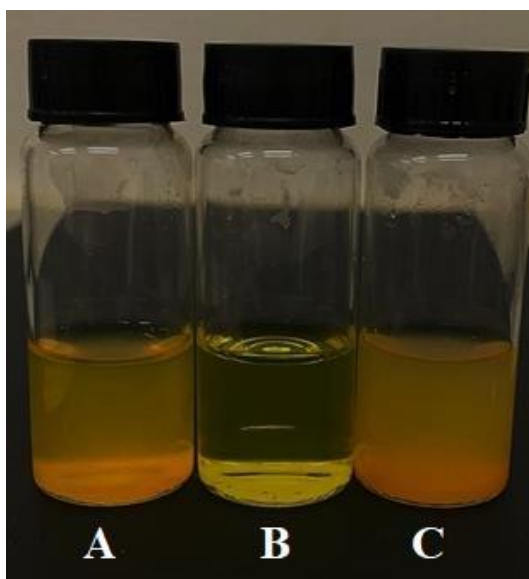
* P= precipitados; O= opalescente.

Fonte: Própria autora

Apesar dos melhores resultados de DHM e IPD terem sido atribuídos ao Pluronic F127®, observou-se que as NPs obtidas com esse tensoativo apresentaram precipitação após 24h da sua obtenção, indicando a não estabilização do sistema. Sendo assim, selecionou-se a amostra B, em que se utilizou o Tween 80®, o qual levou à obtenção de NPs opalescentes, sem precipitados e com tamanho, IPD e PZ adequados.

Através da análise da Figura 13, pode-se observar a característica visual das três amostras contendo os tensoativos (A) Pluronic F127®; (B) Tween 80® e (C) Span 20®, enquanto que através da Figura 14 é possível fazer uma comparação das principais diferenças visuais entre as NPs controle (Fig. 13A) e das NPs com CUR solubilizadas em 1% de Tween 80® (B) na proporção (0,30:1).

Figura 13. Característica visual das amostras obtidas com auxílio de (A) Pluronic F127®; (B) Tween 80®; (C) Span 20®.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 14. Característica visual da NPs controle (A) e das NPs com CUR solubilizadas em 1% de Tween 80[®] (B) na proporção (0,30:1).



Fonte: Dados da pesquisa.

A característica visual opalescente encontrada nas NPs devem-se ao efeito ótico da dispersão da luz pelas partículas coloidais. Os sistemas coloidais são compostos por partículas muito pequenas (tamanho nanométrico), não sendo possível identificá-las a olho nu. Entretanto, essas partículas são capazes de espalhar a luz. Dessa maneira, a identificação de NPs baseia-se na visualização de um feixe de luz de cor azulada, caracterizado pelo efeito opalescente (USBERCO;SALVADOR, 2009).

A quantidade de CUR incorporada (1 mg mL^{-1}) nessa proporção de polímero contendo 1% de Tween 80[®] foi escolhida devido a um levantamento de dados que utilizam essa concentração para o desenvolvimento de NPs de QTS e ALG (BHUNCHU; ROJSITTHISAK; ROJSITTHISAK, 2015; MARTINS et al., 2013; SORASITTHIYANUKARN et al., 2018, 2019).

10.2 Análise do PZ em relação ao tempo

É sabido que o PZ pode ser um parâmetro para análise de estabilidade, pois valores iguais ou maiores que ± 30 mV de PZ conferem maior repulsão eletrostática e com isso diminuem a possibilidade de agregação, mantendo a dispersão de NPs estável por mais tempo (TITUS; JAMES JEBASEELAN SAMUEL e ROOPAN, 2019). A amostra C (0,30:1) foi caracterizada quanto ao DHM, IPD e PZ, sendo realizado um estudo de estabilidade de 24h a 60 dias, cujos resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Estudo de estabilidade da amostra C (0,30:1) incorporada com 1 mg mL^{-1} de CUR em 1% de Tween 80[®]

Amostra	DHM (nm)	IPD	PZ (mV)	Característica Visual*
24 horas	206,43	0,56	-23,66	O
7 dias	208,86	0,59	-24,86	O
15 dias	286,03	0,63	-25,96	O
30 dias	286,80	0,65	-24,70	O
45 dias	227,90	0,62	-25,93	O
60 dias	257,32	0,55	-26,61	O

*O: opalescente

Fonte: Própria autora

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, pode-se observar que houve alteração no DHM, IPD e PZ em relação às amostras sem CUR o que é esperado, sugerindo uma provável incorporação de CUR. Além disso, observou-se um PZ adequado durante os 60 dias demonstrando que o sistema tem estabilidade coloidal.

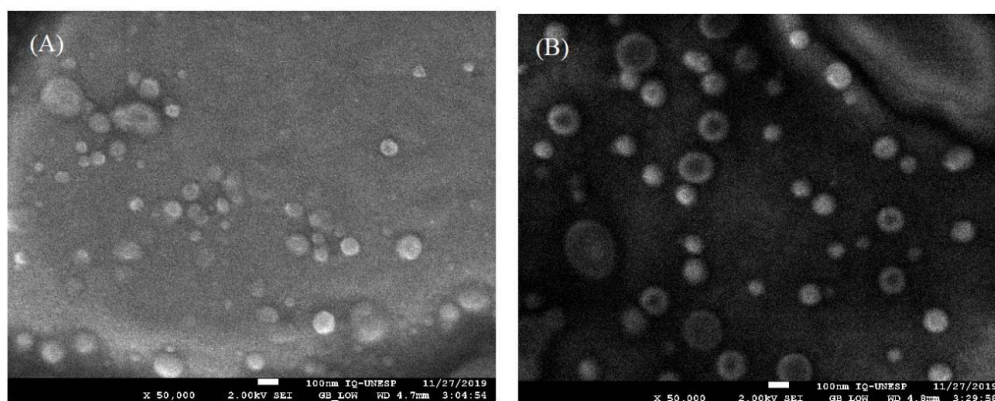
11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

A análise de MEV foi realizada com a intenção de observar a morfologia das NPs antes e após a incorporação do fármaco. As amostras analisadas foram (A) NP controle com

proporção 0,30:1 dos polímeros e (B) NP incorporada com 1 mg mL⁻¹ de CUR em 1% de Tween 80[®] com proporção 0,30:1 dos polímeros.

A Figura 15 ilustra as fotomicrografias das amostras analisadas no aumento de 50.000x.

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura das NPs controle(A) e da NP com o fármaco (B) ambas na proporção 0,30:1 no aumento de 50.000x.



Fonte: Dados da pesquisa.

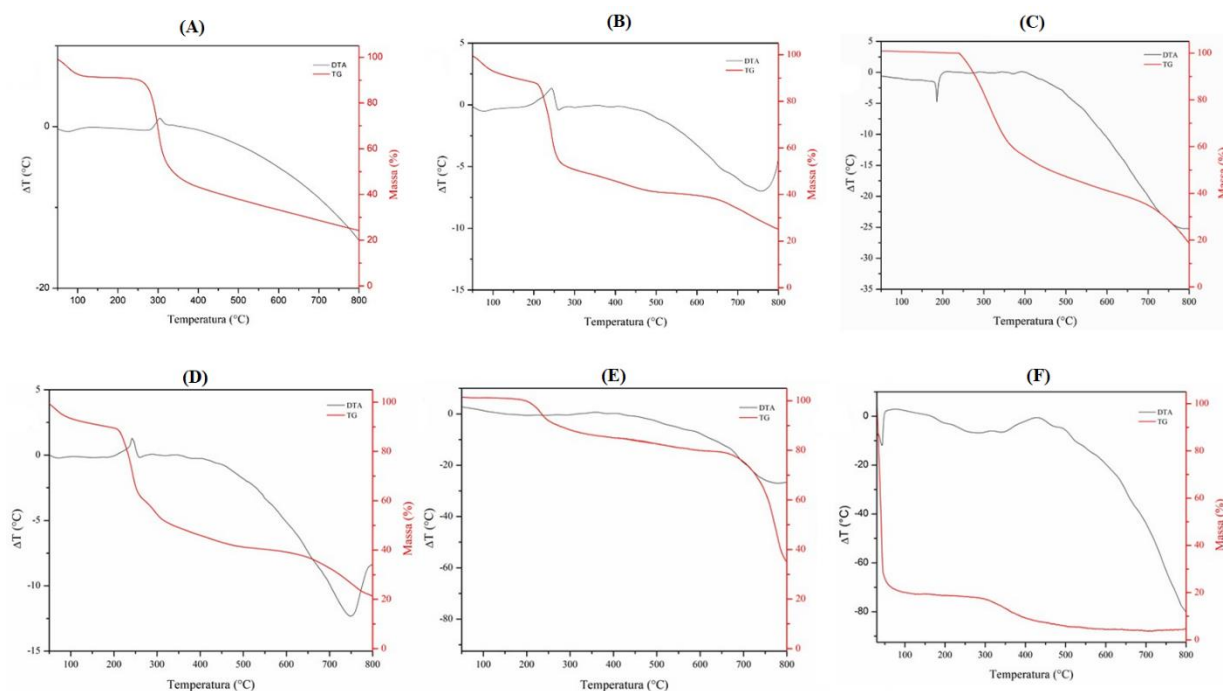
A partir da Figura 15 é possível observar que as NPs obtidas apresentaram forma esférica e distribuíram-se de maneira isolada (não aglomerada) em ambas amostras avaliadas. Nota-se que a incorporação da CUR não alterou a estrutura das partículas, que se manteve esférica e em escala nanométrica.

As fotomicrografias obtidas indicaram valores de diâmetro menores, em torno de 100 nm, do que os obtidos pela técnica de DLS (valor nm). Isto é esperado, pois o DLS mede o diâmetro hidrodinâmico (camada de solvatação) das partículas em suspensão através do movimento Browniano das partículas. Dessa maneira, quando comparado com a técnica de MEV, valores relativamente diferentes podem ser encontrados, pois a amostra não é lida em suspensão, e sim após processo de secagem, conduzindo a valores reduzidos (NOMURA, 2013).

12 Análise térmica

A análise térmica foi realizada para todos os componentes do sistema (QTS, ALG e CUR), para NP formada com fármaco e sem o fármaco e para mistura física. Os termogramas podem ser observados na Figura 16. A termogravimetria (TG/DTA) é um método térmico mais comumente empregado para avaliar a formação de NPs por complexação polieletrólítica.

Figura 16. Termogramas TG/DTA em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min; 10 °C/min⁻¹), obtidas entre 30 e 800 °C para os materiais de partida: (A) QTS; (B) ALG; (C) CUR; (D) mistura física (QTS/ALG/CUR com as mesmas concentrações para obtenção da NP); (E) NP sem CUR, e (F) NP com CUR.



Fonte: Dados da pesquisa.

A curva TG-DTA da QTS (A) indica que o composto sofre perda de massa em três etapas consecutivas. A primeira etapa é atribuída à desidratação, que ocorre entre 30-120 °C (8,35 %), enquanto a segunda etapa que ocorre em 230-470 °C (52,47%) e terceira etapa que

ocorre em 470-800 °C (14,73%) estão relacionadas ao processo lento de pirólise deste polímero (NETO et al., 2005). A curva TG-DTA sugerem que o ALG (B) apresenta um processo de desidratação na região 30-140 °C (9,38%), seguido da decomposição em duas etapas consecutivas entre 140-490 (49,18%) e 490-800 °C com um resíduo final de 25,31% como observado na Figura 15 (SOARES et al., 2004).

A curva TG-DTA da CUR (C) demonstra que sua decomposição térmica ocorre em duas etapas consecutivas entre 225-460 °C (51,23%) e 460-800 °C (23,17%). A amostra sofre fusão em torno de 184 °C, relativa ao primeiro pico endotérmico, seguido da lenta pirólise do material. (GUERRA et al., 2012).

A curva TG-DTA da NP sem o fármaco (E) demonstrou que o composto é estável até 160 °C. Acima dessa temperatura ocorre a perda de massa em duas etapas consecutivas entre 160-450 °C (15,97%) 450-800 (48,01%), podendo ser observados dois picos largos endotérmicos próximos a 206 e 775 °C.

