



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Lorena Fonseca Piovesan

**Filmes orodispersíveis baseados em ácido hialurônico e morina para aplicação
na odontologia**

Araraquara

2024



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Lorena Fonseca Piovesan

Filmes orodispersíveis baseados em ácido hialurônico e morina para aplicação na odontologia

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Dentística Restauradora

Orientador: Hernane da Silva Barud
Coorientadora: Fernanda Lourenção Brighenti
Coorientador: Gustavo Claro Monteiro

Araraquara

2024

Piovesan, Lorena Fonseca

Filmes orodispersíveis baseados em ácido hialurônico e morina para aplicação na odontologia/ Lorena Fonseca Piovesan.-- Araraquara: 2024 71 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araraquara.

Orientador: Hernane da Silva Barud

Coorientadora: Fernanda Lourenção Brighenti

Coorientador: Gustavo Claro Monteiro

1. Produtos com ação antimicrobiana 2. Ácido hialurônico 3. Cárie dentária. I. Título

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Lorena Fonseca Piovesan

Filmes orodispersíveis baseados em ácido hialurônico e morina para aplicação na odontologia

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas na Área de Concentração em Dentística Restauradora

Presidente e orientador: Hernane da Silva Barud

2º Examinador: Ricardo Bortoletto-Santos

3º Examinador: Renan Lira de Farias

Araraquara, 04 de março de 2024.

DADOS CURRICULARES

Lorena Fonseca Piovesan

NASCIMENTO: 20/08/1999 – São Carlos – SP

FILIAÇÃO: Laercio Clovis Piovesan Filho e Kelli Cristina da Fonseca Piovesan

Formação Acadêmica

2022/2024 Mestrado em Ciências Odontológicas na Área de Concentração em Dentística Restauradora – Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2018/2022 Graduação em Odontologia - Universidade de Araraquara (Uniara).

AGRADECIMENTOS

À minha família pela compreensão e carinho durante toda minha trajetória.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hernane da Silva Barud, pela sua orientação, disponibilidade e por todo o aprendizado que me proporcionou.

Aos meus coorientadores Prof. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti e Prof. Dr. Gustavo Claro Monteiro, pela coorientação e disponibilidade para discussões sobre a pesquisa desenvolvida.

Aos grupos de pesquisa BioPolMat e Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Microbiologia (LPBM), pelo auxílio, atenção, apoio e amizade em que desenvolvemos ao longo desses anos.

À empresa de pesquisa e desenvolvimento Biosmart, pela doação de ácido hialurônico, utilizado nessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) (Processo 131430/2022-0) e foi parcialmente apoiado pelas agências brasileiras MCTIC/CNPq (Edital 406973/2022-9) através do INCT/Polissacarídeos (Instituto Nacional de Tecnologia-Ciência dos Polissacarídeos).

Piovesan LP. Filmes orodispersíveis baseados em ácido hialurônico e morina para aplicação na odontologia [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

RESUMO

A biodisponibilidade limitada de formas farmacêuticas orais é um dos principais desafios no desenvolvimento de novos carreadores para a liberação de fármacos, especialmente aqueles destinados ao tratamento de doenças periodontais, cárie e pulpites. Os filmes orodispersíveis (FODs) são promissores para tal finalidade, por apresentarem rápida absorção e por serem facilmente administrados, servindo especialmente para pacientes pediátricos, geriátricos e que possuem limitações no processo de deglutição. O ácido hialurônico (HA) é um biopolímero investigado para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, por apresentar elevada hidrofiliabilidade, excelentes propriedades viscoelásticas, biocompatibilidade e atoxicidade. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar as propriedades físico-químicas, o perfil de liberação *in vitro* e a atividade antimicrobiana e anti-biofilme de FODs à base de HA combinados com flavonóide morina, um composto natural que apresenta altas propriedades anti-biofilme. Os filmes desenvolvidos possuíram uma espessura fina (12-27 μm), flexíveis e homogêneos, atingiram alta resistência mecânica e uma liberação de morina da matriz HA foi evidenciada. Ensaio biológicos forneceram resultados de atoxicidade, bem como a atividade significativa antibiofilme contra *S. mutans*. O conjunto de dados evidenciam que os FODs baseados em HA e morina desenvolvidos nesse trabalho representam uma potencial plataforma para entrega de fármacos orais.

Palavras – chave: Produtos com ação antimicrobiana. Ácido hialurônico. Cárie dentária.

Piovesan LP. Orodispersible films based on hyaluronic acid and morin for application in dentistry [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

The limited bioavailability of oral pharmaceutical forms is one of the main challenges in the development of new carriers for the release of drugs, especially those intended for the treatment of periodontal diseases, caries and pulpitis. The orodispersible films (FODs) are promising for this purpose, because they present rapid absorption and are easily administered, serving especially for pediatric patients, Geriátricos and who have limitations in the swallowing process. Hyaluronic acid (HA) is a biopolymer investigated for the development of new drug delivery systems, due to its high hydrophilicity, excellent viscoelastic properties, biocompatibility and atoxicity. This research aimed to evaluate the physicochemical properties, the in vitro release profile and antimicrobial and anti-biofilm activity of FODs based on HA combined with flavonoid morin, a natural compound that has high anti-biofilm properties. The developed films had a thin thickness (12-27 μm), flexible and homogeneous, reached high mechanical strength and a release of Morina from the HA matrix was evidenced. Biological assays provided atoxicity results as well as significant antibiofilm activity against *S. mutans*. The dataset shows that FODs based on HA and morin developed in this work represent a potential platform for delivery of oral drugs.

Keywords: Products with antimicrobial action. Hyaluronic acid. Dental caries.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Cárie Dentária	17
3.2 Flavonóides	18
3.3 Morina.....	21
3.4 Biopolímeros	23
3.5 Ácido Hialurônico.....	25
3.6 Filmes Orodispersíveis para a Entrega de Fármacos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Desenvolvimento de Filmes Orodispersíveis	29
4.2 Espessura	30
4.3 Espectroscopia Vibracional da Região do Infravermelho com Transformada em Fourier (FTIR).....	30
4.4 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis).....	30
4.5 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG).....	31
4.6 Determinação da Viabilidade Celular	31
4.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme	32
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
4.9 Ensaios Mecânicos	34
4.10 Determinação do Perfil de Liberação <i>In Vitro</i> da Morina	34
4.10.1 Curva de calibração	35
4.10.2 Estudo de dissolução <i>in vitro</i>	35
4.10.3 Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> da morina.....	35
4.11 Planejamento Estatístico e Análise dos Dados	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Espessura	37
5.2 Espectroscopia Vibracional da Região do Infravermelho com Transformada em Fourier (FTIR).....	37
5.3 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis).....	39
5.4 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG).....	40
5.5 Determinação da Viabilidade Celular	42
5.6 Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme	43
5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
5.8 Ensaios Mecânicos	47
5.9 Determinação do Perfil de Liberação <i>in vitro</i> da Morina	49
5.10 Análise dos Mecanismos de Liberação <i>in vitro</i> da Morina.....	51

6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária consiste em uma doença crônica, multifatorial, biofilme dependente e influenciada pela dieta ¹. Esta doença está entre as mais prevalentes da humanidade, apresentando um extenso impacto negativo na qualidade de vida das pessoas².

A presença de biofilme nas superfícies dentárias é um dos principais determinantes causais locais para o desenvolvimento da cárie dentária, e sua remoção mecânica por escovação com dentifrício, associada à redução de açúcar na dieta, é um método de controle e prevenção da doença³. No entanto, a eficácia desse método depende da capacidade motora do indivíduo e, em alguns casos, necessita de abordagens complementares⁴. Por esse motivo, o controle químico do biofilme dental tem sido indicado em situações específicas.

Recentemente, tem havido um aumento significativo no interesse mundial em utilizar biopolímeros. Esse interesse crescente, que também é impulsionado pelos avanços notáveis na área da biotecnologia, decorre da necessidade da substituição de fontes de energias não renováveis, tais como materiais advindos de recursos fósseis, por materiais poliméricos originados de recursos sustentáveis⁵.

Os biopolímeros têm sido extensivamente estudados para a produção de filmes com várias aplicações, incluindo revestimentos comestíveis⁶, cobertura de sementes⁷ e também na indústria farmacêutica. Inicialmente, seu uso na farmácia foi para revestir comprimidos⁸, visando proteger o fármaco de condições ambientais adversas, como luz e umidade, além de melhorar características sensoriais, como aparência e sabor. Esses materiais também têm o potencial de modular a liberação do fármaco, otimizando seu efeito terapêutico.

A entrega de medicamentos por via oral é amplamente favorecida devido à sua conveniência e caráter não invasivo. No entanto, certos pacientes, como crianças, idosos ou aqueles com condições gastrointestinais como disfagia e refluxo esofágico, podem enfrentar dificuldades de deglutição⁹. Como resultado, a indústria farmacêutica está em busca de novas formulações, como filmes orodispersíveis (FODs) e filmes mucoadesivos, que facilitem o tratamento oral desses pacientes, desenvolvendo formas farmacêuticas que se desintegram rapidamente na boca¹⁰.

O ingrediente farmacologicamente ativo (IFA), incorporado em um filme orodispersível, tem sua liberação e absorção distintamente dividida em duas etapas. A primeira fase consiste da difusão da preparação farmacêutica em saliva. Enquanto, a segunda fase constitui-se pela liberação e por conseguinte absorção do IFA. Esta última etapa pode se manifestar na mucosa oral, incluindo áreas como gengiva, região sublingual, bucal e palato ou no decorrer do trato gastrointestinal, após a saliva ser deglutida^{11,12}.

Além disso, nota-se um aumento substancial na biodisponibilidade Ingrediente Farmacêutico Ativo, independente da via utilizada na absorção dos filmes orais em comparação com as formas tradicionais de administração oral, como comprimidos e cápsulas sólidas convencionais. Isso se deve ao fato de que a liberação ocorre na cavidade bucal, e a dissolução do IFA tem início de maneira antecipada^{13,12}.

Em termos gerais, os filmes desenvolvidos para desintegração oral são predominantemente compostos por polímeros hidrodispersíveis, os quais desempenham um papel significativo na determinação das propriedades físico-químicas desses filmes. É crucial que esses filmes apresentem boa resistência mecânica, capacidade de desintegração rápida na cavidade oral e um sabor agradável que garanta uma experiência palatável¹².

Recentemente, o setor farmacêutico tem mostrado interesse crescente no desenvolvimento de filmes orodispersíveis (FODs). Inicialmente, esses filmes foram estudados para combater o mau hálito bucal, e desde então têm evoluído com a incorporação de diversos tipos de medicamentos para uma ampla gama de aplicações. Adicionalmente, os filmes de desintegração oral apresentam algumas vantagens, que incluem um maior período de permanência da substância ativa na cavidade oral, quando comparados a outros sistemas de liberação, tais como os géis orais, que são passíveis de carreamento ao entrarem em contato com a saliva¹⁵.

Na literatura inúmeros estudos abordam a temática de filmes de desintegração oral, demonstrando as diversas formas de aplicabilidade e efeito do composto ativo, observados no Quadro 1

Quadro 1- Exemplos de aplicações de diferentes tipos de filmes e princípio ativo incorporado

Princípio ativo	Tipo de filmes	Aplicação do filme	Autor
Gluconato de clorexidina	Filmes mucoadesivos	Antimicrobiano	Senel et al. ¹⁶ (2000)
Cloridrato de lidocaína	Filmes mucoadesivos	Alívio da dor	Abu-Huwaij et al. ¹⁷ (2007)
Dexametasona	Filme de desintegração rápida	Inflamação	Shimoda et al. ¹⁸ (2009)
Proclorperazina	Filme de desintegração rápida	Náusea	Nishimura et al. ¹⁹ (2009)
Losartan	Filmes mucoadesivos	Tratamento de hipertensão	Koland et al. ²⁰ (2010)
Cloridrato de propanolol	Filmes mucoadesivos	Problemas cardíacos	Abruzzo et al. ²¹ (2012)
Benzoato de rizatriptana	Filmes mucoadesivos	Enxaqueca	Avanchat et al. ²² (2013)

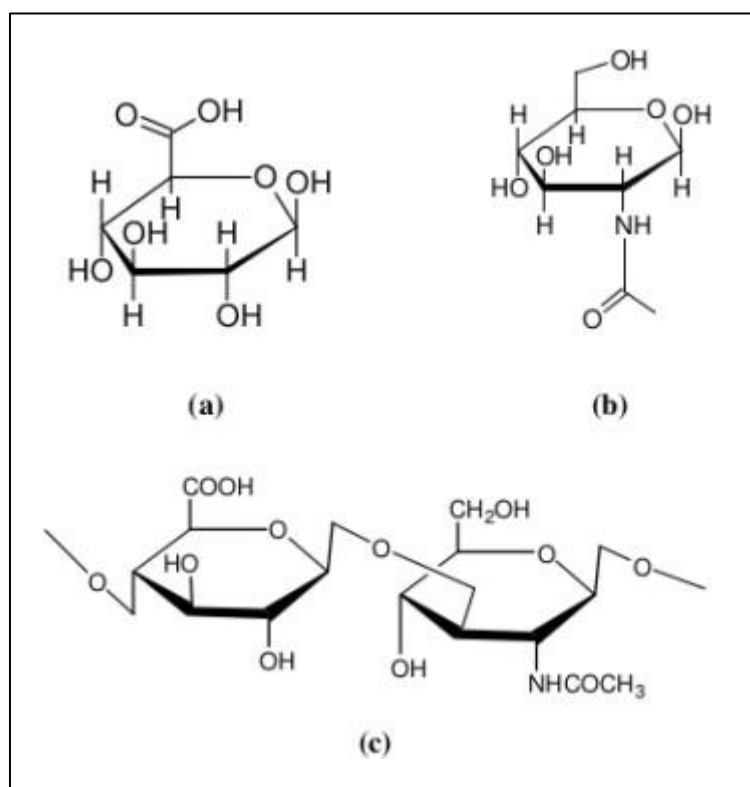
Fonte: Elaboração própria.

Os FODs são comumente feitos com polímeros hidrofílicos, que se dissolvem na boca ao entrar em contato com a saliva, devido à sua solubilidade em água. A seleção do polímero desempenha um papel fundamental, pois influencia várias características dos FODs, que incluem período de desintegração, dissolução do medicamento, elasticidade e resistência mecânica. Portanto, escolher o polímero certo é uma etapa crítica em um projeto de pesquisa, podendo ser variável de acordo com as características do produto de escolha¹⁴. Os polímeros destinados a fabricação dos filmes orodispersíveis devem possuir certas características como serem atóxicos, não irritantes, terem sabor imperceptível e não prolongarem o tempo de desintegração dos filmes⁷.

O uso de biopolímeros naturais para o preparo dos FODs, conforme mencionado anteriormente, possuem como principais vantagens: i) biocompatibilidade; ii) biodegradabilidade; iii) propriedades mecânicas adequadas; iv) facilidade de obtenção e v) baixo custo²³.

Nesse contexto, o ácido hialurônico, do inglês *hyaluronic acid* (HA), é considerado um biopolímero atraente que pode ser aplicado no desenvolvimento dos FODs. O HA é um polissacarídeo linear composto por unidades de dissacarídeos de ácido D-glucurônico e N-acetil glucosamina (Figura 1). O HA tem uma ampla aplicabilidade, principalmente na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética em função à sua biocompatibilidade e atoxicidade.

Figura 1 - (a) Estrutura do Ácido D- glicurônico, (b) Estrutura da N-acetil-D- glicosamina e repetidas unidades dissacarídicas formando o polímero linear (c) Ácido Hialurônico



Fonte: Souza²⁴ (2023).

Sabe-se que as propriedades físicas, bem como as biofunções do HA são dependentes de seu tamanho molecular²⁵. O comportamento de desintegração e ligação intermolecular dos filmes poliméricos estão relacionados com a massa molar dos polímeros formadores de filme²⁶. O filme contendo polímeros menores se dissolve mais rapidamente do que aquele contendo polímeros maiores²⁷. O HA, especialmente de baixa massa molar, foi adequado para o uso em FODs, pois a baixa massa molar diminuiu o tempo de desintegração do filme²⁸. Junto a isso, o HA de cadeia longa pode

ser usado como um agente de liberação controlada, por apresentar propriedades viscoelásticas e a hidrofiliidade adequada que contribuem para tal aplicação. Por outro lado, o HA de cadeia curta tem maior solubilidade em água, porém possui menor capacidade de absorção de líquidos quando comparado ao HA de alta massa molar. Adicionalmente, o filme de HA é mais fácil de aplicar em feridas orais e é clinicamente conveniente devido às suas propriedades orodispersíveis e adesivas.

Ademais, não são necessários métodos especiais de aplicação ou procedimentos adicionais, devido às suas vantagens características adesivas e de longa duração²⁹. Existem muitos produtos derivados de HA para curativos devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, caráter hidrofílico e menos efeitos colaterais^{30,31}. Os efeitos do HA estão relacionados à angiogênese, inflamação e regeneração tecidual³², além de que, sua aplicação melhora a cicatrização de feridas em alvéolos após extração dentária³³ e cicatrização óssea após enxertos³⁴.

A utilização de substâncias provenientes de fontes naturais com propriedades medicinais é uma prática ancestral. Inúmeras plantas, especiarias e outras fontes naturais contêm uma variedade de compostos com diversas funcionalidades, atividade antioxidantes³⁵, estímulo ao sistema imunológico³⁶, regulação do metabolismo hormonal³⁷, bem como atividade antimicrobiana³⁸ e antiviral³⁹.

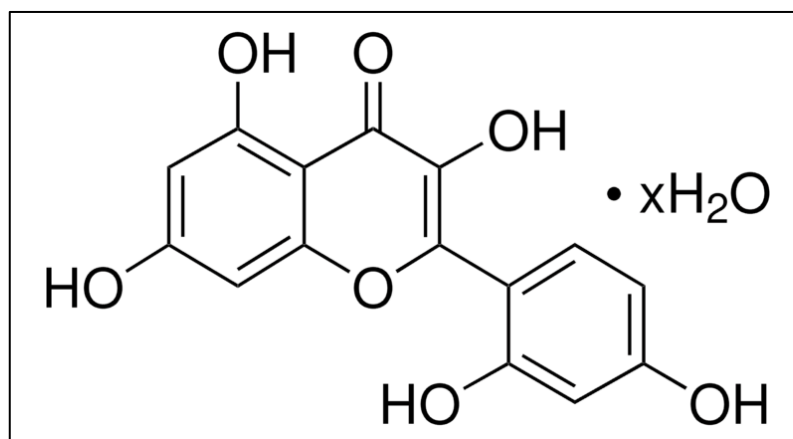
Um aspecto que tem gerado preocupação na comunidade científica é o surgimento de micro-organismos resistentes a compostos químicos, em razão à utilização excessiva desses fármacos ao longo de muitos anos⁴⁰. Nesse contexto, a utilização de substâncias naturais oferece como benefício a ampla gama de compostos ativos em sua composição, o que amplia a eficácia e promove a redução dos riscos de resistência por parte dos micro-organismos a esses produtos⁴¹.

