VALDIRENE ALVES DOS SANTOS

**Preparo e caracterização físico-química de filmes nanofibrílicos contendo
cloreto de cetilpiridíneo: futura alternativa aos antifúngicos para
o tratamento de infecções orais por *Candida***

São Paulo

2013

VALDIRENE ALVES DOS SANTOS

**Preparo e caracterização físico-química de filmes nanofibrílicos contendo
cloreto de cetilpiridíneo: futura alternativa aos antifúngicos para
o tratamento de infecções orais por *Candida***

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti

São Paulo

2013

Santos VA. Preparo e caracterização físico-química de filmes nanofibrílicos contendo cloreto de cetilpiridíneo: futura alternativa aos antifúngicos para tratamento de infecções orais por *Candida*. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Pelo seu amor incondicional, dedico este trabalho

Aos meus pais Marinete e Juraci,

Às minhas sobrinhas Nathaly e Geovanna,

Ao Marcelo,

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas pela oportunidade de trabalhar e desenvolver este estudo nas dependências de seus laboratórios.

Ao CNPq, CAPES e RUSP pelo apoio financeiro.

À FOUSP pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

A todos os docentes da Disciplina de Clínica Integrada que me acolheram quando entrei para cursar o doutorado.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti pela sua dedicação, paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya por continuar sendo meu eterno orientador.

À Profa. Dra. Maria Helena Ambrosio Zanin que, mesmo não sendo minha orientadora oficial, dedicou grande parte do seu tempo e conhecimento no desenvolvimento deste trabalho, muitas vezes me ensinando conhecimento básico sobre química.

Ao Prof. Dr. Adriano Marim de Oliveira por sua paciência, dedicação e ensinamentos.

À Dra. Natalia Neto Pereira Cerize por seus ensinamentos, paciência e dedicação.

Ao Dr. João Guilherme Rocha Poço que, com sua busca em desenvolver produtos odontológicos anti-tártaro, me levou para a pesquisa no laboratório do IPT.

Aos pesquisadores, funcionários, estagiários e bolsistas do Laboratório de Tecnologia de Processos e Partículas do IPT que me muito me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Sem eles, este trabalho não teria sido possível: Dr. Mario Gongorra, Tatiana, Didi, Natanael, Ariane, David, Juliana, Kleber, Henrique e Andrea.

À recém-graduada Patricia Aulestia Veronica Viera, que foi aluna de iniciação científica e realizou importante tarefa na execução da avaliação microbiológica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Atlas Nakamae e a doutoranda Tatiana Miyazima pela disponibilização do laboratório do Departamento de Prótese para realizar a avaliação microbiológica dese trabalho.

Ao Prof. Dr. Sandro de Almeida e à funcionária Sonia Buratto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por cederem gentilmente as cepas utilizadas neste estudo.

Às funcionárias do Departamento de Estomatologia Regina, Nina, Cecília, Marília e Márcia por todo apoio, companheirismo, amizade, preparação de cafezinho, pipoca, etc.

Aos meus colegas de pós-graduação pela amizade e convivência.

As bibliotecárias da FOUSP por toda paciência e dedicação na revisão bibliográfica.

“A dream you dream alone is only a dream. A dream you dream together is reality.”

John Lennon

“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade.”

“Prelúdio”
Raul Seixas

RESUMO

Santos VA. Preparo e caracterização físico-química de filmes nanofibrílicos contendo cloreto de cetilpiridíneo: futura alternativa aos antifúngicos para tratamento de infecções orais por *Candida* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão original.

O antisséptico cloreto de cetilpiridíneo (CCP) demonstrou ser eficaz como alternativa terapêutica aos antifúngicos em candidose oral, porém, apresenta baixa substantividade. Para aumentar sua biodisponibilidade surge a possibilidade de incorporá-lo num sistema de liberação lenta composto por filmes poliméricos nanofibrílicos. O objetivo deste estudo foi preparar filmes nanofibrílicos através de eletrofiação e incorporar CCP, fazer sua caracterização térmica e morfológica, além de análise microbiológica dos filmes contendo CCP frente a cepas de *Candida albicans*. O fármaco CCP foi adicionado a três soluções poliméricas, de álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP) e a de PVP/PM [Poli (metacrilato de metila-co-acrilato de etila-co-metacrilato de amônio)] em 5% de concentração. As soluções foram avaliadas quanto à condutividade, viscosidade e tensão superficial e, posteriormente, passaram pelo processo de eletrofiação para obtenção de filmes nanofibrílicos. Os filmes nanofibrílicos foram caracterizados através de análise morfológica (microscopia eletrônica de varredura - MEV), análise térmica (análise termogravimétrica - TGA e calorimetria exploratória diferencial - DSC) e análise química (espectro de infravermelho da transformada de Fourier - FTIR). A eficiência de encapsulação de CCP nas nanofibras, o perfil cinético de liberação das nanofibras e a permeação em mucosa suína (células de Franz) foram avaliados por espectrofotometria. Foi ainda avaliada a concentração de CCP a ser incorporada (de 0,05 a 5%) em nanofibra para que a fração liberada seja a mínima fungicida frente às cepas de *C. albicans* susceptíveis, pela técnica de disco-difusão, comparada ao miconazol 5% (MCZ). Nestas condições, a solução de PVA apresentou a maior condutividade, viscosidade e tensão superficial. CCP aumentou a condutividade.

Ambos, CCP e PM não alteram a tensão superficial do PVP. PM reduziu a viscosidade. A solução de PVP/PM formou o filme mais uniforme e com menos *beads*. Os termogramas (TGA/DSC) sugerem que o processo de eletrofiação diminuiu a cristalinidade de CCP. A eficiência de encapsulação de CCP alcança 99%. A taxa de liberação de CCP encapsulado foi lenta durante o período experimental de 24h. Quando em filme nanofibrílico, a atividade fungicida de CCP 2,5% e de MCZ 5% foi similar, mas somente MCZ foi fungistático. O filme nanofibrílico contrai em contato com o meio de cultura. Pode-se concluir que filmes nanofibrílicos de PVP/PM com CCP tem potencial para uso como alternativa para tratamento de infecções orais causadas por *Candida*.

Palavras-chave: Candidose oral. Tratamento. Nanotecnologia. Polímeros. Eletrofiação. Nanofibras. Sistema de liberação controlada. Cloreto de cetilpiridíneo. *Candida albicans*. Miconazol.

ABSTRACT

Santos VA. Preparation and physicochemical characterization of nanofibers containing cetylpyridinium chloride: future antifungal alternative for *Candida* oral infections treatment [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão original.

The aim of this study was to prepare electrospun nanofiber films cetylpyridinium chloride (CPC) incorporated test their potential use as antifungal therapy against *Candida albicans*. CPC was incorporated to three different polymeric solutions, one containing polyvinyl alcohol (PVA), the second containing polyvinylpyrrolidone (PVP) and the third prepared with PVP and poly (methyl methacrylate-co-ethyl acrylate-co-methacrylate ammonium) (PMMA). These polymeric solutions were evaluated as to conductivity, viscosity and surface tension, then subjected to a electrospinning process to obtain nanofiber films. The morphology and structure of nanofiber films were analyzed using scanning electron microscopy (SEM). The characterization of nanofiber films was performed by thermogravimetric analysis (TG) and differential scanning calorimetry (DSC). The encapsulation efficiency of the CPC nanofibers and the release kinetic profile of CPC and porcine mucosa permeation (Franz cells) were assessed by spectrophotometry. It was also assessed the concentration of CPC to be incorporated (from 0.05 to 5%) in nanofiber to be minimal fungicidal fraction released against strains of *C. albicans* by disk diffusion tests, compared to 5% miconazole (MCZ). Under these conditions, the PVA solution showed the highest conductivity, viscosity and surface tension. CPC increased conductivity. Both CPC and PMMA did not alter the surface tension of PVP. PMMA reduced viscosity. The solution of PVP/PMMA formed a more uniform film with less beads. Thermograms (TGA / DSC) suggested that the electrospinning process changes the crystallinity of CPC. The encapsulation efficiency reaches 99% of CPC. The release rate of encapsulated CPC was slow during the experimental period of 24 hours. In a nanofibrilic film, the fungicidal activity of CPC 2.5% and 5% MCZ was similar, but only MCZ proved fungistatic action. The nanofibrilic film shows contraction in contact

with the culture medium. It can be concluded that nanofibrilic films PVP/PMMA with CPC has potential for use as an alternative for the treatment of oral infections caused by *Candida*.

Keywords: Oral Candidosis. Treatment. Nanotechnology. Polymers. Electrospinning. Nanofibers. Drug delivery. Cetylpyridinium chloride. *Candida albicans*. Miconazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 5.1 - Análise comparativa da condutividade das soluções poliméricas de PVA, PVP e PVP/PM sem CCP e com CCP a 5%.....	78
Gráfico 5.2 - Análise comparativa da viscosidade das soluções poliméricas de PVA, PVP e PVP/PM sem CCP e com CCP a 5%.....	78
Gráfico 5.3 - Análise comparativa da tensão superficial das soluções poliméricas de PVA, PVP e PVP/PM sem CCP e com CCP a 5%.....	79
Gráfico 5.4 - Perfis de DSC: (a) CCP; (b) Polímero PM; (c) Polímero PVP; (d) Filme nanofibrílico PVP/PM sem CCP e (e) Filme nanofibrílico PVP/PM com CCP.....	85
Gráfico 5.5 - Perfis de FTIR de: (a) Cloreto de Cetilpiridíneo; (b) Polímero PM; (c) Polímero PVP; (d) Filme nanofibrílico PVP/PM sem CCP e (e) Filme nanofibrílico PVP/PM com CCP.....	86
Gráfico 5.6 - Cinética de liberação do fármaco CCP incorporado em filme nanofibrílico constituído de PVP:PM:CCP (10:10:1) durante período de 1440 min. (n=3).....	87
Gráfico 5.7 - Histograma representativo da média $\pm$ EP (erro padrão) dos valores de diâmetro final (mm) dos discos (após contração) e do diâmetro dos halos de inibição fungicida no teste de susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> aos fármacos conforme o grupo. CCP=Cloreto de Cetilpiridíneo; MCZ=Miconazol; nf=nanofibra	94
Gráfico 5.8 - Histograma das médias $\pm$ EP (erro padrão) dos valores do diâmetro (mm) dos halos de inibição no teste de susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> aos fármacos conforme o grupo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,0001$ (ANOVA). CCP=Cloreto de Cetilpiridíneo; MCZ=Miconazol; nf=nanofibra	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Foto ilustrativa, sem escala, da montagem das células de Franz para avaliação da liberação de CCP in vitro.....	61
Figura 4.2 - Ilustração esquemática do sistema de eletrofiação.....	64
Figura 4.3 - Foto ilustrativa do sistema de eletrofiação (Laboratório CTPP - IPT) ..	65
Figura 4.4 - Dissecção entre a mucosa e a camada muscular de esôfago de suíno	69
Figura 4.5 - Membrana biológica obtida de esôfago suíno após o preparo.....	70
Figura 4.6 - Esquema completo de aparato para estudo de permeação em células de Franz.....	71
Figura 4.7 - Reposição da solução receptora em célula de difusão de Fran	72
Figura 5.1 - Fotografia de filme nanofibrílico de PVP/PM com CCP a 5%	80
Figura 5.2 - Fibras de PVP/PM eletrofiadas com uma vazão de 1,7mL/h e tensão de 12,5KV. Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 5000x.....	81
Figura 5.3 - Fibras de PVP/PM eletrofiadas com uma vazão de 1,7mL/h e tensão de 12,5KV. Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 75000x.....	81
Figura 5.4 - Imagem das fibras de PVA (variáveis do processo de eletrofiação: vazão de 2,5mL/h e tensão de 11KV) obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 3500x	82
Figura 5.5 - Imagem das fibras de PVA (variáveis do processo de eletrofiação: vazão de 2,0mL/h e tensão de 22KV) obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 3500x	82

Figura 5.6 - Cristais de CCP. Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (magnitude 350 x)	82
Figura 5.7 - Fibras de PVP/PM contendo CCP a 5%. Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (magnitude 80000x).....	82
Figura 5.8 - Resultado de susceptibilidade através de teste de disco difusão em placa com Agar Mueller-Hinton inoculada com <i>C. albicans</i> : em A, disco com CCP 5% em nanofibra; em B, CCP em disco de papel-filtro; C, miconazol 5% em disco de nanofibra; D, disco de nanofibra sem fármaco; E, miconazol em disco de papel- filtro. Em A, medição com paquímetro	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Comparação de parâmetros das soluções poliméricas.....	77
Tabela 5.2 - Diâmetros dos discos de filme nanofibrílico sem fármaco.....	88
Tabela 5.3 - Resultados da avaliação de crescimento de micro-organismos em ágar BHI após teste de esterilização por raio Gama	89
Tabela 5.4 - Inibição produzida pelo CCP em discos nanofibrílicos.....	90
Tabela 5.5 - Halos de inibição produzidos por discos de papel-filtro contendo CCP 5%	91
Tabela 5.6 - Halos de inibição produzidos por discos de filme nanofibrílico contendo miconazol 5%.....	91
Tabela 5.7- Halos de inibição produzidos pelos discos de papel-filtro contendo miconazol 5%.....	92
Tabela 5.8 - Discos de filme nanofibrílico sem princípio ativo	93
Tabela 5.9 - Discos de papel-filtro sem princípio ativo	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{s/cm}$	micro-siemens por centímetro
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	American Type Culture Collection
<i>Candida spp.</i>	<i>Candida</i> espécies
CCP	cloreto de cetilpirídineo
CFM	concentração fungicida mínima
CHX	clorexidina
CIM	concentração inibitória mínima
DSC	calorimetria exploratória diferencial
EP	estomatite protética
FTIR	espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
h	hora
H-Df (Fo)	diferença halo fungistático- diâmetro fina
H-Df	diferença halo- diâmetro final
HIV	vírus da imunodeficiência humana
kGy	quilogray
KH_2PO_4	fosfato monopotássico
kV	quilovolt
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
mL	mililitro
Mm	milímetro
mPas	milipascal-segundo
Na_2HPO_4	fosfato dissódico
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
nM/m	milinewton por metro
PI	número do ensaio de projeto interno
PM amônio)	Poli (metacrilato de metila-co-acrilato de etila-co-metacrilato de amônio)

PVA	álcool polivinílico
PVP	polivinilpirrolidona
UV/VIS	espectroscopia ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus centígrados
°	graus
%	porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 INFECÇÕES ORAIS CAUSADAS POR <i>CANDIDA</i>	26
2.1.1 Etiologia	26
2.1.2 Fatores de virulência associados à <i>Candida</i>	27
2.1.2.1 Adesão às superfícies	27
2.1.2.2 Formação de hifas.....	27
2.1.2.3 Produção de enzimas.....	28
2.1.3 Fatores predisponentes para infecção por <i>Candida</i>	28
2.1.3.1 Uso de próteses	29
2.1.3.2 Terapêutica medicamentosa e radioterapia	29
2.1.3.3 Fatores nutricionais	29
2.1.3.4 Desordens metabólicas ou imunológicas	30
2.1.3.5 Doenças malignas	30
2.1.4 Classificação e características clínicas de infecções orais por <i>Candida</i>	30
2.1.4.1 Candidose pseudomembranosa.....	31
2.1.4.2 Candidose eritematosa.....	31
2.1.4.3 Candidose hiperplásica	32
2.1.4.4 Lesões associadas à <i>Candida</i>	32
2.1.4.4.1 <i>queilite angular</i>	32
2.1.4.4.2 <i>glossite rombóide mediana</i>	32
2.1.4.4.3 <i>estomatite protética</i>	32
2.1.5 Tratamento de infecções orais causadas por <i>Candida</i>	40
2.1.5.1 Antifúngicos.....	40
2.1.5.2 Agentes antissépticos e desinfetantes	41
2.1.6 Tratamento de Estomatite Protética (EP)	42
2.2 SISTEMA DE LIBERAÇÃO LENTA DE FÁRMACOS EM MUCOSA ORAL.....	43
2.2.1 Sistema de liberação controlada de medicamentos	43
2.2.2 Nanotecnologia	44

2.2.3 Nanoencapsulação de fármacos	45
2.2.3.1 Nanofibras	45
2.2.4 Processo de eletrofiação	46
2.2.4.1 Parâmetros para investigação	47
2.2.4.2 Aplicações biomédicas de nanofibras	48
2.2.4.3 Liberação de fármacos	49
2.3 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EM MUCOSA ORAL	50
2.3.1 Cavidade oral: recursos anatômicos e fisiológicos	50
2.3.2 Mecanismo de transporte de fármacos	51
2.3.3 Elaboração de formulação	51
2.3.3.1 Agentes mucoadesivos	52
2.3.3.2 Potencializadores de penetração	53
2.3.3.3 Inibidores enzimáticos	53
2.3.4 Tipos de formulações	53
2.3.5 Uso de antifúngico em sistema de liberação controlada	54
3 PROPOSIÇÃO	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 FASE I: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES NANOFIBRÍLICOS	57
4.1.1 Material	57
4.1.1.1 Preparo e caracterização das soluções poliméricas	57
4.1.1.1.2 equipamentos.....	57
4.1.1.1.3 reagentes	57
4.1.1.2 Sistema de eletrofiação	58
4.1.1.2.1 acessórios	58
4.1.1.3 Caracterização dos filmes nanofibrílicos	58
4.1.1.3.1 análise morfológica.....	58
4.1.1.3.2 análise térmica	59
4.1.1.3.3 análise química	59
4.1.1.4 Avaliação de eficiência de encapsulação de CCP	59
4.1.1.5 Avaliação da cinética de liberação de CCP nos filmes nanofibrílicos...	59
4.1.1.6. Estudo de permeação do fármaco CCP em mucosa suína.....	60
4.1.1.6.1 materiais.....	60
4.1.1.6.2 equipamentos.....	60

4.1.2 Métodos	61
4.1.2.1 Preparo das soluções poliméricas	61
4.1.2.2 Caracterização das soluções poliméricas	62
4.1.2.2.1 condutividade	62
4.1.2.2.2 viscosidade	63
4.1.2.2.3 tensão superficial	63
4.1.3 Montagem do sistema de eletrofição	64
4.1.4 Confecção dos filmes nanofibrílicos	64
4.1.5 Caracterização dos filmes nanofibrílicos	65
4.1.5.1 Análise morfológica	66
4.1.5.2 Análise térmica	66
4.1.5.3 Análise química	67
4.1.6 Avaliação da eficiência de encapsulação de CCP nos filmes nanofibrílicos	67
4.1.7 Obtenção dos perfis cinéticos de liberação de CCP nos filmes nanofibrílicos	68
4.1.8 Estudo de permeação do CCP em membrana biológica	69
4.1.8.1 Preparação da membrana biológica	69
4.1.8.2 Perfil de liberação do CCP em células de Franz	70
4.2 FASE II: ESTUDO MICROBIOLÓGICO DOS FILMES NANOFIBRÍLICOS	72
4.2.1 Material	72
4.2.2 Métodos	74
5 RESULTADOS	77
5.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS	77
5.2 PREPARO DOS FILMES NANOFIBRÍLICOS	78
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NANOFIBRÍLICOS	80
5.3.1 Análise Morfológica	80
5.3.2 Análise Térmica	84
5.3.3 Análise Química: Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	85
5.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE CCP NOS FILMES NANOFIBRÍLICOS	86
5.5 ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DAS NANOFIBRAS COM O PRINCÍPIO ATIVO CCP	86

5.6 ESTUDO DE PERMEAÇÃO DE CCP EM MEMBRANA BIOLÓGICA OBTIDA DE SUÍNOS	87
5.7 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO PARA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A CEPAS DE <i>C. ALBICANS</i>	88
5.7.1 Diâmetro dos discos de filmes nanofibrílicos	88
5.7.2 Avaliação da esterilização dos filmes nanofibrílicos	89
5.7.3 Resultado de teste de disco difusão para cada grupo	89
5.7.3.1 Susceptibilidade de <i>C. albicans</i> frente ao CCP contido em discos nanofibrílicos	89
5.7.3.2 Susceptibilidade de <i>C. albicans</i> frente ao CCP contido em disco de papel-filtro	90
5.7.3.3 Susceptibilidade de <i>C. albicans</i> frente ao miconazol contido em discos nanofibrílicos	91
5.7.3.4 Susceptibilidade de <i>C. albicans</i> frente ao miconazol contido em disco de papel-filtro	92
5.7.3.5 Susceptibilidade de <i>C. albicans</i> frente aos discos nanofibrílicos sem princípio ativo	93
5.7.3.6 Susceptibilidade de <i>C. albicans</i> frente aos discos de papel-filtro sem princípio ativo	93
5.8 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE	94
6 DISCUSSÃO	97
7 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE	117
ANEXOS	121

1 INTRODUÇÃO

A frequência de infecções fúngicas em mucosas tem aumentado ao redor do mundo. Segundo alguns autores isso pode estar acontecendo em virtude do advento da pandemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da AIDS (Lakshman et al., 2009; Scully et al., 1994), além de mudanças ocorridas na prática médica, com o aumento de procedimentos invasivos e a ampla utilização de terapias imunossupressoras e de antibióticos de largo espectro (Williams; Lewis, 2011).