A curva TG-DTA da NP com fármaco (F) apresenta uma perda de massa em duas etapas entre 30-80 °C (79,30%) e 200-700 °C (17,03%), sendo o primeiro evento atribuído a desidratação da amostra . Essa grande perda de massa no início é atribuída a utilização da amostra em suspensão aquosa. Depois, é possível observar um segundo pico endotérmico na região próxima à 300 °C, referente à degradação dos polímeros.

É importante enfatizar que não foi possível observar o pico de fusão da CUR em 184 °C no termograma da NP com o fármaco, sugerindo que a CUR foi molecularmente dispersa quando encapsulada.

13 Validação da Metodologia Analítica por CLAE

13.1 Conformidade do sistema cromatográfico

A conformidade do sistema cromatográfico foi avaliada e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros estudados para avaliar conformidade do sistema cromatográfico empregado para análise de CUR.

INJEÇÕES	TR (tempo de retenção)	Área do Pico	K (fator de capacidade)	AS (assimetria)	FC (fator de cauda)	N (números de pratos teóricos)
1	14	3233,3	3,16	0,96	1,21	11412
2	14	3230,9	3,14	0,96	1,23	11503
3	14	3240,4	3,14	0,96	1,22	11424
4	14	3243,5	3,17	0,96	1,19	11041
5	14	3239,8	3,16	0,96	1,22	11037
6	14	3239,1	3,12	0,96	1,21	11158
Média	14	3237,833	3,15	0,96	1,21	11262,5
DP	0,02	4,75	0,018	0,000	0,014	208,3773
DPR	0,1	0,1	0,6	0,0	1,2	1,9

Fonte: Própria autora

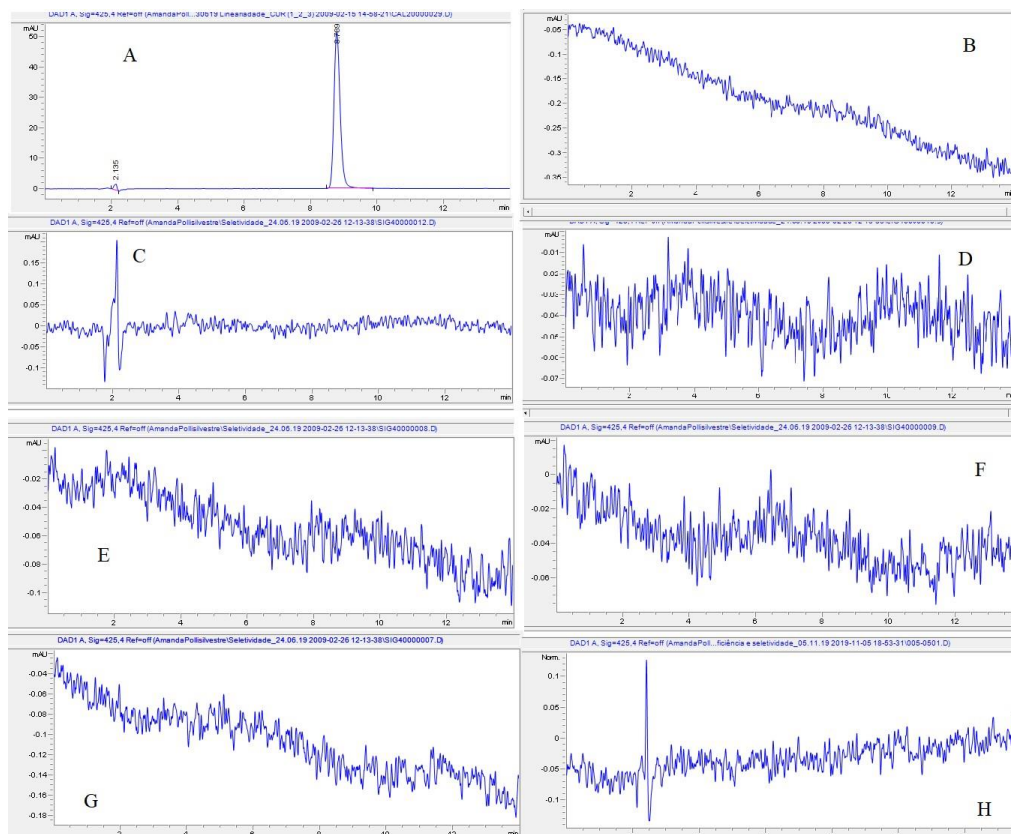
De acordo com a Farmacopéia Americana (2011), o número de pratos da coluna evidencia sua eficiência, sendo adequados valores superiores a 2.000, estando dentro do requerido (11.262,5). Além disso, as médias dos valores de assimetria (0,96) e fator de cauda (1,21) estão abaixo do valor preconizado de 2. Ainda, como mostrado na tabela 7, o fator de capacidade precisa ser maior que 2 e menor que 20, sendo assim de acordo com o preconizado. Verificou-se a precisão nos valores obtidos da área do pico e tempo de retenção, com valor de D.P.R < 5% (USP 34, 2011). Dessa forma, os resultados obtidos demonstraram a confiabilidade do método e do equipamento.

13.2 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método injetaram-se os componentes da fase móvel (água com 2% de ácido acético e acetonitrila) e os componentes da NP, como QTS, ALGe Tween 80®, além da NP livre, sem o fármaco. Todas as amostras foram diluídas para a concentração de 5,0 µg L⁻¹. Os resultados mostraram que tanto os componentes das formulações, quanto os componentes da fase móvel, não interferiram na análise, uma vez que não apresentaram picos cromatográficos coincidentes com o tempo de retenção

específico da CUR, como demonstra a Figura 17 (A-G).

Figura 17. Cromatogramas de (A) CUR, (B) nNPs controles, (C) acetonitrila, (D) água com 2% de ácido acético, (E) ALG, (F) QTS, (G) glicerina e (H) Tween 80®.



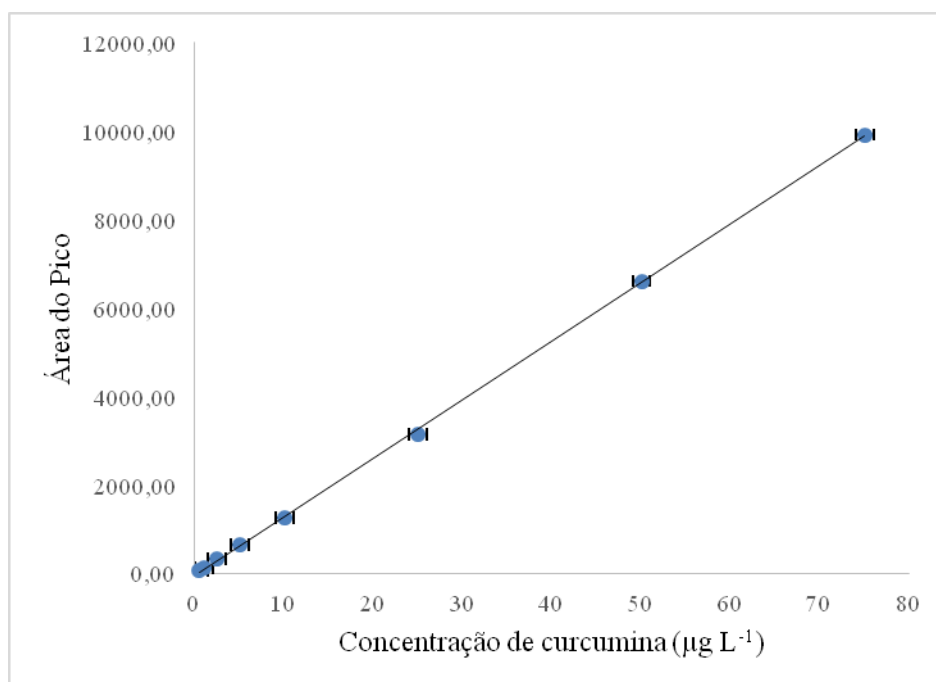
Fonte: Dados da pesquisa.

13.3 Linearidade

Uma curva analítica (área do pico *versus* concentração) de CUR foi construída utilizando solução do analito a 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir de diluições apropriadas da solução estoque de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CUR em triplicata (3n).

Os resultados obtidos na Figura 18 demonstraram relação linear entre a resposta analítica (A) e a concentração de curcumina (C_{cur}), descrita pela equação da reta $A = 132,2444 C_{\text{cur}} - 24,4536$, com um valor de coeficiente de regressão (R^2) de 0,999.

Figura 18. Curva analítica da área do pico *versus* concentração de CUR.



Fonte: Dados da pesquisa.

Realizou-se a análise de variância ANOVA para os dados obtidos a partir da curva analítica da CUR, confirmando que a regressão linear é altamente significativa, a partir dos dados obtidos. Não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo, uma vez que, os valores de F calculados (24.543,30) foram menores do F tabelado (59.874,00) em nível de 95% de confiança.

13.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) indicam a sensibilidade do método analítico. Os valores de LD e de LQ foram calculados a partir das equações descritas nos itens 5.4 e 5.5.

O valor de LD obtido foi de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que significa que é a menor concentração que pode ser detectada, porém não necessariamente, quantificada. Por outro lado, o valor de LQ obtido foi de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Idealmente, os valores de LQ devem corresponder ao valor do primeiro ponto da curva analítica, sendo que nesse caso, o primeiro ponto da curva foi $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando que o método é adequado para determinar concentrações baixas de CUR.

13.5 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos de uma mesma amostra e pode ser expressa de três formas, dentre elas a repetibilidade, a precisão intermediária ou a reprodutibilidade.

13.5.1 Precisão intracorrída

A precisão intracorrída avalia a repetibilidade que determina a precisão dos resultados sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica.

Para avaliação da repetibilidade da metodologia foram calculados DPR para três concentrações como preconizado, dentre elas uma baixa, $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, uma média $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e uma alta de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, como descrito na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de DPR para repetibilidade e precisão inter-dia para a concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Concentração de CUR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Áreas	Médias	Desvio Padrão Relativo (%)
2,5	342,94	349,12	0,94
	350,48		
	349,12		
25	2931,15	2931,15	0,47
	2928,24		
	2953,60		
50	6438,31	6424,43	0,14
	6424,43		
	6422,33		

Fonte: Própria autora

Os resultados obtidos evidenciam que o método em desenvolvimento apresenta uma boa repetibilidade, ou seja, que sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação obteve-se um resultado adequado.

14.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária avalia a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos

Para avaliação da precisão intermediária da metodologia foram calculados DPR para três concentrações como preconizado, dentre elas uma baixa, $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, uma média $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e uma alta de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, como descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de DPR para precisão intermediária para a concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Concentração de CUR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Analista	Dia	Áreas (média)	Padrão Relativo (%)
2,5	1	1	351,95	0,6
2,5	2	2	347,67	
25	1	1	2936,79	0,2
25	2	2	2950,33	
50	1	1	6301,59	2,0
50	2	2	6557,21	

Fonte: Própria autora

A metodologia analítica validada apresentou boa precisão intermediária, expressando valores de 0,2 a 2,0%, mostrando que o método é preciso através da proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos.

14.6 Exatidão

A análise de exatidão é verificada através do ensaio de recuperação que se refere à quantidade de analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (FDA, 1995).

Foram realizadas em concentrações de baixa ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), uma média ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) e uma alta ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de recuperação obtidos para concentrações de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Concentração teórica	Concentração experimental	Recuperação (DPR-%)
$2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$	$2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$	99,86
$25,00 \mu\text{g mL}^{-1}$	$24,51 \mu\text{g mL}^{-1}$	98,04
$50,00 \mu\text{g mL}^{-1}$	$49,34 \mu\text{g mL}^{-1}$	98,68

Fonte: Própria autora

A RDC nº166 de 2017 admite variações na faixa de trabalho entre 80-120%, porém valores próximos a 100% são desejáveis (BRASIL, 2017). Os valores obtidos, conforme mostra a Tabela 7, encontram-se dentro dos limites preconizados, indicando que o método utilizado é exato

14. Eficiência de Encapsulação (EE%)

A EE% retrata a percentagem de CUR incorporada às NPs em relação à quantidade total de CUR acrescentada durante o desenvolvimento das NPs (AHUJA et al., 2010). Para os sistemas desenvolvidos, os valores de EE% estão descritos na Tabela 11 e encontram-se entre aproximadamente 32 e 80%..