Substâncias bioativas, como própolis, curcumina e chá preto, tem mostrado resultados promissores no controle de micro-organismos na cavidade oral⁴² alguns estudos descrevem efeitos terapêuticos da morina como proteção do sistema cardiovascular, redução da glicemia⁴³, atividade anti-inflamatória^{44,45}, ação protetora na doença de Parkinson⁴⁶, ações como indução de apoptose celular em células tumorais⁴⁷ e atividade antimicrobiana e de redução da formação de biofilme por diversos micro-organismos⁴⁸⁻⁵².

Diversos polissacarídeos advindos de plantas tem ganhado atenção da comunidade científica para utilização em FODs, por conta de seu amplo espectro de atividades biológicas, demonstradas a partir de ensaios *in vitro* e *in vivo*^{53,54}.

A morina (3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone) (Figura 2) é um flavonoide de pigmento amarelo, originalmente identificado em plantas da família *Moraceae*, tais como, pau-d'arco (*Maclura pomifera*), amora (*Chlorophora tinctoria*), amêndoa (*Prunus dulcis*), e membros da família *Myrtaceae*, como a goiabeira (*Psidium guajava*)⁵⁵. Este composto está presente em diversas plantas, frutas e no vinho, desempenhando o papel de um antioxidante eficaz que protege as células contra danos pelos radicais livres de oxigênio. Além disso, exerce atividade inibitória contra a xantina oxidase, uma enzima que produz radicais livres, demonstrando uma variedade de efeitos biológicos e bioquímicos, que incluem propriedades anti-inflamatórias e inibição da síntese de ácido graxo^{46,56,57}. Em experimentos conduzidos por Hussain et al.⁵⁷ (2014) para avaliar a bioatividade da morina em espécies de *Fusarium oxysporum* e *Chaetomium globosum*, foram observados diversos componentes extraídos desse flavonoide, os quais, em diferentes concentrações, inibiram o crescimento desses micro-organismos.

Figura 2 - Estrutura química da morina



Fonte: Sigma-Aldrich⁵⁸.

Nesse contexto, filmes orodispersíveis (FODs) à base de HA contendo morina surgem como uma estratégia promissora para o controle do biofilme dental. Isso se deve ao papel da morina no controle de fatores cruciais de virulência associados a cárie, tais como acidogenicidade, redução da viabilidade microbiana, modulação da

concentração de polissacarídeos insolúveis e influência na formação do próprio biofilme⁵⁹.

2 PROPOSIÇÃO

A presente pesquisa tem como objetivo a obtenção e caracterização de filmes orodispersíveis, fundamentados na combinação de ácido hialurônico e morina, com vistas ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas para o tratamento de cárie e inibição de biofilme, com potencial aplicação inovadora no âmbito da odontologia.

2.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

Desenvolver filmes orodispersíveis baseados em HA e morina;

Avaliar as propriedades físico-químicas dos filmes orodispersíveis desenvolvidos;

Avaliar a atividade antimicrobiana dos FODs contra *S. mutans*;

Avaliar a citotoxicidade dos filmes utilizando cultura de fibroblastos murino derivados de tecido conjuntivo (L929) e queratinócitos orais derivados da mucosa oral (NOK-1);

Avaliar o perfil de liberação da morina dos filmes orodispersíveis e o modelo cinético envolvido com o ensaio.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura está apresentada pelos principais temas abordados nesta pesquisa, dentre eles: cárie dentária, flavonóides, morina, biopolímeros, ácido hialurônico e filmes orosipersíveis para a entrega de drogas.

3.1 Cárie Dentária

A cárie dentária, considerada a mais predominante das doenças bucais⁶⁰, é uma condição crônica, multifatorial e dependente de biofilme^{61,62}. Apesar de ser evitável, afeta significativamente a vida de milhões de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. A incidência da doença está diretamente relacionada ao nível socioeconômico da população e a fatores comportamentais⁶³.

A principal meta da prevenção ou reversão da cárie dentária é controlar a desmineralização e estimular a remineralização dos tecidos dentários, aspectos cruciais na abordagem da Odontologia minimamente invasiva⁶⁴. Nesse contexto, a estratégia primordial para evitar o desenvolvimento dessa doença envolve a remoção mecânica dos biofilmes, o uso de produtos fluoretados e a gestão dietética⁶⁵. Apesar dessas medidas, a cárie dentária ainda persiste como uma condição altamente prevalente globalmente⁶⁶. No Brasil, conforme indicado pelos dados do último levantamento epidemiológico: aos 5 anos de idade, a prevalência é de 53,4%, entre 12 e 19 anos é de 76,1%, e na idade adulta atinge 99% da população⁶⁷. Essa alta prevalência gera uma redução na qualidade de vida da população e implica em altos gastos para a sociedade no tratamento da doença⁶⁸⁻⁷⁰.

Para que a cárie ocorra, os microrganismos presentes na cavidade bucal precisam aderir à superfície dentária e formar um biofilme⁷¹. Essa estrutura é definida como um grupo de microrganismos circundados por uma matriz aderida à superfície do dente⁷². Todo biofilme possui uma matriz extracelular comum composta por polissacarídeos, proteínas e algumas vezes ácidos nucleicos. A formação do biofilme ocorre através de sinais ambientais bacterianos e oferece proteção bacteriana contra antibióticos, estresses ambientais e respostas imunológicas do hospedeiro⁷³.

As espécies responsáveis pela colonização inicial da superfície dentária são *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces spp.* Essas espécies produzem ácidos a partir de carboidratos fermentáveis, reduzindo o pH bucal. No entanto, esses ácidos são facilmente neutralizados pelo mecanismo homeostático da cavidade oral, incluindo o tamponamento por sistemas tampões salivares e a metabolização de arginina ou ureia em amônia^{74,75}. Contudo, com a ingestão frequente de açúcar, os mecanismos homeostáticos falham em manter o pH próximo à neutralidade, iniciando a doença e a desmineralização do esmalte. Se o pH permanecer em níveis baixos, essas espécies bacterianas serão substituídas por *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.*, espécies acidúricas e que toleram pH abaixo de 4, promovendo a progressão da doença e eventualmente a cavitação do dente⁷⁶. Assim, o tempo de retenção de carboidratos fermentáveis na cavidade oral mostrou ser o principal fator na iniciação e progressão da cárie dentária⁷⁷.

Além disso, outros fatores que favorecem o desenvolvimento da cárie dentária incluem a taxa de fluxo salivar, a capacidade de tamponamento e a disponibilidade de algumas enzimas e moléculas protetoras na saliva. A composição do esmalte, suas características de superfície e a localização do dente na arcada dentária também podem ser fatores determinantes para o risco de cárie dentária em um indivíduo⁷⁷.

3.2 Flavonóides

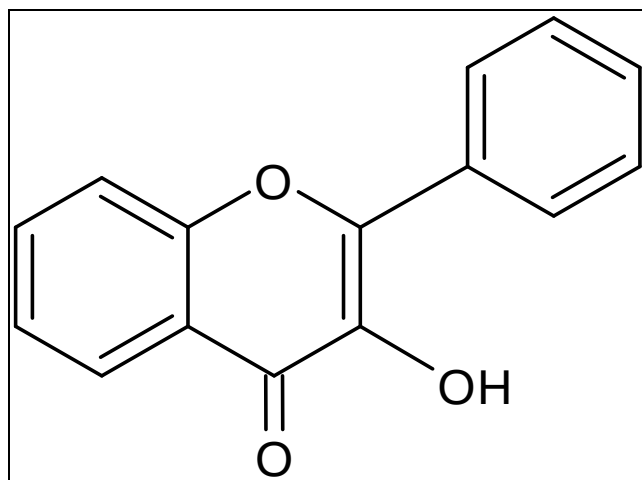
Os flavonóides (Figura 3) se constituem como uma das categorias mais atraentes de compostos bioativos, sendo reconhecidos como o conjunto de polifenóis mais abundante encontrado na dieta humana⁷⁸. São armazenados em vacúolos das células vegetais e possuem cerca de 8000 variedades⁷⁹. Estão presentes em grande parte dos alimentos de origem vegetal e de maneira mais significativa em maçãs, cebolas, vinho tinto, uvas, citrinos, chás, ervas medicinais e azeite⁸⁰. Além disso, compartilham uma estrutura química comum, contudo se diferenciando nos componentes. A estrutura química básica dos flavonoides é composta por um núcleo com 15 átomos de carbono, organizados em três anéis (C₆-C₃-C₆), compreendendo um anel pirano e dois anéis fenólicos⁸¹. Depois de serem ingeridos, o processo de metabolização e absorção dos flavonoides ocorre no intestino delgado e grosso, onde o microbioma presente será responsável pela decomposição dos flavonoides não absorvidos, transformando-os em moléculas menores, tais como ácidos fenólicos e

aromáticos, a fim de torná-los biodisponíveis⁸². Entretanto, para que um efeito biológico adequado ocorra, é crucial que uma quantidade suficiente do composto esteja disponível para as células. Contudo, a biodisponibilidade dos flavonoides é reduzida, o que resulta em limitações na sua aplicação prática⁸³.

Em função ao seu potencial terapêutico, os flavonoides exercem impactos benéficos na saúde humana por meio de atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígena, antihiperglicemiantes, antihiperlipidêmicos, bactericidas, nefropotetoras, hepatoprotetoras, entre outras⁸⁴⁻⁸⁶. Evidências de estudos epidemiológicos sugerem que o consumo prolongado de flavonóides pode diminuir o risco de inúmeras doenças, sendo mais comumente associado a condições como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer de pulmão⁸⁷⁻⁸⁹. Dessa forma, os flavonóides são divididos em dez subclasses que incluem flavononas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanas, chalconas, auronas, antocioninas, neoflavonóides, dihidroflavonois, sendo cada uma delas responsáveis por efeitos biológicos específicos⁷⁹.

Dentre os flavonoides, os flavonóis constituem-se como um dos subgrupos mais abundantes distribuídos na natureza⁹⁰. Sendo abundantemente encontrados em cebolas, couve, alface, tomates, maçãs e uvas. Além de frutas e vegetais, chá e vinho tinto também constituem-se como fonte de flavonóis⁹¹. Os flavonóis mais comuns são galangina, morina, miricetina, quercetina, kaempferol e rutina⁹². Adicionalmente, tais substâncias estão associadas a um amplo potencial terapêutico incluindo o potencial antioxidante, antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório, anticancerígeno, neuroprotetivo e a redução do risco de doenças vasculares⁹³.

Figura 3 - Estrutura química dos flavonoides



Fonte: Elaboração própria utilizando o software ChemSteck.

Shu et al.⁹⁴(2011) observaram os efeitos antibacterianos da quercetina no crescimento de onze principais micróbios patogênicos orais. A quercetina demonstrou inibir o crescimento de seis dos onze micróbios avaliados, incluindo *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus sanguis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia*, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando entre 1-8 mg/mL.

Wang et al.⁹⁵ (2018) avaliaram o efeito bacteriostático da quercetina em quatro tipos de bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica* e *P. aeruginosa* e o mecanismo antibacteriano em *E. coli*, *S. aureus*, a quercetina inibiu significativamente as quatro espécies testadas e o efeito bacteriostático foi mais forte nas bactérias gram-positivas do que nas bactérias gram-negativas, devido a diferença nas diferenças na composição das paredes e membranas celulares de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Além disso, a quercetina danificou as paredes celulares e as membranas de *E. coli* (a 50 × CIM) e de *S. aureus* (a 10 × CIM) levando a um aumento da permeabilidade destas estruturas.

Gendaram et al.⁹⁶(2011) descreveram a ação antibacteriana da miricetina em relação ao *S. aureus* utilizando o método de difusão em disco (300 µg/disco, com uma zona de inibição de 9 mm). Não houve resultados estatisticamente significativos acerca das atividades antibacterianas contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* ou *Micrococcus luteus*. Em contrapartida, a miricetina apresentou atividade inibitória contra a sortase A (SrtA) de *S. aureus* a uma concentração de 100 µM (92%;

IC₅₀ 4,63 µM).

Ouyang et al.⁹⁷ (2018) avaliaram o efeito da galangina contra o *S. aureus*. Os resultados indicaram que a CIM da galangina era de 32 µg/mL contra *S. aureus*, e a substância foi responsável por suprimir, de maneira significativa, o crescimento bacteriano com concentrações de 4, 8 e 16 µg/mL, em comparação com o grupo de controle (0 µg/mL). Para explorar as possíveis razões dos efeitos bacteriostáticos da galangina, foi observado alterações morfológicas utilizando, microscópio eletrônico de transmissão, o qual mostrou que a divisão das células filhas tratadas com galangina foi inibida.

Vaziri et al.⁹⁸ (2023) relataram que a terapia com complexo contendo rutina foi capaz de reduzir, de maneira significativa, as células do biofilme de *S. mutans* em 52,5% quando comparadas ao grupo controle. Adicionalmente, houve uma diminuição na expressão do gene *gtfB*, gene responsável pela formação do biofilme de *S. mutans*, em comparação ao grupo não tratado.

3.3 Morina

O hidrato de morina (3,5,7,2',4'-penta-hidroxiflavona), é uma das principais substâncias componentes de diversos alimentos e plantas medicinais. Na medicina tradicional, é recomendada para o tratamento de várias patologias humanas⁹⁹. Este composto está incluído na classe dos flavonoides, em especial à subclasse dos flavonóis. Corresponde a um composto estável de coloração amarela, presente nas plantas da família Rosaceae, Moraceae e Fagaceae. As fontes principais incluem os ramos de amora branca, goiaba, folhas de goiaba, laranja Osage, casca de maçã, cebola e amêndoa. A morina também pode ser extraída de figo, castanha doce, jaca, vinho tinto, algas marinhas, chá, café e grãos de cereais^{100,101}.

Na última década, o interesse em torno deste flavonoide tem crescido devido ao seu promissor potencial terapêutico. Vários autores conduziram estudos de revisão da literatura para explorar as propriedades biológicas associadas à morina¹⁰⁰⁻¹⁰³, conduziram análises abrangentes e constataram que a morina exibe propriedades biológicas, tais como ação antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora, anti-hiperlipidêmica, anti-hipertensiva, antidiabética, anti-hiperuricêmica, antitrombótica, antiviral, antibacteriana, antialérgica, além de efeitos anticancerígenos. Importante ressaltar que a morina apresenta baixa toxicidade, mesmo em doses mais elevadas,

abrindo assim possibilidades para uma análise mais aprofundada de suas aplicações farmacológicas, incluindo potenciais ensaios clínicos em humanos¹⁰⁴.

Os flavonoides, incluindo a morina, apresentam diversos mecanismos antimicrobianos, como a inibição da síntese de ácidos nucleicos, interferência na função da membrana citoplasmática, a interrupção do metabolismo energético, a inibição da ligação e formação de biofilme, a supressão da porina na membrana celular, a modificação da permeabilidade da membrana e a redução da patogenicidade¹⁰⁵. Substâncias que impedem a exposição de proteínas na superfície celular bacteriana podem ter um valor terapêutico significativo, uma vez que essas proteínas promovem a adesão bacteriana, a evasão da resposta imune, a aquisição de nutrientes e a invasão da célula hospedeira durante infecções bacterianas¹⁰⁶. Os inibidores da Sortase A (SrtA), enzima que desempenha um papel crucial na fixação de proteínas à superfície celular de bactérias gram-positivas, mostram-se como agentes promissores no combate a infecções bacterianas. Esses inibidores atuam na reação de classificação, retardando assim a ligação das proteínas de superfície à parede celular, que é mediada pela SrtA¹⁰⁷. Ainda, o estudo conduzido por Xu et al.¹⁰⁸ (2001) evidenciou que a morina possui a capacidade de inibição da atividade da enzima DNA replicase, a qual está envolvida no metabolismo bacteriano. A influência da morina sobre essa enzima apresenta potencial para regular a proliferação tanto de bactérias gram-positivas quanto gram-negativas.

Huang et al.¹⁰⁹ (2014) conduziram o estudo pioneiro com este composto investigando os efeitos da morina na atividade da SrtA de *Streptococcus mutans*, tanto in vitro quanto in vivo, e na subsequente formação de biofilme. Ficou evidente que a morina exerce um efeito inibitório contra *S. mutans* UA154, com um IC₅₀ de $27,2 \pm 2,6$ μ M. Os resultados do teste de Western Blot indicaram que 30 μ M de morina causaram a liberação parcial da proteína Pac no sobrenadante. Esses achados sugerem que a falta dessa proteína resulta na redução da massa do biofilme de *S. mutans* quando exposto a 30 μ M de morina. Por outro lado, não foi observada diminuição na viabilidade de *S. mutans*.

O estudo de Farias et al.¹¹⁰ (2020) teve como propósito desenvolver e caracterizar sistemas mucoadesivos de liberação controlada contendo morina, com a avaliação de sua atividade antimicrobiana e antibiofilme contra o biofilme de *S. mutans*, além de verificar a citotoxicidade. Para alcançar esse objetivo, micropartículas, filmes e comprimidos orais baseados em alginato e goma gelana

foram desenvolvidos como estratégia para superar a baixa solubilidade aquosa da morina. Os resultados dos testes de liberação *in vitro* de morina em saliva artificial indicaram que as micropartículas controlaram a liberação de maneira mais eficaz (39,6%), seguidas pelos filmes (41,1%) e pelos comprimidos (91,4%) após 20 horas de avaliação. A morina liberada desses sistemas reduziu a acidogenicidade, a viabilidade microbiana, a concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis e o peso seco dos biofilmes, quando comparado ao grupo controle. Esses resultados evidenciam que a morina possui atividade antibiofilme contra microrganismos cariogênicos.

Um estudo adicional conduzido por de Farias et al.¹¹⁰ (2022) analisou a atividade antimicrobiana e antibiofilme da morina em filmes e comprimidos de liberação controlada à base de goma gelana, desta vez em biofilmes polimicrobianos. Esses biofilmes foram formados a partir de saliva durante 48 horas, com exposição intermitente a 1% de sacarose, enquanto estavam em contato com filmes ou comprimidos de goma gelana contendo 2 mg de morina cada. Os parâmetros avaliados incluíram acidogenicidade, viabilidade bacteriana, peso seco e concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis nos biofilmes. A morina liberada desses sistemas reduziu a viabilidade de todos os grupos microbianos analisados, assim como o peso seco e a concentração de polissacarídeos insolúveis na matriz, além de controlar a acidogenicidade quando comparada ao grupo controle sem a substância. Em resumo, a morina demonstrou ser um agente eficaz, apresentando atividade antimicrobiana e antibiofilme também contra biofilmes polimicrobianos.

Sales et al.¹¹¹ (2023) buscaram desenvolver um sistema multiparticulado utilizando polímeros de alginato de sódio/goma gelana para a liberação controlada de morina, empregando parâmetros padronizados no processo de spray-dryer. A otimização desses parâmetros foi realizada visando obter os maiores rendimentos possíveis, e os resultados indicaram eficácia no encapsulamento e na liberação controlada da morina. Os sistemas que continham morina demonstraram uma redução significativa na biomassa do biofilme de *S. mutans*, na viabilidade microbiana e na acidogenicidade quando comparados aos seus respectivos controles.