Candida albicans é um organismo comensal que pode ser isolada a partir do trato gastrointestinal, e na mucosa oral e vaginal de até 80% dos indivíduos saudáveis. Normalmente não é um problema, no entanto, pode causar infecções sintomáticas das membranas mucosas (Kim; Sudberry, 2011). Uma alteração para um estado patogénico de *Candida* pode ocorrer após a alteração do ambiente da cavidade oral (Williams; Lewis, 2011). A manifestação clínica da infecção por *Candida* na boca pode variar desde candidose pseudomembranosa aguda a candidose atrófica crônica (Rautemaa; Ramage, 2011), incluindo a infecção oral mais prevalente envolvendo *Candida*: estomatite protética (Williams; Lewis, 2011). Estomatite protética (EP) é um termo utilizado para descrever a reação inflamatória que ocorre em mucosa oral sob próteses dentárias removíveis, geralmente associada à presença de *Candida spp.* (Jainkittivong et al., 2010).

Uma variedade de agentes antifúngicos tópicos e sistêmicos está disponível para o tratamento de infecções orais causadas por *Candida*. Para candidose oral superficial e sem complicação, geralmente utilizam-se antifúngicos tópicos, que podem ser administrados em suspensão ou sob a forma de gel oral (Rex et al., 2000; Sritairat et al., 2011). A falta de adesão do paciente ao esquema posológico medicamentoso adequado e o uso prolongado destes fármacos pode causar resistência fúngica (Odds, 1988; Wilson, 1998; Niimi et al., 2010).

Enxaguatórios bucais à base de antissépticos, como a clorexidina, o cloreto de cetilpiridíneo (CCP), triclosan, entre outros têm sido estudados como alternativa aos antifúngicos tópicos tradicionais (Giuliana et al., 1997; Pizzo et al., 2001; Santos, 2002). Os agentes antissépticos são eficientes no tratamento tópico de candidose oral e são preferidos por apresentar menor possibilidade de interação com outras drogas e, principalmente, resistência fúngica.

Entretanto, a grande causa de falha no tratamento com antissépticos ocorre devido ao pouco tempo de permanência destes agentes tópicos na boca (baixa substantividade) (Powderly et al., 1999), e por isso necessitam ser aplicados várias vezes ao dia, resultando em baixa adesão do paciente ao tratamento (Samaranayake; Holmstrup, 1989).

O CCP apresenta comprovada ação antifúngica *in vitro* e *in vivo*, com vantagens sobre o triclosan e a clorexidina como sabor mais agradável e por não manchar dentes e língua (Giuliana et al., 1999; Hamers et al., 1996; Santos, 2002). Representa uma alternativa terapêutica aos antifúngicos de administração tópica, e apresenta vantagens como a facilidade de uso, o custo mais baixo, além de evitar o desenvolvimento de resistência microbiana a antifúngicos. No entanto, o tempo de ação do princípio ativo contido nesse enxaguatório bucal é muito pequeno, revelando a necessidade de realização de vários bochechos para que se atinja o efeito terapêutico desejado, o que dificulta a adesão do paciente ao tratamento.

A fim de aumentar a biodisponibilidade do CCP em contato com a mucosa bucal, surgiu a possibilidade de desenvolver uma formulação baseada num sistema de liberação lenta onde o princípio ativo (CCP) incorporado em nanofibras poliméricas, pudesse ser liberado na mucosa bucal lentamente. Esta formulação representaria alternativa ao tratamento de pacientes com infecções orais causadas por *Candida*, pois através da liberação lenta, a frequência de aplicação da formulação na mucosa oral seria diminuída e adesão do paciente ao tratamento seria maior.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. INFECÇÕES ORAIS CAUSADAS POR *CANDIDA*

A frequência de infecções fúngicas em mucosas tem aumentado ao redor do mundo. Segundo alguns autores isso pode estar acontecendo em virtude do advento da pandemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da AIDS (Scully et al., 1994; Lakshman et al., 2009), além de mudanças ocorridas na prática médica, com o aumento de procedimentos invasivos e a ampla utilização de terapias imunossupressoras e de antibióticos de largo espectro (Williams; Lewis, 2011).

As altas taxas globais de incidência e prevalência de candidose oral são resultado da multiplicidade de fatores predisponentes que facilitam a transformação de *Candida* comensal inofensiva para estado patogênico (Lakshman et al., 2009).

Infecções causadas por *Candida* são frequentemente superficiais e ocorrem em superfícies mucosas úmidas de indivíduos que sofrem com alguma debilitação imunológica ou doença sistêmica. Em pacientes severamente imunocomprometidos, pode ocorrer infecção sistêmica por *Candida*, associada à alta taxa de mortalidade. Pacientes de unidades de terapia intensiva com infecção sistêmica por *Candida* apresentam uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30-50% (Williams; Lewis, 2011).

Candida albicans é a espécie mais frequentemente isolada da cavidade oral de humanos e ocorre em até 80% dos indivíduos saudáveis. Em infecções orais, *C. albicans* ocorre em 50% dos casos (Williams; Lewis, 2011).

2.1.1 Etiologia

Candida albicans é a principal espécie associada às candidoses orais, além de ser a espécie mais virulenta dentre *Candida spp.* (Lakshman et al., 2009). No entanto, outras espécies de *Candida spp.* como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* também são patogênicas aos humanos

(Lakshman et al., 2009). Vários são os fatores de virulência associados a *Candida* que contribuem para a sua patogenicidade em candidoses orais, incluem adesão às superfícies do hospedeiro, transformação morfológica (habilidade de formar hifas) e produção de enzimas extracelulares (Rautemaa; Ramage, 2011).

2.1.2 Fatores de virulência associados à *Candida*

2.1.2.1 Adesão às superfícies

Há relação entre a aderência de *C. albicans* à superfícies com sua habilidade de colonizar e causar doenças (Odds, 1998). Um importante aspecto da patogenicidade de *C. albicans* está relacionado à sua afinidade inespecífica e ligações à superfície de resinas acrílicas e outros plásticos. O mecanismo de ligação envolve a interação de componentes da membrana celular de organismos de *Candida* com alvos da superfície (Scully et al., 1994). Inicialmente a aderência de *Candida* a células epiteliais humanas é fraca e reversível, envolvendo interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas, mas podem tornar-se mais fortes quando ocorrem ligações específicas entre *Candida* e receptores nos tecidos do hospedeiro, resultando em ligações covalentes (Williams; Lewis, 2011).

2.1.2.2 Formação de hifas

A habilidade dos organismos de *Candida* para formar hifas implica em maior patogenicidade. Em forma de hifas, os organismos de *Candida* são mais resistentes ao processo de fagocitose quando comparados às células leveduriformes, apresentam maior capacidade de aderência às superfícies do hospedeiro e maior habilidade em invadir os tecidos do hospedeiro resultando em danos ao tecido (Williams; Lewis, 2011).

2.1.2.3 Produção de enzimas

Organismos de *Candida* têm habilidade de produzir enzimas extracelulares que podem levar a danos locais em estruturas do hospedeiro. Dentre estas, estão as fosfolipases e proteinases, que facilitam a penetração de *Candida* em membranas mucosas (Arendorf; Walker, 1979; Scully et al., 1994).

Proteinases produzidas por *C. albicans* possuem atividade queratolítica que tanto facilita a penetração inicial em células queratinizadas quanto fornece valiosa fonte de nitrogênio durante a colonização (Williams; Lewis, 2011). Em termos de virulência, a atividade das proteinases induz danos às células do hospedeiro, facilita a formação de hifas para invasão tecidual, aumenta a aderência de *Candida* por exposição dos receptores e degrada imunoglobulinas e outras proteínas de defesa (Williams; Lewis, 2011).

Outro grupo de enzimas proteolíticas produzidas por *Candida* são as fosfolipases. Sua atividade degrada a membrana de células do hospedeiro, causando lise e morte celular. Este processo facilita a aderência de *Candida* aos receptores e sua penetração em tecidos danificados (Williams; Lewis, 2011).

Organismos de *Candida* produzem lipase e esterase extracelular que estão ambas envolvidas em lise celular, além do efeito citotóxico apresentado pela lipase (Williams; Lewis, 2011).

Hemolisinas são substâncias que lisam células vermelhas do sangue e sua produção por *Candida* é considerada importante atributo em promover sua sobrevivência no hospedeiro por sua habilidade em sequestrar ferro (Williams; Lewis, 2011).

2.1.3 Fatores predisponentes para infecção por *Candida*

São vários os fatores predisponentes para infecção por *Candida*, a seguir.

2.1.3.1 Uso de próteses

O uso de próteses removíveis exerce papel importante na promoção do desenvolvimento de infecções orais por *Candida*, principalmente nos casos de estomatite protética (Gendreau; Loewy, 2011). A habilidade dos organismos de *Candida* para colonizar os materiais das próteses e formar biofilme contribui para o desenvolvimento da doença. O biofilme formado adere à superfície da prótese e funciona como reservatório para continua exposição aos micro-organismos contidos neles (Gendreau; Loewy, 2011). Além disso, pacientes usuários de próteses totais apresentam maior contagem de células fúngicas na saliva do que pacientes dentados (Parvinen, 1984; Scully et al., 2011) e há aumento de dez vezes na contagem de fungos em placa bacteriana obtida de próteses de pacientes com estomatite protética quando comparados a pacientes saudáveis (Budtz-Jorgensen, 1990; Scully et al., 2011).

2.1.3.2 Terapêutica medicamentosa e radioterapia

Antibioticoterapia de largo espectro predispõe a alterações na microbiota oral, assim como o uso de corticosteróides tópicos, sistêmicos ou em aerosol. Redução de fluxo salivar causado por uso de medicações, doenças sistêmicas (Síndrome de Sjogren), ou após radioterapia também pode causar mudanças na microbiota oral e candidose (Scully et al., 2011).

2.1.3.3 Fatores nutricionais

Vários fatores nutricionais como deficiência de ferro, ácido fólico, vitaminas e dietas ricas em carboidratos podem influenciar na patogenicidade de infecções orais por *Candida*.

Deficiências no ferro podem afetar fatores de defesa locais como a atividade de lisosima e lactoferrina, além de interferir na cinética de divisão celular epitelial (Scully et al., 2011).

Dietas ricas em carboidratos causam produção de ácidos e diminuição de pH o que pode potencializar a virulência de *Candida* melhorando seu crescimento, multiplicação e aderência aos tecidos do hospedeiro (Scully et al., 2011).

2.1.3.4 Desordens metabólicas ou imunológicas

Estudos demonstram que espécies de *Candida* são mais prevalentes na cavidade oral de pacientes diabéticos do que em pacientes não diabéticos. Infecções fúngicas são mais frequentes em pacientes com vírus HIV e com outras imunodeficiências secundárias (Scully et al., 2011).

2.1.3.5 Doenças malignas

Os mecanismos de defesa do hospedeiro são prejudicados por processos malignos e pela quimioterapia, que por sua vez podem levar a várias desordens e disfunção de polimorfonucleares e fagócitos mononucleares e levar a candidose oral (Scully et al., 2011).

2.1.4 Classificação e características clínicas de infecções orais por *Candida*

Candidose oral não é uma infecção simples e de uma forma geral, são descritos três tipos primários baseados em características clínicas: candidose pseudomembranosa, candidose eritematosa e candidose hiperplásica, além de um número variado de outras lesões aqui descritas como lesões associadas a *Candida*,

pois sua etiologia inclui a presença de fungos dentre outros fatores associados (Lakshman et al., 2009).

2.1.4.1 Candidose pseudomembranosa

Candidose pseudomembranosa ou “sapinho” é classicamente uma infecção aguda, mas pode persistir por meses ou até mesmo anos em pacientes sob corticoterapia tópica ou por aerosol, em infectados por HIV e outros tipos de imunossupressão. Afeta 5% dos recém-nascidos e 10% de idosos debilitados, principalmente aqueles que estão em estado terminal ou com sérios comprometimentos como leucemia ou outras doenças malignas (Lakshman et al., 2009).

É caracterizada por manchas brancas na superfície oral e mucosa labial, língua e palato mole. As lesões podem confluir formando placas que lembram coalhada e, quando removidas por raspagem com gaze, revelam base erosiva e eritematosa. As placas brancas consistem num emaranhado de hifas, blastóporos, bactérias, células inflamatórias, fibrina e células epiteliais descamadas. Os sintomas incluem queimação, sensibilidade e disfagia (Lakshman et al., 2009).

Em casos crônicos de candidose pseudomembranosa, a infecção pode progredir e envolver a orofaringe e causar dificuldades na deglutição e dores no peito (Williams; Lewis, 2011).

2.1.4.2 Candidose eritematosa

Candidose eritematosa está associada com corticosteróides, antibióticos de largo espectro e infecção por HIV. Pode surgir como consequência de uma persistente candidose pseudomembranosa aguda quando a pseudomembrana é removida e pode se formar de novo, ou em casos onde a infecção por HIV precede a candidose pseudomembranosa. Esta é a variante mais encontrada em pacientes com infecção por HIV.

Clinicamente, candidose eritematosa aparece como uma mancha vermelha geralmente na parte posterior do dorso da língua, palato ou mucosa bucal. Lesões no dorso da língua aparecem em áreas despapiladas. Lesões eritematosas no palato são comuns especialmente em pacientes com infecção por HIV. É usualmente assintomática e permanece despercebida se o clínico não avisar durante o exame clínico das mucosas (Lakshman et al., 2009).

2.1.4.3 Candidose hiperplásica

Candidose hiperplásica ou leucoplasia por *Candida* é a menos comum das três maiores variações clínicas de candidose. Manifesta-se como lesões crônicas com relevo discreto que podem variar desde pequenas e palpáveis até áreas esbranquiçadas com placas densas e opacas de superfícies duras e rugosas. Estas lesões podem ser homogêneas ou salpicadas. Ao contrário das lesões de candidose pseudomembranosa, as lesões de candidose hiperplásica não podem ser removidas por raspagem. Geralmente ocorrem em mucosa jugal uni ou bilateralmente e menos frequentemente em bordo lateral de língua. Histologicamente é caracterizada por hifas de *Candida* dentro de um epitélio hiperplásico acompanhado de infiltrado inflamatório (Williams; Lewis, 2011; Lakshman et al., 2009).

2.1.4.4 Lesões associadas à *Candida*

Em adição às três maiores variantes de candidose oral há um número de lesões associadas à *Candida* nas quais os fungos não são o único agente etiológico, dentre elas está estomatite protética (EP) que apresenta maior prevalência dentre as candidoses orais crônicas (Williams; Lewis, 2011).

2.1.4.4.1 *queilite angular*

Queilite angular é caracterizada pela presença de ulceração, eritema e fissuras nas comissuras labiais e está comumente associada a estomatite protética. Fungos e bactérias estão envolvidos e interagindo com os fatores predisponentes. Os fatores predisponentes são anemia ferropriva ou deficiência de vitaminas como vitamina B12. As lesões são resultado de maceração causada por profundas dobras na pele nos ângulos da boca em indivíduos com dimensão vertical diminuída em função da idade ou do uso de próteses mal-adaptadas. No entanto, pode ser vista em pacientes jovens com infecção por HIV ou imunodeprimidos (Lakshman et al., 2009).

2.1.4.4.2 *glossite romboide mediana*

Glossite romboide mediana é caracterizada por uma área de atrofia papilar de formato elíptico ou rombóide, simetricamente localizado no centro do dorso da língua, anterior a papilar circunvalada. Ocasionalmente pode apresentar-se como lesão exofítica, hiperplásica ou mesmo lobulada. A relevância de *Candida* na etiologia da glossite rombóide mediana é controversa porque uma flora mista de fungos e bactérias está associada a condição (Lakshman et al., 2009).

2.1.4.4.3 *estomatite protética*

A forma mais prevalente de infecção envolvendo *Candida* é chamada de estomatite protética (Williams; Lewis, 2011).

Estomatite protética (EP) é um termo utilizado atualmente para caracterizar a reação inflamatória que ocorre nas mucosas subjacentes às próteses de usuários de próteses removíveis. Segundo Nikawa et al. (1998), em 1885 Black referiu-se a presença de EP como “boca dolorida sob placas”, desde então vários termos foram

utilizados para definir a condição: palatite crônica por próteses, candidose relacionada a próteses, estomatite induzida por próteses, boca dolorida por próteses. Esta doença é recorrente e de etiologia multifatorial, frequentemente associada à presença aumentada de fungos da espécie *Candida* na placa bacteriana que adere às bases das próteses, onde *Candida albicans* é mais frequentemente isolada (Nikawa et al., 1998; Webb et al., 1998; Silva et al., 2012).

a) Características clínicas

EP caracteriza-se por quadro clínico inflamatório que se expressa desde discreto eritema na área central do palato duro até lesões eritematosas extensas com projeções papilomatosas, podendo ocupar todo o palato duro e rebordo alveolar das áreas cobertas pelas próteses. A sintomatologia é incomum. Quando ocorre traduz-se por sensação de queimação, ardência e, raramente, disfagia (Newton, 1962; Budtz-Jørgensen, 1981; Budtz-Jørgensen, 1990; Jainkittivong et al., 2010; Gendreau; Loewy, 2011).

Clinicamente, EP pode apresentar diferentes graus de expressão, considerando-se a intensidade do eritema, a distribuição em pontos ou áreas, a presença de sintomatologia e a associação a processos hiperplásicos (Newton, 1962; Gendreau; Loewy, 2011). De acordo com Newton (1962), três estágios distintos podem ser reconhecidos. Denominou de tipo I, a inflamação localizada limitada às saídas dos ductos das glândulas salivares palatinas, assemelhando-se a hiperemia “pin point”, que seriam lesões puntiformes. No tipo II, o eritema generalizado envolve completamente a área sob a prótese. Já, no tipo III, o eritema associa-se a hiperplasia papilomatosa envolvendo todo o palato duro.

b) Epidemiologia

Diversos estudos sugerem que acima de dois terços dos indivíduos que usam próteses completas removíveis podem apresentar essa condição (Nikawa et

al., 1998; Webb et al., 1998a; Jainkittivong et al., 2010; Salerno et al., 2011; Silva et al., 2012). Diagnosticada com maior frequência em mulheres do que em homens e de incidência maior em idosos (Gendreau; Loewy, 2011). Usuários contínuos de próteses totais apresentam alta incidência de EP (Schou et al., 1987; Budtz-Jørgensen; Lombardi, 2000; Gendreau; Loewy, 2011), assim como fumantes (Arendorf; Walker, 1980; MacEntee et al., 1998). Geralmente a EP é encontrada sob próteses totais superiores e, poucas vezes, sob as inferiores (Jainkittivong et al., 2010; Gendreau; Loewy, 2011).

c) Etiologia

Embora esteja associada ao uso de próteses totais, a EP tem etiologia multifatorial e ainda não totalmente compreendida. Há vários fatores relacionados à condição, incluindo-se trauma da mucosa causado por próteses mal adaptadas, higienização inadequada e uso contínuo das próteses, idade do usuário e idade das próteses, hipersensibilidade aos materiais utilizados na confecção das próteses ou aos condicionadores teciduais e adesivos utilizados nas mesmas, além de infecção fúngica por *Candida* (Budtz-Jørgensen, 1974; Arendorf; Walker, 1979; Jeganathan et al., 1997; Emami et al., 2008; Gendreau; Loewy, 2011).

Além destes fatores, há outras condições locais predisponentes, tais como diminuição do fluxo salivar; hábito de fumar; presença de mucosa oral atrófica; presença de doenças da mucosa (líquen plano oral); uso de corticosteróides tópicos e diminuição de suprimento sanguíneo (como no caso de radioterapia). Quanto às condições sistêmicas predisponentes, incluem-se presença de diabetes; imunodeficiência primária ou secundária, o uso de medicação imunossupressora, subnutrição e idade avançada do usuário de próteses (Arendorf; Walker, 1980; Budtz-Jørgensen, 1990; Dorocka-Bobkowska et al., 1998; Jainkittivong et al., 2010; Gendreau; Loewy, 2011; Rautema; Ramage, 2011; López-Pintor et al., 2013). No entanto, nenhum dos fatores etiológicos citados apresenta uma relação clara de causa e efeito. Diversos estudos concordam que a etiologia de EP é multifatorial geralmente em resposta a uma infecção por *Candida*, primariamente causada por *C. albicans* (Gendreau; Loewy, 2011; Salerno et al., 2011; Webb et al., 1998a).

d) Traumas causados pelo uso de próteses

Desequilíbrios locais causados por traumas à mucosa oral devido ao uso contínuo de próteses e/ou uso de próteses mal adaptadas já foram relacionados como fatores de alto risco para o desenvolvimento de EP (Budtz-Jorgensen, 1981; Emami et al., 2008; Gendreau; Loewy, 2011). Mas foi observado que o uso contínuo das próteses contribui mais para a ocorrência de EP do que a qualidade das mesmas (Arendorf, Walker, 1980; MacEntee et al., 1998).

Além disso, a pressão negativa que se desenvolve sob próteses totais bem adaptadas também tem sido citada como uma possível causa de trauma resultando em hiperplasia papilomatosa, geralmente associada à EP (Ettinger, 1975; Emami et al., 2008). Observou-se que melhorar a estabilidade das próteses parece reduzir o risco para EP (Gendreau; Loewy, 2011).

e) Higienização das próteses

Numerosos estudos demonstram claramente a associação entre higienização precária das próteses e aumento da prevalência de EP (Budtz-Jorgensen, 1981; Kulak et al., 1997; Jeganathan et al., 1997; Schou et al., 1987; Gendreau; Loewy, 2011). Falta de cuidados adequados e falta de manutenção de higiene das próteses leva a um rápido estabelecimento de biofilme e acúmulo de placa bacteriana (Gendreau; Loewy, 2011).

Para que ocorra a formação de placa bacteriana na superfície de próteses, inicialmente há adsorção de proteínas salivares na superfície da resina, então ocorre adesão bacteriana a essa película adquirida, formando o biofilme. Estes fatores parecem ser mais importantes que a retenção mecânica da prótese para a colonização por micro-organismos da superfície das próteses e da mucosa subjacente (Monsenego, 2000).