Tabela 11. Eficiência de encapsulação (EE%) das NPs em diferentes proporções.

Proporção de Amostra (QTS:ALG)	Eficiência de Encapsulação (média- %)
A- NP (0,05:1)	64,13± 0,04
B- NP (0,10:1)	71,80± 0,60
C- NP (0,30:1)	80,23± 0,16
D- NP (0,40:1)	42,53± 0,66
E- NP (0,50:1)	33,17± 0,57
F- NP (1:1)	32,91± 0,92

Fonte: Própria autora

Todas as proporções de amostras foram acrescidas de 1 mg mL^{-1} de CUR e obtidas nas mesmas condições em triplicata (3n). Nota-se pela Tabela 11 que conforme a proporção de QTS foi aumentada (A até C), houve um maior aumento de EE% até uma proporção limite (0,30:1) (qual?). Contudo, acima dessa concentração de QTS (D até F), observou-sea diminuição da EE%. Este comportamento pode estar relacionado com a menor quantidade de sítios ativos do ALG (poliânion) para interação eletrostática com a CUR (carga positiva no pH experimental) devido à sua complexação polieletrólítica com uma maior quantidade de moléculas de QTS.

Os valores de EE% encontrados foram superiores aos da literatura, como por exemplo no trabalho de Bhunchu e colaboradores (2015) em estudo com NPs de QTS e ALG, em que valores de 33,2% a 54,9 % de incorporação de CUR foram alcançados (BHUNCHU; ROJSITTHISAK; ROJSITTHISAK, 2015).

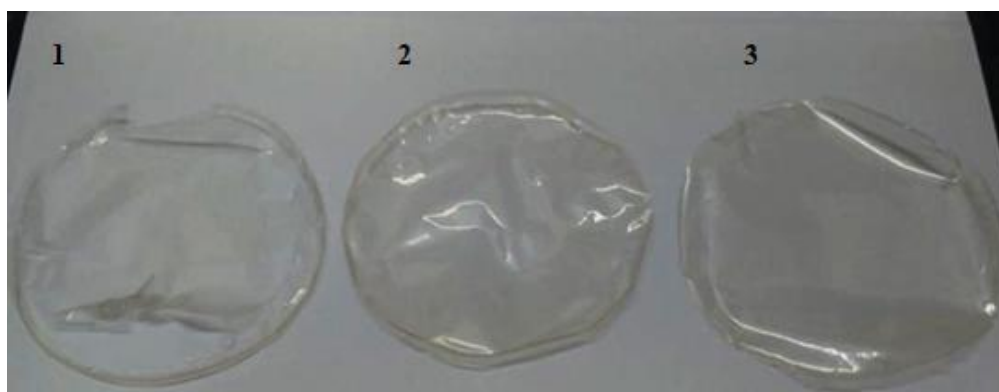
Valores semelhantes de EE% foram relatados por Sorasitthiyanukarn e coautores (2018) para NPs de QTS e ALG, onde os valores de EE% situaram-se entre 28,2% e 78,2% na incorporação de CUR (SORASITTHIYANUKARN et al., 2018).

16. Preparação dos Filmes

Os FA foram obtidos pela técnica de solvente casting através de diferentes concentrações-teste de ALG. A Figura 19 ilustra um teste preliminar para designar a melhor concentração para preparação dos filmes. Foi possível observar apenas de forma visual,

filmes com texturas diferentes. Como visto, o filme 1, obtido com 1% de ALG apresentou estrutura mais friável, provavelmente devido à menor massa de polímero depositada na placa após a evaporação do solvente, conduzindo à construção de uma rede polimérica mais frouxa. Já os filmes 2 e 3, contendo 2,0% e 2,5% de ALG, respectivamente, mostraram-se menos friáveis, além de apresentarem maior flexibilidade, pois apresentavam movimento maleável.

Figura 19. FA obtidos através de concentrações diferentes de ALG, sendo (1) 1,0%, (2) 2,0% e (3) 2,5%.



Fonte: Dados da pesquisa.

15. Caracterização dos Filmes

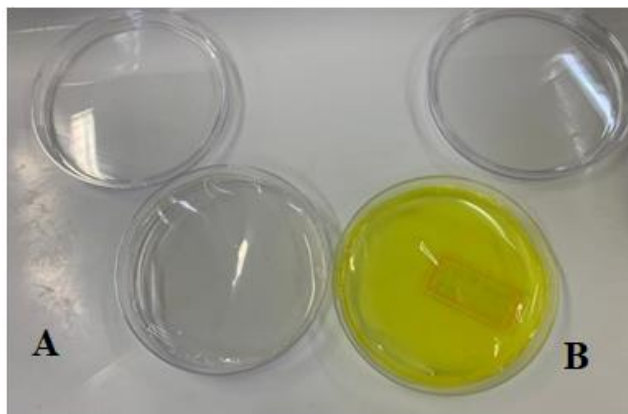
15.1 Análise Macroscópica

A análise macroscópica teve como objetivo determinar visualmente se os filmes obtidos eram homogêneos, translúcidos, maleáveis se havia presença de bolhas ou fissuras os quais são considerados imperfeições facilitadores da liberação prematura do fármaco.

Como pode ser observado na Figura 20, os filmes controle se mostraram homogêneos, transparentes, fáceis de manusear, sem a presença de bolhas ou fissuras, com uma superfície lisa. A adição de diferentes proporções de NPs não alterou as características macroscópicas dos filmes, exceto a coloração, a qual foi alterada principalmente devido ao

pigmento amarelo da CUR. A adição de CUR produziu filmes amarelos translúcidos, porém um pouco mais opacos que o controle.

Figura 20. Filmes de alginato de sódio controle (A) e filmes de alginato de sódio contendo NP com curcumina (B).



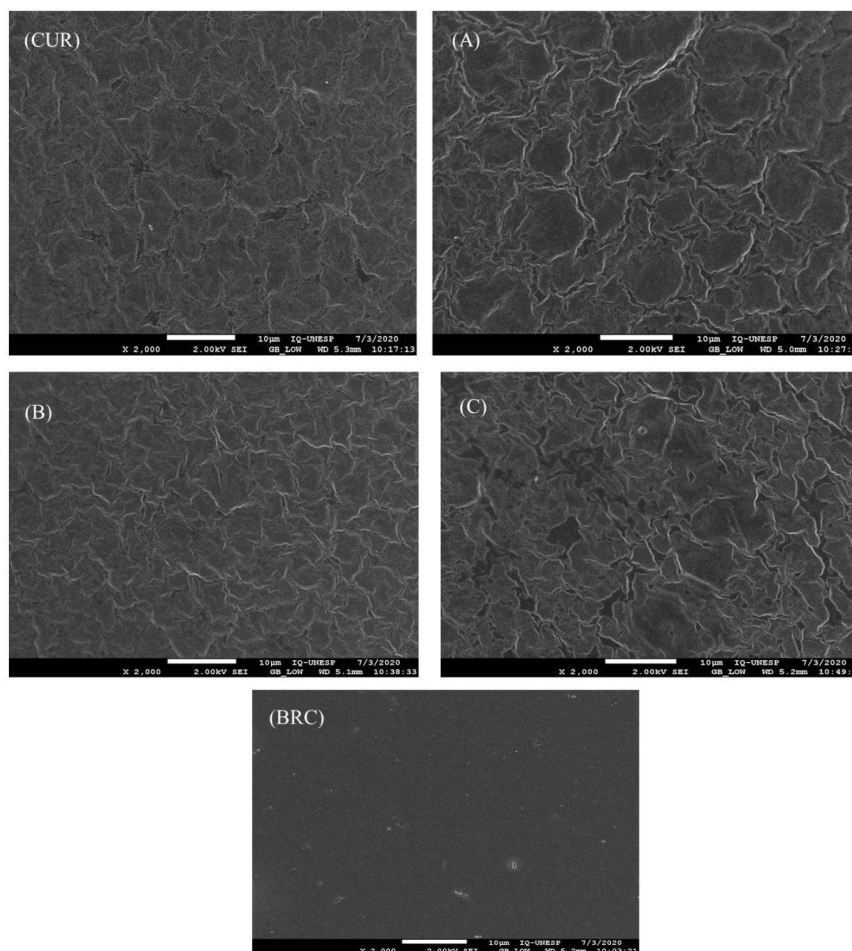
Fonte: Dados da pesquisa.

15.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

A microscopia eletrônica de varredura é uma importante análise, pois fornece imagens detalhadas das superfícies dos filmes e seções transversais e alterações estruturais não vistas a olho nu, permitindo uma avaliação qualitativa da morfologia dos filmes (FREIRE et al., 2009).

A Figura 21 ilustra as fotomicrografias obtidas por MEV-FEG da superfície dos filmes testados.

Figura 21. Fotomicrografias de superfície dos filmes BRC- Branco, A – filme com incorporação de NP a 0,05:1, B – filme com incorporação de NP a 0,10:1, C – filme com incorporação de NP a 0,30:1 e filme com CUR em solução (CUR) no aumento de 2.000x.



Fonte: Dados da pesquisa.

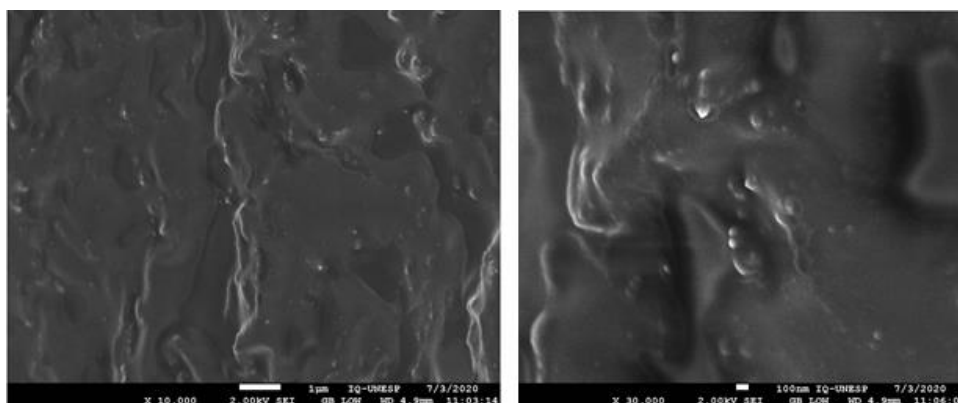
Como pode ser observado, todos os filmes apresentaram estruturas semelhantes em forma de escamas, exceto o branco. Isto pode ser atribuído ao método de obtenção dos filmes por evaporação do solvente, em que diferentes velocidades de evaporação do solvente podem ocorrer nos pontos distintos da placa de Pétri, principalmente devido à interferência das NPs na evaporação de água nos locais em que estão distribuídas, levando à formação de estruturas irregulares (KHUNAWATTANAKUL et al., 2011).

Vale ressaltar ainda que os filmes não apresentaram fissuras ou poros em suas superfícies, e isto pode ser atribuído à plastificação adequada realizada como o plastificante

glicerina à 10 % (GHANBARZADEH et al., 2007), além da construção de uma rede polimérica rígida e estruturada.

A fotomicrografia ilustrada na Figura 22 mostra a seção transversal do filme incorporado com NP na proporção 0,30:1 (C), em que observa-se a distribuição uniforme das NPs e sua forma esférica.

Figura 22. Fotomicrografias da seção transversal do filme C – filme com incorporação de NP a 0,30:1 no aumento de 10.000x e 30.000x.



Fonte: Dados da pesquisa.

15.3 Determinação da espessura dos filmes

O conhecimento e a padronização da espessura de filmes poliméricos é um parâmetro de grande importância no desenvolvimento desses sistemas, já que a espessura está diretamente relacionada com outras propriedades físicas, influenciando principalmente as propriedades mecânicas, de barreira e a cinética de liberação dos filmes. Quando controlada, permite a uniformidade do material e a validade das comparações entre suas propriedades (NAIR et al., 2013).