3.4 Biopolímeros

Os polímeros são compostos por unidades monoméricas que se ligam

covalentemente, formando moléculas de grande porte. Existem diversos tipos de polímeros amplamente utilizados no dia a dia, e a maioria deles é produzida de maneira convencional a partir de fontes de combustíveis fósseis, como petróleo bruto, carvão e gases naturais. Apesar das numerosas vantagens desses polímeros tradicionais, seu uso é desencorajado devido à sua falta de biodegradabilidade. Diante da crescente conscientização ambiental, a busca por alternativas de recursos renováveis tornou-se essencial para possibilitar a produção sustentável de polímeros^{112,113}.

Uma variedade extensa de fontes biológicas se encontra disponível como alternativas promissoras em substituição aos combustíveis fósseis e tem chamado atenção. Os biopolímeros (polissacarídeos e proteínas) podem ser definidos como polímeros naturais sintetizados por plantas, animais e microrganismos. Em comparação com os polímeros derivados de combustíveis fósseis, os biopolímeros apresentam diversas vantagens, como biodegradabilidade, não toxicidade e biocompatibilidade. Essas características fazem dos biopolímeros escolhas excepcionais para uma ampla gama de aplicações, abrangendo setores como medicina, farmacologia, embalagens, cosméticos, absorventes, eletrônica, agricultura, tratamento de água, tecidos de vestuário, plásticos e biossensores¹¹⁴. Entre os biopolímeros amplamente empregados, destacam-se as gelatinas, colágeno, dextrano, poliaminoácidos, albumina, carboximetilcelulose, pectina, agarose, carragenina, sulfato de celulose, ácido hialurônico, quitosana, ciclodextrinas, alginato e goma gelana¹¹⁵.

Ainda, os biopolímeros desempenham um papel crucial na elaboração de sistemas de liberação controlada de fármacos (SLCF). Na seleção do polímero adequado para uma aplicação específica, é fundamental considerar aspectos como biocompatibilidade tecidual e propriedades hidrofílicas ou hidrofóbicas, conforme destacado por Lopes¹¹⁶ (2005) e Coimbra¹¹⁷ (2010). Além disso, é essencial observar propriedades como biodegradação e bioerosão, que também devem ser biocompatíveis, durante o processo de escolha¹¹⁷. Outro ponto relevante é a mucoadesão, que descreve a interação entre a superfície do polímero e a mucina. Os grupos hidrofílicos constituintes dos polímeros interpenetram-se entre as cadeias de mucina, estabelecendo um contato íntimo entre as superfícies, conforme explicado por Shaikh et al.¹¹⁸ (2010).

No contexto do desenvolvimento de SLCF, os principais objetivos incluem a

habilidade de regular as concentrações plasmáticas do composto ativo no determinado período. Esse controle possibilita um efeito farmacológico estendido e uma liberação lenta, contribuindo para a integridade dos compostos ao minimizar a incidência de efeitos adversos e tóxicos. A combinação de SLCF com biopolímeros mucoadesivos prolonga a permanência da formulação no local de ação, possibilitando uma atuação mais eficaz e específica. Além disso, essa associação favorece uma ação de longa duração, uma vez que evita a remoção do sistema do local de aplicação^{119,120}.

3.5 Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (HA) constitui-se como um biopolímero não ramificado, pertencente ao grupo de heteropolissacáridos glicosaminoglicanos (GAGs), que constituem os principais elementos da matriz extracelular¹²¹. Quimicamente, são compostos por duas unidades dissacarídicas repetidas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina, ligadas por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4 alternadas¹²². Possui natureza polar, portanto hidrofílica. O HA, em sua forma nativa, apresenta-se como um polímero de elevado peso molecular, superior a 1000kDa, presente, principalmente, em tecidos intactos, com potencial imunossupressor e anti-angiogênico. Contudo, sob condições específicas, a molécula de HA podem se fragmentar em biopolímeros menores com capacidade de induzir a inflamação e angiogênese¹²³.

Durante o ciclo celular, uma quantidade significativa de células humanas tem capacidade de produzir HA, contudo as células mesenquimais são consideradas a principal fonte¹²⁴. Diferentemente de outros glicosaminoglicanos (GAGs) que são, em sua maioria, sulfatados e sintetizados por enzimas do complexo de Golgi em associação com proteínas, o HA é produzido por uma classe de proteínas integrais denominadas hialurono sintases (HAS-1, HAS-2 e HAS-3) na face interna da membrana plasmática¹²⁵. A decomposição do HA, ocorre no organismo humano por meio de dois métodos distintos. Sendo o primeiro denominado mecanismo específico, este é majoritariamente, mediado por enzimas, conhecidas como hialuronidases (HYALs), enquanto o segundo é o mecanismo inespecífico e resulta em danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS)¹²⁶.

O HA tem ganhado destaque em outras áreas além de cosméticos. Devido a

sua facilidade de processamento, biocompatibilidade e poucos efeitos adversos podem ser extensamente empregados no âmbito dos biomateriais e como sistema de entrega de drogas¹²⁷. Recentemente, o HA tem sido utilizado como veículos para a administração e entrega de medicamentos, por diversas vias, incluindo nasal, oral, pulmonar, oftálmica, tópica e parentérica¹²⁸.

Bayer et al.¹²⁹ (2020) avaliaram o efeito de um hidrogel a base de HA com a finalidade de preservar biomateriais implantados após ortopedia, traumatologia e cirurgia dentária contra a formação de biofilme. Os achados disponíveis indicam que o HA possui uma antidesiva/antibiofilme comprovado, in vitro, contra alguns dos patógenos mais frequentes, reduzindo as bactérias aderentes em relação aos discos de controle, nos tempos de 15,30,60 e 120 minutos em 84%, 72,8%, 72,3% e 63,3%, respectivamente. Além disso, quando associados a diferentes antibióticos apresentaram um sinergismo na redução do biofilme.

Contardi et al.¹³⁰ (2020) analisaram o efeito bicamada à base de polivinilpirrolidona (PVP)/ácido hialurônico (HA) para administração sequencial de anti-séptico e antibiótico cutâneo. As películas da bicamada exibiram propriedades satisfatórias de aderência à pele humana, e a interação entre o PVP e o HA ocorreu por meio de ligações de hidrogênio, resultando na liberação controlada do antibiótico ao longo de um período de 5 dias. A atividade antibacteriana do material contra os microrganismos Gram-positivos (*S. aureus*) e Gram-negativos (*E. coli* e *P. aeruginosa*) produziu uma zona de inibição de 30,6 ($\pm$ 1,9) mm em *S. aureus* e 42,9 ($\pm$ 3,2) e 39,5 ($\pm$ 2,0) mm em *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente, confirmando as suas propriedades antibacterianas.

Palumbo et al.¹³¹ (2015) sintetizaram copolímeros de HA incorporando grupos de polimetacrilato, visando sua aplicação em hidrogéis para a liberação controlada de vancomicina com o propósito de prevenir a colonização por *Staphylococcus aureus*. Foi demonstrado que os géis mantêm a liberação do fármaco por mais de 48 horas. Adicionalmente, os testes de adesão comprovaram, por meio de placas de cultura de vidro e superfícies de titânio com hidroxiapatita que os hidrogéis de HA impediram a adesão bacteriana mesmo sem a vancomicina.

Liao et al.¹³² (2020) desenvolveram um hidrogel de HA oxidado dihidrazida de ácido adípico carregado com vancomicina com o intuito de verificar a biocompatibilidade e atividade antimicrobiana em modelo de biofilme. O gel carregado com antibiótico era biocompatível com células mesenquimais, MC3T3 e fibroblastos

murinos L929. As zonas de inibição in vitro do hidrogel carregado com vancomicina foram de 21, 13, 9 e 5 mm, respetivamente. No modelo de biofilme do implante Ti6Al4V, o gel carregado com vancomicina a 0,01-1% apresentou uma atividade anti-biofilme significativa, medida pelo ensaio MTT.

3.6 Filmes Orodispersíveis para a Entrega de Fármacos

Os filmes orodispersíveis (FODs) tem como mecanismo de ação a dissolução na boca ao entrar em contato com a saliva, dispensando a necessidade de água, permitindo assim uma rápida absorção e administração do fármaco na corrente sanguínea ou um efeito local rápido. Isso resulta na formação de uma solução que pode ser facilmente engolida, promovendo comodidade aos pacientes. Principalmente aqueles que possuem dificuldade de deglutição, medo de engasgar e disfagia¹³³. Além disso, a incorporação de realçadores de sabor ou o emprego de técnicas de mascaramento de sabor de ingredientes farmacêuticos ativos (IFA) pode significativamente aumentar a aceitabilidade dessa forma de administração de medicamentos, especialmente em crianças¹³⁴. Os principais métodos utilizados para preparar FODs incluem a técnica de fundição por solvente, electrospinning, extrusão por fusão a quente e a técnica emergente de impressão 3D (3DP)¹³⁵.

Os constituintes dos filmes orodispersíveis podem divergir dependendo da formulação específica e da finalidade desejada. Entretanto, há compostos comuns presentes em diversas formulações, que incluem ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs), polímeros, plastificantes, adoçantes, aromatizantes, corantes, estimuladores salivares, estabilizadores, tensoativos e solventes¹³⁶.

Dentre os componentes acima, os polímeros representam cerca de 65% do peso com base no peso seco total da película, sendo considerado o principal componente dos FODs¹³⁷. Adicionalmente, devem apresentar algumas propriedades como resistência ao descolamento, cisalhamento, tração, baixa toxicidade, ausência de impurezas lixiviáveis, boa molhabilidade e espalhabilidade, e não promover infecções secundárias na mucosa oral ou nas regiões dentárias¹³⁸.

Na literatura, observa-se como principais polímeros sintéticos e semi-sintéticos empregados a polivinilpirrolidona (PVP), o álcool polivinílico (PVA), o óxido de polietileno (PEO), a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), a hidroxipropilcelulose (HPC), a carboximetilcelulose (CMC), o polietilenoglicol (PEG) e a poli(ε-caprolactona) (PCL).

Também são utilizados polímeros naturais, tais como pululano, amido, maltodextrina, pectina, gelatina, alginato e quitosana¹⁴.

As formulações orodispersíveis tem ganhado destaque no mercado farmacêutico, uma vez que sua administração tem como finalidade aprimorar a biodisponibilidade de certos medicamentos, contribuindo para melhora da adesão e/ou a conformidade dos pacientes às prescrições médicas. Nesse contexto, Serrano et al.³¹ (2019) investigaram o efeito de filmes orodispersíveis de anfotericina B para a candidíase orofaríngea. O filme orodispersível demonstrou rápida desintegração (60 ± 3 segundos), liberação eficiente em saliva artificial ($>80\%$ em 10 minutos), alta resistência à ruptura (2190 mN mm), boa estabilidade química (1 ano em condições refrigeradas e 2 semanas em temperatura ambiente) e eficácia significativa contra diversas espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, com halo de inibição >15 mm).

Dodo et al.¹³⁹ (2020) verificaram o potencial efeito de filmes orodispersíveis de *Streptococcus salivarius* contendo xilitol no tratamento da cárie dentária. Observou-se que a formulação reduziu a população de *S. mutans* de 7,9 para 5,04 Log CFU/mL pós-calorimetria (aproximadamente 3 Log de redução). Também se observou uma diminuição gradual da população de *S. mutans* com o aumento dos volumes supernadante de *S. salivarius*, o que indica a supressão do agente patogénico. Logo, a formulação reduziu quase completamente a população de *S. mutans*, comparável a um efeito esperado de um medicamento antimicrobiano.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

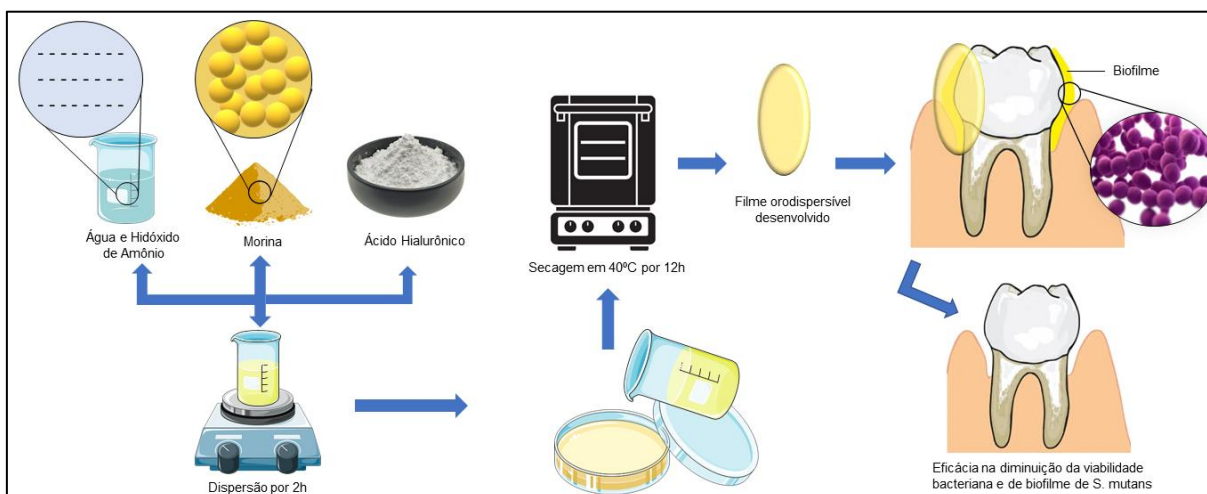
Os materiais e métodos estão apresentados entre: desenvolvimento de filmes orodispersíveis, espessura, espectroscopia vibracional da região do infravermelho com transformada em Fourier, espectroscopia na região do Ultravioleta-visível, análise termogravimétrica e termogravimetria derivada, determinação da viabilidade celular, avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme, microscopia eletrônica de varredura, ensaios mecânicos, determinação do perfil de liberação *in-vitro* da morina, curva de calibração, estudo de dissolução *in-vitro*, análise dos mecanismos de liberação *in-vitro* da morina e planejamento estatístico e análise dos dados.

4.1 Desenvolvimento de Filmes Orodispersíveis

O HA de média massa molar (MMW) da marca Inovasell, fornecido pela empresa BioSmart Nanotechnology LDTA, e o Hidrato de Morina, adquirido comercialmente pela Sigma-Aldrich, foram utilizados na produção de filmes orodispersíveis. Estudos pilotos, cujos dados não foram apresentados, foram conduzidos para avaliar diferentes concentrações de HA e morina. As concentrações de 0,2% m/m e 3% m/m, respectivamente, demonstraram os melhores resultados nos testes preliminares, devido à características físico-químicas e foram selecionadas para os testes finais.

O biopolímero e o flavonoide foram dispersos em 50 mL de água deionizada e 650 µL de hidróxido de amônio, sendo em seguida submetidos a um agitador magnético operando a 250 rpm por 2 horas. A solução final foi colocada em placas de Petri e submetida ao método de *casting* a uma temperatura de 40°C ao longo de 12 horas (Figura 4).

Figura 4 - Graphic abstract do desenvolvimento de FODs



Fonte: Elaboração própria.

4.2 Espessura

Para a análise da espessura dos filmes orodispersíveis foram feitas medidas em 3 pontos aleatórios de cada filme (n=11) por meio de um Micrômetro Digital (Digimess).

4.3 Espectroscopia Vibracional da Região do Infravermelho com Transformada em Fourier (FTIR)

Os espectros foram adquiridos por meio do emprego do espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer, programado para operar em modo de refletância total atenuada (ATR). A coleta dos espectros referentes aos filmes orodispersíveis, constituídos de HA e morina, foi realizada na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} .

4.4 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis)

A transmitância UV-vis dos filmes foi quantificada por meio da utilização de um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Lambda 365n, abrangendo a faixa espectral de 200 a 800 nm.

4.5 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG)

As características térmicas dos filmes à base de HA foram determinadas por meio de análises termogravimétricas (TGA) e termogravimetria derivada (DTG). A instrumentação utilizada para a obtenção das curvas foi o equipamento TA Instruments SDT Q600, empregando fluxo contínuo de nitrogênio (100 mL/min) com taxa de aquecimento de 10°C/min. As análises foram realizadas utilizando um intervalo de temperatura de 35 a 600 °C, e as amostras, pesando 6 mg, foram testadas em conjunto com um cadinho de Alumina como referência.

4.6 Determinação da Viabilidade Celular

Fibroblastos murinos derivados de tecido conjuntivo (L929) adquiridos da ATCC (*American Type Culture Collection*) e queratinócitos orais derivados da mucosa oral (NOK-1), que foram gentilmente cedidas pelo laboratório da Prof^a. Gisele Faria da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP, foram cultivados em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL) e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Após o crescimento adequado das células, foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células/poço. A placa foi incubada por 24 horas em uma atmosfera de 37°C e 5% de CO₂. Concomitantemente ao cultivo das células, os tratamentos contendo os filmes de HA/morina foram preparados de acordo com a ISO 10993- 12¹⁴⁰. Para tal, 3 cm² de cada amostra foram dispostos em tubo cônico de 15 mL e mantidos sob radiação ultravioleta por 30 minutos. Em seguida, 6 mL de meio de cultura (DMEM + 10% de soro fetal bovino) foram adicionados em cada tubo. As amostras em contato com os meios foram deixadas sob agitação por um período de 24 horas a 37°C. Após o término da agitação, os meios de extração oriundos de cada amostra foram adicionados sobre a monocamada celular empregando 100 µL/poço, com posterior incubação em estufa de CO₂ por mais 24 horas. Transcorridas às 24 horas de tratamento, foi realizada a remoção dos meios e a lavagem com solução fosfatada salina (PBS 1X) 2x. Finalizado essa etapa, 100 µL de MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) previamente diluído na concentração de 1 mg/mL foram adicionados em cada poço.

A placa foi incubada por um período 3 horas a 37°C, protegidos da luz, até a observação da formação dos cristais violeta de formazana. Após o término do período de incubação, o MTT foi aspirado dos poços e os cristais de formazana formados, na presença de mitocôndrias ativas, foram dissolvidos adicionando-se 50 µL de álcool isopropílico absoluto.

