

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
Campus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

Jéssica Bernegossi

**Desenvolvimento, caracterização e ação anti-biofilme oral  
de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo o  
peptídeo KSL-W**

Araraquara - SP  
2014

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Campus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

Jéssica Bernegossi

**Desenvolvimento, caracterização e ação anti-biofilme  
oral de sistemas nanoestruturados bioadesivos  
contendo o peptídeo KSL-W**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana

Araraquara -SP  
2014

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**B525e** Bernegossi, Jéssica  
Desenvolvimento, caracterização e ação anti-biofilme oral de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo o peptídeo KSL-W / Jéssica Bernegossi. — Araraquara, 2014  
104 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêutica

Orientador: Marlus Chorilli  
Coorientador: Carla Raquel Fontana Mendonça

1. Nanotecnologia farmacêutica. 2. Cristais líquidos. 3. Peptídeos antimicrobiano. 4. Biofilme multiespécie. 5. KSL-W. I. Chorilli, Marlus. II. Mendonça, Carla Raquel Fontana, coorient, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por sua infinita bondade, o qual por Sua fidelidade me sustentou todos os dias de minha vida, em especial nesses, que me dediquei a esta dissertação de mestrado. O Senhor me ajudou em **TODOS** os momentos e eu Te louvo por isso!

*“Porque o Senhor dá a sabedoria e da sua boca vem a inteligência e o entendimento.” Provérbios 2:6*

À minha família, sou grata por me apoiarem nesta etapa muitas vezes árdua e cansativa. Vocês estiveram ao meu lado, fazendo que cada passo fosse suavizado.

Ao meu marido Rafael Salmazi, obrigada por todas as vezes que me incentivou, por sua paciência e compreensão comigo em dias difíceis, tornando-os mais leves! Não tenho palavras para expressar o qual importante você é para mim. Você tem parte no mérito deste trabalho.

À minha mãe Rita Bernegossi e minha irmã Joyce Bernegossi, vocês são meus alicerces e ao mesmo tempo meus cristais, obrigada por cada palavra motivadora e me perdoem por não estar ao lado de vocês fisicamente em momentos que possam ter precisado. Amo vocês.

Ao meu pai Sérgio Bernegossi (in memoriam), que mesmo não estando mais presente aqui conosco, deixou seus ensinamentos de como reagir frente as dificuldades. Saudade eterna.

Aos meus irmãos Isáías, Josias, Josiane e Juliane Bernegossi, assim também como as minhas cunhadas, sobrinhas e sobrinhos, muito obrigada por me apoiarem!

À minha sogra Vera Martins Salmazi por todos os momentos que me incentivou, seja com palavra ou com ações. Ao meu sogro Milton Adolfo Salmazi por tornar possível a realização de um grande sonho. À minha cunhada Fabiana Salmazi Fernandes, a seu marido Reginaldo Fernandes e minha sobrinha Mariah Salmazi Fernandes, obrigada por todos os momentos de alegria no decorrer destes anos.

À minha “segunda família”, Henrique, Débora, Elisa e João Pedro, obrigada por me sustentarem com suas orações e auxílio nos momentos que eu mais precisei. Vocês são muito especiais.

*“Em todo tempo se ama o amigo, e na angústia se faz o irmão. Provérbios 17:17.*

Ao meu querido orientador e amigo, Professor Doutor Marlus Chorilli, sempre disponível e disposto em me escutar e opinar em minhas decisões. Agradeço pela oportunidade que me deu para que fosse possível de eu subir mais esse degrau na minha vida profissional. Obrigada por todos os seus ensinamentos e exigências, o que fizeram de mim uma pessoa melhor. Agradeço também por me aceitar e apoiar em mais uma nova jornada de trabalho nos próximos anos como meu orientador do doutorado. Tomo você como exemplo de profissional.

Agradeço à querida Professora Doutora Hérica Regina Nunes Salgado, por ser a responsável em abrir as portas dessa nova etapa de minha vida. Aprendi muito tanto pessoalmente como profissionalmente. Agradeço também por permitir o uso do seu laboratório nos momentos que precisei. Muito obrigada por sua amizade!

À minha amiga Giovana Maria Fioramonti Calixto, por todas as vezes que precisei (independente de dia ou horário) você sempre estava disposta em me ajudar. Você tem grande participação neste trabalho! Muito obrigada.

Agradeço aos amigos “irmãos”, que também me incentivaram, muitas vezes diariamente, com orações, ligações e mensagens, com palavras positivas e sábias em tempos de angústia, à Adriana e Edson Magalhães, Amanda Rodrigues, Edith Cristina Laignier Cazedey e ao seu marido Wantuil de Paula Júnior, Ivan, Joyce e Júlia Mussarelli, Josilene Chaves Ruela Corrêa e ao seu marido Leonardo de Queiroz Corrêa, Lucinéia Santana Cabral, Maiara Tomaz de Barros Pereira e a seu marido Alexandre de Barros Pereira, Reginaldo Roberto Carneiro, Renata Andretta. Vocês são pessoas especiais em minha vida.

Sou grata a todas as minhas amigas de trabalho, em especial à Alice Haddad do Prado, Ana Cristina Diniz Recife, Andressa Terumi Fujimura, Fabíola Garavello Prezotti, Fernanda dos Santos Kolenyak, Liliane Neves Pedreiro, Maíra Lima Gonçalves, Márcia Helena Oyafuso, Natália Noronha Ferreira, Roberta Balansin Rigon (irmã), agradeço imensamente por cada conselho, apoio, confraternização e companhias nas madrugadas de trabalho. Pela amizade sincera. Vocês são presentes de Deus para mim!

À minha coorientadora, Professora Doutora Carla Raquel Fontana que me ajudou com toda a parte microbiológica deste trabalho, por sua colaboração e parceria. Obrigada por me auxiliar até mesmo na bancada quando precisei. Também sua mestranda Laura Marise de Freitas, por tanta prestatividade. Teve momentos que pareciam que os meus problemas eram mais seus do que meus! Obrigada por tudo, de coração.

Aos meus amigos do laboratório de controle de qualidade, Ana Carolina Kogawa, Eliane Gandolpho Tótolí, Flávia Angélica Masquio Fiorentino, Lucas Chierentin, Lucélia Magalhães da Silva, Tahisa Marcela Pedroso, agradeço a amizade cultivada e por todos os momentos de alegria.

Agradeço à técnica Natalia Gonçalves dos Santos, pela amizade que cultivamos no dia-a-dia. Por sua boa vontade em querer ajudar sempre.

À técnica e amiga Maria de Fátima Rodrigues Moreti, pelos ensinamentos sempre atenciosos e por todas as ajudas nos momentos que mais precisava.

Ao Leonardo Miziara e ao Jovan Duran, agradeço pela paciência e por todo auxílio que vocês me deram nas análises térmicas.

Ao Professor Doutor Eduardo Maffud Cilli e ao seu aluno Paulo Ricardo da Silva Sanches, do Instituto de Química da UNESP- Araraquara, pela ajuda em todo o processo de síntese do peptídeo utilizado neste trabalho.

Ao Professor Doutor Saulo Santesso Garrido e à Professora Doutora Maria Palmira Daflon Gremião, pela disposição em corrigirem meu trabalho na avaliação de qualificação, obrigada por todas as argumentações construtivas e sugestões. Vocês melhoraram este trabalho.

Agradeço a Professora Doutora Taís Maria Bauab e sua aluna Bruna Vidal Bonifácio, pela disposição em me auxiliarem nas análises microbiológicas.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) de Campinas, pelas análises de “Small Angle X-ray Scattering” (SAXS) e à doutoranda Eloísa Berbel Manaia e ao pós-doutorando Bruno Caetano por auxiliarem gentilmente nesses experimentos.

À Professora Dra. Sandra Helena Pulcinelli por permitir que eu realizasse as análises reológicas e à técnica do laboratório Danubia Cristina Gava por me auxiliar durante a operação do equipamento.

À pós-doutoranda do Instituto de Química UNESP-Araraquara, Rita de Cássia da Silva, pela disposição em me ajudar com as análises térmicas.

Às minhas Professoras na graduação, Lusiane Malafatti Picca e a Paula Cressoni Martini que me incentivaram a ir atrás desse sonho que já estou realizando.

À Croda que cedeu gentilmente amostra suficiente de Procetyl<sup>®</sup> AWS para utilização na realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida durante este trabalho.

Enfim, a todos que me ajudaram de maneira direta ou indireta na concretização deste sonho. Meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

As doenças periodontais acometem grande parte da população, sendo uma das causas de perdas dentárias em humanos. As suas manifestações clínicas podem ser divididas genericamente em gengivite e periodontite, dependendo da existência ou não de envolvimento do tecido de sustentação dos dentes. Sabe-se que sua etiologia envolve, dentre outros fatores, o acúmulo de biofilme dental supra- e subgengival. Dessa maneira, estudos buscam avaliar o potencial antimicrobiano de substâncias que possuam ação contra biofilme dental multiespécie. Recentemente, um crescente interesse tem sido observado no estudo de peptídeos, como o KSL-W, que demonstram ação antimicrobiana contra micro-organismos presentes no biofilme dental. Sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos, como os sistemas líquido-cristalinos (SLC), têm sido muito utilizados pelo fato de aumentarem a estabilidade e a eficácia de fármacos, além de modularem sua ação, o que os torna aptos a serem usados como carreadores de peptídeos. A potencialização destes sistemas de liberação pode, possivelmente, ser conseguida com a presença de substâncias mucoadesivas, essenciais para a permanência prolongada da formulação no local de ação. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados mucoadesivos, como os SLC, para incorporação do peptídeo sintético KSL-W, e posteriormente, avaliar a ação *in vitro* em biofilme multiespécie salivar. Para isso, foram desenvolvidos sistemas líquido-cristalinos constituídos por álcool cetílico propoxilado e etoxilado - Procetyl® AWS (tensoativo, T), ácido oleico (fase oleosa, FO) e dispersão de poloxamer 407 nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1% (fase aquosa, FA), obtendo-se os diagramas S1, S2 e S3, respectivamente. Selecionou-se 4 pontos de cada um dos diagramas mantendo-se a concentração do T em 50% e variando-se as proporções de FA e FO, a saber F27 – 50% T, 10% FO e 40% FA; F28 – 50% T, 20% FO e 30% FA; F29 – 50% T, 30% FO e 20% FA; F30 – 50% T, 40% FO e 10% FA. Posteriormente, as regiões foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS), ensaios térmicos, análise de textura, trabalho de seringabilidade, bioadesão *in vitro* e reologia. Os ensaios de caracterização demonstraram que as formulações F27 e F28 de S1, S2 e S3 apresentaram características de fase lamelar por MLP, o que foi comprovado por SAXS. Dados de análise de textura evidenciaram que F28 de S1, S2 e S3 foram em geral mais adesivas que as demais. No estudo de bioadesão, verificou-se que à medida que foram acrescentadas maiores proporções de FA, os sistemas foram demonstrando maior poder de biodesividade em contato com os blocos de dentes bovinos. Ensaio reológico evidenciaram que as formulações F29 e F30 (menores concentrações de FA), apresentaram comportamento newtoniano, já as amostras F27 e F28 (maiores proporções de FA), não newtonianos, revelando a estruturação dos sistemas dependente da concentração da FA. No teste de trabalho de seringabilidade também foi possível visualizar que os sistemas mais estruturados requisitaram maiores forças para a extrusão das amostras. A análise das dispersões de poloxamer por microcalorimetria evidenciaram que quanto maior as concentrações, maior o deslocamento do evento térmico para temperaturas mais baixas, evidenciando assim sua propriedade termogelificante. No ensaio antimicrobiano, foi possível observar inibição do crescimento do biofilme multiespécie salivar para peptídeo KSL-W incorporado à F28 (S3) na concentração de 1 mg/mL, quando comparado ao controle positivo (biofilme sem tratamento). Os resultados obtidos sugerem potencial do sistema como plataforma para administração bucal de peptídeos com ação anti-biofilme oral.

**Palavras-chave:** nanotecnologia farmacêutica; cristais líquidos; mucoadesão; peptídeo antimicrobiano; KSL-W; biofilme multiespécie..

**ABSTRACT**

Periodontal diseases affect a large part of the population, being one of the causes of tooth loss in humans. Their chronic manifestations can be divided briefly in gingivitis and periodontitis, depending on the existence or not of teeth support tissue involvement. It is known that its etiology involves, among other factors, the accumulation of dental biofilm supra- and subgingival. Thus, studies seek to assess the antimicrobial potential of substances that have action against multispecies biofilms. Recently, a growing interest it has been observed in the study of peptides that demonstrate antimicrobial action against microorganisms present in the dental biofilm, as the KSL-W peptide. Nanostructured systems of drug release, as the liquid-crystalline systems (LCS), have long been used because of increasing stability and the efficacy of drugs, beyond modulate their action, that make them suitable to be used like peptide carrier. The potentialization of delivery system can, possibly, be achieved with the presence of mucoadesivas substances, essential for the prolonged stay of the formulation in the action place. Thereby, it is intended to develop and characterize nanostructured systems mucoadesivos, as the LCS, for incorporation of the synthetic peptide KSL-W, and later, evaluate the *in vitro* antimicrobial action in multispecies biofilms grown on the surface dental root. For that, developed liquid-crystalline systems constituted by cetyl alcohol ethoxylate and propoxilado - Procetyl<sup>®</sup> AWS (surfactant, S), oleic acid (oily phase, OP) and dispersion of poloxamer 407 at concentrations of 0.5%, 0.75% e 1% (the aqueous phase, AP), obtaining the diagrams S1, S2 e S3. It was selected 4 points of each diagram keeping the concentration of surfactant in 50% and varying the proportions of the AP and OP, F27 – 50% S, 10% OP and 40% AP; F28 – 50% S, 20% OP and 30% AP; F29 – 50% S, 30% OP and 20% AP; F30 – 50% S, 40% OP and 10% AP. Posteriorly, the regions were characterized by polarized light microscopy (PLM), small-angle X-ray scattering (SAXS), thermal tests, texture analysis, syringeability, bioadhesion *in vitro* and rheology. Characterization tests showed that the formulations F27 and F28 of S1, S2 and S3 presented by lamellar phase characteristics PLM, that was proved by SAXS. Otherwise, the formulations F29 and F30 of S1, S2 and S3 dark field demonstrated by PLM, it was not corroborated with SAXS. Texture analysis of data showed that F28 of S1, S2 and S3 were generally more adhesive than others. In the study of bioadhesion, it was found that with adding larger proportions of the AP in the systems, they showed greater blinging power. Rheological tests demonstrated that the formulations F29 and F30 (smaller concentrations of AP) showed Newtonian behavior, differently, the samples F27 and F28 (larger proportions of the AP) presented non-Newtonian behavior, revealing that the structure of the systems depends on the concentration of AP. The syringeability showed that the more structured systems ordered larger forces to the extrusion of the samples. The analysis of poloxamer dispersions by microcalorimetry showed that the higher the concentration, the greater the displacement of the thermal event at lower temperatures, showing its termogelificante property. In antimicrobial test was possible to observe a growth inhibition biofilm salivary multispecies for peptide KSL-W embedded in F28 (S3), in the concentration of 1 mg/mL, when compared to the positive control (biofilm without treatment). The results suggest the potential of the system as a platform for oral administration of peptides with oral anti-biofilm action.

**Keywords:** pharmaceutical nanotechnology; liquid crystals; mucoadhesive; antimicrobial peptide; multispecies biofilms.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das proporções do diagrama ternário de fases.....	38
Figura 2- Esquema do preparo das formulações .....	39
Figura 3– Dispositivo empregado para o corte dos blocos de dente bovino. ....	42
Figura 4- Fotografia do dispositivo adaptado na utilização da determinação do trabalho de seringabilidade. ....	45
Figura 5- Esquema do preparo do biofilme e execução da análise microbiológica. ....	47
Figura 6- Esquema da continuação da execução da análise microbiológica. ....	48
Figura 7- Perfil cromatográfico do peptídeo bruto obtido no tempo 0-30 minutos. ....	49
Figura 8- Perfil cromatográfico do peptídeo KSL-W puro. ....	50
Figura 9- Espectro de massas do peptídeo KSL-W puro.....	51
Figura 10- Diagramas de fases ternários. AO (ácido oleico) - fase oleosa; PRO (Procetyl® AWS) – tensoativo; A (água) ou P407 (Dispersão de poloxamer 407) - fase aquosa; CL (cristal líquido); ME (microemulsão); EM (emulsão); SF (separação de fases). Em que, as fases aquosas são: (a) água; (b) 0,50% de Dispersão de poloxamer 407; (c) 0,75% de Dispersão de poloxamer 407 e (d) 1% de Dispersão de poloxamer 407.....	53
Figura 11- Fotomicrografia da formulação 27- 0,50%.....	56
Figura 12- Fotomicrografia da formulação 28- 0,50%.....	56
Figura 13- Fotomicrografia da formulação 29- 0,50%.....	56
Figura 14- Fotomicrografia da formulação 30- 0,50%.....	56
Figura 15- Fotomicrografia da formulação 27- 0,75%.....	57
Figura 16- Fotomicrografia da formulação 28- 0,75%.....	57
Figura 17- Fotomicrografia da formulação 29- 0,75%.....	57
Figura 18- Fotomicrografia da formulação 30- 0,75%.....	57
Figura 19- Fotomicrografia da formulação 27- 1%.....	58
Figura 20- Fotomicrografia da formulação 28- 1%.....	58
Figura 21- Fotomicrografia da formulação 29- 1%.....	58
Figura 22- Fotomicrografia da formulação 30- 1%.....	58
Figura 23- Avaliação estrutural das amostras 27_0,5%, 27_0,75% e 27_1% por SAXS. ....	60
Figura 24- Avaliação estrutural das amostras 28_0,5%, 28_0,75% e 28_1% por SAXS. ....	60

Figura 25- Avaliação estrutural das amostras 29_0,5%, 29_0,75% e 29_1% por SAXS. .....	61
Figura 26- Avaliação estrutural das amostras 30_0,5%, 30_0,75% e 30_1% por SAXS. .....	61
Figura 27- Reograma da formulação 27- 0,50% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	65
Figura 28- Reograma da formulação 27- 0,75% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	65
Figura 29- Reograma da formulação 27- 1% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	66
Figura 30- Reograma da formulação 28- 0,50% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	68
Figura 31- Reograma da formulação 28- 0,75% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	68
Figura 32- Reograma da formulação 28- 1% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	69
Figura 33- Reograma da formulação 29- 0,50% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	69
Figura 34- Reograma da formulação 29- 0,75% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	70
Figura 35- Reograma da formulação 29- 1% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	70
Figura 36- Reograma da formulação 30- 0,50% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	71
Figura 37- Reograma da formulação 30- 0,75% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	71
Figura 38- Reograma da formulação 30- 1% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	72
Figura 39- Variação do módulo de armazenagem G' (círculos) e de perda G'' (triângulos) em função da frequência para a amostra 27- 0,50% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).	75
Figura 40- Variação do módulo de armazenagem G' (círculos) e de perda G'' (triângulos) em função da frequência para a amostra 27- 0,75% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).	75
Figura 41- Variação do módulo de armazenagem G' (círculos) e de perda G'' (triângulos) em função da frequência para a amostra 27- 1% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).....	76
Figura 42- Variação do módulo de armazenagem G' (círculos) e de perda G'' (triângulos) em função da frequência para a amostra 28- 0,50% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).	76
Figura 43- Variação do módulo de armazenagem G' (círculos) e de perda G'' (triângulos) em função da frequência para a amostra 28- 0,75% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).	77
Figura 44- Variação do módulo de armazenagem G' (círculos) e de perda G'' (triângulos) em função da frequência para a amostra 28- 1% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).....	77
Figura 45- Variação do módulo de armazenagem G' (círculos) e de perda G'' (triângulos) em função da frequência para a amostra 29- 0,50% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).	78
Figura 46- Variação do módulo de armazenagem G' (círculos) e de perda G'' (triângulos) em função da frequência para a amostra 29- 0,75% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).	78
Figura 47- Variação do módulo de armazenagem G' (círculos) e de perda G'' (triângulos) em função da frequência para a amostra 29- 1% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).....	79

Figura 48- Variação do módulo de armazenagem $G'$ (círculos) e de perda $G''$ (triângulos) em função da frequência para a amostra 30- 0,50% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).	79
Figura 49- Variação do módulo de armazenagem $G'$ (círculos) e de perda $G''$ (triângulos) em função da frequência para a amostra 30- 0,75% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).	80
Figura 50- Variação do módulo de armazenagem $G'$ (círculos) e de perda $G''$ (triângulos) em função da frequência para a amostra 30- 1% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).	80
Figura 51– Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 0,50%.	88
Figura 52– Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 0,75%.	88
Figura 53– Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 1,0%.	89
Figura 54– Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 10,0%.	89
Figura 55– Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 15,0%.	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Porcentagem de cada composto dos sistemas selecionados para caracterização físico-química. ....	40
Tabela 2- Valores de $q_{\max}$ (Å) e razão entre as distâncias interplanares das formulações selecionadas. ....	62
Tabela 3- Índice de escoamento ( $\eta$ ) e índice de consistência (K) dos sistemas selecionados em todas as condições de temperatura de armazenamento.....	73
Tabela 4- Valores $G'$ e $G''$ do teste oscilatório para todas as formulações selecionadas à 5 °C, 25 °C e 37 °C. ....	81
Tabela 5- Propriedades mecânicas das formulações determinadas por meio de análise de perfil de textura à temperatura de 37°C. ....	83
Tabela 6- Trabalho da força bioadesiva (mN.s) das formulações. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão, à temperatura 37°C. ....	85
Tabela 7- Trabalho de seringueabilidade das formulações selecionadas à 25 °C. ....	86
Tabela 8- Relações de concentração de poloxamer com a temperatura máxima detectada. ....	90
Tabela 9- Porcentagem de crescimento do biofilme <i>in vitro</i> frente amostras adicionadas. ....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\lambda$  max - Comprimento de onda de máxima emissão

ACN - Acetonitrila

Boc - *t*-butiloxicarbonila

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCM - Diclorometano

DIC - Diisopropilcarbodiimida

DIEA - N-Etildiisopropilamina

DMF - N,N-Dimetilformamida

EDT - 1, 2-Etanoditiol

Fmoc - 9-fluorenilmetiloxcarbonila

G' – Módulo elástico

G'' - Módulo viscoso

HATU - Hexafluorofosfato de 2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

HBTU - Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

HOBt - N-Hidroxibenzotriazol

K – Índice de consistência

KSL-W – Peptídeo com sequência dos aminoácidos: Lys- Lys- Val- Val- Phe- Trp- Val- Lys- Phe- Lys

$m/z$  - Relação massa-carga

m – Massa

$\eta$  – Índice de escoamento

NMP - N-metil-pirrolidona

Pa - Pascal

SAXS: Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

TBTU - Tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

TFA - Ácido trifluoroacético

TFE – Trifluoroetanol

TIS – Triisopropilsilano

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1.	Doença periodontal.....	22
2.1.1.	Fatores determinantes para progressão da doença periodontal.....	23
2.1.2.	Tratamentos contra doença periodontal.....	24
2.2.	Peptídeos antimicrobianos contra doença periodontal.....	25
2.3.	Sistemas de liberação de proteínas e peptídeos.....	26
2.4.	Sistemas nanoestruturados.....	27
2.4.1.	Sistemas líquido-cristalinos.....	28
2.5.	Sistemas mucoadesivos.....	28
2.6.	Perspectivas para o tratamento da doença periodontal.....	31
3.	OBJETIVOS.....	32
3.1.	Objetivo Geral.....	32
3.2.	Objetivos Específicos.....	32
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1.	Material.....	33
4.1.1.	Matérias-primas, reagentes e soluções.....	33
4.1.2.	Equipamentos.....	34
4.2.	Métodos.....	35
4.2.1.	Síntese do peptídeo KSL-W.....	35
4.2.2.	Purificação e caracterização do peptídeo KSL-W.....	36
4.2.3.	Determinação da relação massa/carga (m/z) .....	36
4.2.4.	Desenvolvimento das formulações.....	37
4.2.4.1.	Preparo da dispersão de poloxamer 407.....	37
4.2.4.2.	Construção dos diagramas de fases ternários.....	37
4.2.5.	Caracterização físico-química dos sistemas.....	39
4.2.5.1.	Microscopia de luz polarizada.....	40
4.2.5.2.	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	40
4.2.5.3.	Análise do perfil de textura.....	41
4.2.5.4.	Bioadesão <i>in vitro</i> em superfície de dente bovino.....	41
4.2.5.5.	Avaliação <i>in vitro</i> da força bioadesiva.....	43
4.2.5.6.	Análises reológicas.....	43

4.2.5.6.1.	Análise reológica contínua.....	43
4.2.5.6.2.	Análise reológica oscilatória.....	44
4.2.5.7.	Determinação da seringabilidade.....	44
4.2.5.8.	Análise microcalorimétrica das dispersões de poloxamer.....	45
4.3.	Análise estatística.....	46
4.4.	Ensaio microbiológicos.....	46
4.4.1.	Preparo do biofilme salivar multiespécie.....	46
4.4.2.	Execução da análise microbiológica do peptídeo KSL-W frente ao biofilme multiespécie salivar.....	47
5.	RESULTADOS.....	49
5.1.	Síntese do peptídeo KSL-W.....	49
5.2.	Purificação do peptídeo KSL-W bruto.....	49
5.3.	Determinação da relação massa/carga (m/z) .....	50
5.4.	Desenvolvimento das formulações.....	51
5.4.1.	Construção dos diagramas de fases ternários.....	51
5.5.	Caracterização físico-química.....	55
5.5.1.	Microscopia de luz polarizada.....	55
5.5.2.	Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	59
5.5.3.	Análises reológicas.....	63
5.5.3.1.	Análise reológica contínua.....	63
5.5.3.2.	Análise reológica oscilatória.....	74
5.5.4.	Análise do perfil de textura.....	82
5.5.5.	Avaliação <i>in vitro</i> da força bioadesiva.....	84
5.5.6.	Determinação do trabalho de seringabilidade.....	85
5.5.6.1.	Análise térmica das dispersões de poloxamer 407.....	87
5.6.	Ensaio de inibição <i>in vitro</i> da formação de biofilme multiespécie..... salivar.....	91
6.	CONCLUSÕES.....	94
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

## 1. INTRODUÇÃO

O cuidado com a higiene bucal é muito importante para a manutenção da saúde geral do organismo humano. Isto é evidenciado pela repercussão nas novas abordagens dos protocolos clínicos, que associam cada vez mais a saúde bucal com a saúde sistêmica, visto que a boca pode atuar tanto como meio de entrada e fonte de contágio para doenças, quanto como um local primário para disseminação e manifestações de doenças sistêmicas (BOBETSIS *et al.*, 2006; HAUMSCHILD *et al.*, 2009).

O acúmulo do biofilme oral, pode ocasionar patologias como a doença periodontal, que está entre as mais frequentes patologias orais humanas e têm consequências significativas na qualidade de vida do indivíduo, gerando grandes gastos com tratamentos (DEVINE e COSSEAU, 2008; PETERSEN *et al.*, 2005).

A doença periodontal é uma resposta inflamatória exacerbada causada pelo acúmulo de biofilme oral supra e subgingival (biofilme), que pode progredir para o periodonto de sustentação. Esta doença, se não tratada, pode resultar em perda de inserção periodontal (bolsa periodontal), danos nas estruturas de suporte dos dentes podendo, provocada pela relação entre o acúmulo local de biofilme dental e a resposta imune do organismo e consequentemente, ocasionar perda do elemento dental. A sua manifestação clínica pode ser dividida genericamente em gengivite e periodontite, dependendo da existência ou não de envolvimento dos tecido de sustentação dos dentes (DEVINE e COSSEAU, 2008; SOUTHARD e GODOWSKI, 1998).

Segundo Socransky e colaboradores (1998), as bactérias predominantes em doenças periodontais são as do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*). A presença deste complexo tem sido fortemente associada com outras patologias, como lesões cardiovasculares (DOGAN *et al.*, 2005; SPAHR *et al.*, 2006), diabetes (ALVES *et al.*, 2007; LALLA *et al.*, 2006), pré-eclampsia (PASSINI JÚNIOR *et al.*, 2007) e recém-nascidos com baixo peso (LOURO *et al.*, 2001). Seu tratamento consiste na remoção física das bactérias do local da infecção, por meio de procedimentos clínicos aplicados pelo cirurgião dentista associado à aplicação tópica (ou sistêmica) de anti-inflamatórios e/ ou agentes antimicrobianos (AKALIN *et al.*, 2004; BRUSCHI, 2006; JACOB, 2006; JONES *et al.*, 1996; NORKIEWICZ *et al.*, 2001).

Biofilmes se desenvolvem pela colonização sequencial e ordenada da superfície dentária por várias bactérias orais, que se organizam funcionalmente no interior de uma

matriz extracelular de polissacarídeos, formando uma estrutura complexa e dinâmica (MARSH, 2004; KOLENBRANDER *et al.*, 2006). Estas células bacterianas planctônicas (colonizadores primários) se aderem à película adquirida sobre a superfície do dente e posteriormente, em virtude da co-agregação de outros micro-organismos (colonizadores secundários), promovem comunicação metabólica e troca genética inter e intra-espécies (HOJO *et al.*, 2009).

Atualmente, observa-se crescente interesse no uso de peptídeos como agentes alternativos contra micro-organismos presentes em biofilmes orais, uma vez que estes não apresentam resistência bacteriana como os antimicrobianos sintéticos (SEMLALI *et al.*, 2011).

O decapeptídeo antimicrobiano  $\text{NH}_3^+$ -Lys- Lys- Val- Val- Phe- Lys- Val- Lys- Phe- Lys-  $\text{COO}^-$  (KSL), desenvolvido e apresentado na biblioteca tecnológica de combinações sintéticas, mostra uma gama de atividade antibacteriana (HONG *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* têm demonstrado que este peptídeo atua de maneira direta na prevenção do desenvolvimento de biofilme oral formado por bactérias salivares humanas, bem como na inibição do crescimento de patógenos bacterianos orais associados com a periodontite e o desenvolvimento e formação de biofilme oral (SILVA *et al.*, 2012; CONCANNON *et al.*, 2003; LEUNG *et al.*, 2005). Seu mecanismo de ação, todavia, ainda não está totalmente elucidado (LIU *et al.*, 2011). Leung e colaboradores (2009) acreditam que seja decorrente de ação na membrana bacteriana. Todavia, ao realizarem experimentos correlacionando a despolarização da membrana com a ação bactericida, os resultados obtidos não foram conclusivos.

Pesquisas *in vitro* e *in vivo* realizadas com o KSL demonstraram que um dos análogos deste peptídeo, o KSL-W, possui melhor estabilidade e adsorção devido à presença do aminoácido triptofano em substituição a uma lisina (NA *et al.*, 2007). Estudos incorporando o KSL-W em uma goma de mascar demonstraram que este peptídeo pode ser utilizado como um agente removedor de biofilme oral (NA *et al.*, 2005; FARAJ, 2007; NA *et al.*, 2007).

O peptídeo  $\text{NH}_3^+$ -Lys- Lys- Val- Val- Phe- Trp- Val- Lys- Phe- Lys-  $\text{COO}^-$  (KSL-W) tem mostrado um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (WILLIAMS *et al.*, 2012). Também, tem apresentado alguns efeitos diferenciais sobre a função imune de células de mamíferos, como a migração, adesão e modulação do metabolismo de oxidação (WILLIAMS *et al.*, 2012).