Tabela 12. Espessura dos filmes

Filmes	Espessura (mm)
A	0,024* $\pm$ 0,0010
B	0,021* $\pm$ 0,0004
C	0,025* $\pm$ 0,0014
Controle	0,042 $\pm$ 0,0004
CUR	0,028* $\pm$ 0,0004

Média $\pm$ desvio padrão (5 repetições).

* representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através da ANOVA one-way seguida de pós teste Tukey.

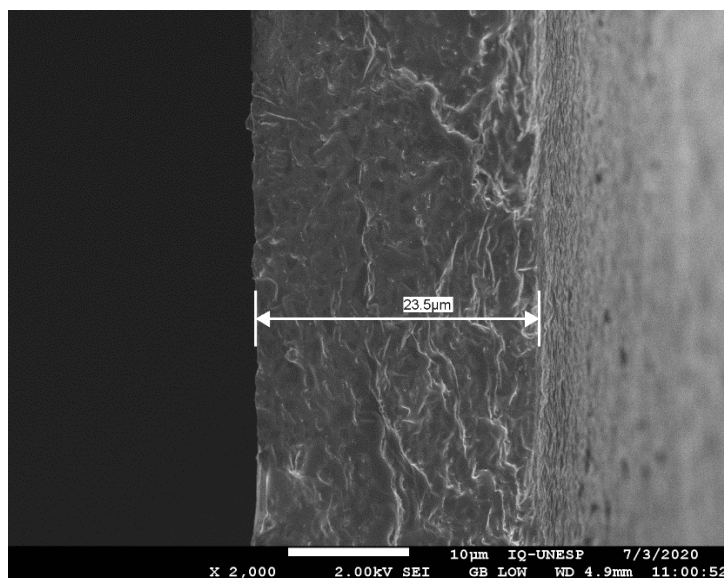
Fonte: Própria autora

Como pode ser observado na Tabela 12, os filmes desenvolvidos apresentaram espessura adequada entre 0,024 e 0,042 mm. Dados da literatura demonstram que filmes com espessuras menores que 0,05 mm melhoraram a adesão do paciente já que se moldam de maneira mais adequada às superfícies e orifícios corporais e tendem a ser mais mucoadesivos (MORALES; MCCONVILLE, 2011). Alguns estudos também obtiveram dados semelhantes a este trabalho, Dou et al. (2018) desenvolveram filmes de ALG e verificaram espessuras semelhantes de 0,03 mm e Marrón e colaboradores (2013) obtiveram espessuras de 0,02 até 3 mm (DOU et al., 2018; RANGEL-MARRÓN et al. 2013).

Entre os FA desenvolvidos nesse trabalho, foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com a amostra controle (maior espessura), porém não foram observadas diferenças entre as réplicas e entre as amostras A, B, C e CUR. Esse comportamento pode ser resultado da interação de ambos CUR e NPs com o ALG, levando à construção de estruturas mais compactas e, conseqüentemente, menos espessas.

Cabe salientar que a análise de espessura pelo micrômetro pode ser considerada efetiva para amostra C (25,0 μm) e corrobora as medidas de espessuras feitas pela análise de MEV, no qual obteve-se valor de 23,5 μm para Amostra C, como ilustrado na Figura 23.

Figura 23. Fotomicrografia do filme com amostra C indicando sua espessura determinada pela seção transversal por MEV-FEG no aumento de 2.000x.



Fonte: Dados da pesquisa.

15.4 Propriedades mecânicas dos filmes

Os filmes para administração bucal devem possuir resistência mecânica adequada para suportar o manuseio sem serem danificados. Com isso, a resistência mecânica é um requisito importante para garantir sua produção, embalagem, armazenamento, transporte e administração. Vários fatores influenciam as propriedades mecânicas, como os polímeros utilizados e suas concentrações, concentração do plastificante, tipo de solvente, espessura dos filmes, processo de fabricação, quantidade de fármaco incorporada, entre outros (PREIS; WOERTZ; KLEINEBUDDE, 2013).

As propriedades mecânicas dos filmes também dependem da natureza do material filmogênico utilizado e da coesão envolvida na estruturação da matriz polimérica. A coesão está relacionada com a aptidão do polímero para formar ligações fortes e/ou numerosas entre as cadeias poliméricas, que dificulta sua separação, quando submetidas à forças mecânicas (GONTARD et al., 1993). As propriedades mecânicas dos filmes estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13. Propriedades mecânicas de filmes de ALG (média $\pm$ DP, n = 3).

Filmes	Rp* (N/m ²)	Ap* (%)	Ep* (N/m ²)
A	12,97 $\pm$ 2,18 ^a	3,95 $\pm$ 0,72	17,05 $\pm$ 3,37
B	33,70 $\pm$ 4,13	4,41 $\pm$ 1,60	49,70 $\pm$ 10,92 ^a
C	19,30 $\pm$ 2,82	2,88 $\pm$ 0,48	28,05 $\pm$ 3,24
Controle	27,05 $\pm$ 3,75	6,47 $\pm$ 0,83	20,09 $\pm$ 7,45
CUR	32,31 $\pm$ 1,75	11,04 $\pm$ 3,03 ^a	36,10 $\pm$ 1,90

*Rp: Resistência à perfuração; *Ap: Alongamento durante a perfuração; *Ep: Energia de perfuração.

^arepresentam diferenças significativas (p<0,05) entre as médias obtidas através da ANOVA one-way seguida de pós teste Tukey.

Fonte: Própria autora

Como pode ser observado na Tabela 13, todas as amostras mostraram valores adequados de resistência mecânica e nota-se que a incorporação de NPs e solução de CUR não mostrou diferença significativa com o controle (27,05 $\pm$ 3,75 N/m²), exceto na amostra A (12,97 $\pm$ 2,18 N/m²). Isto pode ser atribuído ao fato da amostra A conter NPs com menor proporção de QTS comparado com as outras amostras, em que o rearranjo estrutural pode ter sido comprometido, já que a interação eletrostática entre as cadeias poliméricas de QTS e ALG formam um filme altamente organizado e com arranjo estrutural bem estabelecido (WANG et al., 2019).

Por outro lado, o alongamento é usualmente medido anteriormente ao ponto de ruptura do material, sendo expressa como a diferença percentual entre o comprimento inicial até o momento da ruptura proporcionando o alongamento do material. O alongamento é um dado importante e pode sugerir a flexibilidade do material (ROBERTSON, 1993).

Na tabela 13, nota-se que todas as amostras obtiveram um alongamento percentual adequado, variando entre 2,88 e 11,04%. Apesar do filme obtido com a solução de CUR ter apresentado alongamento maior (11,04%) que do filme controle (6,47 %), todos os filmes obtidos através da incorporação da NPs apresentaram excelentes valores para esse

parâmetro, além de não terem diferença significativa em comparação com o controle ($p>0,05$).

15.5 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

A PVA avalia a capacidade de barreira do material contra a permeação de vapor de água. Essa análise é de grande importância, uma vez que os filmes devem proteger o fármaco incorporado na matriz polimérica contra uma série de fatores externos, como a umidade, principalmente para aqueles fármacos que sofrem hidrólise (MENEGUIN et al., 2014). A umidade incorporada em filmes poliméricos também deve ser evitada, já que a água também atua como um plastificante alterando as propriedades mecânicas.

Os dados de PVA estão apresentados na Tabela 14. Considerando os resultados apresentados, verificou-se que os filmes contendo as NPs apresentaram excelentes propriedades de barreira ($3,38 - 4,15 \times 10^{-6} \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) quando comparados com o filme controle ($6,27 \times 10^{-6} \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$). Macromoléculas altamente polares, como os polissacarídeos, contêm grupos hidrofílicos, resultando em filmes com alta permeabilidade ao vapor d'água. Como, por exemplo, o ALG possui grupos funcionais das macromoléculas polares que interagem com a água através de pontes de hidrogênio, resultando na adsorção de água. Assim, os altos coeficientes de solubilidade e absorção em água (rompimento de interações intermoleculares que leva a um aumento do coeficiente de difusão) são responsáveis pelas altas taxas de PVA (McHUGH e KROCHTA, 1994). Por conta disso, o filme livre contendo apenas ALG e glicerina apresentou maior PVA.

A PVA diminuiu devido à incorporação de NPs com CUR e CUR livre em solução, mostrando um excelente perfil de barreira ao vapor d'água. Este resultado condiz com o esperado, pois acredita-se que o caráter hidrofóbico da CUR evita que as moléculas de água permeiem o material e isso também pode estar relacionado ao arranjo estrutural bem

estabelecido, o que dificulta a passagem das moléculas de água através da matriz (RHIM, 2004; WANG et al., 2019).

Ghasemlou et al. (2013) e Ashwar et al. (2015) também desenvolveram filmes de polissacarídeos e tiveram uma redução na PVA com incorporação de compostos hidrofóbicos. Assim a adição de compostos hidrofóbicos em filmes hidrofílicos é comum para melhoria da propriedade de barreira ao vapor d'água (FERNÁNDEZ et al., 2007).

16.6 Determinação do perfil de absorção de líquidos

A absorção de líquidos é um parâmetro que mostra o perfil de hidratação dos filmes e desempenha um papel significativo nas propriedades mucoadesivas. Isto porque, tal hidratação ocorre quando as moléculas do solvente penetram na matriz polimérica a partir de seus grupos hidrofílicos, vindo a ocupar posteriormente regiões do interstício da rede polimérica, podendo causar a dissolução ou desintegração dos filmes à medida que aumenta o volume de água entre as cadeias do polímero (ASSIS, 2003). Outro aspecto muito Assim, a análise de absorção de líquidos está diretamente relacionada à mucoadesividade, uma vez que o estabelecimento das interações mucoadesivas inicia-se através da hidratação do sistema, promovendo relaxamento das cadeias poliméricas para interação com a mucina, principal proteína do muco (PREIS; WOERTZ; KLEINEBUDDE, 2013).

Baseado neste contexto, a Tabela 14 mostra a porcentagem de absorção de líquido em 30 minutos de ensaio utilizando o filme em contato com o meio de saliva simulada.

Observando os dados apresentados na Tabela 14, a Amostra C teve a maior absorção ($454 \pm 2,81\%$), o que também pode ser corroborado com o maior PVA desta amostra, revelando seu maior caráter hidrofílico. Por outro lado, a Amostra B teve a menor absorção ($373 \pm 2,85\%$) e menor PVA. O filme controle (apenas ALG e glicerina) mostrou uma maior porcentagem de absorção de líquidos ($491 \pm 1,91\%$), isto pode ser atribuído também a característica hidrofílica do ALG, que permite uma maior interação entre a água e os grupos hidrofílicos presentes em sua estrutura (NAIR et al., 2013). Nota-se também que a

presença de nanopartículas e a solução de curcumina pareceu reduzir a absorção de líquidos dos filmes.

15.6 Mucoadesão

O processo de mucoadesão geralmente ocorre em duas fases: na primeira, denominada fase de contato, ocorre o contato íntimo entre o polímero mucoadesivo e a camada de muco, resultando no intumescimento do polímero pela transferência de água da camada de muco; na segunda, chamada de fase de consolidação, as cadeias poliméricas adquirem maior mobilidade para poder se interpenetrar nas cadeias glicoproteicas do muco, a mucina. O posterior estabelecimento de ligações químicas entre o polímero e o muco contribui para a consolidação do fenômeno mucoadesivo (CARVALHO et al., 2010; CARVALHO et al., 2014). Os valores de força mucoadesiva obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Permeabilidade ao vapor de água (PVA), absorção de líquidos e força mucoadesiva (FMA) (N) de filmes de alginato de sódio.

Filmes	PVA* (x 10 ⁻⁶ g mm m ⁻² h ⁻¹ Pa ⁻¹)	Absorção de líquidos (%)	Mucoadesão (N)
A	4,08 ± 1,08 ^a	450 ± 1,89	3,39 ± 0,36
B	3,38 ± 1,52 ^a	373 ± 2,85 ^a	4,01 ± 0,04
C	4,15 ± 1,85 ^a	454 ± 2,81	3,79 ± 0,33
Controle	6,27 ± 1,26	491 ± 1,91	3,36 ± 0,26
CUR	4,69 ± 1,81 ^a	317 ± 2,05 ^a	3,70 ± 0,61

* Permeabilidade ao vapor d'água.