Os valores de absorbância (Abs) foram obtidos em espectrofotômetro de microplacas (SoftMax® Pro 5), com comprimento de onda a 570 nm. Como controle de sobrevivência, as células foram tratadas com DMEM + 10% SFB, enquanto como controle de branco, os poços foram mantidos somente com os reagentes empregados em cada etapa do ensaio. Os experimentos foram feitos em triplicata, em três ensaios independentes, incluindo os controles¹⁴¹. Com os valores de Abs, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100%), conforme apresentado pela equação abaixo (norma ISO 10993-5)¹⁴²:

$$\frac{(Abs \text{ da amostra} - Abs \text{ branco})}{(Abs \text{ do controle de sobrevivência} - Abs \text{ branco})} \times 100$$

4.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme

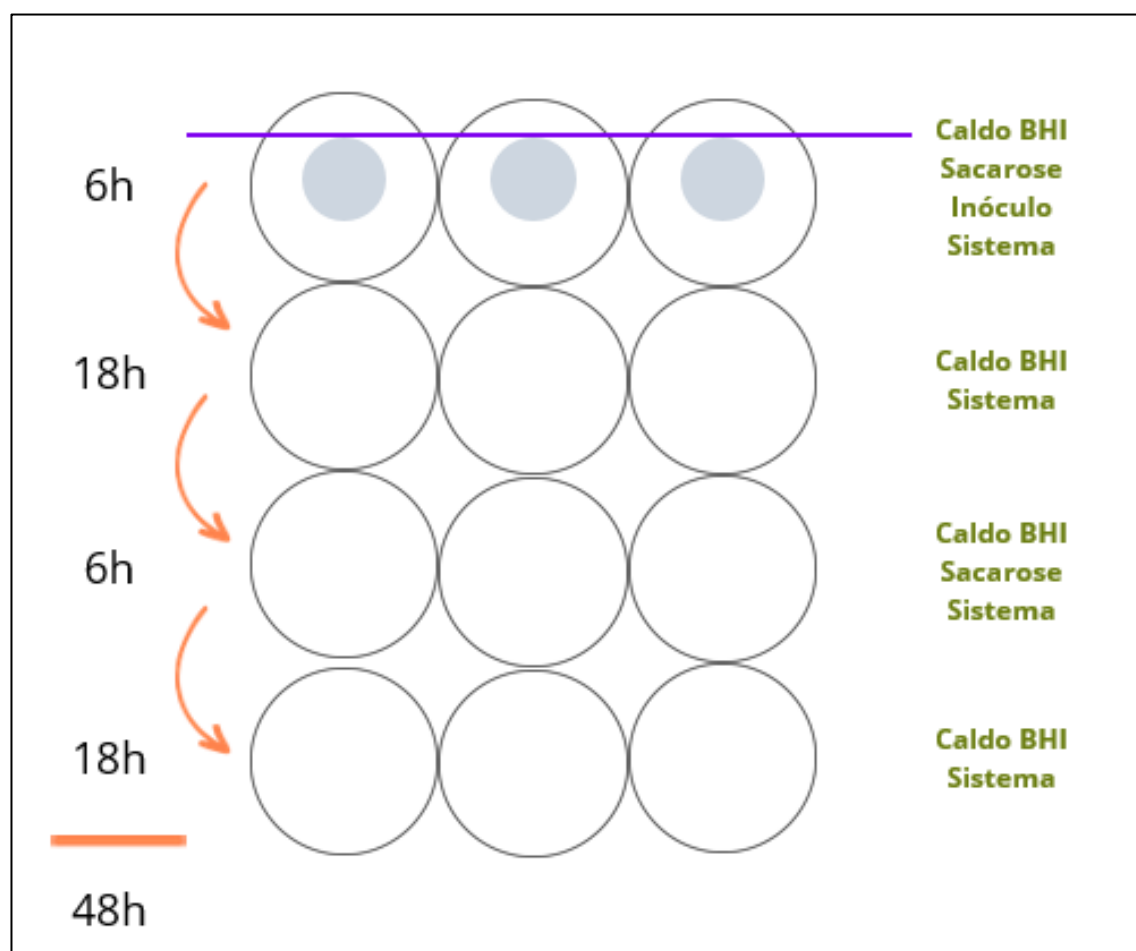
Os filmes orodispersíveis foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre biofilmes de *S. mutans*. A cepa de referência utilizada foi *Streptococcus mutans* UA159, mantidos e reativados conforme descritos por Brighenti et al.¹⁴³ (2014).

Foram utilizados filmes contendo morina e filmes sem morina, considerados brancos. Todos esses sistemas foram adicionados aos poços no tempo inicial (t=0). Uma massa de filme equivalente a 2,4mg foi adicionada aos poços, tendo como base os achados de Farias et al.¹¹⁰ (2020), o que corresponde a 5 discos de 16 mm².

Para crescimento dos biofilmes de *S. mutans*, foi utilizado um modelo de aderência ativa ¹⁴⁴. Neste modelo, a formação de biofilme ocorre apenas com células com capacidade de adesão. Lamínulas de vidro (Ø 13 mm; n=10/grupo) fixas em um dispositivo de aderência ativa foram previamente esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos e, em seguida, secos em estufa. Esse dispositivo foi transferido para placas de 24 poços contendo 2,2 mL do caldo BHI suplementado com 1% de sacarose

e o inóculo microbiano, preparado utilizando uma suspensão microbiana contendo 5×10^7 UFC/mL e adicionado em caldo BHI para obtenção de uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL de *S. mutans*. As placas foram incubadas a 37 °C em 5% de CO₂ durante 48 horas. O meio de cultura foi renovado a cada 6 ou 18 horas (Figura 5), seguindo o modelo intermitente de exposição à sacarose descrito por Van de Sande et al.¹⁴⁵ (2011) e modificado por Albuquerque et al.¹⁴⁴ (2018). Como controle de crescimento, foram utilizados biofilmes sem tratamento com os filmes.

Figura 5 – Ilustração do dispositivo de aderência ativa e troca de poços, totalizando 48 horas de experimento



Fonte: Elaboração própria.

Após 48 horas de experimento, as lamínulas de vidro contendo os biofilmes foram colocadas em tubos de vidro contendo solução salina NaCl 0,9%, onde os biofilmes foram dispersos utilizando o banho de ultrassom¹⁴⁴. A suspensão bacteriana resultante foi diluída, semeada em ágar BHI e incubada a 37°C em 5% CO₂ por 48

horas. Os resultados foram expressos em log (1+ UFC/mL). Para análise da atividade antibiofilme dos filmes contendo morina, outro conjunto de biofilme foi cultivado nos mesmos padrões anteriormente descritos para análise da capacidade antibiofilme por meio da quantificação da biomassa (coloração por cristal violeta; de Farias et al.¹¹⁰). Os resultados foram expressos em intensidade de absorbância (A570).

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliação da morfologia de superfície e da seção transversal dos filmes foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura - Marca: Leo - Modelo: 440. Os filmes foram previamente metalizados em ouro e análise das seções transversais, os filmes foram seccionados através do corte criogênico.

4.9 Ensaios Mecânicos

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas a partir de análises de tensão em um analisador de textura (TA.XT Plus, Stable Micro Systems) equipado com uma célula de carga de 50kg.f (500N). O preparo das amostras e execução dos testes foram realizados de acordo com normas da American Society for Testing and Materials (ASTM¹⁴⁶ 2018). Os corpos de prova (n=5) foram confeccionados com dimensões de 80 mm de comprimento, 20 mm de largura, e espessura média de 0,012 mm para filmes de HA e 0,027 mm para filmes de HA e morina.

Os corpos de prova foram mantidos em atmosfera controlada, com o auxílio de um dessecador, em temperatura constante de 25°C e umidade relativa igual a 55% durante 48 horas. Em seguida, os corpos de prova foram submetidos aos testes de tração, sendo considerada uma área de estresse igual a 128 mm² e velocidade de 0,064 mm/s. Foram determinados, a tensão de ruptura, a porcentagem de deformação e o módulo de elasticidade (Módulo de Young) dos filmes.

4.10 Determinação do Perfil de Liberação *In Vitro* da Morina

Para determinar o perfil de liberação *in-vitro* da morina foram propostos as seguintes análises: curva de calibração, estudo de dissolução *in-vitro*, análise dos mecanimos de liberação *in vitro* da morina.

4.10.1 Curva de calibração

A curva de calibração foi elaborada utilizando solução-estoque de 10mg morina, previamente solubilizada em 8mL de água destilada, com posterior adição de NaOH e banho ultrassônico por 10 minutos a 20 Hz. A partir dessa solução, preparou-se cinco diferentes concentrações, sendo elas: 2,5 ug/mL, 5 ug/mL, 10 ug/mL, 15 ug/mL e 20 ug/mL. A absorbância foi medida em comprimento de 389 nm. As análises foram conduzidas em triplicata. A plotagem do gráfico, determinação da linearidade (R^2) e equação da reta foram realizados no software Excel.

4.10.2 Estudo de dissolução *in vitro*

Para determinar o perfil de dissolução *in vitro* da morina incorporada em HA/NH₄OH/H₂O, com um diâmetro equivalente a 9 cm², empregou-se o dissolutor modelo 299 (Ethik), aplicando o método de dissolução com o uso do cesto rotatório, cujo movimento rotativo durante todo o ensaio garante a dissolução das amostras no meio (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Foi utilizado como meio de dissolução uma solução aquosa de tampão fosfato pH 7,4. O meio de dissolução foi mantido sob temperatura de $37 \pm 0,5$ °C durante todo o ensaio. Os filmes de HA incorporados com morina foram imersos nas cubas do dissolutor com 400 mL do meio de dissolução e foram mantidos em agitação na velocidade de 50 rpm. Alíquotas (1 mL) do meio foram coletadas em diferentes intervalos de tempo: 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 210, 240 e 330 minutos, sendo feita a reposição imediata de solução tamponada (1mL). Os valores de absorbância para a quantificação de morina foram determinados por Espectroscopia UV-Vis (Perkin Elmer modelo Lambda 365n), com leitura no comprimento de 389 nm. As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$), em dois ensaios independentes.

4.10.3 Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* da morina

Para compreender os mecanismos associados ao processo de liberação do fármaco, os dados obtidos foram submetidos a análise por diferentes modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Primeira ordem, Hixson-Crowell e Weibull) e os coeficientes de correlação ajustado (R^2) foram determinados.

4.11 Planejamento Estatístico e Análise dos Dados

Os dados foram analisados com o programa GraphPad Prism 8.0. Foi realizado teste de distribuição amostral (Shapiro-Wilk) para aplicação posterior do teste de variância ANOVA, seguida do pós-teste Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em: espessura, espectroscopia vibracional da região do infravermelho com transformada em Fourier, espectroscopia na região do ultravioleta visível, análise termogravimétrica e termogravimetria derivada, determinação da viabilidade celular, avaliação da atividade antimicrobiana e antitubofilme, microscopia eletrônica de varredura, ensaios mecânicos, determinação do perfil de liberação *in-vitro* da morina e análise dos mecanismos de liberação *in-vitro* da morina.

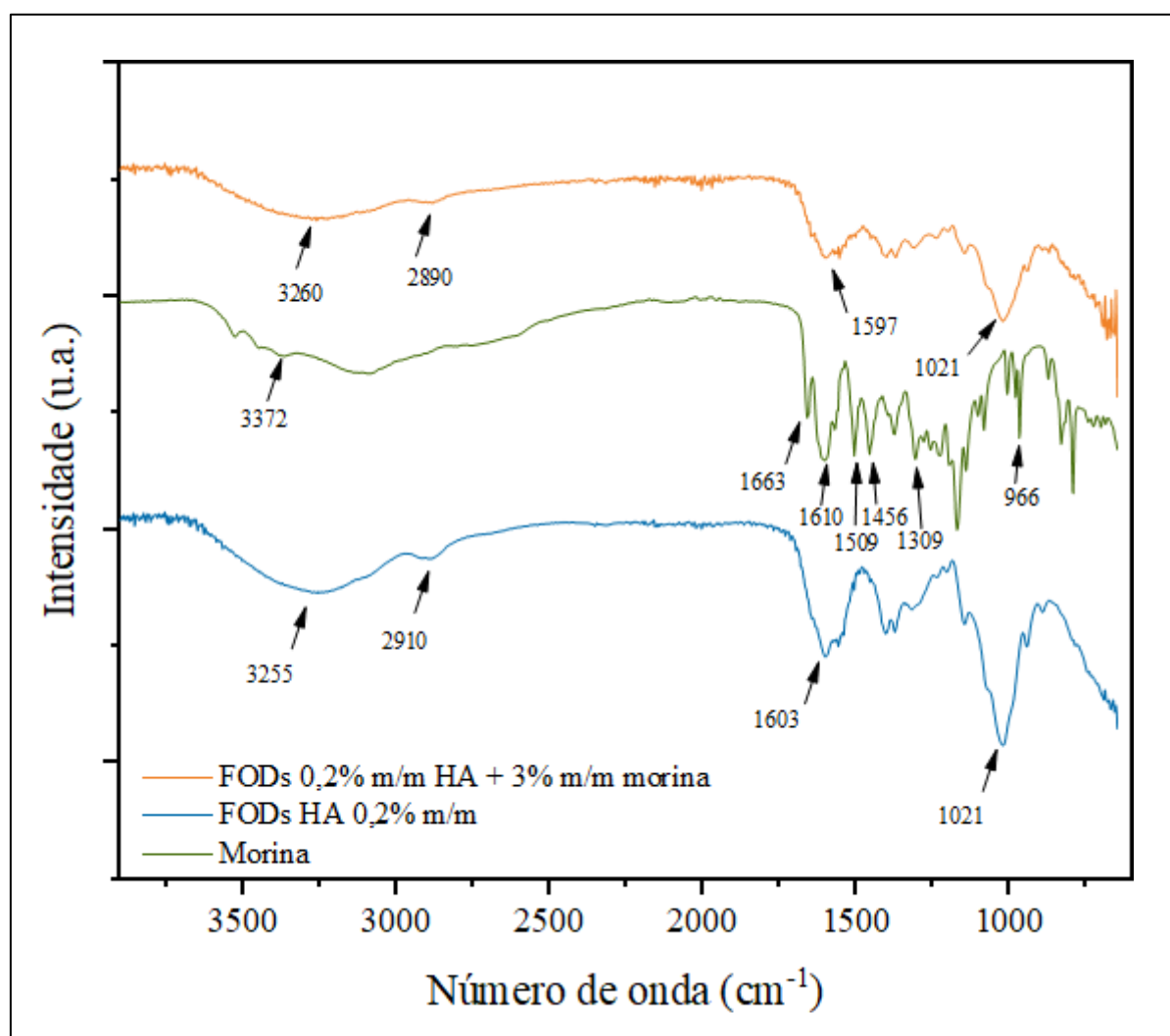
5.1 Espessura

Os FODs baseados em HA MMW apresentaram uma espessura média de $12 \pm 0,003 \mu\text{m}$, enquanto os FODs baseados em HA e morina apresentaram uma espessura média de $27 \pm 0,009 \mu\text{m}$, indicando que a adição de morina nos filmes contendo HA resultaram em um aumento significativo dessa propriedade.

5.2 Espectroscopia Vibracional da Região do Infravermelho com Transformada em Fourier (FTIR)

A fim de identificar os grupos funcionais característicos dos principais compostos presentes na composição dos filmes desenvolvidos, foram conduzidas análises de Espectroscopia de Infravermelho Transformada em Fourier (FTIR). Os espectros FTIR correspondentes aos sistemas em questão são apresentados na Figura 6.

Figura 6 - Espectros FTIR da morina e dos FODs baseados em 0,2% m/m HA 0,2% m/m HA + 3% m/m morina

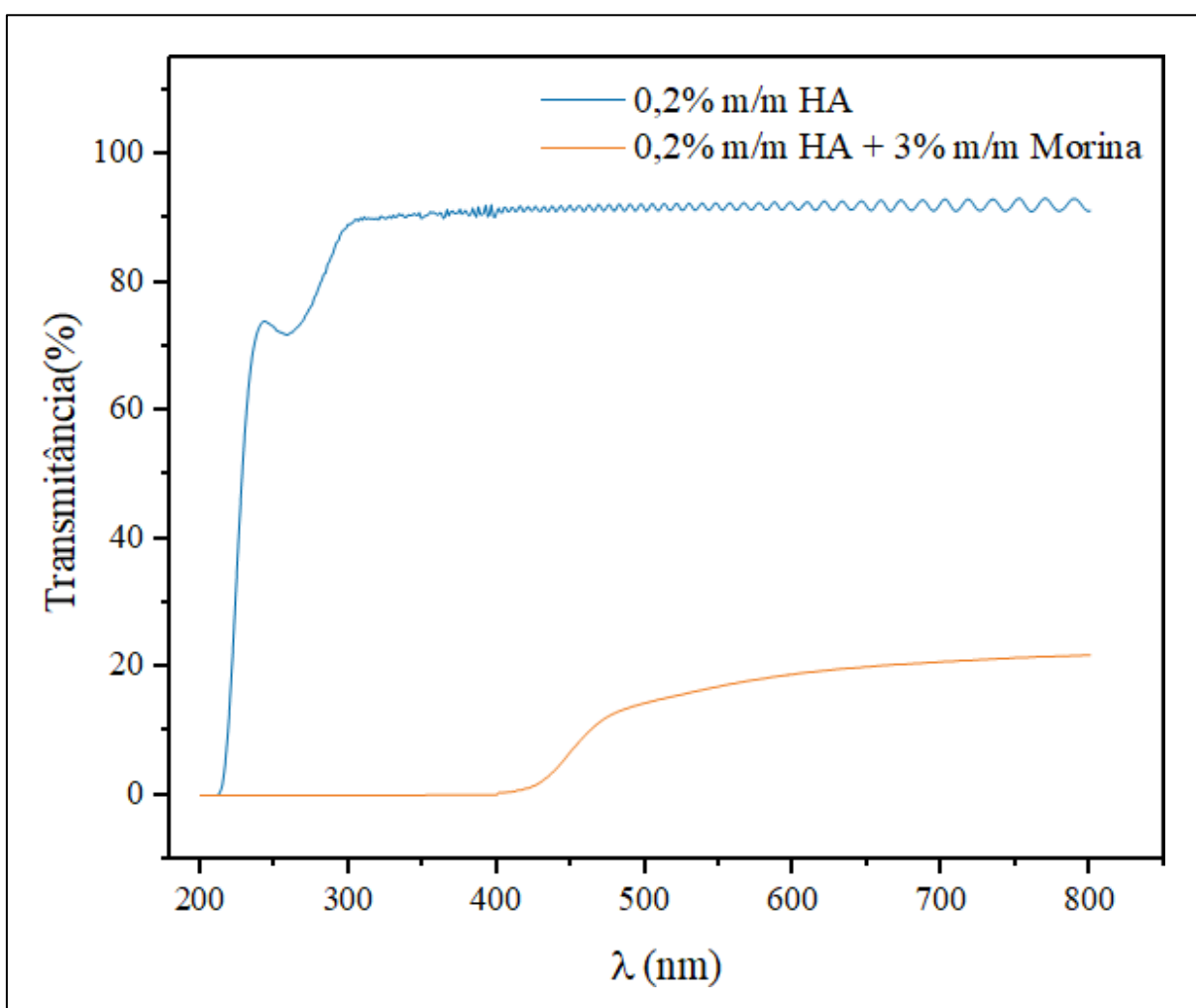


Fonte: Elaboração própria.