A higienização adequada das próteses deve ser feita com o uso de soluções comerciais desinfetantes ou o uso de solução de hipoclorito de sódio diluído como

parte da rotina diária de manutenção. O fato de não removê-las durante a noite associado à higienização inadequada também aumenta o risco para desenvolvimento de EP. O uso constante de próteses associado à má higienização, mantém condições anaeróbias e de baixo pH entre a base da prótese e a mucosa subjacente, o que pode promover o crescimento de fungos comensais como *Candida*. Desde que haja meios para a colonização das próteses por cepas de *Candida*, a correlação entre falta de higiene e propensão para infecção por *Candida* é clara. Placa bacteriana que se forma na base da prótese também é considerada como um fator traumático (Salerno et al., 2011).

Enquanto a higienização precária das próteses aumenta o risco para desenvolvimento de EP, a manutenção rigorosa de higiene tem se mostrado eficaz na prevenção da recorrência (Salerno et al., 2011).

f) *Candida albicans*

Candida spp. são micro-organismos comumente encontrados na cavidade bucal, que fazem parte da microbiota em cerca de 40% da população e, em condições de normalidade, não oferecem risco à saúde bucal do hospedeiro (Odds, 1998). São patógenos oportunistas e só causam problemas ao hospedeiro se alguma alteração da homeostasia estiver presente (Jainkittivong et al., 2010; Farah et al., 2010; Gendreau; Loewy, 2011).

Um dos efeitos patogênicos de *C. albicans* relaciona-se à produção de enzimas proteolíticas que induzem à perda de continuidade da superfície epitelial, proporcionando o aspecto eritematoso do quadro clínico (Budtz-Jørgensen, 1974). Uma razão possível para a proliferação de fungos é a mudança que ocorre no microambiente sob a prótese. Esta alteração da homeostasia induz alterações como o aumento da permeabilidade vascular pela inflamação da mucosa, que eleva a quantidade de soro (exsudato) disponível, levando os organismos de *Candida* a produzir hifas em sua presença (Budtz-Jørgensen, 1974; Richardson; Smith, 1981).

A hipersensibilidade à *Candida* também pode aumentar a permeabilidade vascular, não somente pela alteração da homeostasia (Budtz-Jørgensen, 1974).

Além disso, *C. albicans* apresenta capacidade de formar biofilme a partir de células-livres, chamadas células planctônicas, em superfícies sólidas e inertes (Ramage et al., 2004; Kim; Sudberry, 2011; Rautemaa; Ramage, 2011). Biofilmes estão fortemente associados a infecções relacionadas à biomateriais, incluindo próteses bucais. A formação de biofilme ocorre quando células fúngicas aderem à superfície sólida das próteses, sofrem mudanças morfogênicas e secretam uma matriz extracelular que vai envolver várias camadas de células de diferentes morfologias e protegê-las das defesas do hospedeiro (Kim; Sudberry, 2011). Biofilmes são responsáveis pelo aumento da resistência das células fúngicas aos antifúngicos, uma das principais razões pela qual as doenças associadas a biofilmes, como EP, são refratárias a terapêutica antifúngica convencional (Ramage et al., 2001; Kim; Sudberry, 2011; Rautemaa; Ramage, 2011).

C. albicans podem apresentar-se tanto em forma de micélio como de hifas, sendo que a presença de hifas determina maior patogenicidade, uma vez que, nesta forma, *C. albicans* apresentam maior poder de aderência em fissuras e rugosidades das superfícies das próteses, bem como maior invasividade em mucosa oral (Webb et al., 1998b; Ramage et al., 2004; Gendreau; Loewy, 2011). A identificação de micélio em exame microscópico direto do material colhido da mucosa e da superfície da prótese, leva ao diagnóstico na maioria dos casos de EP (Budtz-Jørgensen, 1974; Kulak et al., 1997).

Em indivíduos portadores de EP são isoladas mais frequentemente *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (Budtz-Jørgensen et al., 1975), e destas, *C. albicans* é a levedura mais comumente encontrada e considerada por alguns autores como patogênica à condição (Arendorf; Walker, 1979; Webb et al., 1998b).

g) Uso de próteses

As próteses contribuem significativamente para o desenvolvimento de EP (Gendreau; Loewy, 2011), no entanto, não constituem sua única causa, ou todos os usuários de próteses desenvolveriam a condição (Mikkonen et al., 1984).

O estudo de Santarpia III et al. (1990) demonstrou correlação positiva entre áreas com sinais clínicos de candidose e áreas mais contaminadas por *Candida* na prótese. Foram feitas réplicas da área chapeável da prótese utilizando ágar seletivo para cultura de *C. albicans*, e concluiu-se que a inflamação é diretamente proporcional ao número de colônias de *Candida*.

Com a superfície colonizada por *C. albicans*, a prótese pode servir como reservatório para infecções locais como EP ou, disseminadas, como pneumonia por aspiração destes micro-organismos e infecções gastrintestinais (Cannon et al., 1995; Nikawa et al., 1998; Williams, 2011).

Estudo realizado por Ramage et al. (2004) demonstrou que biofilmes de *Candida* podem aderir a imperfeições e fissuras nas superfícies das próteses. Bactérias e fungos têm habilidade de colonizar as superfícies das próteses e formar um biofilme que, aderido à superfície da prótese, funciona como um depósito de placa que atua como reservatório para a contínua exposição da mucosa subjacente aos micro-organismos presentes neste biofilme (Gendreau; Loewy, 2011). Além disso, a escovação das superfícies das próteses com escova de dentes e dentifrícios podem criar riscos com potencial de facilitar a adesão bacteriana e formação de biofilme. Assim como os materiais condicionadores teciduais podem promover a formação de superfícies rugosas e favorecer a colonização por *C. albicans* (Tari et al., 2007).

Outro fator importante a se considerar é a hidrofobicidade do material de confecção das próteses, que tem demonstrado facilitar a formação de hifas por *C. albicans* na colonização das superfícies das mesmas. Estudos in vitro têm demonstrado que diminuindo a hidrofobicidade da superfície com o uso de materiais de revestimento hidrofílicos, pode-se diminuir a habilidade de *C. albicans* em colonizar as próteses (Yoshijima et al., 2010).

Com a superfície colonizada por *C. albicans*, a prótese pode servir como reservatório para infecções locais como EP ou, disseminadas, como pneumonia por aspiração destes micro-organismos e infecções gastrintestinais (Cannon et al., 1995; Nikawa et al., 1998; Williams; Lewis, 2011).

2.1.5 Tratamento de infecções orais causadas por *Candida*

2.1.5.1 Antifúngicos

Agentes antifúngicos poliênicos tais como a nistatina e anfotericina B são efetivos no tratamento de candidoses orais, pois agem ligando-se ao ergosterol da membrana das células fúngicas, causando danos e mudanças na sua permeabilidade, com consequente perda de conteúdo e morte celular (Webb et al., 1998c; Scully et al., 2011). No entanto, apresentam vários efeitos colaterais incluindo sabor desagradável, o que pode afetar a tolerância do paciente. Nistatina é pouco absorvida no trato gastrointestinal e pode causar efeitos adversos como náuseas, vômitos e diarreias. Anfotericina B apresenta considerável risco de toxicidade renal, à medula óssea, cardiovascular e neurológico (Scully et al., 1994; Webb et al., 1998c; Muzyka; Somerman, 2006).

Agentes imidazólicos e triazólicos são antifúngicos sintéticos de largo espectro que afetam a permeabilidade da membrana celular fúngica interferindo na síntese do ergosterol, porém são fungistáticos e não fungicidas e apresentam alto custo (Scully et al., 1994; Webb et al., 1998c). Podem ser de uso tópico ou sistêmico, no entanto, o uso de antifúngicos sistêmicos tais como cetoconazol, itraconazol e fluconazol, não é muito recomendado considerando-se que pode haver desenvolvimento de resistência a estes antifúngicos (Ellepola et al., 2000). Além de serem potentes inibidores da enzima hepática citocromo P-450, principalmente o cetoconazol e itraconazol, o que afeta o metabolismo e a meia-vida de uma variedade de outras drogas (Scully et al., 1994; Lesse, 1995; Hoesley; Dismukes, 1997; Niimi et al., 2010). Dessa forma, para infecções localizadas, os agentes tópicos são preferidos (Denning; Hope, 2010).

Apesar dos efeitos colaterais já mencionados, os antifúngicos de uso tópico mais comumente indicados são a nistatina e o miconazol (Muzyka; Somerman, 2006).

2.1.5.2 Agentes antissépticos e desinfetantes

Outros fármacos também têm sido estudados como alternativa medicamentosa para o tratamento de candidoses orais, como os antissépticos disponíveis comercialmente para uso tópico oral, que têm demonstrado propriedades antifúngicas. Os antissépticos apresentam potencialmente menor possibilidade de interação com outras drogas e, principalmente, menor possibilidade de causar resistência fúngica, além de menor custo. Os enxaguatórios bucais à base de antissépticos testados foram a clorexidina, o cloreto de cetilpiridíneo (CCP), triclosan, entre outros (Giuliana et al., 1997; Powderly et al., 1999; Pizzo et al., 2001; Santos, 2002).

Digluconato de clorexidina (CHX) é um antisséptico catiônico de largo espectro que vem sendo utilizado há mais de 40 anos na prática odontológica como enxaguatório bucal (Varoni et al., 2012). Vários estudos tem pesquisado a atividade antifúngica de CHX (Giuliana et al., 1997; Giuliana et al., 1999; Pitten et al., 2003; Sritrairat et al., 2011; Shrestha et al., 2011; Fathilah et al., 2012).

Cloreto de cetilpiridíneo (CCP) é um composto quaternário de amônia com uma longa história de uso seguro e efetivo quando incorporado a produtos de higiene oral (Sreenivasan et al., 2012). Sua atividade antimicrobiana vem da facilidade da carga positiva de sua molécula em ligar-se a superfície negativa da bactéria, causando morte celular. O seu efeito antifúngico tem sido demonstrado em vários estudos.

Triclosan é um agente antimicrobiano não iônico de largo espectro que tem sido incorporado a uma variedade de produtos para higiene pessoal, incluindo enxaguatórios bucais e dentifrícios. Os resultados de estudos clínicos que utilizaram vários produtos com triclosan são conflitantes, alguns estudos demonstraram bom efeito antimicrobiano, outros não (Lefebvre et al., 2001).

Utilizando as concentrações disponíveis comercialmente, foi demonstrado in vivo, em cultura de células epiteliais de mucosa humana, que o CCP (0,05%) reduz a adesão de *Candida* às células, semelhante à clorexidina (0,2%), em 80 e 77%, respectivamente, superando o triclosan (0,045%) que reduziu a adesão em apenas 20% (Pizzo et al., 2001).

O uso de gluconato de clorexidina a 0,2% administrado 3 a 4 vezes ao dia, reduziu significativamente a placa bacteriana, mas não teve efeito significativo na redução do número de colônias de *Candida*. Melhores resultados foram obtidos quando se combinou o uso de cloredixina 2% para imersão das próteses com terapêutica antifúngica tópica (Webb et al., 1998c; Salerno et al., 2011).

Outro estudo demonstrou que o CCP foi mais efetivo que a clorexidina contra cepas de *Candida spp.* (Giuliana et al., 1999). Já, clorexidina in vitro, mostrou-se mais efetiva contra *C. albicans* que a nistatina e a anfotericina B (Hamers et al., 1996).

Ainda, o CCP in vitro, demonstrou maior atividade fungicida que triclosan, embora clinicamente o triclosan também tenha apresentado eficácia em reduzir os sinais clínicos de EP, porém menor que o primeiro (Santos, 2002).

Destes agentes antissépticos, a clorexidina é a que apresenta maior substantividade, mas apresenta alguns efeitos adversos, como sabor desagradável, alteração de paladar e principalmente, manchamento das superfícies das próteses e alguns tecidos bucais (Muzyka; Somerman, 2006).

Esses efeitos adversos foram relatados como sendo mínimos para o CCP (Kozlovsky et al., 1994). Contudo, o CCP apresenta menor substantividade quando comparado a clorexidina, (Elworthy et al., 1996), necessitando que o paciente realize vários bochechos para que se atinja o efeito terapêutico, dificultando a adesão do paciente ao tratamento.

A grande causa de falha no tratamento com antissépticos está relacionada ao pouco tempo de permanência e ação destes agentes tópicos na boca (baixa substantividade) (Powderly et al., 1999), o que acarreta a necessidade de várias aplicações diárias, dificultando a adesão e tolerância do paciente ao tratamento (Samaranayake; Holmstrup, 1989; Giuliana et al., 1997; Pizzo et al., 2001; Santos, 2002).

2.1.6 Tratamento de Estomatite Protética (EP)

A prevenção e o tratamento de EP são complexos devido à etiologia multifatorial da doença (Salerno et al., 2011; Webb et al., 1998c).

A estratégia terapêutica adotada no tratamento de EP inclui criteriosa higienização e desinfecção das próteses que pode estar associada ou não ao uso de fármacos antifúngicos de uso tópico ou sistêmico, além de antissépticos e desinfetantes (Salerno et al., 2011; Webb et al., 1998c).

A manutenção e o controle de higienização criteriosos realizados nas próteses e mucosa oral subjacente demonstraram ser efetivos no tratamento e prevenção de EP (Budtz-Jørgensen, 1974; Arendorf; Walker, 1979; Jeganathan et al., 1997; Budtz-Jørgensen; Lombardi, 2000; Jainkittivong et al., 2010). O controle de higiene também é essencial para evitar recidivas de EP após o tratamento antifúngico (Salerno et al., 2011).

A higienização não deve ser feita somente por escovação, mas com o uso de imersão das próteses em agentes desinfetantes comerciais específicos para próteses ou solução de hipoclorito diluída (Gendreau; Loewy, 2011).

2.2 SISTEMA DE LIBERAÇÃO LENTA DE FÁRMACOS EM MUCOSA ORAL

A eficiência da administração de medicamentos a várias partes do corpo está diretamente afetada pelo tamanho da partícula empregada, sendo assim a encapsulação destes medicamentos em partículas nanométricas apresenta grande potencial em melhorar esta eficiência, constituindo assim um sistema de liberação controlada de fármacos (Hughes, 2005; Zhang et al., 2013).

2.2.1 Sistema de liberação controlada de medicamentos

As principais vias de administração de medicamentos são a oral ou a parenteral o que limita o progresso de desenvolvimento de drogas. Alternativamente, os medicamentos também podem ser administrados por via transdérmica, transmucosa, ocular, pulmonar ou por implantação. Para utilização destes mecanismos de administração de drogas, utiliza-se com frequência, materiais biológicos, poliméricos baseados em silicone ou carbono, e metais. Estes materiais

eram estruturados em microescala e, mais recentemente, em nanoescala (Hughes, 2005; Zhang et al., 2013).

A liberação controlada de medicamentos aumenta a biodisponibilidade da droga, prevenindo sua degradação prematura e melhorando sua captação, aumenta o tempo de ação da droga ao manter a sua concentração terapêutica por mais tempo e permite maior precisão de ação da droga, reduzindo assim os seus efeitos colaterais (Hughes, 2005; Zhang et al., 2013).

Os materiais poliméricos têm várias propriedades desejáveis para um carregador de fármacos, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de funcionalização. Através da manipulação estrutural dos materiais poliméricos, as moléculas de fármaco são incorporadas na estrutura do polímero, o que permite maior controle do comportamento farmacocinético da molécula. Desta maneira, o fármaco pode ser liberado com um perfil cinético mais próximo do ideal, com fluxo constante, mantendo assim níveis estáveis mais apropriados de fármaco no local de liberação e por mais tempo (Hughes, 2005).

Recentemente, fibras nanométricas, preparadas a partir de soluções de polímeros eletrofiadas, têm sido exploradas como novos meios para liberação controlada de fármacos (Kenawy et al., 2009).

2.2.2 Nanotecnologia

Nanotecnologia pode ser definida como a ciência e a engenharia envolvidas em desenho, síntese e aplicação de materiais e dispositivos cuja menor organização funcional de uma de suas dimensões deve estar em escala nanométrica (a bilionésima parte do metro) (Sahoo et al., 2007). É uma ciência multidisciplinar e sua aplicação em diversas áreas da saúde humana apresenta um grande potencial de trazer benefícios significativos no desenvolvimento de medicamentos e sua administração. Essa tecnologia já é empregada e segue se desenvolvendo em várias outras áreas do conhecimento humano, com aplicações na descontaminação de água, tecnologia da informação e comunicações e produção de materiais mais fortes e leves, entre outros. Um dos grandes valores da nanotecnologia associa-se ao desenvolvimento de novos e efetivos tratamentos médicos, incluindo a

concepção de nanopartículas para liberação controlada de medicamentos (Sahoo et al., 2007).

2.2.3 Nanoencapsulação de fármacos

Nanoencapsulação de fármacos envolve a formação de partículas carregadas de fármaco variando de 1 a 1000 nm. Nanopartículas são definidas como carregadores sólidos de fármacos, menores que um micron, biodegradáveis ou não (Reis et al., 2006). O tamanho diminuto das nanopartículas oferece várias vantagens em relação às micropartículas incluindo alta captação intracelular e elevada área de superfície o que tem grande influencia em absorção, biodistribuição e eliminação de fármacos. Há vários métodos de produção de nanopartículas e podem ser utilizados vários materiais. Dependendo das características físico-químicas do fármaco, pode-se escolher o melhor método de preparo e o melhor polímero para alcançar um encapsulamento eficiente do fármaco (Reis et al., 2006).

2.2.3.1 Nanofibras

Fibras nanométricas têm sido exploradas como novos meios para liberação controlada de fármacos (Kenawy et al., 2009) por apresentar diversas vantagens em relação às fibras micrométricas, tais como, razão de área de superfície por volume aumentada, além de flexibilidade e propriedades mecânicas superiores, como alteração da rigidez e resistência à tração quando comparada a qualquer outra forma de material (Huang et al., 2003).

Vários processos já foram utilizados para o preparo de nanofibras poliméricas tais como, desenho, síntese de modelos, separação de fases, automontagem e eletrofiação (Huang et al., 2003). A maior parte destes processos apresenta alguma desvantagem quando comparado ao processo de eletrofiação, sendo assim, eletrofiação parece ser o único método que pode produzir uma massa composta por nanofibras contínuas de vários polímeros (Huang et al., 2003).

A ideia fundamental do processo de eletrofiação data de mais de 60 anos quando Formhals publicou uma série de patentes descrevendo a instalação de um experimento para a produção de filamentos poliméricos utilizando forças eletrostáticas. No seu estudo, uma solução polimérica era submetida a um campo elétrico e filamentos poliméricos se formaram entre dois eletrodos carregados eletricamente com polaridade inversa. Um dos eletrodos era colocado dentro da solução e o outro no coletor. Quando a solução carregada eletricamente era ejetada de uma cânula metálica, o solvente evaporava e as fibras eram colhidas no coletor (Formhals, 1934, 1939, 1940).

2.2.4 Processo de eletrofiação

O sistema para eletrofiação tem basicamente, três componentes: uma fonte de alta voltagem, um tubo capilar com uma cânula ou agulha de pequeno diâmetro e um coletor de metal. A alta voltagem é utilizada para que um jato da solução polimérica saia carregado eletricamente da ponta da cânula. Antes de alcançar o coletor, o solvente da solução do jato evapora ou esta se solidifica e é coletada formando uma rede interconectada de pequenas fibras. Um eletrodo é colocado na solução a ser eletrofiada e o outro no coletor. O campo elétrico é submetido na ponta da cânula que contém a solução. A solução fica mantida por tensão superficial, o que carrega eletricamente a superfície do líquido. Assim que a intensidade do campo elétrico aumenta, a superfície hemisférica do fluído na ponta da cânula se alonga, formando um cone conhecido como cone de Taylor (Taylor, 1969). Com o aumento do campo elétrico, um valor crítico é atingido quando a força eletrostática repulsiva supera a tensão superficial e um jato de fluido carregado é ejetado da ponta do cone de Taylor. O jato de solução polimérica sofre um processo de alongamento e instabilidade, o que o torna muito longo e fino. Enquanto isso, o solvente evapora deixando uma fibra polimérica (Huang et al., 2003; Rutledge; Fridrikh, 2007; Sill; Recum, 2008; Bhardwaj; Kundu, 2010).

A maioria dos polímeros pode ser dissolvida em seus respectivos solventes criando uma solução polimérica para ser eletrofiada. Ambos os processos, dissolução do polímero e eletrofiação podem ser feitos em temperatura ambiente e

em condições normais de atmosfera e pressão. No entanto, alguns polímeros podem apresentar odores desagradáveis, então o processo pode ser conduzido numa capela com ventilação. Além disso, a voltagem utilizada pela fonte de alta tensão é muito alta e deve-se evitar tocar qualquer superfície do sistema durante sua manipulação (Huang et al., 2003; Rutledge; Fridrikh, 2007; Sill; Recum, 2008; Bhardwaj; Kundu, 2010).

Polímeros fundidos em altas temperaturas também podem ser utilizados em eletrofiação, no entanto esse processo requer trabalho em condições de vácuo, o que dificulta a produção (Huang et al., 2003; Rutledge; Fridrikh, 2007; Sill; Recum, 2008; Bhardwaj; Kundu, 2010).