^arepresentam diferenças significativas (p>0,05) entre as médias obtidas através da ANOVA one-way seguida de teste pós Tukey.

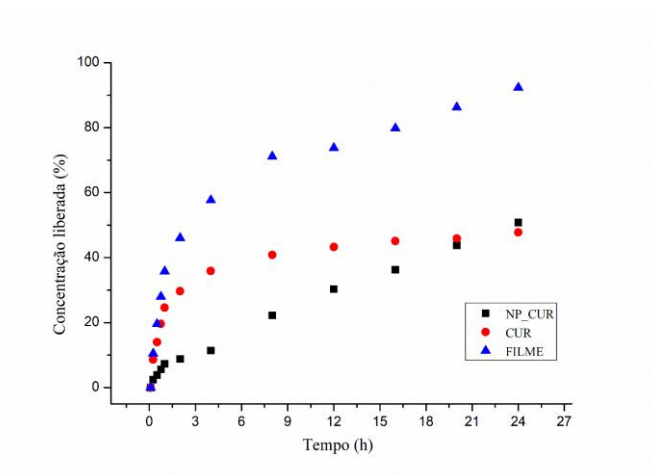
Fonte: Própria autora

Como pode-se observar no ensaio de mucoadesão (Tabela 14) não houve diferenças significativas para as amostras. Todas amostras testadas mostraram alta força de destacamento, conferindo boas propriedades mucoadesivas. Isto acontece devido às propriedades do ALG, o qual após expor seus grupos hidrofílicos, permite uma interpenetração adequada entre suas cadeias e as cadeias poliméricas da mucina, formando interações físico-químicas que consolidam e fortalecem a ligação mucoadesiva. Além disso, a hidratação do filme permitiu o estabelecimento de um contato íntimo (força aplicada (0,5N)) entre o filme pré-hidratado e o disco de mucina (DIAS et al., 2007; CARVALHO et al., 2014).

16. Ensaio de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi testado em saliva simulada (pH 6) conduzido sob condições sink, e avaliou-se a formulação final (FA/NP-CUR), NP-CUR e solução de CUR. O perfil de liberação pode ser verificado na Figura 24. Para a formulação FA/NP-CUR, houve aproximadamente 92% de liberação de CUR em 24 horas. Por outro lado, a partir das NP- CUR e CUR livre, foi observado uma liberação de aproximadamente 50% em 24 horas.

Figura 24. Perfil de liberação *in vitro* (%) da CUR a partir do sistema final FA/NP-CUR, NP_CUR e CUR livre pelo período de 24 horas.



Fonte: Dados da pesquisa

Essa diferença nas taxas de CUR liberada pode estar relacionada à liberação prematura da CUR a partir das NPs durante a produção dos filmes poliméricos, os quais envolvem etapas prévias de mistura dos polímeros e NPs, além de uma etapa de secagem relativamente longa devido à utilização de água como solvente, a qual requer mais de 12h em estufa com circulação forçada de ar para sua evaporação). Assim, acredita-se que uma porcentagem maior de CUR livre pode estar presente nos filmes de alginato em relação às nanoencapsuladas, conduzindo à maior liberação.

Os trabalhos na literatura mostram perfil de liberação semelhante para amostra de NP_CUR. O estudo de Peñaranda (2017) foi desenvolver nanopartículas de QTS e ALG incorporadas com CUR e testar a liberação in vitro em duas condições de pH (7,4 e 2,0). Os autores observaram uma liberação mais prolongada em pH neutro e mais acelerada alta em pH ácido. Paiva (2015) também desenvolveu NP incorporadas com CUR e observou o mesmo, atribuindo este efeito ao pH. Sorasitthiyankarn et al. (2017) também prepararam NPs de QTS e ALG incorporadas com CUR e realizaram ensaio de liberação in vitro em três valores de pH (1,2; 6,8 e 7,4). Foram encontrados valores de 44-60% de liberação de CUR nos meios com pH próximos ao neutro após 24h e valores mais altos (75%) em meio ácido (pH 1,2), o que foi atribuído ao pH do meio e a alta solubilidade da QTS em soluções acidificadas.

O trabalho de Das et al. (2015) mostrou um perfil de liberação semelhante ao encontrado neste trabalho. Os autores prepararam NPs de QTS e ALG com CUR e analisaram por 24h o perfil de liberação em tampão fosfato pH 7,4. Nas primeiras 12 horas, apenas 36% da CUR foi liberada das NPS, tendo as taxas de liberação aumentado até 51% em 24 horas. Além disso, também prevaleceu o um transporte não-Fickiano ou anômalo (DAS et. al, 2015).

Tem-se desenvolvido modelos matemáticos que contribuem para determinar o tipo de mecanismo de liberação predominante. Existem atualmente diversos modelos matemáticos como, por exemplo, Korsmeyer-Peppas, Weibull, Higuchi, Primeira Ordem e entre outros (COSTA et al, 2002; LOPES, 2005).

A liberação do fármaco em NS pode ser controlada pela difusão, grau de intumescimento, erosão ou estímulos externos, como pH, temperatura e presença de biomoléculas (BIZERRA e SILVA, 2016). Nos sistemas controlados pela difusão, a liberação do fármaco é regida por um gradiente de concentração e baseada na Lei de Fick de difusão. Já nos sistemas controlados pelo intumescimento, o aumento da flexibilidade das cadeias do polímero durante e após a absorção de fluidos produz maiores volumes livres, expansão da rede e melhora da mobilidade das moléculas do fármaco e a difusão. No processo de erosão, normalmente a liberação é controlada por mecanismos físicos de transporte de massa e por reações químicas de degradação. Por fim, nos sistemas controlados por estímulos (*smart systems*), a liberação ocorre somente após a ativação do material através de um mecanismo específico (BIZERRA e SILVA, 2016).

Neste trabalho, foram aplicados aos perfis de liberação os modelos matemáticos de Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (Tabela 15). O modelo de Korsmeyer-Peppas mostrou índice de correlação (R^2) adequado (índices menores que 0,9 não são indicados) e maior predominância da cinética de liberação baseado na Lei das Potências, o qual deve ser aplicado aos dados dos primeiros 60% de liberação, estabelecendo uma relação exponencial entre a liberação do fármaco com o tempo através da equação 13:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad \text{Equação 13}$$

onde M_t/M_∞ representa a fração do soluto liberado no tempo t , k é uma constante de velocidade e n é o coeficiente difusional, cujo valor depende da geometria da partícula e fornece informações sobre o mecanismo de liberação de agentes ativos a partir de matriz

polimérica (KORSMEYER et al. 1983).

Tabela 15. Parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do fármaco para as amostras testadas.

Amostras	Modelos Matemáticos								
	Primeira Ordem			Higuchi			Korsmeier-Peppas		
	R ²	k	n	R ²	k	n	R ²	k	n
NP_CUR	0,9841;	0,0290;	-	0,9784;	10,60	-	0,9873;	6,15	0,6373
FA/NP-CUR	0,8367;	0,1626;	-	0,8873;	21,17	-	0,9128;	29,45	0,6070
CUR_LIVRE	0,1490;	0,035;	-	0,7086;	11,91	-	0,8927;	19,33	0,3288

Fonte: Própria autora

Tabela 16. Relação entre o expoente difusional n e mecanismo de liberação para os diferentes sistemas de liberação.

Expoente difusional, n			Mecanismo de liberação
Filmes	Cilindros	Esferas	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo (não Fickiano)
1,0	0,89	0,85	Caso II de transporte
$> 1,0$	$> 0,89$	$> 0,85$	Super Caso II de transporte

Fonte: KORSMEYER et al. 1983

Como observado na Tabela 15 e 16, na amostra de NP_CUR foi encontrado um R² de 0,9873 para o modelo matemático de Kormeyer-Peppas, valor de k de 6,15, e valor de n de 0,63, o qual indica transporte não- Fickiano ou anômalo (quando o coeficiente se encontra entre $0,43 < n < 0,85$ para esferas). Neste tipo de transporte de fármacos ocorre a superposição de dois fenômenos, sendo que a liberação é controlada pela difusão e intumescimento, simultaneamente (KORSMEYER et al. 1983).

O mesmo aconteceu para amostra FA/NP_CUR onde foi determinado um R² de 0,9129 para o mesmo modelo, valor de k de 29,45, e n com valor de 0,60 que indica, um transporte não- Fickiano ou anômalo (quando o coeficiente se encontra entre $0,5 < n < 1,0$ para filmes), ocorrendo a superposição dos dois fenômenos difusão e intumescimento, como

explanado anteriormente. Nota-se que a constante de velocidade liberação da curcumina (k) foi maior para a formulação com os filmes quando comparada com as NPs o que resultou em perfis diferentes de porcentagem liberada *versus* tempo (KORSMEYER et al. 1983).

17. Ensaios Microbiológicos

Para os ensaios microbiológicos foram escolhidas e testadas as amostras de NP com maior incorporação de CUR na proporção de 0,30:1 (QTS:ALG). Foram selecionados os filmes nos quais incorporou-se a proporção 0,30:1 de NP. A CUR em solução foi incorporada no filme na mesma concentração incorporada na NP de 86,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e os testes foram aplicados em *S.mutans* e *C. albicans*.

17.1 *S. mutans*

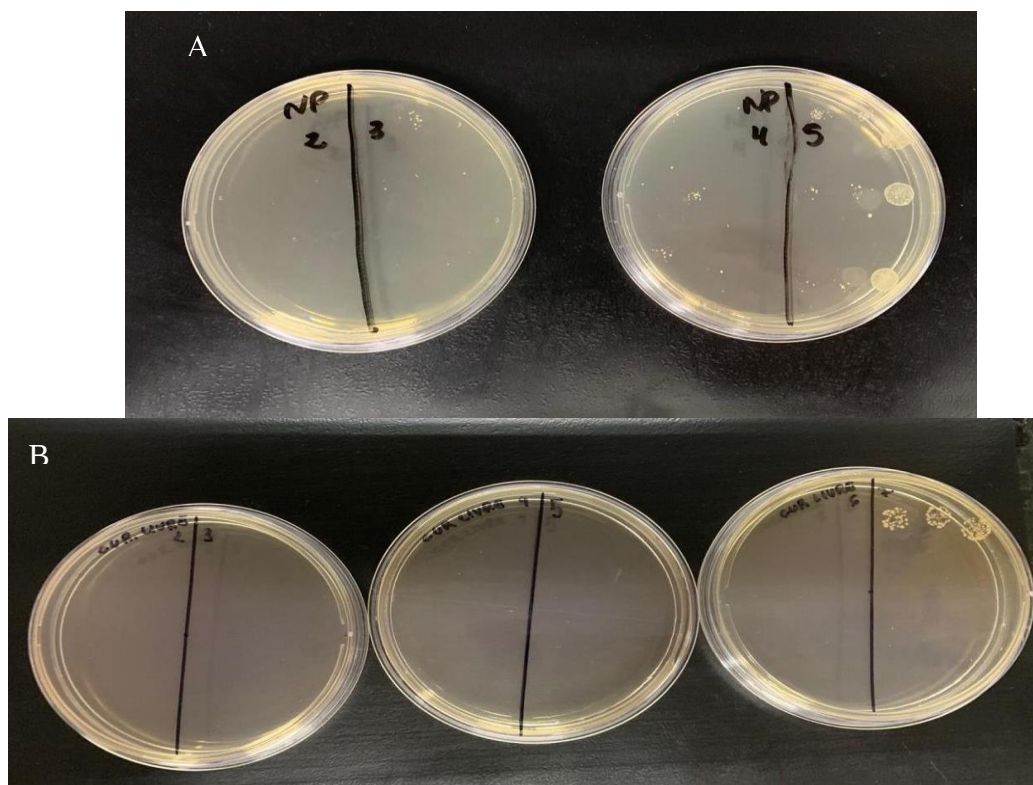
19.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e

Determinação da Concentração Bactericida (CBM)

Os resultados de CIM e CBM foram importantes para determinar se a quantidade de CUR incorporada seria efetiva para matar *S.mutans*. De acordo com a determinação CIM e CBM, a CUR livre e as NP_CUR se mostraram eficazes nas concentrações de 69,6 $\mu\text{g/mL}$ quando comparada à NP_livre nas mesmas concentrações.