5.3 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis)

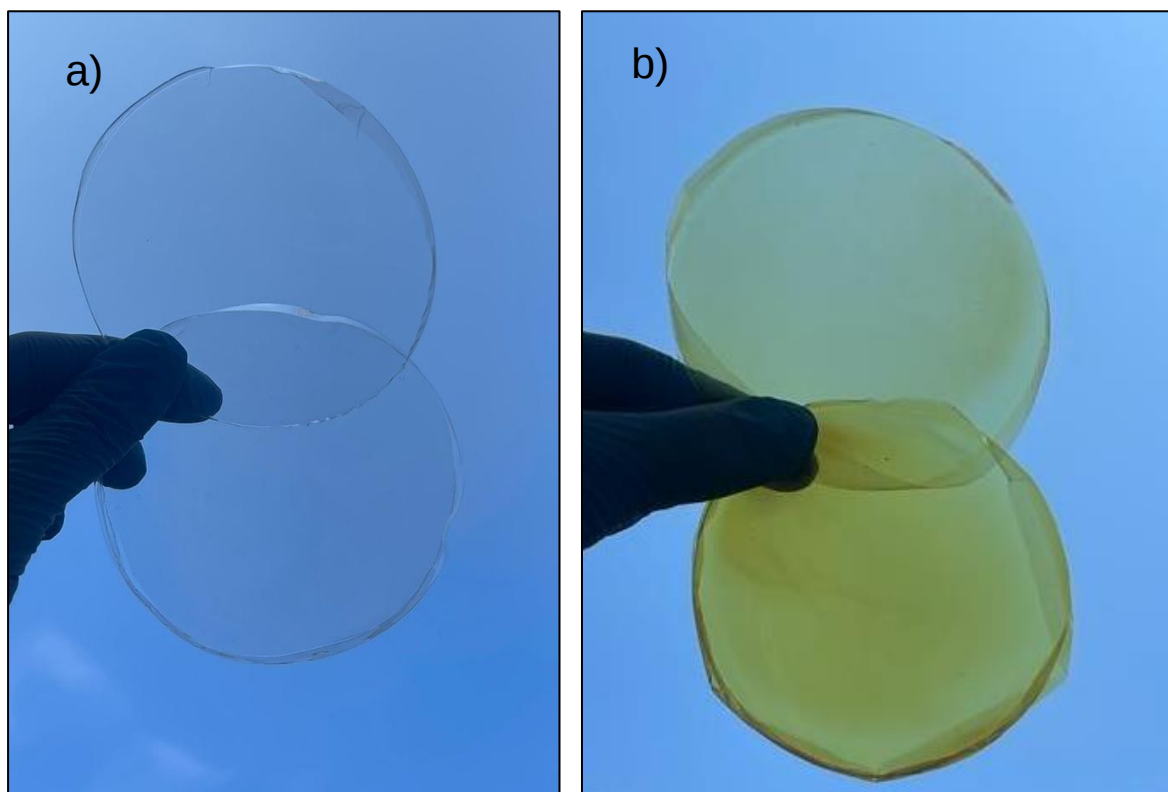
Os resultados das análises espectrofotométricas UV-vis, centradas na região do espectro visível (400-800 nm), revelam que a transmitância para filmes à base de HA varia de forma distinta em relação à filmes com morina, observados na Figura 7 e corroborados em análises visuais representados na Figura 8.

Figura 7 - Medida de transmitância dos FODs baseados em 0,2% m/m HA e 0,2% m/m HA + 3% m/m morina no espectro de luz visível



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Análise visual dos FODs dos filmes desenvolvidos



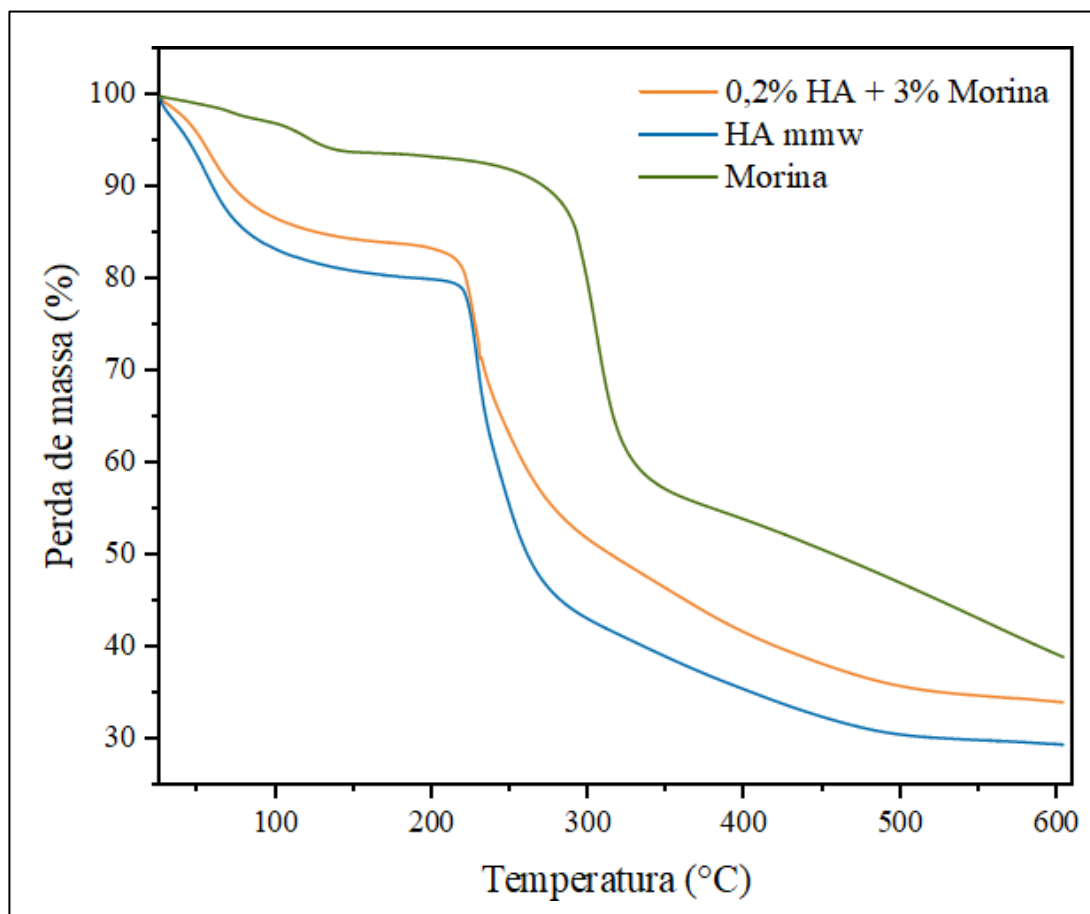
Sendo (a) para imagem de filmes baseados em HA 0,2% m/m e (b) representada pelos filmes baseados em HA 0,2% m/m e morina 3% m/m.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

5.4 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG)

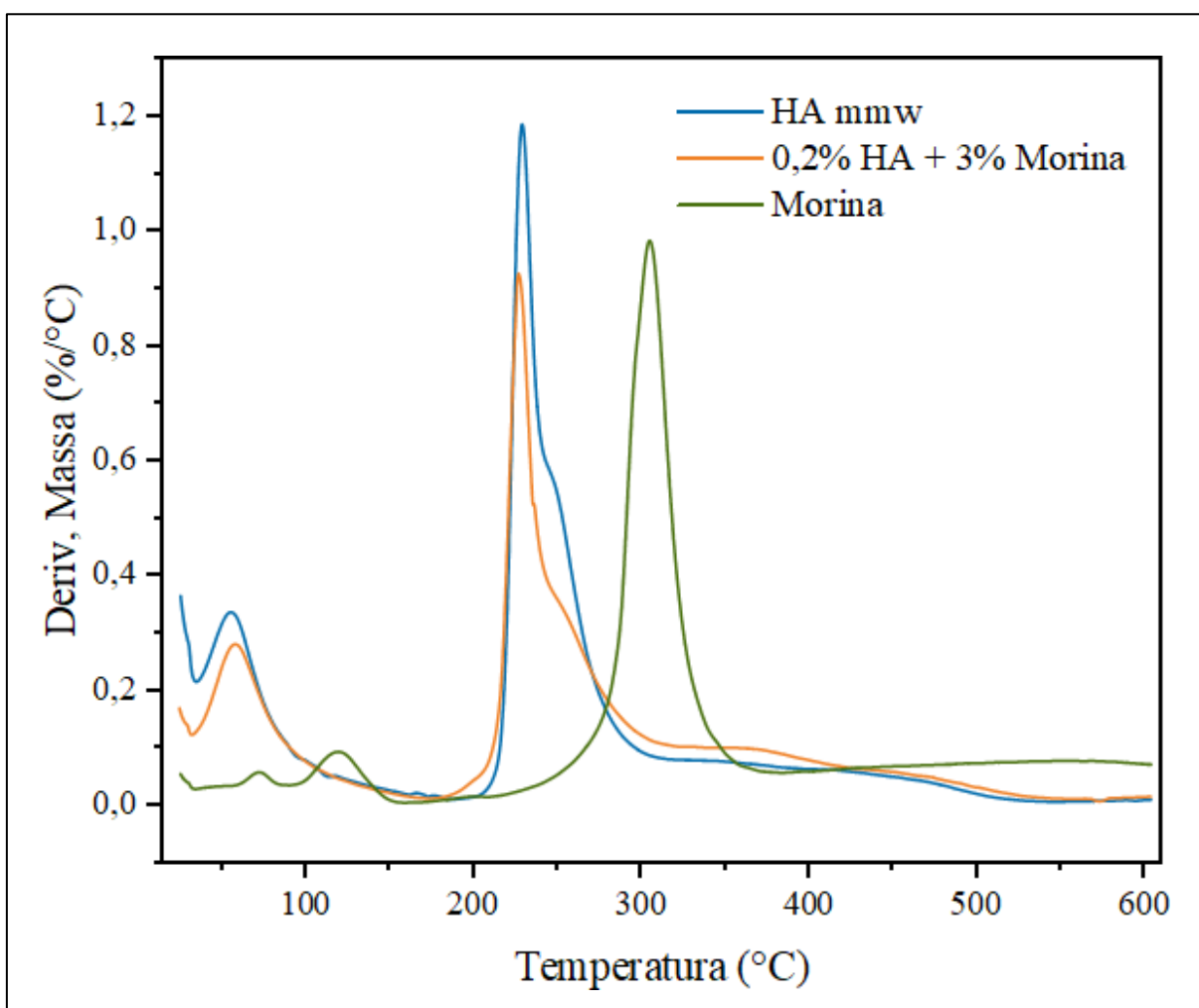
Os métodos termoanalíticos de análise, como a termogravimetria (TG) e a termogravimetria derivada (DTG), são utilizados para estudar a decomposição térmica de materiais. A termogravimetria (Figura 9) acompanha a perda de massa da amostra em função da temperatura, enquanto a termogravimetria derivada (Figura 10) fornece a derivada primeira da curva termogravimétrica em função da temperatura. Essas análises são úteis para determinar as temperaturas de início e fim da decomposição, também denominados como eventos térmicos, bem como a taxa de decomposição dos materiais.

Figura 9 - Curva TGA comparando HA MMW; FODs desenvolvido 0,2% m/m HA + 3% m/m morina e morina



Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 - Curva DTG comparando HA MMW; FODs desenvolvido 0,2% m/m HA + 3% m/m morina e morina

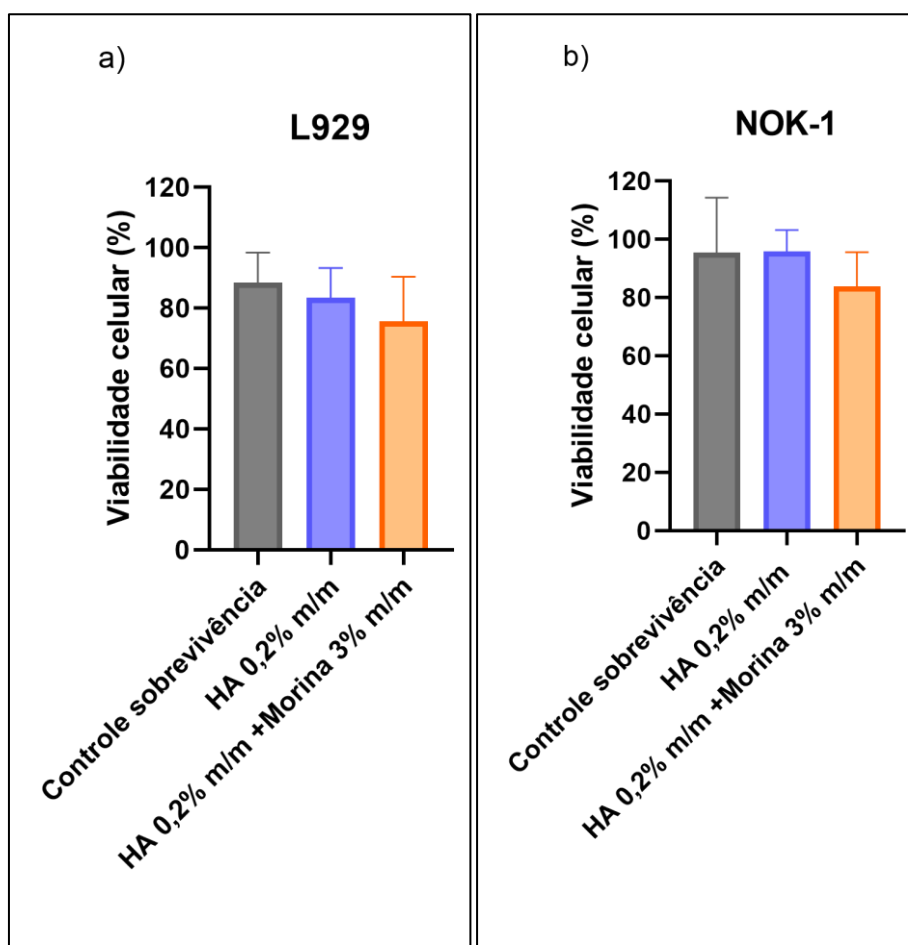


Fonte: Elaboração própria.

5.5 Determinação da Viabilidade Celular

Os resultados das análises de determinação da viabilidade celular, empregando o método indireto colorimétrico MTT, das linhagens L929 e NOK-1, estão representados na Figura 11.

Figura 11 - Viabilidade celular das linhagens L929 (a) e NOK-1 (b) empregando o método indireto colorimétrico MTT

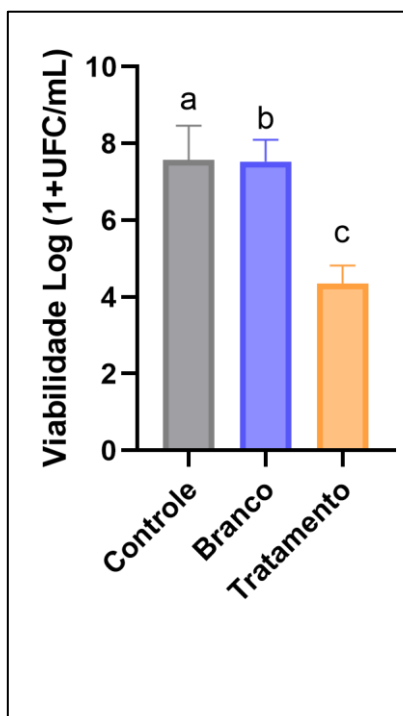


Fonte: Elaboração própria.

5.6 Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme

A viabilidade de *S. mutans* (Figura 12) foi significativamente menor na presença de morina em comparação à formulação sem morina (“branco”) e ao grupo controle.

Figura 12 - Viabilidade de biofilmes de *S.mutans* (Média $\pm$ DP) após tratamento. “Branco”: filmes de HA sem morina; “Controle”: sem tratamento; “Tratamento”: filmes de HA contendo morina. n=10

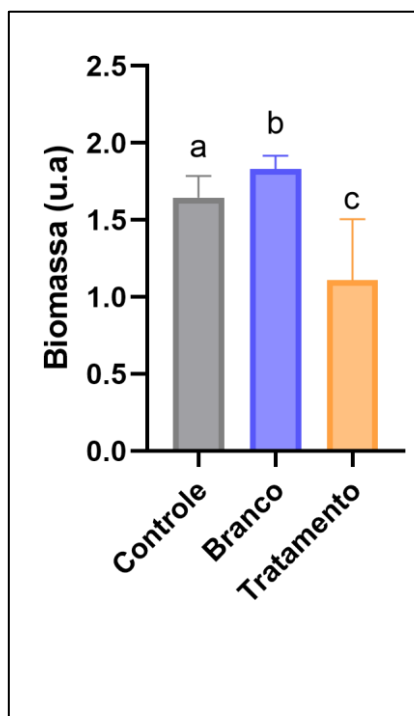


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, ANOVA ($p < 0,0001$), seguido do pós-teste de Tukey, (axb = p 0,890); (axc = $p < 0,001$); (bxc = $p < 0,0001$).

Fonte: Elaboração própria.

Além disso, a biomassa de *S. mutans* (Figura 13) foi significativamente menor na presença do filme contendo morina em comparação com o branco e o controle.

Figura 13 - Quantificação da biomassa de *S.mutans* (Média $\pm$ DP) após tratamento. “Branco”: filmes de HA sem morina; “Controle”: sem tratamento; “Tratamento”: filmes HA contendo morina. n=10



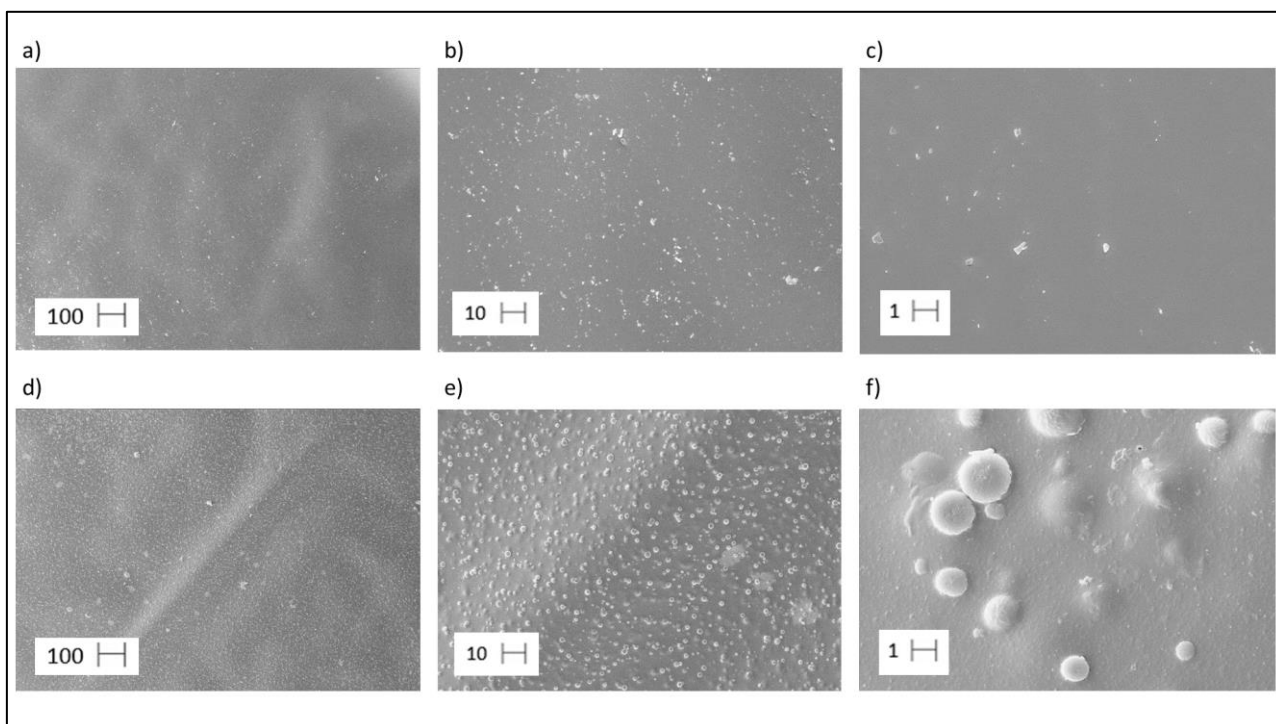
Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, ANOVA ($p < 0,0001$), seguido do pós-teste de Tukey, (axb = p 0,0022); (axc = p 0,0008); (bxc = $p < 0,0001$).