Estudos de toxicidade realizados por Semlali e colaboradores (2011) utilizando este peptídeo em culturas de células epiteliais gengivais humanas indicaram efeito não tóxico sobre a adesão ou o crescimento celular, o que o torna ainda mais atraente como agente terapêutico. Quando se pensa na utilização da via bucal, a via de liberação que será utilizada neste trabalho, alguns fatores devem ser considerados, como a secreção contínua da saliva (0,5 - 2L/dia), que pode levar à diluição do fármaco e sua possível ingestão, além da remoção involuntária da forma farmacêutica. Além disso, problemas associados com a eficácia dos peptídeos são intrínsecos ao desenvolvimento de formulações com atuação em substratos biológicos e muitas vezes estas substâncias podem apresentar falta de toxicidade seletiva (MILLER *et al.*, 2005).

Apesar das desvantagens apresentadas, esta via oferece muitas vantagens, como ambiente favorável para a administração de fármacos, especialmente proteínas e polipeptídeos, decorrente da ausência de hidrólise ácida e do efeito hepático de primeira-passage (MILLER *et al.*, 2005), administração fácil e indolor, rápido início de ação devido à alta vascularização da mucosa e fácil aderência ao tratamento (HOOGSTRAATE e WERT, 1998).

Sistemas nanoestruturados de liberação, englobando os lipossomas, cristais líquidos, microemulsões e nanopartículas, têm sido utilizados como carreadores alternativos, uma vez que representam uma estratégia interessante para a administração intrabolsa periodontal de peptídeos. Estes sistemas protegem o princípio ativo contra degradações e possibilitam a liberação no local específico de ação em uma taxa controlada (KANG, 2009).

Vários trabalhos na literatura têm demonstrado que a incorporação de peptídeos em sistemas de liberação de fármacos pode ser uma estratégia interessante a ser adotada, independente da via de administração a ser utilizada (LESTINI *et al.*, 2002; KUBIK *et al.*, 2005; STEVENSON *et al.*, 2005; CHALASANI *et al.*, 2007). Lestini e colaboradores (2002) desenvolveram lipossomas para promover a liberação local de fármacos em doenças cardiovasculares, utilizando peptídeos contendo a sequência ácido aspártico-arginina-glicina.

Dentre os sistemas nanoestruturados que podem ser utilizados para a incorporação de peptídeos, destacam-se os sistemas líquido-cristalinos (SLC), os quais apresentam vantagens relacionadas, principalmente, ao fato de promoverem liberação controlada de

fármacos, protegerem os princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação, além de aumentarem a eficácia de fármacos (MOHANRAJ e CHEN, 2006).

Os SLC possuem propriedades tanto de líquidos quanto de sólidos. Apresentam ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos (CHORILLI *et al.*, 2009). Eles podem ser divididos em duas principais classes: os termotrópicos, formados pela influência da temperatura, e os liotrópicos, constituídos por misturas de compostos anfífilos em um solvente, em geral a água (ROCHA, 2010).

Os SLC oferecem grande potencial de transportadores no campo dos peptídeos e proteínas, apesar dessa aplicação ser ainda pouco explorada. Rizwan e colegas (2010) e Angelova e colaboradores (2010) verificaram que peptídeos incorporados em fases cúbicas foram mais protegidos contra degradações físicas e químicas, apresentando também liberação prolongada.

Tratando-se de aplicação bucal de peptídeos, uma estratégia interessante é o emprego de polímeros mucoadesivos nas formulações. O termo mucoadesivo é comumente usado para substâncias que se ligam à camada de mucina das membranas biológicas, sendo essenciais para permanência prolongada da formulação no local de ação (JASTI *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2011).

Os polímeros mucoadesivos podem ser empregados objetivando manter uma alta concentração do peptídeo no local de ação por um longo período, além de protegê-lo da degradação ambiental, pelo fato de terem grande afinidade pela mucosa bucal (VEUILLEZ *et al.*, 2001). Esses polímeros também podem competir com enzimas proteolíticas, o que é interessante para substâncias propensas à degradação enzimática, como os peptídeos (MILLER *et al.*, 2005).

O copolímero em tri-bloco de polioxietileno-polioxipropileno termossensível (Pluronic® F127), composto por 70% de unidades de polioxietileno, é capaz de formar tanto gel líquido-cristalino isotrópico quanto anisotrópico, possuindo predisposição em formar gel transparente em meios aquosos a uma concentração de aproximadamente 20% (v/v) (MIKSIK e DEYL, 2000; CAFAGGI *et al.*, 2005; LIMA, 2010). Também, apresenta capacidade única de gelificação térmica reversível. O gel é obtido em temperaturas mais altas, como a temperatura corpórea, e pode ser revertido mediante resfriamento. Esse copolímero tem sido explorado em sistemas de liberação contendo vários agentes terapêuticos por exibir alta capacidade de solubilização, baixa toxicidade e excelentes

características de liberação controlada e prolongada de fármacos (MORIKAWA *et al.*, 1987; BHARDWAJ e BLANCHARD, 1996; DESAI e BLANCHARD, 1998; MIKSIK e DEYL, 2000; CAFAGGI *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Williams e colaboradores (2012) utilizaram esse copolímero na obtenção de hidrogéis para incorporação do peptídeo KSL-W para uso na cicatrização de feridas em camundongos. Este peptídeo demonstrou ser multifuncional, pois além de exercer ação antimicrobiana, foi capaz de recrutar células de defesa e inativar patógenos. Os neutrófilos demonstraram uma capacidade para migrar em direção KSL-W de uma maneira dependente da concentração, acelerando assim a recuperação das feridas, podendo ser considerado quimiotático.

Na literatura, não há relatos de utilização do KSL-W incorporado em sistema de liberação controlada visando o tratamento de doenças causadas pelo acúmulo do biofilme oral. Dessa forma, pretendeu-se desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados mucoadesivos, como os SLC, para incorporação do peptídeo sintético KSL-W, e posteriormente, avaliar a ação anti-biofilme oral.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Doença periodontal

Segundo últimos dados publicados pela Organização Mundial da Saúde sobre prevalência da doença periodontal, (divulgados em abril de 2012), cerca de 15 a 20% da população mundial com idade entre 35-44 anos apresentam doença periodontal grave (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica do periodonto, de caráter progressivo, induzida por bactérias e que leva à destruição dos tecidos de suporte do dente – osso, ligamento periodontal e cemento (QUIRINO *et al.*, 2009; DARVEAU, 2010). Causada pelo acúmulo de biofilme oral supra e subgingival, que pode ou não progredir para o periodonto de sustentação. Se não tratada a doença, sua possível consequência é a perda de inserção dentária e danos nas estruturas de suporte dos dentes, o que conseqüentemente, poderão ocasionar a perda do elemento dental. A sua manifestação crônica pode ser dividida genericamente em gengivite e periodontite, dependendo da existência ou não de envolvimento dos tecido de sustentação dos dentes (DEVINE e COSSEAU, 2008; SOUTHARD e GODOWSKI, 1998).

Considerando indivíduos com boa saúde periodontal, é possível observar que a profundidade do sulco gengival é mínima, até 3mm. Entretanto, na presença da periodontite essa profundidade aumenta, entre 4 e 12 mm, uma vez que ocorre a migração do epitélio juncional em direção à raiz do dente.

O sulco gengival é continuamente irrigados pelo fluido gengival crevicular, cuja composição é análoga à do plasma, porém em menores concentrações. Normalmente, o volume desse fluido no sulco gengival é de 0,04  $\mu\text{L}$  e seu fluxo de 0,03  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; porém, com a formação da bolsa periodontal, seu volume eleva-se para 0,05  $\mu\text{L}$  e seu fluxo para 0,05  $\mu\text{L}/\text{min}$  podendo atingir a 2,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  (NUNES, 2012).

### **2.1.1. Fatores determinantes para progressão da doença periodontal**

Biofilmes orais se desenvolvem pela colonização sequencial e ordenada da superfície dentária por várias bactérias orais, que se organizam funcionalmente no interior de uma matriz extracelular de polissacarídeos, formando uma estrutura complexa e dinâmica (MARSH, 2004; KOLENBRANDER *et al.*, 2006). Estas células bacterianas planctônicas (colonizadores primários) se aderem à película adquirida sobre a superfície do dente e posteriormente, em virtude da co-agregação de outros micro-organismos (colonizadores secundários), promovem comunicação metabólica e troca genética inter e intra-espécies (HOJO *et al.*, 2009).

Ressalta-se que essas bactérias patogênicas mais evidenciadas necessitam do biofilme (estrutura complexa e dinâmica) como suporte/ auxílio para sua própria sobrevivência, ou seja, para haver a troca de substratos entre espécies. Existem grandes indícios que as diferentes espécies se unem e formam microfilmes, os quais conseguem aumentar a resistência aos antimicrobianos (PASTERNAK, 2009).

Os biofilmes orais formados na superfície do dente podem contribuir para o surgimento da cárie dentária, gengivite e conseqüentemente evoluir para uma periodontite (LEUNG *et al.*, 2009; MASH, 2006).

Embora o biofilme presente no interior da bolsa periodontal apresente diferentes espécies de micro-organismos (aproximadamente 300 espécies consubstanciadas), apenas algumas delas apresentam relação com a patologia (CARVALHO e CABRAL, 2007). Segundo Socransky e colaboradores (1998), as bactérias predominantes em doenças periodontais são as do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*).

### **2.1.2. Tratamentos contra doença periodontal**

Como já dito anteriormente, o tratamento para a doença periodontal mais utilizado é a remoção física das bactérias do local da infecção, associando a este tratamento anti-inflamatórios e/ou agentes antimicrobianos por via tópica ou sistêmica (NUNES, 2012; TABARY *et al.*, 2014). O uso de fármacos, como a clorexidina, está indicado, porém sua aplicação clínica é limitada, uma vez que apresenta um gosto amargo, pode provocar manchas nos dentes com o uso frequente e perda de sensibilidade das papilas linguais (WEI *et al.*, 2006).

Na literatura, depara-se com a busca por sistemas e dispositivos antimicrobianos de liberação para aplicações no interior de bolsas periodontais, por volta da década de 70, com o intuito de conseguir permanecer a concentração do fármaco incorporado em quantidades iguais ou maiores que a sua concentração inibitória mínima (BRUSCHI *et al.*, 2006). A aplicação de sistemas ou dispositivos de liberação intrabolsa periodontal é possível pois o seu formato colabora para a acomodação destes sistemas, levando também em consideração o fluxo crevicular gengival que facilita a liberação do fármaco (NUNES, 2012).

No início dos estudos realizados para a obtenção desses dispositivos, os pesquisadores utilizaram polímeros não biodegradáveis os quais posteriormente foram abandonados mediante aos inconvenientes como a necessidade de se remover os dispositivos após o tempo de contato requerido, a dificuldades de regeneração da mucosa e conseqüentemente a não adesão do tratamento por parte do paciente frente essas intervenções. Posteriormente, iniciaram estudos com sistemas utilizando polímeros biodegradáveis, os quais mostraram-se vantajosos quando comparado aos que utilizaram não biodegradáveis (SOSKOLONE e FREIDMAN, 1996).

Mediante aos sistemas de liberação intrabolsas periodontal já desenvolvidos e encontrados na literatura, os sistemas injetáveis oferecem maiores benefícios como fácil aplicação, (intermediado pelo cirurgião dentista, o qual necessitará apenas do auxílio de uma seringa no ato da aplicação, desta maneira o sistema irá preencher completamente o interior da bolsa periodontal), por serem biodegradáveis e por dificilmente apresentarem incômodo ao paciente no ato da aplicação (BRUSCHI, 2006).

Consequentemente, para que haja uma aplicação sem perturbações conforme dito anteriormente, os sistemas devem dispor uma determinada fluidez, de modo que colabore com a extrusão deste sistema para fora do dispositivo sem muitos esforços e posteriormente, quando houvesse total extrusão do sistema, este houvesse uma alteração em sua viscosidade para que ficasse retido no local da aplicação, ou mesmo que apresentasse propriedades bioadesivas para que impedisse a retirada do sistema do interior da bolsa periodontal devido ao fluxo do fluido crevicular gengival (MEDLICOTT *et al.*, 1994; SOSKOLONE e FREIDMAN, 1996; BRUSCHI, 2006).

## 2.2. Peptídeos antimicrobianos contra biofilme oral

Os peptídeos têm surgido como um grupo promissor de antimicrobianos (WEI *et al.*, 2006), apresentando elevado potencial de suas aplicações terapêuticas (ROMANELLI *et al.*, 2011; GODBALLE *et al.*, 2011). Tais substâncias, com suas extraordinárias propriedades, como atividade de amplo espectro, ação rápida e diminuição do desenvolvimento de resistência, tornaram-se moléculas promissoras no desenvolvimento de novos medicamentos (YEAMAN *et al.*, 2003).

Após levantamento de dados sobre peptídeos antimicrobianos, foi despertado o interesse pelo peptídeo KSL-W devido seus potenciais demonstrados por pesquisas já realizadas onde sua aplicação resultou em ações almejadas, como por exemplo, amplo espectro contra bactérias da cavidade bucal.

O decapeptídeo antimicrobiano  $\text{NH}_3^+$ -Lys- Lys- Val- Val- Phe- Lys- Val- Lys- Phe- Lys - $\text{COO}^-$  (KSL), desenvolvido e apresentado na biblioteca tecnológica de combinações sintéticas (dados armazenados e disponibilizados por pesquisadores), mostra uma ampla gama de atividade antibacteriana, desta maneira despertou o interesse do estudo de sua ação contra bactérias orais (HONG *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* têm demonstrado que este peptídeo atua de maneira direta na prevenção do desenvolvimento de biofilme oral formado por bactérias salivares humanas, bem como na inibição do crescimento de patógenos bacterianos orais associados com a periodontite e o desenvolvimento e formação de biofilmes orais (SILVA *et al.*, 2012; CONCANNON *et al.*, 2003; LEUNG *et al.*, 2005). Seu mecanismo de ação, todavia, ainda não está totalmente elucidado (LIU *et al.*, 2011). Leung e colaboradores (2009) acreditam que seja decorrente de ação na membrana bacteriana. Todavia, ao realizarem experimentos

correlacionando a despolarização da membrana com a ação bactericida, os resultados obtidos não foram conclusivos.

Pesquisas *in vitro* e *in vivo* realizadas com o KSL demonstraram que um dos análogos deste peptídeo, o KSL-W, possui melhor estabilidade e adsorção devido à presença do aminoácido triptofano em substituição a uma lisina (NA *et al.*, 2007). Estudos incorporando o KSL-W em uma goma de mascar demonstraram que este peptídeo pode ser utilizado como um agente removedor de biofilme oral (NA *et al.*, 2005; FARAJ, 2007; NA *et al.*, 2007).

O peptídeo KSL-W ( $\text{NH}_3^+$ -Lys- Lys- Val- Val- Phe- Trp- Val- Lys- Phe- Lys. –  $\text{COO}^-$ ) tem mostrado um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (WILLIAMS *et al.*, 2012). Estudos de toxicidade realizados por Semlali e colaboradores (2011) utilizando este peptídeo em culturas de células epiteliais gengivais humanas indicaram efeito não tóxico sobre a adesão ou o crescimento celular, o que o torna ainda mais atraente como agente terapêutico.

### **2.3. Sistemas de liberação de proteínas e peptídeos**

As biomoléculas proteicas são conhecidas por seu potencial terapêutico em várias doenças; porém, existem diferentes fatores ambientais que podem comprometer a estabilidade físico-química dessas substâncias bioativas, tais como pH, força iônica, temperatura, alta pressão, solventes não aquosos, íons metálicos, agitação e cisalhamento, sendo que a maioria desses fatores estão presentes em processos de fabricação comuns, incluindo esterilização e liofilização que também podem danificar as proteínas, reduzindo assim a sua atividade biológica (ALMEIDA *et al.*, 1997; YADAV *et al.*, 2011).

De modo geral o termo sistema de liberação de fármaco pode ser definido como método ou processo de administração de uma substância farmacologicamente ativa, que foi formulado com a finalidade de assegurar que tal substância atinja o local de ação, promovendo efeitos terapêuticos e minimizando os efeitos adversos; tal sistema não é farmacologicamente ativo, mas é capaz de melhorar a eficácia e/ou a segurança do agente terapêutico que ele carrega (SCHIFFTER, 2011).

Durante um longo período de anos, macromoléculas como as proteínas não eram consideradas viáveis para incorporação em sistemas de liberação modificada, devido ao tamanho de sua cadeia, sendo consideradas grandes demais para se difundirem pelos

materiais poliméricos. Com o avanço dos estudos de sistemas poliméricos foi observado o controle da liberação de macromoléculas por períodos prolongados, alguns hidrogéis preparados a partir de polímeros sintéticos como, por exemplo, metacrilato de hidroxietila e álcool polivinílico, e alguns polímeros naturais, como alginato, quitosana, colágeno e gelatina, foram considerados úteis para a incorporação de proteínas e peptídeos, sendo o foco de várias pesquisas para tal uso (DAI *et al.*, 2005).

O mecanismo de liberação de macromoléculas envolve sua difusão através de uma estrutura porosa na matriz polimérica, sendo que alguns fatores podem influenciar na taxa de liberação, como o tamanho, solubilidade e peso molecular da macromolécula, composição do polímero, entre outros (DAI *et al.*, 2005).

Diversos sistemas de liberação para a incorporação de peptídeos e proteínas (insulina, fatores de crescimento, etc.), com eles estão as micro e nanopartículas poliméricas, hidrogéis e os sistemas líquido-cristalinos (SLC), com o objetivo de proteger as proteínas contra degradação no organismo, além de promoverem um perfil de liberação modificada, gerando assim uma maior ação farmacológica (MOHANRAJ e CHEN, 2006).

#### **2.4. Sistemas nanoestruturados**

Sistemas nanoestruturados de liberação, englobando os lipossomas, cristais líquidos, microemulsões e nanopartículas, têm sido utilizados como carreadores alternativos, uma vez que representam uma estratégia interessante para a administração bucal de diversas moléculas bioativas, inclusive de peptídeos. Estes sistemas podem proteger o princípio ativo contra degradações e possibilitam a liberação no local específico de ação em uma taxa controlada (KANG, 2009).

Vários trabalhos na literatura têm demonstrado que a incorporação de peptídeos em sistemas de liberação de fármacos pode ser uma estratégia interessante a ser adotada, independente da via de administração a ser utilizada (LESTINI *et al.*, 2002; KUBIK *et al.*, 2005; STEVENSON *et al.*, 2005; CHALASANI *et al.*, 2007). Lestini e colaboradores (2002) desenvolveram lipossomas para promover a liberação local de fármacos em doenças cardiovasculares, utilizando peptídeos contendo a sequência ácido aspártico-arginina-glicina. Outro grupo de pesquisadores desenvolveu sistemas líquido-cristalinos para a incorporação e liberação controlada de insulina (STEVENSON *et al.*, 2005). As

nanopartículas vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de sistemas de liberação de hormônio do crescimento (somatotrofina) e insulina para administração nasal, como relatado por Chalasani e cols. (2007).

#### **2.4.1. Sistemas líquido-cristalinos**

Dentre os sistemas nanoestruturados que podem ser utilizados para a incorporação de peptídeos, destacam-se os sistemas líquido-cristalinos (SLC), os quais apresentam vantagens relacionadas, principalmente, ao fato de promoverem liberação controlada de fármacos, protegerem os princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação, além de aumentarem a eficácia de fármacos (MOHANRAJ e CHEN, 2006).

Os SLC possuem propriedades tanto de líquidos quanto de sólidos. Apresentam ordem estrutural e rigidez características de sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos (CHORILLI *et al.*, 2009). Eles podem ser divididos em duas principais classes: os termotrópicos, formados pela influência da temperatura, e os liotrópicos, constituídos por misturas de compostos anfifílicos em um solvente, em geral a água (ROCHA, 2010).

Os SLC oferecem grande potencial de transportadores no campo dos peptídeos e proteínas, apesar dessa aplicação ser ainda pouco explorada. Rizwan e colegas (2010) e Angelova e colaboradores (2010) verificaram que peptídeos incorporados em fases cúbicas foram mais protegidos contra degradações físicas e químicas, apresentando também liberação prolongada.

Ainda não são observados na literatura disponível, estudos utilizando o peptídeo KSL-W em sistemas líquido-cristalinos.

### **2.5. Sistemas mucoadesivos**

Tratando-se de aplicação intrabolsa periodontal de peptídeos, uma estratégia interessante é a incorporação de polímeros mucoadesivos nas mesofases líquido-cristalinas. O termo mucoadesivo é comumente usado para substâncias que se ligam à camada de muco que recobre as membranas biológicas, sendo essenciais para

permanência prolongada da formulação no local de ação (JASTI *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2011).

Os polímeros mucoadesivos podem ser empregados objetivando manter uma alta concentração do peptídeo no local de ação por um longo período, além de protegê-lo da degradação ambiental, pelo fato de terem grande afinidade pela mucosa bucal (VEUILLEZ *et al.*, 2001). Esses polímeros também podem competir com enzimas proteolíticas, o que é interessante para substâncias propensas à degradação enzimática, como os peptídeos (MILLER *et al.*, 2005).

Como exemplo de polímeros bioadesivos, tem sido destacado o copolímero em tri-bloco de polioxietileno-polioxipropileno termossensível (Pluronic<sup>®</sup> F127), composto por 70% de unidades de polioxietileno, o qual é capaz de formar tanto gel líquido-cristalino isotrópico quanto anisotrópico, possuindo predisposição em formar gel transparente em meios aquosos a uma concentração de aproximadamente 20% (v/v) (MIKSIK e DEYL, 2000; CAFAGGI *et al.*, 2005; LIMA, 2010). O poloxamer, que é um tensoativo com afinidades hidrofílicas, demonstra também um comportamento gelificante termo dependente reversível, o que pode ser usado como uma oportunidade de aplicação do sistema ainda líquido e sua posterior gelificação *in situ* (DOMINGOS, 2012; ESPOSITO *et al.*, 1996).

O gel é obtido em temperaturas mais altas, como a temperatura corpórea, e pode ser revertido mediante resfriamento. Esse copolímero tem sido explorado em sistemas de liberação contendo vários agentes terapêuticos por exibir alta capacidade de solubilização, baixa toxicidade e excelentes características de liberação modificada de fármacos (MORIKAWA *et al.*, 1987; BHARDWAJ e BLANCHARD, 1996; DESAI e BLANCHARD, 1998; MIKSIK e DEYL, 2000; CAFAGGI *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Williams e colaboradores (2012) utilizaram esse copolímero na obtenção de hidrogéis para incorporação do peptídeo KSL-W para uso na cicatrização de feridas em camundongos. Este peptídeo demonstrou ser multifuncional, pois além de exercer ação antimicrobiana, foi capaz de recrutar células de defesa e inativar patógenos.

Em nosso grupo de pesquisa foram estudados sistemas mucoadesivos compostos pelo tensoativo Procetyl<sup>®</sup> AWS para a administração cutânea, oral e nasal de fármacos. Um dos estudos mostrou como a combinação de Procetyl<sup>®</sup> AWS com diferentes fases oleosas, como ácido oleico ou óleo mineral, causa mudanças significativas na

organização estrutural dos sistemas. O ácido oleico permitiu a formação de sistemas líquidos e isotrópicos, além de fases lamelares e hexagonais, enquanto o óleo mineral diminui a formação de sistemas com fluidez e favorece a formação de fases cúbicas extremamente rígidas (CARVALHO *et al.*, 2012).

Carvalho (2009) desenvolveu sistemas líquido-cristalinos mucoadesivos utilizando como componentes o ácido oleico como fase oleosa, o Procetyl<sup>®</sup> AWS como tensoativo e água para a administração nasal do antirretroviral zidovudina. Nesta pesquisa, a autora verificou a propriedade mucoadesiva do sistema em muco nasal simulado (em temperatura nasal) e observou que conforme havia o aumento da quantidade de muco simulado, os sistemas se transformaram de microemulsões para cristais líquidos, melhorando assim a mucoadesão. O sistema desenvolvido foi promissor, revelando inclusive a possibilidade do uso deste em outras vias de administração.

Calixto (2013) desenvolveu sistemas mucoadesivos contendo Procetyl<sup>®</sup> AWS, ácido oleico e diversas dispersões de polímeros como fase aquosa (carbopol 0,5%, dispersão de policarbofil 0,5%, dispersão de hidroxietilcelulose 0,5% e dispersão de quitosana 0,5%), incorporando o peptídeo p1025 visando a prevenção da cárie. Foi concluído que os sistemas apresentaram biodesividade desejáveis para sistemas a serem aplicados na mucosa bucal.

Nos sistemas líquido-cristalinos, o mecanismo de mucoadesão envolvido é o mesmo utilizado por hidrogéis estímulo-sensitivos, cujo aumento da viscosidade é dado com um impulso fisiológico, como temperatura, pH ou força iônica (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2008; HE, KIM, LEE, 2008; CARVALHO, 2009).

## **2.6. Perspectivas para o tratamento da doença periodontal**

Na literatura a utilização do KSL-W incorporado em sistema de liberação modificada visando o tratamento de doença periodontal ainda não foi abordada. Dessa forma, observando ser uma pesquisa promissora, pretendeu-se desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados mucoadesivos, como os SLC, para incorporação do peptídeo sintético KSL-W, e posteriormente, avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* em biofilme multiespécie.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar sistemas líquido-cristalinos mucoadesivos para a incorporação do peptídeo KSL-W e avaliar *in vitro* seu potencial anti-biofilme oral.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar e purificar o peptídeo KSL-W de sequência:  $\text{NH}_3^+$ -Lys- Lys- Val- Val- Phe-Trp- Val- Lys- Phe- Lys-COO<sup>-</sup>;
- Desenvolver sistemas líquido-cristalinos para incorporação do decapeptídeo sintetizado e caracterizá-los por meio de microscopia de luz polarizada, reologia, espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS), avaliação do perfil de textura, seringabilidade e bioadesão *in vitro*;
- Realizar ensaio antimicrobiano *in vitro* da formulação desenvolvida frente a biofilme multiespécie salivar.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. *Matérias-primas, reagentes e soluções*

Acetonitrila (J.T. Baker<sup>®</sup>, Estados Unidos);  
Ácido oleico P.A. (Synth<sup>®</sup>, Brasil);  
Ácido trifluoroacético (Merck<sup>®</sup>, Alemanha)  
Água deionizada em sistema Milli Q<sup>®</sup> com condutividade 18,2 $\mu$ S.cm<sup>-1</sup>;  
Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl AWS – Croda<sup>®</sup>, Brasil);  
Dentes bovinos (Frigorífico Vangélio Mondelli LTDA - Bauru)  
Diclorometano (Sigma- Aldrich<sup>®</sup> Estados Unidos);  
Diisopropilcarbodiimida (Novartis<sup>®</sup> Estados Unidos);  
Fita dupla-face (Adermax<sup>®</sup>, Brasil);  
Gluconato de clorexidina - Periotrat<sup>®</sup>;  
Hemina (Sigma- Aldrich<sup>®</sup> Estados Unidos)  
Hexafluorofosfato de o-(benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametilurônico (Novartis<sup>®</sup> Brasil);  
L-aminoácidos (Tedia<sup>®</sup>, Estados Unidos);  
Membrana de acetato de celulose para tubos de diálise, 76 mm – Sigma -Aldrich  
Menadiona (Sigma- Aldrich<sup>®</sup> Estados Unidos)  
N-etildiidopropilamina (Novartis<sup>®</sup> Estados Unidos);  
Ninidrina (Sigma- Aldrich<sup>®</sup> Estados Unidos)  
N-hidroxibenzotriazol (Novartis<sup>®</sup> Estados Unidos);  
N-metil-2-pirrolidona (Qhemis<sup>®</sup>, Brasil);  
Poloxamer 407 (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Estados Unidos)  
Resina Rink Amide (Avantis<sup>®</sup> Estados Unidos);  
Seringas plásticas de 1,0 mL (BD<sup>®</sup>, Argentina);  
Trietanolamina (Synth<sup>®</sup>, Brasil);  
Tubos cônicos tipo Falcon (BD<sup>®</sup> Argentina);

### ***4.1.2. Equipamentos***

Analisador de textura TA.XT Plus – Stable Micro Systems®;  
Agitador mecânico – Marconi®;  
Balança analítica – Owa labor®;  
Balança semianalítica – Gehaka®;  
Centrífuga modelo TC 6 Du Pont – Sorvall TC®;  
Coluna analítica de fase reversa C18 (0,46 cm x 25 cm) - Ultrasphere®;  
Coluna analítica de fase reversa C18 (2,12 cm x 25 cm);  
Cromatógrafo - BEAKMAN®;  
Cromatógrafo – Prostar 400/ Dynamax System VARIAN®;  
Dimetilformamida (DMF) - Quemis®  
Espectrofluorímetro Cary Eclipse - Varian®  
Espectrômetro de Massas AmaZon SL - Bruker® com bomba Shimadzu LC-10AD®;  
Lavadora Ultra-sônica - UNIQUE®;  
Liofilizador - Biolab®;  
Microscópio de luz polarizada Axioskop – Zeizz®;  
Motor de alta rotação - modelo MRS 400 Torque – Dabi Atlante®  
Peagômetro – Gehaka®;  
Reômetro, modelo AR2000ex -TA Instruments®  
Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus – Hanson Research Corporation®;  
Sistema de purificação de água MILLIPORE®, Milli - Q Plus;  
Ultrassom Ultra Sonic Cleaner – UNIQUE®;  
Espectrofotômetro, modelo UV- 1601 PC – Shimadzu®.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Síntese do peptídeo KSL-W

Esta etapa do trabalho foi realizada com a colaboração do Professor Doutor Eduardo Maffud Cilli, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Foi realizada a síntese em fase sólida (SFS) do peptídeo, a qual acontece pela adição da sequência dos aminoácidos, um por vez, sobre um suporte polimérico o qual é insolúvel nos reagentes que serão utilizados durante o processo de síntese (STEWART e YOUNG, 1984; ATHERTON e SHEPPARD, 1989; LLOYD-WILLIAMS *et al.*, 1997; RUIZ, 2003).

Foram utilizados L-aminoácidos protegidos e com pureza acima de 98 %. O suporte polimérico (resina) utilizado nesta síntese foi a Rink Amide com grau de substituição de 0,6 mmol/g<sup>-1</sup>. Como reagentes de acoplamento, foram utilizados o diisopropilcarbodiimida (DIC), N-etildiidopropilamina (DIEA), hexafluorofosfato de o-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU) e N-hidroxibenzotriazol (HOBt).

A síntese foi realizada no sentido de C-terminal para N-terminal, onde a parte extrema de C-terminal permaneceu ligada à resina durante o proceder de toda síntese. Utilizou-se o protocolo 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc), o qual foi adotado pelo motivo de não aplicar ácidos fortes durante o processo, logo esquivando-se da degradação do composto. Logo, a região N-terminal do aminoácido foi protegida pelo protetor temporário, Fmoc, o qual é base lábil e os aminoácidos trifuncionais por protetores permanentes, terc-butiloxycarbonila (t-Boc), para que impedissem qualquer tipo de acoplamento na cadeia lateral durante a síntese.