Sendo assim, a concentração de CUR livre de 69,6 $\mu\text{g/mL}$ foi eficaz para promover ação bacteriostática (CIM) e ação bactericida (CBM) no valor de 2,175 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, NPs_CUR na concentração de 69,6 $\mu\text{g/mL}$ foram eficazes para promover ação bacteriostática (CIM) e ação bactericida (CBM) no valor de 8,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ilustrado na Figura 25.

Figura 25. Concentração bactericida mínima (CBM) para (A) NPs_CUR e (B) CUR livre.



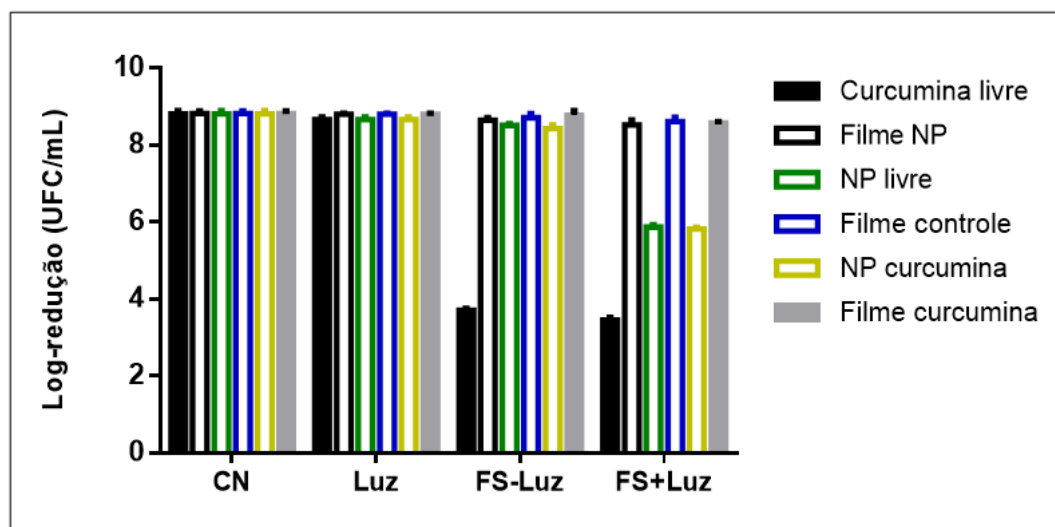
Fonte: Dados da pesquisa.

19.1.2 Avaliação Quantitativa das células bacterianas viáveis dos biofilmes de *S. mutans*

Para avaliação de UFC/mL em biofilmes de *S. mutans* as amostras de CUR livre em solução não houve diferenças entre o tratamento com luz e sem luz como observado na Figura 26 com valores de 3,45 a 3,73 $\log_{10}$ respectivamente.

É interessante ressaltar que obteve maior atividade antimicrobiana, porém é um dado esperado já que a CUR em solução não precisa ser liberada para fornecer atividade, ela está em contato direto com o biofilme pois está em solução.

Figura 26. Gráfico de Log de redução de UFC/mL em biofilme de *S.mutans*



*CN: Controle negativo; LUZ: Controle positivo: se a luz promove atividade sozinha; FS-LUZ: tratamentos sem luz e FS+LUZ: tratamento com luz. (média (n=5) $\pm$ intervalo de confiança (95%). Fonte: Dados da pesquisa.

Em relação aos filmes não se observou diferença significativa entre o tratamento com luz e sem luz com valores de 8,64 e 8,74 $\log_{10}$ respectivamente. Os filmes com NP obtiveram valores parecidos com os filmes controles de 8,52 e 8,65 $\log_{10}$ respectivamente. O filme com a CUR também não mostrou diferenças significativas com valores de 8,58 e 8,84 $\log_{10}$ respectivamente.

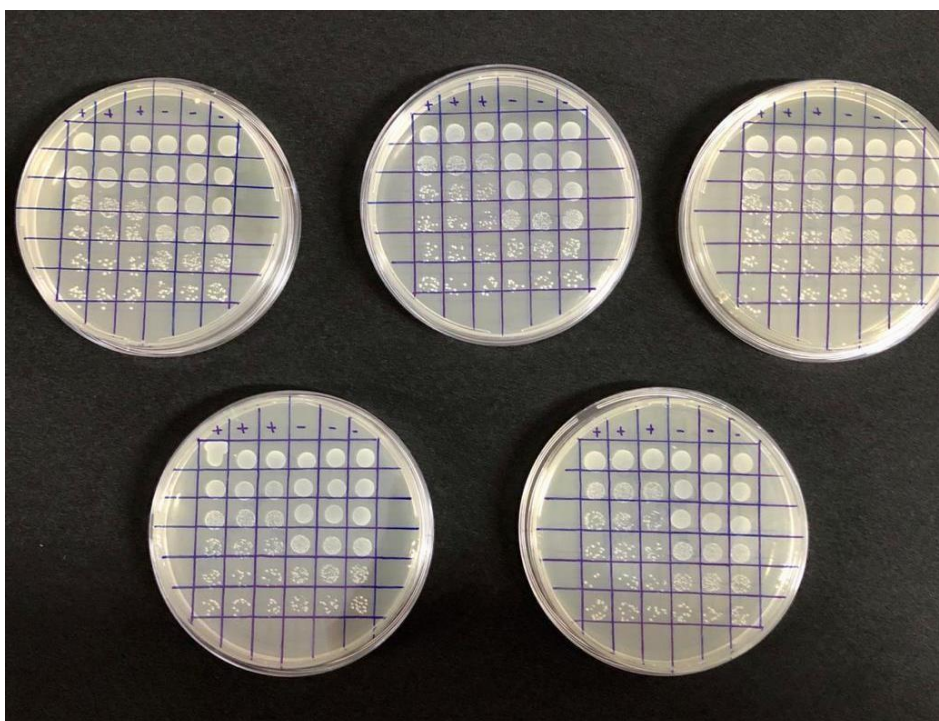
Por outro lado, vale salientar que nas amostras de nanopartículas (NP-livre e NP-CUR) os resultados demonstram-se muito promissores com 3 $\log_{10}$ de redução entre o tratamento com luz e sem luz. Os valores da NP-livre para o tratamento sem luz foram 8,52 $\log_{10}$ e o tratamento com luz resultou em valor de 5,88 $\log_{10}$. Os valores da NP-CUR para o tratamento sem luz foram 8,45 $\log_{10}$ e o tratamento com luz resultou em valor de 5,83 $\log_{10}$ porém, não obtiveram diferenças entre si. A Figura 27 ilustrada a contagem de UFC/mL do grupo NP-CUR onde evidência a redução entre os tratamentos.

Tais considerações apontam que apenas a quitosana esteja promovendo a ação antimicrobiana, devido seus mecanismos antimicrobianos que podem ser definidos em interação com componentes celulares externos, interação com a membrana citoplasmática e

interação com constituintes citoplasmáticos, não de forma exclusiva, uma vez que a inibição microbiana pela quitosana é considerada o resultado de uma sequência de processos moleculares, resultando em vários eventos prejudiciais aleatórios que levam à lise celular (RAAFAT et al., 2009).

Os principais mecanismos são as interações entre suas cargas positivas com as cargas negativas da membrana da bactéria de *S.mutans*. Tal interação causa uma mudança na permeabilidade e nos componentes intercelulares, levando à morte celular (FRADE et al., 2018). Além desse, podem ocorrer hidrólise da parede do microrganismo levando um vazamento intracelular de eletrólitos provocando uma diminuição da pressão interna; Inibição de RNA mensageiro e síntese protéica; Além de quelação de metais e ligações essenciais para o crescimento microbiano e o pH mais ácido pode fornecer maior atividade (RAAFAT et al., 2009).

Figura 27. Contagem de UFC/mL para o grupo NP-CUR demonstrando a redução de 3 log₁₀ de redução entre o tratamento com luz e sem luz.



Fonte: Dados da pesquisa

Apesar da CUR em solução ter maior atividade antimicrobiana, este FS possui várias limitações como, insolúvel em água e que pode sofrer rápida degradação em várias condições (luz, temperatura, oxigênio, condições alcalinas). Apesar de solúvel em etanol e DMSO (dimetilsulfóxido), esses solventes orgânicos apresentam efeitos tóxicos dependendo da concentração utilizada. (ALVES et al., 2018).

Além disso, sua incorporação em formulações farmacêuticas de liberação controlada traz grandes vantagens, pois promove proteção contra fatores externos e maior estabilidade, ação no local alvo e com isso menores efeitos colaterais. Dependendo da matriz polimérica utilizada, possibilita o aumento da solubilidade dos princípios ativos, pode aumentar bioadesão do sistema no tecido alvo (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

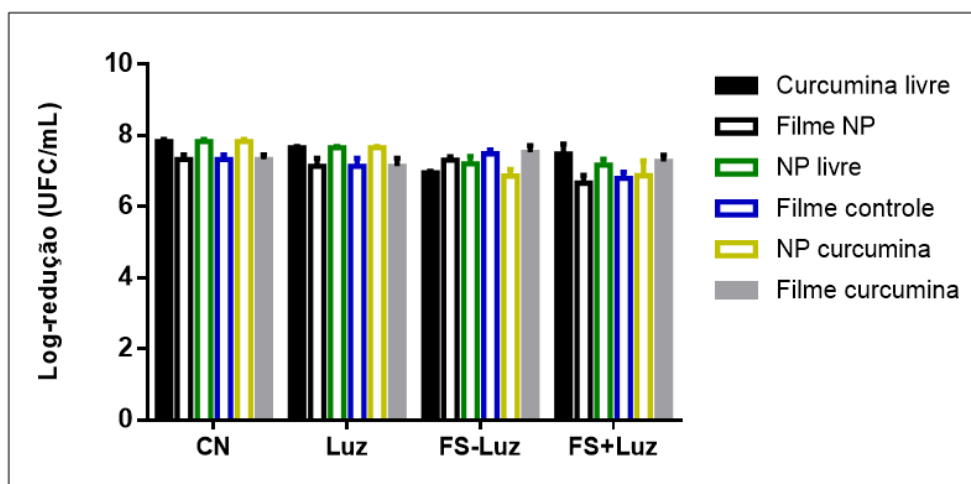
A associação com uma fonte de radiação LED azul levou a uma redução significativa de 3 log UFC/mL. Esses resultados são promissores, pois, níveis de redução iguais ou superiores a 3 log UFC/mL são um dos fatores que predizem se um composto antimicrobiano apresentará significância clínica (PANKEY; SABATH, 2004).

19.2 *C. albicans*

19.2.1 Avaliação Quantitativa das células Fúngicas viáveis dos biofilmes

Para avaliação de UFC/mL em biofilmes de *C. albicans* todas as amostras não mostraram diferença significativas entre o tratamento com luz e sem luz como observado na Figura 28.

Figura 28. Gráfico de Log de redução de UFC/mL em biofilme de *C. albicans*



*CN: Controle negativo; LUZ: Controle positivo: se a luz promove atividade sozinha; FS-LUZ: tratamentos sem luz e FS+LUZ: tratamento com luz. (média (n=5) $\pm$ intervalo de confiança (95%). Fonte: Dados da pesquisa.

Amostras de curcumina livre com tratamento com luz e sem luz apresentaram valores de 6,92 a 7,48 $\log_{10}$ respectivamente. Em relação as amostras filmes com NP-CUR com o tratamento com luz e sem luz com valores de 6,62 e 7,28 $\log_{10}$ respectivamente. O filme controle obteve valores de 6,72 e 7,47 $\log_{10}$ respectivamente. O filme com a curcumina livre também não mostrou diferenças significativas com valores de 7,48 e 7,31 $\log_{10}$ respectivamente.