Fonte: Elaboração própria.

5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises da morfologia da superfície e das seções transversais foram realizadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), conforme evidenciado nas Figuras 14 e 15. As imagens de cada filme exibiram uma conformação caracterizada por apresentar superfície irregular, com a presença de HA e morina. As ampliações foram conduzidas em magnificações de 100x, 500x e 5000x, proporcionando uma análise detalhada das características morfológicas dos filmes.

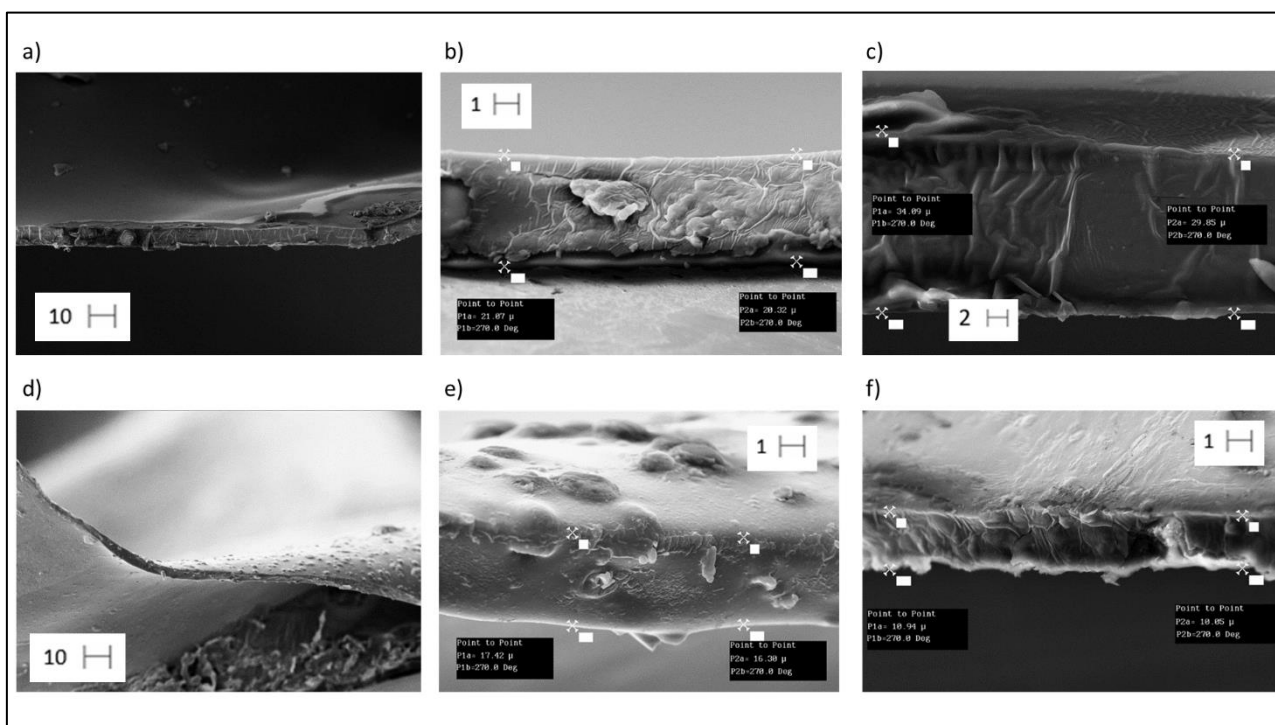
Figura 14 - MEV para avaliação da morfologia de superfície dos FODs desenvolvidos



Sendo: (a), (b) e (c) para FODs HA 0,2% m/m em magnificações 100x, 500x e 5000x;
(d), (e) e (f) para FODs HA 0,2% m/m + 3% m/m morina em magnificações 100x, 500x
e 5000x.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 15 - MEV para avaliação de secções transversais dos FODs desenvolvidos



Sendo: (a), (b) e (c) para FODs HA 0,2% m/m em magnificações 500x e 5000x; (d), (e) e (f) para FODs HA 0,2% m/m + 3% m/m morina em magnificações 500x e 5000x.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

5.8 Ensaios Mecânicos

A média das cinco réplicas submetidas ao ensaio de deformação do filme orodispersível baseado apenas em HA 0,2% m/m foi de 33% (± 12), enquanto para o filme contendo HA 0,2% m/m + morina 3% m/m foi de 23% (± 3).

A média das cinco réplicas submetidas ao ensaio de tensão na ruptura do filme orodispersível baseado apenas em HA 0,2% m/m foi de 16 MPa (± 2) e para o filme contendo HA 0,2% m/m + morina 3% m/m foi de 16 MPa (± 2).

A média das cinco réplicas submetidas ao ensaio do módulo de elasticidade do filme orodispersível baseado apenas em HA 0,2% m/m foi de 186 MPa (± 43), enquanto para o filme contendo HA 0,2% m/m + morina 3% m/m foi de 182 MPa (± 23).

Os resultados obtidos dos FODs desenvolvidos são ilustrados na Tabelas 1 e na Figura 16.

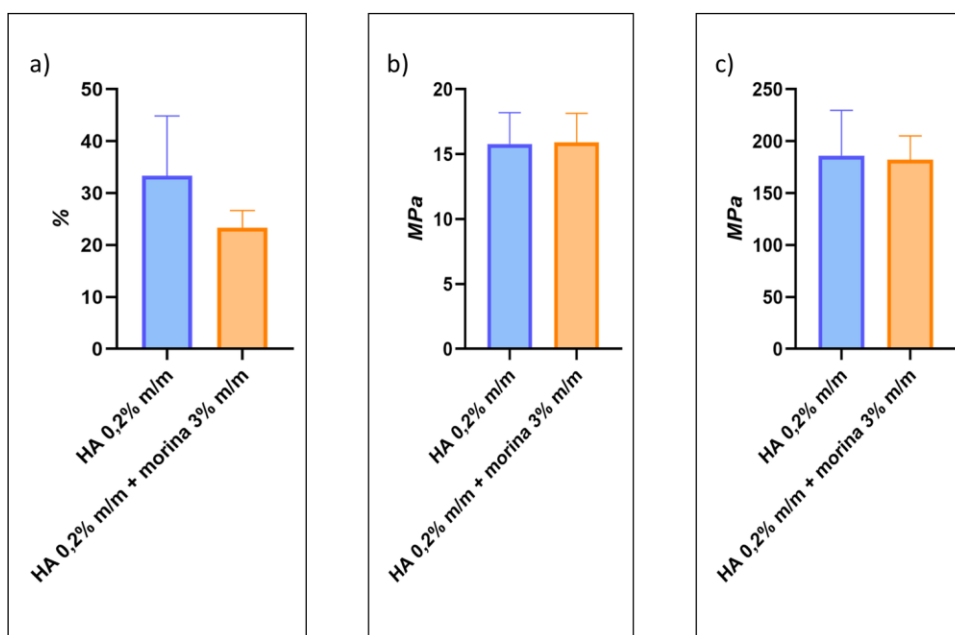
Tabela 1 - Média e desvio padrão submetidos ao ensaio mecânico de FODs 0,2% m/m HA e 0,2% m/m HA + morina 3% m/m

Filme HA 0,2% m/m	Deformação (%)	Tensão de ruptura (MPa)	Módulo de elasticidade (Young) (MPa)
Média	33	16	186
Desvio Padrão	12	2	43

Filme HA 0,2% m/m + 3% m/m morina	Deformação (%)	Tensão de ruptura (MPa)	Módulo de elasticidade (Young) (MPa)
Média	23	16	182
Desvio Padrão	3	2	23

Fonte: Elaboração própria.

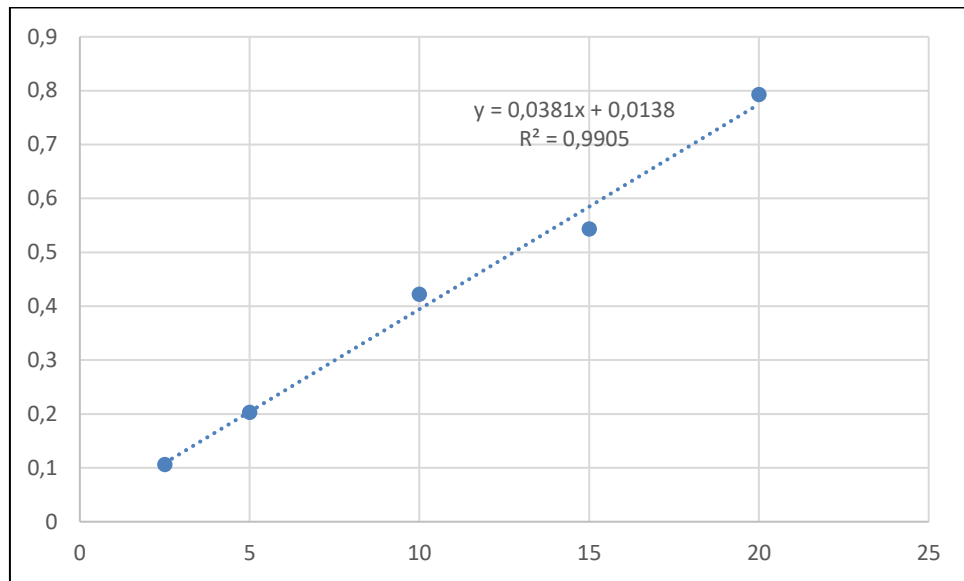
Figura 16 - a) Deformação; b) Tensão na ruptura; c) Módulo de Young de filmes baseados em HA 0,2% m/m e HA 0,2% m/m + morina 3% m/m



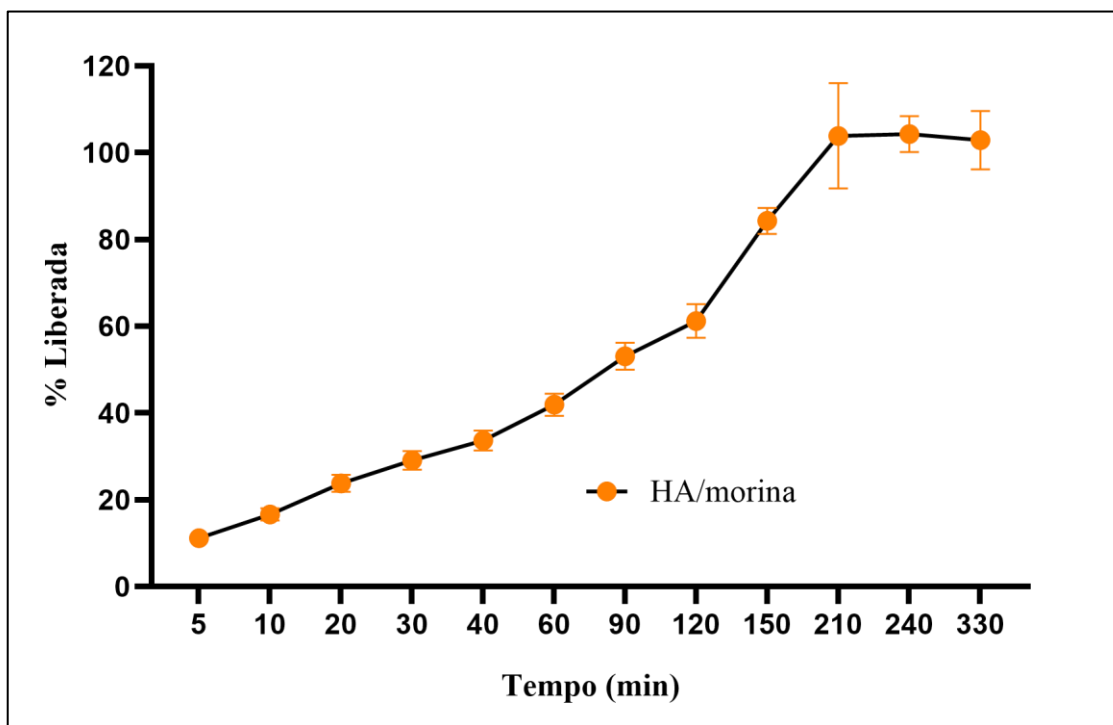
Fonte: Elaboração própria.

5.9 Determinação do Perfil de Liberação *in vitro* da Morina

Conhecendo o comprimento de onda adequado para o estudo com a morina, foi construída uma curva de calibração (Figura 17), obtendo-se a equação $y = 0,381x - 0,0138$, com coeficiente de correlação linear 0,9905 (R^2), na temperatura de 25°C, em seguida foi avaliado o perfil de liberação (%) morina versus tempo (Figura 18).

Figura 17 - Curva de calibração – Morina

Fonte: Elaboração própria.

Figura 18 - Perfil de liberação da morina versus tempo

Fonte: Elaboração própria.

5.10 Análise dos Mecanismos de Liberação *in vitro* da Morina

Os valores dos coeficientes de correlação ajustados (R^2) para os diversos modelos matemáticos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Coeficiente de correlação da morina liberada a partir de FODs HA/morina obtidos através de diferentes modelos matemáticos

Modelos de Liberação	Valor de R^2
Higuchi	0,9219
Korsmeyer-Peppas	0,9886
Primeira ordem	0,775
Hixson-Crowell	0,8298
Weibull	0,9886

R^2 = coeficiente de correlação ajustado. Valores em destaque indicam os modelos que apresentaram melhor correlação.

Fonte: Elaboração própria.

A partir dos valores de coeficiente de correlação ajustado (R^2), os modelos matemáticos que melhor se correlacionaram com os dados de liberação dos sistemas estudados foram o de Korsmeyer-Peppas e Weibull.

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a eficácia da morina, quando incorporada em sistemas mucoadesivos de liberação, contra microrganismos associados à cárie. Os resultados indicam que a morina demonstra um significativo potencial no controle de biofilmes.

Os filmes destinados à desintegração oral podem ser fabricados por meio da técnica de evaporação de solvente (solvent casting), do método de extrusão à quente (hot melt extrusion) ou por intermédio da impressão 3D. Contudo, a técnica de evaporação de solvente destaca-se como a mais amplamente empregada, dada a sua capacidade de produzir filmes com características físicas notáveis, uniformidade de espessura e principalmente na simplicidade de execução e custo reduzido^{147,148}.

Borges et al.¹⁴ (2015) avaliaram filmes dispersíveis presentes no mercado que possuíam espessuras entre 40-140 μm e constataram a necessidade da padronização da espessura de maneira uniforme em todo filme a fim de garantir a precisão da dose de fármaco. Entretanto, Kweon e Han¹⁴⁹ (2023), avaliaram que filmes de ácido hialurônico com diferentes m_w apresentaram espessuras entre 24-57 μm . Nos resultados desta pesquisa, observa-se que as espessuras dos FODs contendo morina apresentam $27 \mu\text{m} \pm 0,009$, indicando que a presença de morina nos filmes desenvolvidos resultam em um aumento significativo da espessura e corroboram com os dados obtidos na literatura e que a espessura influencia no processo de liberação, assim indiretamente na biositribuição e dose do IFA.

Nos espectros FTIR dos filmes orodispersíveis desenvolvidos, observam-se bandas situadas na faixa de 3255 a 3260 cm^{-1} , indicativas da presença de grupos –OH. A banda de 2890 a 2910 cm^{-1} está associada à ligação C-H. As bandas entre 1597 e 1603 cm^{-1} estão relacionadas ao grupo carbonílico C=O. A banda em torno de 1021 cm^{-1} corresponde às ligações C-C e C-O.

Para a morina, uma banda de intensidade significativa é observada a 3372 cm^{-1} devido ao grupo –OH. As bandas a 1610 cm^{-1} , 1509 cm^{-1} e 1456 cm^{-1} são atribuídas à vibração de estiramento C=C no anel aromático, enquanto a vibração de deformação –C-OH é observada a 1309 cm^{-1} . A banda a 966 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento -C-OH, assim como nos dados representados na literatura¹⁵⁰. De maneira geral, as mesmas bandas foram identificadas nos espectros dos filmes, sugerindo que a incorporação de morina não acarretou alterações significativas na estrutura química.

Nas análises de UV-vis, observa-se uma transmitância em torno de 90% para os filmes baseados exclusivamente em HA 0,2% m/m, diminuindo em torno de 15-20% quando incorporada uma concentração de 3% m/m morina. Estes resultados evidenciam uma correlação entre a morina e a transmitância dos filmes, corroborando com as observações macroscópicas realizadas durante a análise dos filmes orodispersíveis desenvolvidos.

Dois eventos de redução de massa podem ser discernidos a partir da análise da curva termogravimétrica (TG) e da termogravimetria derivada (DTG). A primeira perda de massa para todas as amostras investigadas ocorreu na faixa de temperatura de 40°C a 100°C. Esta etapa foi relacionada à perda de água e ácido residual por evaporação ou à redução do teor de umidade. O próximo estágio em 200-350°C foi atribuído à desassociação das cadeias e à degradação das amostras, em consonância com dados previamente documentados na literatura¹⁵¹. O aumento significativo da massa residual para 0,2%HA/3%Morina em relação ao HA sugeriu a presença de morina na matriz HA. A análise dos valores correspondentes da derivada da redução de massa ratifica a presença de dois picos em temperaturas correspondentes, correspondendo à evaporação da água e ao ponto de perda máxima de massa dos materiais.

Na análise de determinação da viabilidade celular, verificou-se que os filmes de HA a 0,2% m/m e aqueles incorporados com 3% m/m de morina não apresentaram citotoxicidade para as células L929 e NOK-1, mantendo a viabilidade celular acima de 70% (cut-off). Conforme estabelecido pela norma a ISO 10993-5, é necessário que a viabilidade celular seja superior a 70% para que os materiais ou dispositivos médicos submetidos aos testes sejam classificados como não tóxicos e seguros.