2.2.4.1 Parâmetros para investigação

Muitos parâmetros podem influenciar a transformação de soluções poliméricas em nanofibras através da eletrofiação. Estes parâmetros incluem: propriedades da solução como viscosidade, elasticidade, condutividade e tensão superficial; variáveis administráveis como vazão de saída da solução polimérica da cânula, potencial elétrico aplicado na ponta da cânula e distância entre a ponta de cânula e o coletor, além de parâmetros ambientais como temperatura da solução e umidade e velocidade do ar na câmara de eletrofiação carregada (Huang et al., 2003; Rutledge; Fridrikh, 2007; Sill; Recum, 2008; Bhardwaj; Kundu, 2010; Costa et al., 2012).

Várias pesquisas foram feitas para investigar a capacidade de eletrofiação de diferentes polímeros. Dentre os vários achados, conclui-se que a viscosidade da solução influencia na capacidade da solução polimérica de se eletrofiar, além de influenciar no diâmetro da nanofibra. Uma solução polimérica de alta viscosidade resultará em nanofibras de maior diâmetro. Outro fator que influencia o diâmetro da fibra é a voltagem aplicada na ponta da cânula. De uma maneira geral, quanto maior a voltagem aplicada, o jato de solução polimérica apresentará maior volume resultando numa fibra de maior diâmetro. O processo de eletrofiação apresenta ainda mais alguns desafios como o controle da uniformidade das nanofibras e a formação de gotas e poros em sua superfície carregada (Huang et al., 2003;

Rutledge; Fridrikh, 2007; Sill; Recum, 2008; Bhardwaj; Kundu, 2010; Costa et al., 2012).

Heikkilä e Harlin (2008) obtiveram resultados que apontam a dependência do diâmetro das fibras com a voltagem aplicada e com a distância entre a agulha e superfície coletora. Segundo os autores, a voltagem pode ser considerada como um parâmetro principal, pois é a responsável pela formação do jato de solução polimérica que vai da agulha para o coletor. Ainda:

- Se a tensão elétrica aplicada for muito baixa, não haverá força elétrica suficiente para formar o jato de solução, ocorrendo o gotejamento de solução na ponta da agulha;
- Se a tensão elétrica aplicada for muito alta, o jato formado não será uniforme e carregará quantidades diferentes de polímero a cada momento para o coletor, levando à formação de fibras de diâmetros diferentes e *beads*.

A distância entre a ponta da cânula e o coletor seria o segundo principal fator, já que está diretamente relacionada ao campo elétrico formado entre a cânula e o coletor:

- Em caso de distância muito grande, o campo elétrico será fraco e nem todas as fibras chegarão ao coletor, desta forma haverá um grande desperdício de matéria prima além de haver uma baixa produtividade no processo;
- Em caso de pequenas distâncias, não haverá espaço suficiente para a solução evaporar, formando gotas de polímero no filme. Após evaporação do solvente, estas gotas também formarão os chamados *beads* (Heikkilä; Harlin 2008).

Por sua vez, Zhang et al. (2005) observaram que, quando a vazão supera um valor crítico, a quantidade de polímero que chega a ponta da cânula torna-se maior que a capacidade do campo elétrico de retirá-la de maneira uniforme. Isso resulta em um jato de polímero instável que leva quantidades diferentes de polímero ao coletor durante o processo, conduzindo à formação de *beads* e de fibras com diâmetros diferentes.

2.2.4.2 Aplicações biomédicas de nanofibras

De um ponto de vista biológico, quase todos os tecidos humanos são organizados em formas ou estruturas nanométricas, tais como, ossos, dentina, colágeno, cartilagem e pele. Estes tecidos são caracterizados por apresentarem uma estrutura fibrosa muito bem organizada de dimensões nanométricas. Sendo assim, as pesquisas recentes sobre nanofibras poliméricas estão focadas na sua maior área de aplicação, a bioengenharia (Huang et al., 2003; Rutledge; Fridrikh, 2007; Sill; Recum, 2008; Bhardwaj; Kundu, 2010; Costa et al., 2012).

As aplicações das nanofibras poliméricas incluem a confecção de próteses de tecidos moles, como vasos sanguíneos e mamas, ou mesmo para recobrir próteses de tecidos duros, funcionando como interface entre o material da prótese e o tecido do hospedeiro, na expectativa de reduzir a incompatibilidade, prevenindo possíveis falhas após o implante (Huang et al., 2003; Liang et al., 2007; Costa et al., 2012). Podem ainda ser utilizadas como arcabouço para proliferação e deposição celular para regeneração de tecidos e órgãos humanos. Podem ser aplicadas como recobrimento de queimaduras de pele humana, encorajando a formação de pele normal e eliminando a formação de cicatrizes. Podem ser utilizadas na confecção de cosméticos e em formulações farmacêuticas para liberação de fármacos (Huang et al., 2003; Ma et al., 2005; Liang et al., 2007; Costa et al., 2012).

2.2.4.3 Liberação de fármacos

As formas de administração de fármacos sempre foram ponto importante para a medicina. De uma maneira geral, quanto menor a dimensão da droga e do material utilizado para a sua encapsulação, melhor será a absorção da droga pelo organismo. A liberação de fármacos por nanofibras poliméricas é baseada no princípio de que a taxa de dissolução da droga particulada é maior quanto maior a área de superfície da droga e de seu carreador (Huang et al., 2003; Sill; Recum, 2008; Patel et al., 2011; Zhang et al., 2013).

2.3 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EM MUCOSA ORAL

Devido à facilidade de administração, a cavidade oral é um local atrativo para a administração de fármacos por liberação lenta. Através desta rota é possível obter efeitos tópicos e sistêmicos, sendo que para o primeiro efeito, o objetivo é alcançar um local específico para a administração do medicamento, e para o segundo efeito, ocorre a absorção de fármacos através da barreira mucosa para alcançar a circulação sistêmica. A mucosa oral é altamente vascularizada e apresenta reduzida atividade enzimática quando comparada com as mucosas, intestinal, retal e nasal e é menos sensível a danos e irritação quando comparada ao epitélio nasal (Rossi et al., 2005). A liberação lenta de fármacos por via oral apresenta várias vantagens em relação a administração oral: evita o metabolismo pré-sistêmico do trato gastrointestinal e a via de eliminação hepática, apresenta facilidade de administração do dispositivo de entrega de fármaco, sem dor, com ação de início rápido, nenhuma ou pouca irritação e boa aceitabilidade pelo paciente e aumenta sua adesão ao tratamento (Hoogstraate; Wertz, 1998; Rossi et al., 2005; Scholz et al., 2008).

2.3.1 Cavidade oral: recursos anatômicos e fisiológicos

A mucosa oral apresenta área de superfície em torno de 100 cm² e compõe-se de três tipos diferentes: mucosa mastigatória, mucosa de revestimento e mucosa especializada. A mucosa mastigatória representa 25% da mucosa oral total, com 100 a 200 µm de espessura, recobre a gengiva e o palato duro. Apresenta-se firmemente aderida as estruturas subjacentes e está sujeita ao estresse dos esforços mastigatórios. A mucosa de revestimento representa 60% da mucosa oral total, com 500 a 800 µm de espessura e recobre os lábios, mucosa jugal, palato mole, ventre lingual e assoalho bucal. A mucosa especializada (15% da mucosa total) responsável pelo paladar é encontrada no dorso da língua (Hoogstraate; Wertz, 1998; Rossi et al., 2005).

As regiões da cavidade oral onde a liberação lenta de fármacos pode ser aplicada são: mucosa jugal, sublingual, palatina e gengival, sendo que as mucosas

jugal e sublingual são as mais adequadas para liberação de fármacos e podem ser usadas para tratamento de doenças locais ou sistêmicas (Scholz et al., 2008).

Apesar de apresentar várias vantagens, a liberação lenta de fármacos em mucosa oral encontra algumas dificuldades. A produção de saliva e sua composição podem promover modificações químicas em certos fármacos, além disso, o dispositivo de entrega de fármaco sofre ação de lavagem feita pela saliva, o que dificulta sua retenção por um período de tempo prolongado no local ou ainda, o dispositivo pode ser engolido, o que resulta numa perda de fármaco no local de absorção (Scholz et al., 2008).

2.3.2 Mecanismo de transporte de fármacos

O mecanismo de transporte de fármacos através da mucosa oral envolve duas vias principais: a transcelular (intracelular) e a paracelular (intercelular). A via transcelular envolve passagem através da membrana celular e a via paracelular implica em difusão passiva. É reconhecido que a matriz lipídica extracelular exerce função de barreira na via paracelular, especialmente quando os compostos são hidrofílicos e com alto peso molecular, como os peptídeos (Smart, 1993; Rossi et al., 2005). Para alcançar a circulação sistêmica, os fármacos devem ultrapassar uma barreira enzimática representada pelas enzimas que estão presentes na superfície da mucosa e na própria mucosa. No entanto, a barreira enzimática da mucosa oral é menos efetiva que a do trato gastrointestinal (Smart, 1993; Scholz et al., 2008).

2.3.3 Elaboração de formulações

Em caso de administração mucosa e transmucosa de fármacos, as formulações convencionais não garantem o nível terapêutico da droga na mucosa nem na circulação. Isto ocorre devido aos mecanismos fisiológicos de remoção da cavidade oral (efeito de lavagem da saliva e estresse mecânico) que removem a formulação da mucosa, resultando em tempo de exposição muito pequeno e

distribuição imprevisível da droga no sítio de ação ou de absorção. Para obter o efeito terapêutico, é necessário prolongar e aumentar o contato entre o princípio ativo e a mucosa (Rossi et al., 2005).

Para preencher as exigências terapêuticas, formulações elaboradas para administração bucal devem conter os seguintes agentes funcionais: agentes mucoadesivos, para manter contato íntimo e prolongado entre a formulação e o local de absorção; potenciadores de penetração, para aumentar a permeação da droga através da mucosa (liberação transmucosa) ou nas camadas mais profundas do epitélio (liberação mucosa); e inibidores enzimáticos, para proteger a droga de degradação enzimática (Rossi et al., 2005; Scholz et al., 2008).

2.3.3.1 Agentes mucoadesivos

Em caso de formulações secas ou parcialmente hidratadas, a hidratação e dilatação do polímero são fatores importantes na mucoadesão. A hidratação do polímero e consequente desidratação da mucosa podem causar aumento das propriedades coesivas da mucosa, o que resulta em aumento da mucoadesão. A dilatação favorece a flexibilidade das cadeias poliméricas e a interpenetração entre polímero e as cadeias de mucina. Então, dependendo do tipo de formulação a ser preparado, polímeros com diferentes características devem ser considerados (Rossi et al., 2005).

Os polímeros que são mais comumente utilizados em formulações secas ou parcialmente hidratadas incluem ácido poliacrílico, álcool polivinílico, polivinil pirrolidona, polietileno glicol, carboximetilcelulose, hidroximetilcelulose, hidroxipropilcelulose e alginato de sódio (Rossi et al., 2005). Para formulações totalmente hidratadas, já foram testados: ácido poliacrílico, quitosana e seus derivados, hidroxipropilcelulose, álcool polivinílico, gelatina, carragena, carboximetilcelulose, ácido hialurônico e todos demonstraram interagir com a mucosa bucal (Hoogstraate; Wertz, 1998; Rossi et al., 2005).

2.3.3.2 Potencializadores de penetração

Potencializadores de penetração são necessários quando o fármaco deve atingir a circulação sistêmica para exercer sua ação. Devem ser não irritantes à mucosa e ter efeito reversível, ou seja, o epitélio deve recuperar suas propriedades de barreira após o fármaco ser absorvido. Dependem das propriedades físico-químicas do fármaco, do local de administração e da natureza do veículo. Agem por diferentes mecanismos, reduzindo a viscosidade e/ou elasticidade da camada de muco, alterando temporariamente a bicamada lipídica da membrana celular ou ultrapassando a barreira enzimática da mucosa oral (Scholz et al., 2008).

Os mais comumente utilizados são quelantes, ácidos graxos, surfactantes, sais biliares, não-surfactantes e alcoóis (Scholz et al., 2008; Rossi et al., 2005).

2.3.3.3 Inibidores enzimáticos

A administração concomitante da droga com inibidores enzimáticos é outra estratégia para aumentar a absorção bucal de fármacos, particularmente de peptídeos, pois diminui a sua degradação metabólica (Hoogstraate; Wertz, 1998; Rossi et al., 2005).

2.3.4 Tipos de formulações

Diferentes formulações podem ser utilizadas para liberação de fármacos em mucosa oral como tablete, adesivos, pastilhas, sprays, hidrogel, gomas de mascar, pó e soluções. Estas formulações devem ter tamanho pequeno e geometria apropriada para não interferir com a função fisiológica da boca, mesmo após sua hidratação na cavidade bucal. Também não podem ter aderência muito forte para não injuriar a mucosa quando da sua remoção após o uso (Hoogstraate; Wertz, 1998; Rossi et al., 2005).

A maioria destas formulações permite absorção em várias partes da cavidade oral e alguma perda de fármaco para o trato gastrointestinal deve ocorrer. Para restringir a liberação do fármaco na mucosa oral, podem ser utilizados hidrogéis, tabletes ou filmes mucoadesivos (Hoogstraate; Wertz, 1998; Rossi et al., 2005).

Os adesivos são formulações que receberam grande atenção para a liberação de fármacos na boca, pois causam menor desconforto ao paciente por causa da sua flexibilidade. Geralmente são laminados e consistem de uma camada impermeável e uma camada que contém o fármaco com propriedades mucoadesivas, de onde o fármaco pode ser liberado de maneira controlada. Podem ser usados para uso tópico ou sistêmico (Hoogstraate; Wertz, 1998; Rossi et al., 2005).

2.3.5 Uso de antifúngico em sistema de liberação controlada oral

O estudo de Singh et al. (2008), onde o antifúngico clotrimazol foi incorporado em filme bioadesivo de carboximetilcelulose e carbopol (não nanofibrílico) e testado in vitro frente a *C. albicans*, demonstrou que o filme forneceu liberação controlada e prolongada do fármaco e a sua atividade antifúngica in vitro foi comprovada durante 6h.

Já o estudo de Nafee et al. (2003) onde *patches* mucoadesivos foram preparados com os polímeros carboximetilcelulose, quitosana, hidroxietil celulose, hidroxipropilcelulose e polivinilpirrolidona e miconazol (10mg) foram avaliados, observou em estudo em humanos, que o *patch* tem habilidade de fornecer elevada concentração de droga na saliva durante 6h, mesmo que a concentração do fármaco no *patch* (10mg) seja menor do que a concentração encontrada na formulação convencional (25mg). O que não ocorreu quando o estudo foi feito com gel comercial (Daktarin®) in vivo, permanecendo em concentração elevada na saliva apenas na primeira hora de estudo.

Estes estudos, dentre outros na literatura, demonstraram que antifúngicos podem ser utilizados em sistemas de liberação controlada para uso tópico em mucosa oral, no entanto, o uso de antifúngico pode levar a resistência microbiana. Sendo assim, o presente estudo visa apresentar a possibilidade de utilizar um antisséptico incorporado num sistema de liberação lenta como futuro tratamento alternativo aos antifúngicos para as infecções orais causadas por *Candida*.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição deste trabalho foi de criar uma alternativa para o tratamento de lesões orais causadas por *Candida* através de um sistema de liberação lenta de fármacos contendo o antisséptico cloreto de cetilpiridíneo, confeccionado a partir de soluções poliméricas submetidas ao processo de eletrofiação.

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é produzir filmes nanofibrílicos a partir de polímeros sintéticos contendo o princípio ativo cloreto de cetilpiridíneo (CCP) e caracterizá-los quanto à análise físico-química. Avaliar a cinética de liberação do princípio ativo CCP pela nanofibra e a cinética de permeação do princípio ativo em membrana biológica. Além de realizar estudo microbiológico in vitro de amostras de filmes nanofibrílicos com CCP frente à cepa de *Candida albicans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto são:

- Produzir filmes nanofibrílicos através de um sistema de eletrofiação; utilizando polímeros sintéticos PVA, PVP, PVP/ PM contendo cloreto de cetilpiridíneo (CCP);
- Analisar durante o processo de eletrofiação do filme nanofibrílico a condutividade, viscosidade e tensão superficial das soluções poliméricas com CCP;
- Caracterização físico-química (análise termogravimétrica, calorimetria exploratória diferencial e espectro de infravermelho da transformada de Fourier) e morfológica (microscopia eletrônica de varredura) das soluções poliméricas, de modo a encontrar condições

ideais de processamento que proporcionem liberação eficiente do fármaco CCP;

- A eficiência de encapsulação de CCP nos filmes nanofibrílicos,
- Estudar a cinética de liberação do princípio ativo (CCP);
- Analisar a cinética de permeação do princípio ativo (CCP) em membrana biológica em células de Franz;
- Avaliar microbiologicamente a ação do CCP contido em filmes nanofibrílicos *in vitro* frente a cepas de *Candida albicans*, a fim de determinar a concentração a ser incorporada para que a fração liberada seja fungicida.
- Verificar a eficiência do método de esterilização por energia ionizante dos discos de filmes nanofibrílicos (variação de dose).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FASE I: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES NANOFIBRÍLICOS

Os equipamentos utilizados para o preparo e caracterização das soluções e dos filmes nanofibrílicos estavam locados no laboratório do Centro Tecnológico de Processos e Partículas (CTPP) no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT).

4.1.1 Material

4.1.1.1 Preparo e caracterização das soluções poliméricas

4.1.1.1.1 Equipamentos

- Chapa de aquecimento e agitação MR-3001 Heidolph, Alemanha;
- Condutivímetro MC226 Mettler Toledo, Suíça;
- Viscosímetro DV-II Ultra Brookfield Engineering Laboratories, USA;
- Tensiômetro DCAT11 Dataphysics, Alemanha;
- Placa PT11 Wilhelmy Plate, Dataphysics;
- Adaptador de pequenas amostras, Brookfield.

4.1.1.1.2 Reagentes

- Poli (metacrilato de metila-co-acrilato de etila-co-metacrilato de amônio) (PM), Eudragit® RS100, Evonik, Degussa Rohm GmbH Pharma Polymers, Alemanha;
- Polivinilpirrolidona (PVP), Kollidon® 90F, Basf, Alemanha;
- Alcool polivinílico (PVA), Celvol® 325, Hexion Química, Brasil;
- Acetona, Synth, Brasil;

- Álcool etílico 99,3° GL, Synth, Brasil;
- Solução padrão de condutividade Digimed 1.412 μ S/cm;
- Cloreto de cetilpiridíneo (CCP), Sigma-Aldrich, USA.

4.1.1.2 Sistema de eletrofiação

- Fonte de alta voltagem modelo ES30P-10W Gamma High Voltage Research, Florida, USA;
- Bomba de infusão PHD2000 Harvard Apparatus, USA;
- Cilindro metálico de diâmetro 4,5 cm;
- Motor rotativo IKA RW 20 digital;
- Capela para exaustão de gases Sppencer Scientific, Brasil.

Acessórios

- Proveta de 25,0mL;
- Seringa hipodérmica de vidro de 10 mL, Art Glass, Itália;
- Embalagem plástica transparente 15X20, B.D.;
- Papel manteiga;
- Bico de Bunsen;
- Cânula calibre 22, diâmetro externo 0,72mm, diâmetro interno 0,41mm, comprimento 12,7mm, Nordson EFD, USA.

4.1.1.3 Caracterização dos filmes nanofibrílicos

4.1.1.3.1 Análise morfológica

- Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Quanta 3D FEG, FEI, República Tcheca;

- Microscópio eletrônico de varredura (MEV) 360 ou JSM, Jeol;
- Equipamento Desk IV, Denton Vacuum, USA;
- Fita dupla face metalizada de cobre Electrical tape, 3M.

4.1.1.3.2 Análise térmica

- Equipamento TGA/DSC 1 Star^e System, Mettler Toledo, Suíça.

4.1.1.3.3 Análise química

- Equipamento Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR, USA;
- Pastilhas de KBr (brometo de potássio).

4.1.1.4 Avaliação de eficiência de encapsulação de CCP

- Balança analítica AY 220, Shimadzu, Filipinas;
- Incubadora 430/RDB, Nova Ética, Brasil;
- Espectrofotômetro UV GBC 10, Cintra Double Beam, GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Austrália.

4.1.1.5 Avaliação da cinética de liberação de CCP nos filmes nanofibrílicos

- Incubadora 430/RDB, Nova Ética, Brasil;
- Espectrofotômetro UV GBC 10, Cintra Double Beam, GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Austrália.

4.1.1.6 Estudo de permeação do fármaco CCP em mucosa suína

Para o estudo de permeação utilizou-se mucosa esofágica suína de animais abatidos no Frigorífico Rajá Ltda. O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (nº 63/3013) conforme (Anexo A).

4.1.1.6.1 Materiais

- Tampão fosfato pH 7,4 preparado com:
 - fosfato de sódio dibásico, Sigma-Aldrich, USA;
 - fosfato de potássio dibásico, Sigma-Aldrich, USA;
 - cloreto de sódio, Sigma-Aldrich, USA;
 - ácido fosfórico para acertar o pH, Sigma-Aldrich, USA;
 - água destilada.
- Filmes nanofibrílicos confeccionados a partir da solução PVP/PM 10% (m/m);
- Filmes nanofibrílicos confeccionados a partir da solução PVP/PM 10% (m/m) com CCP 5%;
- Mucosa de esôfago de porco (*Sus scrofa domesticus*).

4.1.1.6.2 Equipamentos

- Equipamento de difusão em célula de Franz Variomag Telesystem 6, Komet, Thermo Electron Corporation, China;
- Incubadora 430/RDB, Nova Ética, Brasil;
- Espectrofotômetro UV GBC 10, Cintra Double Beam, GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Austrália;
- Banho Julabo 4, Labortechnik, Alemanha.