As amostras de nanopartículas (NP-livre e NP-CUR) demonstraram resultados diferentes entre ambas, porém sem diferença significativa de redução de log entre os tratamentos com luz e sem luz de cada grupo testado. Os valores da NP-livre para o tratamento sem luz foram 7,23 $\log_{10}$ e o tratamento com luz resultou em valor de 7,12 $\log_{10}$. Os valores da NP-CUR para o tratamento sem luz foram 6,90 $\log_{10}$ e o tratamento com luz resultou em valor de 6,82 $\log_{10}$.

Um dos principais desafios dessa associação com a aTFD mediada pela reação do tipo II que acontece em maior proporção e é considerada a principal via de danos às células microbianas gera oxigênio singlete que possui uma vida útil curta em sistemas biológicos e

um raio de ação muito curto levando a uma resposta localizada, em virtude disso, há uma necessidade de maiores tempo de pré-irradiação para que o tempo do FS seja liberado e agir quando irradiado (SCHERER,2017).

Outro ponto que cabe a ser destacado é que apesar de todas as vantagens dos nanossistemas, não está claro se a relação custo-benefício superará os regimes de tratamento comumente utilizados na clínica odontológica. Ainda assim, existe uma escassez na literatura comparando esses tratamentos em ensaios *in vivo*. Entretanto, estudos baseados em nanossistemas associados a aTFD são de suma importância e vão além de tratamento de infecções odontológicas e podem ser aprimoradas para outros biofilmes na área da saúde (BENOIT, 2019).

18. CONCLUSÕES

Considerando todos os resultados apresentados, pode-se concluir que os dois sistemas desenvolvidos (filmes e as nanopartículas poliméricas) apresentaram caracterização e parâmetros adequados de obtenção e eficaz aplicação *in vitro*. Diante disto, é importante lembrar que a concentração da CUR testada é eficiente, contudo, a incorporação no sistema pode retardar o efeito antimicrobiano, pois a maioria dos sistemas nanoestruturados tende a ter uma liberação prolongada, fazendo com que o FS demore mais tempo para ser liberado e, quando irradiado, promover a ação antimicrobiana. Os resultados evidenciam que o sistema proposto (FA/NP_CUR) apresentam boas propriedades mucoadesivas e liberação mais adequada (rápida) para aplicação da aTFD e isto pode ser atribuído ao método de obtenção dos filmes, em comparação com as CUR livre e as NP_CUR, as quais demonstraram liberação prolongada. É interessante ressaltar, que esses resultados podem ser aprimorados com o aumento do tempo de pré irradiação e dose aplicada da aTFD. É importante ainda citar que os resultados apresentados neste trabalho podem ser adaptados para outras aplicações na área odontológica, como através da incorporação das NP_CUR de liberação prolongada em enxaguante bucal como um tratamento preventivo de cáries ou até mesmo para outras áreas da saúde devido as diversas propriedades farmacológicas da curcumina.

Portanto, os resultados sugerem que o sistema desenvolvido associado a terapia fotodinâmica antimicrobiana apresentam um potencial promissor para aplicação no tratamento de biofilmes de *S.mutans* devido a redução de $3\log_{10}$ de UFC/mL do tratamento com luz em comparação com o tratamento sem luz.

REFERÊNCIAS

- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* : chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol.** v. 55, Pt 8, p. 999–1008, 2006.
- AL-SHAMMERY, D. et al. Scope of antimicrobial photodynamic therapy in Orthodontics and related research: A review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, n. February, p. 456–459, 2019.
- ALBERS, V. Archaeal biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, n.11, p. 699-713. 2018. DOI: 10.1038/s41579-018-0058-4.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of dental research**, v. 89, n. 11, p. 1175–86, 25 nov. 2010.
- ALVAREZ, M. G. et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* using bridged polysilsesquioxane films doped with porphyrin. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 13, p. 4032–4039, 2012.
- ALVES, R. C. et al. Critical Reviews in Analytical Chemistry A Critical Review of the Properties and Analytical Methods for the Determination of Curcumin in Biological and Pharmaceutical Matrices. A Critical Review of the Properties and Analytical Methods for the. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 49, n. 2, p.138-149, 2018.
- AURELIO, M. et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 10, n. 3, p. 313-319. 2013.
- ASHWAR, B. A. et al. Rice starch active packaging films loaded with antioxidantsdevelopment and characterization. **Starch**, v. 67, n. 3-4, p. 294–302, 2015. <https://doi.org/10.1002/star.201400193>.
- ASSIS, O. B. G.; VALMIR L. DA, S. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 223–228, 2003.
- AZIZI, A. et al. Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene Blue on streptococcus mutans bacterial colonies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, n. May, p. 203–209, 2019.
- BAPAT, R. A. et al. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 85–98, 2019.
- BENOV, L. Photodynamic therapy: Current status and future directions. **Medical Principles and Practice**, v. 24, n. suppl 1, p. 14–28, 2015.
- BENOIT, D. S. W.; SIMS, K. R.; FRASER, D. Nanoparticles for Oral Biofilm Treatments. **ACS Nano**, v. 13, n. 5, p. 4869–4875, 2019.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente-RESMA**, n. 2, p. 1–12, 2016.

BHUNCHU, S.; ROJSITTHISAK, P.; ROJSITTHISAK, P. Effects of preparation parameters on the characteristics of chitosanealginate nanoparticles containing curcumin diethyl disuccinate. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 28, p. 64–72, 2015.

BOWEN, W. H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. Interactions in Microenvironments. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 229–242, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.008>.

BUCHHAMMER, H. M.; MENDE, M.; OELMANN, M. Formation of mono-sized polyelectrolyte complex dispersions: effects of polymer structure, concentration and mixing conditions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 218, n. 1, p. 151–159, 2003.

CARRERA, E. T. et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: A critical review. **Laser Physics**, v. 26, n. 12, 123001, 2016. <http://dx.doi.org/10.1088/1054-660X/26/12/123001>.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Polimeros**, v. 24, n. 2, p. 203–213, 2014.

CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 1–17, 2010.

CHO, H. et al. Redox-sensitive polymeric nanoparticles for drug delivery. **Chemical Communications**, v. 48, n. 48, p. 6043–6045, 2012.

CHOPRA, M. et al. Design of Curcumin Loaded Polymeric Nanoparticles- Optimization, Formulation and Characterization. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 9, p. 9432–9442, 2016.

CODEVILLA, C. F. et al. Incorporação da curcumina em sistemas nanoestruturados: Revisão Incorporation of curcumin into nanostructured systems: A review. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas - UFSM**, v. 37, p. 151–163, 2015.

COSTA, P. J. C. DA. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141–153, 2002.

COSTA, L. et al. Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. **Antiviral Research**, v. 91, n. 3, p. 278–282, 2011.

DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 153–160, 2010.

DE MELO, W. C. M. A. et al. Photodynamic inactivation of biofilm: Taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 7, p. 669-693, 2013. <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.2013.811861>.

DIAS, H. B. et al. LED and low level laser therapy association in tooth bleaching using a novel low concentration H₂O₂/N-doped TiO₂ bleaching agent. **Laser Physics**, v. 26, n. 1, 015602, 2016. <https://doi.org/10.1088/1054-660X/26/1/015602>.

DIAS, S. et al. A administração na mucosa bucal como uma estratégia alternativa à via oral. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, Porto**, v.4, p. 118-133, 2007. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10284/417>.

DINIZ, I. M. A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: A promise candidate for caries lesions treatment. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 511– 518, 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DOU, L. et al. Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, Part B, p. 1377-1383, Oct. 2018. Doi do artigo: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.121>.

EMMANUEL, S. Predictive in vitro dissolution tools: Application during formulation development. [Dissertação]. University Clermont-Ferrand 1, França, 2010.

EL MAGHRABY, G. M.; ARAFA, M. F. Alginate-chitosan combinations in controlled drug delivery. In: HASNAIN, M.S.; NAYAK, A.K. (ed.). **Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications**. London, UK: Academic Press; Elsevier, 2019. Chapter 15, p. 339-361.

ELIZABETH, P. S.; NÉSTOR, M. M.; DAVID, Q. G. Nanoparticles as dental drug-delivery systems. In: SUBRAMANI, K.; AHMED, W. **Nanobiomaterials in Clinical Dentistry**. 2nd. ed. Amsterdam, Netherlands: elsevier, 2019. Chapter 23, p. 567-593. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815886-9.00023-1>.

ETCHEVERRY, M. E.; PASQUALE, M. A.; GARAVAGLIA, M. Photodynamic therapy of HeLa cell cultures by using LED or laser sources. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 271–277, 2016.

FEKRAZAD, R.; NEJAT, A. H.; KALHORI, K. A. M. Antimicrobial Photodynamic Therapy With Nanoparticles Versus Conventional Photosensitizer in Oral Diseases. In: FICAI, A.; GRUMEZESCU, A.M. **Nanostructures for Antimicrobial Therapy: Micro and Nano Technologies**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017. Chapter 10, p. 237–259. (Nanostructures in Therapeutic Medicine Series). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00010-X>.

FERRAZ, R. C. M. C. et al. Chemiluminescence as a PDT light source for microbial control. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, n. 2, p. 87–92, 2011.

- FERREIRA, D. P. et al. Porphyrin dye into biopolymeric chitosan films for localized photodynamic therapy of cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 160–171, 2016.
- FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals in in vitro performance tests. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 1029–1037, 2017.
- FORSSTEN, S. D.; BJÖRKLUND, M.; OUWEHAND, A. C. Streptococcus mutans, Caries and Simulation Models. **Nutrients**, v. 2, n. 3, p. 290–298, 2010. doi: 10.3390/nu2030290. Epub 2010 Mar 2.
- FRADE, M. L. et al. Assessment of chitosan-based hydrogel and photodynamic inactivation against propionibacterium acnes. **Molecules**, v. 23, n. 2, 473, 2018. doi: 10.3390/molecules23020473.
- FULAZ, S. et al. Nanoparticle–Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 11, p. 915–926, 2019.
- FERNÁNDEZ, L.; ELENA, D.; CEBRI, M. Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of WPI-based edible films. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 4, p. 415–420, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0305-1>.
- FREIRE, A. C.; PODCZEK, F.; VEIGA, F.; SOUSA, J. Starch-based coatings for colon-specific delivery. Part II: Physicochemical properties and in vitro drug release from high amylose maize starch films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 587-594, 2009b.
- GHANBARZADEH, B. et al. Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability , surface energy and microstructure properties of zein films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 1191– 1197, 2007.
- GONÇALVES, V. S. S. et al. Alginate-based hybrid aerogel microparticles for mucosal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 160–170, 2016.
- GUERRA, R. et al. Thermal behaviour of curcumin. n. January, 2012. GHASEMLOU, M. et al. Physical , mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 1117– 1126, 2013.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 206-211, 1993.
- HOBDELL, M. H.; CHHER, T. Oral Health and Disease in the Tropics. In: RYAN, E. T. et al. (ed.). **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**. 10th. ed. Elsevier, 2012. Chapter 15, p. 127-132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00015-6>.
- HU, X. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, Article 1299, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01299>.

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R. L. Bacterial interactions in dental biofilm. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 435-444. 2011. doi: 10.4161/viru.2.5.16140. Epub 2011 Sep 1.

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

JANA, S. et al. Characterization of Physicochemical and Thermal Properties of Chitosan and Sodium Alginate after Biofield Treatment. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, n. 10, 100043, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/21532435.1000430>.

JARAI, B. M. et al. Polymeric Nanoparticles. In: Eun Ji Chung, **Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2020. Chapter 18, p. 303-324. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00018-7>.

KARYGIANNI, L. et al. Natural antimicrobials and oral microorganisms: A systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. jan, p. 1–17, 2016.

KHALID, K. et al. Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial : a review. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 328–355, 2020.

KHUNAWATTANAKUL, W. et al. Novel chitosan – magnesium silicate nanocomposite film coatings for modified-release tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1–2, p. 132–141, 2011.

KIKUCHI, T. et al. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment: A review of literature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 24111–24126, 2015.

KILICARSLAN, M. et al. Preparation and evaluation of clindamycin phosphate loaded chitosan/alginate polyelectrolyte complex film as mucoadhesive drug delivery system for periodontal therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 123, n. August, p. 441–451, 2018.