Devido às suas propriedades antimicrobianas, substâncias naturais têm despertado interesse crescente no contexto do controle de biofilmes e microrganismos orais^{152,153}. Dessa maneira, o estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme, teve como propósito avaliar in vitro a atividade antimicrobiana e antibiofilme de filmes orodispersíveis baseados em HA contendo morina para o controle de biofilmes bucais. Os resultados demonstraram que os filmes desenvolvidos contendo morina mostraram-se eficazes no controle de *S. mutans*, afetando sua viabilidade e biomassa, corroborando com os achados de Farias et al.¹¹⁰ (2020) e Sales et al.¹¹¹ (2023).

A aplicação de compostos extraídos de alimentos no controle de

microrganismos bucais tem sido proposta como uma alternativa aos antimicrobianos convencionais⁹. A inclusão desses alimentos funcionais em sistemas mucoadesivos de liberação pode ser altamente benéfica para a odontologia, prolongando o tempo de exposição dos agentes farmacológicos na cavidade bucal e mantendo suas concentrações terapêuticas¹²⁰. Além disso, o ensaio avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme teve o objetivo de analisar também a viabilidade biomassa do biofilme de *S. mutans*, que também foi afetada na presença do filme contendo morina.

Huang et al.¹⁰⁹ (2020) também observaram uma redução na formação de biofilme causada pela morina, embora nesse estudo não tenham utilizado um veículo para a utilização do fármaco. O mecanismo subjacente a essa diminuição, de acordo com Huang et al.¹⁰⁹ (2020), pode estar relacionado à falta da proteína Pac na superfície celular, mediada pela enzima sortease A.

Os flavonoides, incluindo a morina, possuem mecanismos antimicrobianos diversos, como inibição do metabolismo energético, da membrana citoplasmática e da síntese de ácidos nucleicos. Além disso, eles atuam nas porinas da membrana celular, na fixação e na formação de biofilme, na patogenicidade e na permeabilidade da membrana¹⁰⁵. Adicionalmente, a inibição da enzima sortease A (SrtA) é responsável por reduzir a adesão e a formação do biofilme de *S. mutans*¹⁰⁹, como discutido anteriormente. Embora o mecanismo exato pelo qual a morina controla a virulência do biofilme de *S. mutans* ainda não seja totalmente compreendido, é possível que um ou mais mecanismos associados aos flavonoides estejam envolvidos, o que deve ser avaliado no futuro.

O teste de tensão na ruptura revela a capacidade do material de resistir à deformação sem danos. Para realizar o teste, o filme é fixado entre dois grampos e submetido a uma tração até que ocorra a ruptura. Os valores obtidos indicam a viabilidade do material, pois mostram sua capacidade de suportar a deformação sem ser danificado^{154,155}.

Ao submeter uma amostra a um teste de tração, ocorre sua deformação, resultando em um aumento de seu comprimento, ou seja, em seu alongamento. Medir essa alteração é fundamental para avaliar a plasticidade do polímero sem causar danos ao material. Utilizando a equação ($\% E = [L - L_0] \times 100 / L_0$) é possível calcular a porcentagem de alongamento ao medir a diferença entre o comprimento final (L) e o comprimento inicial (L₀) do filme orodispersível após o teste de tração^{155,156}.

O módulo de elasticidade é um indicador da rigidez do filme orodispersível. Ele representa a resistência do material à deformação linear, uma característica fundamental para entender como o material responde à tensão aplicada. Para efetuar essa mensuração, o filme é colocado em um suporte de amostra, e um dispositivo de sonda é aplicado, iniciando um movimento contínuo até que o filme sofra danos^{155,157}.

A literatura relata uma ampla gama de valores para tensão na ruptura e alongamento em filmes de desintegração oral, que são propriedades mecânicas significativas. Essas características são intimamente relacionadas à macromolécula empregada na formação da matriz, assim como aos demais elementos incorporados nela^{158,159}.

Para os filmes HA 0,2% m/m e HA 0,2% m/m + morina 3% m/m, observou-se uma proximidade nos valores do Módulo de Young, não sendo evidenciadas diferenças estatisticamente significativas, entretanto, de acordo com dados achados na literatura¹⁴, os FODs obtidos nessa pesquisa apresentam similaridade em relação ao Módulo de Young, tensão na ruptura e deformação a duas marcas comerciais, sendo elas: Snoreeze Oral Strips e Boots Sleepeaze Snoring Relief Oral Strips, onde ambas apresentam HA na composição.

Na análise do perfil de liberação de um fármaco é fundamental a compreensão do comportamento das substâncias em diferentes sistemas, e os testes de dissolução *in vitro* desempenham um papel importante na predição de sua eficácia *in vivo*. O teste de liberação recomenda o emprego das “*sink conditions*” que consiste em um método utilizado para evitar a saturação do meio e para permitir uma avaliação efetiva da habilidade do sistema em regular as taxas de liberação¹⁶⁰.

Existem vários fatores que influenciam na taxa de liberação de fármacos. Esses fatores incluem a solubilidade do fármaco, a difusão do fármaco através da matriz, a erosão da matriz e a desorção do fármaco adsorvido. Ademais, a eficiência da liberação *in vitro* de uma molécula a partir de diferentes sistemas de liberação depende não apenas das características do meio/pH, mas também da natureza e das propriedades físico-químicas da matriz/carreador¹⁶¹. Portanto, nesse estudo foi avaliado o perfil de liberação *in vitro* da morina incorporada nos filmes desenvolvidos, pH = 7,4.

Os resultados experimentais evidenciam uma curva de inclinação acentuada, indicativo de uma liberação rápida “burst”, com um total de 30% de morina liberada nos primeiros 30 minutos do ensaio, e 53% de morina liberada em 90 minutos. É

possível observar uma liberação total de morina (100%) em 210 minutos do ensaio, que tendeu a uma constante até o fim do experimento (330 minutos).

Presume-se que por se tratar de uma matriz altamente hidrofílica, quando o HA entra em contato com o meio de dissolução, o mesmo sofre intumescimento e erosão, formando uma continua camada de gel (aspecto observado após o término do ensaio).

Deste modo, a liberação da morina na matriz polimérica de HA deve ser governada por um ou mais mecanismos cinéticos, incluindo o intumescimento do polímero resultando na formação de uma camada gelatinosa, seguido pela difusão do fármaco através dessa camada entumecida e subsequente erosão do polímero¹⁶².

Na literatura, poucos estudos avaliaram o efeito antimicrobiano da morina quando incorporada em sistemas de liberação controlada de polímeros naturais. O estudo pioneiro conduzido por Farias et al.¹¹⁰ (2020) demonstraram a capacidade desses sistemas em controlar as taxas de liberação do fármaco e reduzir os fatores de virulência associados aos biofilmes cariogênicos, o que valida com os resultados do nosso estudo.

O modelo matemático de Weibull estabelece uma relação exponencial entre a fração do fármaco liberado e o tempo. Ele deve ser empregado para analisar os dados referentes aos primeiros 63,2% da liberação do fármaco¹⁶³. Esse modelo é frequentemente utilizado para descrever a liberação de fármacos de formas farmacêuticas sólidas, em que a quantidade de fármaco liberado (Q) é em função do tempo de ensaio (t), ou seja, $Q = f(t)$. Além disso, o modelo de Weibull tem sido eficazmente adaptado para ajustar uma variedade de curvas de dissolução, sendo amplamente utilizado para ajustar dados de liberação de fármacos¹⁶³.

Além disso, o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas, fundamentado na Lei das Potências, descreve uma relação exponencial entre a liberação do fármaco e o tempo. Sua recomendação é para analisar os primeiros 60% do fármaco liberado. Na equação correspondente, k representa uma constante cinética e n é o expoente de liberação. Esse modelo é frequentemente empregado para descrever a cinética de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos e tem sido aplicado com sucesso em diversos estudos para explicar o mecanismo de liberação de diferentes compostos farmacêuticos¹⁶³. Os dois modelos de liberação também foram classificados como o de maior desempenho para os dados obtidos na literatura^{110,111} e também para os dados desenvolvidos nessa pesquisa.

A maior parte dos estudos documentados na literatura indica uma liberação

sustentada de morina por até 12 horas, utilizando polímeros sintéticos para a concepção dos sistemas¹⁶⁴. Os resultados obtidos neste estudo, ao empregar polímero natural, demonstram estratégias eficazes para o controle da liberação da morina, representando avanços significativos nessa área. Em sistemas com matriz polimérica hidrossolúvel, a liberação é normalmente controlada por meio de três mecanismos: difusão, erosão e intumescimento¹⁶⁵.

7 CONCLUSÃO

A inclusão da morina em filmes orodispersíveis baseados em ácido hialurônico pode representar uma opção terapêutica promissora, assim como o desenvolvimento de filmes orodispersíveis como um novo sistema de liberação de fármacos. Diante dos resultados promissores desta pesquisa, é evidente que essas formulações representam não apenas uma alternativa viável, mas também uma abordagem inovadora no campo da terapêutica odontológica.

Diante dos dados encontrados neste estudo, pode-se concluir que:

Filmes orodispersíveis de HA e morina foram obtidos pelo método *casting*, que apresenta simplicidade de execução e custo reduzido;

Os filmes de HA incorporados com morina não se demonstraram citotóxicos para as células L929 e NOK-1, com a manutenção da viabilidade celular acima de 70%;

A viabilidade e a biomassa de *S. mutans* apresentaram diferença estatisticamente significativas menores na presença de morina em comparação à formulação sem morina e ao grupo controle;

As análises de MEV evidenciaram filmes com superfície irregular;

Os testes mecânicos não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas no Módulo de Young e apresentaram dados similares à modelos comerciais;

Os dois modelos de liberação evidenciados nesta pesquisa também foram classificados como o de maior desempenho para os dados obtidos na literatura;

Os FODs obtidos demonstraram a capacidade de liberação da morina e a redução dos fatores de virulência associados aos biofilmes cariogênicos.

REFERÊNCIAS*

1. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017, 3: 17030.
2. Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2017; 44 Suppl 18: S5-S11.
3. Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J*. 2012; 212(12): 601-6.
4. Valkenburg C, Slot DE, Bakker EW, Van der Weijden FA. Does dentifrice use help to remove plaque? a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2016; 43(12): 1050-8.
5. Galiano F, Briceño K, Marino T, Molino A, Christensen KV, Figoli A. Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications. *J Memb Sci*. 2018; 564: 562-86.
6. Jaafar AM, Hasnu N, Zainal Z, Masarudin MJ, Md Ajat MM, Aung MM et al. Preparation, characterisation and antibacterial activity of carvacrol encapsulated in gellan gum hydrogel. *Polymers (Basel)*. 2021; 13(23): 4153.
7. Vercelheze AES, Marim BM, Oliveira ALM, Mali S. Development of biodegradable coatings for maize seeds and their application for *Azospirillum brasilense* immobilization. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019; 103(5): 2193-2203.
8. Villanova JCO, Orefice RL, Cunha AS. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros*. 2010; 20(1): 51-64.
9. Khan J, Yadav S, Alam MA. Recent developments in nanomaterial drug delivery and upgrading treatment of cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*. 2023; 29: 2640-54.
10. Krause J, Brokmann F, Rosenbaum C, Weitschies W. The challenges of drug delivery to the esophagus and how to overcome them. *Expert Opin Drug Deliv*. 2022; 19(2): 119-31.
11. Preis M, Knop K, Breitzkreutz J. Mechanical strength test for orodispersible and buccal films. *Int J Pharm*. 2014; 461(1-2): 22-9.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Silva LL. Desenvolvimento e caracterização de filmes de desintegração oral contendo dinitrato de isossorbida [Dissertação mestrado em Ciências Farmacêuticas]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2021.
13. Siddiqui MDN, Garg G, Sharma PK. A short review on a novel approach in oral fast dissolving drug delivery system and their patents. *Adv Biol Res.* 2011; 5(6): 291-303.
14. Borges AF, Silva C, Coelho JF, Simões S. Oral films: Current status and future perspectives: Galenical development and quality attributes. *J Control Release.* 2015; 206: 1–19.
15. Li C, Bhatt PP, Johnston TP. Evaluation of a mucoadhesive buccal patch for delivery of peptides: in vitro screening of bioadhesion. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998; 24(10): 919-26.
16. Senel S, Ikinç G, Kaş S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pharm.* 2000; 193(2): 197-203.
17. Abu-Huwaij R, Assaf S, Salem M, Sallam A. Mucoadhesive dosage form of lidocaine hydrochloride: I. Mucoadhesive and physicochemical characterization. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007; 33(8): 855-64.
18. Shimoda H, Taniguchi K, Nishimura M, Matsuura K, Tsukioka T, Yamashita H, Inagaki N, Hirano K, Yamamoto M, Kinoshada Y, Itoh Y. Preparation of a fast dissolving oral thin film containing dexamethasone: a possible application to antiemesis during cancer chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 73(3): 361-5.
19. Nishimura M, Matsuura K, Tsukioka T, Yamashita H, Inagaki N, Sugiyama T, Itoh Y. In vitro and in vivo characteristics of prochlorperazine oral disintegrating film. *Int J Pharm.* 2009; 368(1-2): 98-102.
20. Koland M, Charyulu RN, Vijayanarayana K, Prabhu P. In vitro and in vivo evaluation of chitosan buccal films of ondansetron hydrochloride. *Int J Pharm Investig.* 2011; 1(3): 164-71.
21. Abruzzo A, Bigucci F, Cerchiara T, Cruciani F, Vitali B, Luppi B. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. *Carbohydr Polym.* 2012; 87(1): 581-8.
22. Avachat AM, Gujar KN, Wagh KV. Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate. *Carbohydr Polym.* 2013; 91(2): 537-42.
23. Lim HP, Tey BY, Chan ES. Particle designs for the stabilization and controlled-delivery of protein drugs by biopolymers: A casa study on insulin. *J Control Release.* 2014; 186: 11-21.

24. Souza ML. Ácido hialurônico: uma revisão bibliográfica. [Trabalho de conclusão de curso em Química Industrial]. Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia; 2023.
25. Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol.* 2002; 21: 25-9.
26. Kharlampieva E, Kozlovskaya V, Sukhishvili S. Layer-by-layer hydrogen bonded polymer films: From fundamentals to applications. *Advanced Materials.* 2009; 21(30): 3056-65.
27. Arya A, Chandra A, Sharma V, Pathak. Fast dissolving oral films: an innovative drug delivery system and dosage form. *Int. J. Chemtech Res.* 2010; 2: 576-83.
28. Kim S, Cho D, Kweon D, Jang E, Hong J, Lim S. Improvement of mechanical properties of orodispersible hyaluronic acid film by carboxymethyl cellulose addition. *Food Sci Biotechnol.* 2020; 29: 1233-9.
29. Lee J, Lee K, Nam O, Chae Y, Lee M, Kweon D, et al. Orodispersible hyaluronic acid film delivery for oral wound healing in rats. *J Dent Sci.* 2022; 17(4): 1595-1603.
30. Himeda Y, Yanagi S, Kakema T, Fujita F, Umeda T, Miyoshi T. Adhesion preventive effect of a novel hyaluronic acid gel film in rats. *J Int Med Res.* 2003; 31: 509-16.
31. Serrano-Sevilla I, Artiga A, Mitchell SG, De Matteis L, de Fuente JM. Natural polysaccharides for siRNA delivery: nanocarriers based on chitosan, hyaluronic acid and their derivatives. *Molecules.* 2019; 24:2570.
32. Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds.* 2016; 28: 78-88.
33. Alcântara CEP, Castro MAA, Noronha MS, Martins-Junior PA, Mendes RM, Caliari MV, et al. Hyaluronic acid accelerates bone repair in human dental sockets: a randomized triple-blind clinical trial. *Braz Oral Res.* 2018; 32:e84.
34. Arpag OF, Damlar I, Altan A, Tatli U, Gunay A. To what extent does hyaluronic acid affect healing of xenografts, a histomorphometric study in a rabbit model. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26; e20170004.
35. Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JÁ. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Sep Purif Technol.* 2011; 83: 173-9.
36. Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr.* 2000; 130(1): 53-6.
37. Duncan AM, Underhill KE, Xu X, Lavalleur J, Phipps WR, Kurzer MS. Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(10): 3479-84.

38. Escuredo O, Silva LR, Valentão P, Seijo MC, Andrade PB. Assessing *Rubus* honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chemistry*. 2012; 130(3): 671-78.
39. Suárez B, Álvarez AL, García YD, Barrio G, Lobo AP, Francisco Parra F. Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chem*. 2010; 120(1): 339-42.
40. Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, et al. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol*. 2002; 20(12): 522-31.
41. Oliveira AB, Ferrisse TM, Annunzio SR, Franca MGA, Silva MGV, Cavaleiro AJ, et al. In vitro evaluation of photodynamic activity of plant extracts from senna species against microorganisms of medical and dental interest. *Pharm*. 2023; 15(1): 181.
42. Li B, Li X, Lin H, Zhou Y. Curcumin as a promising antibacterial agent: effects on metabolism and biofilm formation in *S. mutans*. *Biomed. Res. Int*. 2018; 4508709.
43. Stegemann S, Ecker F, Maio M, Kraahs P, Wohlfart R, Breitzkreutz J, et al. Geriatric drug therapy: neglecting the inevitable majority. *Ageing Res. Rev*. 2010; 9: 384–98.
44. Venu Gopal J. Morin hydrate: botanical origin, pharmacological activity and its applications: A mini-review, *Pharmacogn J*. 2013; 5: 123-6.
45. Waddad AY, Abbad S, Yu F, Munyendo WLL, Wang J, Lv H, et al. Formulation, characterization and pharmacokinetics of Morin hydrate niosomes prepared from various non-ionic surfactants. *Int J Pharm*. 2013; 456(2): 446-58.
46. Zhang ZT, Cao XB, Xiong N, Wang HC, Huang JS, Sun SG, Wang T. Morin exerts neuroprotective actions in Parkinson disease models in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin*. 2010; 31(8): 900-6.
47. Sivaramakrishnan V, Devaraj SN. Morin fosters apoptosis in experimental hepatocellular carcinogenesis model. *Chem Biol Interact*. 2010; 183(2): 284-92.
48. Green AE, Rowlands RS, Cooper RA, Maddocks SE. The effect of the flavonol morin on adhesion and aggregation of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett*. 2012; 333(1): 54-8.
49. Huang P, Hu P, Zhou SY, Li Q, Chen WM. Morin inhibits sortase A and subsequent biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol*. 2014; 68(1): 47-52.
50. Grimsrud KN, Sherwin CMT, Constance JE, Tak C, Zuppa AF, Spigarelli MG, Mihalopoulos NL. Special population considerations and regulatory affairs for clinical research. *Clin Res Regul Aff*. 2015; 32: 47–56.