Figura 4.1 - Foto ilustrativa, sem escala, da montagem das células de Franz para avaliação da liberação de CCP in vitro

4.1.1 Métodos

4.1.2.1 Preparo das soluções

Foram preparadas três soluções poliméricas sem CCP:

- **Solução PVA:** preparada com o polímero álcool polivinílico (PVA) (Celvol[®] 325, Hexion) e água destilada na proporção de 10% em relação à massa total e levou-se a agitação magnética e aquecimento (90°C) na chapa de aquecimento e agitação (MR-3001, Heidolph) até completa solubilização;
- **Solução PVP:** preparada com o polímero polivinilpirrolidona (PVP) (Kollidon[®] 90F, Basf) solubilizado numa mistura de álcool etílico 99,3° GL (Synth) e água destilada na proporção de 80:20, até obter-se a concentração de 10% de PVP em relação à massa total;
- **Solução PVP/ PM:** obtida através da solubilização de partes iguais de PVP (Kollidon[®] 90F, Basf) e PM (Eudragit[®] RS100, Evonik) em partes iguais de álcool etílico 99,3° GL (Synth) e acetona (Synth) até a concentração de 10% de polímero em relação à massa total.

Foram preparadas três soluções poliméricas associadas ao CCP:

Para realização dos ensaios com o princípio ativo cloreto de cetilpiridíneo (CCP) (Sigma-Aldrich), foram preparadas outras 3 soluções análogas as primeiras acrescentando-se CCP em concentração máxima de 5% em relação à massa de polímero disperso, com o intuito de caracterizar as soluções, avaliar a capacidade de encapsulação do princípio ativo pela fibra e seu perfil de liberação. Foram denominadas:

- **Solução PVA/ CCP**
- **Solução PVP/ CCP**
- **Solução PVP/ PM/ CCP.**

4.1.2.2 Caracterização das soluções poliméricas

As seis soluções preparadas foram caracterizadas quanto à condutividade, viscosidade e tensão superficial. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1.2.2.1 condutividade

Após calibração do condutímetro com uma medição da condutividade do ar, foram realizados os ensaios das soluções preparadas. Numa proveta foram adicionados 10 ml da solução polimérica a ser analisada, onde o eletrodo foi mergulhado e as medições realizadas. Os ensaios foram feitos com uma margem de temperatura de $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, e após cada um, o eletrodo foi enxaguado com água ou álcool/água dependendo do polímero analisado. Os resultados devem ser expressos em $\mu\text{S/cm}$ (micro-Siemens por centímetro).

4.1.2.2 viscosidade

Nesta caracterização foi utilizado o programa Rheocalc acoplado ao viscosímetro para realização do estudo. Foram adicionados 5,0 ml de solução ao adaptador de pequenas amostras, e com o *spindle 18* foram feitas as medições. Para manter o torque dentro dos limites adequados (entre 10% e 90%), variou-se a rotação do *spindle*, utilizando a velocidade de 10rpm para as soluções de PVP e PVP/PM, e de 3rpm para as medições da solução de PVA. Os ensaios foram feitos a temperatura de $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Os resultados devem ser expressos em mPas (milipascal-segundo).

4.1.2.3 tensão superficial

Para a análise desta variável, foi utilizado o programa Scat acoplado ao tensiômetro. Utilizou-se para a análise em todas as soluções a placa PT11 esterilizada, juntamente com o recipiente de análise do próprio equipamento. Para a esterilização da placa, enxágua-se a placa com água e álcool e, com o auxílio de um bico de Bunsen, aquece-se a placa até o rubro. A temperatura do ensaio ficou entre $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e deve-se tomar a precaução de não haver bolhas na superfície da amostra. Os resultados devem ser expressos em mN/m (milinewton por metro).

4.1.3 Montagem do sistema de eletrofiação

O sistema de eletrofiação foi montado utilizando-se uma fonte de alta tensão, uma bomba de infusão e um cilindro acoplado a um coletor rotativo (Figuras 4.1 e 4.2).

A fonte de alta tensão elétrica possui um eletrodo condutor de tensão com pinça do tipo jacaré na sua extremidade. Esta pinça foi conectada a uma cânula metálica acoplada numa seringa de vidro de 10 ml contendo solução polimérica. A

bomba de infusão foi utilizada para controlar a velocidade de bombeamento da solução polimérica contida na seringa, pressionando o êmbolo.

4.1.4 Confecção dos filmes nanofibrílicos

Após o preparo de cada solução polimérica, 5,0 ml eram dispensados em seringa de vidro com uma cânula metálica instalada em sua ponta. Esta seringa era posicionada na bomba de infusão e um fio conector com pinça do tipo jacaré, partindo da fonte de alta voltagem, fazia a conexão com a cânula metálica, próximo a sua ponta.

Quando a bomba de infusão e a fonte elétrica eram acionadas, a solução polimérica passava pela cânula e formava uma gota de superfície semicircular em sua extremidade. Sob efeito da tensão elétrica, a superfície hemisférica da gota alongava formando um cone, conhecido como cone de Taylor. Quando as forças eletrostáticas superavam a tensão superficial, um jato de solução carregado eletricamente era ejetado a partir da extremidade do cone (Mohan, 2002; Kenawy et al., 2003). Durante a trajetória do jato, o solvente se evaporava depositando nanofibras poliméricas solidificadas em um coletor aterrado, conforme figura 4.2.

Um cilindro em rotação, aterrado e envolto em papel manteiga foi utilizado como coletor do filme polimérico como apresentado na figura 4.3.

Figura 4.2 - Ilustração esquemática do sistema de eletrofiação. Adaptado de <http://www.che.vt.edu/Wilkes/electrospinning/electrospinning.html>

Figura 4.3 - Foto ilustrativa do sistema de eletrofiação (Laboratório CTPP - IPT).

Devido às características de cada solução, foram realizados processos de eletrofiação em diferentes condições. Para a solução de PVA, de acordo com estudo piloto prévio, adotou-se como condição ideal, realizar os ensaios a distância de 10 cm entre a ponta da cânula e a superfície do coletor, com vazão de 1mL/h na bomba, 12 KV na fonte de alta tensão e rotação de 30 rpm no cilindro coletor, por um período de 120 min. Para os ensaios de PVP, adotou-se a distância de 10 cm, vazão de 1,7 mL/h, tensão de 15 KV e rotação de 30 rpm por um período de 120 min. Por fim, para os ensaios de PVP/PM, adotou-se a distância de 6 cm, vazão de 1,0mL/h, tensão de 18KV e rotação de 30 rpm por um período de 120 min. Após o processo, a folha de papel manteiga com o filme produzido foi retirada do cilindro e colocada em uma embalagem transparente devidamente identificada.

4.1.5 Caracterização dos filmes nanofibrílicos

Os filmes nanofibrílicos produzidos foram caracterizados através de análises morfológica, térmica e química.

4.1.5.1 Análise morfológica

Para observação ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), amostras de filmes nanofibrílicos dos grupos PVA e PVP/PM foram imobilizadas no porta-amostras através de fita dupla face de cobre. A seguir, as amostras foram metalizadas com liga de platina-ouro no equipamento Desc IV (Denton) por 160 seg com amperagem de 12,5 mA. As análises foram realizadas em alto vácuo com uma tensão de aceleração do feixe de elétrons de 20 kV, com ampliações variando de 350 até 80.000 vezes de aumento.

Deste teste em diante, utilizou-se apenas as soluções e as correspondentes nanofibras de PVP ou PVP/PM com e sem CCP, devido aos resultados preliminares desfavoráveis com a solução de PVA.

4.1.5.2 Análise térmica

A análise térmica das matérias primas envolvidas e das nanofibras produzidas foram realizadas através da análise da calorimetria exploratória diferencial (DSC) e da análise termogravimétrica (TGA).

A técnica de DSC explora o fato que diferentes materiais apresentam diferentes pontos de fusão e entalpia, avaliando a quantidade de calor que é requerida para aumentar a temperatura de um material de amostra e de um material de referência. Fornece informações sobre o estado físico e a cristalinidade dos materiais envolvidos, além da temperatura de fusão e entalpia (Durán et al., 2011; Guimarães; Ré, 2011). Neste estudo foi realizada através da célula TGA/DSC 1 Star^e System da Mettler Toledo, sob as seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50mL/min.; razão de aquecimento de 10°C/min; no intervalo de temperatura de 25 a 640 °C; cadinho de alumínio fechado e massa de amostra entre 5 e 6 mg.

A técnica de TGA analisa a variação da massa da amostra em função de temperatura e/ou tempo (decomposição, desidratação, oxidação ou combustão dos materiais envolvidos) e fornece dados quanto à estabilidade térmica da amostra,

estabilidade dos compostos intermediários e do produto final. Neste estudo foi realizada através da célula TGA/DSC 1 Star^e System da Mettler Toledo, sob as seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50mL/min.; razão de aquecimento de 10°C/min; no intervalo de temperatura de 25 a 700 °C; cadinho de alumina aberto e massa de amostra entre 5 e 6 mg.

4.1.5.3 Análise química

O estudo do espectro de infravermelho da transformada de Fourier (FTIR) analisa a interação da radiação eletromagnética com a matéria através da absorção, emissão e espalhamento de radiação. Em polímeros permite a identificação, determinação de grupos funcionais, estudo de conformação e estrutura das macromoléculas, produzindo uma identificação dos componentes de uma amostra. Também se pode avaliar a influência do processo de eletrofiação na estrutura química dos materiais eletrofiados (Costa et al., 2012).

Os polímeros puros e os filmes nanofibrílicos previamente produzidos foram caracterizados quanto ao espectro de infravermelho da transformada de Fourier (FTIR) usando o equipamento Thermo Scientific Modelo Nicolet 6700, empregando pastilhas de KBr (brometo de potássio) na faixa de 4000 – 450 cm⁻¹. Amostras (triplicata) de filmes nanofibrílicos, assim como amostras de CCP, PVP e PM foram maceradas com KBr e depositadas sobre o porta-amostra para proceder a leitura.

4.1.6 Avaliação da eficiência de encapsulação de CCP nos filmes nanofibrílicos

Amostra de filme nanofibrílico produzido a partir de solução polimérica PVP/PM com CCP à 5%, amostra de filme produzido nas mesmas condições sem o princípio ativo (controle negativo), e amostra do princípio ativo puro (controle positivo) foram pesadas em balança analítica e colocadas em frascos identificados de cor âmbar com tampa com capacidade de 125 mL. Adicionou-se 50 mL de solvente (álcool/água em partes iguais) e levou-se a agitação durante 10 min. Após

a completa dissolução do filme nanofibrílico visível a olho nu, foram colhidas amostras de 3,0 ml de cada frasco e procedeu-se à leitura em espectrofotômetro para avaliação da quantidade de princípio ativo liberado. O comprimento de onda utilizado foi de 258 nm de acordo com a curva de calibração (apêndice D) realizada anteriormente. Os testes foram feitos em triplicata.

4.1.7 Obtenção dos perfis cinéticos de liberação de CCP nos filmes nanofibrílicos

Os perfis cinéticos de liberação do princípio ativo CCP, contidos nas mantas de polímeros, foram avaliados conforme metodologia descrita por Kenawy et al. (2003).

Amostra de filme nanofibrílico produzido a partir de solução polimérica PVP/PM com CCP a 5% e amostra de um filme produzido nas mesmas condições sem o princípio ativo, isto é, o controle negativo, foram pesados em balança analítica e acondicionados separadamente em frascos de Erlenmeyer identificados. Adicionou-se 50 mL de solução tampão pH 7,4 em cada frasco e em seguida, os frascos foram levados a incubadora à temperatura de 37°C e rotação de 60 rpm. A cada intervalo de tempo pré-estabelecido, alíquotas de 3,0 mL eram coletadas de cada frasco com pipeta analítica e, em seguida o mesmo volume de solução tampão pH 7,4 era adicionado em cada frasco para manter o volume inicial da solução. As alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo fixos a partir do tempo zero, sendo considerados os intervalos de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 1440 minutos. As amostras coletadas foram separadas e submetidas à avaliação através da técnica de espectrofotometria no UV/VIS para quantificação da droga liberada, no comprimento de onda de 258 nm, de acordo com curva de calibração (apêndice D) previamente realizada. O estudo foi feito em triplicata.

4.1.8 Estudo de permeação do CCP em membrana biológica

O estudo da cinética de permeação do fármaco CCP contido nos filmes nanofibrílicos foi realizado em mucosa de esôfago suíno que apresenta características semelhantes à da mucosa bucal humana (Ceschela et al., 2002; Diaz-Del Consuelo et al., 2005).

4.1.8.1 Preparação da membrana biológica

Peças de esôfago suíno foram obtidas logo após o abate do animal diretamente de um frigorífico local (Frigorífico Rajá Ltda.) e transportadas ao laboratório sob refrigeração em caixas térmicas. O material foi lavado com solução de tampão-fosfato gelada, e com auxílio de tesoura cirúrgica e bisturi, procedeu-se a dissecação para separação do músculo que envolve o esôfago externamente (Figura 4.4). O esôfago foi cortado longitudinalmente com o auxílio do bisturi e enxaguado com solução de tampão-fosfato. Obtendo-se desta forma, peças retangulares de aproximadamente 10 x 3,0 cm e 1,0 mm de espessura que foram acondicionadas em papel alumínio e levadas para refrigeração até o momento do ensaio (Figura 4.5).

Figura 4.4 – Dissecação entre a mucosa e a camada muscular de esôfago de suíno

Figura 4.5 - Membrana biológica obtida de esôfago suíno após o preparo

4.1.8.2 Perfil de liberação do CCP em células de Franz

Amostras de filmes previamente produzidos pelo processo de eletrofiação foram separadas para este ensaio sendo, quatro amostras de filme nanofibrílico PVP/PM com princípio ativo CCP na concentração de 5% e duas amostras de filme nanofibrílico PVP/PM sem princípio ativo, aqui denominado simplesmente de filme branco. As amostras foram cortadas em dimensões semelhantes e pesadas em balança analítica.

O aparelho de célula vertical tipo Franz possui seis células de vidro termo aquecido. Cada célula apresenta um compartimento doador e outro receptor, que é preenchido com uma solução receptora. Entre os compartimentos supracitados, é colocada a membrana biológica, neste caso a mucosa de esôfago suíno. As células são conectadas a uma cuba com meio receptor para reposição de meio durante a amostragem. Esta cuba mantém a temperatura da solução em $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e sob constante agitação magnética. O estudo foi realizado por um período de 12 horas. Sobre cada célula montada com a membrana biológica, uma amostra de filme foi posicionada e a célula devidamente identificada.

Como solução doadora utilizou-se solução tampão preparada com 2,38g de Na_2HPO_4 , 0,19g de KH_2PO_4 , 8,0g de NaCl, 1L de água destilada e pH 7,4 ajustado com ácido fosfórico. Após preparação, a solução foi adicionada em recipiente de

vidro, em banho-maria, a 37 °C. O controle da temperatura é crucial durante todo o experimento, devendo permanecer constante em 37 °C. O recipiente de vidro em banho-maria, como também o aparelho que controla a rotação da agitação magnética que está localizado a sua esquerda, podem ser visualizados na figura 4.6.

Figura 4.6 - Esquema completo de aparato para estudo de permeação em células de Franz

Em cada célula de difusão foi colocada uma membrana biológica, com a parte interna colocada em contato com a solução receptora, cuja função é representar a etapa de liberação do princípio ativo da formulação. Sobre cada membrana, foi colocada uma amostra de filme nanofibrílico. O estudo foi feito em oclusão, uma vez que este filme nanofibrílico com o princípio ativo deve ser usado como *patch* (adesivo).

Em cada célula de difusão existem dois orifícios, sendo que o inferior é utilizado para injetar a solução receptora e o superior para coletar a solução receptora, cujos tempos estabelecidos para essa coleta foram: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 minutos. A quantificação de princípio ativo foi realizada através de espectrofotometria UV/VIS no comprimento de onda de 258 nm, de acordo com curva de calibração previamente realizada (apêndice D).

A figura 4.7 ilustra a etapa de coleta de solução receptora das células de difusão e reposição de 1,0 mL de solução receptora a 37 °C por meio de uma seringa.

Figura 4.7 - Reposição da solução receptora em célula de difusão de Franz

4.2 FASE II: ESTUDO MICROBIOLÓGICO DOS FILMES NANOFIBRÍLICOS

O estudo microbiológico dos filmes nanofibrílicos foi realizado no laboratório de micologia do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, onde estavam locados os materiais e equipamentos utilizados.

4.2.1 Materiais

- Agar Sabouraud Dextrose 500mg Difco, USA;
- Agar Mueller-Hinton 500g Sigma-Aldrich, USA;
- Agar Brain Heart Infusion 500g Himedia, India;
- Miconazol 1g Sigma-Aldrich, USA;
- Cloreto de cetilpiridíneo (CCP) Sigma-Aldrich, USA.

- Placa de Petri descartável com 09 cm de diâmetro, J Prolab, São José dos Pinhais, Brasil;
- Alça bacteriológica descartável Brand;
- Papel filtro 40 Whatman;
- Pinça estéril;
- Lâmina de bisturi;
- Haste de plástico com algodão (swab);
- Cultura de *Candida albicans* proveniente da American Type Culture Collection (ATCC 90028);
- Discos de filmes nanofibrílicos de diâmetro 05 mm, 09 mm, 13 mm e 19 mm, previamente confeccionados a partir de solução de polímeros PVP/PM contendo CCP nas concentrações 5%, 2,5%, 1,25% e 0,05%;
- Discos de papel filtro de 13 mm de diâmetro, previamente confeccionados a partir de papel filtro tipo 40, embebidos em solução de miconazol 5% em álcool/acetona.

Equipamentos

Os equipamentos utilizados para o teste de disco-difusão para susceptibilidade antifúngica estavam locados no laboratório do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. São eles:

- Estufa para secagem Olidef cz;
- Fluxo laminar Pachane, Piracicaba, Brasil;
- Autoclave Phoenix Luferco, Araraquara, Brasil;
- Geladeira Eletrolux;
- Micro-ondas Panasonic, Manaus, Brasil;
- Balança analítica Adventurer Ohaus, USA;
- Câmara de incubação Fanen, São Paulo, Brasil;
- Paquímetro, Mitutoyo, Brasil.

4.2.2 Métodos

Avaliação da susceptibilidade das cepas de *C. albicans* ao CCP em filme nanofibrílico

- Diâmetro do disco nanofibrílico

Em estudo piloto prévio, foram utilizados discos nanofibrílicos apenas do grupo PVP/PM em vários diâmetros para determinar qual o diâmetro de trabalho mais adequado. Utilizaram-se discos de diâmetros aleatórios com 5,0 mm, 9,0 mm, 13 mm e 19 mm, e após 48 horas, observou-se que os discos sofreram uma contração (18,9%). Observou-se que os discos de 19 mm de diâmetro apresentavam maior facilidade de leitura após sua contração. Determinou-se que o teste seria feito utilizando discos de filme nanofibrílico com 19 mm de diâmetro. Os discos foram recortados com o auxílio de uma lâmina de bisturi, pesados em balança analítica e identificados.

- Esterilização dos discos nanofibrílicos

Amostras de filmes nanofibrílicos foram submetidas a esterilização por energia ionizante através de raios gama Co60 (Embrarad Empresa Brasileira de Radiações LTDA, Cotia, São Paulo, Brasil; www.cbresa.com.br) em única aplicação. Subgrupos de amostras foram submetidos a cinco diferentes doses: 10, 15, 20, 30 e 40 kGy (anexos B e C).

Com o objetivo de verificar a eficiência do método de esterilização, discos de filmes nanofibrílicos submetidos à energia ionizante foram recortados com o auxílio de pinça e bisturi estéreis e colocados em meio de cultura para crescimento de bactérias. O meio de cultura utilizado foi ágar BHI (Brain Heart Infusion, Sigma-Aldrich, USA) preparado de acordo com as instruções do fabricante e vertido em

placas de Petri estéreis. Após solidificação do ágar, foram depositados os discos ionizados e os conjuntos levados à incubação em estufa (37°C) durante 48 horas para posterior leitura das placas.

- Teste de disco-difusão

Os testes de disco-difusão foram realizados utilizando os seguintes grupos de discos, todos com 19 mm de diâmetro:

1. Discos nanofibrílicos contendo CCP com as concentrações de 0,05, 1,25, 2,5 e 5% (n=6 de cada concentração).
2. Disco nanofibrílicos sem a presença do princípio ativo (n=15).
3. Discos nanofibrílicos contendo miconazol (5%) (n=6).
4. Discos de papel-filtro com CCP (5%) (n=15).
5. Disco de papel-filtro com miconazol (5%) (n=10).
6. Discos de papel-filtro sem princípio ativo (n=4).

Os discos foram pesados e a massa de CCP presente em cada disco foi calculada.

Para realizar os testes com *C. albicans* ATCC 90028, foi utilizado como meio de cultura o ágar Muller-Hinton (Mueller Hinton Agar, Sigma-Aldrich, USA), preparado de acordo com as instruções do fabricante. O ágar foi vertido em placa de Petri de 9,0 cm até completar 4,0 mm de altura, em superfície nivelada em capela de fluxo laminar. Para inocular o ágar, preparou-se uma suspensão de cultura de 24h de *Candida* em solução salina estéril. A turbidez da suspensão foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland de acordo com o protocolo da CCSL (Sheehan et al., 2004).