Em cada acoplamento de aminoácidos à cadeia peptídica, eram ativados os grupos carboxílicos com DIC, HOBt, ou HBTU e DIEA nos casos que houve a necessidade de reacoplamento. Para a retirada do grupo Fmoc (base-lábil), foi feita a lavagem com piperidina a 20% e dimetilformamida (DMF). Foram realizados ciclos de lavagens alternadas com DMF e diclorometano (DCM) para a eliminação dos subprodutos. A

confirmação de cada acoplamento foi monitorada utilizando o teste de ninidrina (KAISER, 1970), o qual apresenta uma coloração azul na presença de grupos aminos livres quando elevado a uma temperatura de aproximadamente 121°C. Caso não houvesse a presença de grupos aminos livres, a coloração permanecia inalterada (amarelo).

Para a finalização da síntese, foi realizada a clivagem por meio da adição de solução contendo triisopropilsilano (TIS), água deionizada e TFA (proporção de 2,5: 2,5: 95; v: v: v) sob agitação durante duas horas. Em seguida, precipitou-se o peptídeo junto com a resina com éter gelado e centrifugação, ficando na parte sobrenadante os subprodutos resultantes da clivagem, os quais foram descartados. Posteriormente, o peptídeo foi solubilizado em solução com água deionizada e TFA (0,045%) e centrifugado, onde houve a precipitação da resina e coletado o sobrenadante (peptídeo). O sobrenadante foi liofilizado, obtendo-se o peptídeo bruto.

#### ***4.2.2. Purificação e caracterização do peptídeo KSL-W***

A purificação do peptídeo bruto sintetizado foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (CLAE), no modo semipreparativo, utilizando cromatógrafo BEAKMAN® com coluna de fase reversa C18 (2,12 cm x 25 cm), o qual fracionava automaticamente as porções de interesse. O grau de pureza dessas frações foi determinado utilizando cromatógrafo Prostar 400/ Dynamax System VARIAN®, com coluna analítica de fase reversa C18 (250 x 4, 6 mm) Ultrasphere. Utilizou-se durante o processo de purificação e determinação da pureza os solventes A (0,045% de TFA em água deionizada) e B (0,036% de TFA em acetonitrila). Foram utilizadas somente as frações que apresentaram grau de pureza elevado (acima de 95%), como descrito por Crusca Jr e colaboradores (2011).

#### ***4.2.3. Determinação da relação massa/carga (m/z)***

Para determinação da razão massa molecular/carga (MM/z), foi utilizado espectrômetro de massas AmaZon SL - Bruker®, com injeção direta utilizando bomba Shimadzu LC-10 AD. Após a injeção da amostra em análise, calcularam-se as massas moleculares obtidas experimentalmente.

#### ***4.2.4. Desenvolvimento das formulações***

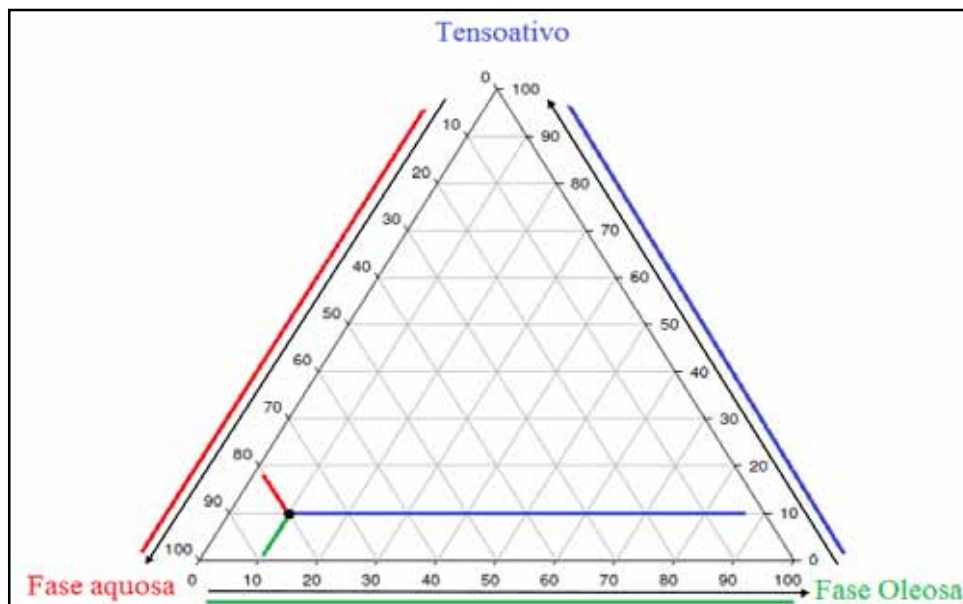
##### *4.2.4.1. Preparo da dispersão de poloxamer 407*

Foram preparadas dispersões de poloxamer nas concentrações de 5,0% (m/m), 7,5% (m/m) e 10,0% (m/m) em temperatura ambiente, adicionando o copolímero em água purificada em béquer, seguido de agitação mecânica por 24 horas.

##### *4.2.4.2. Construção dos diagramas de fases ternários*

Foram confeccionados três diferentes diagramas de fases ternários, sendo que a única diferenciação entre eles foi na fase aquosa. Todos continham ácido oleico como fase oleosa, álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl® AWS) como tensoativo e na fase aquosa foi utilizada dispersão de poloxamer 407 à 0,5%, 0,75% e 1% nos sistemas 1, 2 e 3, respectivamente.

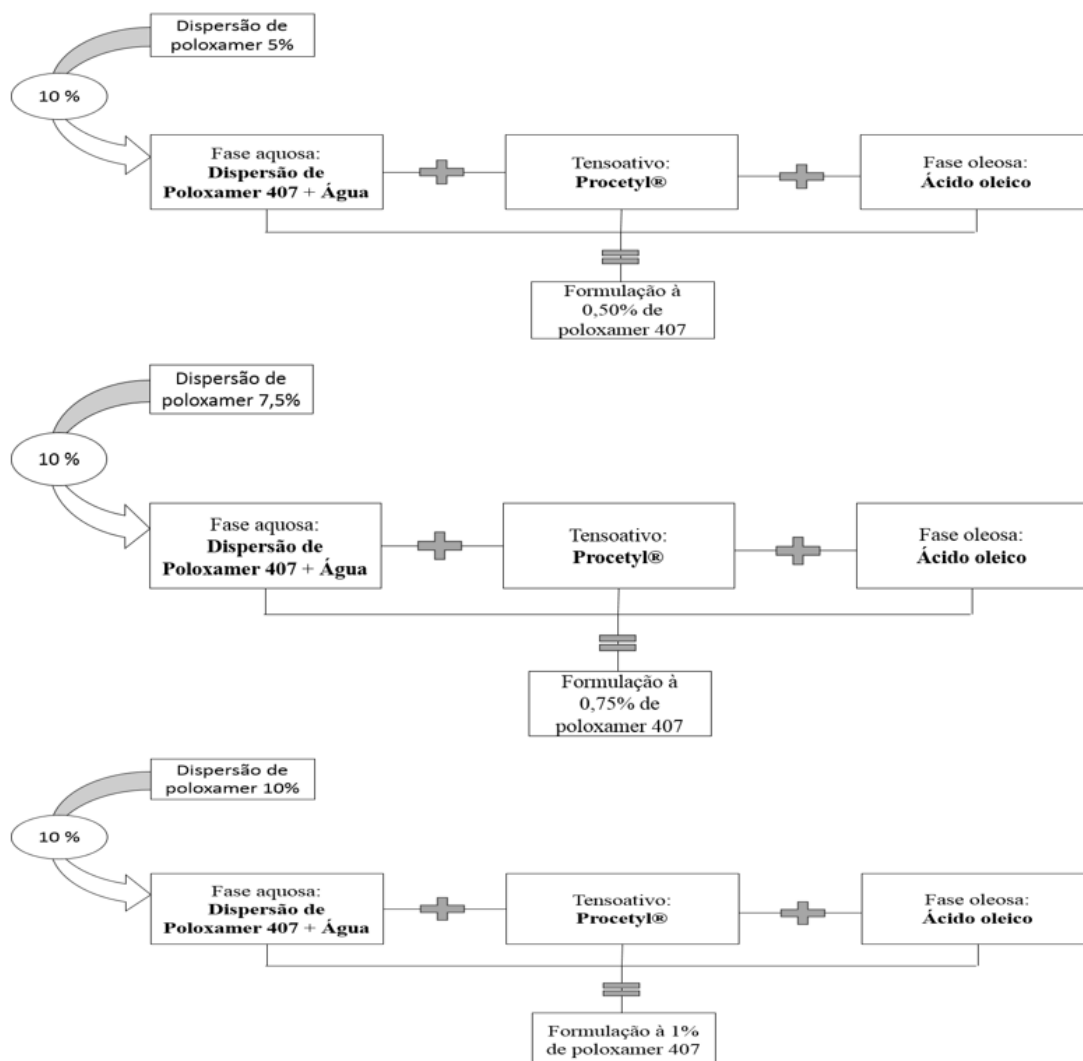
Para cada diagrama, foram preparadas 36 diferentes proporções, variando de 10 a 80% (m/m) os componentes citados acima, seguindo a orientação do diagrama, como exemplo da Figura 1, onde toma-se como exemplo um ponto que conterà 10% de fase oleosa, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa.

**Figura 1** - Representação das proporções do diagrama ternário de fases

Em temperatura ambiente, os componentes da fase oleosa, tensoativo e 10% das dispersões de poloxamer (5%, 7,5% e 10%) foram adicionados em recipientes, completando-se o volume com quantidade suficiente de água ultrapurificada, para atingir a proporção desejada de fase aquosa, de modo que a formulação final apresentasse a concentração de 0,5%, 0,75% ou 1% de dispersão de poloxamer. Posteriormente, os frascos foram levados para agitação em vórtex, até completa homogeneização. Na Figura 2 segue o esquema do preparo das formulações.

Após 24 horas, os sistemas obtidos foram visualmente classificados em separação de fases, sistemas líquidos ou viscosos opacos, translúcidos ou transparentes. Dessa maneira, determinou-se diferentes regiões no diagrama de fases. De acordo com essa classificação, foram selecionados os sistemas de interesse para posterior caracterização físico-química.

Figura 2- Esquema do preparo das formulações



#### 4.2.5. Caracterização físico-química dos sistemas

Foram selecionados para caracterização físico-química 4 pontos de cada diagrama (S1, S2 e S3), totalizando 12 diferentes formulações, as quais são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Porcentagem de cada composto dos sistemas selecionados para caracterização físico-química.

Sistemas	Ácido Oleico (%)	Procetyl (%)	Água (%)	Dispersão Poloxamer 5 % (%)	Dispersão Poloxamer 7,5% (%)	Dispersão Poloxamer 10% (%)
27_0,5%	10	50	30	10	-	-
27_0,75%	10	50	30	-	10	-
27_1%	10	50	30	-	-	10
28_0,5%	20	50	20	10	-	-
28_0,75%	20	50	20	-	10	-
28_1%	20	50	20	-	-	10
29_0,5%	30	50	10	10	-	-
29_0,75%	30	50	10	-	10	-
29_1%	30	50	10	-	-	10
30_0,5%	40	50	0	10	-	-
30_0,75%	40	50	0	-	10	-
30_1%	40	50	0	-	-	10

Para todas as formulações, variou-se apenas a razão água/óleo, sendo que a porcentagem de tensoativo foi fixada em 50%. Como consequência, pode-se observar a estruturação dos sistemas de acordo com incorporação de água, simulando o ambiente bucal, no qual a formulação entrará em contato.

#### 4.2.5.1. *Microscopia de luz polarizada*

Transferiu-se para lâminas 1 gota de cada um dos sistemas, as quais foram recobertas com lamínula e levadas para avaliação em microscópio sob luz polarizada, utilizando aumento de 40 vezes.

#### 4.2.5.2. *Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)*

As medidas de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Brasil), na linha SAXS1. Esta linha é equipada com um monocromador ( $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$ ), um detector vertical localizado cerca de 1,5 m da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento  $I(q)$ , em função do vetor de espalhamento,

$q$ . O espalhamento das micas e do ar foram subtraídos da intensidade total espalhada. Cada espectro foi coletado por 45 segundos. Essa instalação permitiu um vetor de espalhamento,  $q$ , entre aproximadamente 0,1 e 2,3  $\text{\AA}^{-1}$ . O teste foi realizado com as formulações à 37°C.

#### 4.2.5.3. *Análise do perfil de textura*

O perfil de textura foi avaliado empregando analisador de texturas TA-XT Plus (Stable Micro Systems, Inglaterra). Este equipamento possibilitou a apreciação de propriedades de textura, tais como compressibilidade, adesividade, dureza e coesão. Os sistemas selecionados (12,50 g) foram transferidos para tubos de centrífuga cônica de 50 mL (Falcon, BD<sup>®</sup>) e centrifugados por 5 minutos à 4000 rotações por minuto para eliminação de bolhas de ar. Após 24 horas de repouso, os tubos foram analisados. Estes, eram posicionados de maneira que permitissem acesso da sonda analítica (10 mm de diâmetro) do analisador de textura com a formulação. No software Exponent Lite<sup>®</sup>, foram adicionados os parâmetros desejados como a velocidade de compressão e retorno à superfície (0,5 mm/s) e profundidade de entrada da sonda (10 mm). Após a primeira entrada da sonda na amostra, depois de um período de repouso (5 segundos) realizou-se, nas mesmas condições, uma segunda compressão. As amostras foram avaliadas numa temperatura de 37 °C, com n=7.

#### 4.2.5.4. *Bioadesão in vitro em superfície de dente bovino*

A fim de realizar a análise da força bioadesiva *in vitro* utilizando superfície de dentes bovinos, realizou-se inicialmente o preparo dos blocos de dentes bovinos (adquiridos de frigorífico sob fiscalização do Ministério da Agricultura – SIF nº 1758) assim como o processamento da saliva. Para a obtenção dos blocos de esmalte de dentes bovinos (região do cimento), foram selecionados incisivos de novilhos com 20 a 30 meses de idade, sendo estes excluídos quando havia a presença de cálculo no terço médio coronário, desgaste do terço incisal, trincas, alterações morfológicas da coroa e hipoplasias de esmalte. Após serem limpos, os dentes foram fixados por uma morsa de aperto submersa em água e gelo. Por intermédio de um motor de alta rotação (modelo MRS 400 Torque – Dabi Atlante<sup>®</sup>) engatado a um disco de ponta diamantada cilíndrica

(KG Sorensen<sup>®</sup>), foram obtidos blocos de 1 cm de diâmetro e 0,30 cm de espessura. Em seguida, para a regularização da superfície, os discos foram desgastados com lixas d'água de granulação 200 (T469-SF). A Figura 3 exibe o dispositivo empregado para o corte dos blocos de dentes bovinos.

**Figura 3** – Dispositivo empregado para o corte dos blocos de dente bovino.



Como citado anteriormente, também realizou-se o processamento da saliva para realização do teste de bioadesão *in vitro*. Foi coletada em tubos esterilizados cônicos de 50 mL (Falcon<sup>®</sup>, BD) saliva não estimulada de 20 doadores voluntários de ambos os sexos, previamente selecionados, os quais não utilizaram nos últimos três meses enxaguantes bucais, antimicrobianos e medicamentos que causasse qualquer tipo de intervenção no fluxo salivar ou em sua composição, era permitida a escovação dos dentes antes da coleta. Após o tempo de coleta (3 minutos), todos os tubos contendo saliva dos doadores foram transferidos para um único tubo (estéril) para que fossem homogeneizados e em seguida centrifugados à 4 °C, 10.000 g por 5 minutos (MOURA, 2006). Imediatamente, em fluxo laminar, filtrou-se a saliva centrifugada em sistema filtrante com membrana porosa de 0,22 µm, previamente esterilizado, utilizando bomba à vácuo (PEROS e GIBBONS, 1981). Em seguida, transferiu-se a saliva tratada para recipiente estéril, sendo armazenada a -7°C até o momento do uso. Esta etapa do projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCF-UNESP, com o parecer nº 423.890 em 2013.

#### 4.2.5.5. Avaliação *in vitro* da força bioadesiva

Utilizando o analisador de textura TA- TX Plus (Stable Micro Systems), no modo *Adhesion Test*, foram obtidas, *in vitro*, as forças dispensadas para a remoção dos sistemas avaliados dos blocos de dentes bovinos umedecidos com saliva.

Preparou-se a extremidade livre da sonda cilíndrica (10 mm de diâmetro) com a adesão do bloco de dente bovino, utilizando fita adesiva dupla face acrílica (Adermax®) com fixação extra forte, sendo em seguida o bloco de dente bovino umedecido por 5 segundos. As formulações foram acondicionadas em pequenos recipientes rasos de vidro (5 mL), os quais permitiam que as amostras ficassem expostas possibilitando a entrada da sonda cilíndrica adaptada com o bloco de dente umedecido com saliva. As amostras permaneceram na temperatura de 37 °C antes do início do teste. Programou-se o sistema para que a sonda se movimentasse à velocidade constante de 1 mm/s em direção à amostra. O dente permaneceu em contato íntimo com amostra durante 60 segundos. Após o tempo programado, a sonda era levantada (0,5 mm/s) ocorrendo a determinação do valor resultante da força *versus* tempo necessário para a remoção do bloco de dente da formulação. Este ensaio foi realizado com sete réplicas.

#### 4.2.5.6. Análises reológicas

A fim de realizar a caracterização reológica dos sistemas, foram executadas as análises reológicas contínua e oscilatória, de acordo com as etapas **4.2.5.6.1.** e **4.2.5.6.2.**

##### 4.2.5.6.1. Análise reológica contínua

Foram obtidos reogramas dos sistemas selecionados empregando reômetro AR2000ex (TA Instruments) no modo *fluency (flow)*, e de acordo com a consistência de cada formulação, utilizou-se geometria cone/placa ou placa/placa, às temperaturas de 5, 25 e 37 °C.

Cautelosamente, foi colocada uma pequena amostra do sistema em análise sobre a base inferior do reômetro, aguardando 3 minutos em repouso, para ambientalização da amostra com a temperatura do equipamento, sendo esta a desejável durante a realização do experimento. A taxa de cisalhamento utilizada para a curva ascendente foi de 0 a 100

s<sup>-1</sup> e para a curva descendente, de 100 a 0 s<sup>-1</sup> durante 120 segundos cada. Este teste foi realizado em triplicata.

#### 4.2.5.6.2. Análise reológica oscilatória

Foi realizada a análise oscilatória empregando reômetro AR2000ex (TA Instruments) utilizando geometria cone/placa ou placa/placa, conforme a consistência de cada formulação, sendo realizadas em temperaturas de 5, 25 e 37 °C, todas em triplicata. Para a realização do teste de varredura de tensão, colocou-se o reômetro no modo *amplitude sweep*, podendo assim determinar a região viscoelástica. Foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 rad/s.

Posteriormente, com a determinação da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, colocou-se o reômetro no modo *frequency sweep* para a realização do teste de varredura de frequência, para a determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 10 Hz, à tensão de 1 Pa.

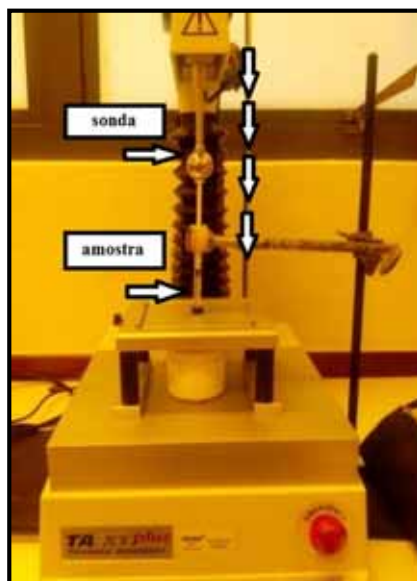
#### 4.2.5.7. Determinação da Seringabilidade

Cada formulação selecionada foi avaliada quanto ao trabalho necessário para a amostra sair de dentro da seringa, possibilitando a observação da fluxibilidade das amostras avaliadas. Para este teste, utilizou-se um analisador de Textura TA- XT Plus – Stable Micro Systems, no modo de compressão (JONES *et al.*, 2000, BRUSCHI, 2006).

Adicionaram-se as formulações a serem analisadas cautelosamente em seringas plásticas de 1,0 mL, de modo a evitar a formação de bolhas durante o processo de transferência da amostra para seu interior. A seringa foi preenchida de maneira que esta atingisse a altura de 30 mm. Adaptou-se a seringa de modo que, presa por garra, permanecesse na posição vertical, assim como mostra a Figura 4, encaixada em suporte metálico e com a prova encostada com o êmbolo. Com uma velocidade constante de 2,0 mm/s e ao longo de uma distância de 30 mm, a prova foi movimentada para baixo.

Durante a compressão do êmbolo (forçando a saída da amostra), foi determinada a resistência por meio do cálculo da área sob a curva força *versus* distância. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C e em triplicata.

**Figura 4** - Fotografia do dispositivo adaptado na utilização da determinação do trabalho de seringabilidade.



#### 4.2.5.8. *Análise microcalorimétrica das dispersões de poloxamer*

As medidas microcalorimétricas foram conduzidas em equipamento Nano-DSC TA Instruments em taxa de aquecimento igual a 1°C/min na faixa de varredura de 0-60°C. As curvas representaram o perfil térmico da dispersão de poloxamer. As concentrações das dispersões de poloxamer testadas foram de 0,50%, 0,75%, 1%, 10% e 15%. A correção da linha base foi feita subtraindo-se um termograma contendo apenas água, obtido sob condições idênticas. Os termogramas foram então tratados utilizando-se software NanoAnalyze para obtenção dos parâmetros termodinâmicos relacionados à transição da dispersão de polímero.

### **4.3. Análise estatística**

Os dados obtidos nos experimentos foram analisados estatisticamente pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey, sendo este com nível de significância de 0,01%. O software utilizado para processar os dados foi o Graph Pad Prisma<sup>®</sup>, versão 5.01, 2007.

### **4.4. Ensaio Microbiológicos**

Iniciaram-se os ensaios microbiológicos com o preparo do biofilme oral *in vitro* para posterior observação da ação do peptídeo KSL-W em solução e também incorporado na formulação.

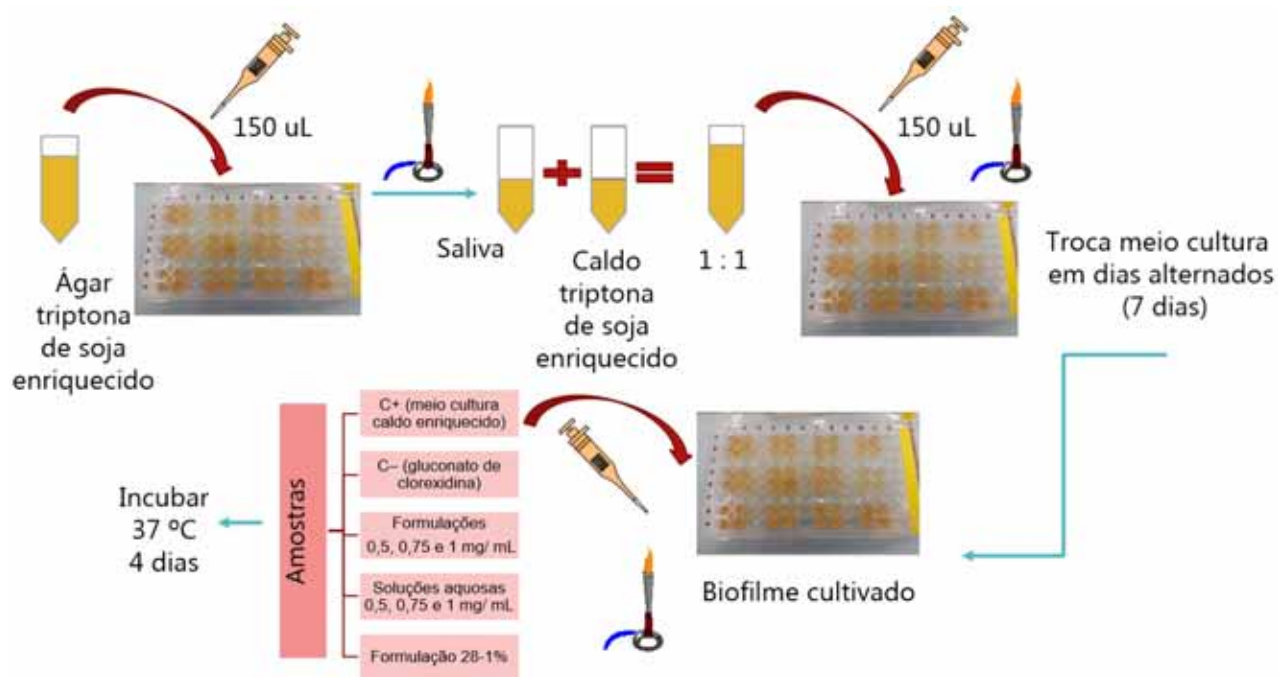
#### ***4.4.1. Preparo do biofilme salivar multiespécie***

Para a formação do biofilme multiespécie salivar foi preparado o meio de cultura ágar triptona de soja enriquecido com menadiona e hemina (ambas à 0,0005%); em seguida, foi transferido assepticamente 150 µL em cada poço da placa estéril de 96 poços, todos devidamente estéreis. Em seguida, adicionaram-se 150 µL de uma mistura de saliva com meio de cultura caldo enriquecido (1:1). A saliva foi coletada no período da manhã, de voluntários doadores os quais foram orientados a não realizarem a escovação dos dentes antecedente a coleta e que mantivessem o jejum matinal, conforme CEP com número de parecer aprovado nº 423.890. Após o preparo a placa de 96 poços foi mantida em ambiente microaerófilo, na temperatura de 37°C por 7 dias, sendo realizada a substituição do sobrenadante em dias alternados, com 100 µL de caldo triptona de soja enriquecido com menadiona e hemina, ambas à 0,0005% (FONTANA *et al.*, 2009) de maneira cuidadosa, de modo que não ocasionasse o descolamento do biofilme em cultivo do ágar.

#### 4.4.2. Execução da análise microbiológica do peptídeo KSL-W frente ao biofilme multiespécie salivar

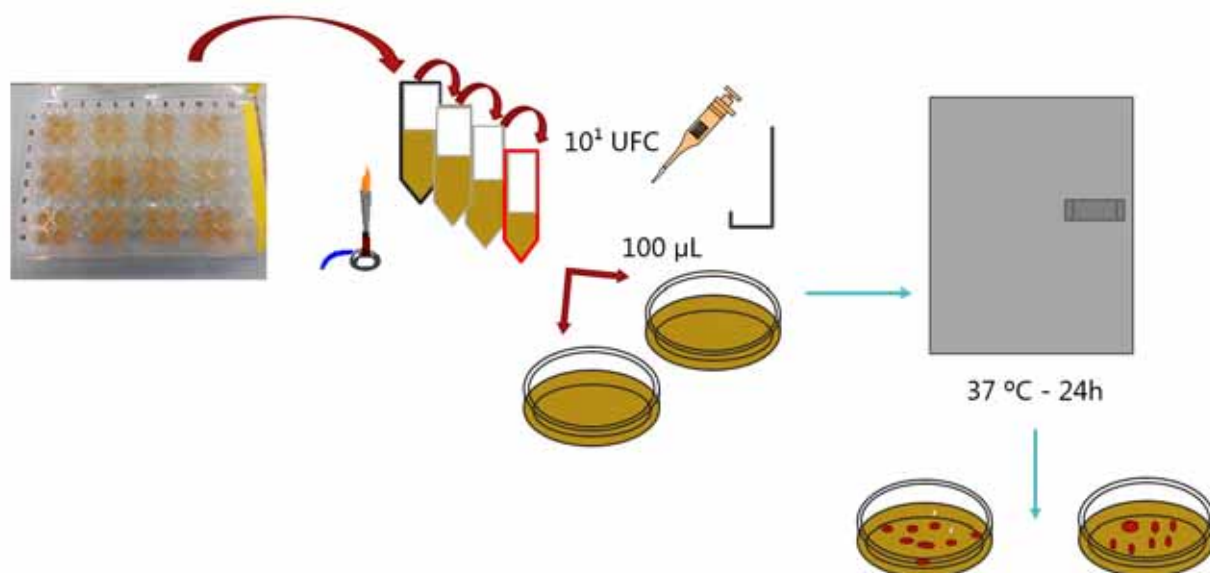
Após os 7 dias do preparo do biofilme, retiraram-se 150  $\mu$ L de sobrenadante e adicionaram-se 150  $\mu$ L das amostras a serem testadas formulações 28-1% com o peptídeo, nas concentrações 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL e 1 mg/mL. Testou-se nas mesmas concentrações, o peptídeo em solução aquosa (0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL e 1 mg/mL), também apenas a formulação 28-1% sem peptídeo, o controle positivo (sendo apenas a mistura da saliva com o meio de cultura caldo enriquecido) e o controle negativo (gluconato de clorexidina 1,2 mg/mL), sendo representado pela Figura 5.

**Figura 5-** Esquema do preparo do biofilme e execução da análise microbiológica.



Depois de 4 dias, aspirou-se o sobrenadante e fez-se diluições seriadas com o próprio meio de cultura em caldo, até atingir a concentração de  $10^1$  UFC/mL, que foi então plaqueado 150  $\mu$ L em placa de Petri contendo ágar triptona de soja enriquecido com menadiona e hemina (ambas à 0,0005%), com o auxílio de alça de Drigaslki. As placas foram preparadas em duplicatas e permaneceram durante 24 horas em temperatura de  $37^\circ$ , como demonstrado na Figura 6. Após, fez-se a contagem das colônias crescidas em cada placa, a qual foi feito a média das duplicatas e calculou-se a porcentagem os valores, considerando como 100% o valor obtido do controle positivo.

**Figura 6** - Esquema da continuação da execução da análise microbiológica.

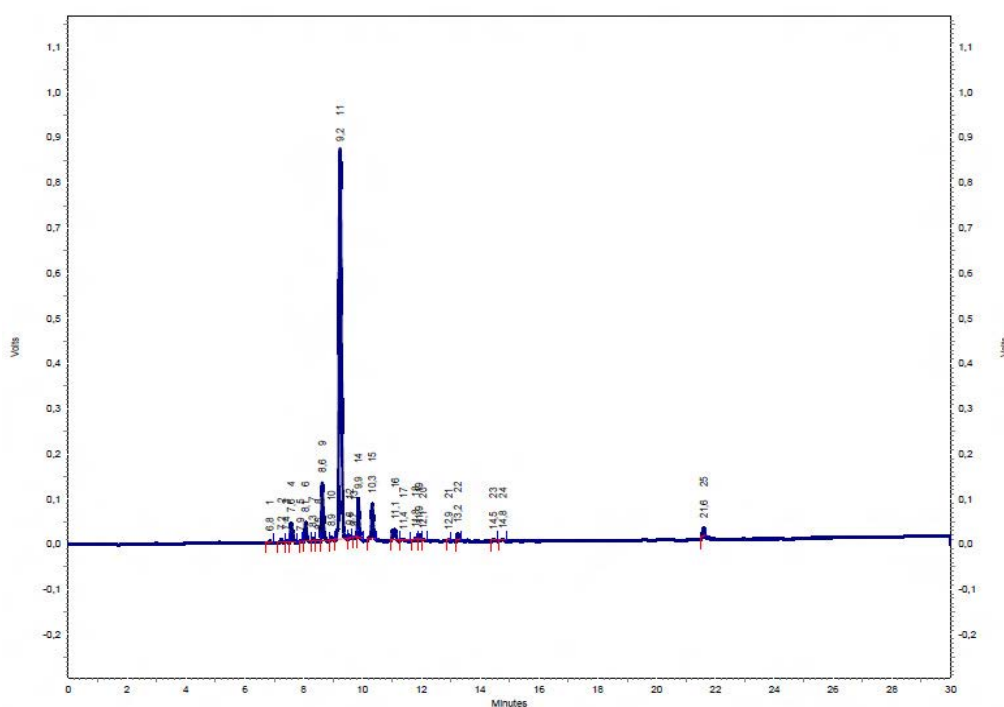


## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Síntese do peptídeo KSL-W

Após o processo de síntese, foi obtido o peptídeo na forma bruta, o qual apresentou o perfil cromatográfico ilustrado na Figura 7.