KIZILAY, E.; KAYITMAZER, A. B.; DUBIN, P. L. Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, n. 1–2, p. 24–37, 2011.

KLEIN, M. I. et al. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. February, p. 1–8, 2015.

KOO, H.; ANDES, D. R.; ID, D. J. K. Candida – streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. **Plos Pathogens**, v.14, n.12, e1007342, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007342>.

KOO, H.; BOWEN, W. H. Candida albicans and Streptococcus mutans: A potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. **Future Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 1295–1297, 2014.

KUMAR, M. N. V. R. et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6017–6084, 2004.

KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. June, p. 1098–1107, 2018.

KORSMEYER, R. W., GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal Pharmaceutics**, v. 15, p. 25–35, 1983.

LAFFLEUR, F.; RÖTTGES, S. Mucoadhesive approach for buccal application: Preactivated chitosan. **European Polymer Journal**, v. 113, n. November 2018, p. 60–66, 2019.

LAMONT, R. J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 745–759, 2018.

LARANJEIRA, M. C. M.; DE FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009.

LBOUTOUNNE, H. Dental Medicine Nanosystems: Nanoparticles and their use in Dentistry and Oral Health Care. **International Journal of Dentistry and Oral Health**, v. 3, n. 10, p. 150–162, 2017.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEMOS, J. A. et al. The Biology of Streptococcus mutans. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 1, 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018, 2019. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.

LIU, J. et al. Chitosan-sodium alginate nanoparticle as a delivery system for ϵ -polylysine: Preparation, characterization and antimicrobial activity. **Food Control**, v. 91, p. 302–310, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.020>.

LIU, Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**, v. 1, n. 3, p. 140–167, 2015a.

LIU, Y. et al. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. **Food Research International**, v. 74, p. 97–105, 2015b.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LU, X. Y. et al. Polymer nanoparticles. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 104, p. 299–323, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3>.

LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 353–367, 2014.

MA, J. et al. Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans* biofilms in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, n. June, p. 280–287, 2019.

MANGOLIM, C. S. et al. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. **Food Chemistry**, v. 153, p. 361–370, 2014.

MARSH, P. D.; HEAD, D. A.; DEVINE, D. A. Ecological approaches to oral biofilms: Control without killing. **Caries Research**, v. 49, suppl 1, p. 46–54, 2015.

MARTÍN, M. J. et al. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 140–149, 2015.

MARTINS, A. F. et al. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 174–184, 2013.

MATOS, B. N. et al. Chitosan nanoparticles loading oxaliplatin as a mucoadhesive topical treatment of oral tumors: iontophoresis further enhances drug delivery ex vivo. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, p. 1265-1275, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.001. 2019.

MAYER, F. L. et al. Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013. doi: 10.4161/viru.22913. Epub 2013 Jan 9.

MAZZARINO, L.; BORSALI, R.; LEMOS-SENNA, E. Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: A new strategy for buccal curcumin release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 11, p. 3764–3771, 2014.

MENEGUIN, A.B et al. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 140–149, 2014.

MCCARRON, P. A. et al. Evaluation of a water-soluble bioadhesive patch for photodynamic therapy of vulval lesions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, n. 1–2, p. 11–23, 2005.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010.

MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 187–199, 2011.

MUKHOPADHYAY, P. et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of pH sensitive, safe quercetin-succinylated chitosan-alginate core-shell-corona nanoparticle for diabetes treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 182, p. 42–51, 2018.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Sorbitol-plasticized vs glycerol-plasticized whey-protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 841- 845, 1994

MUMUNI, M. A. et al. Insulin-loaded mucoadhesive nanoparticles based on mucin-chitosan complexes for oral delivery and diabetes treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, 115506. 2019. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115506. Epub 2019 Nov 4.

MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 5, p. 445-451, 2011.

NAFEE, N. Nanocarriers Against arterial Biofilms: Current Status and Future Perspectives. In: RAI, M.; KON, K. (ed.). **Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases**. London, UK: Academic Press; Elsevier, 2015. Chapter 11, p. 167-189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801317-5.00011-6>.

NAGARAJU, T. et al. Comprehensive Review On Oral Disintegrating Films. **Current Drug Delivery**, v. 10, n. 1, p. 96–108, 2013.

NAIR, A. B. et al. In vitro techniques to evaluate buccal films. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 1, p. 10–21, 2013.

NETO, C. G. T. et al. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 2, p. 97–103, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.022>.

NOMURA, D.A.; ENOKI, T.A.; SILVEIRA, N.P.; LAMY, M.T. Discussing the use of light scattering in the characterization of polydisperse colloidal systems. Trabalho apresentado In: XLII REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOFÍSICA, 2013, Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

OMS.Organização Mundial da Saúde. **Resistência microbiana: saiba o que é e como evitar**. 2020.Disponível em:
<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/resistencia-microbiana-saiba-o-que-e-e-como-evitar> >

ONISZCZUK, A. et al. The potential of photodynamic therapy (PDT)— Experimental investigations and clinical use. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 912–929, 2016.

OZTURK, I. et al. Antifungal photodynamic activities of phthalocyanine derivatives on *Candida albicans*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, n. February, Article 101715, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101715>.

PAIVA, N.A. **Citotoxicidade de curcumina presente em nanoparticulas de quitosana/sultato de condroitina contendo lecitina**. [Dissertação]. Universidade de Brasília, 2015.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram- Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

LEITE, D.P.V.; PAOLILLO, F.R.; PARMESANO,T. N.; FONTANA,C.R.; BAGNATO, V.S. Effects of Photodynamic Therapy with Blue Light and Curcumin as Mouth Rinse for Oral Disinfection: A Randomized Controlled Trial. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 11, p. 627–632, 2014. <https://doi.org/10.1089/pho.2014.3805>.

LIMA, J. E. DE O. Cárie dentária: um novo conceito. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 12, n. 6, p. 119–130, 2007.

PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.pdf. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751–760, 2007.

PEH, K. K.; WONG, C. F. Polymeric Films as Vehicle for Buccal Delivery: Swelling, Mechanical, and Bioadhesive Properties. v. 2, n. 2, p. 53–61, 1999.

PEÑARANDA, D. F. S. **Preparação e caracterização de matrizes nanoparticuladas na base de óxido de zinco e polímeros biodegradáveis para a liberação controlada de antimicrobianos**. [Tese]. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017. <http://hdl.handle.net/1843/SFSA-AP9T49>.

PREIS, M.; WOERTZ, .; KLEINE U E, P. Oromucosal film preparations: classification and characterization methods. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 9, p. 1303–1317, 2013. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.804058>.

QAYYUM, S.; KHAN, A. U. Nanoparticles vs. biofilms: a battle against another paradigm of antibiotic resistance. **MedChemComm**, v. 7, p. 1479–1498, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6MD00124F>.

RAAFAT, D.; SAHL, H. G. Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 186–201, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>.

RAFIEE, A. et al. Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 5, p. 372–377, 2014.

RHIM, J. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 323–330, May 2004. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.008>.

ROBERTSON, G. **Food packaging: principles and practice**. New York: Marcel Dekker, 1993. (Packaging and converting technology, 6.)

SALAS-VALERO, L. M.; KIECKBUSCH, T.G. **Confecção e caracterização de filmes a base de alginato de sódio reticulados com ions estrôncio (Sr++)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Belo Horizonte-Minas Gerais, 2008.

SANTANA, A.A. **Influência de características físicas e químicas de plastificantes na confecção e no comportamento estrutural e higroscópico de filmes de alginato de cálcio**. [dissertação]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 176 p. 2010.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. N. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 409–415, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.01.016>.

SANTIN, G. C. et al. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: A systematic review of the literature. **Scientific World Journal**, v. 2014, Article ID 824538, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/824538>.

SANTOS, D. DE A. et al. A novel technique of antimicrobial photodynamic therapy—aPDT using 1,9-dimethyl-methylene blue zinc chloride double salt-DMMB and polarized light on *Staphylococcus aureus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 200, p. 111646, september 2019. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111646.

SARI, T. P. et al. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 540–546, 2015.

SCHERER, K. M. et al. New Approaches to Photodynamic Therapy from Types I, II and III to Type IV Using One or More Photons. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 171–189, 2017. DOI: <http://10.2174/1871520616666160513131723>.

ŞENEL, S. Potential applications of chitosan in oral mucosal delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 23–32, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(10\)50003-0](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(10)50003-0).

SEPÚLVEDA, A. A. L. et al. Efficacy of photodynamic therapy using TiO₂ nanoparticles doped with Zn and hypericin in the treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, Article 101676, June 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101676>.

SERIES, C. Antimicrobial photodynamic of blue LED for activation of curcumin extract (*curcuma longa*) on staphylococcus aureus bacteria, an in vitro study. 2018. **Journal of Physics: Conference Series** v. 1120, Article 012073, 2018. doi:10.1088/1742-6596/1120/1/012073.

SILVA, H. S. R. C; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776–785, 2006.

SILVA, B. M. A. et al. Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 537–551, 2015.

SIMONOSKA CRCAREVSKA, M.; GLAVAS DODOV, M.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 565–578, 2008.

SOARES, J. P. et al. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Eclética Química**, v. 29, n. 2, p. 53–56, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702004000200009>.

SOARES, P. I. P. et al. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 304–312, 2016.

SORASITTHIYANUKARN, F. N. et al. Chitosan/alginate nanoparticles as a promising approach for oral delivery of curcumin diglutaric acid for cancer treatment. **Materials Science and Engineering C**, v. 93, p. 178–190, 2018.

SORASITTHIYANUKARN, F. N. et al. Chitosan/alginate nanoparticles as a promising carrier of novel curcumin diethyl diglutarate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 1125–1136, 2019.

SOUSA, A. M. M. **Aplicação de biopolímeros extraídos de algas na produção de embalagens biodegradáveis**. [Dissertação]. Universidade do Porto, Porto, 2008.

SUN, X. et al. Nanoparticles having amphiphilic silane containing Chlorin e6 with strong anti-biofilm activity against periodontitis-related pathogens. **Journal of Dentistry**, v. 81, p. 70–84, February 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.12.011>.

TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M.; DASS, C. R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 184–193, 2010.

TAVARES, A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: Study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. **Marine Drugs**, v. 8, n. 1, p. 91–105, 2010.

TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; JESUS, P. DA C. C. DE. Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) Action Based on Nanostructured Photosensitizers. In: GRUMEZESCU, A. M. (ed.). **Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics**. Kidlington, Oxford: Elsevier, 2017. Chapter 2, p. 9-29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00019-8>.

TITUS, D.; JAMES JEBASEELAN SAMUEL, E.; ROOPAN, S. M. Nanoparticle characterization techniques. In: PAL, G.; RAI, P.; PANDEY, A. (ed). **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**. Elsevier, 2019. Chapter 2, p. 303-319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G.; GIMENES, M. L. Release of calcium benzoate from films of sodium alginate crosslinked with calcium ions. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 21, n. 3, p. 175–181, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282011005000034>.

USBERCO; SALVADOR. **Química. volume 2: físico-química**. 12 ed.reform. São Paulo: Saraiva, 2009.

USP. **United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34-NF 29)**. 2011.

WANG, F. et al. Pharmacokinetic studies and anticancer activity of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers. **Acta Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 357–371, 2017.

WANG, H. et al. Preparation and characterization of multilayer films composed of chitosan , sodium alginate and carboxymethyl chitosan-ZnO nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 283, p. 397-403, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.022>.

XU, L. et al. Polymeric nanoparticles responsive to intracellular ROS for anticancer drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 252–260, may 2019.

YEKEEN, N. et al. Synergistic influence of nanoparticles and surfactants on interfacial tension reduction, wettability alteration and stabilization of oil-in-water emulsion. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 186, Article 106779, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.106779>.

YONCHEVA, K. et al. Optimization and in-vitro/in-vivo evaluation of doxorubicin- loaded chitosan-alginate nanoparticles using a melanoma mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 556, p. 1–8, 2019. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.070.

ZHOU, M. et al. Alginate hydrogel beads as a carrier of low density lipoprotein/pectin nanogels for potential oral delivery applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 859–864, 2018.