A inoculação foi feita através de estrias em três direções na superfície do ágar com o auxílio de um swab. Logo após a inoculação, os discos foram aplicados com o auxílio de pinça estéril para evitar contaminação. Todos os discos foram pressionados suavemente para o contato total com a superfície do ágar. Foram mantidas as distâncias de 30 mm entre um disco e outro (centro a centro dos discos) e de 15 mm da margem da placa para evitar a superposição dos halos de inibição. Após 48h de incubação a 37°C, as placas foram examinadas para verificar se o crescimento obtido foi uniforme, se houve presença de contaminantes e se o

diâmetro do halo de inibição estava bem definido. A leitura foi realizada com o auxílio de um paquímetro (mm). Ao realizar a medição dos halos de inibição, também foi medido o diâmetro do disco para quantificar a contração (%).

- Avaliação do teste de disco-difusão

A interpretação dos resultados do teste de disco-difusão foi realizada de acordo com as Normas do CCSL (Sheehan et al., 2004). Esse método é qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra fúngica em suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antifúngico. A ausência de crescimento de *Candida* demonstra a ocorrência de uma zona de inibição em volta do disco que contém o CCP. A expressão da atividade antifúngica do fármaco é expressa pela medida do diâmetro da zona de inibição, sendo o diâmetro diretamente proporcional à concentração inibitória mínima (CIM).

5 RESULTADOS

5.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

Antes de serem submetidas ao processo de eletrofiação, as três soluções poliméricas (PVA, PVP, PVP/PM) e as respectivas associações com princípio ativo CCP 5% preparadas para este estudo foram caracterizadas quanto à condutividade, viscosidade e tensão superficial. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 5.1:

Tabela 5.1 – Comparação de parâmetros das soluções poliméricas

Solução	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	Viscosidade (mPas)	Tensão Superficial (mN/m)
PVA	827,33 $\pm$ 3,18	502,9 $\pm$ 0,88	54,20 $\pm$ 0,91
PVA + CCP (5%)	1502,33 $\pm$ 2,90	468,9 $\pm$ 2,51	37,26 $\pm$ 0,42
PVP	11,04 $\pm$ 0,45	125 $\pm$ 0,36	25,63 $\pm$ 0,03
PVP + CCP(5%)	234,33 $\pm$ 0,33	129,7 $\pm$ 0,36	25,76 $\pm$ 0,08
PVP/PM	185,9 $\pm$ 0,25	30 $\pm$ 0,17	23,25 $\pm$ 0,04
PVP/PM + CCP(5%)	503 $\pm$ 22,09	31,2 $\pm$ 1,37	23,38 $\pm$ 0,04

(n=3)

Foi observado que a adição de CCP a 5% às soluções poliméricas aumentou a condutividade tanto do PVA, quanto do PVP e PVP/PM, como pode ser observado no gráfico 5.1 (Apêndice B).

Gráfico 5.1 – Análise comparativa da condutividade das soluções poliméricas de PVA, PVP e PVP/PM sem CCP e com CCP a 5% ($p < 0,0001$) ($n=3$)

A presença de CCP (5%) não interferiu na viscosidade das soluções de PVP e PVP/PM, enquanto que diminuiu a viscosidade da solução de PVA. A adição de PM ao PVP também diminuiu a viscosidade da solução, como pode ser observado no gráfico 5.2 (Apêndice C).

Gráfico 5.2 – Análise comparativa da viscosidade das soluções poliméricas de PVA, PVP e PVP/PM com e sem CCP a 5% ($p < 0,0001$) ($n=3$)

A adição de CCP (5%) ou de PM não alterou a tensão superficial das soluções contendo PVP. Quanto ao PVA, a adição de CCP (5%) diminuiu ($p < 0,0001$) a tensão superficial da solução, como pode ser observado no gráfico 5.3 (apêndice A).

Gráfico 5.3 – Análise comparativa da tensão superficial das soluções poliméricas de PVA, PVP e PVP/PM sem CCP e com CCP a 5% ($p < 0,0001$) ($n=3$)

5.2 Preparo dos filmes nanofibrílicos

As três soluções poliméricas puras (PVA, PVP, PVP/PM) e com o princípio ativo CCP (5%) preparadas previamente, foram eletrofiadas no sistema de eletrofiação montado para este estudo. O filme obtido está representado na figura 5.1.

Figura 5.1 - Fotografia de filme nanofibrílico de PVP/PM com CCP a 5%

Após estudo piloto com PVA, foi observado que os filmes nanofibrílicos constituídos de PVA solubilizavam rapidamente em meio ambiente, impossibilitando seu manuseio e posterior caracterização. Sendo assim, ao longo da pesquisa, baseado na literatura e nos trabalhos experimentais, o uso do polímero PVA inicialmente previsto, foi abandonado e optou-se por prosseguir o estudo com os polímeros PVP e PM e a associação PVP/PM.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NANOFIBRÍLICOS

5.3.1 Análise morfológica

A caracterização dos filmes nanofibrílicos foi realizada por imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram tomadas imagens dos filmes de PVP/PM sem CCP (Figuras 5.2 e 5.3) e de PVA (Figuras 5.4 e 5.5), para determinação de alguns dos parâmetros da eletrofiação.

Figura 5.2 - Fibras de PVP/PM eletrofiadas com uma vazão de 1,7mL/h e tensão de 12,5kV. Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 5000x

Figura 5.3 - Fibras de PVP/PM eletrofiadas com uma vazão de 1,7mL/h e tensão de 12,5kV. Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 75000x

Figura 5.4 - Imagem das fibras de PVA (variáveis do processo de eletrofiação: vazão de 2,5mL/h e tensão de 11kV) obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 3500x

Figura 5.5 - Imagem das fibras de PVA (variáveis do processo de eletrofiação: vazão de 2,0mL/h e tensão de 22kV) obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 3500x

Observa-se na figura 5.4 que as fibras apresentam diâmetro de ordem micrométrica. No entanto, na figura 5.5, onde se observa fibras de diâmetro menor do que na figura 5.4, há presença de grandes irregularidades quanto ao tamanho e à morfologia das fibras, além da existência de muitos *beads* (pontos de acúmulo de polímero).

Observou-se que ao utilizar os seguintes parâmetros de processo para eletrofiação: vazão de 1,0ml/h e tensão de 18KV para solução de PVP/PM, foi possível de se obter filmes de boa uniformidade e com poucos *beads*, como observado na figura 5.3.

Após a análise das imagens, foi realizado o processo de eletrofiação das soluções poliméricas acrescidas de CCP a 5%.

A figura 5.6 apresenta a morfologia dos cristais de CCP e Figura 5.7 apresenta a morfologia da nanofibra contendo CCP. Observa-se que, através da comparação com as figuras 5.3 e 5.7, a adição de CCP não altera as características do sistema, mantendo as dimensões das fibras e o seu enovelamento.

Figura 5.6 - Cristais de CCP. Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (aumento de 350 x)

Figura 5.7 - Fibras de PVP/PM contendo CCP a 5%. Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (magnitude 80000x)

5.3.2 Análise Térmica

Os perfis de DSC das matérias primas, cloreto de cetilpiridíneo (CCP) e dos polímeros PVP e PM foram avaliados, assim como os filmes nanofibrílicos de PVP/PM com e sem CCP, estão representados no gráfico 5.4.

Lab: METTLER

STAR® SW 9.30

Gráfico 5.4 - Perfis de DSC: (a) CCP; (b) Polímero PM; (c) Polímero PVP; (d) Filme nanofibrílico PVP/PM sem CCP e (e) Filme nanofibrílico PVP/PM com CCP (n=3)

O fármaco CCP apresentou um pico na faixa de 85 °C, correspondente a temperatura de fusão e outro pico na temperatura de 240 °C, conforme trabalhos anteriores de Krajisnik et al., 2011. A presença destes picos não foi detectada no termograma da nanofibra contendo este ativo. Estes termogramas avaliados juntamente sugerem que o processo de eletrofiação da nanofibra produziu uma diminuição na cristalinidade do CCP e/ou conferiu a este fármaco um estado próximo ao amorfo.

5.3.3 Análise química: Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR dos filmes nanofibrílicos de PVP/PM contendo ou não CCP apresentaram picos semelhantes com predominância das características de seus polímeros precursores e são apresentados no gráfico 5.5.

Gráfico 5.5 - Perfis de FTIR de: (a) Cloreto de Cetilpiridíneo; (b) Polímero PM; (c) Polímero PVP; (d) Filme nanofibrílico PVP/PM sem CCP e (e) Filme nanofibrílico PVP/PM com CCP (n=3)

5.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE CCP NOS FILMES NANOFIBRÍLICOS

O estudo da eficiência de encapsulação de CCP demonstrou que os filmes poliméricos liberaram 99% da quantidade do fármaco inicialmente encapsulado.

5.5 ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DAS NANOFIBRAS COM O PRINCÍPIO ATIVO CCP

O estudo da cinética de liberação do CCP *in vitro* (Gráfico 5.6) demonstrou que 78% do princípio ativo contido nas nanofibras foi liberado durante os 300 primeiros minutos de ensaio com perfil de liberação gradativa. A avaliação do filme nanofibrílico branco (sem CCP) também foi realizada para observar se havia algum tipo de interferência entre os polímeros que constituem a solução, como também presença de impurezas.

Gráfico 5.6 - Cinética de liberação do fármaco CCP incorporado em filme nanofibrílico constituído de PVP:PM:CCP (10:10:1) durante período de 1440 min (n=3) média aritmética

5.6 ESTUDO DE PERMEAÇÃO DE CCP EM MEMBRANA BIOLÓGICA OBTIDA DE SUÍNOS

O estudo da cinética de permeação do fármaco CCP contido nos filmes nanofibrílicos foi realizado em mucosa de esôfago suíno que apresenta características semelhantes à da mucosa bucal humana (Diaz-Del Consuelo et al., 2005). Observou-se que não houve permeação através da membrana mucosa pelo CCP.

5.7 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO PARA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A CEPAS DE *C. ALBICANS*

Antes do teste de disco-difusão propriamente dito, avaliou-se o diâmetro dos discos nanofibrílicos mais apropriado para realização do teste e avaliou-se o método de esterilização dos mesmos discos.

5.7.1 Diâmetro dos discos de filmes nanofibrílicos

Os discos de filme nanofibrílico sem fármaco sofreram contração (18,9%) e alguns deles apresentaram um halo de inibição (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Diâmetros dos discos de filme nanofibrílico sem fármaco

Amostra	Disco inicial (mm)	Disco final (mm)	Halo (mm)	H-Df	Amostra	Disco inicial (mm)	Disco final (mm)	Halo (mm)	H-Df
1	19	12	0	0	9	19	15	22	7
2	19	15	0	0	10	19	16	23	7
3	19	13	0	0	11	19	18	24	6
4	19	15	21	6	12	19	15	22	7
5	19	15	20	5	13	19	16	23	7
6	19	18	24	6	14	19	14	0	0
7	19	15	22	7	15	19	18	0	0
8	19	16	23	7	Média	19	15,4	14,9	3,4

H-Df= diferença halo- diâmetro final

5.7.2 Avaliação da esterilização dos filmes nanofibrílicos

Feita a leitura das placas no teste de esterilização, observou-se que não houve crescimento de micro-organismos nas placas (Tabela 5.3): todas as doses foram eficazes.

Tabela 5.3 - Resultados da avaliação de crescimento de micro-organismos em ágar BHI após teste de esterilização por raio Gama

PI	DOSE (KGy)	CRESCIMENTO	PI	DOSE (KGy)	CRESCIMENTO
21	10	Negativo	31	30	Negativo
22	10	Negativo	32	30	Negativo
23	10	Negativo	34	40	Negativo
24	15	Negativo	35	40	Negativo
25	15	Negativo	36	40	Negativo
26	15	Negativo	40B	40	Negativo
27	20	Negativo	41B	40	Negativo
28	20	Negativo	42B	40	Negativo
29	20	Negativo	37B	10	Negativo
30	30	Negativo	38B	10	Negativo
			39B	10	Negativo

5.7.3 Resultado de teste difusão para cada grupo:

5.7.3.1 Susceptibilidade de *C. albicans* frente ao CCP contido em filmes nanofibrílicos

Assim, como demonstrado na tabela 5.4 a seguir, primeiramente foi observado que os discos sofreram contração (34,7%) após 48h na estufa. Observou-

se também que para as concentrações de 5% e 2,5%, houve susceptibilidade de *C. albicans* ao CCP (parte azul da coluna, na tabela 5.4), demonstrada pelo halo de inibição presente além dos diâmetros inicial e final dos discos nanofibrílicos. Dentro das amostras com a mesma concentração houve halos de inibição diferentes.

Tabela 5.4 - Inibição produzida pelo CCP em discos nanofibrílicos

Concentração %CCP	Peso disco (mg)	Massa CCP/disco (mg)	Diâmetro inicial (mm)	Diâmetro final (mm)	Halo (mm)	H-Df
5	5,6	0,28	19	13,1	21,3	8,4
2,5 *	5,8	0,14	19	12,5	20,3	7,8
1,25	5,3	0,06	19	12,2	18	5,8
0,05	7,3	0,0036	19	11,8	16,1	4,3

Média aritmética (n=6) dos valores. * CFM Cores: Azul: suscetível; Rosa: não suscetível H-Df= diferença halo- diâmetro final

5.7.3.2 Susceptibilidade de *C. albicans* frente ao CCP contido em disco de papel-filtro

Discos de papel-filtro contendo CCP a 5% produziram halo bactericida, observado em todas as amostras, apresentando em média 26 mm de diâmetro (Tabela 5.5). Os discos de papel-filtro não sofreram contração, pelo contrário, durante a medição do diâmetro final do disco, foi verificada a presença de algumas amostras com mais de 19 mm (diâmetro inicial).

Tabela 5.5 - Halos de inibição produzidos por discos de papel-filtro contendo CCP 5%

Am.	Fungicida (mm)	Disco inicial (mm)	H-Df	Disco final (mm)	Am.	Fungicida (mm)	H-Df	Disco inicial (mm)	Disco final (mm)
1	25	19	6	19	9	29	8	19	21
2	26	19	7	19	10	26	7	19	19
3	27	19	7	20	11	27	8	19	19
4	20	19	0	20	12	27	7	19	20
5	26	19	7	19	13	27	7	19	20
6	26	19	7	19	14	27	7	19	20
7	25	19	6	19	15	27	8	19	19
8	26	19	6	20	Média	26,06	6,5	19	19,2

(n=15) H-Df= diferença halo- diâmetro final

5.7.3.3 Susceptibilidade de *C. albicans* frente ao miconazol contido em disco de filme nanofibrílico

Discos de filme nanofibrílico contendo miconazol a 5% produziram halos bactericida e bacteriostático. Nas amostras de filmes nanofibrílicos contendo miconazol, os halos apresentaram em média 37 mm de diâmetro com ação bacteriostática e 17,3 mm com ação bactericida. Os discos de filme nanofibrílico sofreram contração (38,9%) como exposto na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Halos de inibição produzidos por discos de filme nanofibrílico contendo miconazol 5%

Amostra	Peso (mg)	Fungistático (mm)	H-Df (Fo)	Fungicida (mm)	H-Df (Fc)	Disco inicial (mm)	Disco final (mm)
1	3	37	26	15	4	19	11
2	3	35	23	15	3	19	12
3	6	37	26	16	5	19	11
4	8	35	23	19	7	19	12
5	4	38	26	20	8	19	12
6	5	40	28	19	7	19	12
Média	4,3	37	25,3	17,3	5,6	19	11,6

(n=6) H-Df (Fo)= diferença halo fungistático- diâmetro final H-Df (Fc)= diferença halo fungicida- diâmetro final

5.7.3.4 Susceptibilidade de *C. albicans* frente ao miconazol contido em disco de papel-filtro

As amostras de discos de papel-filtro contendo miconazol demonstraram halos maiores em comparação aos discos de filme nanofibrílico com o mesmo princípio ativo. Estes halos apresentaram em média 45,7 mm de diâmetro com ação bacteriostática e 23,8 mm com ação bactericida. Os discos de papel-filtro não sofreram contração (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 - Halos de inibição produzidos pelos discos de papel-filtro contendo miconazol 5%

Amostra	Fungistático (mm)	H-Df (Fo)	Fungicida (mm)	H-Df (Fc)	Disco inicial (mm)	Disco final (mm)
1	45	26	35	16	19	19
2	42	22	21	1	19	20
3	45	25	22	2	19	20
4	45	26	21	2	19	19
5	40	21	22	3	19	19
6	46	26	23	3	19	20
7	45	25	24	4	19	20
8	48	29	24	5	19	19
9	52	32	22	2	19	20
10	49	29	24	4	19	20
Média	45,7	26,1	23,8	4,2	19	19,6

(n=10)

H-Df (Fo)= diferença halo fungistático- diâmetro final H-Df (Fc)= diferença halo fungicida- diâmetro final).

5.7.3.5 Susceptibilidade de *C. albicans* frente aos discos nanofibrílicos sem princípio ativo

Os discos de filme nanofibrílico sem princípio ativo sofreram contração (18,9%) e alguns deles apresentaram um halo de inibição (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Discos de filme nanofibrílico sem princípio ativo

Amostra	Disco inicial (mm)	Disco final (mm)	Halo (mm)	H-Df	Amostra	Disco inicial (mm)	Disco final (mm)	Halo (mm)	H-Df
1	19	12	0	0	9	19	15	22	7
2	19	15	0	0	10	19	16	23	7
3	19	13	0	0	11	19	18	24	6
4	19	15	21	6	12	19	15	22	7
5	19	15	20	5	13	19	16	23	7
6	19	18	24	6	14	19	14	0	0
7	19	15	22	7	15	19	18	0	0
8	19	16	23	7	Média	19	15,4	14,9	3,4

(n=6) H-Df= diferença halo- diâmetro final)

5.7.3.6 Susceptibilidade de *C. albicans* frente aos discos de papel-filtro sem princípio ativo

Os discos de papel-filtro sem princípio ativo não sofreram contração nem apresentaram halo de inibição (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Discos de papel-filtro sem princípio ativo

Amostra	A	B	C	D
Diâmetro inicial	19 mm	19 mm	19 mm	19 mm
Diâmetro final	19 mm	19 mm	19 mm	19 mm
Halo inibição	0	0	0	0

(n=4)

5.8 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DO TESTE DE SUCEPTIBILIDADE

Gráfico 5.7 - Histograma representativo da média $\pm$ EP (erro padrão) dos valores de diâmetro final (mm) dos discos (após contração) e do diâmetro dos halos de inibição fungicida no teste de susceptibilidade de *Candida albicans* aos fármacos conforme o grupo. CCP=Cloreto de Cetilpiridíneo; MCZ=Miconazol; nf=nanofibra

Gráfico 5.8 - Histograma das médias $\pm$ EP (erro padrão) dos valores do diâmetro (mm) dos halos de inibição no teste de susceptibilidade de *Candida albicans* aos fármacos conforme o grupo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,0001$ (ANOVA). CCP=Cloreto de Cetilpiridíneo; MCZ=Miconazol; nf=nanofibra

Figura 5.8 - Resultado de susceptibilidade através de teste de disco difusão em placa com Agar Mueller-Hinton inoculada com *C. albicans*: em A, disco com CCP 5% em nanofibra; em B, CCP em disco de papel-filtro; C, miconazol 5% em disco de nanofibra; D, disco de nanofibra sem fármaco; E, miconazol em disco de papel- filtro. Em A, medição com paquímetro

6 DISCUSSÃO

Nossa principal questão, relativa ao desenvolvimento deste trabalho, foi a de desenvolver um método de tratamento alternativo para infecções orais causadas por *Candida* onde a frequência de administração das formulações pudesse ser reduzida, assim como os seus efeitos colaterais e, além disso, que pudesse aumentar a adesão do paciente ao tratamento. Desta maneira, surgiu a possibilidade de desenvolver um sistema que liberasse o princípio ativo, neste caso um antisséptico representado pelo cloreto de cetilpiridíneo (CCP), lentamente e, consequentemente aumentasse a biodisponibilidade do fármaco em contato com a mucosa bucal.

O sistema de liberação lenta de escolha foi filme nanofibrílico por apresentar características favoráveis à aplicação em mucosa bucal, tais como maleabilidade e grande área superficial de contato (Huang et al, 2003; Teo; Ramakrishna, 2006).

Para desenvolver este sistema de liberação lenta de fármaco, houve necessidade da obtenção de filmes nanofibrílicos produzidos através de um processo de eletrofiação e posterior caracterização destes filmes. A utilização do processo de eletrofiação possibilitou a obter um produto final (Figura 5.3) em escala nanométrica, que aumenta a área de superfície de contato. Ainda, que é uma forma viável e eficiente de encapsulação de fármacos em nanofibras poliméricas, sendo um processo relativamente simples, observando-se as variáveis aplicadas durante o processo para produzir nanofibras mais uniformes.

Com isso, foram produzidos filmes nanofibrílicos a partir de polímeros sintéticos contendo o princípio ativo (CCP) e foi realizada sua caracterização quanto à análise físico-química, avaliação da cinética de liberação do princípio ativo pela nanofibra e a cinética de permeação do princípio ativo (incorporado em nanofibra) em membrana biológica, além de realizar estudo microbiológico *in vitro* com amostras de filmes nanofibrílicos frente à cepa de *Candida albicans*, a fim de comprovar que: o CCP seria encapsulado em nanofibras poliméricas e que após sua encapsulação, seria liberado lentamente durante certo intervalo de tempo, a permeação do CCP não ocorreria através de membrana biológica e que a eficácia antifúngica do CCP encapsulado em nanofibras ocorreria frente a cepas de *C. albicans*, além de determinar a concentração do antisséptico a ser incorporada para obter essa eficácia.