**Figura 7** - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto obtido no tempo 0-30 minutos.



Na Figura 7, pode-se observar um pico intenso referente ao material de interesse, que necessita ser purificado para eliminação dos picos menores que são interferentes indesejáveis.

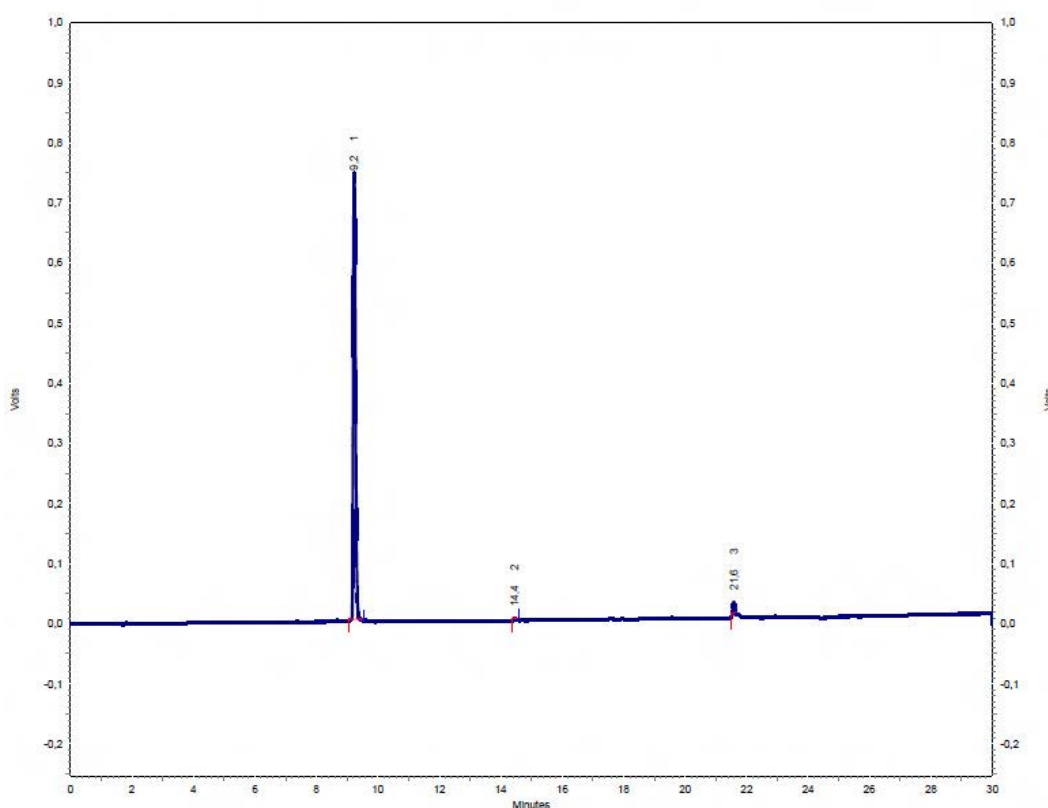
### 5.2. Purificação do peptídeo KSL-W bruto

Depois que o peptídeo bruto foi purificado utilizando cromatógrafo analítico, sendo fracionadas as porções de interesse e coletadas em tubos de ensaio, utilizando o método de gradiente de acetonitrila de 20 a 50% (sistema contendo TFA). Os tubos com as porções que continham o material puro foram agrupados (processo de corte) e

lioofilizados, obtendo-se o peptídeo com grau de pureza de 96%, com o rendimento de 13 mg. A Figura 8 apresenta o perfil cromatográfico do peptídeo purificado.

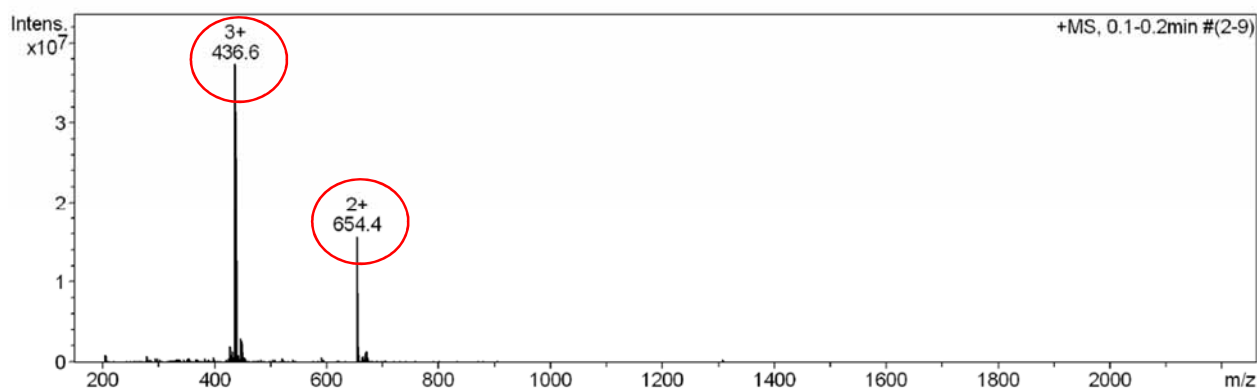
São necessários que peptídeos com intenções de uso clínico ou uso em produtos de consumo alimentar apresentem purezas iguais ou superiores a 95% (MACHADO *et al.*, 2004).

**Figura 8** - Perfil cromatográfico do peptídeo KSL-W puro.



### 5.3. Determinação da relação massa/carga ( $m/z$ )

Após a purificação, fez-se a caracterização do KSL-W puro, que apresenta a sequência  $\text{NH}_3^+$ -Lys- Lys- Val- Val- Phe- Trp- Val- Lys- Phe- Lys - $\text{COO}^-$  e massa molecular teórica de 1308,7 g/Mol. A caracterização foi realizada por espectrometria de massas. Obtiveram-se as seguintes relações de massa/carga ( $m/z$ ) as quais estão expressas no espectro da Figura 9.

**Figura 9** - Espectro de massas do peptídeo KSL-W puro.

Os valores de relação  $m/z$  obtidos comprovaram que o produto obtido é o peptídeo em questão.

#### 5.4. Desenvolvimento das formulações

##### 5.4.1. Construção dos diagramas de fases ternários

A partir da combinação de diferentes componentes, pode-se obter a formação de diferentes tipos de agregados. O diagrama ternário é uma ferramenta aplicada para avaliação do comportamento da mistura à união e formação de sistemas. Ele tem a forma de triângulos equiláteros, demarcando eixos que fixam valores correspondentes aos componentes a serem utilizados na formação de um determinado sistema. Usualmente este valor é representado como porcentagem de peso total da formulação; desta maneira, completa-se em cada vértice 100% do componente em uso.

Elaboraram-se três diagramas de fases ternários, sendo diferenciados apenas na fase aquosa, utilizando diferentes concentrações de dispersão de poloxamer 407 (0,50%, 0,75% e 1%), objetivando a observação de possíveis alterações nos sistemas. Como fase oleosa e tensoativo, utilizou-se ácido oleico e Procetyl<sup>®</sup> AWS (álcool cetílico etoxilado e propoxilado), respectivamente. Os diagramas obtidos foram comparados com diagrama empregando água como fase oleosa, Figura 10(a), o qual foi obtido por Calixto (2013).

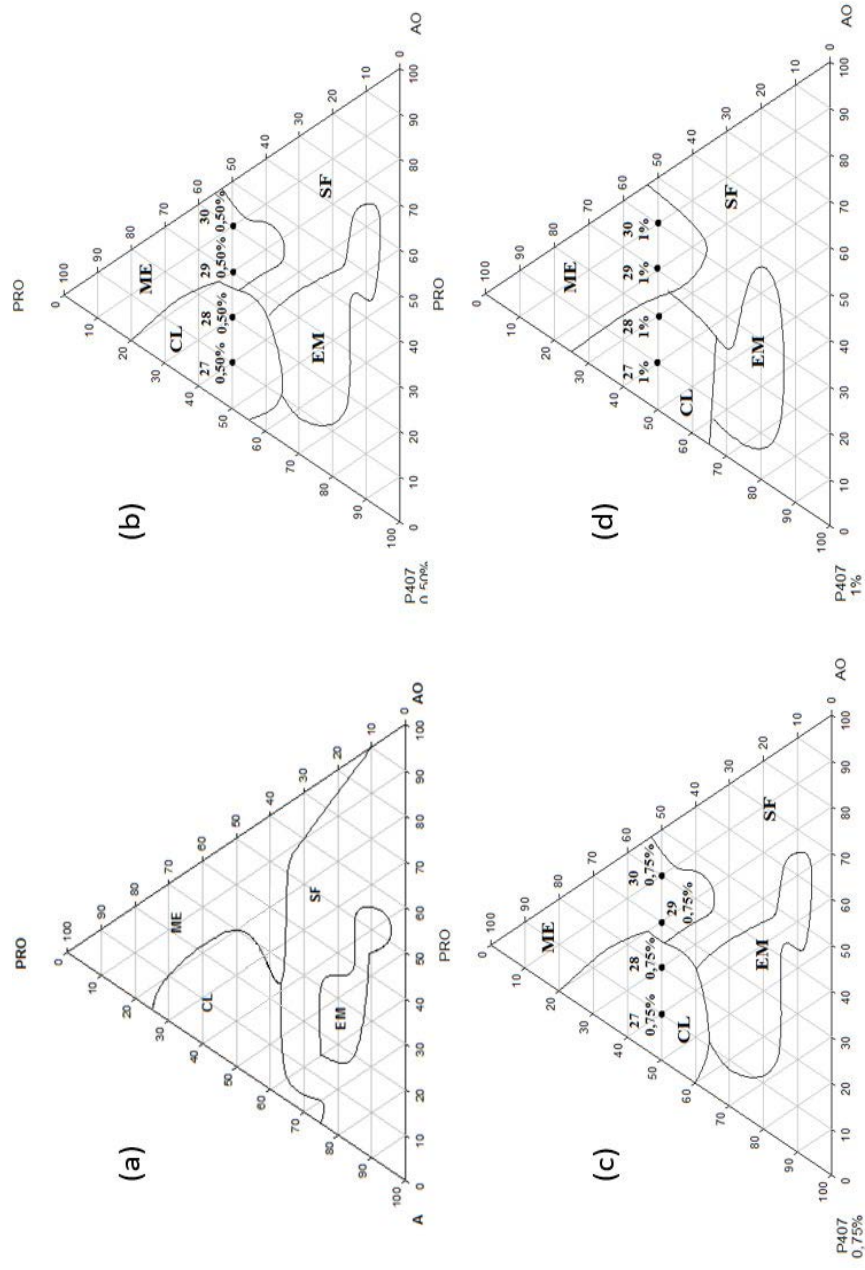
Os sistemas foram avaliados e caracterizados macroscopicamente, facilitando a determinação dos pontos de maior interesse. Visualmente foram classificados como: cristais líquidos (CL) - formulações viscosas e transparentes; microemulsões (ME) -

formulações fluidas e transparentes; emulsões (EM) - formulações com coloração branca independente da fluidez; separação de fases (SF) – formulações que apresentaram qualquer tipo de alteração quanto à homogeneidade.

Pode-se observar na Figura 10 o segundo diagrama (b) construído com ácido oleico, Procetyl® AWS e dispersão de poloxamer 407 a 0,5%. Nele nota-se que em concentrações abaixo de 50% de tensoativo houveram muitas formulações que separaram de fase. No mesmo diagrama observou-se a formação de emulsões na faixa entre 5–35% de tensoativo e de 10 a 60% de fase oleosa. Constatou-se também uma considerável região de microemulsão a partir de 35% de tensoativo, com valores abaixo de 20% de dispersão de poloxamer (0,50%) e com fase oleosa abaixo de 50%.

Já nas concentrações de 40-80% de tensoativo, 20-55% de dispersão de polímero e abaixo de 30% de fase oleosa obteve-se região de cristais líquidos. Logo, observou-se que para concentrações acima de 35% de tensoativo, maiores proporções de fase aquosa e menores proporções de fase oleosa, as regiões alteraram de microemulsão para sistema líquido-cristalino.

**Figura 10** - Diagramas de fases ternários. AO (ácido oleico) - fase oleosa; PRO (Procetyl<sup>®</sup> AWS) – tensoativo; A (água) ou P407 (Dispersão de poloxamer 407) - fase aquosa; CL (cristal líquido); ME (microemulsão); EM (emulsão); SF (separação de fases). Em que, as fases aquosas são: (a) água; (b) 0,50% de Dispersão de poloxamer 407; (c) 0,75% de Dispersão de poloxamer 407 e (d) 1% de Dispersão de poloxamer 407.



No terceiro diagrama (c), formado com proporções de ácido oleico, Procetyl e dispersão de poloxamer 407 à 0,75%, constatou-se o mesmo perfil que o segundo apresentado na Figura 10 (b), ou seja, o aumento na concentração de polímero disperso na fase aquosa (de 0,50% para 0,75%) não ocasionou alterações nas regiões obtidas de cristais líquidos, microemulsões, emulsões e separações de fases.

Já no diagrama com 1% de dispersão de poloxamer na fase aquosa apresentado na Figura 10 (d), observou-se algumas sutis alterações comparado aos diagramas anteriores, como a diminuição da região de sistemas emulsionados para separação de fases na concentração de 45-65% de fase oleosa. Houve também um leve aumento na obtenção de CL ao aumentar a concentração de fase aquosa (de 55% para 65%). Neste diagrama, observam-se regiões similares às obtidas para os diagramas (b) e (c), como já relatado por Carvalho (2009), que pioneiramente construiu diagrama com ácido oleico (fase oleosa), Procetyl<sup>®</sup> AWS (tensoativo) e água (fase aquosa), observado que a formação de microemulsões se deu com concentrações abaixo de 45% de água, juntamente com quase todo o eixo do tensoativo e do óleo.

Pode-se observar então que a substituição da água por dispersões de poloxamer 407 como fase aquosa causou mudanças no perfil de obtenção dos sistemas, o que pode ser claramente visto nos diagramas apresentados nas Figuras 10 (b), (c) e (d), nos quais observou-se a formação de sistemas microemulsionados com concentrações de fase aquosa abaixo de 20%, tensoativo acima de 35% e fase oleosa abaixo de 45%. Já sem a adição de poloxamer 407 na fase aquosa, Calixto (2013) constatou sistemas microemulsionados nas regiões de 0-40% de fase aquosa, 0-90% de fase oleosa e acima de 10% de tensoativo. Domínios de cristais líquidos foram observados nas regiões com fase aquosa entre 25-75%, tensoativo também entre 25-75% e fase oleosa abaixo de 0-30%. Observando esses dados, podemos detectar a alteração causada pelo poloxamer 407, o qual foi responsável pela diminuição dos domínios de sistemas microemulsionados quando comparados ao sistema com apenas água na fase aquosa. Essa diminuição da região microemulsionada passou a pertencer a regiões de sistemas líquido-cristalinos, talvez pelo motivo do poloxamer 407 apresentar propriedade de tensoativo, organizando-se em predomínio de regiões mais estruturadas.

## 5.5. Caracterização físico-química

### 5.5.1. *Microscopia de luz polarizada*

Nesta técnica utiliza-se o microscópio de luz polarizada, o qual é equipado com dois filtros de polarização, um condensador que permite que todo o feixe de luz propagado se conduza a uma só direção e um analisador, que reconhece a propagação ficando próximo à ocular (CARVALHO, 2009).

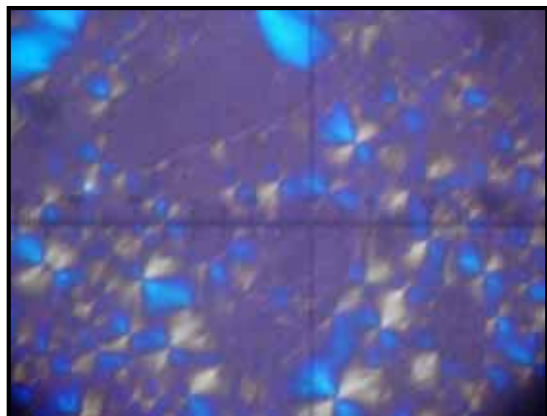
Quando são analisadas amostras birrefringentes, este microscópio fornece informações quanto à sua estruturação. Portanto, se esta for capaz de alterar o plano de luz polarizada, ela é caracterizada como anisotrópica; caso isso não aconteça, a amostra é considerada isotrópica, ou seja, ela não ocasiona a alteração do plano de luz polarizada.

As estruturas observadas quando se tem campo anisotrópico, como estrias e cruzeiros de malta, são denominadas como hexagonais e lamelares, respectivamente, enquanto que as mesofases cúbicas e microemulsões são isotrópicas, visualizadas como campo escuro (CALIXTO, 2013).

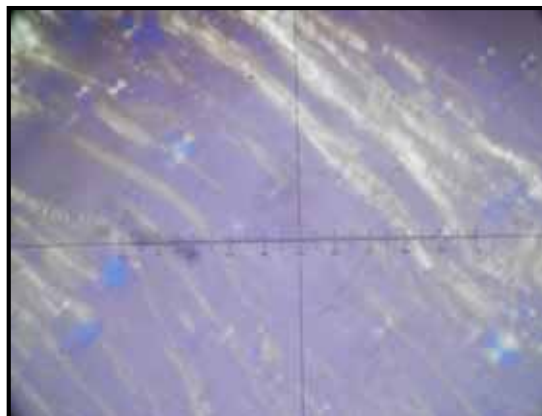
Esta técnica tem sido cada vez mais usada, pela facilidade e rapidez na obtenção de resultados, na caracterização de unidades como lamelas, estrias (indicativo de sistemas líquido-cristalinos) e também sistemas como agregados de micelas e microemulsões (CHORILLI, 2007).

Estão representadas nas Figuras 11 a 22 as fotomicrografias das formulações selecionadas, capturadas em lente com aumento 20 vezes.

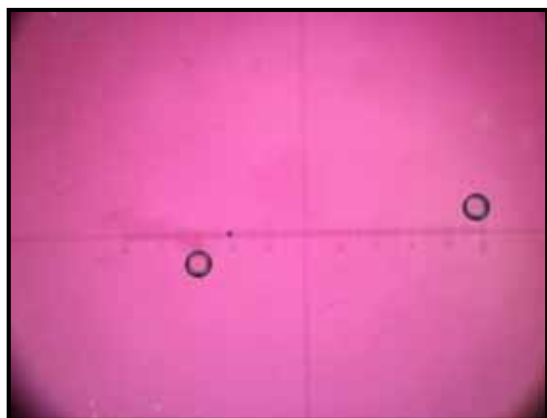
**Figura 11** - Fotomicrografia da formulação 27-0,50%.



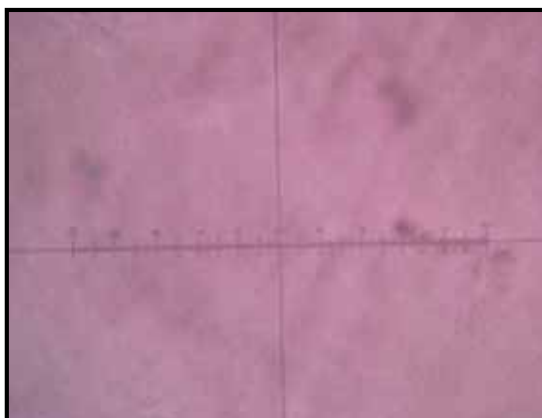
**Figura 12** - Fotomicrografia da formulação 28-0,50%.



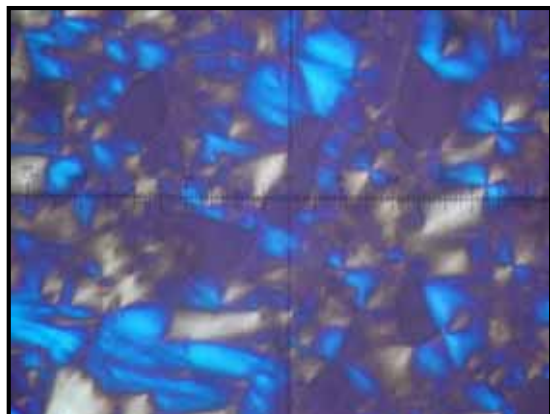
**Figura 13** - Fotomicrografia da formulação 29-0,50%.



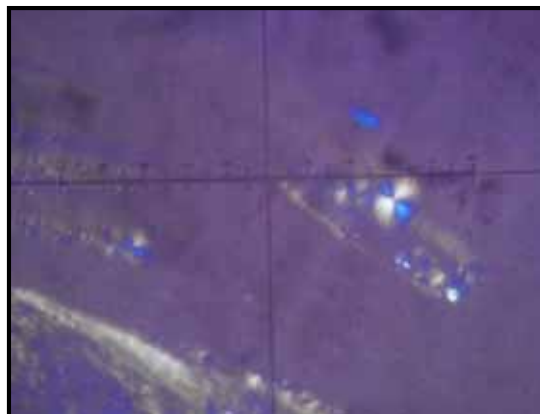
**Figura 14** - Fotomicrografia da formulação 30-0,50%.



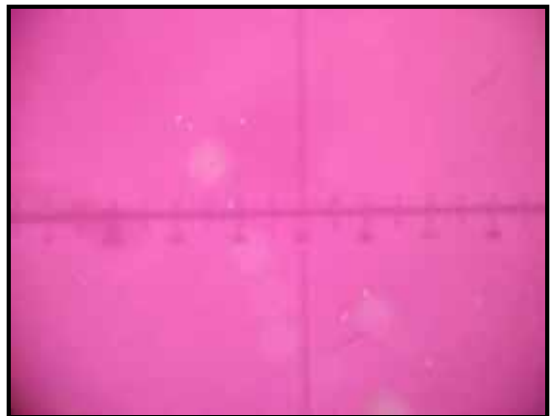
**Figura 15** - Fotomicrografia da formulação 27-0,75%.



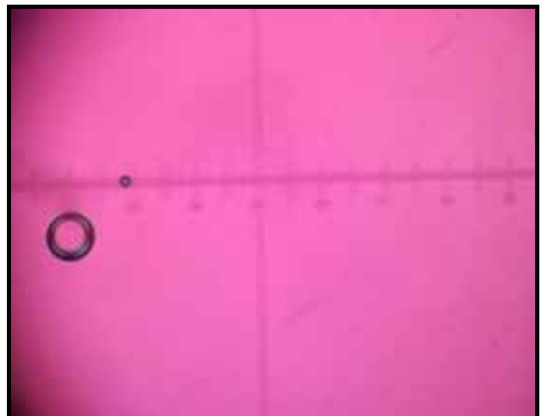
**Figura 16** - Fotomicrografia da formulação 28-0,75%.



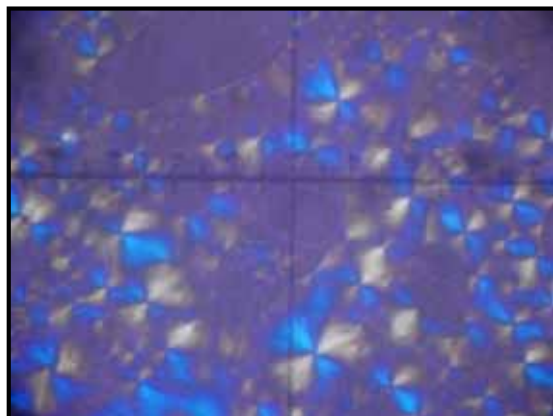
**Figura 17** - Fotomicrografia da formulação 29-0,75%.



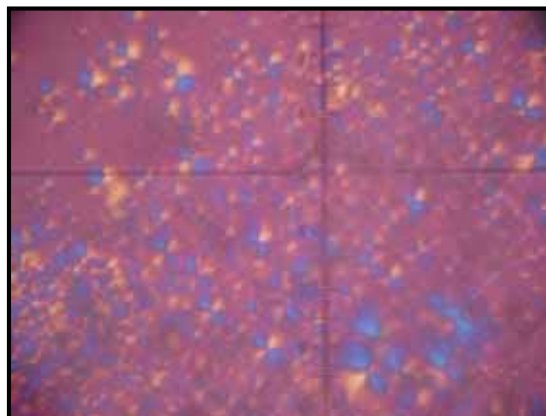
**Figura 18** - Fotomicrografia da formulação 30-0,75%.



**Figura 19** - Fotomicrografia da formulação 27-1%.



**Figura 20** - Fotomicrografia da formulação 28-1%.



**Figura 21** - Fotomicrografia da formulação 29-1%.



**Figura 22** - Fotomicrografia da formulação 30-1%.



Classificaram-se sistemas que apresentaram estruturas em forma de cruces de malta, como os das Figuras 11, 12, 15, 16, 19 e 20, correspondentes às formulações 27-0,50%, 28- 0,50%, 27- 0,75%, 28- 0,75%, 27- 1% e 28- 1%, respectivamente, como mesofases líquido-cristalinas lamelares.

Já as Figuras 13, 14, 17, 18, 21 e 22 que apresentam fotomicrografias relacionadas às formulações 29- 0,50%, 30- 0,50%, 29- 0,75%, 30- 0,75%, 29- 1% e 30- 1% revelaram que sob o plano de luz polarizada estas formulações não desviaram a luz, ou seja, são isotrópicas, sugerindo a formação de microemulsões, uma vez que visualmente apresentaram-se não tão viscosas.

Observa-se que ao se adicionar maiores concentrações de fase aquosa nas amostras que se apresentavam como isotrópicas, as formulações passaram por uma estruturação mais organizada, apresentando-se como sistemas com mesofases líquido-cristalinos.

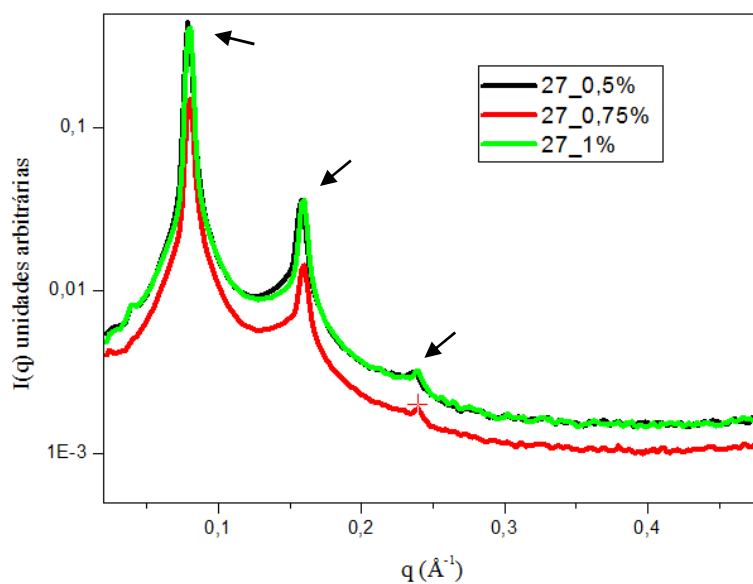
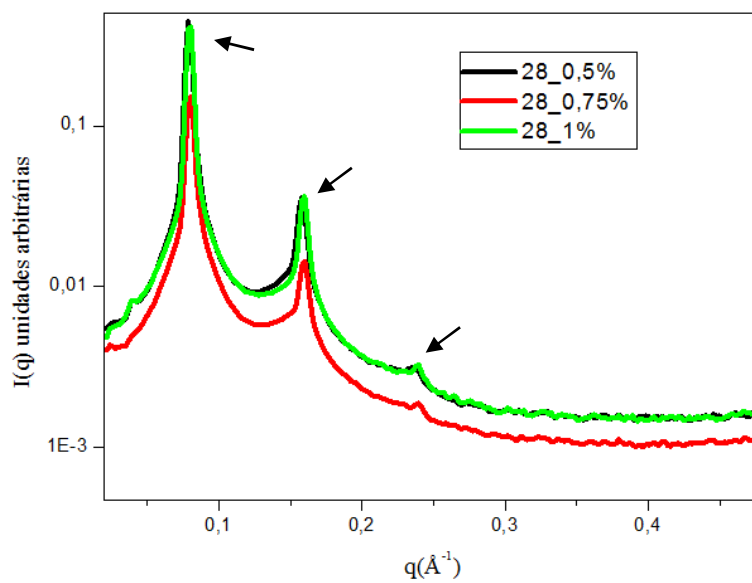
### 5.5.2. Espalhamento de raio X a baixo ângulo (SAXS)

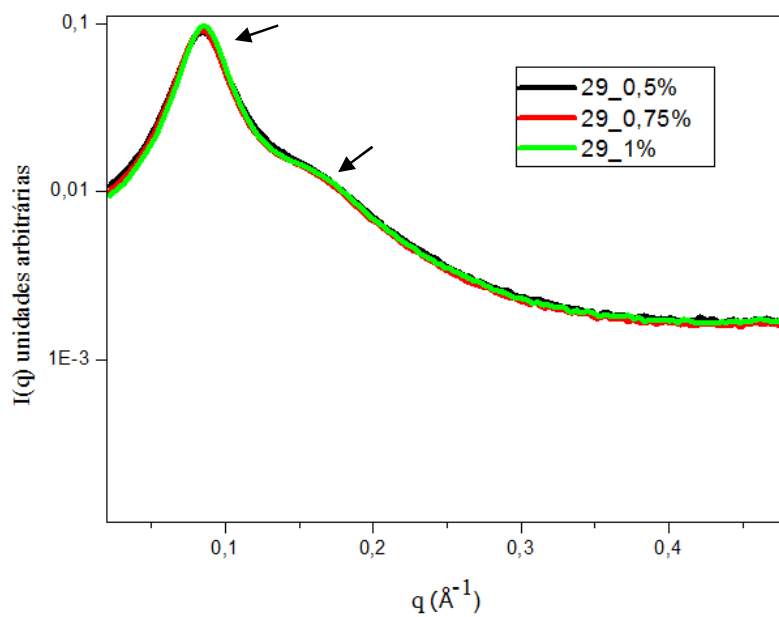
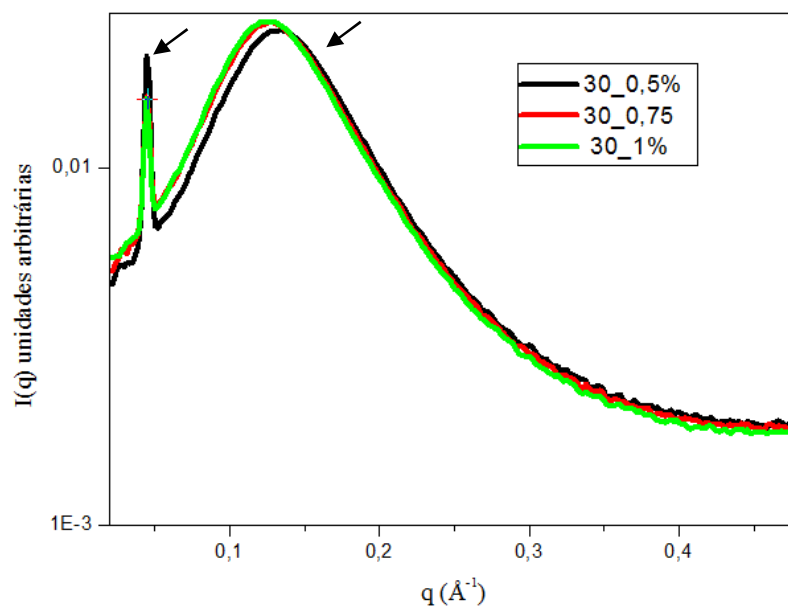
Apesar da técnica de microscopia de luz polarizada apresentar algumas facilidades como rapidez na obtenção de resultados e maior acessibilidade, a técnica mais apropriada para a identificação de cristais líquidos é o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (termo em inglês *Small-Angle X-Ray Scattering* - SAXS) (MANAIA, 2012).

A técnica revela o espalhamento dos raios-X em ângulos de  $\theta$  menor  $10^\circ$ , os quais equivalem a distâncias interplanares com dimensões nanométricas, possibilitando a caracterização dos sistemas pela definição de tamanho médio e distância entre os objetos espalhadores. Sendo assim, esta técnica é utilizada para detectar estruturas cristalinas, gotículas, micelas ou mesmo avaliar a estrutura de objetos espalhadores desordenados (CARVALHO, 2009; CALIXTO, 2013).

Para estruturas hexagonais e lamelares, as posições relativas dos picos de difração são semelhantes, diferenciando-se apenas pela presença de um pico entre o primeiro e o segundo da fase lamelar para a estrutura hexagonal. A relação destes picos respeita a equação  $q = n \cdot 2\pi/d$ , em que para a fase lamelar o  $n = 1, 2, 3...$  e para a fase hexagonal o  $n = 1, 3, 4, 7, 9, 12$  (FERREIRA, 2011). Sistemas isotrópicos (cristais líquidos de fase cúbica), por sua vez, obedecem a relação  $\sqrt{2}:\sqrt{3}:\sqrt{8}:\sqrt{9}$  (YARIV *et al.*, 2010). Para sistemas micelares e microemulsões, é possível observar um amplo pico devido à baixa correlação espacial 3 D (FORMARIZ *et al.*, 2007).

As Figuras 23 a 26 mostram as curvas das intensidades de espalhamento em função do vetor de espalhamento  $q$ . Na Tabela 2, estão expostos os valores de espalhamento  $q_{\max}$ , periodicidade lamelar das formulações líquido-cristalinas.

**Figura 23** - Avaliação estrutural das amostras 27\_0,5%, 27\_0,75% e 27\_1% por SAXS.**Figura 24** - Avaliação estrutural das amostras 28\_0,5%, 28\_0,75% e 28\_1% por SAXS.

**Figura 25** - Avaliação estrutural das amostras 29\_0,5%, 29\_0,75% e 29\_1% por SAXS.**Figura 26** - Avaliação estrutural das amostras 30\_0,5%, 30\_0,75% e 30\_1% por SAXS.

**Tabela 2** - Valores de  $q_{\max}$  (Å) e razão entre as distâncias interplanares das formulações selecionadas.

Formulação	$q_{\max 1}$	$q_{\max 2}$	$q_{\max 3}$	$d_2/d_1$	$d_3/d_1$	Estrutura
27_0,5%	0,07	0,15	0,24	2	3	Lamelar
27_0,75%	0,07	0,15	0,24	2	3	Lamelar
27_1%	0,08	0,16	0,24	2	3	Lamelar
28_0,5%	0,07	0,15	0,24	2	3	Lamelar
28_0,75%	0,07	0,15	0,24	2	3	Lamelar
28_1%	0,08	0,16	0,24	2	3	Lamelar
29_0,5%	0,08	-	-	-	-	-
29_0,75%	0,08	-	-	-	-	-
29_1%	0,08	-	-	-	-	-
30_0,5%	0,04	0,12	-	3	-	-
30_0,75%	0,04	0,12	-	3	-	-
30_1%	0,04	0,12	-	3	-	-

De acordo com as curvas representadas pelas Figuras 23 e 24, e também pelos valores expostos na Tabela 2, mesofases das estruturas líquido-cristalinas do tipo lamelar foram observadas.

Na Figura 25, observa-se para a formulação 29 (0,50%, 0,75% e 1%) e também na Figura 26 para a formulação 30 (0,50%, 0,75% e 1%), a presença de um ombro após o pico largo e pouco intenso, apresentando assim um perfil de transição, evoluindo para sistemas mais estruturados. Dessa forma, embora os resultados de MLP sugiram que as formulações F29 e F3, nas três concentrações de dispersões poliméricas de poloxamer como fase aquosa, tratam-se de microemulsões, as medidas de SAXS não permitiram esta conclusão.

Calixto (2013) realizou a análise de SAXS de amostras com a mesma composição, exceto a fase aquosa, a qual utilizou-se apenas água, e observou que ao se adicionar maiores quantidades de fase aquosa os sistemas transitaram de microemulsões para sistemas líquido-cristalinos mesofases hexagonal. O fato de ter adicionado o poloxamer 407 na fase aquosa, pode sugerir uma modificação na estruturação nos sistemas deste trabalho, uma vez que apresenta funções como a de co-tensioativo, podendo assim ter se reorganizado em fases lamelares.

### 5.5.3. *Análises reológicas*

#### 5.5.3.1. *Análise reológica contínua*

A análise reológica contínua permite o estudo do comportamento de fluxo que o material em análise apresenta quando este sofre uma determinada tensão (SAVIC *et al.*, 2011).

O que define o comportamento de fluxo do material estudado é a correlação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, que é representada graficamente em diagramas denominados de curvas de fluxo. Essas curvas são reflexo de duas etapas do estudo, no qual o aumento da taxa de cisalhamento é revelado pela curva ascendente e a diminuição da taxa de cisalhamento é representada pela curva descendente (PESTANA, 2009; SCHRAMM, 2006).

A partir deste experimento, classifica-se pela observação da curva ascendente, o material em análise, como newtoniano ou não newtoniano. Posteriormente, caso seja não newtoniano, o material pode ser classificado ainda como pseudoplástico, plástico ou dilatante. Quanto à curva descendente, os materiais podem ser diferenciados em tixotrópicos ou repéticos (CALIXTO, 2013).

Os materiais não-newtonianos com comportamento plástico apresentam a necessidade de uma força prévia para iniciar o processo de tensão de cedência. Os com comportamento pseudoplástico formam um reograma onde a curva, igualmente como os fluidos newtonianos, tem como origem o zero; entretanto, a relação entre a taxa de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento não são lineares, ou seja, ao se aumentar a velocidade de cisalhamento, diminui-se a viscosidade. Os fluidos não newtonianos com comportamento dilatante é o inverso do pseudoplástico, ou seja, ao se aumentar a velocidade de cisalhamento, observa-se aumento da viscosidade (LAHOUD e CAMPOS, 2010).

Os fluidos classificados como newtonianos exibem a velocidade de cisalhamento diretamente proporcional à tensão de cisalhamento submetida, ou seja, a sua viscosidade apresenta-se constante (LAHOUD e CAMPOS, 2010).

É desejável que as formulações para liberação modificada de fármacos em bolsas periodontais apresentem algumas características peculiares, como fluxo do tipo pseudoplástico e viscosidade que permita a fácil aplicação com o uso de seringas e

supostas agulhas. Deseja-se também que demonstrem um certo grau de tixotropia, de modo que ocorra após aplicação, uma rápida reestruturação (NUNES, 2012; BRUSCHI; FREITAS, 2005).

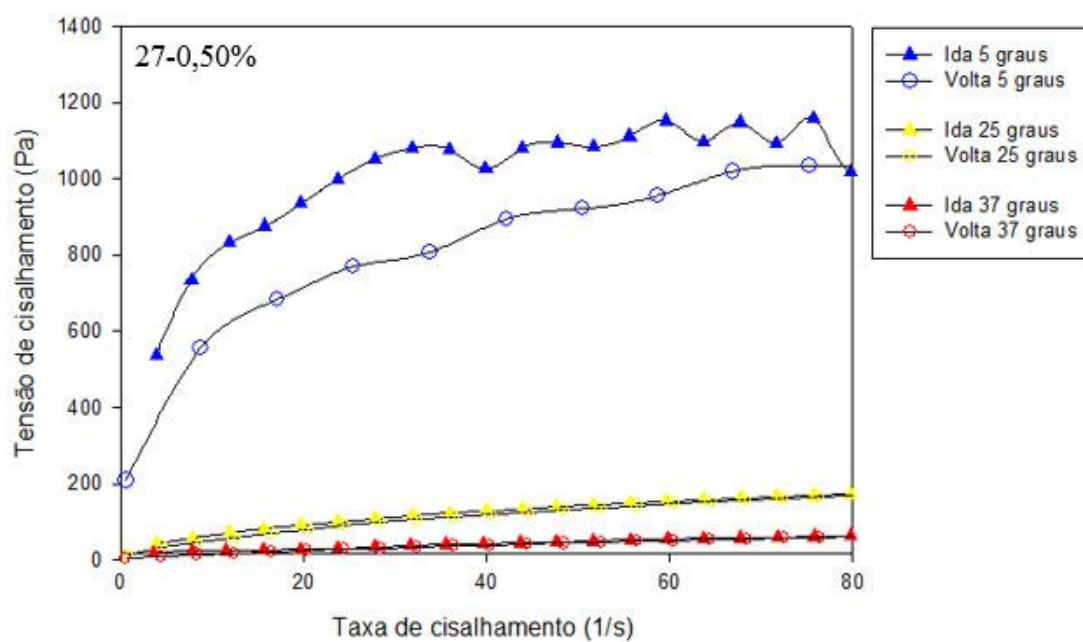
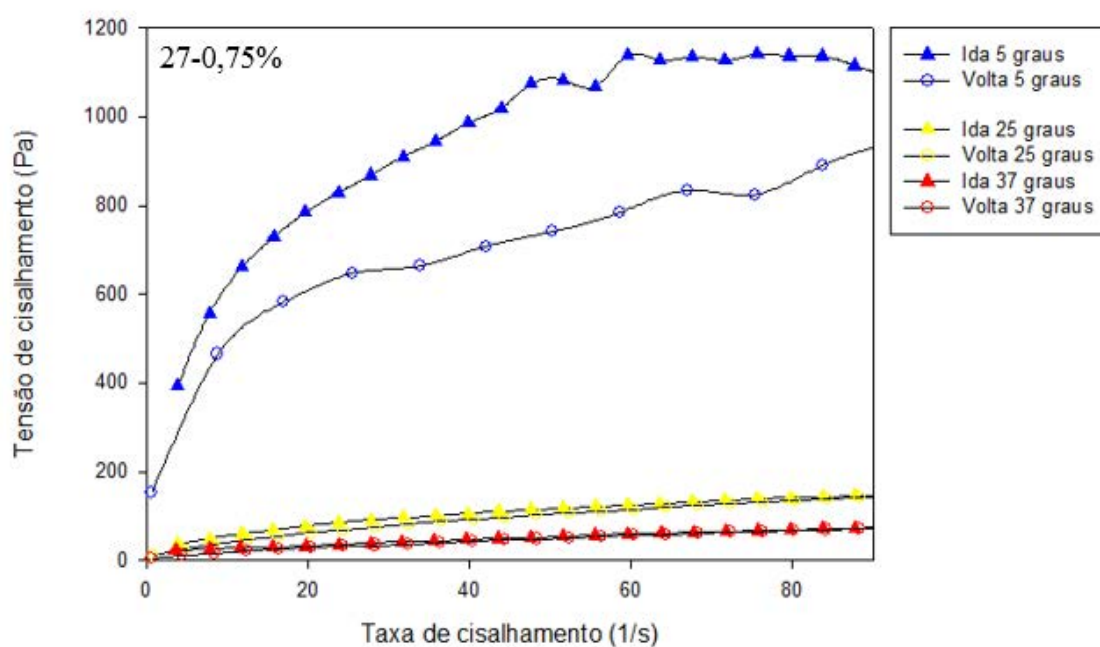
As análises reológicas foram realizadas em três temperaturas, objetivando simular as condições possíveis de armazenamento (5 °C e 25 °C) e de aplicação em bolsa periodontal (37 °C), além de permitirem a observação do comportamentos dos sistemas com as concentrações crescentes de dispersão de poloxamer.

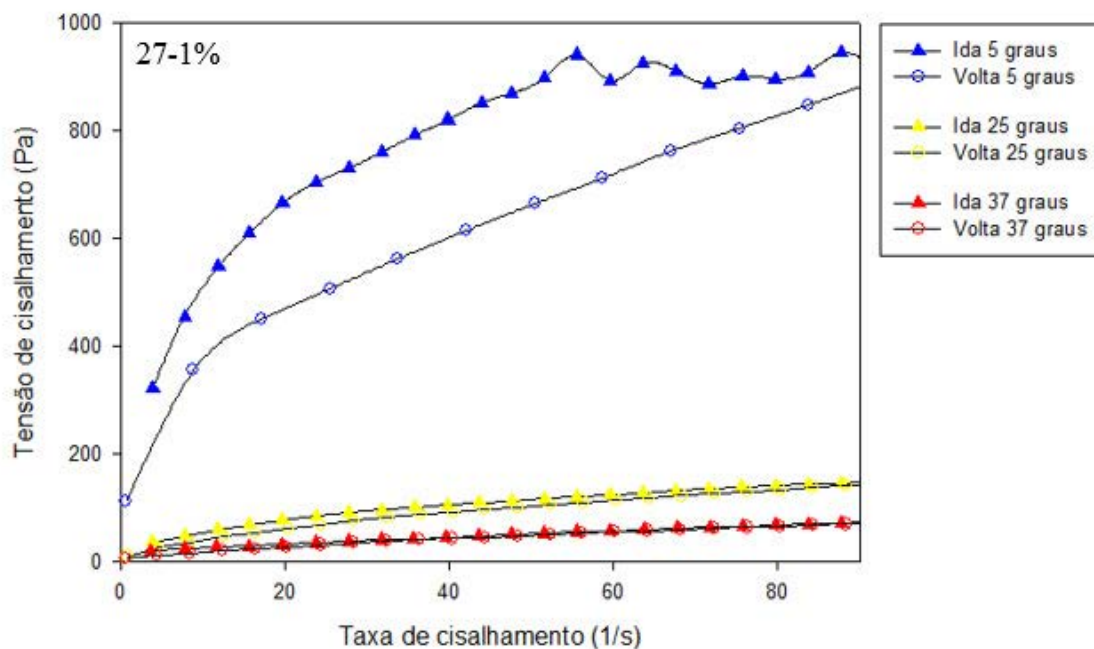
O poloxamer, que é um tensoativo com afinidades hidrofílicas, demonstra também um comportamento gelificante termo dependente reversível, o que pode ser usado como uma oportunidade de aplicação do sistema ainda líquido, podendo obter posterior gelificação *in situ* (DOMINGOS, 2012; ESPOSITO *et al.*, 1996).

Como pode ser observado nas Figuras 27 a 38, as concentrações crescentes de poloxamer utilizadas (0,50%, 0,75% e 1%) não ocasionaram alterações no comportamento reológico, ou seja, não se observou diferenças nos perfis das curvas para as formulações testadas (27, 28, 29 e 30).

Jones e colaboradores (2009) utilizaram concentrações de poloxamer 407 entre 10, 15 e 20% em sistemas monopoliméricos e constataram em análises reológicas de cisalhamento contínuo, utilizando as temperaturas de 5 e 37° C, que o comportamento de fluxo foi dependente tanto da concentração de polímero quanto da temperatura. Com concentrações de 15 e 20% de poloxamer 407 em ambas temperaturas, os autores observaram comportamento pseudoplástico, enquanto que para a dispersão com 10%, observou-se comportamento newtoniano.

Pelas Figuras 27, 28 e 29, relacionadas à amostra 27 nas concentrações de 0,50%, 0,75% e 1% de poloxamer, observou-se que elas apresentaram-se não newtonianas, do tipo pseudoplásticas, com curvas descendentes do tipo tixotrópicas tempo dependentes. Observa-se que em temperatura de 5 °C, houve uma maior área de histerese comparado às demais temperaturas.

**Figura 27** - Reograma da formulação 27- 0,50% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.**Figura 28** - Reograma da formulação 27- 0,75% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.

**Figura 29** - Reograma da formulação 27- 1% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.

Os reogramas relacionados à amostra 28 (com concentrações de 0,50%, 0,75% e 1% de poloxamer), dispostos nas Figuras 30, 31 e 32, demonstraram o mesmo comportamento que o observado para a amostra 27, com concentrações de 0,50%, 0,75% e 1% de poloxamer, ou seja, se comportaram como fluidos não newtonianos, do tipo pseudoplástico, com curvas descendentes do tipo tixotrópica tempo dependente. Porém, observou-se diminuição na área de histerese das formulações, revelando que o retorno à reestruturação acontece de maneira mais rápida, o que é desejado para a aplicação proposta.

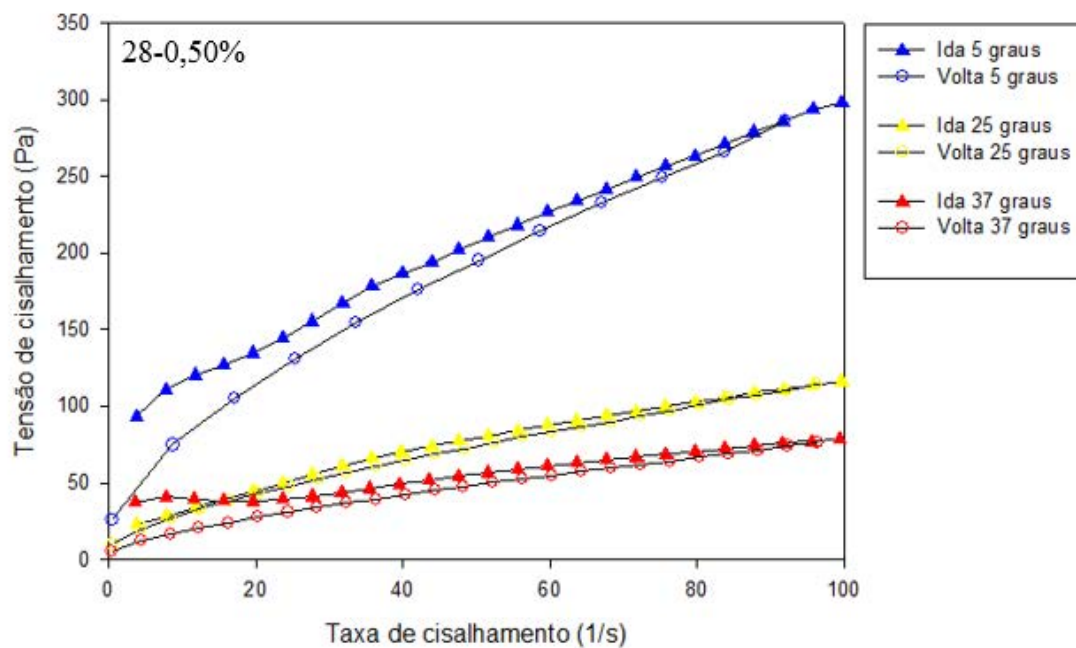
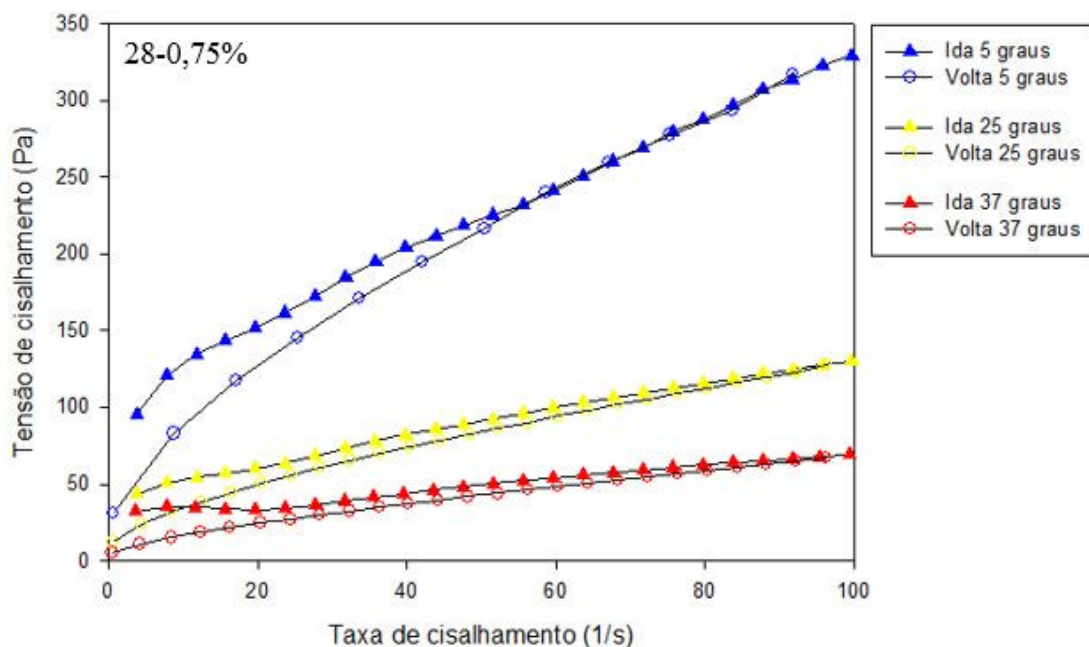
Já os reogramas relacionados à amostra 29 (com concentrações de 0,50%, 0,75% e 1% de poloxamer), conforme mostrado nas Figuras 33, 34 e 35, revelam que as amostras apresentaram o mesmo perfil de comportamento entre si, mostrando que em temperatura de 5 °C em suas curvas ascendentes, foram caracterizadas como newtonianas, ou seja, não apresentaram nenhum tipo de alteração conforme o aumento da taxa de cisalhamento. Ainda na temperatura de 5 °C, nas suas curvas descendentes, após o término da aplicação da taxa de cisalhamento, houve um aumento da viscosidade, evidenciado por seu retorno acima da curva ascendente no sentido anti-horário da curva. Em experimentos realizados por Pestana (2009) em temperatura de 25°C, as microemulsões estudadas com 17% de

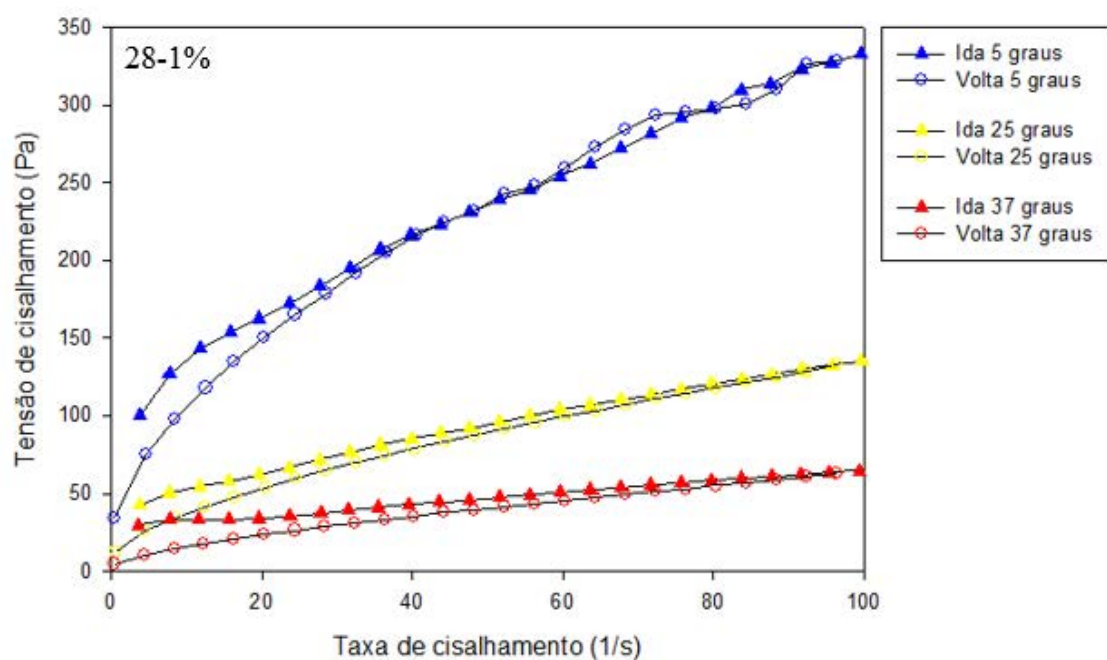
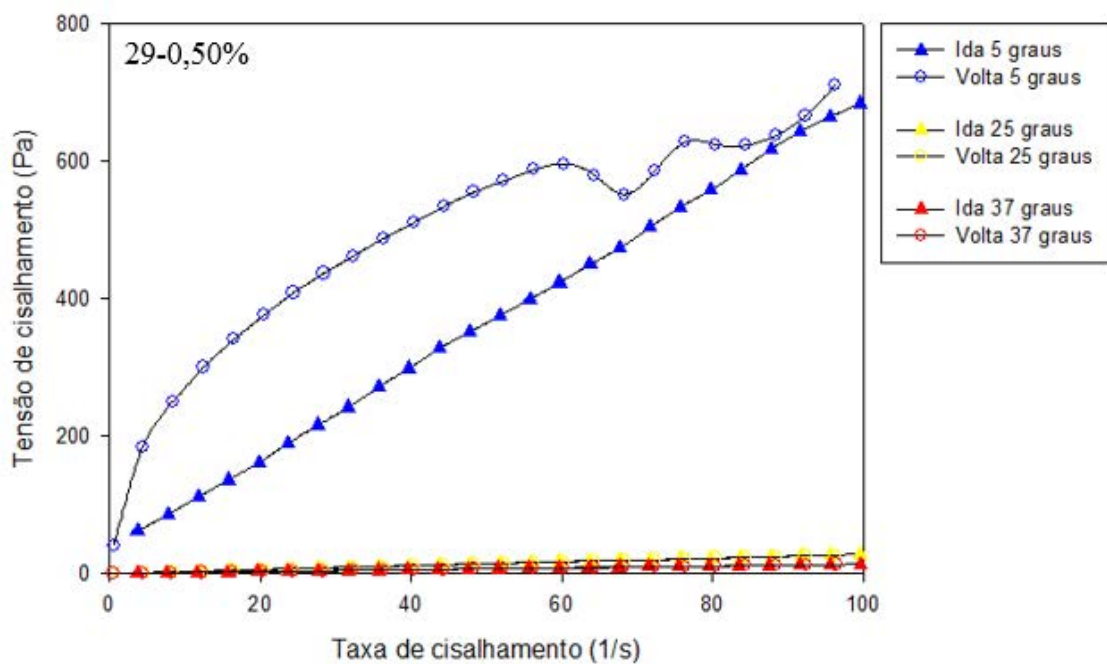
fase oleosa apresentaram o mesmo perfil de comportamento, ou seja, apresentaram-se newtonianas, com curvas descendentes do tipo anti-tixotrópico.

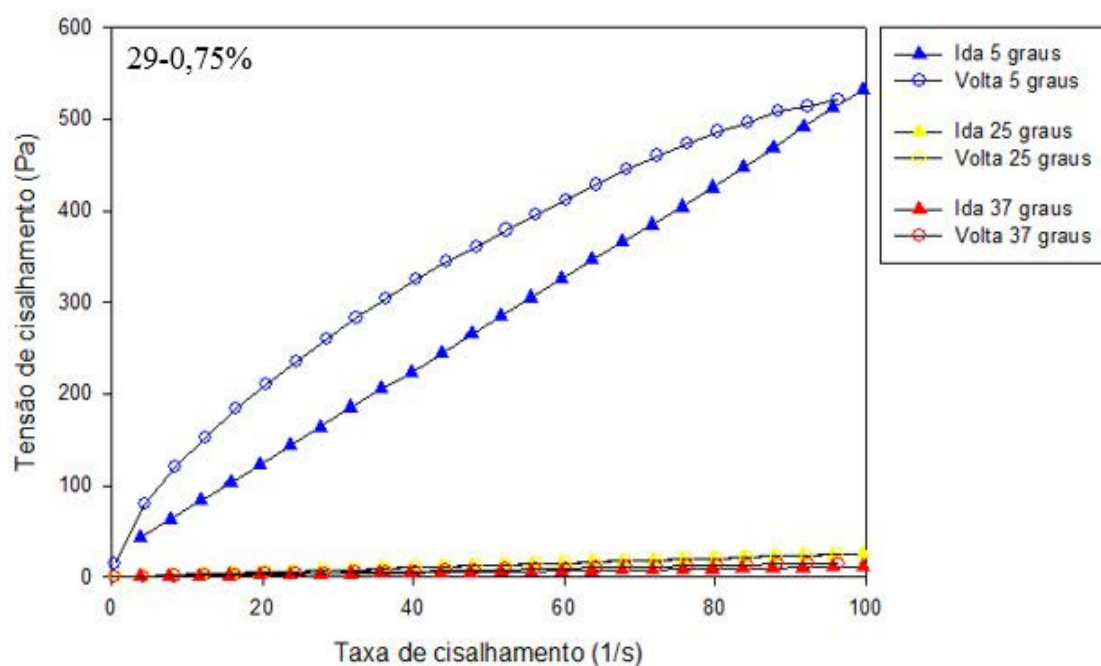
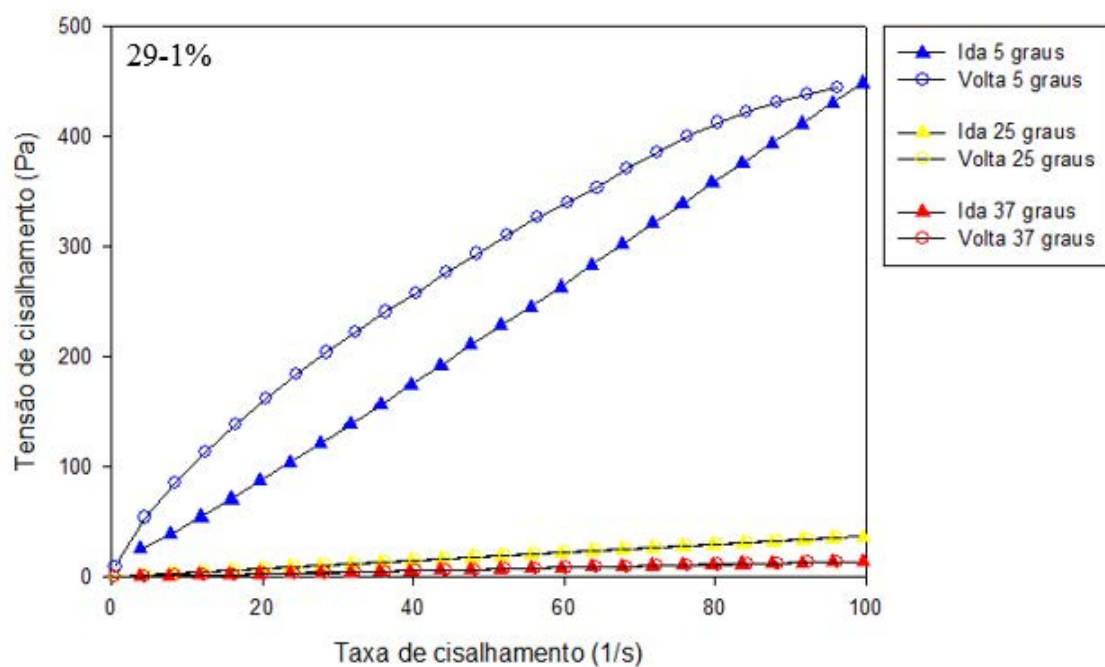
Os reogramas relacionados à amostra 30 para as diferentes concentrações de poloxamer são exibidos nas Figuras 36, 37 e 38. De igual forma, obteve-se sistemas newtonianos para todas as temperaturas em todas as concentrações, inclusive na temperatura de 5 °C. Isso mostra que o sistema não sofre nenhuma intervenção sofre a imposição e a retirada da taxa de cisalhamento.

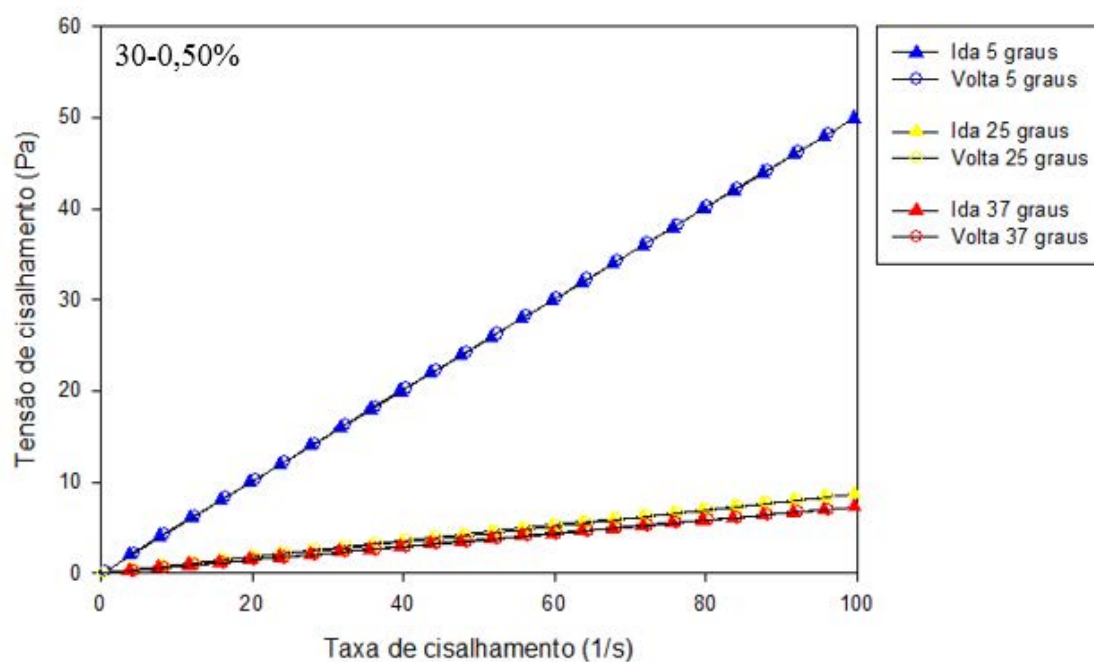
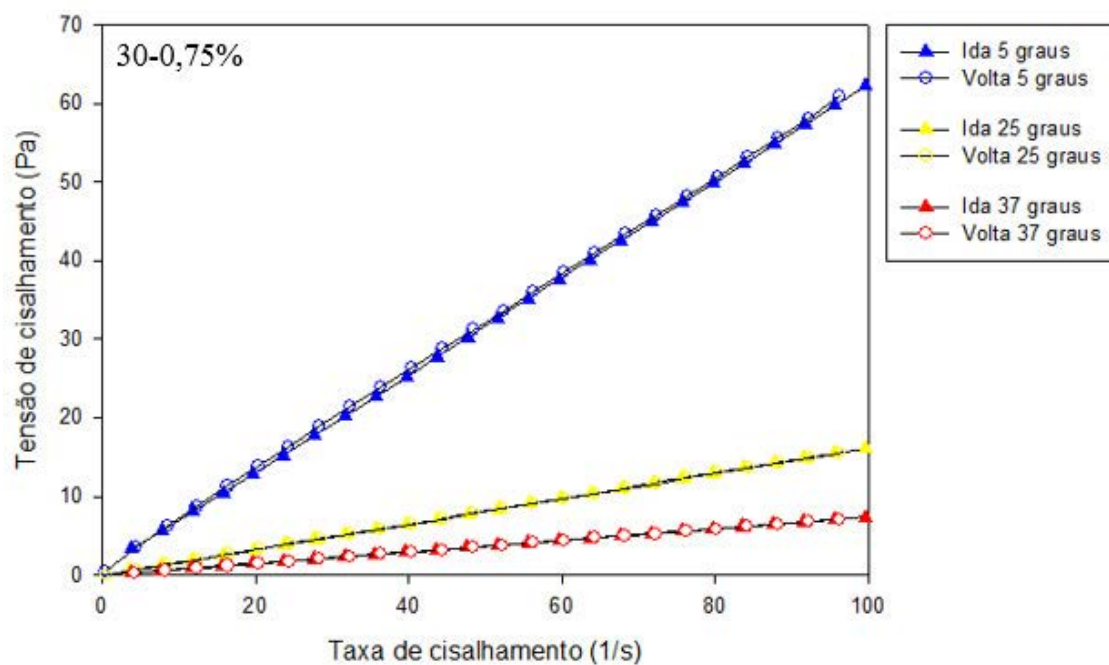
Foi possível detectar a influência da água em todas as formulações (27, 28, 29 e 30), independente da concentração do poloxamer na dispersão. Este evento pode ser observado nos reogramas em todas as temperaturas, de modo que as amostras foram necessitando de uma tensão de cisalhamento mais elevada para haver a alteração da viscosidade ao passo que foi se aumentando a concentração da fase aquosa no sistema.

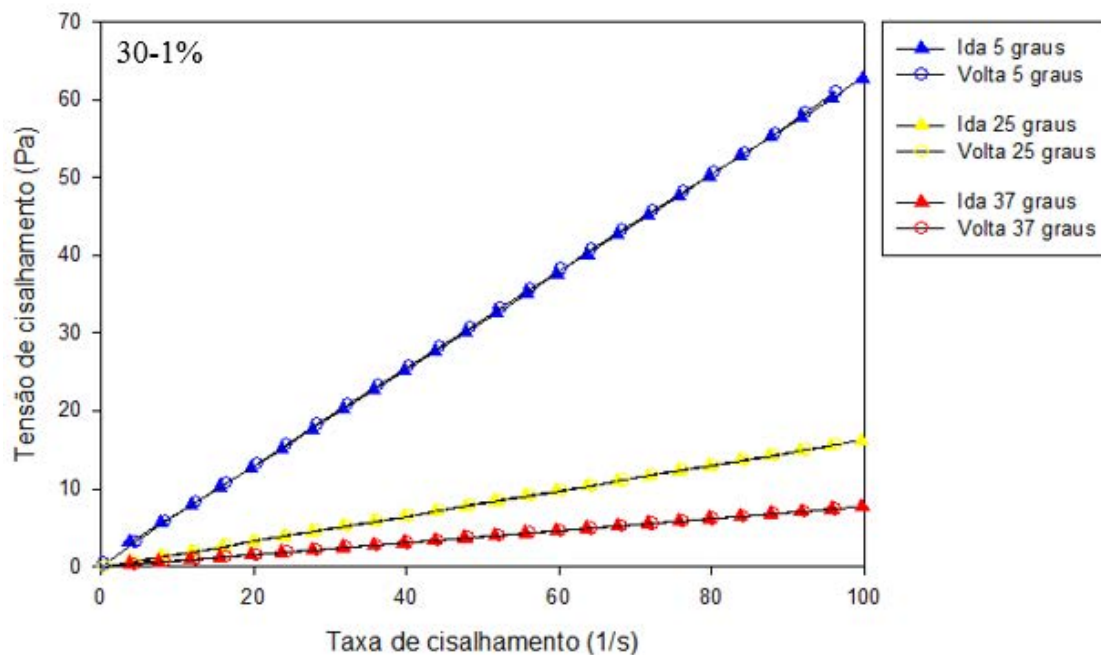
O mesmo fato foi observado por Carvalho e colaboradores (2011), que observaram o mesmo perfil em reogramas obtidos com sistema constituído por Procetyl AWS, ácido oleico e água, porém esta evidência foi mais sutil. Os autores detectaram que nas amostras com menores concentrações de água, menores tensões de cisalhamento foram necessárias, de maneira que a tensão foi aumentada conforme o aumento da proporção de fase aquosa.

**Figura 30** - Reograma da formulação 28- 0,50% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.**Figura 31** - Reograma da formulação 28- 0,75% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.

**Figura 32** - Reograma da formulação 28- 1% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.**Figura 33** - Reograma da formulação 29- 0,50% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.

**Figura 34** - Reograma da formulação 29- 0,75% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.**Figura 35** - Reograma da formulação 29- 1% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.

**Figura 36** - Reograma da formulação 30- 0,50% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.**Figura 37** - Reograma da formulação 30- 0,75% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.

**Figura 38** - Reograma da formulação 30- 1% nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.

Observando os reogramas apresentados nas Figuras 27 a 38, reafirma-se os comportamentos observados pela lei das potências, descritas pela equação 1:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Equação 1})$$

em que  $k$  é um parâmetro relacionado à consistência (índice de consistência) e  $n$  é o índice de escoamento. Neste modelo,  $n > 1$  representa um fluido dilatante,  $n < 1$  representa fluido pseudoplástico, e  $n = 1$  fluido newtoniano (CARVALHO, 2009).

Na Tabela 3, são apresentados os valores de  $\eta$  e  $K$  de todas as formulações selecionadas em todas as condições de temperatura para a comparação quanto à classificação dos reogramas.

**Tabela 3** - Índice de escoamento ( $\eta$ ) e índice de consistência (K) dos sistemas selecionados em todas as condições de temperatura de armazenamento.

Formulações	5 °C		25 °C		37 °C	
	$\eta$	K	$\eta$	K	$\eta$	K
<b>27- 0,50%</b>	0,146	591,159	0,443	24,769	0,512	6,738
<b>27- 0,75%</b>	0,258	363,775	0,426	21,658	0,503	7,584
<b>27- 1%</b>	0,254	306,529	0,357	27,495	0,508	7,294
<b>28- 0,50%</b>	0,445	37,271	0,565	8,633	0,350	14,825
<b>28- 0,75%</b>	0,444	40,895	0,431	17,334	0,635	3,610
<b>28- 1%</b>	0,418	47,273	0,440	17,325	0,616	3,690
<b>29- 0,50%</b>	0,894	11,142	0,995	0,289	0,990	0,144
<b>29- 0,75%</b>	0,909	7,968	0,992	0,263	0,987	0,120
<b>29- 1%</b>	1,015	4,177	0,993	0,378	0,986	0,150
<b>30- 0,50%</b>	0,994	0,514	0,987	0,092	0,988	0,077
<b>30- 0,75%</b>	0,973	0,704	0,994	0,166	0,988	0,079
<b>30- 1%</b>	0,986	0,668	0,994	0,167	0,983	0,083

Nota-se que para as formulações 27 e 28, em todas as concentrações de poloxamer, na temperatura de 5 °C, os valores de  $n$  apresentaram-se todos menores que 1, concordando com a interpretação feita utilizando seus respectivos reogramas. Observa-se também que à medida em que se acrescentou maiores concentrações de fase aquosa, obteve-se maiores valores de índice de consistência.

Quando o ensaio foi realizado na temperatura de 25 °C, as formulações 27- 0,50%, 27-0,75%, 27-1%, 28-0,50%, 28-0,75% e 28-1% apresentaram os valores de  $\eta$  entre 35 à 56, observando que quanto maior a concentração de água adicionada aos sistemas, maiores os valores de K, o qual podemos correlacionar com a viscosidade dinâmica mostrando maior estruturação dos sistemas. Já as amostras 29- 0,50%, 29- 0,75%, 29-1%, 30- 0,50%, 30- 0,75% e 30- 1% mostraram –se como newtonianas ao apresentarem valores de muito próximos de  $n = 1$ . Tal característica é condizente com sistemas

característicos aos de microemulsões, uma vez que não apresentam nenhuma estruturação para ser desorganizada (IZQUIERDO *et al.*, 2013).

Quando o ensaio foi realizado na temperatura de 37 °C, observou-se as mesmas características observadas para a temperatura de 25 °C, ressaltando que os valores de K diminuíram, o que pode sugerir a influência da temperatura quanto à viscosidade dinâmica, ou seja, quanto maior a temperatura menor a viscosidade.

Bruschi (2006) realizou análise de dispersões de poloxamer 407 nas concentrações de 10, 15 e 20%, às temperaturas de 5, 25 e 37°C, e observou que, ao passo que se aumentava a temperatura, os valores de índice de consistência (K) das concentrações de 15 e 20% também aumentavam, exceto da dispersão de 10% de polímero.

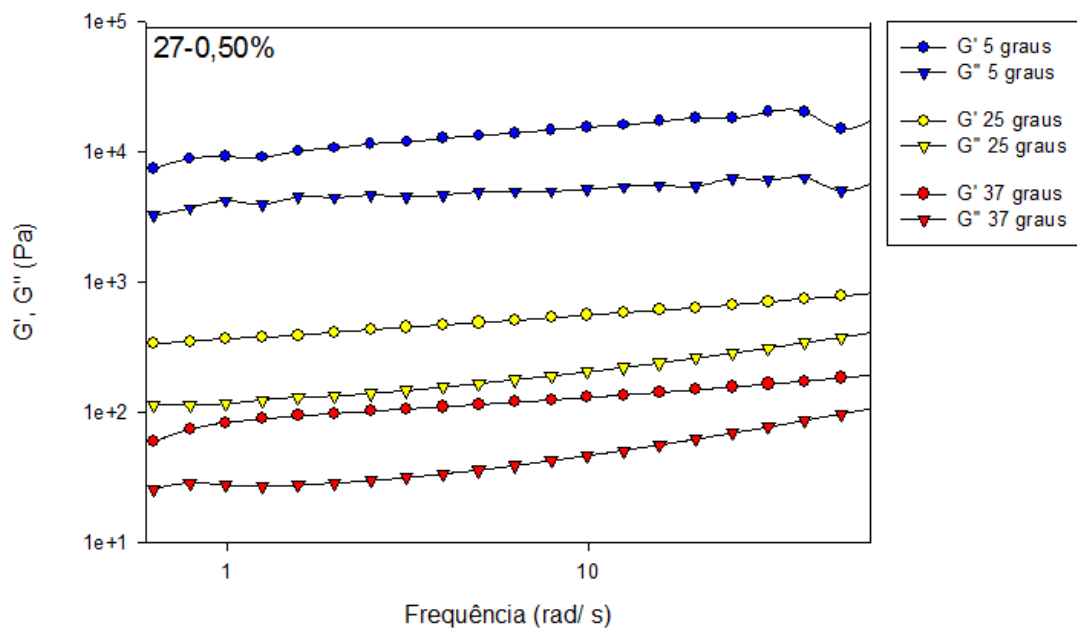
#### 5.5.3.2. *Análise reológica oscilatória*

A análise reológica oscilatória investiga as propriedades viscoelásticas e materiais das formulações, o que traz informações quanto à natureza estrutural do sistema, implicando diretamente no desempenho da formulação (RAO, 1992; SCHRAMM, 2006).

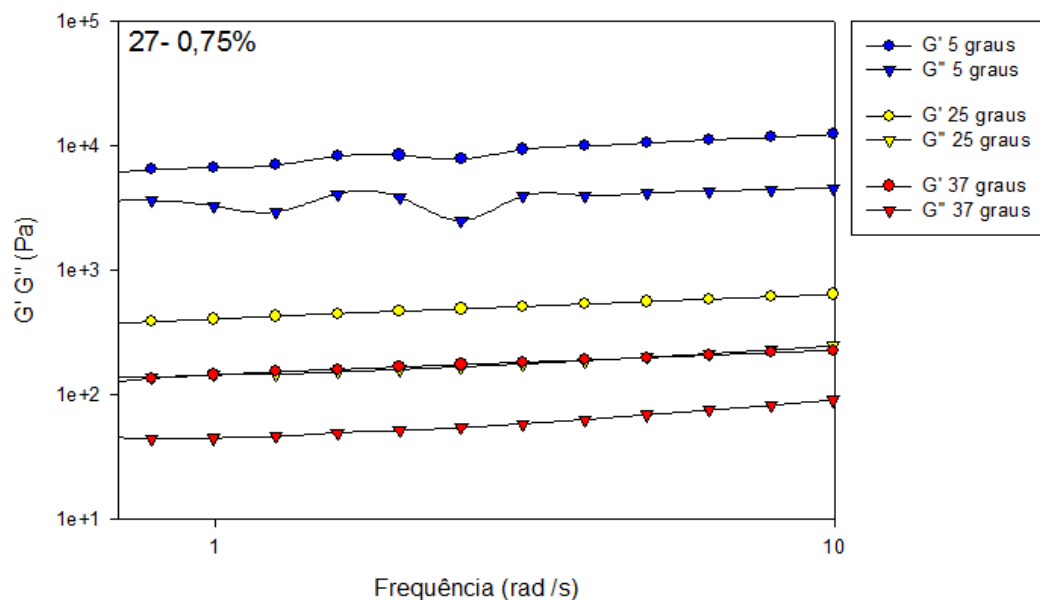
Essa informação é obtida através da análise do módulo elástico ( $G'$ ) e do módulo viscoso ( $G''$ ) obtidos nesse ensaio. O módulo elástico,  $G'$ , é denominado módulo de armazenagem, representando tanto a energia armazenada durante a deformação quando a tensão aumenta, quanto a energia liberada quando a tensão é relaxada. Já o módulo viscoso  $G''$  é o elemento viscoso que não pode armazenar energia, pois a tensão aplicada se dissipa na forma de deformação irreversível (PÈNZES *et al.*, 2004). Pode-se também calcular o módulo de cisalhamento dinâmico viscoso ou de perda ( $G''$ ), que indica o caráter líquido do material (BONTORIN, 2009).

As Figuras 39 a 50 e na Tabela 4 exibem evolução temporal dos módulos de armazenagem ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ).

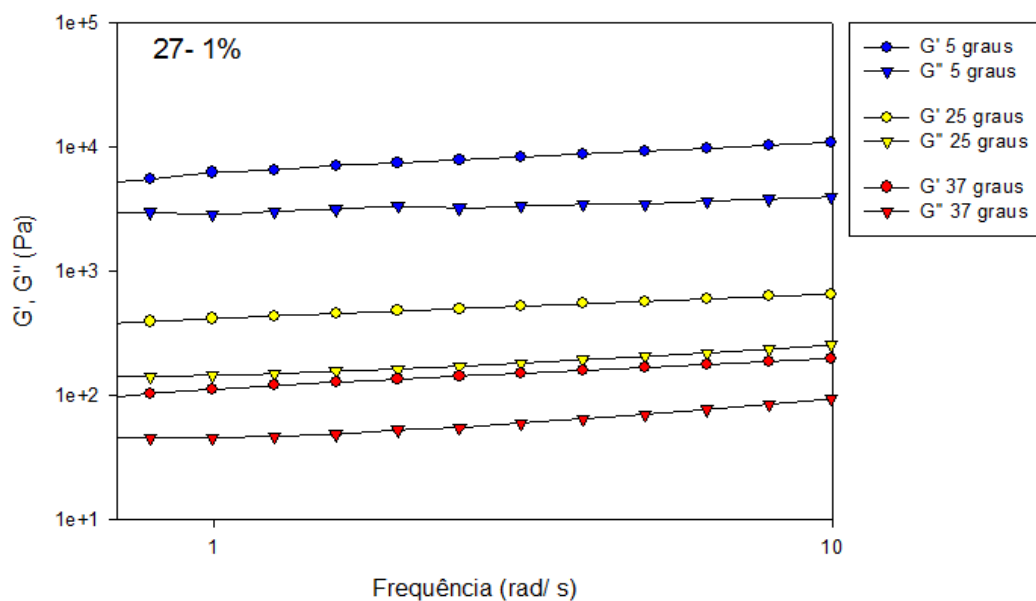
**Figura 39** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 27- 0,50% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



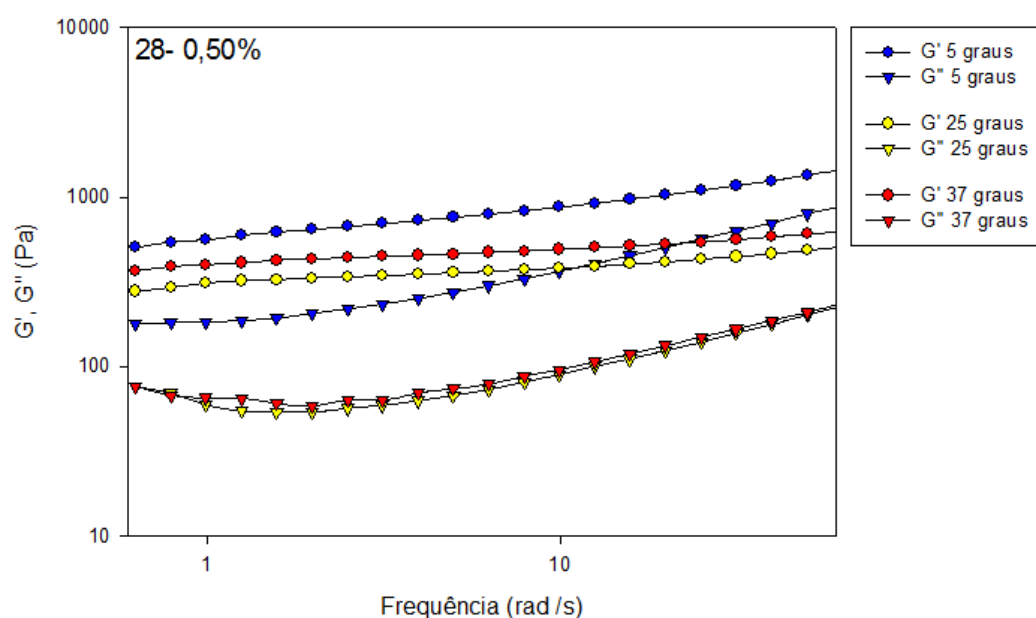
**Figura 40** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 27- 0,75% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



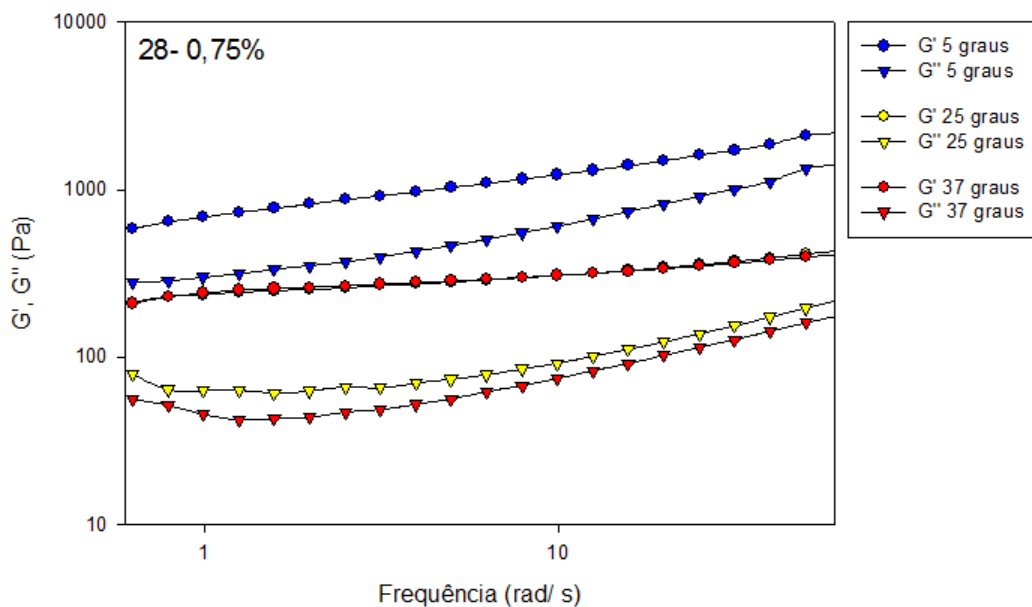
**Figura 41** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 27- 1% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



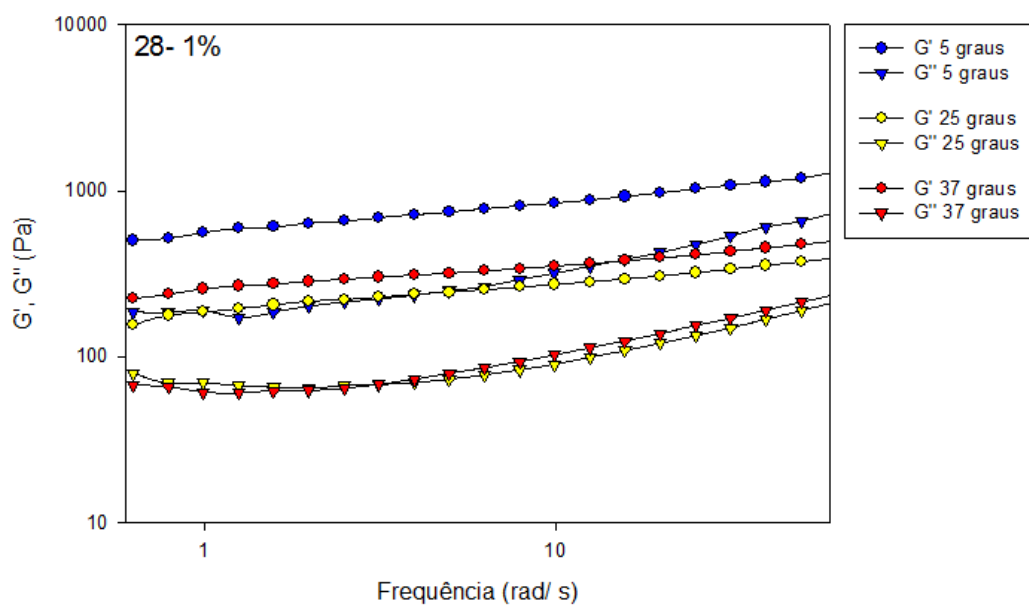
**Figura 42** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 28- 0,50% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



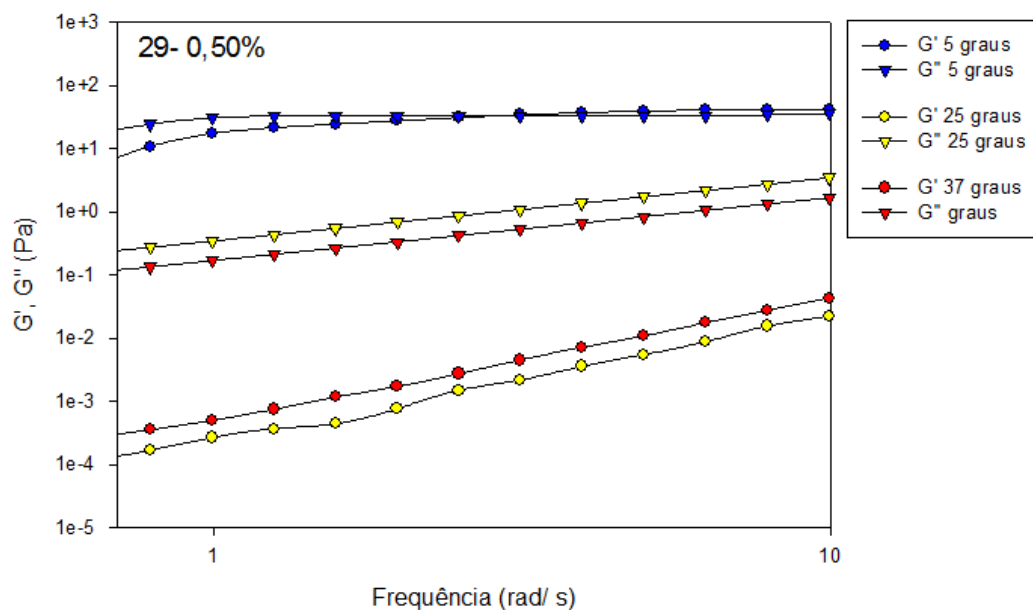
**Figura 43** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 28- 0,75% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



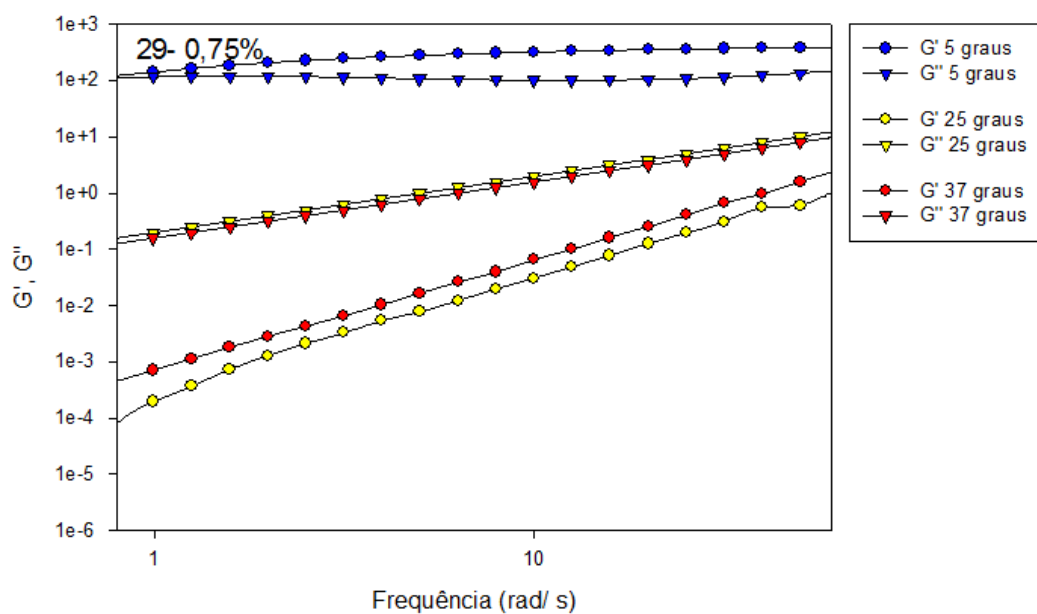
**Figura 44** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 28- 1% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



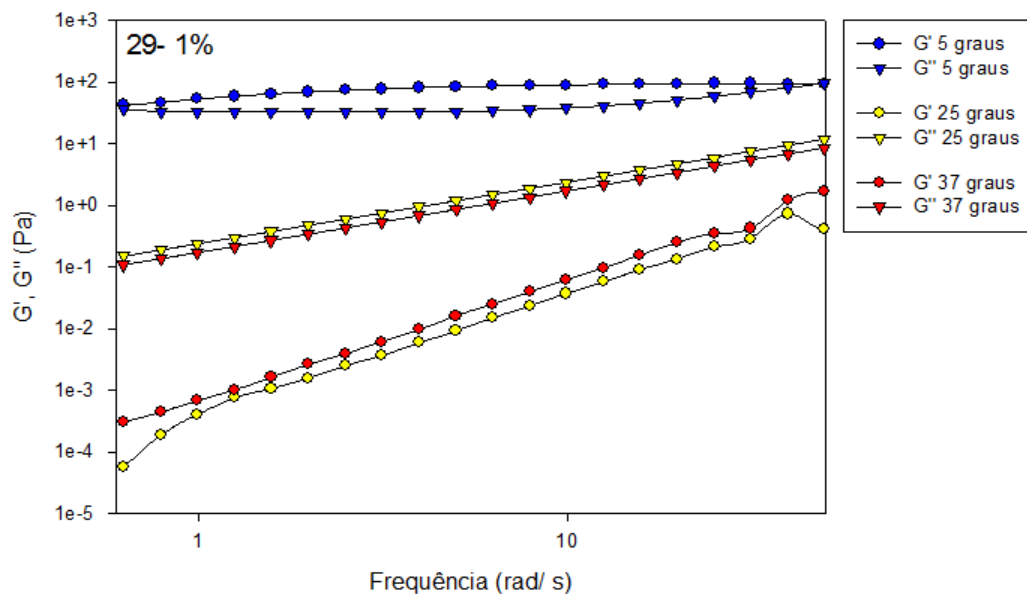
**Figura 45** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 29- 0,50% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



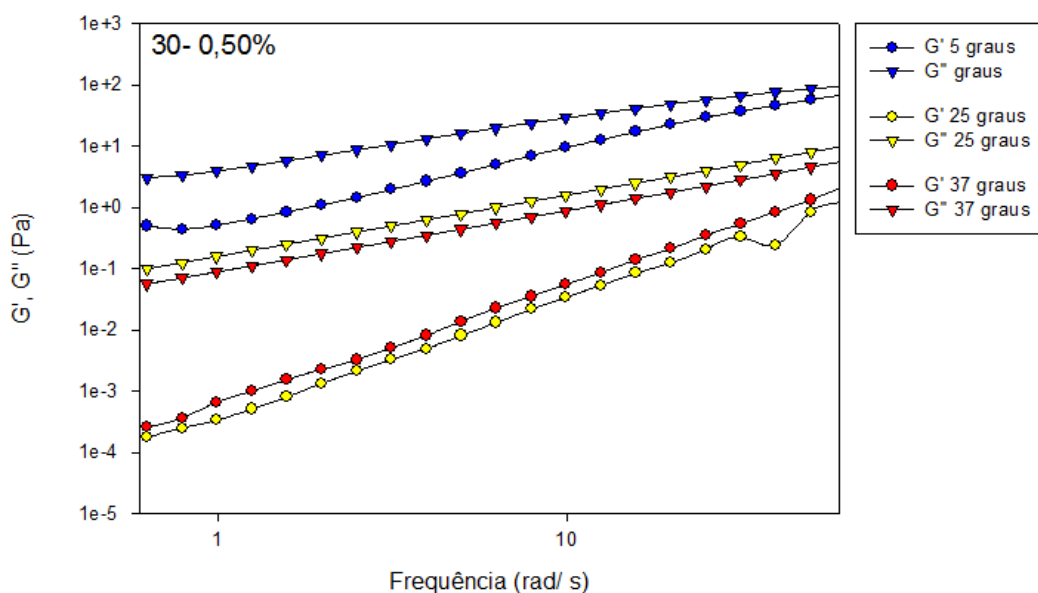
**Figura 46** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 29- 0,75% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



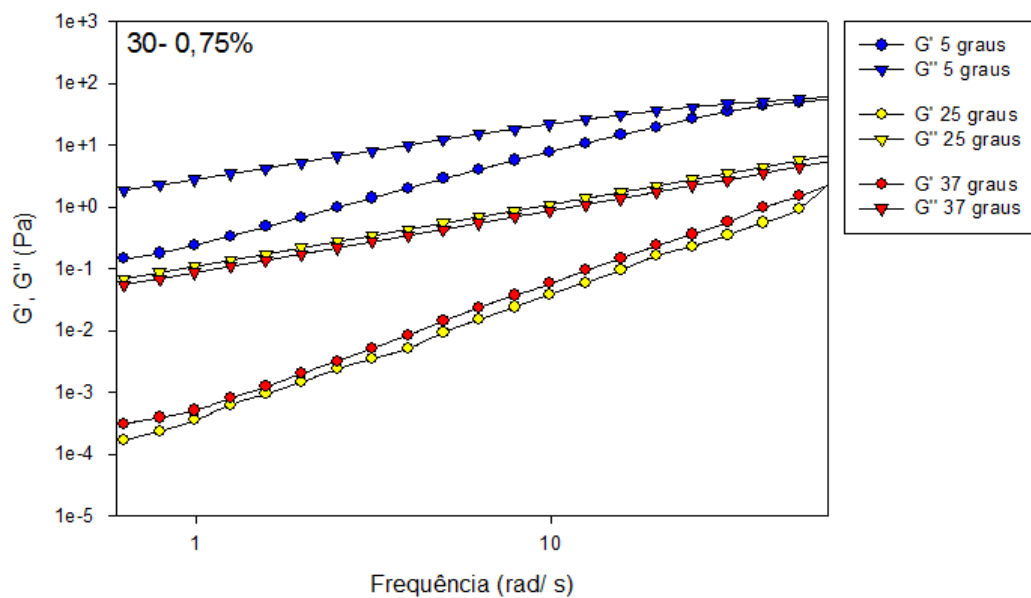
**Figura 47** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 29- 1% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



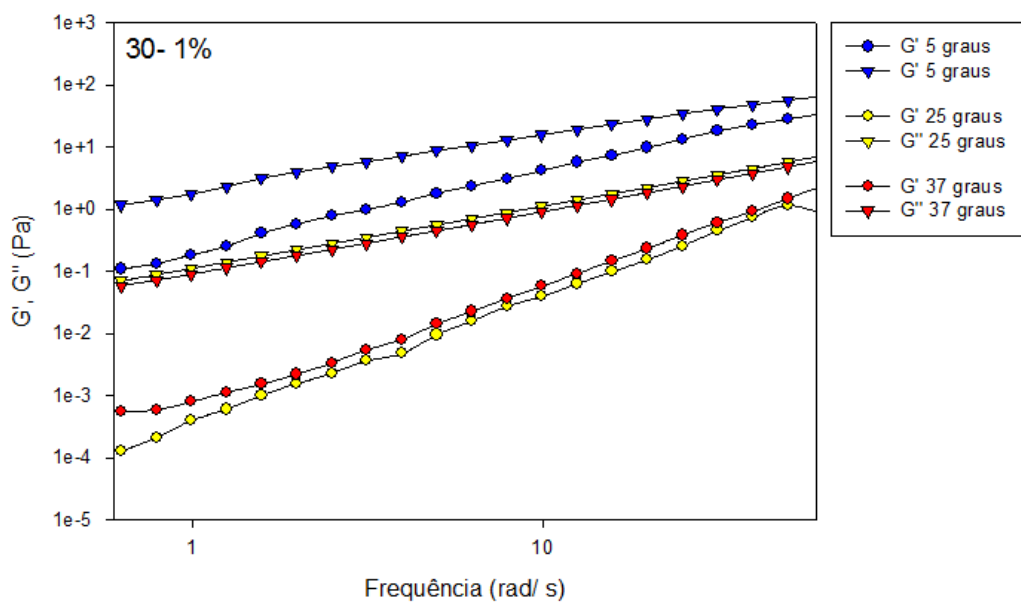
**Figura 48** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 30- 0,50% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



**Figura 49** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 30- 0,75% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



**Figura 50** - Variação do módulo de armazenagem  $G'$  (círculos) e de perda  $G''$  (triângulos) em função da frequência para a amostra 30- 1% em 3 temperaturas (5, 25 e 37 °C).



**Tabela 4** - Valores  $G'$  e  $G''$  do teste oscilatório para todas as formulações selecionadas à 5 °C, 25 °C e 37 °C.

Formulações	5 °C		25 °C		37 °C	
	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)
<b>27- 0,50%</b>	7469,5	3284	338,33	114,1	124,45	49,43
<b>27- 0,75%</b>	5713	3551,67	363,83	139,06	220,33	95,00
<b>27- 1%</b>	5084,33	2835	370,56	140,4	190,98	98,64
<b>28- 0,50%</b>	502,66	179,73	376,58	99,89	482,33	106,39
<b>28- 0,75%</b>	582,83	282	302,74	102,63	301,49	80,53
<b>28- 1%</b>	502,26	186,46	263,05	101,41	342,56	109,12
<b>29- 0,50%</b>	4,99	16,28	0,07	5,28	0,25	2,43
<b>29- 0,75%</b>	98,25	100,06	0,15	2,89	5,49	8,87
<b>29- 1%</b>	42,30	36,16	0,14	3,44	0,29	2,49
<b>30- 0,50%</b>	0,50	3,07	0,15	2,37	5,48	6,59
<b>30- 0,75%</b>	0,15	1,88	0,26	1,64	0,31	1,28
<b>30- 1%</b>	0,11	1,16	0,18	1,65	0,30	1,36

As formulações 27, para todas as concentrações de dispersão de poloxamer (0,50%, 0,75% e 1%) apresentaram predominantes características de formulações elásticas, uma vez que em toda faixa de frequência estudada, estes obtiveram valores do módulo de armazenagem ( $G'$ ) superiores ao de perda ( $G''$ ), em todas as temperaturas, sendo que em 5° C os valores de  $G'$  e  $G''$  foram maiores que em 25°C, que por sua vez foram maiores que em 37°C.

Já para as formulações 28-0,50%, 28-0,75%, e 28-1%, pode-se observar que também os valores do módulo de armazenagem ( $G'$ ) foram superiores aos de perda ( $G''$ ) em todas as temperaturas, porém, diferentemente das amostras 27, os valores de  $G'$  e  $G''$  foram mais próximos entre si, independente da concentração do polímero.

Comparando as formulações com maiores quantidades de água (27 e 28) com as 29 e 30 (menores quantidades de água), independente da temperatura analisada, pode-se observar que os valores de  $G'$  foram maiores que de  $G''$  para as formulações 27 e 28, quanto que para as formulações 29 e 30 os valores de  $G''$  foram maiores que de  $G'$ , mostrando claramente a interferência da água na estruturação destes sistemas.

Para a formulação 29 com as concentrações de 0,75% e 1% de dispersão polimérica, em todas as temperaturas (5, 25 e 37 °C) observou-se valores de módulo de perda ( $G''$ ) superior ao de armazenagem ( $G'$ ). Estes dados apontam que estas formulações apresentam predominantemente comportamento viscoso, sinalizando sistemas pouco organizados. Calixto (2013) realizou a análise com formulações contendo o mesmo tensoativo, fase oleosa e as mesmas proporções de fase aquosa com diferentes tipos de polímeros em 37°C e também obteve o mesmo perfil entre os módulos elástico e viscoso. Apenas houve uma inversão na razão entre os módulos quando estas amostras foram expostas à temperatura de 5 °C, na qual apresentaram predomínio do módulo elástico, provavelmente revelando possível mudança na estruturação do poloxamer 407, polímero que é termo-responsivo.

A formulação 30 (com 0,50%, 0,75% e 1% de dispersão polimérica) demonstrou também o mesmo comportamento que a formulação 29, exceto na temperatura de 5 °C, a qual permaneceu com o mesmo comportamento das outras temperaturas.

Foi possível observar também que para todas as formulações, as concentrações de poloxamer não promoveram alteração no comportamento reológico, sendo que para as amostras 27-0,50%, 27-0,75% e 27-1% não se observou influência do aumento da concentração do polímero, assim como entre as formulações 28, 29 e 30. Isto pode ser devido à baixa concentração dos polímeros e/ou porque as concentrações escolhidas foram muito próximas entre si.

#### **5.5.4. Análise do perfil de textura**

Neste teste, obtêm-se propriedades mecânicas das formulações, como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão, relacionadas ao seu perfil de textura.

Portanto, nesta técnica é possível analisar a dureza, que é a resistência máxima à deformação compressional, e a compressibilidade, que é o trabalho exigido para comprimir o sistema. Logo, a dureza mostra a facilidade de aplicação, e a compressibilidade a facilidade de espalhamento da formulação sobre a superfície biológica administrada (JONES *et al.*, 2009; CARVALHO, 2012; CALIXTO, 2013).

Para isso, as formulações selecionadas foram avaliadas quanto ao perfil de textura exposto na Tabela 5.

**Tabela 5** - Propriedades mecânicas das formulações determinadas por meio de análise de perfil de textura à temperatura de 37°C.

<b>Sistemas</b>	<b>Compressibilidade</b> (mN.s)	<b>Dureza</b> (mN)	<b>Adesividade</b> (mN.s)	<b>Coesão</b>
<b>27_0,5%</b>	101,3 ± 1,05	14,60 ± 0,18	27,5 ± 8,21	0,70 ± 0,02
<b>27_0,75%</b>	102,47 ± 0,47	14,66 ± 0,07	33,0 ± 5,91	0,72 ± 0,02
<b>27_1%</b>	99,78 ± 0,49	10,20 ± 0,10	10,28 ± 7,63	0,76 ± 0,05
<b>28_0,5%</b>	190,16 ± 1,74	23,58 ± 0,16	98,6 ± 11,97	0,60 ± 0,02
<b>28_0,75%</b>	175,84 ± 2,42	26,32 ± 0,14	79,33 ± 19,72	0,63 ± 0,03
<b>28_1%</b>	183,35 ± 1,68	28,76 ± 0,17	104,25 ± 16,39	0,63 ± 0,04
<b>29_0,5%</b>	-	-	-	-
<b>29_0,75%</b>	-	-	-	-
<b>29_1%</b>	-	-	-	-
<b>30_0,5%</b>	-	-	-	-
<b>30_0,75%</b>	-	-	-	-
<b>30_1%</b>	-	-	-	-

Não foi possível realizar a análise de perfil de textura para as formulações 29 e 30 em todas suas concentrações de polímero na fase aquosa (0,50%, 0,75% e 1%), em virtude da baixa viscosidade e do comportamento newtoniano, não conferindo resistência mecânica à sonda analisadora de textura.

Após a realização do ensaio, realizou-se análise estatística pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 0,01%.

Quanto à adesividade, a formulação 28, com todas as proporções de polímero mostrou valor superior ao da formulação 27, porém entre elas constatou-se que houve apenas diferença estatística com nível significância maior que 0,01% entre os valores obtidos da amostra 28-1%.

### 5.5.5. Avaliação *in vitro* da força bioadesiva

No campo das Ciências Farmacêuticas, o termo bioadesão é definido como a condição entre dois materiais, sendo sempre pelo menos um destes de origem biológica, que permanecem unidos por um período de tempo, por meio de forças interfaciais (GU *et al.*, 1988).

Na Tabela 6, são expostos os valores obtidos na realização deste teste. De acordo com esses dados, observa-se que houve a obtenção de sistemas mais bioadesivos com a adição de maiores concentrações de água (amostras 27 e 28 em diferentes concentrações de poloxamer). Porém, quando comparadas entre si, as amostras 27-0,50%, 27-0,75%, 27-1%, 28-0,50%, 28-0,75% e 28-1% não apresentaram diferença estatística significativa, demonstrando assim que a variação da concentração de dispersão de poloxamer (0,50%, 0,75% e 1%) não foi suficiente para a observação desta possível variação, da mesma maneira, como não houve diferença estatística significativa entre as amostras 29-0,50%, 29-0,75%, 29-1%, 30-0,50%, 30-0,75% e 30-1%.

Podemos observar também que a formulação sem a adição de polímero também apresenta certo grau de bioadesividade, intensificando o efeito almejado para sistemas de liberação modificada a serem aplicados via intrabolsa periodontal.

**Tabela 6** - Trabalho da força bioadesiva (mN.s) das formulações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão, à temperatura 37°C.

Sistemas	Trabalho da força bioadesiva (mN.s)
<b>27- sem poloxamer</b>	10,40 $\pm$ 3,84 <sub>a</sub>
<b>27- 0,50%</b>	19,50 $\pm$ 6,85 <sub>a</sub>
<b>27- 0,75%</b>	16,25 $\pm$ 2,87 <sub>a</sub>
<b>27- 1%</b>	15,25 $\pm$ 1,50 <sub>a</sub>
<b>28- sem poloxamer</b>	8,00 $\pm$ 1,87 <sub>a</sub>
<b>28- 0,50%</b>	12,50 $\pm$ 2,88 <sub>a</sub>
<b>28- 0,75%</b>	18,00 $\pm$ 2,64 <sub>a</sub>
<b>28- 1%</b>	15,50 $\pm$ 1,00 <sub>a</sub>
<b>29- sem poloxamer</b>	5,25 $\pm$ 0,95 <sub>b</sub>
<b>29- 0,50%</b>	3,80 $\pm$ 1,48 <sub>b</sub>
<b>29- 0,75%</b>	5,50 $\pm$ 1,47 <sub>b</sub>
<b>29- 1%</b>	5,25 $\pm$ 1,04 <sub>b</sub>
<b>30- sem poloxamer</b>	9,50 $\pm$ 1,73 <sub>b</sub>
<b>30- 0,50%</b>	5,16 $\pm$ 2,13 <sub>b</sub>
<b>30- 0,75%</b>	4,40 $\pm$ 1,81 <sub>b</sub>
<b>30- 1%</b>	7,40 $\pm$ 1,81 <sub>b</sub>

\*Houve diferença estatística entre os valores obtidos entre grupo a e b, com o nível significância maior que 0,01%.

#### 5.5.6. Determinação do trabalho de seringabilidade

A obtenção de menor força necessária para originar o fluxo e o trabalho de extrusão das formulações é importante no decorrer do desenvolvimento de novos sistemas. A determinação do trabalho de seringabilidade visa antecipar a percepção de possíveis dificuldades/facilidades quanto ao momento de aplicação do sistema no paciente.

Determinou-se a seringabilidade dos sistemas utilizando o analisador de texturas. É conveniente que se analise as formulações a serem administradas via bucal, mais especificamente dentro das bolsas gengivais, quando se faz o uso de seringas para tal

administração (BRUSCHI, 2006). Na Tabela 7, pode se observar o trabalho necessário para expelir cada formulação a partir da seringa sem agulha.

**Tabela 7** - Trabalho de seringabilidade das formulações selecionadas à 25 °C.

Sistemas	Trabalho de seringabilidade (N.mm)
27_0,5%	22,81 ± 10,20
27_0,75%	28,53 ± 7,41
27_1%	41,53 ± 6,38
28_0,5%	23,51 ± 10,18
28_0,75%	17,41 ± 8,33
28_1%	21,97 ± 7,86
29_0,5%	12,11 ± 13,83
29_0,75%	18,64 ± 5,16
29_1%	27,81 ± 7,79
30_0,5%	14,02 ± 1,28
30_0,75%	17,38 ± 3,69
30_1%	17,83 ± 5,97

\* Cada valor representa a média ± desvio padrão de cinco réplicas.

Observa-se que o trabalho de seringabilidade foi maior nas formulações que tinham maiores concentrações de água. O maior trabalho de seringabilidade executado dentre as formulações testadas foi na formulação 27-1%, sendo que esta foi a única que apresentou diferença estatística entre os valores obtidos, com o nível significância maior que 0,01%.

O aumento deste trabalho também pode ser associado com o aumento das concentrações de poloxamer 407, sendo que o mesmo comportamento já foi relatado no desenvolvimento de sistemas semissólidos por Bruschi (2006).

Quanto maiores forem as concentrações do polímero, possivelmente, maiores serão as forças necessárias para expulsar a formulação de dentro da seringa, uma vez que foi percebido que este polímero, aumentando a viscosidade das formulações de acordo com sua concentração, diminui assim sua flexibilidade.

Os sistemas mais fluidos demonstraram em geral, menores valores de trabalho para extrusão das amostras pela seringa. Quanto aos mais viscosos, como esperado, houve a necessidade de maiores aplicações de força.

#### 5.5.6.1. *Análise térmica das dispersões de poloxamer 407*

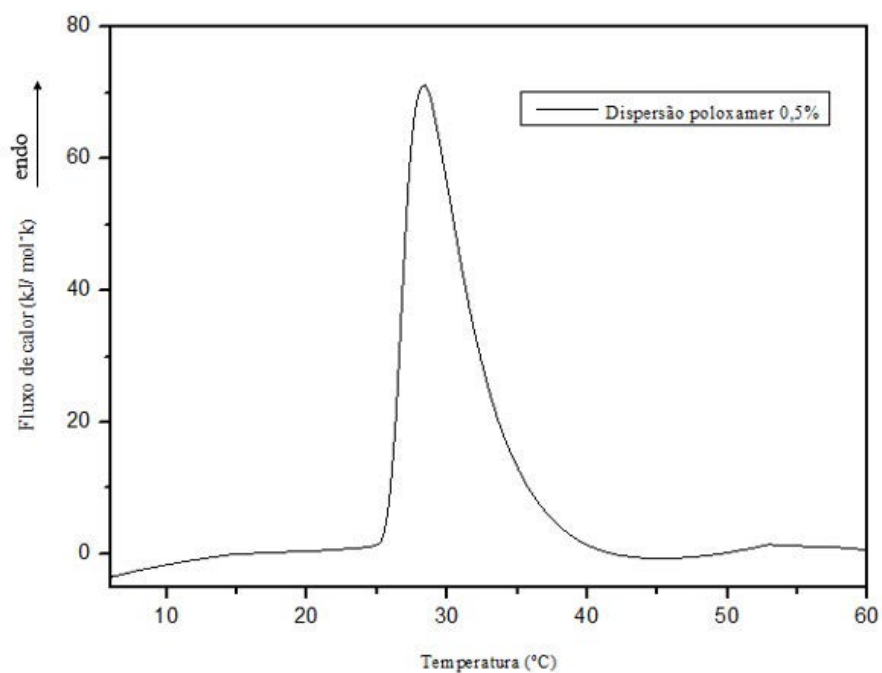
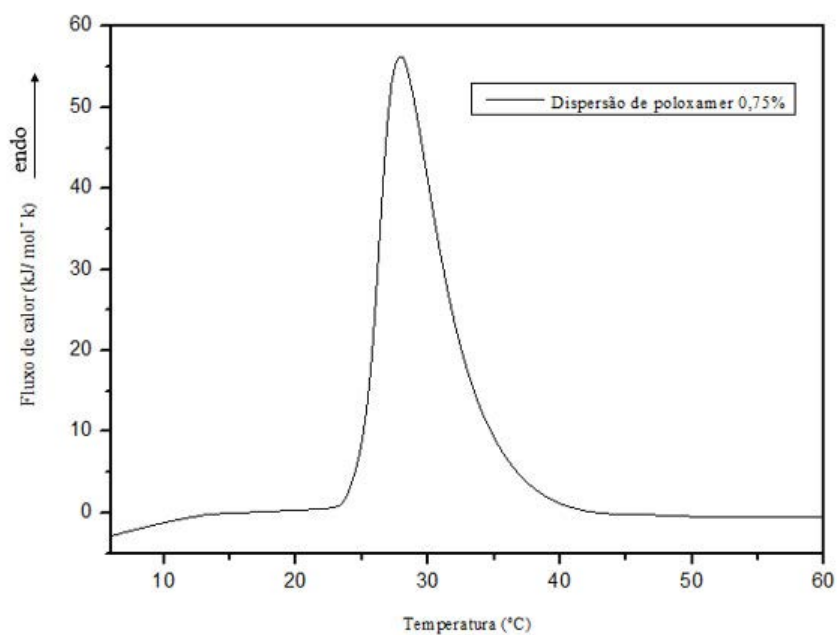
O termo análise térmica envolve um conjunto de técnicas que acompanham uma propriedade física ou química de uma determinada substância (ou de seus produtos de reação) em função da temperatura ou do tempo, à medida que uma programação controlada é submetida a temperatura da amostra, sob atmosfera determinada.

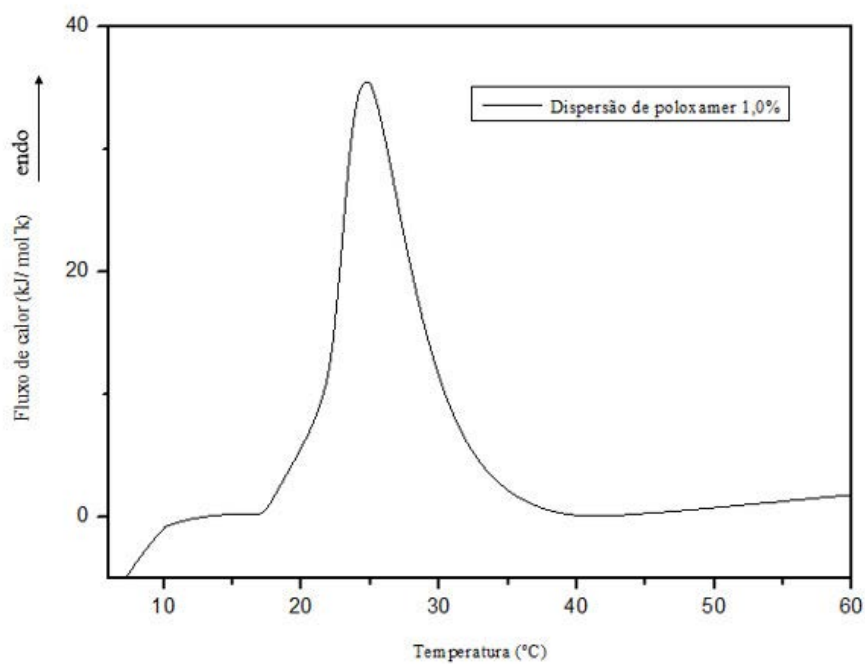
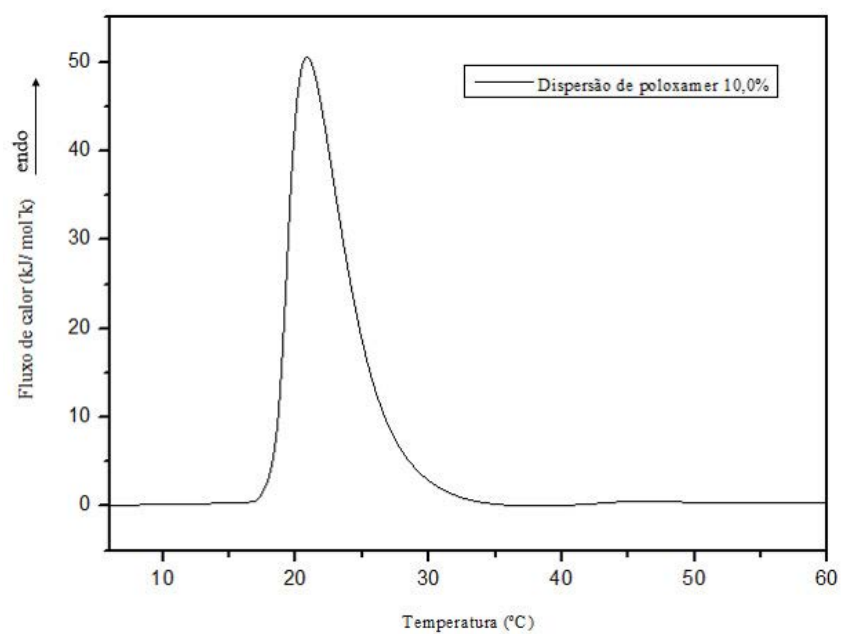
Uma das técnicas de análise térmica é a calorimetria diferencial exploratória (em inglês *Differential scanning calorimetry* – DSC). O princípio do DSC é aquecer e/ou resfriar um material isotermicamente e avaliar transições ou eventos energéticos, para posterior comparação com o padrão de referência da amostra, em função do tempo ou temperatura (FORD e MANN, 2012). Pode ser aplicada para determinação de pureza, transição vítrea, transição de mesofases, taxas de cristalização e reações entre outras.

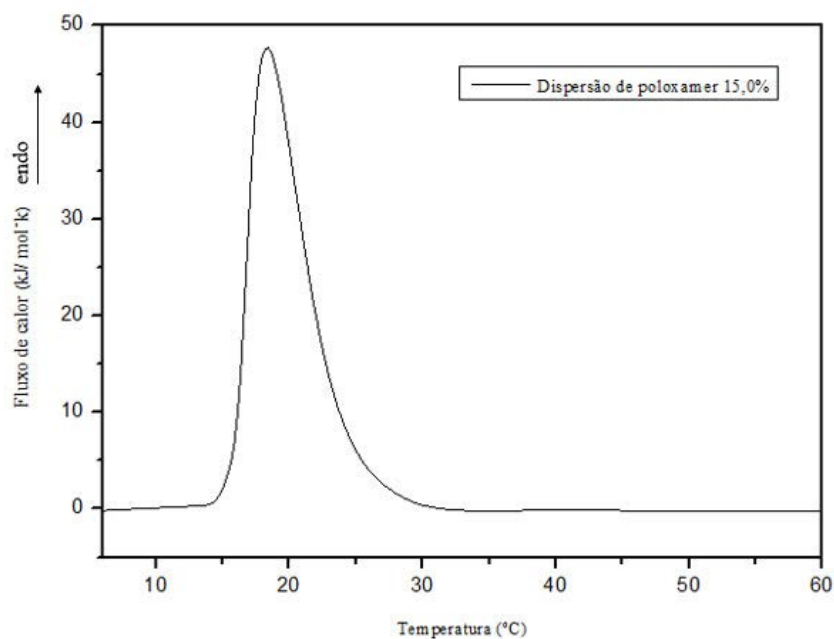
Os poloxamers possuem capacidade de se transformar, partindo de moléculas de copolímero em bloco individuais para estruturação de micelas, quando entram em contato com a água. O seu comportamento dependente de temperatura para autoestruturação e termogelificantes são bem estudados (BONACUCINA *et al.*, 2007).

Na literatura, encontra-se que para dispersões de poloxamer 407 em água é atingido o pico máximo de viscosidade na faixa de 30 – 50 °C, sendo dependente da concentração de polímero utilizada (BONACUCINA *et al.*, 2007; BROWN *et al.*, 1992).

De acordo com as Figuras 51 a 55, pode-se constatar eventos com temperaturas máximas entre 18 e 28 °C. Observa-se que para o poloxamer 407 disperso em água, quanto maior a concentração do polímero, mais o evento observado se desloca para menores temperaturas. Isso mostra a relação da concentração do polímero e sua resposta gelificante. Nos sistemas desenvolvidos neste trabalho não foi possível perceber claramente o efeito do aumento da concentração do polímero nas formulações devido às baixas concentrações utilizadas.

**Figura 51** – Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 0,50%.**Figura 52** – Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 0,75%.

**Figura 53** – Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 1,0%.**Figura 54** – Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 10,0%.

**Figura 55** – Termograma da dispersão de poloxamer 407 à 15,0%.

Observa-se que todas as dispersões demonstram eventos térmicos do polímero disperso em água. Na Tabela 8, estão expostos os valores de  $t_{máx}$  obtidos nos termogramas apresentados nas Figuras 51 a 55.

**Tabela 8** – Relações de concentração de poloxamer com a temperatura máxima detectada.

Concentração de poloxamer (%)	$T_{máx}$ (°C)
15,0	18,3954
10,0	20,7571
1,0	24,7656
0,75	27,9292
0,50	28,4437

Observou-se que, ao aumentar a concentração de polímero nas dispersões, os eventos e deslocaram para temperaturas mais baixas, evidenciando seu potencial termossensível. Bonacucina e colaboradores (2007) observaram o mesmo comportamento com dispersões de poloxamer 407, mostrando que o aumento da concentração de polímero provocou redução da temperatura de termogelificação, tornando a dispersão em sistema semi-sólido já em temperatura ambiente.

### 5.1. Ensaio de inibição *in vitro* do biofilme multiespécie salivar

O peptídeo KSL-W é um peptídeo antimicrobiano o qual tem demonstrado capacidade de inibir o crescimento de diversas bactérias orais associadas com o desenvolvimento de cáries e a formação de biofilmes orais (NA *et al.*, 2005, LIU *et al.*, 2011).

No ensaio de inibição do biofilme, testaram-se três concentrações diferentes do peptídeo antimicrobiano KSL-W, sendo estas 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL e 1 mg/mL, tanto em solução quanto incorporado na formulação 28-1%. Após a contagem das colônias ao término do ensaio, foram obtidos os resultados expressos na Tabela 9, onde a inibição do biofilme está expressa como a porcentagem de unidades formadoras de colônias presentes, comparando com o controle positivo (considerando as 251 colônias crescidas como 100%).

**Tabela 9-** Porcentagem de crescimento do biofilme *in vitro* frente amostras adicionadas.

Amostras	%UFC
Controle positivo (biofilme)	100
Controle negativo (gluconato de clorexidina 1,2 mg/mL)	0
Solução de peptídeo 0,50 mg/mL	14,57
Solução de peptídeo 0,75 mg/mL	19,56
Solução de peptídeo 1 mg/mL	9,98
Formulação 0,50 mg/mL	12,77
Formulação 0,75 mg/mL	11,69
Formulação 1 mg/mL	0
Formulação 28-1%	14,37

Os resultados demonstraram que o sistema desenvolvido (28-1%) com a concentração de 1 mg/mL de peptídeo, apresentou o menor crescimento do biofilme com

as amostras testadas, sendo de 0 % quando comparado com o controle positivo. Utilizando esta mesma concentração de peptídeo KSL-W, pesquisas realizadas por Liu e colaboradores (2011) apontaram ser esta a concentração mínima inibitória de um dos patógenos diretamente relacionados à doença periodontal, o *Porphyromonas gingivalis*, enquanto que em concentrações menores que 1 mg/mL já se obtinha ação contra outros micro-organismos como exemplo, *Streptococcus* sp, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Candida albicans*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Em geral, após a incorporação deste peptídeo no sistema líquido-cristalino mucoadesivo, observou-se que o sistema desenvolvido demonstrou ser mais efetivo (0% de crescimento) que se peptídeo fosse apenas adicionado numa solução (9,98% de crescimento), resultado este que pode sugerir que o sistema teve uma liberação modulada e que decorrente a este fator teve sua ação por um período maior.

Pesquisas realizadas por Leung e colegas (2005) incorporaram o peptídeo KSL com a sequência de aminoácidos NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Lys- Lys- Val- Val- Phe- Lys- Val- Lys- Phe- Lys -COO<sup>-</sup> (do qual originou o KSL-W) em gomas de mascar e testaram sobre biofilmes em desenvolvimento e em biofilmes maduros, de forma que contabilizaram as reduções de micro-organismos viáveis. Eles observaram que os biofilmes maduros ofereciam maior resistência ao peptídeo antimicrobiano, enquanto aos biofilmes que estavam em desenvolvimento.

De acordo com o tempo de cultivo *in vitro* dos biofilmes, é possível denominá-los como maduros ou prematuros. Na presença de substrato disponível, com o passar do tempo (acima de 48 horas) as bactérias conseguem se aderir mais umas às outras formando uma rede de células densa, tornando-se mais resistentes que aquelas que estão iniciando seu processo de amadurecimento (BERTOLINI *et al.*, 2010).

O gluconato de clorexidina, utilizado neste trabalho como controle negativo, causou 100% de inibição do biofilme analisado. No estudo citado anteriormente, liderado por Leung e colaboradores (2005), foi utilizada a clorexidina como comparativo, a qual apresentou sua ação próxima ao da ação do peptídeo em solução aquosa na concentração de 200 µg/mL, revelando os valores de unidades formadoras de colônia por mililitro tanto da solução de peptídeo (8 UFC/mL), quanto da clorexidina (7 UFC/mL). Assim, os

resultados obtidos até o momento nas condições testadas não corroboram com a literatura, porém novos ensaios são necessários.

Leung e colegas (2009) testaram o peptídeo KSL-W incorporado na goma de mascar desenvolvida e adicionaram mais um componente, o cloreto de cetilpiridínio (CPC). Os autores observaram a ação sobre biofilme salivar cultivado em discos de hidroxiapatita e concluíram que houve uma interação sinérgica entre os componentes da goma de mascar (peptídeo antimicrobiano e o CPC), sendo possível a diminuição das concentrações de ambos os componentes antimicrobianos. Em contraste com os controles positivos, foi eliminado mais de 90% do biofilme depois do tratamento com a formulação do teste contendo a menor quantidade de substâncias ativas (200 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de peptídeo e CPC, respectivamente).

## 6. CONCLUSÕES

Perante os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- Foi possível obter sistemas com a utilização de ácido oleico (fase oleosa), Procetyl AWS (tensoativo) e dispersão de poloxamer 407 (fase aquosa), formando regiões de líquido-cristalinos (lamelares) e microemulsões a partir de 35% de tensoativo, os quais foram correlacionados com o aumento de sua estruturação, conforme houve aumento da concentração de fase aquosa.

- As regiões dos sistemas 27-0,50%, 27-0,75%, 27-1%, 28-0,50%, 28-0,75%, 28-1%, 29-0,50%, 29-0,75%, 29-1%, 30-0,50%, 30-0,75% e 30-1% foram selecionados para caracterização físico-química. Dentre eles, as formulações 27-0,50%, 27-0,75%, 27-1%, 28-0,50%, 28-0,75% e 28-1% apresentaram comportamentos reológicos, mecânicos e bioadesivos almejados para serem usadas como sistemas de liberação modificada.

- O ensaio antimicrobiano *in vitro* evidenciou que o peptídeo KSL-W (1 mg/mL) incorporado na formulação 28 com 1% de poloxamer 407, apresentou ação superior contra o biofilme multiespécie salivar quando comparado ao peptídeo em solução, na mesma concentração.

- Os resultados obtidos sugerem potencial do sistema como plataforma para administração bucal de peptídeos com ação anti-biofilme oral.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKALIN, F.A.; BALTACIOG, E.; SENGÜN, D.; HEKIMOG, S.; TASKIN, M.; ETIKAN, I.; FISENK, I. A comparative evaluation of the clinical effects of systemic and local doxycycline in the treatment of chronic periodontitis. **J. Oral Sci.**, v. 46, n. 1, p. 25-35, 2004.

ALMEIDA, A. J.; RUNGE, S.; MILLER, R.H. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): influence of production parameters, **Int. J. Pharm.** v.149, p. 255-265, 1997.

ALVES, C.; ANDION, J.; BRANDÃO, M.; MENEZES, R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao Diabetes Melito. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 7, p. 1050-1057, 2007.

ANDREWS, G.P.; LAVERTY, T.P.; JONES, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2008.

ANGELOVA, A.; ANGELOV, B.; MUTAFCHIEVA, R.; LESIEUR, S.; COUVREUR, P. Self assembled multicompartiment liquid crystalline lipid carriers for protein, peptide, and nucleic acid drug delivery. **Acc. Chem. Res.**, v. 43, n. 2., p. 190-200, 2010.

ATHERTON, E.; SHEPPARD, R.C. **Solid phase peptide synthesis: A practical approach**, Oxford, IRL press. Oxford University, UK. 1989. 216p.

BERTOLINI, M.M.; OLIVEIRA, G.; CHARONE, S.; SOARES, R.M.A.; SOUZA, I.P.R.; PORTELA, M.B. Avaliação *in vitro* da microdureza de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina submetidos a biofilme de *Candida albicans*. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, v. 10, n. 2, p. 249-255, 2010.

BHARDWAJ, R.; BLANCHARD, J. Controlled-release delivery system for the alpha-MSH analog melanotan-I using poloxamer 407. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, p. 915-919, 1996.

BONTORIM, G. Estudo de estabilidade de emulsão cosmética utilizando reologia e técnicas convencionais de análise. 2009. 74 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Faculdade de Química (Curitiba – Brasil).

BOBETSIS, Y.A.; BARROS, S.P; OFFENBACHER, S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 137, p. 7-13, 2006.

BONACUCINA, G.; SPINA, M.; MISICI-FALZI, M.; CESPI, M.; PUCCIARELLI, S.; ANGELETTI, M.; PALMIERI, G.F. Effect of hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin on the self-assembling and thermogelation properties of Poloxamer 407. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 32, p. 115-122, 2007.

BROWN, W.; SCHILLEN, K.; HVIDT, S. Triblock copolymers in aqueous solution studied by static and dynamic light scattering and oscillatory shear measurements: influence of relative block sizes. **J. Phys. Chem.**, v. 96, p. 6038-6044. 1992.

BRUSCHI, M.L.; FREITAS, O. Oral bioadhesive drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 31, p. 293-310, 2005.

BRUSCHI, M.L. Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal. 2006. 320 p. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Ribeirão Preto – Brasil).

CAFAGGI, S.; LEARDI, R.; PARODI, B.; CAVIGLIOLI, G.; RUSSO, E.; BIGNARDI, G. Preparation and evaluation of a chitosan salt–poloxamer 407 based matrix for buccal drug delivery. **J. Control. Release**, v. 102, p. 159-169, 2005.

CALIXTO, G.M.F. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do *Streptococcus mutans*. 2013. 105 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil).

CARVALHO, C.; CABRAL, C.T. Papel da *Porphyromonas gingivalis* na doença periodontal. **Rev. Port. Estomatol. Cir. Maxilofac.**, v. 48, n. 3, p. 167-171, 2007.

CARVALHO, F.C. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. 2009. 143 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil).

CARVALHO, F.C.; ROCHA E SILVA, H.; LUZ, G.M., BARBI, M.S.; LANDGRAF, D.S.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.V.; GREMIÃO, M.P.D. Rheological, Mechanical and Adhesive Properties of Surfactant-Containing Systems Designed as a Potential Platform for Topical Drug Delivery. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 8, p. 1–10, 2011.

CHALASANI, K.B.; RUSSELL-JONES, G.J.; YANDRAPU, S.K.; DIWAN, P.V.; JAIN, S.K. A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. **J. Control. Release**, v.117, p. 421-429, 2007.

CHORILLI, M. Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo. 2007. 172f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluído de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Quím. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.

CONCANNON, S.P.; CROWE, T.D.; ABERCROMBIE, J.J.; MOLINA, C.M.; HOU, P.; SUKUMARAN, D.K.; RAJ, P.A.; LEUNG, K.P. Susceptibility of oral bacteria to an antimicrobial decapeptide. **J. Med. Microb.**, v. 52, p. 1083-1093, 2003.

CRUSCA, E. JR.; REZENDE, A.A.; MARCHETTO R.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FONTES, W.; CASTRO, M.S.; CILLI, E.M. Influence of N-terminus modifications on

the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a. **Biopolymers.**, v. 96, p 41-48, 2011.

DAI, C.; WANG, B.; ZHAO, H. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. **Colloids. Surf. B. Biointerfaces.**, v. 41, p. 117-120, 2005.

DARVEAU, R.P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 481-490, 2010.

DESAI, S.D.; BLANCHARD, J. *In vitro* evaluation of pluronic F127- based controlled-release ocular delivery systems for pilocarpine. **J. Pharm. Sci.**, v. 87, p. 226-230, 1998.

DEVINE, D.A.; COSSEAU, C. Host defense peptides in the oral cavity. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 63, p.282, 2008.

DIAS, S.; FIGUEIRAS, A.; BARATA, P.; OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; VEIGA, F. A administração na mucosa bucal como uma estratégia alternativa à via oral. **Rev. Cienc. Saude.**, n. 4, p. 118-133, 2007.

DOGAN, B.; BUDUNELI, E.; EMINGIL, G.; ATILLA, G.; AKILLI, A.; ANTINHEIMO, J.; LAKIO, L.; ASIKAINEN, S. Characteristics of periodontal microflora in acute myocardial infarction. **J. Periodontol.**, n. 5, v. 76, p. 740-748, 2005.

DOMINGOS, L.F. Desenvolvimento de sistemas microestruturados a base de polihidroxicanoatos para a liberação periodontal do naproxeno. 2012. 140 p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós-graduação em Farmácia (Florianópolis – Brasil).

ESPOSITO, E.; CAROTTAB, V.; SCABBIAB, A.; TROMBELLIB, L.; D'ANTONAC, P.; MENEGATTIA, E.; NASTRUZZI, C. Comparative analysis of tetracycline-containing dental gels: poloxamer- and monoglyceride-based formulations. **Int. J. Pharm.**, v. 142, p. 9–23, 1996.

FARAJ, J.A.; DORATI, R.; SCHOUBBEN, A.; WORTHEN, D.; SELMIN, F.; CAPAN, Y.; LEUNG, K.; DELUCA, P.P. Development of a peptide-containing chewing gum as a sustained release antiplaque antimicrobial delivery system. **AAPS. Pharm. SciTech.**, v. 8, p. 1-9, 2007.

FERREIRA, M.S. Caracterização estrutural de sistemas formados por compostos siliconados: mesofases, microemulsões e nanoemulsões. 2011. 150 p. Tese de Doutorado – Instituto de Química da Unicamp (Campinas – Brasil).

FONTANA, C.R.; ABERNETHY, A.D.; SOM, S.; RUGGIERO, K.; DOUCETTE, S.; MARCANTONIO, R.C.; BOUSSIOS, C.I.; KENT, R.; GOODSON, J.M.; TANNER, A.C.R.; SOUKOS, N.S. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **J. Periodont. Res.**, v. 44, p. 751-759, 2009.

FORD, J.L.; MANN, T.E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Adv. Drug Deliv.**, v. 64, 422–430, 2012.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO V.H.V.; SANTILLI, C.V.; TABOSA DO EGITO, E.S.; OLIVEIRA, A.G. Relationship between structural features

and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids. Surf. B. Biointerfaces**, v. 60, p. 28–35, 2007.

GODBALLE, T.; NILSSON, L.L.; PETERSEN P.D.; JENSSEN, H. Antimicrobial  $\beta$ -peptides and  $\alpha$ -peptoids. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 77, p. 107–116, 2011.

GOOR, S-U.; ABDOLHOSSEINI, M. Antimicrobial peptides and periodontal disease. **J. Clin Periodontol.**, v. 38, p. 126-141, 2011.

GU, J.M.; ROBINSON, J.R.; LEUNG, S.H.S. Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: structure property relationships. In: **Critical Review Therapeutic Drug Carrier Systems**, p. 93-108, 1988.

HAUMSCHILD, M.S.; HAUMSCHILD, R.J. Clinical practice in long-term care: The importance of oral health in long-term care. **J. Am. Med. Dir. Assoc.**, v. 10, n. 9, p. 667-671, 2009.

HE, C.; KIM, S.W.; LEE, D.S. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. **J. Control. Rel.**, v. 127, p. 189–207, 2008.

HOJO, K.; NAGAOKA, S.; OHSHIMA, T.; MAEDA, N. Bacterial interections in dental biofilm development. **J. Dent. Res.**, v. 88, p. 982-990, 2009.

HOOGSTRAATE, J.A.J.; WERT, P.W. Drug delivery via the buccal mucosa. **Pharm. Sci. Technol. Today**, v. 1, n. 7, p. 309-316, 1998.

HONG, S.Y.; OH, J.E.; KWON, M.; CHOI, M.J.; LEE, J.H.; LEE, B.L.; MOON, H.M.; LEE, K.H. Identification and characterization of novel antimicrobial decapeptides generated by combinational chemistry. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 10, p. 2534-2541, 1998.

IZQUIERDO, S.S.; LACARRERE, I.G.M.; CARRIL, M.G.; HERNÁNDEZ, O.D.L. Diseño de una formulación de ciclosporina A solución oral con alto grado de dispersion. **Rev. Cubana de Farm.**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2013.

JASTI, B.; LI, X.; CLEARY, G. Recent advances in mucoadhesive drug delivery systems. **Bus. Briefing. Pharma. Tech.**, p. 194-196, 2003.

JACOB, T.D.T.L. Laser de diodo (810nm) na redução bacteriana periodontal em pacientes cardiovasculares (coronariopatas). 2006. 60 p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo (São Paulo - Brasil).

JAPONI, A.; JAMALIDOUST, M.; FARSHAD, S.; ZIYALYAN, M.; ALBORZI, A.; JAPONI, S.; RAFAATPOUR, N. Characterization of SCC mec types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Iran. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 64, p. 28-33, 2011.

JONES, D.S.; BRUSCHI, M.L.; FREITAS, O.; GREMIÃO, M.P.D.; LARA, E.H.G.; GAVIN, P.A. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and

carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **Int. J. Pharm.**, n. 372, p. 49–58, 2009.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; DJOKIC, J. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. **J. App. Pol. Sci.**, v. 61, p. 2229-2234, 1996.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F.; COULTER, W.A.; MCCLENLLAND, C.; IRWIN, C.R. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. **J. Control. Rel.**, v. 67, p. 357- 368, 2000.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Biochem.**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KANG, M.L.; CHO, C.S.; YOO, H.S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, p. 857–86, 2009.

KOLENBRANDER, P.E.; PALMER Jr, R.J.; RICKARD, A.H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N.I.; DIAZ, P.I. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontol. 2000**, v. 42, p. 47-79, 2006.

KUBIK, T.; BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M. Nanotechnology on duty in medical application. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 6, p. 17–33, 2005.

LALLA, E.; KAPLAN, S.; CHANG, S.J.; ROTH, G.A.; CELENTI, R.; HINCKLEY, K.; GREENBERG, E.; PAPAPANOU, P.N. Periodontal infection profiles in type 1 diabetes. **J. Clin. Periodontal.**, v. 33, p. 855-862, 2006.

LAHOUD, M.H.; CAMPOS, R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. **Visão Acadêmica**, v.11, n.1, p. 65-73, 2010.

LESTINI, B.J.; SAGNELLA, S.M.; XU, Z.; SHIVE, M.S.; RICHTER, N.J.; JAYASEHARAN, J.; CASE, A.J.; KOTTKE-MARCHANT, K.; ANDERSON, J.M.; MARCHANT, R.E. Surface modification of liposomes for selective cell targeting in cardiovascular drug delivery. **J. Control. Release**, v. 78, p. 235-247, 2002.

LESNIAKA, W.G.; JYOTI, A.; MISHRA, M.K.; LOUISSAINT, N.; ROMERO, R.; CHUGANI, D.C.; KANNAN, S.; KANNAN, R.M. Concurrent quantification of tryptophan and its major metabolites. **Anal. Biochem.**, n. 443, p. 222–231, 2013.

LEUNG, K.P.; CROWE, T.D.; ABERCROMBIE, J.J.; MOLINA, C.M.; BRADSHAW, C.J.; JENSEN, C.L.; LUO, Q.; THOMPSON, G.A. Control of oral biofilm formation by an antimicrobial decapeptide. **J. Dent. Res.**, v. 84, p. 1172-1177, 2005.

LEUNG, K.P.; ABERCROMBIE, J.J.; CAMPBELL, T.M.; GILMORE, K.D.; BELL, C.A.; FARAJ, J.A.; DELUCA, P.P. Antimicrobial peptides for plaque control. **J. Adv. Dent. Res.**, v. 21, p. 57–62, 2009.

LIMA, J.D.F. Obtenção de sílicas mesoporosas sba-15 e sba-16 com poros grandes. 2010. 35p. Trabalho de Graduação - Universidade Federal do Ceará - Departamento de Engenharia Química.

LIU, Y.; WANG, L.; ZHOU, X.; HU, S.; ZHANG, S.; WU, H. Effect of the antimicrobial decapeptide KSL on the growth of oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilm. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.37, p. 33-38, 2011.

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. **Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins**. Florida, CRC Press, USA. 1997. 278 p.

LOURO, P.M.; FIORI, H.H.; LOURO, P.; STEIBEL, J.; FIORI, R.M. Doença periodontal na gravidez e baixo peso ao nascer. **J. Pediatr.**, v. 77, n. 1, p. 23-28, 2001.

MACHADO, A.; LÍRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MAINARDES, R.M.; URBAN, M.C.C.; CINTO, P.O.; CHAUD, M.V.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Curr. Drug Deliv.**, v. 3, p. 275-285, 2006.

MANAIA, E.B. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO<sub>2</sub> para proteção solar e liberação controlada de terpinem-4-ol. 2012. 91 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil).

MARSH, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res.**, v. 38, p. 204-211, 2004.

MASH, P.D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v. 6, p. 1-7, 2006.

MEDLICOTT, N.J.; RATHBONE, M.J.; TUCKER, I.G.; HOLBORROW, D.W. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 13, p. 181-203, 1994.

MELO, C.S.; CUNHA, A.S.; FIALHO, S.L. Formas farmacêuticas poliméricas para administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 33, p. 469-477, 2012.

MIKSIK, I.; DEYL, Z. Application of pluronic copolymer liquid crystals for the capillary electrophoretic separation of collagen type I cyanogen bromide fragments. **J. Chromatogr. B.**, v. 739, p. 109–116, 2000.

MILLER, N.S.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON T.P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 57, p. 1666–1691, 2005.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Trop. J. Pharm. Res.**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MORIKAWA, K.; OKADA, F.; HOSOKAWA, M.; KOBAYASHI, H. Enhancement of therapeutic effects of recombinant interleukin 2 on a transplantable rat fibrosarcoma by the use of a sustained release vehicle, Pluronic gel. **Cancer Res.**, v. 47, p. 37–41, 1987.

MOURA, J.S.; SILVA, W.J.; PEREIRA, T.; CURY, A.A.D.B.; GARCIA, R.C.M.R. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. **J. Prosthet. Dent.**, v. 96, p. 205-211, 2006.

NORKIEWICZ, D.S.; BREAU LT L.G.; WONDERLICH, S.T.; MALONE K.H. The use of chemotherapeutic agents in localized periodontal pockets. **Mil. Med.**, v. 166, n. 11, p. 940-946, 2001.

NA, D.H.; FARAJ, J.; CAPAN, Y.; LEUNG, K.P.; DELUCA, P.P. Chewing gum of antimicrobial decapeptide (KSL) as a sustained antiplaque agent: Preformulation study. **J. Control. Release**, v. 107, p. 122-130, 2005.

NA, D.H.; FARAJ, J.; CAPAN, Y.; LEUNG, K.P.; DELUCA, P.P. Stability of antimicrobial decapeptide (KSL) and its analogues for delivery in the oral cavity. **Pharm. Res.**, v. 24, n. 8, p. 1544-1550, 2007.

NUNES, K.M. Desenvolvimento de sistemas precursores de fase cristalina para administração intrabolsa periodontal. 2012. 128 p. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Ribeirão Preto- Brasil).

PASSINI JÚNIOR, R.; NOMURA, M.L.; POLITANO, G.T. Doença periodontal e complicações obstétricas: há relação de risco?. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 29, n.7, p. 370-375, 2007.

PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. **SBCC**, p. 36 – 38, 2009.

PATEL, V.F.; LIU, F.; BROWN, M.B. Advances in oral transmucosal drug delivery. **J. Control. Release**, v. 153, p. 106–116, 2011.

PEROS, W.J.; GIBBONS, R.J. Influence of growth medium on adsorption of *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, and *Actinomyces naeslundii* to saliva-treated hydroxyapatite surfaces. **Infect. Immun.**, v. 32, p. 111-117, 1981.

PESTANA, K.C. Microemulsões biocompatíveis de anfotericina b para administração oral estudo estrutural, liberação *in vitro* e farmacocinética pré-clínica. 2009. 109 p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ciências Farmacêuticas (Araraquara – Brasil).

PETERSEN, P.E.; BOURGEOIS, D.; OGAWA, H.; DAY, S.E.; NDIAYE, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull. World Health Org.**, v. 83, n. 9, p. 661, 2005.

QUIRINO, M.R.S.; JARDIM, J.C.M; REZENDE, P.H.N.; BULHOES, R.C.; PALLOS, D. Doença Periodontal e diabetes mellitus: uma via de mão dupla. **RCM**, v. 18, p. 235-241, 2009.

RAO, M.A. **Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid food**. In: RAO, M.A.; STEFFE, J.F. Viscoelastic properties of foods. New York: Elsevier Applied Science, 1992. p. 207-231.

RIBEIRO, J.N.; JORGE, R.A.; SILVA, A.R.; FLORES, A.V.; RONCHI, L.M.; TEDESCO, A.C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Ecl. Quím.**, v. 32, p. 17-14, 2007.

RIZWAN, S.B.; BOYD, B.J.; RADES, T.; HOOK, S. Biocontinuous cubic liquid crystals as sustained delivery systems for peptides and proteins. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 7, p. 1133-1144, 2010.

ROCHA, L.A. Materiais meso-estruturados luminescentes. 2010. 161 p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química (Araraquara - Brasil); Université Paul Sabatier (França).

ROMANELLI, A.; MOGGIO, L.; MONTELLA, R.C.; CAMPIGLIA, P.; IANNACCONE, M.; CUPUANO, F.; PEDONE, C.; CAPPARELLI, R. Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. **J. Pept. Sci.**, v. 17, n. 5, p. 348-352, 2011.

RUIZ, C.M.R. Estudo da síntese convergente de peptídeos em fase sólida: Abordagem Clássica e uso de temperatura alta. 2003. 106 p. Dissertação de Mestrado -Universidade de São Paulo, Instituto de Química (São Paulo - Brasil).

SAVIC, S.; LUKIC, M.; JAKSIC, I.; REICHL, S.; TAMBURIC, S.; GOYMANN, C.M. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 358, n. 1, p. 182-191, 2011.

SCHIFFTER, H.A. The Delivery of Drugs – Peptides and Proteins. Oxford, **University of Oxford**, 2011.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria**. Fundamentos Teóricos e Práticos. São Paulo: Artiber, 2006.

SEMLALI, A.; LEUNG, K.P.; CURT, S.; ROUABHIA, M. Antimicrobial decapeptide KSL-W attenuates *Candida albicans* virulence by modulating its effects on Toll-like receptor, human  $\beta$ -defensin, and cytokine expression by engineered human oral mucosa. **Peptides**, v. 32, n. 5, p. 859-867, 2011.

SILVA, B.R.; FREITAS, V.A.A.; NETO, L.G.N.; CARNEIRO, V.A.; ARRUDA, F.V.S.; AGUIAR, A.S.W.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Antimicrobial peptide control of

pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature. **Peptides**, v.36, n. 2, p. 1-7, 2012.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAIEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 2, p. 134-44, 1998.

SOSKOLENE, W.A.; FREIDMAN, M.F. Intra-periodontal pocket drug delivery systems. In: RATHBONE, M.J. (Ed.) **Oral mucosal drug delivery**. New York: Marcel Dekker, v. 74, 1996. p. 359-379.

SOUTHARD, G.L.; GODOWSKI, K.C. Subgingival controlled release of antimicrobial agents in the treatment of periodontal disease. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 9, n. 4, p. 239-253, 1998.

SPAHR, A.; KLEIN, E.; KHUSEYINOVA, N.; BOECKH, C.; MUCHE, R.; KUNZE, M.; ROTHENBACHER, D.; PEZESHKI, G.; HOFFMEISTER, A.; KOENIG, W. Periodontal infections and coronary heart disease. **Arch, Med, Intern.**, v. 166, p. 554-559, 2006.

STEVENSON, C.L.; BENNETT, D.B.; LEGHUGA-BALLESTEROS, D. Pharmaceutical liquid crystals: The relevance of partially ordered systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 94, p. 1861-1880, 2005.

STEWART, J.M.; YOUNG, J.D. **Solid Phase Peptide Synthesis**. Pierce Chemical Company, Rockford, USA. 1984. f. 1-49.

TABARY, N.; CHAI, F.; BLANCHEMAIN, N.; NEUT, C.; PAUCHET, L.; BERTINI, S.; DELCOURT-DEBRUYNE, E.; HILDEBRAND, H.F.; MARTEL, B. A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 318-329, 2014.

THEIN, Z.M.; SMARANAYAKE, Y.H.; SMARANAYAKE, L.P. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. **APMIS**, v. 115, p. 1241-1251, 2007.

VEUILLEZ, F.; KALIA, Y.N.; JACQUES, Y.; DESHUSSE, J.; BURI, P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 51, p. 93-109, 2001.

WEI, G.; CAMPAGNA, A.N.; BOBEK, L.A. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, p. 1100-1109, 2006.

WILLIAMS, R.L.; SROUSSI, H.Y.; LEUNG, K.; MARUCHA, P.T. Antimicrobial decapeptide KSL-W enhances neutrophil chemotaxis and function. **Peptides**, v. 33, p. 1-8, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Oral health. WHO, 2012 (Ficha nº 318).

YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

YADAV, S.C.; KUMARI, A.; YADAV, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. **Peptides**, v. 32, p. 173-187, 2011.

YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. *In vitro* permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids. Surf. B. Biointerfaces**, v. 78, p. 185–192, 2010.

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** "Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados mucoadesivos contendo peptídeo KSL-w: ensaios antimicrobianos in vitro".

**Pesquisador:** Jéssica Bernegossi

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 19256013.1.0000.5426

**Instituição Proponente:** Faculdades de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 423.890

**Data da Relatoria:** 15/10/2013

**Apresentação do Projeto:**

O projeto é viável e esclarece a literatura pertinente na área correlata.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo da pesquisa foi escrito de maneira clara e esclarecedora.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são mínimos e foram pontuados no formulário e no TCLE.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é interessante podendo trazer ganho de conhecimento na área do projeto.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos foram alterados conforme solicitado.

**Recomendações:**

Nada a declarar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto em conformidade com as solicitações do colegiado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Rodovia Araraquara Jaú, Km 1

**Bairro:** Campus Universitário

**CEP:** 14.801-902

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** 1633-0168

**Fax:** 1633-2200

**E-mail:** sta@fcar.unesp.br; diretor@fcar.unesp.br

FACULDADES DE CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS DO  
CÂMPUS DE ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 423.890

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Vice-coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, aprovou ad-referendum as adequações efetuadas pela pesquisadora do projeto de pesquisa em questão.

O relatório final e os Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em JULHO de 2014.

ARARAQUARA, 14 de Outubro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Fernando Rogério Pavan**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rodovia Araraquara Jaú, Km 1

**Bairro:** Campus Universitário

**CEP:** 14.801-902

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** 1633-0168

**Fax:** 1633-2200

**E-mail:** sta@fcar.unesp.br; diretor@fcar.unesp.br