51. Sivaranjani M, Gowrishankar S, Kamaladevi A, Pandian SK, Balamurugan K, Ravi AV. Morin inhibits biofilm production and reduces the virulence of *Listeria monocytogenes* - an in vitro and in vivo approach, *Int J Food Microbiol.* 2016; 237: 73-82.
52. Chemmugil P, Lakshmi PTV, Annamalai A. Exploring Morin as an anti- quorum sensing agent (anti-QSA) against resistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Microb Pathog.* 2019; 127: 304-15.
53. Inngjerdingen KT, Debes SC, Inngjerdingen M, Hokputsa S, Harding SE, Rolstad B, Michaelsen TE, Diallo D, Paulsen BS. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *J Ethnopharmacol.* 2005; 101: 204-14.
54. Ovodov I. Polysaccharides of flower plants: Structure and physiological activity. *Bioorg Khim.* 1998; 24: 483-501.
55. Wijeratne SS, Abou-Zaid MM, Shahidi F. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(2): 312-8.
56. Al-Numair KS, Chandramohan G, Alsaif MA, Veeramani C, El Newehy AS. Morin, a flavonoid, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2014; 11(3):14-20.
57. Hussain J, Ali L, Khan AL, Rehman NU, Jabeen F, Kim JS, Al-Harrasi A. Isolation and bioactivities of the flavonoids morin and morin-3-O- β -D-glucopyranoside from *Acridocarpus orientalis*-A wild Arabian medicinal plant. *Molecules.* 2014; 19(11): 17763-72.
58. Sigma-Aldrich. Morin hydrate [acesso em 10 dez 2023]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/morin-hydrate?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=morin%20hydrate&type=product>
59. de Farias AL, Meneguín AB, da Silva Barud H, Brighenti FL. The role of sodium alginate and gellan gum in the design of new drug delivery systems intended for antibiofilm activity of morin. *Int J Biol Macromol.* 2020; 162: 1944-58.
60. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015; 94(5): 650-8.
61. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010; 54(3): 441-54.
62. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007; 369(9555): 51-9.

63. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: A systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *J Dent Res*. 2017; 96(4):380-7.
64. Frencken JE, Leal SC. The correct use of the ART approach. *J Appl Oral Sci*. 2010; 18(1): 1-4.
65. Rabe P, Twetman S, Kinnby B, Svensäter G, Davies JR. Effect of fluoride and chlorhexidine digluconate mouthrinses on plaque biofilms. *Open Dent J*. 2015; 9: 106-11.
66. Schwendicke F, Dörfer CE, Schlattmann P, Foster Page L, Thomson WM, Paris S. Socioeconomic inequality and caries: a systematic review and meta analysis. *J Dent Res*. 2015; 94(1): 10-8.
67. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde. 2012.
68. García-Pérez Á, Irigoyen-Camacho ME, Borges-Yáñez SA, Zepeda-Zepeda MA, Bolona-Gallardo I, Maupomé G. Impact of caries and dental fluorosis on oral health-related quality of life: a cross-sectional study in schoolchildren receiving water naturally fluoridated at above-optimal levels. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(9): 2771-80.
69. Fernandes IB, Pereira TS, Souza DS, Ramos-Jorge J, Marques LS, Ramos-Jorge ML. Severity of dental caries and quality of life for toddlers and their families. *Pediatr Dent*. 2017; 39(2): 118-23.
70. Baelum V, van Palenstein Helder W, Hugoson A, Yee R, Fejerskov O. A global perspective on changes in the burden of caries and periodontitis: implications for dentistry. *J Oral Rehabil*. 2007; 34(12): 872-940.
71. Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J Clin Invest*. 2003; 112(11): 1626-32.
72. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(9): 623-33.
73. Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, Aguilar C, Kolter R. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322: 1-16.
74. Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(2): 89-95.

75. Morou-Bermudez E, Elias-Boneta A, Billings RJ, et al. Urease activity in dental plaque and saliva of children during a three-year study period and its relationship with other caries risk factors. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(11): 1282-9.
76. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008; 42(6): 409-18.
77. Mathur VP, Dhillon JK. Dental caries: a disease which needs attention. *Indian J Pediatr.* 2018; 85(3): 202-6.
78. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): 727–47.
79. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients.* 2021; 13(1): 273.
80. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc.* 2010; 69(3): 273-8.
81. Nabavi SM, Šamec D, Tomczyk M, Milella L, Russo D, Habtemariam S et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnol. Adv.* 2018; 38:107316.
82. Murota K, Nakamura Y, Uehara M. Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018; 82(4): 600-10.
83. Hu B, Liu X, Zhang C, Zeng X. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *J Food Drug Anal.* 2017; 25(1): 3- 15.
84. Ahmed OM, Mahmoud AM, Abdel M. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of hesperidin and naringin in high fat diet/streptozotocin type 2 diabetic rats. *Life Sci J.* 2011; 8: 91-101.
85. Ahmed RR, Mahmoud AM, Ashour MB, Kamel AM. Hesperidin protects against diethylnitrosamine-induced nephrotoxicity through modulation of oxidative stress and inflammation. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol.* 2015; 5(5): 391-7.
86. Aly MS, Galaly SR, Moustafa N, Mohammed HM, Khadrawy SM. Hesperidin protects against diethylnitrosamine/carbon tetrachloride-induced renal repercussions via up-regulation of Nrf2/HO-1 signaling and attenuation of oxidative stress. *J Appl Pharm Sci.* 2017; 7(11): 007- 014.
87. Arts IC. A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer. *J Nutr.* 2008; 138(8): 1561S-66S
88. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1 Suppl): 317S-325S.

89. Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo C, Rotilio G. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 2008; 33(12): 2390-2400.
90. Perez-Vizcaino F, Duarte J. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med.* 2010; 31(6): 478-94.
91. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016; 5:47.
92. Ma Y, Zeng M, Sun R, Hu M. Disposition of flavonoids impacts their efficacy and safety. *Curr Drug Metab.* 2014; 15(9): 841-64.
93. Farias EAO, Araujo TDS. Aplicações dos flavonoides em biotecnologia: propriedades terapêuticas e aplicações. *Revista Brasileira De Inovação Tecnológica Em Saúde.* 2014; 4(2).
94. Shu X, Hu XJ, Zhou SY, Xu CL, Qiu QQ, Nie SP, Xie MY. Effect of quercetin exposure during the prepubertal period on ovarian development and reproductive endocrinology of mice. *Yao Xue Xue Bao.* 2011; 46(9): 1051-7.
95. Wang S, Yao J, Zhou B, Yang J, Chaudry MT, Wang M et al. Bacteriostatic effect of Quercetin as an antibiotic alternative in vivo and its antibacterial mechanism in vitro. *J Food Prot.* 2018; 81(1): 68-78.
96. Gendaram O, Choi YH, Kim YS, Ryu SY. Anti-oxidative and antibacterial constituents from *Sedum hybridum*. *Nat Prod Sci.* 2011; 17: 279-84.
97. Ouyang J, Sun F, Feng W, Xie Y, Ren L, Chen Y. Antimicrobial activity of Galangin and its effects on murein hydrolases of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) strain Mu50. *Chemotherapy.* 2018; 63(1): 20-8.
98. Vaziri AS, Ghorbanzadeh R, Hosseinpour-Nader A. Rutin-gallium complex mediated antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro studies against *Streptococcus mutans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2023; 42: 103367.
99. Gutiérrez RM, Mitchell S, Solis RV. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 117: 1-27.
100. Rajput SA, Wang XQ, Yan HC. Morin hydrate: A comprehensive review on novel natural dietary bioactive compound with versatile biological and pharmacological potential. *Biomed Pharmacother.* 2021; 138: 111511.
101. Jonnalagadda Venu Gopal. Morin Hydrate: Botanical origin, pharmacological activity and its applications: A mini-review. *Pharmacognosy Journal.* 2013; 5(3): 123-6.
102. Caselli A, Cirri P, Santi A, Paoli P. Morin: A promising natural drug. *Curr Med Chem.* 2016; 23(8): 774-91.

103. Thakur K, Zhu YY, Feng JY, Zhang JG, Hu F, Prasad C et al. Morin as an imminent functional food ingredient: an update on its enhanced efficacy in the treatment and prevention of metabolic syndromes. *Food Funct.* 2020; 11(10): 8424-43.
104. Nag D, Dastidar DG, Chakrabarti G. Natural flavonoid morin showed anti-bacterial activity against *Vibrio cholera* after binding with cell division protein FtsA near ATP binding site. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2021; 1865(8): 129931.
105. Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Curr Med Chem.* 2015; 22: 132-49
106. Dramsi S, Bierne H. Spatial organization of cell wall-anchored proteins at the surface of gram-positive bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017; 404: 177-201.
107. Kumari P, Bowmik S, Paul SK, Biswas B, Banerjee SK, Murty US et al. Sortase A: A chemoenzymatic approach for the labeling of cell surfaces. *Biotechnol Bioeng.* 2021; 118(12): 4577-89.
108. Xu H, Ziegelin G, Schröder W, Frank J, Ayora S, Alonso JC et al. Flavones inhibit the hexameric replicative helicase RepA. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(24): 5058-66.
109. Huang P, Hu P, Zhou SY, Li Q, Chen WM. Morin inhibits sortase A and subsequent biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol.* 2014; 68(1): 47-52.
110. de Farias AL, Meneguín AB, da Silva Barud H, Brighenti FL. The role of sodium alginate and gellan gum in the design of new drug delivery systems intended for antibiofilm activity of morin. *Int J Biol Macromol.* 2020; 162: 1944-58.
111. Sales LS, Gimenes MDS, Meneguín AB, Barud HDS, Achcar JA, Brighenti FL. Development of multiparticulate systems based on natural polymers for morin controlled release. *Int J Biol Macromol.* 2023; 228: 1-12.
112. Özcimen D, İnan B, Morkoc O, Aybüke Efe. A Review on Algal Biopolymers. *J. Chem. Eng. Res. Updates.* 2017; 4(1): 7-14.
113. Sivakanthan S, Rajendran S, Gamage A, Madhujith T, Mani S. Antioxidant and antimicrobial applications of biopolymers: A review. *Food Res Int.* 2020; 136: 109327.
114. Niaounakis M. *Biopolymers: Applications and trends.* Elsevier Inc. 2015. [acesso em 10 dez 2023]. 1ª ed. Disponível em: <https://shop.elsevier.com/books/biopolymers-applications-and-trends/niaounakis/978-0-323-35399-1>

115. Yaashikaa PR, Senthil Kumar P, Karishma S. Review on biopolymers and composites - Evolving material as adsorbents in removal of environmental pollutants. *Environ Res.* 2022; 212(Pt A): 113114.
116. Lopes CM, Lobo JMS, Costa P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 2005; 41(2): 143- 54.
117. Coimbra PMA. Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural. [Tese de doutorado em Engenharia Química].Coimbra Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; 2010.
118. Shaikh RP, Pillay V, Choonara YE, Toit LC, Ndesendo VMK, Bawa P et al. A review of multi-responsive membranous systems for rate-modulated drug delivery. *AAPS PharmSci.* 2010; 2(1): 441-59.
119. Lacevic A, Vranic E, Zulic I. Endodontic-periodontal locally delivered antibiotics. *Bosn J Basic Med Sci.* 2004; 4(1): 73-8.
120. Carvalho FC, Chorilli M, Gremião MPD. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. *Polímeros Ciência e Tecnologia.* 2014; 24 (2): 203-13.
121. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers (Basel).* 2018; 10(7): 701.
122. Weissmann B, Meyer K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J Am Chem Soc.* 1954; 76: 1753– 57:119962.
123. Papakonstantinou E, Roth M., Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinology.* 2012; 4: 253–8.
124. Liang J, Jiang D, Noble PW. Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 97: 186–203.
125. Prehm P. Release of hyaluronate from eukaryotic cells. *Biochem J.* 1990; 267: 185–9.
126. Bastow ER, Byers S, Golub SB, Clarkin CE, Pitsillides AA, Fosang AJ. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(3): 395-413.
127. Sionkowska A, Gadomska M, Musiał K, Piątek J. Hyaluronic acid as a component of natural polymer blends for biomedical applications: A review. *Molecules.* 2020; 25(18): 4035.
128. Sudha PN, Rose MH. Beneficial effects of hyaluronic acid. *Adv Food Nutr Res.* 2014; 72: 137-76.
129. Bayer IS. Hyaluronic acid and controlled release: A review. *Molecules.* 2020; 25(11): 2649.

130. Contardi M, Montano S, Liguori G, Heredia-Guerrero JA, Galli P, Athanassiou A, Bayer IS. Treatment of coral wounds by combining an antiseptic bilayer film and an injectable antioxidant biopolymer. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 988.
131. Palumbo FS, Bavuso Volpe A, Cusimano MG, Pitarresi G, Giammona G, Schillaci DA polycarboxylic/amino functionalized hyaluronic acid derivative for the production of pH sensible hydrogels in the prevention of bacterial adhesion on biomedical surfaces. *Int J Pharm*. 2015; 478(1): 70-7
132. Liao CH, Chen CS, Chen YC, Jiang NE, Farn CJ, Shen YS, et al. Vancomycin-loaded oxidized hyaluronic acid and adipic acid dihydrazide hydrogel: Bio-compatibility, drug release, antimicrobial activity, and biofilm model. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020; 53(4): 525-31.
133. Krampe R, Visser JC, Frijlink HW, Breitzkreutz J, Woerdenbag HJ, Preis M. Oromucosal film preparations: points to consider for patient centricity and manufacturing processes. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016; 13(4): 493-506.
134. Orlu M, Ranmal SR, Sheng Y, Tuleu C, Seddon P. Acceptability of orodispersible films for delivery of medicines to infants and preschool children. *Drug Deliv*. 2017; 24(1): 1243-8.
135. Turković E, Vasiljević I, Drašković M, Parojić J. Orodispersible films. Pharmaceutical development for improved performance: A review. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2022; 75, 103708.
136. US Food and Drug Administration. Quality by Design for Andas: An Example For Immediate-Release Dosage Forms; US Department of Health and Human Service—FDA: Rockville, MD, USA, 2012.
137. Irfan M, Rabel S, Bukhtar Q, Qadir MI, Jabeen F, Khan A. Orally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. *Saudi Pharm J*. 2016; 24(5): 537-46
138. Jacob S, Boddu SHS, Bhandare R, Ahmad SS, Nair AB. Orodispersible films: Current innovations and emerging trends. *Pharmaceutics*. 2023; 15(12): 2753
139. Dodoo CC, Stapleton P, Basit AW, Gaisford S. The potential of *Streptococcus salivarius* oral films in the management of dental caries: An inkjet printing approach. *Int J Pharm*. 2020; 591: 119962.
140. International Organization for Standardization, "Biological evaluation of medical devices". Part 12: Sample preparation and reference materials, 4 ed, ISO 10993-12, 2012.
141. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983; 16: 55-63.
142. International Organization for Standardization, "Biological evaluation of medical devices". Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods", 3^a ed, ISO 10993-5, 2009.

143. Brighenti FL et al. Evaluation of caries-associated virulence of biofilms from *Candida albicans* isolated from saliva of pediatric patients with sickle-cell anemia. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(6): 484–489.
144. Albuquerque YE, Danelon M, Salvador MJ, Koga-Ito CY, Botazzo Delbem AC, Ramirez-Rueda RY et al. Mouthwash containing *Croton doctoris* essential oil: in vitro study using a validated model of caries induction. *Future Microbiol.* 2018; 13: 631-43.
145. Van de Sande FH et al. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2011; 27(9): 1057–63.
146. ASTM D882-18. Disponível em: <https://www.astm.org/d0882-18.html>
147. Karki S, Kim H, Na SJ, Shin D, Jo K, Lee J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J Pharmaceut Sci.* 2016; 11: 559- 74.
148. Silva LL. Desenvolvimento e caracterização de filmes de desintegração oral contendo dinitrato de isossorbida. [Dissertação mestrado em Ciências Farmacêuticas]. São Paulo. Universidade Federal de São Paulo; 2021.
149. Kweon DK e Han JA. Development of hyaluronic acid based edible film for alleviating dry mouth. *Food Sci Hum Wellness.* 2023; 12: 371-7.
150. Ghosh P, Bag S, Roy AS, Subramani E, Chaudhury K, Dasgupta S. Solubility enhancement of morin and epicatechin through encapsulation in an albumin based nanoparticulate system and their anticancer activity against the MDA-MB-468 breast cancer cell line. *RSC Advances.* 2016; 6: 101415-101429.
151. Lapcik L, Otyepková E, Lapcikova B, Otyepka M, Vlcek J, Kupská I. Physicochemical analysis of hyaluronic acid powder for cosmetic and pharmaceutical processing. *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications.* 2014. 1ª ed. [acesso em 10 dez 2023]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/266295547_Physicochemical_Analysis_of_Hyaluronic_Acid_Powder_for_Cosmetic_and_Pharmaceutical_Processing.
152. Badria FA, Zidan OA. Natural products for dental caries prevention. *J Med Food.* 2004; 7(3): 381-4.
153. Chen X, Daliri EBM, Kim N, Kim JR, Yoo D, Oh DH. Microbial etiology and prevention of dental caries: Exploiting natural products to inhibit cariogenic biofilms. *Pathogens,* 2020; 9(7), 569.
154. Bauer W, Westfall GD, Dias H. Física para Universitários-Mecânica. AMGH Editora, 2012.
155. Tamanini F. Desenvolvimento de filme orodispersível como forma farmacêutica para incorporação de fármaco. [Dissertação mestrado em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal]. Araraquara. Universidade de Araraquara; 2020.

156. Wasilewska K, Winnicka K. How to assess orodispersible film quality? A review of applied methods and their modifications. *Acta Pharm.* 2019; 69(2): 155-76.
157. Londhe VY, Umalkar KB. Formulation development and evaluation of fast dissolving film of telmisartan. *Indian J Pharm Sci.* 2012, 74: 122-126.
158. Calister Júnior WD. Ciências e engenharia de materiais: uma introdução. Tradução: Sérgio Murilo Stamile Soares. Rio de Janeiro, LTC. 2008; 7^a ed. 705.
159. Borges JG. Desenvolvimento de filmes de desintegração oral para liberação de compostos bioativos. [Dissertação mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos]. São Paulo. Universidade de São Paulo. 2013.
160. Phillips DJ, Pygall SR, Cooper VB, Mann JC. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *J Pharm Pharmacol.* 2012; 64(11): 1549-59.
161. Thang NH, Chien TB, Cuong DX. Polymer-based hydrogels applied in drug delivery: an overview. *Gels.* 2023; 9(7): 523.
162. Lopes CM, Lobo JMS, Costa P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Rev Bras Cienc Farm.* 2005; 41(2): 143- 54.
163. Costa PJC. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Rev Bras Cienc Farm.* 2002; 38(2).
164. Yu J, Wan K, Suna X. Improved transdermal delivery of morin efficiently inhibits allergic contact dermatitis. *Int J Pharmac.* 2017; 530: 145–54.
165. Bettini R, Catellani PL, Santi P, Peppas NA, Colombo P. Translocation of drug particles in HPMC matrix gel layer: effect of drug solubility and influence on release rate. *J. Control. Release.* 2001; 70(3): 383-91.

Não Autorizo a reprodução deste trabalho pelo prazo de até 2 anos após a data de defesa

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 04 de março de 2024.

Lorena Fonseca Piovesan