A revista da literatura referente às infecções orais causadas por *Candida* evidencia o aumento em sua incidência de uma maneira global, seja pelo advento do vírus da imunodeficiência humana e da AIDS ou pelo aumento de procedimentos médicos invasivos e ampla utilização de terapias imunossupressoras e de antibióticos de largo espectro (Scully et al., 1994; Lakshman et al., 2009; Williams; Lewis 2011). O tratamento para estas infecções geralmente preconiza o uso de antifúngicos, sejam ele de uso tópico ou sistêmico, os quais apresentam diversos efeitos colaterais variando desde sabor desagradável até toxicidade renal, medular, cardiovascular e neurológica (Webb et al., 1998c; Muzyka; Somerman, 2006; Scully et al., 1994), além da possibilidade de resistência aos antifúngicos.

Outros fármacos também têm sido estudados como alternativa medicamentosa para o tratamento de candidoses orais, como os antissépticos disponíveis comercialmente para uso tópico oral. Esta classe de fármacos tem demonstrado propriedades antifúngicas, como a clorexidina, cloreto de cetilpiridíneo (CCP), triclosan entre outros (Giuliana et al., 1997; Powderly et al., 1999; Pizzo et al., 2001; Santos, 2002). No entanto, o tempo de ação dos princípios ativos contidos nos enxaguatórios bucais comerciais é muito pequeno, e para que se atinja o efeito terapêutico desejado, há necessidade da realização de vários bochechos, o que dificulta a adesão do paciente ao tratamento (Samaranayake; Holmstrup, 1989; Giuliana et al., 1997; Powderly et al., 1999; Pizzo et al., 2001; Santos, 2002). Havia a necessidade de prolongar o tempo de ação do fármaco e viu-se a possibilidade de aumentar a disponibilidade do fármaco por mais tempo aplicando-se o sistema de liberação lenta de fármaco, como o desenvolvido neste trabalho, filmes nanofibrílicos com princípio ativo incorporado preparados em escala nanométrica através de processo de eletrofiação.

Ao realizar o preparo e caracterização das soluções poliméricas utilizadas neste estudo, pode-se observar que a adição de CCP, assim como o PM, às soluções poliméricas afeta de maneira significativa ($p < 0,0001$) as características de condutividade de todas as soluções poliméricas, o que poderia facilitar o processo de eletrofiação, já que este depende da condutividade da solução (Tabela 5.1, Gráfico 5.1 e 5.2). Provavelmente devido ao fato de o CCP ser um sal de amônia quaternária da classe dos surfactante catiônicos, ou seja, é iônico e portanto, aumenta a condutividade elétrica da solução e, conseqüentemente, reduz a resistência elétrica ao meio.

Já em relação à viscosidade, o PVA foi muito mais viscoso que o PVP (quase 5x) e que o PVP/PM (mais de 5x). O CCP não interferiu em nenhuma solução, mas a adição do polímero PM melhorou a viscosidade significativamente (Gráfico 5.2).

Quanto à tensão superficial, o resultado estatístico acusa diferença significativa entre vários grupos, mas podemos observar acentuada diminuição do parâmetro quando o CCP foi incorporado ao PVA (um terço). A tensão superficial do PVA foi maior (o dobro) que para o PVP com ou sem PM ou CCP (Gráfico 5.3). Desse modo, devido a menor viscosidade, menor tensão superficial e maior condutividade (entre as soluções com PVP), a solução PVP/PM apresenta maior vantagem, acentuada pelo CCP, para formar o filme nanofibrilico mais uniforme, confirmado na análise microscópica (sem CCP) na figura 5.2.

Em estudo prévio piloto sobre o preparo dos filmes nanofibrilicos através do processo de eletrofiação, pode-se observar que as variáveis do processo (distância da ponta da cânula até o coletor, vazão de alimentação da seringa, tensão aplicada) interferem diretamente no processo de eletrofiação propriamente dito, além de interferir na uniformidade e diâmetro das fibras produzidas, resultando em fibras de diâmetro micrométrico e formação de *beads* (gotas de acúmulo de polímeros), assim neste estudo, os valores dessas variáveis foram fixados para que não fossem fatores de variação.

A observação dos filmes nanofibrilicos de PVA (Figuras 5.4 e 5.5) e PVP/PM sem CCP (Figuras 5.2 e 5.3) foi realizada por imagens de microscopia eletrônica de varredura para determinação de alguns dos parâmetros da eletrofiação. A partir da observação das imagens do PVA foi possível avaliar como as alterações na tensão e na vazão influenciam na morfologia das fibras, variando de 11 KV para 22 kV e de 2,5 mL/h para 2,0 mL/h, respectivamente, melhoram o processo de eletrofiação, sendo a primeira (Figura 5.4) com fibras em escala micrométricas e a segunda (Figura 5.5), nanométrica. Desta forma foi possível, juntamente com os dados obtidos na literatura, determinar os parâmetros do processo de eletrofiação.

Assim como os resultados obtidos por Heikkilä e Harlin (2008), pode-se observar que fibras formadas a partir de uma mesma solução de PVA com distância de trabalho fixada em 10 cm, apresentaram maior uniformidade quanto ao seu diâmetro e menor formação de *beads* quando eletrofiadas com menor vazão de alimentação da cânula (2,0mL) e maior tensão elétrica (22kV) (Figuras 5.4 e 5.5).

Com os resultados obtidos após as análises de DSC e FTIR, pode-se observar que o fármaco CCP sofreu alterações em algumas de suas características como pico de fusão, após o processo de eletrofiação. No entanto, os filmes nanofibrílicos avaliados conservaram as características dos seus polímeros estruturantes, sendo um indício de que o CCP apresenta pouca interação com os polímeros estudados. Estas observações sugerem que o processo de eletrofiação produziu uma diminuição na cristalinidade do CCP e/ou conferiu a este fármaco um estado próximo ao amorfo, características que indicam que houve encapsulação do fármaco pela nanofibra (Gráficos 5.4 e 5.5).

Este fato é de grande importância quando se leva em consideração que, para existir eficiência em um sistema de liberação transmucosa, o princípio ativo deve estar encapsulado nas fibras e apresentar maior atração físico-química com a mucosa do que com os polímeros para que ocorra migração no sentido nanofilme-mucosa, a ser comprovado em outros estudos.

O estudo da cinética de liberação do CCP *in vitro* demonstrou que 78% do princípio ativo encapsulado nas nanofibras foi liberado durante os 300 primeiros minutos de ensaio (Gráfico 5.6). Aos cinco minutos de ensaio (ponto vermelho no Gráfico 5.6), a concentração de CCP liberada pelo filme foi de 3,99 µg/ml (3,17% do fármaco incorporado, ou seja, o CCP em concentração de 0,16% ou 1,6 µg/ml) que é cerca de 20 vezes maior que a CFM obtida por Santos (2002) de 0,007% (0,07 µg/ml). A taxa de liberação foi decaindo até o tempo de 24h, mas ainda assim permanecendo acima de 50% da concentração inicial. Estudos microbiológicos são necessários para comprovar se, nestas condições de liberação, o CCP apresenta atividade antifúngica frente à *Candida spp.*

Através dos resultados obtidos com o estudo de permeação de CCP em membrana biológica pode-se observar que o fármaco não atravessa a membrana mucosa na concentração testada. Isto é um indício de que sua utilização futura provavelmente é segura quanto aos níveis tóxicos de CCP no organismo, precisando de análise de toxicidade em estudos posteriores.

Observou-se que a esterilização dos filmes nanofibrílicos por raio Gama Co60 resultou num método eficaz, porém seria interessante realizar outros estudos com doses inferiores a 10 kGy e com outros métodos de esterilização que não alterassem as propriedades dos polímeros e do fármaco assim como a estrutura dos filmes nanofibrílicos (tabela 5.3).

No nosso estudo, propusemos avaliar filmes nanofibrílicos contendo o mesmo princípio ativo utilizado em enxaguatórios bucais (CCP) a fim de que sejam utilizados como alternativa para o tratamento das superfícies das mucosas orais afetadas por *Candida*, pressupondo efeito antifúngico como já demonstrado na literatura (Giuliana et al., 1997; Giuliana et al., 1999; Levy et al., 1999; Lefebvre et al., 2001; Santos, 2002).

Observamos que a ação antifúngica do CCP permanece inalterada quando ele é encapsulado em nanofibras poliméricas, para tanto, a concentração de CCP encapsulada (2,5%) já apresentou ação fungicida (gráfico 5.7 e 5.8; tabela 5.4), e deve ser maior que a utilizada em enxaguatórios comuns (0,05%), como por exemplo, Cepacol[®]. Apesar da necessidade de alta concentração de CCP, o filme nanofibrílico apresenta a vantagem de liberar o fármaco lentamente, graduando a concentração de CCP liberada na mucosa. Isto também certamente diminuiria a frequência de uso e facilitaria a forma de aplicação do filme nanofibrílico na boca, o que levaria a uma maior adesão do paciente ao tratamento, além de possibilitar que o tratamento seja feito em pacientes com dificuldade motora, imobilizados ou incapacitados por terceiros. Porém, mais ensaios laboratoriais e posteriormente clínicos serão necessários para avaliar a eficiência do CCP incorporado em nanofibra no tratamento de infecções orais causadas por *Candida*.

A próxima concentração de CCP testada foi de 1,25%, onde não houve atividade fungicida do fármaco, motivo pelo qual é necessário realizar novos testes com valores de concentração entre 2,5% e 1,25% para obter um valor mais exato até onde há atividade fungicida. Também é necessário realizar testes utilizando micro-organismos organizados em biofilme, já que está comprovado que as células em biofilmes se comportam de maneira diferente que células planctônicas (Ramage et al., 2001).

Neste estudo também foi observado que os discos nanofibrílicos obtidos a partir de uma mesma amostra de filme apresentavam espessuras e pesos diferentes, portanto é desejável que os filmes apresentem espessura uniforme, pois desta maneira, experimentos dependentes da concentração poderiam apresentar resultados mais precisos.

Os discos nanofibrílicos utilizados apresentaram contração (Gráfico 5.7, tabela 5.4 para CCP, 5.6 para MCZ e 5.8 para filme sem princípio ativo) no seu diâmetro quando foram colocados em contato com o meio de cultura para o teste de

disco-difusão, o que nos leva a supor que semelhante contração poderá ocorrer quando o filme for aplicado sobre a mucosa bucal, diminuindo assim o campo de ação do fármaco. Testes complementares com outros polímeros poderão ser realizados na busca de filmes que sofram menor contração, mantendo o campo de ação do fármaco em superfície maior de mucosa bucal por mais tempo. A contração dos discos nanofibrílicos sofreu a influencia do princípio ativo, de apenas 19% quando sem princípio ativo, e de 35% para o CCP e de 39% para o MCZ (Gráfico 5.7).

A presença de halos de inibição em discos nanofibrílicos sem princípio ativo durante o teste de disco-difusão sugere que ocorre por fenômenos físicos como arrastamento ou oclusão das colônias de levedura durante a contração dos discos (uma vez que se formaram colonias dentro desse “halo”, figura 5.11, no disco D) ou ainda que a ação fungicida poderia acontecer não apenas por ação do CCP, mas também por outros mecanismos referentes à composição dos filmes nanofibrílicos.

Em contrapartida, a observação da formação de halo de inibição maior que 19 mm em alguns grupos testados, sem a formação de colônias dentro desse espaço (Figura 5.11, disco A) confirma que nos discos com concentração de 2,5% e 5% de CCP, realmente indica ação fungicida do fármaco, e não apenas ausência das leveduras por arrastamento ou oclusão.

Outra possibilidade da ação fungicida apresentada pelo disco nanofibrílico ser somatória da ação fungicida do princípio ativo à toxicidade da composição da nanofibra, para esclarecer este fato, estudos sobre toxicidade do CCP e dos polímeros constituintes dos filmes nanofibrílicos serão necessários para avaliar a viabilidade de sua utilização segura como alternativa ao tratamento de infecções orais por *Candida*.

Os discos nanofibrílicos com CCP 5% demonstraram menor halo de inibição quando comparados com os discos de papel-filtro com a mesma concentração, o mesmo ocorrendo com os discos nanofibrílicos e de papel de miconazol (Gráfico 5.8, Figura 5.11). Isto ocorre, provavelmente, porque o fármaco encapsulado na nanofibra não foi liberado na mesma concentração em que foi encapsulado e muito mais lentamente, não na mesma velocidade de liberação que ocorre em disco de papel-filtro. O disco de papel libera possivelmente a mesma concentração da inicial, porém pode também se esgotar mais rapidamente. A nanofibra atuando como um sistema de liberação lenta provavelmente altera a biodisponibilidade do fármaco,

cuja velocidade de liberação depende de diversos fatores, motivo pelo qual vemos novamente a necessidade de realizar outros estudos, como um teste de liberação controlada variando a concentração do fármaco, e ao mesmo tempo avaliar a eficácia fungicida.

No gráfico 5.8 pode-se observar que o halo produzido pelo disco nanofibrílico contendo miconazol a 5% foi ligeiramente menor ($p>0,05$) que o halo do disco nanofibrílico contendo CCP à 5%, isto não significa necessariamente que o miconazol tenha efeito fungicida inferior ao do CCP. Há a possibilidade de que o CCP seja liberado mais rapidamente da nanofibra devido ao seu menor peso molecular (CCP: 339,98 e MCZ: 416,12) (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), ou outras características físico-químicas ainda não avaliadas.

A atividade fungicida do CCP 2,5% e do MCZ 5%, ambos em filme nanofibrílicos, foi similar, mas somente o MCZ apresentou ação fungistática (Gráfico 5.8 e Figura 5.11). Essa grande ação fungistática do MCZ tanto em filme nanofibrílico quanto em disco de papel representa uma vantagem do miconazol em relação ao CCP, porém seus efeitos colaterais, como alteração do paladar, desconforto oral, náusea e maior risco de ocorrer resistência fúngica, tornam importante a pesquisa sobre fármacos alternativos a ele (Muzyka; Somerman, 2006; Niimi et al., 2010).

Quando em disco de papel-filtro, o miconazol a 5% apresenta maior ação fungistática que em disco nanofibrílico (diâmetro de halo de 45,8 mm vs 37 mm, respectivamente), provavelmente devido ao fato do primeiro ser liberado mais rapidamente na concentração inicial e o segundo, contido em um sistema de liberação gradual, necessitando de mais estudos para comprová-lo.

Este é o primeiro estudo que apresenta filmes nanofibrílicos contendo CCP como futura alternativa para tratamento de infecções orais causadas por *Candida*, não havendo ainda estudos similares para comparação. A vantagem na indicação de antissépticos para tratamento destas infecções, conforme já ressaltamos anteriormente, consiste na preservação dos antifúngicos para infecções fúngicas mais graves, evitando a maior disseminação de cepas resistentes, o acesso mais fácil e a custo menor da medicação alternativa para a população e, é claro, possivelmente à obtenção de um resultado terapêutico satisfatório.

Entretanto, os resultados deste estudo indicam a necessidade de análises complementares como: variações de concentração do princípio ativo, avaliação de

citotoxicidade, avaliação da adesividade do filme na mucosa bucal e ensaio microbiológico com biofilme, antes dos ensaios clínicos para avaliar a eficiência do CCP incorporado em nanofibra como alternativa terapêutica no tratamento de estomatite protética ou outras infecções fúngicas.

Este estudo trouxe uma contribuição dentro da área de nanotecnologia na área de liberação controlada de fármacos. Resultados importantes foram obtidos referentes à produção das nanofibras com a incorporação do fármaco CCP, o qual só existe na forma livre dentro da aplicação odontológica, abrindo a possibilidade de uma nova forma de veiculação, a qual não foi ainda apresentada na literatura, desde periódicos até patentes nacionais e internacionais.

No que concerne à avaliação do processo de eletrofiação, observa-se que é uma forma viável e eficiente de se encapsular fármacos em nanofibras poliméricas, sendo um processo relativamente simples e com a possibilidade de se fazer o escalonamento de processo, já que atualmente estão surgindo máquinas que permitem uma produção em maior escala, abrindo a possibilidade da transferência da tecnologia para o setor industrial brasileiro.

Pode-se estabelecer neste estudo uma série de correlações interessantes, que provavelmente não fomos capazes de esgotar nesta discussão, mas que certamente trarão desdobramentos futuros, além de poder contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de outras doenças bucais.

7 CONCLUSÕES

Nestas condições experimentais:

- A presença do CCP a 5% aumentou a condutividade tanto da solução de PVA, quanto das soluções de PVP e PVP/PM.
- A solução de PVA apresentou a maior condutividade, viscosidade e tensão superficial.
- Ambos, CCP e PM não alteram a tensão superficial da solução de PVP.
- A adição do polímero PM reduz a viscosidade do PVP, com ou sem CCP.
- A solução polimérica de PVP/PM forma um filme mais uniforme e com menos beads.
- A análise térmica sugere que a eletrofiação da nanofibra diminui a cristalinidade do CCP, ficando este amorfo.
- A eficiência de encapsulação de CCP em PVP/PM alcança 99%.
- A taxa de liberação do CCP encapsulado foi lenta durante o período experimental de 24h.
- Quando em filme nanofibrílicos, a atividade fungicida do CCP 2,5% e do MCZ 5% foi similar, mas somente o MCZ tem ação fungistática.
- Quando em disco de papel-filtro, o miconazol à 5% apresenta menor ação fungicida que o CCP, porém ainda com ação fungistática.
- Ocorre contração dos filmes nanofibrílicos em contato com o meio de cultura, sendo mais intensa na presença do princípio ativo.
- O uso de raio gama Co60 é um método efetivo de esterilização para filmes nanofibrílicos. Neste estudo, foi eficaz a partir de 10 KGy.

- Os filmes nanofibrílicos de PVP/PM com CCP têm potencial para uso como alternativa para tratamento de infecções orais causadas por *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS¹

Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. Br Dent J. 1979;147:267-72.

Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. Arch Oral Biol. 1980;25:1-10.

Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Biotechnol Adv. 2010;28:325-47.

Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. J Oral Pathol. 1981;10:65-80.

Budtz-Jorgensen E, Lombardi T. Antifungal therapy in the oral cavity. Periodontol. 2000;10:89-106.

Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. Community Dent Oral Epidemiol. 1975;3:115-9.

Budtz-Jorgensen, E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Acta Odontol Scand. 1990;48:37-43.

Budtz-Jorgensen, E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. Scan J Dent Res. 1974;82:151-90.

Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? J Dent Res. 1995;74:1152-61.

Ceschela GC, Maffeia P, Sforzina A, Borgiata SL, Yasina A, Ronchi C. In vitro permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenetyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis. Fitoterapia. 2002; 73(Suppl 1):44-52.

Costa RGF, Oliveira JE, Paula GF, Picciani PHS, Medeiros ES, Ribeiro C, Mattoso LHC. Eletrofição de polímeros em solução. Parte I: fundamentação teórica. Polímeros. 2012;22(2):170-7.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Costa RGF, Oliveira JE, Paula GF, Picciani PHS, Medeiros ES, Ribeiro C, Mattoso LHC. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte II: aplicações e perspectivas. *Polímeros*. 2012;22(2):178-85.

Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol*. 2010; May;18(5):195-204. doi: 10.1016/j.tim.2010.02.004. Epub 2010 Mar 6.

Diaz-Del Consuelo I, Jacques Y, Pizzolato GP, Guy RH, Falson F. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Arch of Oral Biol*. 2005;50:981-7.

Diaz-Del Consuelo ID, Pizzolato GP, Falson F, Guy RH, Jacques, Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *J Pharm Sci*, 2005;94, 2777-88.

Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 1998;25:411-5.

Doshi J, Reneker H D. Electrospinning process and application of electrospun fibers. *J App Polymer Sci*. 1995;35:151-60.

Durán N, Teixeira Z, Marcato PD. Topical application of nanostructures: solid lipid, polymeric and metallic nanoparticles In: Beck R, Guterres S, Pohlmann A, editors. *Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care*. New York:Springer. Chapter 4, p.66-99.

Ellepola AN, Samaranayake LP. Antimycotic agents in oral candidosis: an overview: 2. Treatment of oral candidosis. *Dent Update*. 2000;27:165–70,172-4.

Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol*. 1996;67:572-6.

Emami E, Grandmont P, Rompré PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. *J Dent Res*. 2008; 87(5):440-4.

Ettinger RL. The etiology of inflammatory papillary hyperplasia. *J Prosthet Dent*. 1975;34:254-61.

Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J*. 2010;55(1 Suppl):48-54.

Fathilah, AR, Himratul-Aznita, WH, Fatheen ARN, Suriani KR. The antifungal properties of chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride on oral *Candida*. *J Dent*. 2012;40:609-15.

Formhals A, inventor. Process and apparatus for preparing artificial threads. United States patent US 1975504. 1934.

Formhals A, inventor. Method and apparatus for spinning. United States patent US 2169962. 1939.

Formhals A, inventor. Artificial thread and method of producing same. United States patent US 2187306. 1940.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20:251-60.

Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Giangreco R. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1999;87(1):44-9.

Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Musotto GC, Giangreco R. *In vitro* antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. *J Periodontol*. 1997;68:729-33.

Guimarães KL, Ré MI. Lipid nanoparticles as carriers for cosmetic ingredients: the first (SLN) and the second generation (NLC) In: Beck R, Guterres S, Pohlmann A, editors. *Nanocosmetics and nanomedicines. New approaches for skin care*. New York: Springer; 2011. Chapter 5, p.101-122.

Hamers AD, Shay K, Hahn BL, Sohnle PG. Use of a microtiter plate assay to detect the rate of killing of adherent *Candida albicans* by antifungal agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1996;81:44-9.

Heikkilä P, Harlin A. Parameter study of electrospinning of Polyamide-6. *Eur Polymer J*. 2008;44:3067-79.

Hoesley C, Dismukes WE. Overview of oral azole drugs as systemic anti-fungal therapy. *Semin Resp Crit Care Med*. 1997;18:301–9.

Hoogstraate JA, Wertz PW. Drug delivery via the buccal mucosa. *Pharm Sci Technol*. 1998;1:7.

Huang Z, Zhang Y, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Sci Technol*. 2003;63:2223-53.

Hughes G A. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine*. 2005;1:22-30.

Jainkittivong A, Aneksuk V, Langlais RP. Oral mucosal lesions in denture wearers. *Gerodontology*. 2010;27:26-32.

Jeganathan S, Payne JA, Thean HPY. Denture stomatitis in an elderly edentulous Asian population. *J Oral Rehabil*. 1997;24:468-72.

Kenawy E, Abdel-Hay FI, El-Newehy MH, Wnek GE. Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems. *Mater Chem Phys*. 2009;113:296-302.

Kenawy E, Layman JM, Watkins JR, Bowlin GL. Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials*. 2003;24:907-13.

Kenawy E, Bowlin GL, Mansfield K, Layman J, Simpson, DG, Snaers, EH, Wnek, GE. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *J Control Release*. 2002;81:57-64.

Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011;49(2):171-7.

Kozlosky A, Sintov A, Moldovan M, Tal H. Inhibition of plaque formation by local application of a degradable controlled release system containing cetylpyridinium chloride. *J Clin Periodontol*. 1994;21:32-7.

Krajisnik D, Dakovic A, Milojevic M, Malenovic M, Kragovic M, Bogdanovic DB, Dondur V, Milic J. Properties of diclofenac sodium sorption onto natural zeolite modified with cetylpyridinium chloride. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;83:165-72.

Kulak Y, Arian A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil*. 1997;24:788-90.

Lakshman P, Samaranayake, W, Keung L, Lijian J. Oral mucosal fungal Infections. *Periodontology* 2000. 2009;49:39–59.

Lesse AJ. Antifungal agents. In: Smith CM, Reynard A. *Essentials of pharmacology*. Philadelphia: Saunders; 1995. p. 404–11.

Lefebvre CA, Wataha JC, Cicirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. *J Prosthet Dent*. 2001;85(4):352-6.

Levy CW, Roujeinikova A, Sedelnikova S, Baker PJ, Stuije AR, Slabas AR, Rice DW, Rafferty JB. Molecular basis of triclosan activity. *Nature*. 1999;(398):383-4.

Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59:1392-412.

López-Pintor, RM, Hernández G, de Arriba L, de Andrés A. Oral candidiasis in patients with renal transplants. *Med Oral Patol Cir Bucal*. 2013. doi:10.4317/medoral.18658.

Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng*. 2005;11(1/2):101-9.

MacEntee MI, Glick N, Stolar E. Age, gender, dentures and oral mucosal disorders. *Oral Dis*. 1998;4:32-6.

Malhotra N, Rao SP, Acharya S, Vasudev B. Comparative *in vitro* evaluation of efficacy of mouthrinses against *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* and *Candida albicans*. *Oral Health Prev Dent*. 2011;9:261-8.

Mikkonen M, Nyyssönen V, Paunio I, Rajala M. Prevalence of oral mucosal lesions associated with wearing removable dentures in Finnish adults. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1984;12:191-4.

Mohan, A. Formation and characterization of electrospun nonwoven webs. [master's thesis]. Raleigh: Faculty of North Carolina State University; 2002.

Monsenego P. Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study in vivo. *J Oral Rehabil.* 2000; 27:708-13.

Muzyka BC, Somerman M. Antifungal and antiviral agents. In: American Dental Association. ADA/ PBR guide to dental therapeutics. 4 ed. Chicago: ADA; p.217-20.

Nafee NA, Ismail FA, Boraie NA, Mortada LM. Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing. *Int J Pharm.* 2003;Oct 2;264(1-2):1-14.

Newton AV. Denture sore mouth, a possible aetiology. *Br Dent J.* 1962; 112:357-60.

Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology.* 2010;98:15-25.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque - past and recent concerns. *J Dent.* 1998;26:299-304.

Odds FC. *Candida and candidosis – a review and bibliography.* 2nd. London: Balliere Tindal; 1998. P.93-114.

Parvinen, T. Stimulated salivary flow rate, pH and lactobacillus and yeast concentrations in persons with different types of dentition. *Scand J Dent.* 1984;92: 412-8.

Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Control Release.* 2011. doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.027.

Pitten FA, Werner HP, Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J Hosp Infect.* 2003;55:108-15.

Pizzo G, Giuliana G, Milici ME, D'Angelo M. Effect of antimicrobial mouthrinses on the in vitro adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. Clin Oral Investig. 2001;Sep;5(3):172-6.

Powderly WG, Gallant JE, Ghannoum MA, Mayer KH, Navarro EE, Perfect JR. Oropharyngeal candidiasis in patients with HIV: suggested guidelines for therapy. AIDS Res Hum Retroviruses. 1999;15:1619–23.

Pupe CG, Villardi M, Rodrigues CR, Rocha HVA, Maia LC, Sousa VP, Cabral LM. Preparation and evaluation of antimicrobial activity of nanosystems for the control of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Int J Nanomed. 2011;6:2581-90.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;98:53-9.

Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother; 2001;45(9):2475-9.

Ranade VV, Hollinger MA. Drug Delivery Systems, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 2004.

Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis – Clinical challenges of a biofilm disease. Crit Rev Microbiol. 2011;37(4):328-36.

Reis CPR, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine. 2006;2:8-21.

Reneker, DH; Yarin, AL. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. J Appl Phys. 2000;87(9):4531-47.

Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE. Practice guidelines for the treatment of candidosis. Clin Infect Dis. 2000;30:662–78.

Rossi S, Sandri G, Caramella CM. Buccal drug delivery: A challenge already won? Drug Discov Today Technol. 2005;2(1):59-65.

Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1384-91.

Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine.* 2007;3:20-31.

Santarpia III RP, Pollock JJ, Renner RP, Spiechowicz E. An in vivo replica method for the site-specific detection of *Candida albicans* on the denture surface in denture stomatitis patients: Correlation with clinical disease. *J Prosthet Dent.* 1990;63:437-43.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Guida A, Petruzzi M, Serpico R. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Mar 1;16(1):e139-43.

Samaranayake LP, Holmstrup P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J Oral Pathol Med.* 1989;Dec;18(10):554-64.

Santos VA. Uso de antissépticos bucais no tratamento de estomatite protética. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2002.

Schou L, Wright C, Cumming C. Oral hygiene habits, dental plaque, presence of yeasts and stomatitis in institutionalised elderly in Lothian, Scotland. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1987;15:85-9.

Scholz AO, Wolff A, Schumacher A, Giannola LI, Campisi G, Ciach T, Velten T. Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device. *Drug Discov Today.* 2008;13(5-6):247-53.

Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol and Med.* 1994;5(2):125-57.

Sheehan DJ, Brown SD, Pfaller MA, Warnock DW, Rex JH, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Moore LS, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. Wayne (DA): National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2004. V.24. NCCLS Document M44-A.

Shrestha A, Rimal J, Rao A, Sequeira OS, Doshi D, Bhat GK. *In vitro* antifungal effect of mouth rinses containing chlorhexidine and thymol. *J Dent Sci.* 2011;6:1-5.

Silva MM, Mima EGO, Colombo AL, Sanitá PV, Jorge JH, Massucato SEM, Vergani CE. Comparison of denture microwave disinfection and conventional antifungal therapy in the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;114:469-79.

Sill TJ, Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29:1898-2006.

Singh S, Jain S, Muthu MS, Tiwari S, Tilak R. Preparation and evaluation of buccal bioadhesive films containing clotrimazole. *AAPS Pharm Sci Technol*. 2008;9(2):660-7.

Smart JD. Drug delivery using buccal-adhesive systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 1993;11:253-70.

Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Lett Appl Microbiol*. 2012;56:14-20.

Sritairat N, Nukul N, Inthasame P, Sansuk A, Prasirt J, Leewatthanakorn T, Piamsawad U, Dejrudee A, Panichayupakaranant P, Pangsomboon K, Chanowanna N, Hintao J, Teanpaisan R, Chaethong W, Yongstar P, Pruphetkaew N, Chongsuvivatwong V, Nittayananta W. Antifungal activity of lawsone methyl ether in comparison with chlorhexidine. *J Oral Pathol Med*. 2011;40:90-6.

Tari BF, Nalbant D, Dogruman AI F, Kustimur S. Surface roughness and adherence of *Candida albicans* on soft lining materials as influenced by accelerated aging. *J Contemp Dent Pract*. 2007;Jul 1;8(5):18-25.

Taylor G. Electrically driven jets. *Proc Roy Soc Lond A*. 1969;313:453-75.

Teo, WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006;17:14 R89 doi:10.1088/0957-4484/17/14/R01

Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol*. 2012;61:399-419.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of candida species in the oral cavity. *Austr Dent J*. 1998a; 43(1):45-50.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by candida species. *Austr Dent J*. 1998b;43(3):160-6.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Austr Dent J*. 1998c;43(4):244-9.

Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol*. 2011;3:5771.

Wilson J. The aethiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Brit Dent J*. 1998;185:380-4.

Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T. Effect of substrate hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses*. 2010;53:221-6.

Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65:104-120.

Zhang C, Yuan X, Wu L, Han Y, Sheng J; Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *Eur Polymer J*. 2005;41:423-32.

APÊNDICE A – ANOVA E TUKEY - TENSÃO SUPERFICIAL PARA 1%

Parameter	Data tensão				
Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	P<0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	899,7				
R squared	0,9973				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2250	5	450,0		
Residual (within columns)	6,003	12	0,5002		
Total	2256	17			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.01?	Summary	99% CI of diff
PVA vs PVA 5%CCP	16,94	41,48	Yes	***	14.45 to 19.43
PVA vs PVP	28,57	69,98	Yes	***	26.08 to 31.07
PVA vs PVP 5%CCP	28,44	69,66	Yes	***	25.95 to 30.93
PVA vs PVP/PM	30,95	75,80	Yes	***	28.46 to 33.44
PVA vs PVP/PM 5%CCP	30,83	75,50	Yes	***	28.34 to 33.32
PVA 5%CCP vs PVP	11,64	28,50	Yes	***	9.146 to 14.13
PVA 5%CCP vs PVP 5%CCP	11,51	28,18	Yes	***	9.015 to 14.00
PVA 5%CCP vs PVP/PM	14,01	34,32	Yes	***	11.52 to 16.50
PVA 5%CCP vs PVP/PM 5%CCP	13,89	34,02	Yes	***	11.40 to 16.38
PVP vs PVP 5%CCP	-0,1317	0,3224	No	ns	-2.623 to 2.360
PVP vs PVP/PM	2,375	5,817	No	*	-0.1159 to 4.867
PVP vs PVP/PM 5%CCP	2,253	5,517	No	*	-0.2386 to 4.744
PVP 5%CCP vs PVP/PM	2,507	6,140	Yes	**	0.01576 to 4.998
PVP 5%CCP vs PVP/PM 5%CCP	2,384	5,839	No	*	-0.1069 to 4.876
PVP/PM vs PVP/PM 5%CCP	-0,1227	0,3004	No	ns	-2.614 to 2.369

APÊNDICE B – ANOVA E TUKEY - CONDUTIVIDADE

Estatística Condutividade

Parameter

Table Analyzed

Data 1

One-way analysis of variance

P value P<0.0001

P value summary ***

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 6

F 3578

R squared 0,9993

ANOVA Table

Treatment (between columns) SS df MS 4526000 5 905100

Residual (within columns) 3036 12 253,0

Total 4529000 17

Tukey's Multiple Comparison Test

Mean Diff. q Signif? P < 0.05? Summary 95% CI of diff

PVA vs PVA 5%CCP -675,0 73,51 Yes *** -718.6 to -631.4

PVA vs PVP 816,3 88,89 Yes *** 772.7 to 859.9

PVA vs PVP 5%CCP 593,0 64,58 Yes *** 549.4 to 636.6

PVA vs PVP/PM 641,4 69,85 Yes *** 597.8 to 685.1

PVA vs PVP/PM 5%CCP 324,3 35,32 Yes *** 280.7 to 368.0

PVA 5%CCP vs PVP 1491 162,4 Yes *** 1448 to 1535

PVA 5%CCP vs PVP 5%CCP 1268 138,1 Yes *** 1224 to 1312

PVA 5%CCP vs PVP/PM 1316 143,4 Yes *** 1273 to 1360

PVA 5%CCP vs PVP/PM 5%CCP 999,3 108,8 Yes *** 955.7 to 1043

PVP vs PVP 5%CCP -223,3 24,32 Yes *** -266.9 to -179.7

PVP vs PVP/PM -174,9 19,04 Yes *** -218.5 to -131.2

PVP vs PVP/PM 5%CCP -492,0 53,57 Yes *** -535.6 to -448.3

PVP 5%CCP vs PVP/PM 48,43 5,274 Yes * 4.806 to 92.06

PVP 5%CCP vs PVP/PM 5%CCP -268,7 29,26 Yes *** -312.3 to -225.0

PVP/PM vs PVP/PM 5%CCP -317,1 34,53 Yes *** -360.7 to -273.5

	PVA	PVA 5%CCP	PVP	PVP 5%CCP	PVP/PM	PVP/PM 5%CCP
Number of values	3	3	3	3	3	3
Minimum	822,0	1497	10,52	234,0	185,4	459,0
25% Percentile	822,0	1497	10,52	234,0	185,4	459,0
Median	827,0	1503	10,66	234,0	186,1	522,0
75% Percentile	833,0	1507	11,96	235,0	186,2	528,0
Maximum	833,0	1507	11,96	235,0	186,2	528,0
Mean	827,3	1502	11,05	234,3	185,9	503,0
Std. Deviation	5,508	5,033	0,7941	0,5774	0,4359	38,22
Std. Error	3,180	2,906	0,4585	0,3333	0,2517	22,07
Lower 95% CI	813,7	1490	9,074	232,9	184,8	408,0
Upper 95% CI	841,0	1515	13,02	235,8	187,0	598,0

APÊNDICE C – ANOVA E TUKEY - VISCOSIDADE

Estatística Viscosidade

Parameter	Data 1					
Table Analyzed						
One-way analysis of variance						
P value	P<0.0001					
P value summary	***					
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes					
Number of groups	6					
F	29680					
R squared	0,9999					
ANOVA Table	SS	df	MS			
Treatment (between columns)	689300	5	137900			
Residual (within columns)	55,75	12	4,646			
Total	689400	17				
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff	
PVA vs PVA 5%CCP	32,33	25,98	Yes	***	26.42 to 38.25	
PVA vs PVP	376,2	302,3	Yes	***	370.3 to 382.1	
PVA vs PVP 5%CCP	371,5	298,6	Yes	***	365.6 to 377.4	
PVA vs PVP/PM	471,2	378,7	Yes	***	465.3 to 477.1	
PVA vs PVP/PM 5%CCP	470,0	377,7	Yes	***	464.1 to 475.9	
PVA 5%CCP vs PVP	343,9	276,4	Yes	***	338.0 to 349.8	
PVA 5%CCP vs PVP 5%CCP	339,2	272,6	Yes	***	333.3 to 345.1	
PVA 5%CCP vs PVP/PM	438,9	352,7	Yes	***	433.0 to 444.8	
PVA 5%CCP vs PVP/PM 5%CCP	437,7	351,7	Yes	***	431.8 to 443.6	
PVP vs PVP 5%CCP	-4,700	3,777	No	ns	-10.61 to 1.212	
PVP vs PVP/PM	95,00	76,34	Yes	***	89.09 to 100.9	
PVP vs PVP/PM 5%CCP	93,80	75,38	Yes	***	87.89 to 99.71	
PVP 5%CCP vs PVP/PM	99,70	80,12	Yes	***	93.79 to 105.6	
PVP 5%CCP vs PVP/PM 5%CCP	98,50	79,15	Yes	***	92.59 to 104.4	
PVP/PM vs PVP/PM 5%CCP	-1,200	0,9643	No	ns	-7.112 to 4.712	
	PVA	PVA 5%CCP	PVP	PVP 5%CCP	PVP/PM	PVP/PM 5%CCP
Number of values	3	3	3	3	3	3
Minimum	499,9	465,9	124,5	129,0	29,70	29,40
25% Percentile	499,9	465,9	124,5	129,0	29,70	29,40
Median	500,9	466,9	124,8	129,9	30,00	30,30
75% Percentile	502,9	473,9	125,7	130,2	30,30	33,90
Maximum	502,9	473,9	125,7	130,2	30,30	33,90
Mean	501,2	468,9	125,0	129,7	30,00	31,20
Std. Deviation	1,528	4,359	0,6245	0,6245	0,3000	2,381
Std. Error	0,8819	2,517	0,3606	0,3606	0,1732	1,375
Lower 99% CI	492,5	443,9	121,4	126,1	28,28	17,56
Upper 99% CI	510,0	493,9	128,6	133,3	31,72	44,84

APÊNDICE D – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CCP

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP N° 06/2013 referente ao projeto intitulado: "Análise microbiológica de cloreto de cetilpiridíneo em nanofibras poliméricas e perfil de permeação em mucosa suína" sob a responsabilidade de execução dos autores **Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti**, os alunos **Valdirene Alves dos Santos e Patricia Veronica Aulestia Viera e os Doutores Maria Helena Ambrosio Zanin e Adriano Marim de Oliveira**, foi analisado na presente data e considerado isento de análise da CEUA por utilizar amostras biológicas provenientes de porcos (*Sus scrofa domesticus*), mucosa jugal e de esôfago adquiridos em Frigorífico Rajá Ltda já disponíveis no Laboratório do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP.

São Paulo, 09 de abril de 2013.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEUA/FOUSP

ANEXO B – CERTIFICADO DE IRRADIAÇÃO DE PRODUTOS EMBRARAD

EMBRARAD Empresa Brasileira de Radiações Ltda. Av. Cruzada Bandeirante, 280 - V. Joviana - C. J. SP - CEP 06705-140 - Tel.: (11) 3546-4700 - CNPJ: 45.789.724/0002-85 - I.E.: 278.015.211.114 www.cbesa.com.br	
CERTIFICADO DE IRRADIAÇÃO DE PRODUTOS CERTIFICATE FOR IRRADIATION TREATMENT		Nº 245475	
Certificamos que o(s) produto(s) abaixo descrito(s) foi(foram) tratado(s) por energia ionizante (raios gama - Co60) conforme solicitação da Empresa: We certify that the product listed below has been treated by Ionizing Radiation (gamma rays - Co60) as solicited by the Company:			
MARIA HELENA AMBROSIO ZANIN			
NOTA FISCAL DO CLIENTE CLIENT INVOICE 038065	DATA DATE 16/05/2012	ORDEM DE SERVIÇO SERVICE ORDER ZANI.00001.12.E	DATA DO PROCESSO PROCESS DATE 18/05/2012
CODIGO CODE 000000	PRODUTO PRODUCT TESTE NANOFIBRA POLIMERICA	NOTA FISCAL INVOICE 038727	DATA DATE 23/05/2012
QUANTIDADE QUANTITY 21		UNIDADE UNIT UN	
OBSERVAÇÕES/NOTE			
UNIDADE DE DOSE ABSORVIDA DOSE ABSORBED UNIT: KG/CM ² /DOSE/HR		ASSINATURA DO RESPONSÁVEL AUTHORIZED OFFICER FERNANDO REICHMANN Responsável Técnico CREA: No. 068.558.746-2	

ANEXO C – RELATÓRIO TÉCNICO EMBRARAD

Relatório Técnico:

(TESTE DE COMPATIBILIDADE)

RT N°: C002692

1. Cliente: MARIA HELENA AMBROSIO ZANIN

2. Descrição do produto:

Produto: NANOFIBRA POLIMERICA

Quantidade: Sete amostras

3. Procedimento experimental:

Com o objetivo de avaliar os efeitos da radiação gama nas características do produto, as amostras foram submetidas às seguintes doses de irradiação conforme solicitação do cliente:

10 - 15 - 20 - 30 e 40 kGy (quilogray).

Obs.: Cada embalagem foi identificada com a dose alvo e recebeu selo radiosensível, indicativo de processo (amarelo-não tratado; laranja a vermelho – tratado).

4. Dosimetria:

Dose mínima absorvida pelo produto: Conforme descrição acima.

Tipo de dosímetro:

Red Perspex

Fabricante: Harwell Dosimeters (UK)

Batch n°:

LS

5. Espectrofotômetro:

Fabricante: Spectronic Instruments

Modelo: Genesys 20

Comprimento de Onda (nm):

640 nm

6. Conclusões:

- Não foram detectadas alterações visuais nas amostras, conforme observado nas fotos a abaixo.

Amostra antes do processo de irradiação.

Amostra irradiada com a maior dose de 40 kGy

- É importante salientar que durante o processo de irradiação ocorre a formação de um gradiente de doses, e desse modo existem pontos do material que recebem doses superiores àquelas definidas pelo cliente. Por esse motivo é essencial a definição de dose máxima por parte do cliente.

Dose mínima: dose necessária para atingir o objetivo desejado.

Dose máxima: dose de tolerância que não comprometa as características desejáveis do produto.

- Após a realização dos testes os produtos foram encaminhados ao cliente para avaliações pertinentes.

7. Ordem de serviço interna:

ZANI.00001.12.E

8. Data de realização do processo:

18/05/2012

9. Responsáveis:

Realizado por: Fábio Lemos

Ass.:

Aprovado por: Fernanda Oliveira

Ass.: