



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Rodrigo Henrique Saatkamp

**Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões revestidas por quitosana  
como carreadores de timol aplicadas a tratamentos de problemas da cavidade  
oral**

FLORIANÓPOLIS  
2019

Rodrigo Henrique Saatkamp

**Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões revestidas por quitosana como carreadores de timol aplicadas a tratamentos de problemas da cavidade oral**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Mestre em Química.  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Saatkamp, Rodrigo Henrique

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões  
revestidas por quitosana como carreadores de timol  
aplicadas a tratamentos de problemas da cavidade oral /  
Rodrigo Henrique Saatkamp ; orientador, Alexandre Luis  
Parize, 2019.

91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,  
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Nanoemulsões . 3. Revestimento por  
quitosana. 4. Timol. I. Parize, Alexandre Luis. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Química. III. Título.

Rodrigo Henrique Saatkamp

**Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões revestidas por quitosana como carreadores de timol aplicadas a tratamentos de problemas da cavidade oral**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Thiago Caon, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Daniela Zambelli Mezalira, Dr(a).

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Tatiane de Andrade Maranhão, Dr(a).

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química obtido pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

---

Prof. Dr. Marcus César Mandolesi Sá

Coordenador do Programa

---

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Orientador

Florianópolis, 15 de Julho de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão deste trabalho só foi possível devido ao empenho e colaboração de diversas pessoas e entidades. Dessa forma agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na realização do trabalho, em especial:

- A minha família que de alguma forma sempre esteve presente no processo;
- Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Luís Parize pelos ensinamentos e auxílios;
- A banca avaliadora: Prof. Dr. Thiago Caon, Prof.(a) Dr(a) Daniela Zambelli Mezalira, Prof.(a) Dr(a) Tatiane de Andrade Maranhão, pelo tempo disposto e pelas contribuições;
- Aos integrantes do laboratório POLIMAT e amigos;
- A UFSC e os laboratórios parceiros, POLISOL, LACBIO, LCME e a Central de análises do departamento de química da UFSC;
- Laboratório de farmacotécnica e cosmetologia e integrantes pelo auxílio nos testes de permeabilidade;
- A Capes pela concessão da bolsa de estudos;

Por fim, deixo um muito obrigado a todos os mencionados anteriormente, assim como, todos aqueles não mencionados, que de alguma maneira contribuíram e fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Com intuito de oferecer uma alternativa ao tratamento de problemas bucais, o presente estudo relata o preparo de nanoemulsões formadas por lecitina, Pluronic® P123 e óleo de semente de uva (OSU) como um sistema carreador para o timol, utilizando o método de emulsificação espontânea. A fim de promover a mucoadesão das amostras, as nanoemulsões (NE) foram revestidas por quitosana. As nanoemulsões não contendo e contendo timol (NEB e NET) e seus respectivos sistemas revestidos por quitosana (NEB@Qts e NET@Qts), foram caracterizadas por DLS, potencial zeta, TEM e DSC. NEB e NET apresentaram tamanho em torno de 208 e 160 nm de diâmetro, respectivamente, com morfologia esférica e valores negativos de potencial zeta. As NEB@Qts e NET@Qts apresentaram valores de potencial zeta positivos e tamanhos maiores para as nanopartículas, indicando que o recobrimento ocorreu. O sistema apresentou uma eficiência de encapsulação de 81% e a liberação *in vitro* foi realizada para a NET em água e em tampão saliva simulado, ambos seguiram o modelo cinético descrito pela equação de Korsmeyer-Peppas. A permeação do timol via estudos de liberação *ex vivo* foi realizada para as amostras NET e NET@Qts em célula de Franz, e apresentou dados promissores para a liberação do ativo na cavidade oral. Com o objetivo de incorporar características tecnológicas às NE, as amostras NEB@Qts e NET@Qts foram secas por spray drying e analisadas por DSC e SEM, onde obteve-se partículas esféricas de 700 nm carregadas com OSU e timol, na qual NET@Qts manteve o timol no produto de secagem.

**Palavras-chave:** Nanoemulsão. Lecitina. Timol. Quitosana.

## ABSTRACT

In order to offer an alternative to the treatment of oral problems, the present study reports the preparation of nanoemulsions formed by lecithin, Pluronic® P123 and grape seed oil as a carrier system for thymol, using the method of spontaneous emulsification. To obtain the mucoadhesion characteristic of the samples, nanoemulsions (NE) were coated with chitosan. The nanoemulsions that does not contain and the one that contain thymol, called NEB and NET respectively, and their respective chitosan coated systems (NEB@Qts and NET@Qts), were characterized by DLS, zeta potential, TEM and DSC. NEB and NET revealed size around 208 and 160 nm of diameter, respectively, with spherical morphology and negative values of zeta potential. The NEB@Qts and NET@Qts exhibit positive zeta potential values and larger sizes for the nanoparticles, indicating that the coating occurred. The system showed an encapsulation efficiency of 81%. The *in vitro* release was performed for the NET in water and in simulated saliva buffer; both followed the kinetic model described by the Korsmeyer-Peppas equation. The permeation of thymol via *ex vivo* release studies was performed for the NET and NET@Qts samples in Franz cell and presented promising data for the release of the active substance into the oral cavity. To aim technological features into the NE, the samples NEB@Qts and NET@Qts were dried by spray drying and analyzed by DSC and SEM, which resulted in spherical particles of 700 nm loaded with OSU and thymol, in which NET@Qts maintained thymol in the drying product.

**Keywords:** Nanoemulsion. Lecithin. Thymol. Chitosan.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de uma emulsão O/W e W/O .....	20
Figura 2 – Representação esquemática de microemulsão (a) e NE (b). .....	21
Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de formação da uma NE espontânea.....	23
Figura 4 - Representação estrutural e esquemática da molécula de PC (Lecitina).....	24
Figura 5 - Representação da estrutura do P 123, onde X = 20, Y = 70 e Z = 20. ....	26
Figura 6 – Representação esquemática de uma possível organização de uma micela entre lecitina, P123 e um ativo hidrofóbico. ....	27
Figura 7 - Estrutura química do timol.....	29
Figura 8 - Estrutura química da quitina e Qts. ....	30
Figura 9 - Representação esquemática da câmara de difusão de Franz. ....	41
Figura 10 – Dados de tamanho e PDI adquiridos a partir do ângulo de 90°, dos dias 1 (Barra azul), 7 (Barra verde) e 15 (Barra laranja) para as formulações de NEB1 a NEB9 (A), NEB10 a NEB18 (B) e NEB19 a NEB27 (C). ....	44
Figura 11 - Avaliação da estabilidade das amostras NEB10 (A) e NET1 (B) por tamanho de raio no ângulo de 90° (■) e potencial zeta (●). ....	46
Figura 12 – Curvas correlação G (t) para o ângulo de 90° (linha sólida) e a respectiva distribuição de tamanho (linha tracejada), assim como a dependência da frequência de relaxação ( $\Gamma$ ) em função de $q^2$ para as amostras NEB10 (A) e (B), NET1 (C) e (D) e NET2 (E) e (F). ....	49
Figura 13 - Imagens de TEM da amostra NEB@Qts em que em (a) e (b) a barra de escala é de 0,2 $\mu\text{m}$ . Para a amostra NET@Qts em que em (c) a barra de escala é de 2 $\mu\text{m}$ e em (d) é de 0,2 $\mu\text{m}$ . ....	51
Figura 14 - Curvas de DSC dos componentes puros timol (a), P123 (b), OSU (c) e lecitina (d). ....	53
Figura 15 - Curvas de DSC dos componentes puros timol (a), lecitina (b) e OSU (c), assim como dos sistemas NEB10 (d) e NET1 (e). ....	54
Figura 16 - Curvas de DSC referentes aos compostos puros timol (a), OSU (b) e lecitina (c), as interações entre estes componentes lecitina + OSU (d) e lecitina + OSU + Timol (e), juntamente com os sistemas NEB10 (f) e NET1 (g). ....	55

Figura 17 - Curvas de DSC do timol (a) OSU, (b) e a mistura entre 48,2 % de timol e 51,8% de OSU (c).....	55
Figura 18 - Tamanho de partícula pelo tempo das amostras NEB@Qts (A) e NET@Qts (B). .....	57
Figura 19 - Índice de polidispersidade (PDI), pela porcentagem de solução de Qts, nos dias 1, 7, 15 e 30, para o conjunto de amostras NEB@Qts (A) e NET@Qts (B). .....	59
Figura 20 - Dados de potencial zeta referente as amostras NEB@Qts (A) e NET@Qts (B) com diferentes porcentagens de Qts.....	59
Figura 21 - Soluções compostas por diferentes porcentagens de solução de Qts 0,3 % e NE, tanto para os sistemas NEB@Qts (A) e NET@Qts (B). .....	61
Figura 22 - (A) Função de correlação G (t) para o ângulo de 90° (linha sólida) e sua respectiva distribuição de tamanho (linha tracejada), assim como a dependência de q <sup>2</sup> em função da frequência de relaxação (Γ) (B) para a amostra NEB@Qts.....	62
Figura 23 - (A) Função de correlação G (t) para o ângulo de 90° (linha sólida) e sua respectiva distribuição de tamanho (linha tracejada), assim como a dependência de q <sup>2</sup> em função da frequência de relaxação (Γ) (B) para a amostra NET@Qts contendo 27 mg de timol. ....	62
Figura 24 - Curva de correlação para a amostra de Qts 0,3 % contendo 10% de NE com 128 mg de timol. ....	63
Figura 25 - Imagens de TEM da amostra NEB@Qts em que em (a) a barra de escala é de 1 μm e em (b) é de 0,5 μm. Para a amostra NET@Qts em que em (c) a barra de escala é de 1 μm e em (d) é de 0,5 μm. ....	64
Figura 26 - Curvas de liberação par a amostra NET em água (■) e tampão saliva (●).....	65
Figura 27 - Dados de permeabilidade para o timol em diferentes sistemas: (a) solução controle, (b) NET e (c) NET@Qts, apresentados no formato de massa de timol permeada por área (μg cm <sup>-2</sup> ) por tempo (A) e porcentagem de timol liberada pelo tempo (B).....	68
Figura 28 - Curvas de DSC para as amostras obtidas via secagem por atomização NEB@Qts {(f), (h)} e NET@Qts {(g), (i)} e seus respectivos componentes puros timol (a), P123 (b), OSU (c), lecitina (d) e Qts (e).....	73

Figura 29 - Curvas de DSC para os sistemas NEB@Qts (a) e NET@Qts (b). .....	74
Figura 30 – As imagens de SEM para a amostra NEB@Qts são apresentadas com magnificações de 500 vezes (a), 1500 vezes (b), 5000 vezes (c) e 10000 vezes (d). Para a amostra NET@Qts temos magnificações de 500 vezes (e), 1500 vezes (f), 5000 vezes (g) e 10000 vezes (h), secas via secagem por atomização. ....	75
Figura 31 - Gráfico referente ao plot da viscosidade reduzida vs concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ), com um $R^2 = 0,99694$ e o coeficiente angular 0,37442 .....	87
Figura 32 - Espectro de absorção no infravermelho da Qts para determinação %GD.....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Os diferentes grupos que podem constituir a região polar de um fosfolípido. ....	25
Tabela 2 - Formulações utilizadas na escolha da NEs. ....	34
Tabela 3 - Composição das amostras NEB10, NET1 e NET2. ....	35
Tabela 4 – Valores de PDI das amostras NEB10 e NET1 referentes ao ângulo de 90° para os dias 1, 7, 15 e 30. ....	46
Tabela 5 – Valores de $R_H$ , PDI e potencial zeta para as amostras NEB, NET1 e NET2. ....	50
Tabela 6 - Variação do tamanho do raio das partículas em porcentagem no decorrer do tempo. ....	58
Tabela 7 - Valores de $R_H$ e PDI para as amostras NEB@Qts, NET1@Qts e NET2@Qts. ....	63
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos para liberação in vitro do timol em água e meio aquoso de tampão saliva. ....	67
Tabela 9 – Parâmetros de permeabilidade para a solução controle e as amostras NET e NET@Qts. ....	69
Tabela 10 - Comportamento dos sistemas baseados nos valores de potencial zeta antes e após a liberação em mucosa de porco. ....	71

## LISTA DE ACRONIMOS SIGLAS E SIMBOLOS

$(N^+(CH_3)_3)$  – Fórmula química da trimetilamina.

$(PO_4)^{-3}$  – Formula química do fosfato.

$[\eta]$  – viscosidade intrínseca.

amostragem.

BHL – Balanço Hidrofílico-Lipofílico.

$C_d$  - Concentração inicial de fármaco na câmara doadora.

$C_i$  - Concentração de fármaco no tempo de ordem  $i$ .

$C_t$  - Concentração de fármaco no meio receptor em cada tempo.

DLS – Espalhamento de luz dinâmico (do inglês *dynamic light scattering*).

DP – Desvio padrão.

DSC – Calorimetria de varredura diferencial (do inglês *differential scanning calorimeter*).

EE % - Eficiência de encapsulação.

$J_s$  - Estado de fluxo constante.

log P – Coeficiente de partição octanol/água.

MIC – Concentração Inibitória Mínima.

$M_v$  – Massa molar viscosimétrica.

NE – Nanoemulsão.

NEB – Nanoemulsão de óleo de semente de uva sem timol.

NEB@Qts – Nanoemulsão de óleo de semente de uva e recoberta por quitosana.

NEs – Nanoemulsões.

NET – Nanoemulsão de óleo de semente de uva com timol.

NET@Qts - Nanoemulsão de óleo de semente de uva com timol e recoberta por quitosana.

NP – Nanopartícula.

NPs – Nanopartículas.

o/w - Emulsão de óleo em água.

OSU – Óleo de semente de uva.

$P$  - Coeficiente de permeabilidade.

P123 - Pluronic® P123.

PC – Fosfatidilcolina.

PEO – Polioxietileno.

pH – potencial Hidrogeniônico, definida pelos valores na escala de 1 a 14.

PIT – Emulsão por inversão de fase.

pKa - valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido (Ka).

PPO – Polioxipropileno.

$Q_t$  - Quantidade de fármaco acumulada por área.

Qts – Quitosana.

$R_H$  – Raio hidrodinâmico.

SEM – Microscopia eletrônica de varredura (do inglês scanning electron microscopy).

TEM – TEM – microscopia eletrônica de transmissão (do inglês transmission electron microscopy).

UV-VIS – Ultravioleta-visível (do inglês ultraviolet-visible).

v/v – Unidade de concentração volume, volume (em porcentagem)

$V_r$  - Volume da solução receptora.

$V_s$  - Volume da alíquota.

w/o - emulsão de água em óleo.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Justificativa</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Revisão bibliográfica</b> .....	<b>17</b>
2.1	Cavidade oral.....	17
2.2	Candidíase.....	18
2.3	Nanotecnologia.....	19
<b>2.3.1</b>	<b>Nanoemulsões</b> .....	<b>20</b>
2.3.1.1	Lecitina.....	23
2.3.1.2	Pluronic® P123 (P123).....	25
2.4	Óleos essenciais.....	27
<b>2.4.1</b>	<b>Timol</b> .....	<b>28</b>
2.5	Quitosana (QTs).....	30
<b>3</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>32</b>
3.1	Objetivos geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
<b>4</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	<b>33</b>
4.1	Materiais.....	33
4.2	Métodos.....	33
<b>4.2.1</b>	<b>Preparo das Nanoemulsões</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Preparo das NE contendo Timol</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Preparo das NE recobertas com Qts</b> .....	<b>35</b>
4.3	Caracterização das nanoemulsões.....	35
<b>4.3.1</b>	<b>Espalhamento de luz dinâmico</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Análise de Potencial zeta</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)</b> .....	<b>37</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Calorimetria de varredura diferencial (DSC)</b> .....	<b>37</b>
4.4	Estabilidade de armazenamento.....	38

<b>4.4.1</b>	<b>Estabilidade das nanoemulsões</b> .....	<b>38</b>
4.5	Liberação e eficiência de encapsulação .....	38
<b>4.5.1</b>	<b>Metodologia de quantificação de timol utilizando UV-vis</b> .....	<b>38</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Curvas de liberação em água e solução tampão saliva</b> .....	<b>38</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Eficiência de encapsulação (EE%)</b> .....	<b>39</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Quantificação do timol utilizando espectroscopia de fluorescência para o estudo de permeabilidade transbucal.</b> .....	<b>39</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Estudos de permeabilidade transbucal <i>ex vivo</i></b> .....	<b>40</b>
4.5.5.1	Cálculos dos dados de permeabilidade .....	41
4.6	Secagem das amostras NEB@Qts e NET@Qts por spray drying.....	42
<b>4.6.1</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura (SEM)</b> .....	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>Resultados e discussões</b> .....	<b>43</b>
5.1	Escolha da formulação da nanoemulsão .....	43
5.2	caracterização das nanoemulsões .....	48
<b>5.2.1</b>	<b>Raio Hidrodinâmico (<math>R_H</math>) para os sistemas NEB10, NET1 e NET2</b> .....	<b>48</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Microscopia de transmissão eletrônica (TEM)</b> .....	<b>50</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b> .....	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>Revestimento das nanoemulsões com quitosana</b> .....	<b>56</b>
6.1	Variação da porcentagem de Qts para recobrimento .....	56
6.2	Caracterização dos sistemas NEB@Qts e NET@Qts selecionadas .....	61
<b>6.2.1</b>	<b>Raio Hidrodinâmico (<math>R_H</math>)</b> .....	<b>61</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para as NE recobertas por Qts</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Liberação controlada do timol a partir das nanoemulsões</b> .....	<b>65</b>
7.1	Liberação por membrana de diálise.....	65
7.2	Estudo de permeabilidade <i>ex vivo</i> .....	68
<b>8</b>	<b>Secagem das nanoemulsões utilizando spray dryer</b> .....	<b>71</b>
8.1	Calorimetria de varredura diferencial (DSC) .....	73

8.2	Microscopia eletrônica de Varredura (SEM) .....	74
9	<b>Conclusão .....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO A – Determinação da massa molar viscosimétrica média de quitosana e alginato de sódio .....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXO B – Grau de desacetilação da Qts .....</b>	<b>88</b>

## 1 JUSTIFICATIVA

A produção de um novo fármaco é lenta e pode levar anos ou até mesmo nunca chegar as prateleiras de uma farmácia, resultado de diversos fatores tais como, testes biológicos, toxicologia, efeitos colaterais, teste *in vivo*, entre outras barreiras. Em paralelo a esta problemática, também pode ser citado a frequência com que os patógenos estão adquirindo resistências em relação aos tratamentos convencionais. Desta maneira, a nanotecnologia se mostra promissora para amenizar estes efeitos, através da encapsulação de fármacos, aumento da estabilidade do ativo, liberação localizada e controlada e diferentes formas de aplicação.

A cavidade oral é um local complexo para uma limpeza detalhada, somado ainda a presença de cerca de 1000 espécies de microrganismos, tornando-se um ambiente propício para o surgimento de diversas enfermidades como infecções, inflamações, cárie dental, entre outros. Desta maneira torna-se necessário o uso de métodos alternativos para o tratamento de enfermidades na cavidade oral, como por exemplo da cândida bucal. Uma alternativa é o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados baseados em NE com intuito de carrear fármacos hidrofóbicos como aplicação aos problemas da cavidade oral. A técnica de NE espontânea foi utilizada neste estudo, pois se trata de uma técnica simples, reprodutível, requer equipamentos disponíveis no laboratório e as amostras obtidas são estáveis frente a um amplo espectro de aplicação.

As amostras geradas por esta técnica, se tratando de sistemas com aplicações farmacológicas, é capaz de encapsular uma infinidade de fármacos e moléculas, como por exemplo o timol, molécula hidrofóbica extraída de óleos essenciais, e amplamente reportada na literatura para aplicações microbiológicas. A incorporação de timol em NE, reside no propósito de ampliar os usos terapêuticos de óleos essenciais, uma vez que o timol é o grande responsável pelas propriedades do óleo essencial das plantas de *Thymus vulgaris L.* (tomilho) e tem amplo uso na área farmacêutica.

Para as aplicações desejadas, é de extrema importância que este fármaco permaneça no local de aplicação por um período maior, uma vez que o timol possui

baixa solubilidade em água e alta pressão de vapor. Mesmo sendo liberado de forma efetiva, o seu tempo de residência seria diminuído. Desta forma, este ponto pode ser alcançado revestindo as NE a serem desenvolvidas no estudo com Qts. As NE revestidas por quitosana auxiliam no aumento do tempo de residência do timol na cavidade oral, pois favorecem a mucoadesão das NE na mucosa, promovendo uma liberação lenta quando em contato com a saliva. Isto está relacionado por interações da Qts com a mucosa, através do caráter positivo da Qts e negativo da mucina, presente na mucosa.

Aliado ao que foi anteriormente destacado, tem-se também o intuito de obter um produto de maior valor tecnológico de menor massa final, podendo-se aumentar a concentração de ativo. Assim surge o interesse em aplicar a técnica de spray drying na secagem das NE estabilizadas por quitosana. Esta técnica promove a efetiva obtenção de um material particulado na forma de pó com características mucoadesivas e maior solubilidade, ampliando o espectro da aplicação. Desta foram são apresentadas três diferentes formulações, sendo elas, a NE, seguido da NE recoberta com Qts e o respectivo material particulado, visando a aplicabilidade na cavidade oral, em específico no tratamento de cândida bucal.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CAVIDADE ORAL

Entre os microrganismos que podem ser encontrados na cavidade oral, estão o *Streptococcus mutans* (KHAN et al., 2017), *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* (GREENSPAN; FRANCISCO, 1994), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, entre outros patógenos causadores de diversas doenças e enfermidades bucais, como cárie dental, gengivite, infecções e inflamações pós cirúrgicas e cândida bucal (OLSEN, 2015; (ANDRADE et al., 2011); (DEWHIRST et al., 2010). Estes microrganismos se localizam principalmente nas regiões do epitélio bucal, dorso da língua, superfície dental e epitélio do sulco gengival. A soma da diversidade de organismos presentes na boca e a dificuldade de uma boa higienização mecânica, faz-se necessária a busca por alternativas complementares, que gerem resultados significativos frente a higienização e prevenção de doenças sistêmicas. Outra consequência gerada é a resistência aos antibióticos, adquirida pelos microrganismos após reincidências e constantes utilizações de antibióticos (KHAN et al., 2017).

A dificuldade na higienização está em conscientizar a população da importância de uma limpeza minuciosa e eficiente, em pontos inalcançáveis pelos métodos mecânicos. Como forma de suprir esta necessidade é utilizado o enxaguante bucal, possibilitando maior poder de higienização dos pontos inacessíveis pelos métodos mecânicos e com maior facilidade (MARUNIAK et al., 1992). Estes enxaguantes geralmente são compostos por água, álcool, surfactante, umectantes, flavorizantes, componentes ativos como clorexidina, cloreto de cetilpiridínio, triclosan, óleos essenciais, entre outros compostos e componentes (ANDRADE et al., 2011). Estas soluções devem ser capazes de inibir o crescimento e controlar a proliferação dos microrganismos presentes na cavidade bucal. Além disso é interessante que seja confeccionado componentes biodegradáveis, biocompatíveis e que apresentem ação prolongada (RASSU et al., 2014). Dentre os componentes ativos passíveis de compor um enxaguante bucal, o timol apresenta características bactericidas e

antifúngicas comprovadas (SHAPIRO; GUGGENHEIM, 1995; RASSU et al., 2014). Estes componentes podem ser incorporados em diferentes sistemas, como NEs (LI et al., 2017), nanopartículas (NPs) (MARCHESE et al., 2016), e estes podem ser adicionados por exemplo a enxaguantes bucais, assim como serem utilizados na forma de pó. Desta maneira, são englobadas as características citadas anteriormente para a confecção de um produto viável para aplicação.

## 2.2 CANDIDÍASE

O corpo humano pode sofrer de diversas enfermidades, podendo levar como exemplo as infecções fúngicas, causadas por leveduras do gênero *Candida* (BRITO et al., 2015). Os quadros de infecção são diversos, desde manifestações banais como a colonização de mucosas e até quadros sistêmicos com a invasão de diferentes órgãos. Além da *Candida albicans*, pode-se citar outras leveduras importantes como: *C. Tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* entre outras (SANGEORZAN et al., 1994).

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista, onde indivíduos com baixa imunidade são prejudicados de forma significativa. Pacientes com AIDS e HIV, em algum momento da doença, apresentam infecções causadas pelos fungos do gênero *Candida*, causando infecção em diferentes mucosas, incluindo a mucosa bucal (KOLOKOTRONIS; KIOSES, 1994; GREENSPAN; FRANCISCO, 1994). A candidíase oral é a mais comumente encontrada e estudos relatados para o seu combate já são realizados a longo prazo. O tratamento destas infecções é uma tarefa difícil, em virtude da baixa disponibilidade de fármacos, a alta resistência adquirida pelo fungo ao longo do tempo e a toxicidade gerada pelos fármacos em longos tratamentos, assim como, elevadas doses (SPETTEL et al., 2019). Dentre os antifúngicos utilizados, podemos citar as classes dos azoles, equinocandinas, polienos e análogos de pirimidina, dos quais apresentam algum tipo de limitação no uso, como citado anteriormente (KSIEZOPOLSKA; GABALDÒN, 2018; BOKEN; SWINDELLS; RINALDI, 1992).

Neste panorama, uma das alternativas é a utilização de produtos ou compostos extraídos de fontes naturais, podendo citar o óleo essencial de tomilho, que tem como componente principal o timol (PINTO et al., 2006). Estudos mostram a eficiência tanto do óleo essencial, quanto do timol no combate de fungos do gênero

cândida. Podemos encontrar na literatura diferentes trabalhos que apresentam valor de concentração inibitória mínima (MIC) para o combate dos fungos de cândida, como por exemplo para o óleo essencial de *Thymus pulegioides* (0,32 e 0,64  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) (PINTO et al., 2006) e timol (32 e 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (BRITO et al., 2015; MARCHESE et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2014). A confecção de materiais nanotecnológicos contendo timol, para o tratamento de candidíase na cavidade oral, estão aliados a melhora de palatabilidade e possibilitam uma liberação controlada, localizada e sistemática (RASSU et al., 2014).

### 2.3 NANOTECNOLOGIA

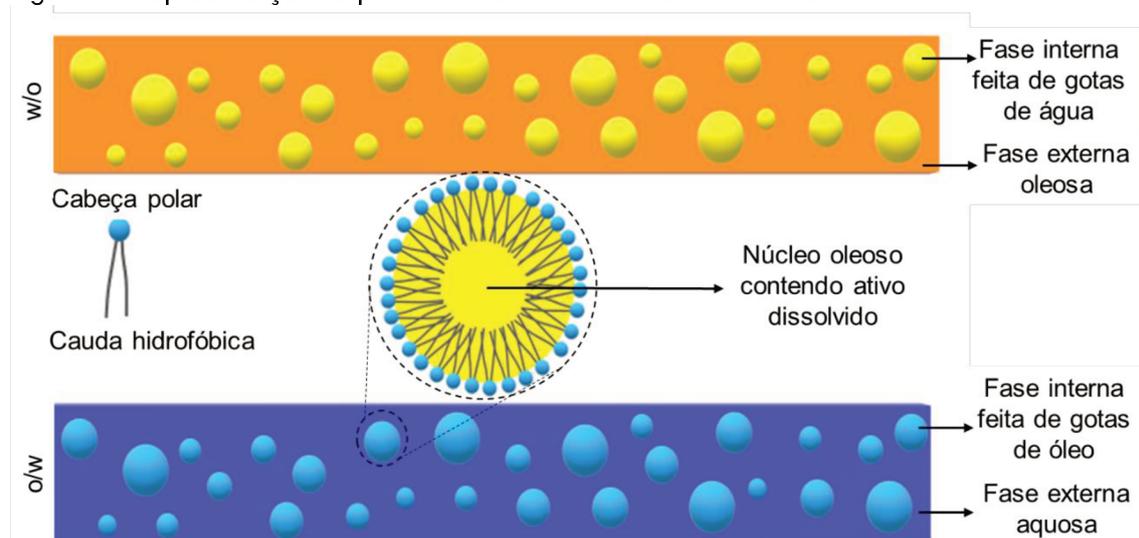
A nanotecnologia é aplicada em diversas áreas da ciência, com o intuito de trazer a nanoescala, para produtos já existentes nas escalas micro e macro. A comunidade científica e industrial tem grande interesse na utilização da nanotecnologia nos setores de cosmetologia (NAFISI; MAIBACH, 2017), alimentício (HAMAD et al., 2018), agrícola (OLIVEIRA et al., 2014), farmacêutico (ZHANG et al., 2018), biomedicina (LESO; FONTANA; IAVICOLI, 2019) entre outros. O uso da nanotecnologia tem diversas vertentes, incluindo a alteração dos meios de administração, aumento da eficiência, proteção contra degradação, aumento da solubilidade, formulações inéditas, entre outras tantas possibilidades farmacológicas (LESO; FONTANA; IAVICOLI, 2019; NAFISI; MAIBACH, 2017; ZHANG et al., 2018).

Tais potencias de aplicação podem ser alcançados através da utilização de diferentes técnicas e ramos da nanotecnologia, como NEs, NPs, nanofilmes, nanocompósitos, nanofibras, entre outras (RAI; ZACCHINO; DERITA, 2017). A formulação de NEs é um caminho alternativo, que possibilita alterações significativas nas características físico-químicas de fármacos, gerando distintas possibilidades de aplicação e administração. As NEs também podem ser combinadas com diferentes técnicas, incorporando ainda mais a gama de aplicação (SINGH et al., 2017). A utilização de uma molécula com características de mucoadesão, por exemplo, pode apresentar a capacidade de adesão à mucosa, resultando em um sistema com diferentes mecanismos de liberação e aplicação (WANG et al., 2013).

### 2.3.1 Nanoemulsões

Sistemas compostos por duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma das fases dispersa no meio da outra na forma de finas gotículas e cineticamente estáveis, são denominados emulsão (KLANG; VALENTA, 2011). As fases líquidas podem ser constituídas por uma infinidade de compostos, mas geralmente compreendem uma fase oleosa e uma fase aquosa. Pode-se formar dois sistemas principais, uma emulsão de óleo em água (o/w) ou uma emulsão de água em óleo (w/o), como pode ser visto na Figura 1. A formação de gotículas da fase dispersa e sua estabilização na fase dispersante é um processo energeticamente instável pela elevada energia superficial das gotículas, das quais tendem a coalescer, formando gotas maiores de menor energia superficial. Desta maneira é necessário a utilização de surfactantes ou agentes emulsificantes, incrementando assim uma energia de estabilização adicional para a emulsão (SINGH et al., 2017).

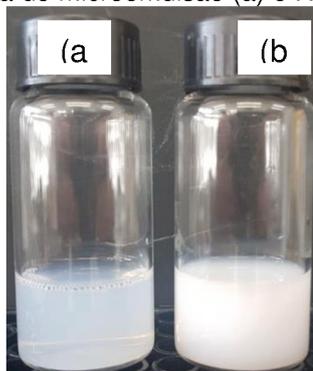
Figura 1 - Representação esquemática de uma emulsão O/W e W/O



Fonte: Próprio autor, adaptado de (SINGH et al., 2017)

O termo NE geralmente é utilizado para dispersões de aparência leitosa, compostas de partículas com tamanhos entre 150 e 1000 nm como mostra a Figura 2.b. Já a microemulsão é classificado como uma dispersão translúcida com tamanhos entre 10 e 150 nm (Figura 2.a) (KLANG; VALENTA, 2011). Estes conceitos não são unânimes na literatura, sendo assim, neste trabalho será utilizado o termo nanoemulsão para os sistemas desenvolvidos.

Figura 2 – Representação esquemática de microemulsão (a) e NE (b).



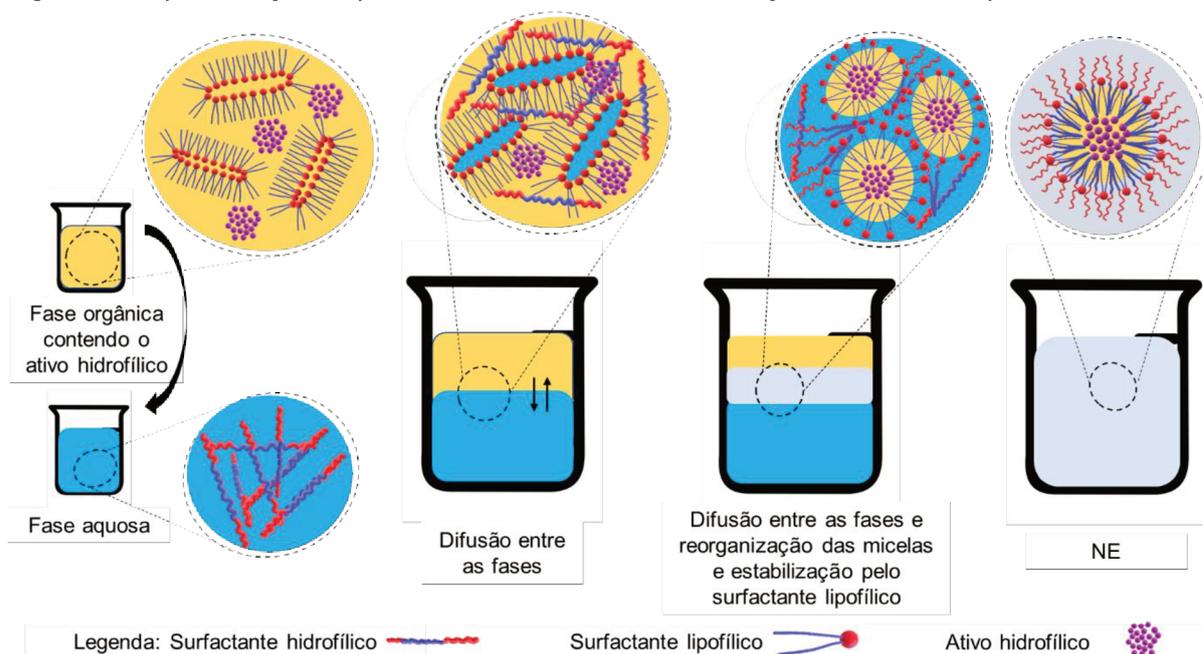
A obtenção de NEs envolve basicamente a emulsificação de uma fase oleosa em uma fase aquosa, estabilizada por um ou mais surfactantes. Os métodos de emulsificação envolvem a utilização de alta ou baixa quantidade de energia. Os métodos de emulsificação de alta energia estão baseados na geração de energia mecânica através da alta tensão de cisalhamento (WU et al., 2016), homogeneização a alta pressão (SCHUH; BRUXEL; TEIXEIRA, 2014), microfluidizadores (KLANG; VALENTA, 2011) ou pela utilização de ultrassom (SINGH et al., 2017). Estes mecanismos geram forças capazes de deformar e quebrar gotículas micrométricas da fase dispersa em gotículas nanométricas, que são estabilizadas pela adsorção do surfactante na sua superfície. Para a formação de emulsões de baixa energia, temos o método de temperatura de inversão de fase e o método de emulsificação espontânea (SOLANS; SOLÉ, 2012). O método de emulsificação espontânea é interessante do ponto de vista econômico, pois não faz uso de equipamentos sofisticados e aquecimento, podendo incorporar fármacos termolábeis, ou seja, sensíveis a temperatura (BOUCHEMAL et al., 2004).

O método de temperatura de inversão de fase consiste no uso de propriedades específicas de surfactantes não iônicos, geralmente surfactantes que possuem afinidade tanto com a fase oleosa quanto com a fase aquosa, podendo alterar com a variação da temperatura. Esta afinidade é governada pela diferença do potencial químico do surfactante em cada uma das fases (SINGH et al., 2017).

A emulsificação espontânea consiste na rápida difusão do solvente orgânico miscível em água. Isso ocorre pela elevada diferença de tensão superficial e o gradiente de concentração destes líquidos, descrito pelo efeito Maragoni (TADROS et al., 2004). Quando o solvente de menor tensão superficial e menor concentração, flui para a água de maior tensão superficial e maior concentração, o mesmo deixa livre em solução as nanogotículas de óleo que são imediatamente estabilizadas pelo surfactante em solução (BOUCHEMAL et al., 2004; SOLANS; SOLÉ, 2012). Os fatores que podem interferir nas características de uma NE são a viscosidade do óleo, equilíbrio lipofílico e hidrofílico do surfactante, a miscibilidade dos solventes e a velocidade de difusão (SINGH et al., 2017). Em muitos casos, é utilizada agitação mecânica moderada para acelerar o processo de difusão e estabilização das nanogotículas de óleo (MENDES et al., 2017a).

Basicamente, a técnica de emulsificação espontânea para a formação de uma NE consiste na lenta adição de uma fase orgânica a uma fase aquosa de forma contínua ou semi-contínua, sob agitação magnética. Neste processo, é gerada uma turbulência interfacial provocada pela rápida difusão do solvente orgânico na água e, desta maneira, ocorre a formação espontânea da emulsão como observado na Figura 2 (SOLANS; SOLÉ, 2012). Para elucidar o processo de maneira mais eficiente, é necessário lembrar que a fase orgânica é composta por um óleo, um surfactante lipofílico e um solvente orgânico miscível em água, onde nesta solução, já contamos com a presença de micelas formadas pelo óleo e o surfactante lipofílico (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016). No momento da adição da fase orgânica à fase aquosa composta por água e surfactante hidrofílico, ocorre a miscibilização do solvente orgânico na água, juntamente com o recobrimento e estabilização das micelas formadas anteriormente, pelo surfactante hidrofílico (SINGH et al., 2017). Na sequência, o solvente orgânico é removido por evaporação a pressão reduzida.

Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de formação da uma NE espontânea.



Fonte : Próprio autor, adaptado de (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016)

O êxito na obtenção de amostras por NE está diretamente ligado com o Balanço Hidrofílico-Lipofílico (BHL) entre os surfactantes, que promovem a máxima solubilização do óleo e da água. O valor de BHL é uma escala semi-empírica utilizada para a seleção dos surfactantes, onde a escolha destes ocorre pela semelhança entre os valores de BHL entre a fase oleosa e os surfactantes (BOUCHEMAL et al., 2004; MENDES et al., 2017a). Em geral a escolha da fase oleosa à qual tem a função de dissolver o ativo é definido pelos valores de coeficiente de partição n-octanol/água. Neste contexto selecionou-se um fosfolipídio PC como surfactante lipofílico e um copolímero tribloco como surfactante hidrofílico.

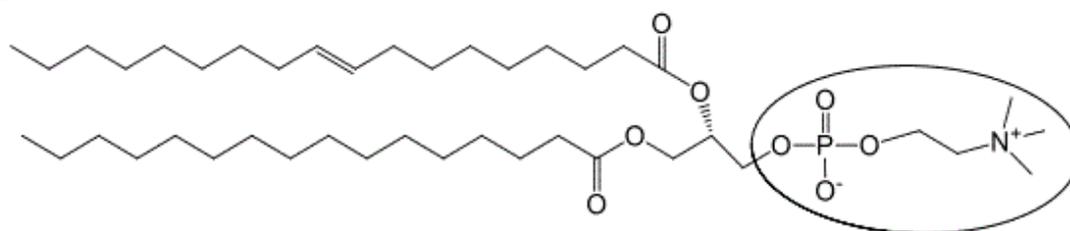
### 2.3.1.1 Lecitina

Lecitina é o nome dado para uma mistura de fosfolipídios polares e não polares, que devem conter pelo menos 60 % de lipídios polares (SCHAFFER, 2007). Sua utilização compõe diversos estudos, por ser um surfactante com características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e elevada pureza. A biocompatibilidade é

conferida pela semelhança com a membrana celular, a qual é composta por fosfolípidios (LI et al., 2014). A lecitina pode ser de origem animal (gema de ovo) ou vegetal (soja) e é constituída majoritariamente pelo lipídio fosfatidilcolina (PC). A região polar é formada por um grupo colina ( $N^+(CH_3)_3$ ), com carga residual positiva e um grupo fosfato ( $PO_4^{-3}$ ), com carga residual negativa. Para garantir o caráter anfifílico desta molécula, ela também possui uma região apolar, composta de duas cadeias de ácidos graxos com extensão similares, como observado na estrutura da Figura 3, com valores de BHL entre 7 e 8,5 (SCHAFFER, 2007).

As diferentes fontes de obtenção da lecitina, apresentam diferentes porcentagens de PC e diferentes tipos de ácidos graxos insaturados. A lecitina obtida da gema de ovo apresenta um maior teor de PC e ácidos graxos saturados, detalhe fundamental para a formação de micelas e lipossomos mais estáveis (WANG; WANG, 2008). Esta estabilidade é obtida por meio de um melhor empacotamento e/ou auto-organização.

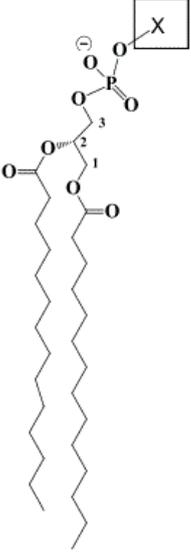
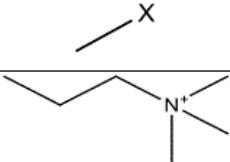
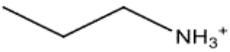
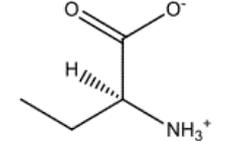
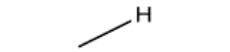
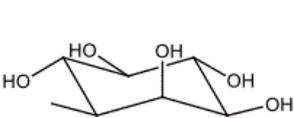
Figura 4 - Representação estrutural e esquemática da molécula de PC (Lecitina)



Fonte: Próprio autor, adaptado de (LI et al., 2014)

A Tabela 1 a seguir mostra exemplos de diferentes grupos que podem compor a região polar dos fosfolípidios, tais como o grupo colina da PC ou grupos como etanolamina, serina, ácido fosfatídico e inositol (BRUXEL et al., 2012).

Tabela 1 - Os diferentes grupos que podem constituir a região polar de um fosfolípido.

		Grupo
		Colina
		Etanolamina
		Serina
		Ácidofosfatídico
		Inositol

Fonte: Próprio autor, adaptado de (LI et al., 2014).

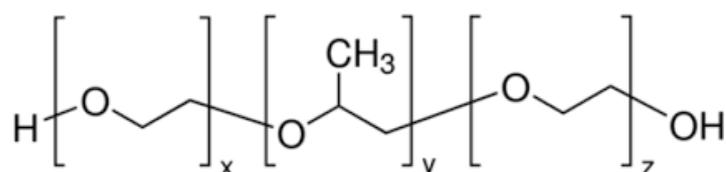
Os grupos apresentados na Tabela podem apresentar cargas positivas, negativas e neutras, gerando um potencial de superfície, fator importante na estabilidade de NEs e interação com fármacos, membranas celulares e surfactantes (BRUXEL et al., 2012). Outra forma de interação é por ligação de hidrogênio entre o surfactante ou do mesmo com a molécula a ser encapsulada, como por exemplo o timol (FERREIRA; LAGO; CASELI, 2019). Pode ocorrer ainda interação intermolecular entre a carga positiva do grupo N-metil e a carga negativa do grupo fosfato de uma molécula vizinha de lecitina formando uma espécie de *crosslinking* (YEAGLE et al., 1977); (PASENKIEWICZ-GIERULA et al., 1999).

### 2.3.1.2 Pluronic® P123 (P123)

O Pluronic® é um copolímero tribloco (Figura 4), no qual o bloco central é formado por unidades de polioxipropileno (PPO) e os blocos laterais são formados por unidades de polioxietileno (PEO). Esta estrutura garante ao P123 um caráter anfifílico, onde o bloco central possui característica hidrofóbica e os blocos laterais, características hidrofílicas (PITTO-BARRY; BARRY, 2014). Essa classe de

copolímeros usualmente é utilizada como surfactante ou tensoativo e tratando-se do P123 tem-se um surfactante não iônico de cor branca, aparência pastosa e baixa toxicidade, com unidades de repetição  $\text{PEO}_{20}\text{PPO}_{70}\text{PEO}_{20}$ , massa molar de  $5800 \text{ g mol}^{-1}$  e um BHL de 7 a 9 (determinado pelo fabricante Sigma Aldrich).

Figura 5 - Representação da estrutura do P 123, onde  $X = 20$ ,  $Y = 70$  e  $Z = 20$ .



O grande potencial de utilização do P123 no setor biomédico é resultado da capacidade de auto associação espontânea, sendo capaz de formar micelas em solução aquosa, que podem incorporar em seu interior moléculas de caráter hidrofóbico e hidrofílico (ENUMO; PEREIRA; PARIZE, 2019; PITTO-BARRY; BARRY, 2014) Outra aplicação é como estabilizante de sistemas nanocarreadores ou dispersões coloidais, onde o mesmo é adsorvido na interface da nanoestrutura, gerando maior volume ao sistema, retardando efeitos de coalescência e segregação de fase por efeito estérico (AKHLAGHI et al., 2016). Nota-se diferenças significativas na capacidade de copolímeros em bloco quanto à eficiência de encapsulação e liberação controlada de fármacos, que em sua grande maioria possui características hidrofóbicas (ENUMO; PEREIRA; PARIZE, 2019).

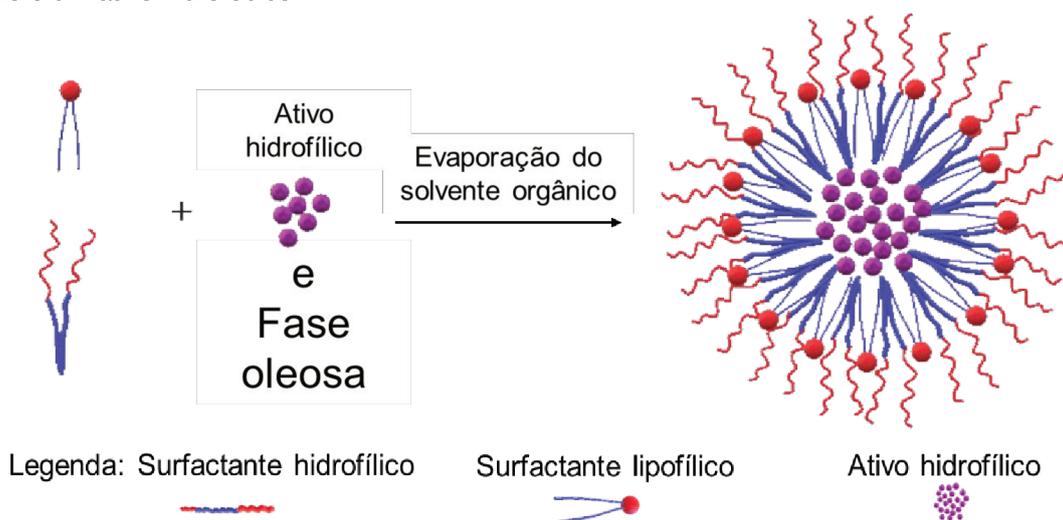
A combinação dos tensoativos lecitina e P123 é relatada em diversos estudos pela eficiência da emulsão resultante em encapsular compostos hidrofílicos, de diversos tamanhos e diferentes grupos funcionais (AKHLAGHI et al., 2016; CHEN et al., 2016a, 2015; PITTO-BARRY; BARRY, 2014; SHEU et al., 2016). Assim como pode-se encontrar diversos trabalhos aplicando a utilização de surfactantes e polímeros na formação de emulsões para encapsulação de fármacos.

A encapsulação de um fármaco lipofílico como a anfotericina é descrita por CHEN et al. (2015), através de uma emulsão utilizando lecitina combinada a diferentes polímeros anfifílicos. Este novo sistema proporciona maior solubilidade do fármaco em água e minimiza os efeitos da neurotoxicidade da anfotericina. Da mesma forma (DORDEVIĆ et al., 2015) em busca de aumentar a solubilidade do fármaco

resperidona, utilizaram lecitina e polímeros hidrofílicos, entre outros componentes, para preparar emulsões pelo método de inversão de fase (PIT).

A encapsulação de curcumina utilizando lecitina e P123 é proposta por (CHEN et al., 2016a), onde é apresentada uma possível organização da micela. Esta organização seria composta de unidades intercaladas de P123 e lecitina, na qual a região hidrofóbica da lecitina está voltada para o interior da micela juntamente com o ativo. Já o P123 tem sua região hidrofóbica voltada para o interior em formato de 'V', como representado na Figura 5. Assim, a partir do exposto, verifica-se que o sistema composto por lecitina e P123, é um sistema interessante para incorporar ativos com caráter hidrofóbico.

Figura 6 – Representação esquemática de uma possível organização de uma micela entre lecitina, P123 e um ativo hidrofóbico.



Fonte: Próprio autor, adaptado de (CHEN et al., 2016b).

## 2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

A utilização de ervas medicinais na forma de óleos essenciais ou extratos na alimentação e medicina popular é mundialmente difundido. No último século, desenvolveu-se uma crescente procura por métodos e maneiras de potencializar e viabilizar o uso destas ervas, em diversas aplicações, tais como conservantes alimentícios, controle de pragas e insetos e usos medicinais (RAI; ZACCHINO; DERITA, 2017; KWON et al., 2018; MATOS et al., 2019). Diversos compostos já são

utilizados e possuem suas propriedades conhecidas, como o óleo essencial de citronela na repelência de insetos (MAIA; MOORE, 2011), o óleo essencial de melaleuca como um potente antifúngico (C. F. CARSON, K.A. HAMMER, 2014), o óleo essencial de eucalipto como antibacteriano (EL-HEFNY et al., 2017), entre outros.

Estes óleos essenciais são substâncias voláteis e complexas, extraídas de plantas e compostas principalmente de misturas entre terpenos, fenilpropanóides (monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados) e ácidos graxos. Estes compostos são biosintetizados pelo metabolismo secundário das plantas, responsável pelos mecanismos de defesa da mesma (RAI; ZACCHINO; DERITA, 2017); (MATOS; LUCCA; KOESTER, 2019). Em geral, a eficiência da aplicação dos óleos essenciais está diretamente ligada ao seu componente majoritário, proporcionando a realização de estudos iniciais apenas com os compostos majoritários puros. Pode-se produzindo inicialmente sistemas de menor complexidade frente a formação e caracterização do produto gerado, para após optar pela incorporação de uma matriz complexa como os óleos essenciais. Dentre a gama de óleos essenciais, o óleo essencial extraído principalmente de plantas das espécies *Thymus*, como tomilho (*T. vulgaris*) possui como componente majoritário o timol (MARCHESE et al., 2016); (VASCONCELOS et al., 2014). Estudos mostram que o óleo essencial extraído das folhas de *Thymus vulgaris* L. são compostos de 50 % de timol, 20 % de p-cimeno, 18 % de g-terpineno, 4,5 % de carvacrol e 1,5 % de borneol (JAKIEMIU et al., 2010).

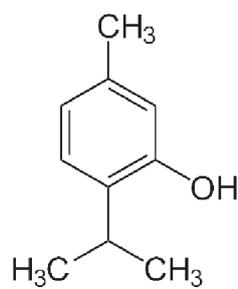
#### **2.4.1 Timol**

O timol (2-isopropil-5-metilfenol), mostrado na Figura 6, é um fenol monoterpreno de aparência cristalina e incolor, de sabor forte, aroma agradável e pouco solúvel em água (NAGOOR MEERAN et al., 2017). Demais características são: pKa 10,6, log P 3,4, ponto de fusão entre 48 e 51 °C, ponto de ebulição de 232 °C (RASSU et al., 2014) e pressão de vapor de 1 mmHg (64 °C). Assim como diversos óleos essenciais, o timol também vem sendo utilizado por décadas na medicina popular e tradicional como um agente antioxidante (WU; LUO; WANG, 2012), anti-inflamatório (PIVETTA et al., 2018), analgésico, antiespasmódico, antibactericida (LI et al., 2017), antifúngico (ROMERO et al., 2009), antisséptico (SHAPIRO;

GUGGENHEIM, 1995), antitumoral (NAGOOR MEERAN et al., 2017) e inseticida (MATOS et al., 2019)(JAKIEMIU et al., 2010)

O timol já é utilizado em produtos alimentares, pomadas tópicas, sabões, cremes dentais, xampus, desodorantes e enxaguantes bucais (SHAPIRO; GUGGENHEIM, 1995; M. RAI, S. ZACCHINO, [s.d.]). Devido às suas potentes propriedades antimicrobianas, o timol é também utilizado na odontologia para o tratamento de infecções da cavidade oral (MARUNIAK et al., 1992). Como já mencionado anteriormente, estudos mostram a sua eficiência no combate ao fungo *C. albicans*, causador das candidíase bucal (VASCONCELOS et al., 2014).

Figura 7 - Estrutura química do timol.



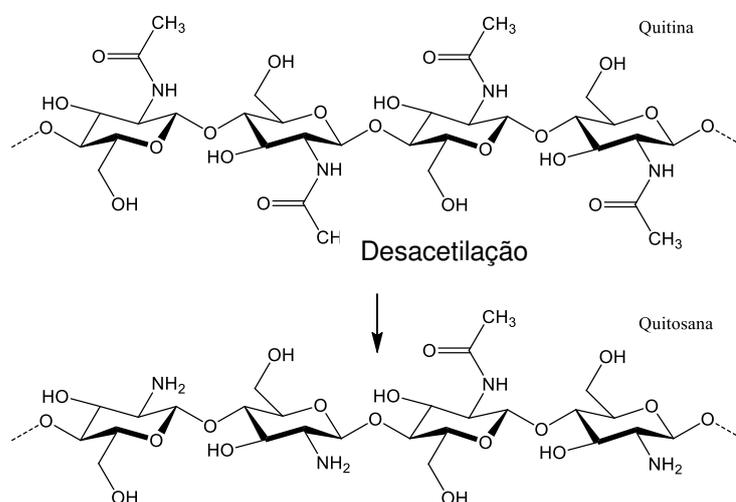
O timol possui algumas limitações em virtude da sua baixa solubilidade em água em pH neutro, apresenta uma solução com sabor desagradável e odor forte, sua natureza hidrofóbica restringe a solubilidade no domínio hidrofóbico da membrana citoplasmática das células bacterianas entre as cadeias acíclicas lipídicas e a baixa solubilidade no plasma sanguíneo (NAGOOR MEERAN et al., 2017; MARCHESE et al., 2016). O timol também apresenta uma dependência ao pH, sofrendo degradação por hidrólise em valores de pH baixos, na faixa de 5 (LIU et al., 2017). Ao contrário, o mesmo é rapidamente adsorvido ou degradado no estômago ou intestino delgado, devido a protonação do grupo fenol (NIEDDU et al., 2014). Em geral, a técnica utilizada para aumentar a solubilidade e a estabilidade de compostos naturais é encapsulá-los em micelas e/ou lipossomas (MARCHESE et al., 2016). Deste modo, a proposta da encapsulação através de uma NE utilizando lecitina, P123, revestida com quitosana torna-se interessante, pois apresenta a possibilidade de alterações nas

características de liberação controlada e adsorção quando comparadas com o timol puro (MA; DAVIDSON; ZHONG, 2016; MENDES et al., 2017b, 2017a).

## 2.5 QUITOSANA (QTS)

A quitosana é um biopolímero obtido pela desacetilação em meio alcalino da quitina [poli( $\beta(1\rightarrow4)$ -N-acetil-D-glicosamina)], mostrada na Figura 7. É um dos polímeros mais abundantes na natureza, sendo encontrada principalmente nas carapaças de crustáceos, insetos, moluscos e na parede celular de fungos. A estrutura da Qts é composta de uma sequência de açúcares monoméricos do tipo  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glicose(N-acetilglicosamina), da qual se assemelha muito a estrutura das fibras de celulose, divergindo apenas pelos grupos hidroxilas localizadas na posição 2. A reação de desacetilação é realizada com o emprego de excesso de NaOH e calor.

Figura 8 - Estrutura química da quitina e Qts.



A Qts possui como principais características dissolver em soluções ácidas diluídas, devido ao seu pKa por volta de 6,2, apresentar carga iônica positiva, a qual possibilita a reticulação com espécies negativas, fornecendo a ela um caráter mucoadesivo (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005). A característica da mucoadesividade da quitosana é consequência de interações intermoleculares e eletrostáticas com o muco presente na mucosa, o qual é composto

predominantemente por mucina (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005). A Qts apresenta uma gama de grupos passíveis de formação de ligação de hidrogênio e grupos compostos de cargas negativas que vão interagir com as cargas positivas da Qts (WERLANG; CÁRCARMO-OYARCE; RIBBECK, 2019).

A estrutura química da Qts apresenta dois grupos com grande potencial para modificações químicas, podendo proporcionar alterações significativas quanto sua hidrofiliabilidade e hidrofobicidade (SEVERINO et al., 2015). Todas as características citadas anteriormente conferem a Qts uma versatilidade de trabalho, com diferentes formas físicas, tais como pó, flocos, microesferas, NPs, membranas, esponjas, fibras, entre outras (HASANI; OJAGH; GHORBANI, 2018; MENDES et al., 2017b; OLIVEIRA et al., 2014; ROBLEDO et al., 2018a; SHAO et al., 2018). Assim, a Qts torna-se um biopolímero candidato para uso como formador de material de parede para proteção de NEs e posterior liberação em mucosas (SOUZA et al., 2014; ESTEVINHO et al., 2013; SOSNIK; SEREMETA, 2015; SANDRI et al., 2012).

A obtenção de partículas carregadas com ativo denominada “Trojan”, consiste no revestimento das gotículas da NE por uma macromolécula, seguido da secagem por atomização por spray dryer (CASANOVA; ESTEVINHO; SANTOS, 2016). Estas partículas carregadas protegem a integridade das nanogotículas de óleo e são facilmente redispersas em fase aquosa. Desta maneira, é possível a obtenção de um pó carregado com um princípio ativo volátil e intacto. Proporcionado assim significativas mudanças na estabilidade do ativo e alterações nos mecanismos de liberação e ação, ampliando a aplicabilidade de diversos ativos (MENDES et al., 2017b),(CASANOVA; ESTEVINHO; SANTOS, 2016).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAL

Desenvolver e avaliar as características de NEs produzidas pelo método de emulsificação espontânea como possíveis carreadores de timol, e estas revestidas com Qts, aplicadas a cavidade oral.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) Avaliar a concentração de lecitina, P123 e a massa de OSU para a formulação de NE pelo método de emulsificação espontânea.

ii) Avaliar a estabilidade coloidal dos sistemas obtidos via emulsificação espontânea utilizando lecitina, P123 e OSU, a fim de obter os melhores parâmetros.

iii) Desenvolver uma formulação contendo timol a partir dos melhores parâmetros de preparo da NE.

iv) Desenvolver e caracterizar NE sem e com timol revestidas por Qts;

v) Caracterizar todas as formulações por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), potencial zeta, Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM), Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);

vi) Estudar a liberação do timol em água e tampão saliva por membrana de diálise e permeabilidade em mucosa suína;

vii) Empregar a técnica de secagem por aspensão para a obtenção de um pó carregado com NE.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

As NEs foram preparadas utilizando lecitina (Lipoid® S75 com 75 % de PC adquirido da Lipoid GmbH (Alemanha)), Óleo do Semente de Uva (OSU) adquirido na farmácia Magistrale (Florianópolis), Pluronic® P123 (P123) e timol na forma sólida com pureza de 98,5 %, adquiridos da Sigma Aldrich. A Qts utilizada foi de média massa molar ( $M_v = 10.6 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ ), determinada pelo método viscosimétrico segundo WITT et al. (2010), com grau de desacetilação de 86,8 % baseando-se no método descrito por BRUGNEROTTO et al. (2001) os procedimentos estão descritos nos anexos A e B, respectivamente. O tampão fosfato-salina (PBS) foi preparado com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,43 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,24 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NaCl}$  (8,00 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{KCl}$  (0,20 g  $\text{L}^{-1}$ ) e teve seu pH ajustado para 7,4 com  $\text{HCl}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ . O tampão Krebs-Ringer bicarbonato foi preparado com  $\text{NaCl}$  (6,95 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{KCl}$  (0,35 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,16 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NaHCO}_3$  (2,10 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,37 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,20 g  $\text{L}^{-1}$ ), glicose (0,99 g  $\text{L}^{-1}$ ) e seu pH foi ajustado para 7,4 com  $\text{HCl}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ . Tampão saliva foi adaptado de (MUSA TROLIC et al., 2019), e preparado com  $\text{KCl}$  (1,5 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NaHCO}_3$  (0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ) e  $\text{KSCN}$  (0,5 g  $\text{L}^{-1}$ ). Os demais reagentes e solventes, são de elevado grau de pureza e utilizados sem purificação prévia.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparo das Nanoemulsões

As NE foram preparadas de acordo com a técnica descrita por (BOUCHEMAL et al., 2004). Primeiramente, a fase orgânica constituída de OSU (0,1, 0,3 e 0,5 g) foi dissolvida em solução de acetona contendo o surfactante lipofílico PC nas concentrações de (0,06153, 0,1494 0,3486 g  $\text{L}^{-1}$ ) resultando em 20 mL de fase orgânica. A fase aquosa foi preparada utilizando água deionizada e surfactante aniônico P123, nas concentrações de 0,5, 1 e 3 g  $\text{L}^{-1}$ , totalizando um volume de 40

mL. Para o preparo das NE, a fase orgânica foi injetada na fase aquosa, de modo semi-contínuo e sob agitação constante por 15 minutos. Após a agitação, o solvente orgânico foi removido por evaporação a pressão reduzida, resultando um volume final de 40 mL de solução (LI et al., 2017). Após a remoção do solvente as NEs sem timol (NEB), foram armazenadas a 4 °C e posteriormente caracterizadas. A formulação ideal foi adquirida através da variação das concentrações de lecitina, P123 e OSU, gerando 27 formulações diferentes, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Formulações utilizadas na escolha da NEs.

Amostra	Lecitina <sup>a</sup>	P123 <sup>a</sup>	Óleo de semente de uva <sup>b</sup>
NEB1	0,3486	3	
NEB2	0,3486	1	
NEB3	0,3486	0,5	
NEB4	0,1494	3	
NEB5	0,1494	1	0,1
NEB6	0,1494	0,5	
NEB7	0,06153	3	
NEB8	0,06153	1	
NEB9	0,06153	0,5	
NEB10	0,3486	3	
NEB11	0,3486	1	
NEB12	0,3486	0,5	
NEB13	0,1494	3	
NEB14	0,1494	1	0,3
NEB15	0,1494	0,5	
NEB16	0,06153	3	
NEB17	0,06153	1	
NEB18	0,06153	0,5	
NEB19	0,3486	3	
NEB20	0,3486	1	
NEB21	0,3486	0,5	
NEB22	0,1494	3	
NEB23	0,1494	1	0,5
NEB24	0,1494	0,5	
NEB25	0,06153	3	
NEB26	0,06153	1	
NEB27	0,06153	0,5	

<sup>a</sup> concentração em g L<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> massa em g

#### 4.2.2 Preparo das NE contendo Timol

A NE selecionada é composta de 0,3 g de OSU com e sem timol, 0,3486 g L<sup>-1</sup> de lecitina e 3 g L<sup>-1</sup> de P123, e foi escolhida pelos critérios descritos nos próximos capítulos. Na preparação das NE contendo timol (NET), foram preparadas duas formulações, a metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente. O timol foi dissolvido no OSU na proporção de 9,1% e 42,8% (m/m), resultando em sistemas com 0,512 e 3,2 g L<sup>-1</sup> de timol, nomeadas como NET1 e NET2 respectivamente, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Composição das amostras NEB10, NET1 e NET2.

Amostra	Composição			
	Lecitina <sup>a</sup>	P123 <sup>a</sup>	OSU <sup>b</sup>	Timol <sup>b</sup>
<b>NEB10</b>	0,3486	3	0,3	0
<b>NET1</b>	0,3486	3	0,3	0,52
<b>NET2</b>	0,3486	3	0,3	3,2

<sup>a</sup> concentração em g L<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> em g

#### 4.2.3 Preparo das NE recobertas com Qts

As NE recobertas com Qts foram obtidas através da adição de NEB e NET a uma solução de Qts 0,3 % (m/v) preparada em solução de ácido acético 1 % (v/v) nas proporções de 50, 60, 70, 80 e 90 % (v/v) de solução de Qts 0,3 %. Estas amostras denominadas por NEB@Qts, NET1@Qts e NET2@Qts foram caracterizadas por DLS e potencial zeta, juntamente com a estabilidade.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

#### 4.3.1 Espalhamento de luz dinâmico

A determinação do tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram realizados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em um Goniômetro Multicorrelador (ALV - LSE 5004, Alemanha) com um laser de HeNe trabalhando a

632,8 nm, disponível no Laboratório de Polímeros e Surfactantes (POLISSOL). Para as amostras NEB10, NET1 e NET2, puras e recobertas com Qts o espalhamento de luz das nanopartículas foi verificado na faixa de 30° - 150° com intervalo de 10° durante 120 s para cada ângulo, onde foi então determinado o Raio Hidrodinâmico ( $R_H$ ). Os demais dados de espelhamento foram obtidos no ângulo fixo de 90° durante 120 s.

A partir do decaimento da função de autocorrelação, aplicando modelos matemáticos é possível calcular o coeficiente de difusão das partículas, assim como, o tamanho da NE. O valor do coeficiente de difusão ( $D$ ) é calculado pelo coeficiente da reta do plot da frequência de relaxação da função de correlação ( $\tau$ ), pela função do vetor de onda ( $q^2$ ) do feixe de luz incidente (Equação 1).

$$\tau = q^2 D \quad (1)$$

Onde  $\tau$  é a frequência de relaxação e  $q$  é o vetor de onda definido pela equação 2. Sendo que  $\lambda$  comprimento de onda da luz incidente,  $\theta$  o ângulo de espalhamento e  $n$  o índice de refração do meio.

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2)$$

Assim, conhecendo-se o coeficiente de difusão, a partir da Equação de Stokes-Einstein (Equação 3), é possível calcular o  $R_H$  das nanopartículas, na qual  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura da amostra e  $\eta$  a viscosidade do meio.

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3)$$

O índice de polidispersidade (PDI) foi calculado no Software do Correlador ALV 7004 V.3.0 pelo método Cumulant. As análises foram realizadas em cubetas cilíndricas de vidro contendo 2 mL da amostra previamente diluída em água deionizada utilizando um fator de diluição de 1:30. Da mesma forma foi realizado a diluição das amostras recobertas por Qts, acrescido de uma filtragem com filtro de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2 Análise de Potencial zeta

O potencial zeta ( $\zeta$ ) das amostras foram determinadas utilizando um equipamento Zetasizer Nano Series modelo SZ (Malvern Instruments, Reino Unido), operando em 4,0 mW, disponível no Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio). As amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente no item 4.3.1.

### 4.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A obtenção das imagens dos sistemas NEB, NET e NEB@Qts, NET@Qts (0,3 % de Qts) por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada utilizando um microscópio JEM 1011 operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV, disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME). As amostras foram depositadas em grades de cobre revestidas com filme polimérico (FORMVAR®) e contrastadas pela adição de acetato de uranila 3 % (m/v). O excesso de líquido foi removido com papel filtro e deixado secar à temperatura ambiente. As NEB e NET foram preparadas a partir da diluição de uma alíquota de 300  $\mu$ L em uma solução de isopropanol e água deionizada 50 % (v/v). Já para as NEB@Qts e NET@Qts (0,3 % de Qts), 500  $\mu$ L de amostra foram diluídos em 5 mL de isopropanol, filtradas com filtro de membrana de acetato de celulose com 0,45  $\mu$ m de tamanho de poro, antes de ser gotejado no grid. O isopropanol é comumente utilizado no preparo de amostras para TEM, com o objetivo de obter uma melhor dispersão da amostra sobre a superfície do grid, resultado da rápida evaporação do solvente, evitando assim a formação de aglomerados. O *software open source* Image J foi empregado para obtenção do diâmetro das partículas, calculados a partir da área de cada partícula (área do círculo).

### 4.3.4 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

As curvas de calorimetria diferencial foram obtidas utilizando um calorímetro diferencial de varredura modelo DSC-50 marca Shimadzu, disponível na central de análises do departamento de química da UFSC. Os experimentos foram realizados em atmosfera de nitrogênio 50 mL  $\text{min}^{-1}$  e célula de alumínio, nas condições de temperatura entre -110 a 230  $^{\circ}\text{C}$ , com uma taxa de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Esta condição extrema de temperatura, foi utilizada para obtenção das transições em temperaturas negativas, sem que houvesse interferências geradas pela estabilização da linha base. A análise de DSC de polímeros pode envolver a realização de uma primeira varredura para eliminação da história térmica ou de solvente do material. Em amostras contendo Qts faz-se necessário este processo para a eliminação de água

da matriz. Para as amostras avaliadas neste trabalho, devido à possibilidade de ocorrer degradação da NE e do ativo após a primeira varredura, não foi realizada a eliminação da história térmica ou de solvente.

#### 4.4 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO

##### 4.4.1 Estabilidade das nanoemulsões

As NEs NEB e NET foram armazenadas em frascos tampados em geladeira a uma temperatura de 4 °C para o estudo de estabilidade nos tempos (1, 7, 15 e 30 dias), mediante as variações de tamanho, Índice de Polidispersidade (PDI) e potencial zeta. As metodologias de análise utilizadas estão descritas no item 4.3.1 deste trabalho.

#### 4.5 LIBERAÇÃO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

##### 4.5.1 Metodologia de quantificação de timol utilizando UV-vis

Para a quantificação da quantidade de timol liberada utilizando membrana de diálise, foi confeccionada uma curva de calibração utilizando um espectrômetro UV-Vis (UV NOVA/1800, Brazil), disponível no Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos (POLIMAT). Espectros de absorbâncias de soluções contendo timol (98,5 %), preparadas em água e tampão saliva, nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mg mL<sup>-1</sup>, foram analisados no comprimento de onda de 274 nm (NAGOOR MEERAN et al., 2017). A equação da reta resultou em um coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) de 12,56 para a água e 12,57 para o tampão saliva.

##### 4.5.2 Curvas de liberação em água e solução tampão saliva

Com o objetivo de obter curvas de liberação das diferentes amostras em diferentes sistemas que descrevam um comportamento prévio sobre sistemas de maior complexidade, foi utilizado o processo de diálise (ROBLEDO et al., 2018b). As amostras foram preparadas e adicionadas a uma membrana de diálise (Sigma Aldrich,

tamanho molecular de  $12,000 \text{ kg mol}^{-1}$ ) e colocadas em contato com 500 mL de água deionizada ou tampão saliva, realizando-se coletas de diferentes pontos num período de doze horas, passando em seguida para intervalos de 24 horas até atingir a concentração no tempo infinito. As alíquotas foram analisadas por UV-VIS no comprimento de onda de 274 nm e os cálculos realizados utilizaram o  $\epsilon$  do item 4.5.1. O volume retirado nas coletas era devolvido integralmente para a solução externa à membrana de diálise.

#### 4.5.3 Eficiência de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação foi determinada pela Equação 4 segundo metodologia adaptada de ROBLED0 et al. (2018b) foi analisado a quantidade de timol, em massa, liberado em 24 h, utilizando o sistema de diálise descrito no item 4.5.2.

$$EE\% = \frac{\text{massa de timol liberado}}{\text{massa de timol inicial}} \times 100 \quad (4)$$

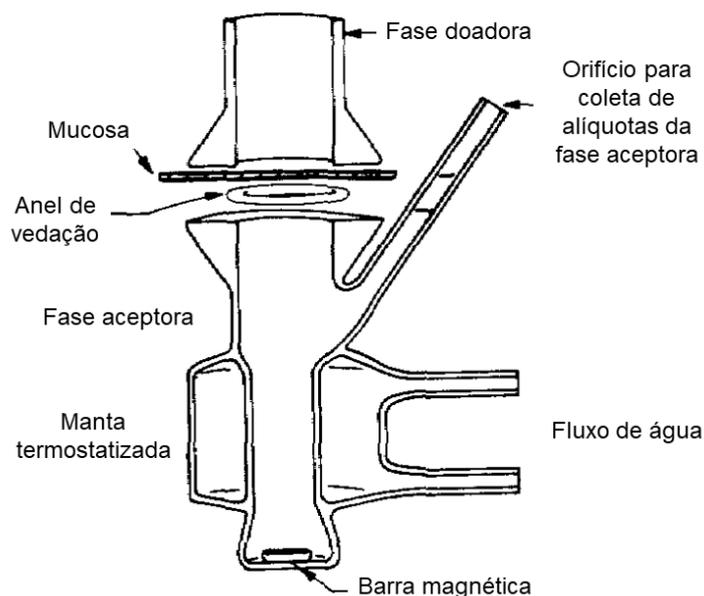
#### 4.5.4 Quantificação do timol utilizando espectroscopia de fluorescência para o estudo de permeabilidade transbucal.

A metodologia de quantificação para o timol foi baseada nos estudos de interação do mesmo com albumina bovina, utilizando a espectroscopia de fluorescência (ROUFEGARINEJAD et al., 2018). A curva de calibração para quantificação do timol foi determinada a temperatura ambiente utilizando-se um fluorímetro da Hitachi modelo F-4500, disponível no POLISSOL. Espectros de emissão de fluorescência de soluções de timol ( $0,07 - 7 \text{ mg mL}^{-1}$ ) preparados em mistura de solventes de 50 % de acetonitrila e uma solução de PBS 15 % etanol, foram obtidos no intervalo de 285 a 400 nm com  $\lambda_{\text{exc}} = 277 \text{ nm}$ . A equação da reta resultante da relação entre a concentração de timol e a respectiva emissão em 304 nm foi utilizada para quantificação do composto.

#### **4.5.5 Estudos de permeabilidade transbucal *ex vivo***

A fim de observar o comportamento das amostras na boca, foram realizados testes de permeabilidade em mucosa suína. Considerando as similaridades estruturais entre a mucosa bucal humana e suína, e que ambas apresentam permeabilidade semelhante, esse tecido animal foi escolhido para os estudos de transporte do timol (KULKARNI et al., 2009). A mucosa bucal suína foi obtida em um abatedouro local imediatamente após o abate e transportada em tampão Krebs à 4 °C. Para os testes, o tecido adiposo foi removido com o auxílio de tesoura cirúrgica e bisturi e a mucosa separada foi mantida em tampão Krebs à 4 °C até o início dos estudos de permeabilidade. Os ensaios de permeabilidade foram realizados no laboratório de farmacotécnica e cosmetologia, utilizando a câmara de difusão de Franz, como mostrado na Figura 8, com uma área de difusão de 1,77 cm<sup>2</sup>. As fases receptoras foram preenchidas com solução aquosa de PBS e etanol 15% e mantidas à 37 °C sob constante agitação magnética a 765 rpm. Devido à baixa solubilidade do timol em água, foi utilizado etanol 15 % para melhorar a solubilidade do mesmo, na fase acceptora, atingindo assim, quantidades quantificáveis do ativo. As fases doadoras foram preenchidas com 2 mL de amostra, sendo elas, uma solução de timol em PBS como controle, NET e NET@Qts, contendo uma massa inicial de 1,5 1,36 e 0,68 mg. Durante um período de 7 horas, a cada hora, alíquotas de 400 µL foram coletadas da fase receptora, e o volume original era corrigido com a adição de solução receptora fresca. As amostras foram diluídas em acetonitrila para a precipitação de proteínas, homogeneizadas em agitador do tipo Vortex, centrifugadas a 12000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi quantificado por fluorescência no comprimento de onda de 304 nm.

Figura 9 - Representação esquemática da câmara de difusão de Franz.



Fonte: Franz. 1975(FRANZ, 1975)

#### 4.5.5.1 Cálculos dos dados de permeabilidade

A quantidade de fármaco acumulada por área ( $Q_t$ ) foi calculada de acordo com a equação 5 (SINTOV; BOTNER, 2006).

$$Q_t = V_r C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_s C_i \quad (5)$$

Onde,  $V_r$  e  $V_s$  representam o volume da solução receptora e da alíquota, respectivamente;  $C_t$  é a concentração de fármaco no meio receptor em cada tempo de amostragem e  $C_i$  é a concentração de fármaco no tempo de ordem  $i$ .

Através dos dados obtidos pela permeabilidade foi calculado o estado de fluxo constante ( $J_s$ ) através do coeficiente angular da reta que relaciona a quantidade permeada acumulada de fármaco ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) em função do tempo (h). O coeficiente de permeabilidade ( $P$ ) foi determinado pela relação entre  $J_s$  e a concentração inicial de fármaco na câmara doadora ( $P = J_s/C_d$ ). O tempo de latência, tempo requerido para a obtenção do estado de fluxo constante, é representado pelo intercepto da regressão linear com o eixo das abcissas.

#### 4.6 SECAGEM DAS AMOSTRAS NEB@QTS E NET@QTS POR SPRAY DRYING

Após a obtenção das formulações das NE, as mesmas foram revestidas por Qts, através da adição de 10% de NET ou NEB em uma solução de Qts 0,4 % (m/v) preparada em solução de ácido acético 1% (v/v). Posteriormente, as mesmas foram secas empregando-se a técnica de secagem por atomização, utilizando o equipamento spray dryer BUCHI B290 (Suíça), disponível no POLIMAT (CASANOVA; ESTEVINHO; SANTOS, 2016),(RASSU et al., 2014). As condições operacionais de secagem foram fixadas em 120 °C para a temperatura de entrada, 100 % de taxa de aspiração ( $35 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ ), 5 % de taxa de injeção da amostra ( $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) e um fluxo de ar de  $600 \text{ L h}^{-1}$ , resultando assim em uma temperatura de saída em torno de  $84 \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ , com uma agulha de 0,5 mm de diâmetro.

##### 4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Para verificar o tamanho e morfologia das partículas obtidas por spray drying, foram obtidas imagens de SEM, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM – 6390LV) disponível no LCME, com uma tensão de aceleração de 10 kV e com aproximações de 500, 1500, 5000 e 10000 vezes. As amostras foram preparadas através da deposição das partículas em fita de carbono e metalizadas com fina camada de ouro. O *software open source* Image J foi empregado para obtenção do diâmetro das partículas, calculados a partir da área de cada partícula (área do círculo).

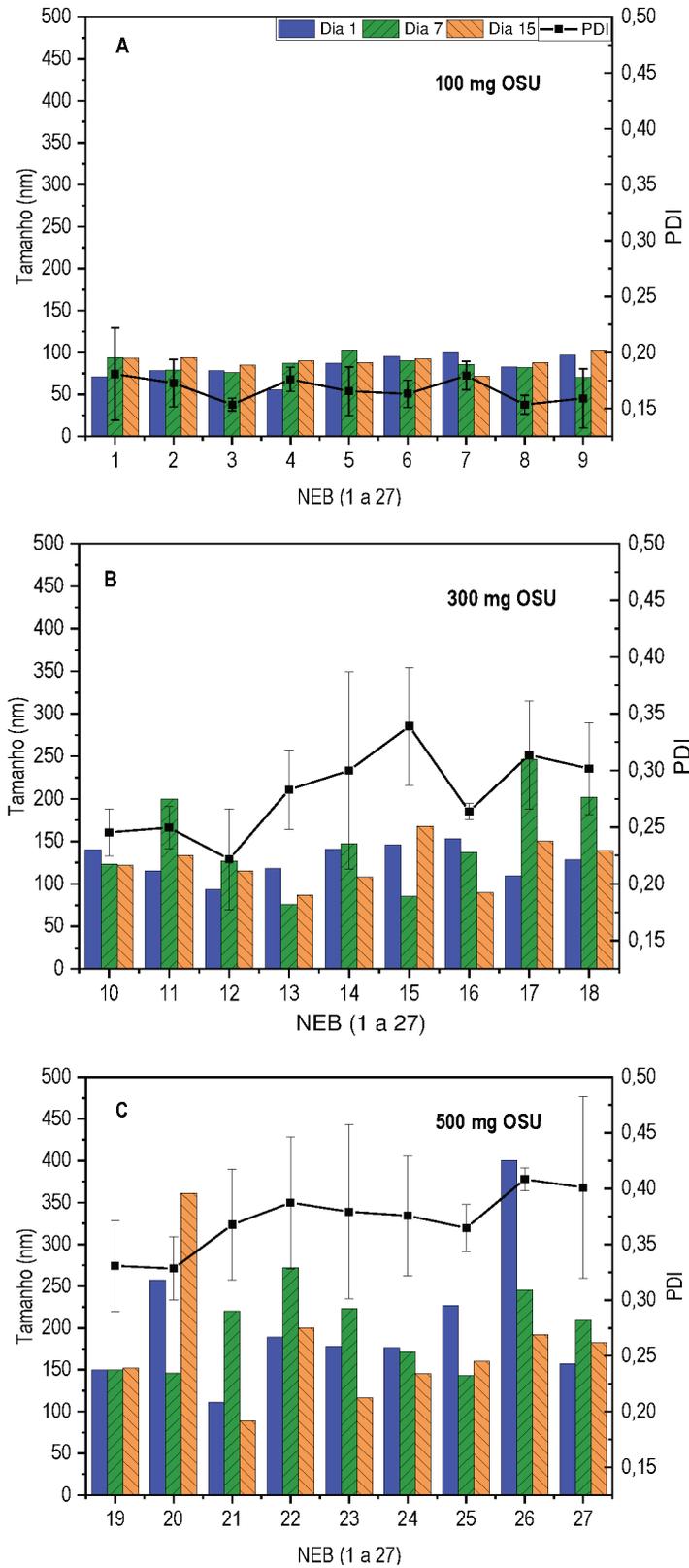
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ESCOLHA DA FORMULAÇÃO DA NANOEMULSÃO

A escolha de uma formulação da NE foi realizada a partir formulação de 27 NEs preparadas com diferentes concentrações de lecitina, P123 e massa de OSU, conforme apresentado na Tabela 2. As amostras foram avaliadas pelo seu tamanho e PDI nos dias 1, 7 e 15 como visto na Figura 9, a seguir. As Figuras 9A, 9B e 9C mostram uma tendência de aumento dos valores de tamanho e PDI, com o aumento da quantidade de óleo utilizada. Conclusão baseada na observação, pois os gráficos estão apresentados na mesma escala de tamanho, para ambos os eixos “y”. O conjunto de amostras NEB1 a NEB9, representados de maneira mais clara na Figura 10A, com 100 mg de OSU empregados na confecção da NE, observa-se uma tendência de tamanhos inferiores a 100 nm e valores de PDI abaixo de 0,230. Tendência essa que se manteve com o passar do tempo, indicando boa estabilidade deste sistema.

O conjunto NEB10 a NEB18 e NEB19 a NEB27 contendo 300 e 500 mg são mostrados na Figura 10B e 10C, respectivamente, apresentando a tendência em formar partículas maiores e mais polidispersas. Para a Figura 10B observa-se tamanhos entre 75 e 350 nm com PDI entre 0,2 e 0,4 e de modo semelhante para a Figura 10C temos tamanhos entre 100 e 400 nm e PDI entre 0,3 e 0,5. Pode ser observado também que com o passar dos dias a variação de tamanho e PDI aumenta, consequência da possível formação de aglomerados e segregação de fase. É importante ressaltar que os dados de PDI estão apresentados através das médias e respectivos desvios, para valores adquiridos nos três diferentes dias, com a finalidade de visualizar uma linha de tendência na variação destes valores no tempo.

Figura 10 – Dados de tamanho e PDI adquiridos a partir do ângulo de 90°, dos dias 1 (Barra azul), 7 (Barra verde) e 15 (Barra laranja) para as formulações de NEB1 a NEB9 (A), NEB10 a NEB18 (B) e NEB19 a NEB27 (C).



A escolha da NE a ser utilizada nos passos seguintes deste trabalho, foi baseada nos critérios de maior quantidade de OSU carregada junto da melhor estabilidade. Com isso foram selecionadas as amostras NEB10 e NEB19, pois carregaram respectivamente 300 e 500 mg de óleo e mantiveram a estabilidade com relação ao tamanho e PDI. A formulação número 19 apesar de promissora, foi descartada por apresentar segregação de óleo na superfície da NE, assim como todas as amostras entre NEB11 e NEB27.

O OSU foi escolhido para a formulação das NE pois em produtos comerciais contendo óleo essencial de tomilho, entre outros óleos essenciais, eles são diluídos com OSU. O mecanismo de formação da NE através da utilização de P123 é complexo, onde apenas proposições podem ser feitas, tais com a alternância entre moléculas de lecitina e P123. O mesmo pode estar em formato de “v” como mostrado na Figura 6 ou simplesmente na sua forma alongada (CHEN et al., 2016b). Apesar de complexo, sem um segundo surfactante, a NE não é formada, sendo formados apenas lipossomos. Desta maneira, a discussão deste trabalho terá seu foco maior nas interações que ocorrem devido a presença de lecitina.

De acordo com a Figura 11A, observa-se que a formulação NEB10 apresenta um período de estabilização inicial, mostrado pela discrepância entre os valores de tamanho de raio do dia 1 para o dia 7, pois os valores subsequentes apresentam maior proximidades. Este fenômeno é justificado pela metodologia utilizada, visto que tanto as medidas de tamanho, PDI e potencial zeta foram realizadas no mesmo dia de sua confecção, ou seja, dia 1, sem que houvesse um tempo prévio para a estabilização do sistema. De maneira geral podemos observar que o sistema é estável no período analisado, sustentado pelos valores de tamanho e potencial zeta apresentados na Figura 11A e pelos baixos valores de PDI apresentados na Tabela 4. Soluções monodispersas são cineticamente estáveis, possuem maior resistência a formação de cremes e coalescência, assim como, menor efeito gravitacional (BOUCHEMAL et al., 2004). A coalescência do sistema é governada pelo amadurecimento de Oswald, onde em NEs o mecanismo de crescimento de gotículas é dirigido pela migração de moléculas de óleo das gotículas menores, através da fase aquosa, para as gotículas maiores, promovendo gotículas cada vez maiores até o ponto que ocorra a

segregação das fases (CHANAMAI; HORN; MCCLEMENTS, 2002). Esta migração é favorecida pelo aumento da solubilidade do óleo na água.

Figura 11 - Avaliação da estabilidade das amostras NEB10 (A) e NET1 (B) por tamanho de raio no ângulo de 90° (■) e potencial zeta (●).

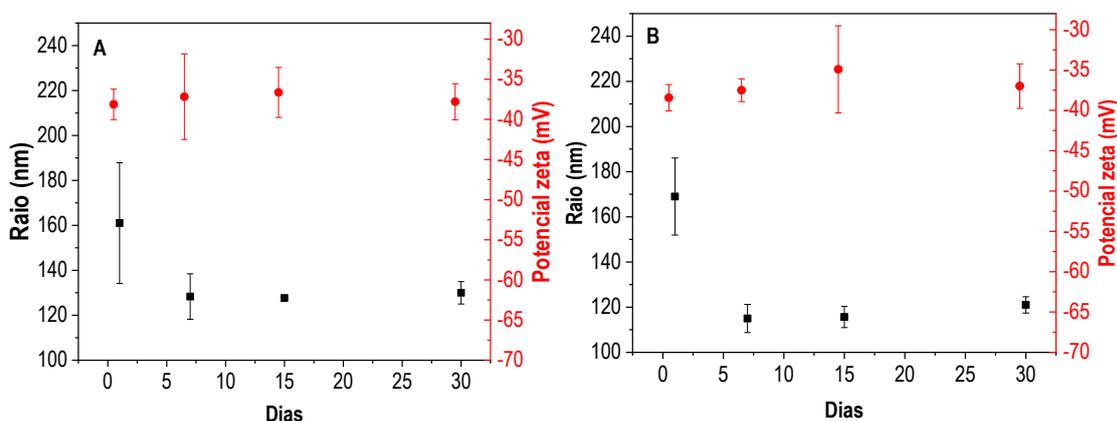


Tabela 4 – Valores de PDI das amostras NEB10 e NET1 referentes ao ângulo de 90° para os dias 1, 7, 15 e 30.

Dias	NEB10 <sup>a</sup>	NET <sup>a</sup>
1	0,198 ± 0,0296	0,202 ± 0,0719
7	0,236 ± 0,0267	0,208 ± 0,0276
15	0,243 ± 0,0233	0,179 ± 0,0392
30	0,244 ± 0,0151	0,227 ± 0,0462

<sup>a</sup> medida ± DP, n = 3

Os valores de potencial zeta estão correlacionados a estabilidade de uma NE pelo seu valor negativo, quanto mais negativo forem seus valores de potencial zeta, maior será o número de cargas negativas no sistema e conseqüentemente maior a repulsão entre as partículas. Desta forma é retardada a coalescência das partículas, impossibilitando a formação de conglomerados ou partículas maiores, o que aumentaria a possibilidade do sistema de sair de fase (LI et al., 2017).

Após a escolha da melhor formulação contendo apenas lecitina, P123 e OSU, ou seja, a formulação NEB10, foi então realizada a incorporação do timol na NE, dispersando este no OSU. Foi realizada uma solução de OSU contendo 9,1% do timol, da qual 0,3 g de OSU foram utilizados na formulação da NET1, resultando em uma massa de 0,0273 g de timol, ou seja, 0,512 g L<sup>-1</sup>, como mostrado anteriormente na Tabela 3. A estabilidade da NET1 foi acompanhada do mesmo modo que a amostra NEB, onde podemos ver na Figura 11B um comportamento similar ao observado para

a amostra NEB10. É observado uma diferença significativa de tamanho entre os dias 1 e 7 e uma estabilidade entre os dias 7 e 30, sendo justificado conforme citado anteriormente para a amostra NEB10. Ainda correlato as conclusões já feitas, temos também valores negativos do potencial zeta e valores de PDI abaixo de 0,230 como mostrado na Tabela 4. Estudos utilizando lecitina como emulsificantes citam que valores entre 0,1 e 0,2 são valores aceitáveis para uma dispersão coloidal de qualidade e desta forma obtivemos um valor próximo ao máximo referenciado na literatura (KLANG; VALENTA, 2011). De maneira introdutória podemos observar tamanhos menores para NET1 do que para o sistema NEB10 e valores de potencial zeta e PDI próximos, constatando uma considerável semelhança entre os dois sistemas NEB10 e NET1.

A discussão dos tópicos seguintes mostra a necessidade da confecção de uma segunda formulação com maior massa de timol, a fim de melhorar os estudos de DSC e incrementar trabalhos futuros do ponto de vista da liberação em água e tampão simulador saliva, análise do pó obtido por spray drying e os estudos de permeabilidade em mucosa de porco. Esta nova formulação foi denominada de NET2, onde foram utilizados 42,8% de timol, resultando em 0,128 g de timol por formulação ou uma concentração de 3,2 g L<sup>-1</sup> como visto anteriormente na Tabela 3. Os valores de tamanho, PDI e potencial zeta para a amostra NET2 serão abordados e apresentados subsequente junto a discussão sobre R<sub>H</sub>, assim como as diferenças entre o sistema NET1. A incorporação de uma maior massa de timol é vantajosa para melhorias na quantificação do ativo nos diferentes processos, acompanhada também do aumento da eficiência do material formado. Observa-se também que a solubilidade proporcionada pelo sistema é vantajosa, já que a solubilidade máxima do timol em água é de 1 g L<sup>-1</sup>, como já citado anteriormente.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

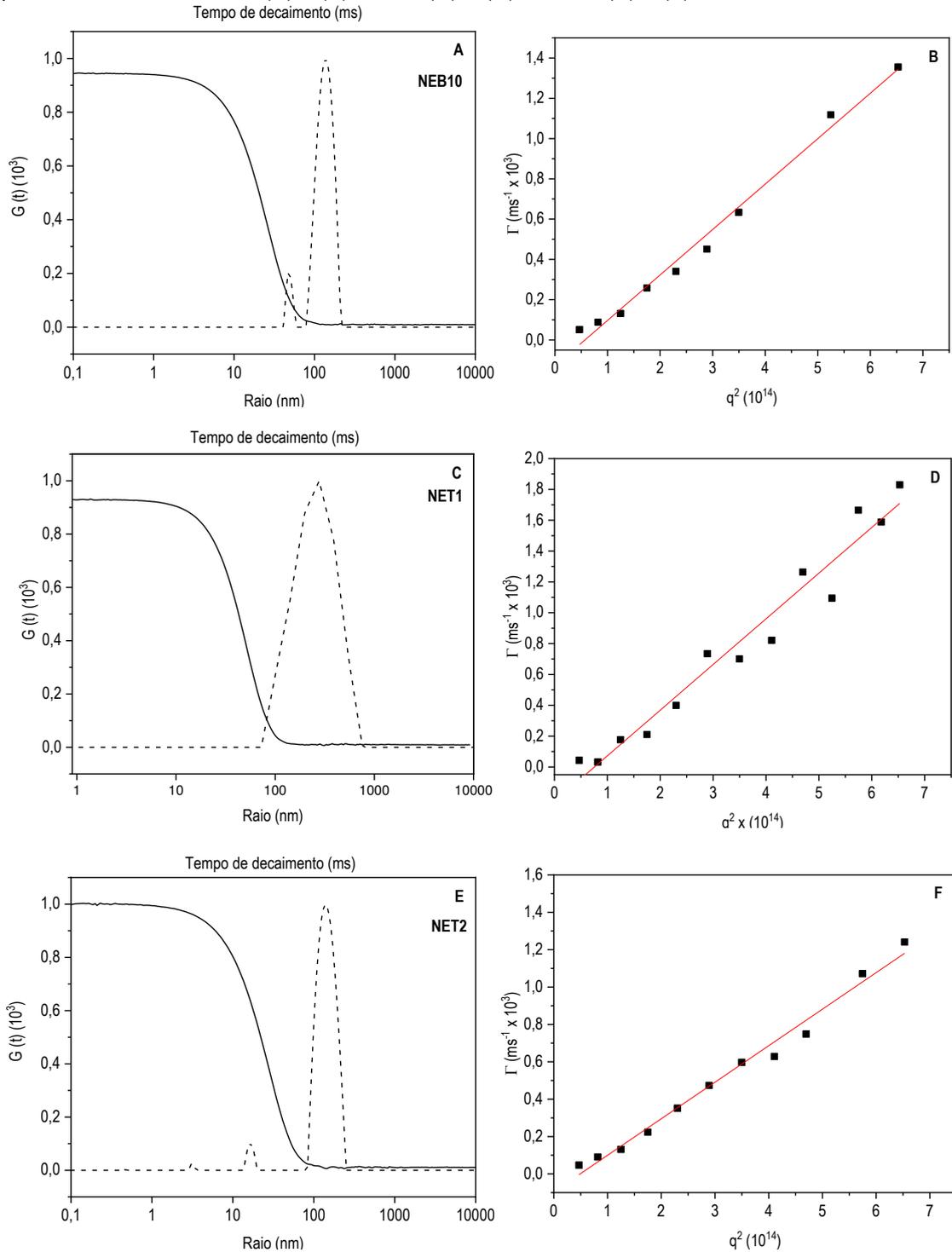
### 5.2.1 Raio Hidrodinâmico ( $R_H$ ) para os sistemas NEB10, NET1 e NET2

Pode-se observar na Figura 12A, para a amostra NEB10 uma boa curva de correlação e uma distribuição de tamanho com duas populações distintas para o ângulo de  $90^\circ$ . As populações e seus devidos tamanhos obtidos pela curva de distribuição a partir do software foram de 6,8 % com 100 nm e 93,2 % com 268 nm de diâmetro, com um PDI de 0,296. A presença de duas populações pode ser justificada pela metodologia de análise e pela não homogeneidade na confecção da NE, podendo apresentar variações no momento da adição da fase orgânica a fase aquosa, momento de maior importância no processo de formação da NE. A Figura 12B mostra a dependência da frequência de relaxação ( $\Gamma$ ) em função de  $q^2$  com um  $R^2 = 0,9869$  e um coeficiente angular de  $2,26 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , resultando em um  $R_H$  de 104 nm e um diâmetro de 208 nm.

De maneira similar, a Figura 12C apresenta a curva de correlação e a distribuição do raio hidrodinâmico, assim como a dependência de  $q^2$  em função da frequência de relaxação (Figura 12D) para a amostra NET contendo 27 mg de timol. Observa-se novamente uma boa curva de correlação e uma única população com o  $R_H$  de 79,29, o que dá um tamanho de aproximadamente 160 nm, apresentando um aumento de tamanho significativo comparado a NEB10. Quando o raio hidrodinâmico é analisado apenas pelo ângulo de  $90^\circ$  obtém-se 100% de população com 480 nm e um PDI de  $0,217 \pm 0,172$  já que a medida feita em um único ângulo resulta no coeficiente de difusão aparente.

Por fim a Figura 12E mostra as curvas de correlação e a distribuição do raio hidrodinâmico e a dependência de  $\Gamma$  em função de  $q^2$  (Figura 12F) para a amostra de NET2 preparado com 128 mg de timol. Podemos observar uma boa correlação dos dados e a população majoritária apresenta um  $R_H$  de 84,2 nm e um tamanho de 168,4 nm. Da mesma maneira obtém-se os dados no ângulo de  $90^\circ$  apresentam populações de 1,5 % com 100 nm, 97% com 484 nm e 1,5 % com 3,2  $\mu\text{m}$  com um PDI de 0,227.

Figura 12 – Curvas correlação  $G(t)$  para o ângulo de  $90^\circ$  (linha sólida) e a respectiva distribuição de tamanho (linha tracejada), assim como a dependência da frequência de relaxação ( $\Gamma$ ) em função de  $q^2$  para as amostras NEB10 (A) e (B), NET1 (C) e (D) e NET2 (E) e (F).



Observando a Tabela 5 conclui-se uma diminuição significativa nos valores de  $R_H$  da NEB10 para a NET1 e NET2, em torno de 20%, justificado pela interação do timol com a região polar da lecitina (mais efetiva com o grupo fosfato). Esta interação

gera uma força positiva no sentido de aproximar as moléculas lecitina na NE, formando um sistema mais compacto e organizado. Estudos mostram que em filmes lineares de PC o timol causa um efeito da diminuição da pressão e aumento na elasticidade do filme (FERREIRA et al., 2016). Desta maneira, quanto mais compacta forem as gotículas, menor será o seu tamanho. Em contra partida observamos um acréscimo de 5 % no  $R_H$  comparando NET1 e NET2, aumento do qual pode ser justificado pelo aumento da quantidade de timol a ponto de o mesmo localizar-se entre as regiões polares da lecitina de tal maneira a causar uma certa repulsão ou consequência de uma encapsulação mais eficiente de (OSU + timol) (FERREIRA; LAGO; CASELI, 2019).

Tabela 5 – Valores de  $R_H$ , PDI e potencial zeta para as amostras NEB, NET1 e NET2

Amostra	$R_H^a$	PDI	Potencial zeta <sup>b</sup>
NEB	104	0,296	$-36,8 \pm 1,74$
NET1	79,3	0,217	$-37,9 \pm 2,50$
NET2	84,2	0,227	$-32,6 \pm 2,68$

<sup>a</sup> nm

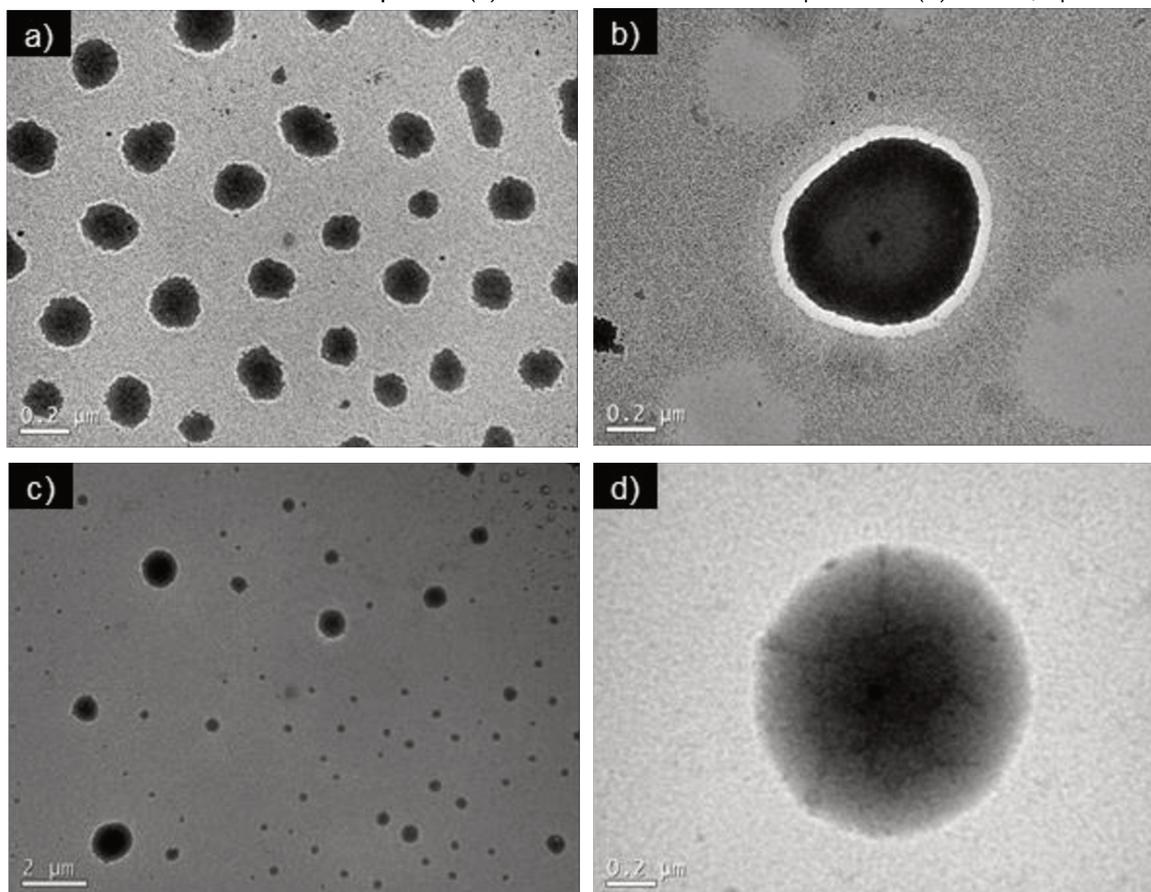
<sup>b</sup> medida  $\pm$  DP, n = 3

Verificando-se os valores de potencial zeta na Tabela 5 observa-se valores semelhantes para as amostras NEB10 e NET1. Mas nota-se um decréscimo no valor de potencial zeta para a amostra de NET2, mostrando que a disponibilidade das cargas negativas da lecitina diminuiu com o aumento da concentração de timol.

## 5.2.2 Microscopia de transmissão eletrônica (TEM)

A fim de observar o formato das NEs formadas foram realizadas imagens por TEM dos sistemas NEB10 (a) e (b) e NET (c) e (b), representados na Figura 13. A amostra NEB10 apresentou um tamanho de partícula de  $175 \pm 27$  nm, valor menor que o observado anteriormente pelo  $R_H$  que foi de 208 nm. Esta redução de tamanho entre as diferentes técnicas de análise é esperada, já que para obtenção das micrografias, a amostra se encontra seca, apresentando comportamento diferente do apresentado em solução. O efeito de secagem pode ser observado em maior detalhe na Figura 13b, pela formação de um anel branco em torno da NE seca.

Figura 13 - Imagens de TEM da amostra NEB@Qts em que em (a) e (b) a barra de escala é de 0,2  $\mu\text{m}$ . Para a amostra NET@Qts em que em (c) a barra de escala é de 2  $\mu\text{m}$  e em (d) é de 0,2  $\mu\text{m}$ .



Para a amostra NET1 (Figura 13c) o tamanho foi de  $886 \pm 316$  nm, superior ao encontrado pelo  $R_H$  que foi de 160 nm. Neste ponto nos deparamos com problemas técnicos da análise e do equipamento, que impossibilitou uma aproximação maior, sendo possível apenas a visualização de gotículas maiores. Em contra partida é visível a formação da NE e é evidenciado um menor efeito da secagem do solvente, resultado da interação do timol com a região polar da lecitina, formando então uma micela mais organizada e de maior rigidez.

Outro ponto a ser observado é a diferença de coloração entre as amostras, sendo a NEB10 muito mais escura do que a NET. Este efeito pode ser justificado pela interação eletrostática entre os íons uranila ( $\text{UO}_2$ )<sup>+2</sup> com as cargas negativas do grupo fosfato da lecitina (SHAH, 1969). O íon uranila é derivado da solução de acetato de uranila utilizada para contrastar as amostras sobre o grid para realização das

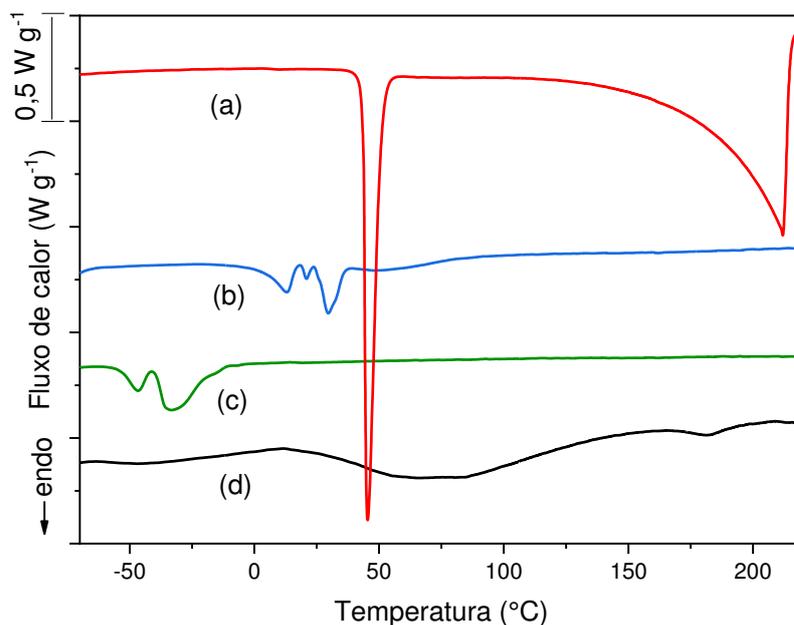
imagens. Sabe-se então que quanto maior a quantidade de íons uranila sobre a superfície da partícula, mais escura ela será, indicando que para a NEB10 existem mais cargas negativas de lecitina disponíveis para interação com estes íons. Desta maneira é adicionado mais um resultado que mostra a interação entre o timol e a lecitina, já que a coloração mais acinzentada da partícula NET sugere menor quantidade de íons uranila na superfície, ou seja, menos cargas negativas da lecitina disponíveis, consequência da presença de timol entre as moléculas. A Figura 13c está em uma escala maior que a Figura 13a, resultado da não obtenção de uma imagem com nitidez aceitável, que mostrasse as características do material.

### 5.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A fim de avaliar as interações presentes na formulação em relação à composição das NEs com e sem timol, foram realizadas análises de DSC entre os componentes puros, mistura dos componentes presentes na formulação, assim como das NEs carregadas e não carregadas com timol. Na Figura 14a é mostrada a curva de DSC para o componente puro timol, que apresenta dois eventos endotérmicos bem distintos, o primeiro em 45,7 °C com o valor de entalpia de 116,1 J g<sup>-1</sup>, referente à sua fusão e o segundo evento que se inicia em 120 °C e termina próximo a 220 °C com uma taxa máxima de sublimação em 230 °C, compreendendo uma entalpia de 367,8 J g<sup>-1</sup> (ZAMANI et al., 2015). Este segundo evento tem um perfil alargado e está relacionado com a transição de fase líquido-vapor do composto, seguido de um acréscimo vertical acima da linha base inicialmente estabelecida, sugerindo assim a perda de massa durante o processo. Este evento está atrelado a elevada pressão de vapor do timol.

A curva (b) é referente ao tensoativo P123, que apresenta dois eventos de fusão muito próximos com uma entalpia total de 15,3 J g<sup>-1</sup> nas temperaturas de 19,3 e 20,6 °C, seguido de uma fusão em 32,2 °C com entalpia de 17,124 J g<sup>-1</sup>. Já a curva (c) deste mesmo gráfico representa as transições do OSU que apresenta duas entalpias de fusão muito próximas em temperaturas negativas de -46,5 e -33,24 °C, somando um valor de -51,0 J g<sup>-1</sup>. Isso mostra que a temperaturas inferiores a -50 °C o mesmo se encontra no estado sólido.

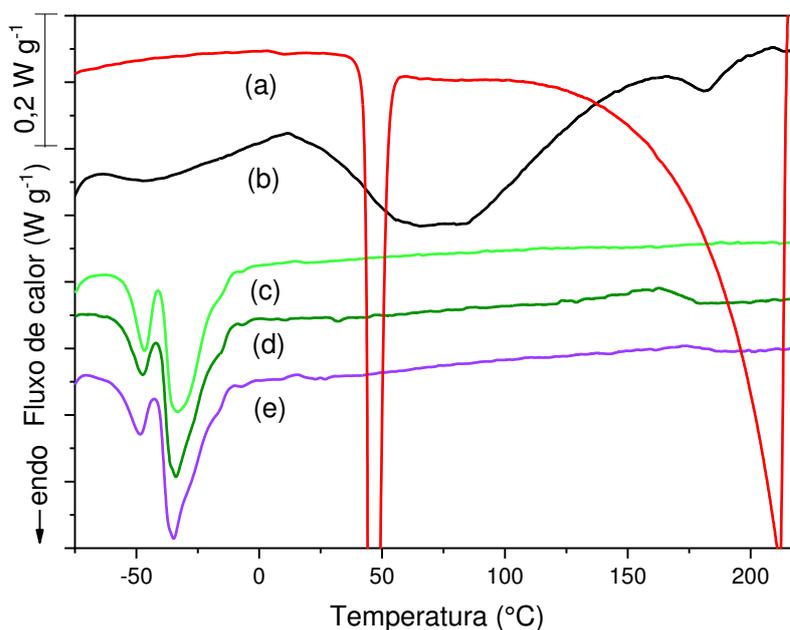
Figura 14 - Curvas de DSC dos componentes puros timol (a), P123 (b), OSU (c) e lecitina (d).



Por fim a lecitina curva (d) apresenta três eventos pouco definidos, consequência da complexidade da amostra e da baixa entalpia dos processos. O primeiro evento entre -65 e 10 °C apresenta uma entalpia de fusão de  $13,6 \text{ J g}^{-1}$ , seguido de um segundo evento alargado entre 75 e 85 °C com  $\Delta H$  de  $-157,8 \text{ J g}^{-1}$  e um último evento em 182 °C com uma entalpia de  $6,4 \text{ J g}^{-1}$ .

Em seguida na Figura 15 são mostradas as curvas das amostras NEB10 (d) e NET1 (e) e dos componentes puros timol (a), lecitina (b) e OSU (c). Observa-se nas amostras NEB10 e NET1 a presença das bandas de transição de fase referente ao OSU (-60 a 0 °C), consequência da grande quantidade em massa presente do mesmo nas amostras e um evento bem definido para a amostra NEB10 na faixa de temperatura entre 164 e 178 °C, possível resultado de uma transição da lecitina. Este mesmo evento também está presente na amostra NET1 de forma discreta e levemente deslocado para maiores temperaturas, possível resultado da interação da lecitina com o timol.

Figura 15 - Curvas de DSC dos componentes puros timol (a), lecitina (b) e OSU (c), assim como dos sistemas NEB10 (d) e NET1 (e).



Para um melhor entendimento dos sistemas gerados, foram obtidas as curvas de DSC de misturas de menor complexidade a partir dos componentes puros, preservando a integridade da metodologia de preparo das NEs, assim como as proporções. As curvas da mistura de lecitina + OSU e lecitina + OSU + timol estão apresentadas da Figura 16 (d) e (e), respectivamente, juntamente dos componentes puros e das NEs NEB10 e NET1.

Estes dados mostram que na mistura entre OSU e lecitina (d) não é possível observar transições referentes a lecitina, apenas transições do OSU próximo à -50 °C pode ser notada, mas quando adicionado timol à mistura ocorre o desaparecimento das transições relativas ao OSU e tem-se o aparecimento de uma transição em torno de 160 °C possivelmente referente ao timol. A Figura 17 apresenta de forma nítida a forte interação entre a mistura de OSU e timol, já que esta mistura tende a ficar líquida na faixa de temperatura estudada, sem a presença de uma transição de fase evidente ou definida. Pode-se apenas podemos identificar de forma clara a supressão das entalpias de fusão dos dois componentes.

Figura 16 - Curvas de DSC referentes aos compostos puros timol (a), OSU (b) e lecitina (c), as interações entre estes componentes lecitina + OSU (d) e lecitina + OSU + Timol (e), juntamente com os sistemas NEB10 (f) e NET1 (g).

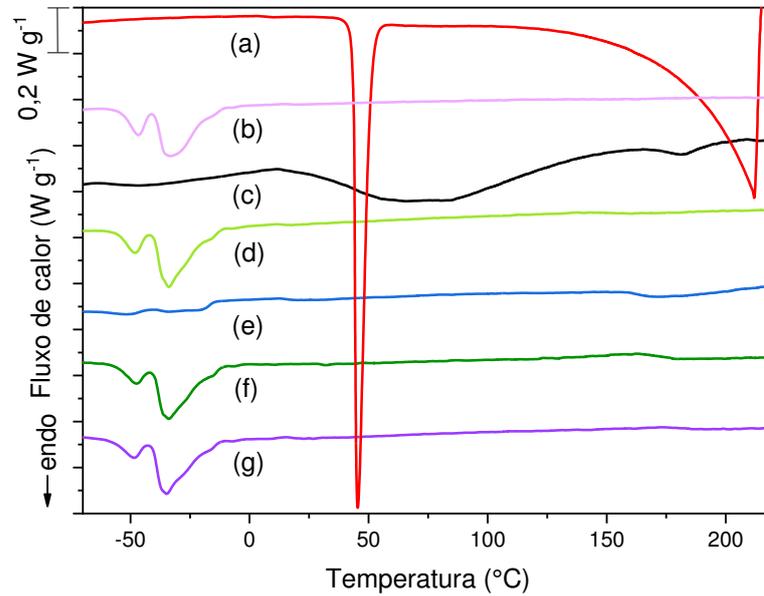
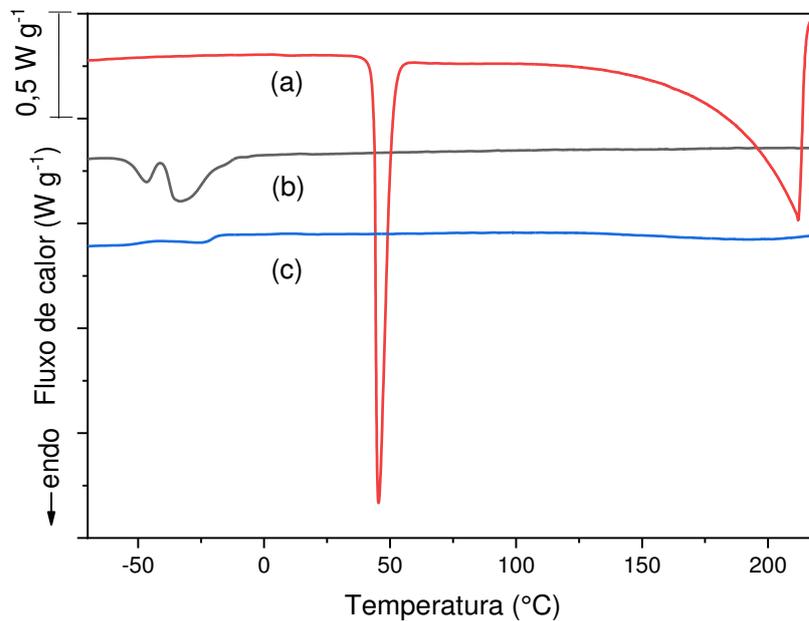


Figura 17 - Curvas de DSC do timol (a) OSU, (b) e a mistura entre 48,2 % de timol e 51,8% de OSU (c).



Em resumo, a Figura 17 nos mostra a elevação do ponto de congelamento do OSU devido a presença de timol e a diminuição da pressão de vapor do timol e também retarda a sua temperatura de ebulição. Comportamento observado pela

comparação das temperaturas de transição com os componentes puros. Isso mostra que existe uma forte interação entre estes componentes, o que implica que estes compostos interferem na estrutura cristalina do outro. Fato importante, pois esta mistura confere uma maior solubilidade para o timol, junto da diminuição da elevada pressão de vapor. Em geral isso pode conferir ao sistema uma melhor eficiência de encapsulação e uma liberação mais controlada. Ponto importante este também quando relacionamos os resultados com a proposta de secagem da NET por atomização a elevada temperatura.

## **6 REVESTIMENTO DAS NANOEMULSÕES COM QUITOSANA**

Na segunda etapa do trabalho, com o objetivo de obter um produto com características mucoadesivas foi confeccionado um sistema composto de NE revestida por Qts. A interação da Qts com as NE é de caráter eletrostático, mais precisamente, entre as cargas negativas da lecitina e das cargas positivas referente ao grupo amino da Qts, quando protonado (LIU et al., 2016). A elucidação mais detalhada do comportamento da NE recoberta por Qts será realizada nos itens a seguir, onde serão reportadas todas as caracterizações realizadas para os sistemas NEB@Qts e NET@Qts. O sucesso em obter sistemas estáveis, está na utilização dos volumes adequados na mistura entre NE e Qts, que está diretamente relacionado a massa de Qts presente na solução.

### **6.1 VARIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE QTS PARA RECOBRIMENTO**

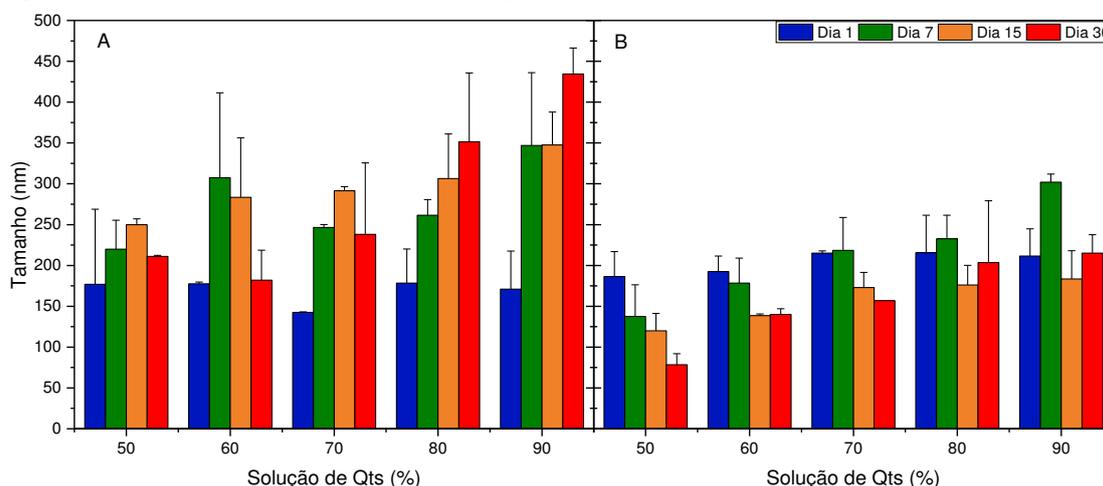
A fim de entender melhor o funcionamento e o comportamento das NEs em contato com uma solução de Qts, foi preparada uma solução de 0,3 % (m/v) de Qts em solução ácida de ácido acético 1 % (v/v). Esta porcentagem foi baseada na utilização moderada de Qts, pois se trata de uma relação direta entre massas. Quanto maior a massa de Qts, maior a capacidade de encapsulação da NE, mas em contra partida o excesso pode se tornar um desperdício. Este limite também tem relação com a viscosidade da solução, ou seja, quanto maior a massa, maior a viscosidade e maiores serão os desafios de trabalho com esta solução. Assim, foi necessário um

estudo para avaliar quantidade máxima de NE que poderia ser adicionado a uma solução de Qts 0,3 % em função da estabilidade do sistema formado.

Foi então conduzido um experimento onde foram estudadas 5 diferentes soluções, contendo 50, 60, 70, 80 e 90 % (v/v) de solução de Qts, sendo avaliadas pelo tamanho, PDI e potencial zeta nos dias 1, 7, 15 e 30. É importante ressaltar que o dia 1 é referente a 24 h de contato sob agitação entre a NE e a solução de Qts. Após este período, as mesmas foram acondicionadas em geladeira a temperatura de 4 °C com o intuito de avaliar sua estabilidade.

Os resultados para as amostras NEB@Qts (A) e NET@Qts (B) são apresentados a seguir, nas Figuras 18, 19 e 20, indicando, respectivamente, os dados de tamanho, PDI e Potencial zeta. As discussões desta seção podem ser realizadas de diferentes maneiras, sendo prudente iniciar pelos tamanhos apresentados pelas diferentes amostras. Observa-se na Figura 18A que quanto maior a quantidade de Qts nos sistemas, acima de 80 %, maior é o raio das partículas formadas, elevando a probabilidade do sistema de se auto organizar com o passar do tempo, formando partículas ainda maiores e possivelmente mais sólidas (Tabela 6).

Figura 18 - Tamanho de partícula pelo tempo das amostras NEB@Qts (A) e NET@Qts (B).



Abaixo de 80 % de Qts observa-se um comportamento interessante, onde o tamanho apresenta um aumento considerável até o 15<sup>a</sup> dia, seguido de uma diminuição a valores próximos aos apresentados no 1<sup>a</sup> dia. Também foi observado a separação de fase para as amostras abaixo de 80 % de Qts, causada pelo excesso

de NE e a baixa massa de Qts presente, impossibilitando a formação de partículas com camada uniforme e espessa. A formação de uma camada espessa pode estar relacionada diretamente com a quantidade de Qts em solução, capaz de auto organizar-se em torno da NE, assim como os efeitos causados pela carga superficial da NE.

Tabela 6 - Variação do tamanho do raio das partículas em porcentagem no decorrer do tempo.

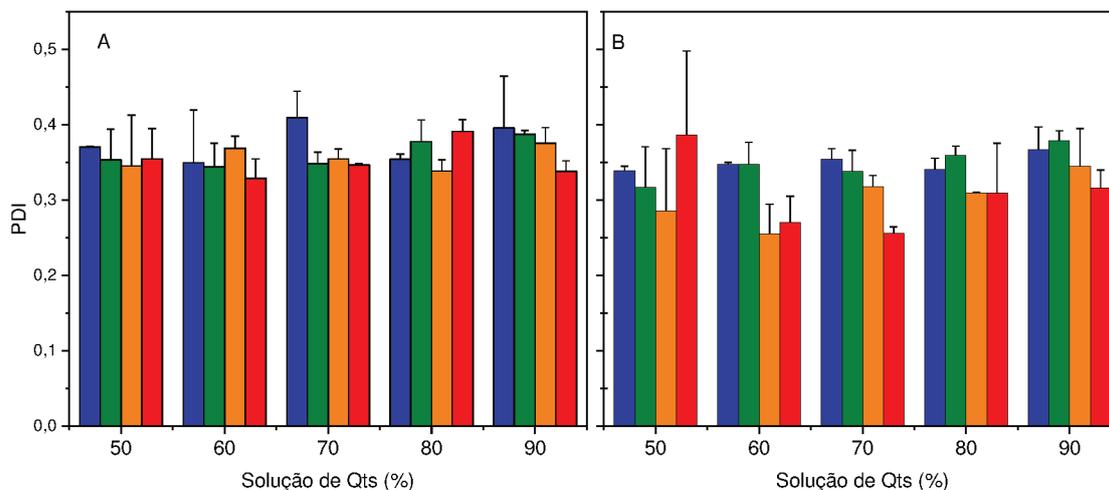
Amostra	Qts (%)	Variação do tamanho em função do tempo (%) <sup>a</sup>		
		7 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>
NEB10@QTS	50	24,29	41,24	19,20
	60	73,23	59,71	2,535
	70	72,98	104,5	67,01
	80	46,49	71,70	96,91
	90	102,9	103,2	154,1
NET1@Qts	50	-26,27	-35,65	-57,90
	60	-7,272	-28,05	-27,27
	70	1,627	-19,53	-26,97
	80	7,888	-18,32	-5,568
	90	42,78	-13,23	1,654

<sup>a</sup> Valores de variação em relação ao 1<sup>a</sup> dia.

<sup>b</sup> Tempo (dias)

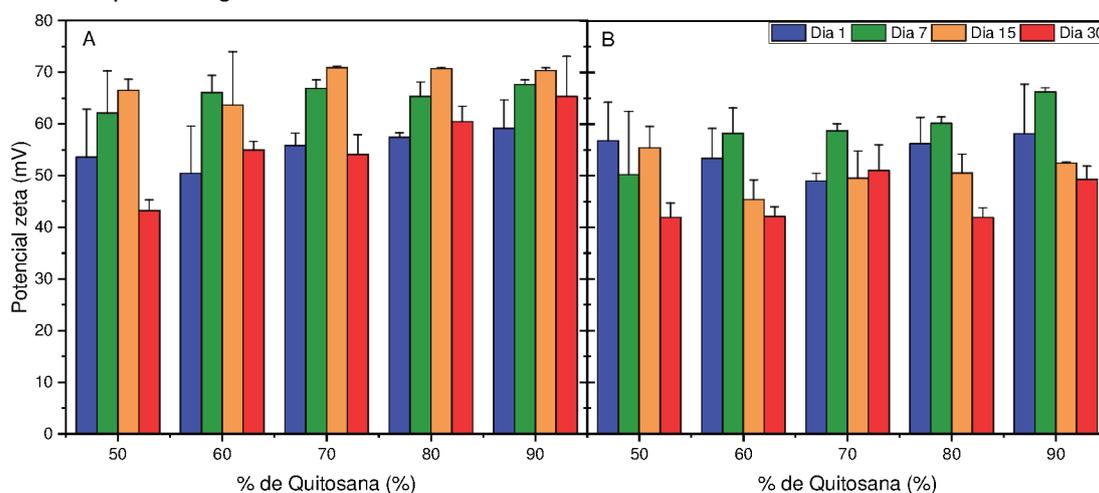
Analisando os dados de PDI na Figura 19A encontramos valores muito próximos ao decorrer do tempo e com baixos desvios nos tempos analisado, o que indica que o sistema possui uma boa polidispersidade, que segundo (AVADI et al., 2010) indica o intervalo entre 0 a 0,5 como um bom valor. Este PDI homogêneo é possível consequência de a amostra ter sido submetida a filtração antes da realização da análise, evitando dessa forma o aparecimento de cadeias soltas e aglomerados do polímero.

Figura 19 - Índice de polidispersidade (PDI), pela porcentagem de solução de Qts, nos dias 1, 7, 15 e 30, para o conjunto de amostras NEB@Qts (A) e NET@Qts (B).



O dados de potencial zeta da Figura 20 mostram valores positivos, o que é esperado para sistemas contendo Qts, devido sua carga positiva do grupo amina (ILK; SAGLAM; ÖZGEN, 2017). Em todas as porcentagens é observado um aumento no valor do potencial até o 15° dia, indicando novamente que o sistema se organizando de forma mais ordenada e volumosa em torno da NE com o tempo, suprimindo o efeito da carga residual negativa da NE sobre o valor do potencial zeta. Após 30 dias é possível verificar uma diminuição do potencial zeta e isso pode ser efeito da segregação de fase e presença de NE livre em solução, elevando a soma de cargas negativas ao potencial zeta referente a NE livre.

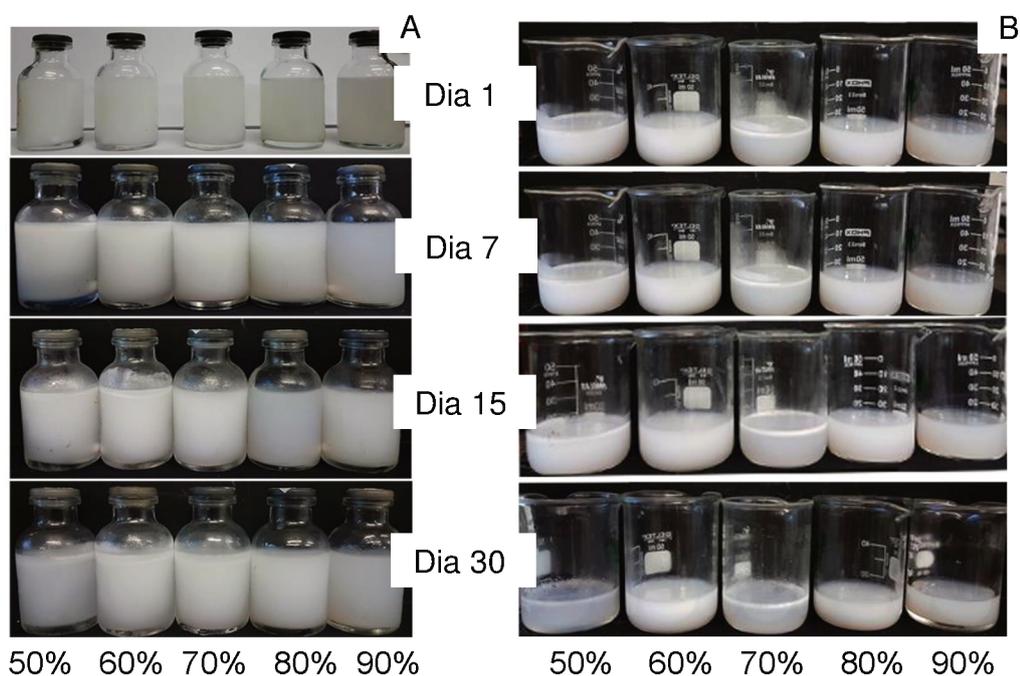
Figura 20 - Dados de potencial zeta referente as amostras NEB@Qts (A) e NET@Qts (B) com diferentes porcentagens de Qts.



Partindo para as NET recobertas por Qts observamos na Figura 18B uma tendência no aumento do tamanho das partículas com o aumento da porcentagem de Qts e uma diminuição do mesmo no decorrer dos dias. Nas soluções acima de 30 % de NET temos valores de tamanho menores do que o tamanho inicial do dia 1, em especial a amostra contendo 50 de NET que apresentou uma diminuição constante no tamanho. Já para as amostras com 10 e 20 % de NET observa-se o comportamento de aumento de tamanho com o passar dos dias como visto anteriormente para a NEB@Qts e uma estabilização no 15<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> dia, com valores próximos do dia 1, como observado também pela na Tabela 4. Os valores de PDI apresentam uma tendência de baixa em todas as amostras descritas na Figura 19B. Os valores de potencial zeta mostram uma tendência de alta do 1<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia, seguido de uma baixa no 15<sup>o</sup> 30<sup>o</sup> dia, possível consequência da desestabilização do sistema.

Em resumo observa-se que os sistemas NEB@Qts apresentam maior tamanho, valores mais positivos de potencial zeta e maior linearidade nos valores de PDI frente ao sistema NET@Qts. Este comportamento pode ser esperado, já que o sistema NET@Qts possui moléculas de timol interagindo na superfície da partícula da NE, dificultando a interação com as moléculas de Qts, formado partículas menores e de fino revestimento. Tamanho este que pode ser correlacionado também com o valor de  $R_H$  inferior da NET em relação a NEB, como apresentado anteriormente. Os valores de PDI e potencial zeta apresentados estão diretamente ligados ao preparo de amostra do sistema. No momento da diluição e filtração, para as amostras menos estáveis é possível a ocorrência de uma maior seleção de NE não revestida do que revestida. Quanto maior a quantidade de NE não revestida, menor será o valor de potencial zeta e quanto maior a seletividade da filtração, menor será o PDI. A solução escolhida neste processo foi a contendo 90 % de solução de Qts 0,3 % e 10 % de NE, pois foi o sistema que mais se apresentou estável e sem segregação de fase como observa-se na Figura 21A para a NEB@Qts e 21B para as amostras NET@Qts. Juntamente dos valores mostrados, pode-se observar na Figura 21 uma tendência de que quanto maior a porcentagem de NE, menor é a estabilidade do sistema, nas condições experimentais aqui descritas.

Figura 21 - Soluções compostas por diferentes porcentagens de solução de Qts 0,3 % e NE, tanto para os sistemas NEB@Qts (A) e NET@Qts (B).



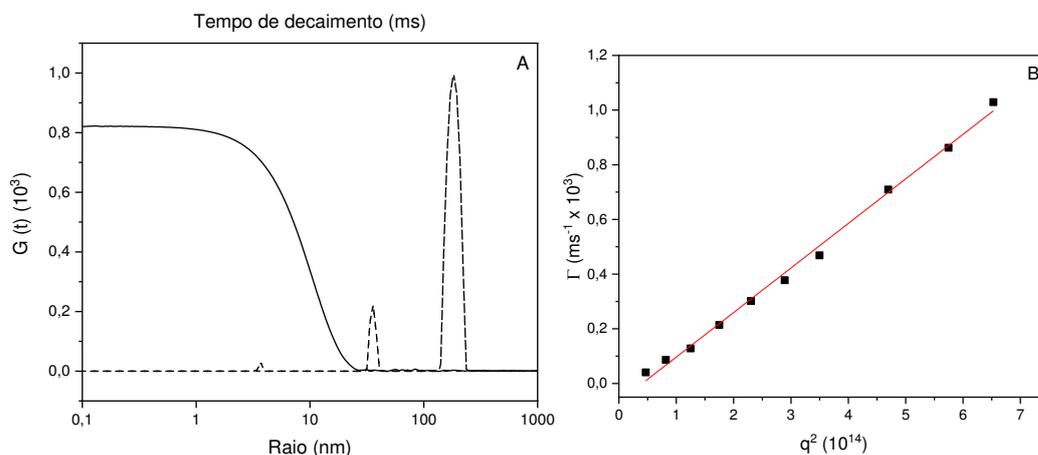
## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NEB@QTS E NET@QTS SELECIONADAS

### 6.2.1 Raio Hidrodinâmico ( $R_H$ )

Os valores de  $R_H$  para as amostras recobertas com Qts foram todos adquiridos por soluções compostas de 90 % de uma solução de Qts 0,3 % (m/v) e 10 % de NE. A Figura 22A mostra uma boa curva de correlação para a amostra NEB@Qts e dois picos principais para a curva de distribuição de tamanho para a análise em  $90^\circ$ , onde o pico de maior intensidade representa 90 % de uma população de 360 nm de diâmetro e uma segunda população com 10 % com diâmetro em torno de 60 nm, com um PDI de 0,296. A Figura 22B mostra a dependência da frequência de relaxação ( $\Gamma$ ) em função de  $q^2$  com um  $R^2 = 0,9951$  e um coeficiente angular de  $1,63 \times 10^{-12}$ , resultando em um  $R_H$  de 144 nm e um diâmetro de 288 nm. Comparando com os valores de  $R_H$  apresentados anteriormente para a NEB10, obtivemos um acréscimo

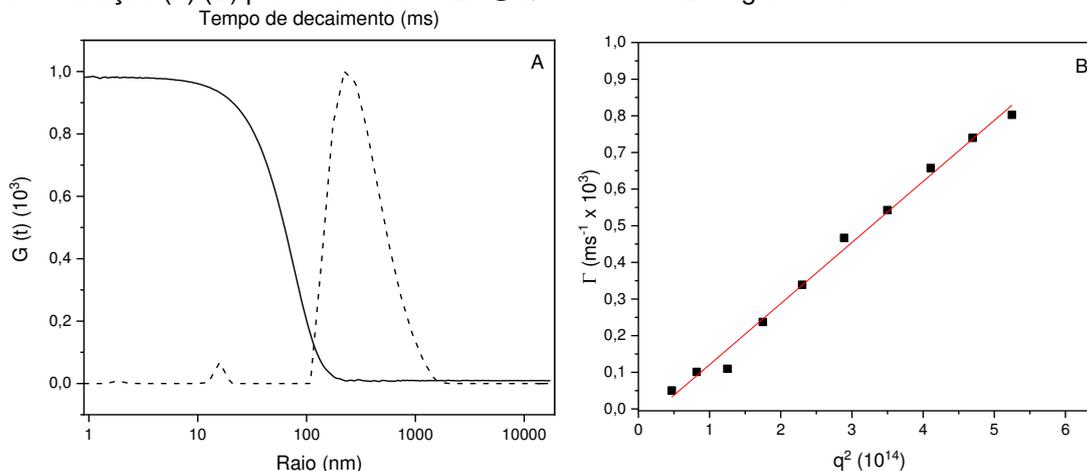
de tamanho em torno de 80 nm, equivalente a cerca de 40%, comprovando desta maneira o recobrimento da NE por uma camada de Qts.

Figura 22 - (A) Função de correlação  $G(t)$  para o ângulo de  $90^\circ$  (linha sólida) e sua respectiva distribuição de tamanho (linha tracejada), assim como a dependência de  $q^2$  em função da frequência de relaxação ( $\Gamma$ ) (B) para a amostra NEB@Qts.



Os dados referentes as amostras de NET@Qts, contendo NET1 e NET2 são mostrados nas Figuras 23 e 24 respectivamente. A Figura 23A mostras a distribuição de tamanhos com dois picos definidos, com tamanhos de 600 nm e 30 nm e população de 98,5 % e 1,5 % com um PDI de 0,262. O  $R_H$  encontrado para esta amostra foi de 140,9 nm, aproximadamente 282 nm, através da reta representada na Figura 23B com um  $R^2=0,99136$  e um coeficiente angular de  $1,66 \times 10^{-12}$ . Como visto anteriormente a amostra NET1 apresentou um  $R_H$  com diâmetro de 160 nm, o que representa um crescimento de 76 % ou 122 nm.

Figura 23 - (A) Função de correlação  $G(t)$  para o ângulo de  $90^\circ$  (linha sólida) e sua respectiva distribuição de tamanho (linha tracejada), assim como a dependência de  $q^2$  em função da frequência de relaxação ( $\Gamma$ ) (B) para a amostra NET@Qts contendo 27 mg de timol.



Por fim, a NET2 (Figura 24A) revestida com Qts, contendo 128 mg de timol apresentou um valor de  $R_H$  de 120 nm, ou seja, um diâmetro de 240 nm, valor do qual representa um crescimento de 72 nm ou aproximadamente 43 % com relação a amostra anterior NET1 e NEB. Observa-se um decréscimo em torno de 40 nm comparado a ambas as amostras. Apresentando novamente que o timol tem um papel importante na superfície da NE, já que a partir do seu aumento ocorre uma diminuição na espessura camada de Qts formada. Quando analisamos a curva de distribuição de tamanho encontramos duas populações, onde uma é representada por 96 % de um tamanho de 286 nm e 4 % por 40 nm de diâmetro com um PDI de 0,310.

Figura 24 - Curva de correlação para a amostra de Qts 0,3 % contendo 10% de NE com 128 mg de timol.

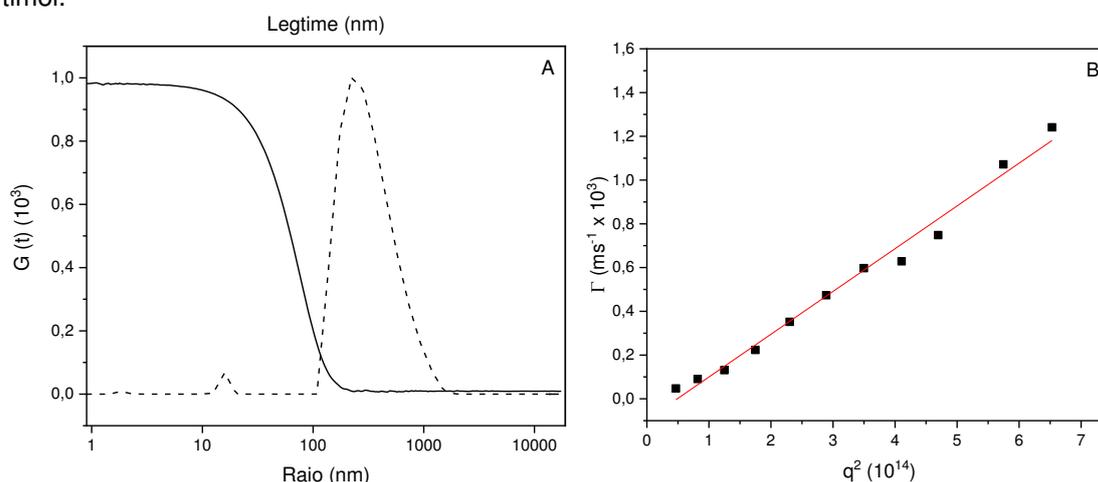


Tabela 7 - Valores de  $R_H$  e PDI para as amostras NEB@Qts, NET1@Qts e NET2@Qts

Amostra	$R_H^a$	PDI
NEB@Qts	144	0,296
NET1@Qts	141	0,262
NET2@Qts	120	0,310

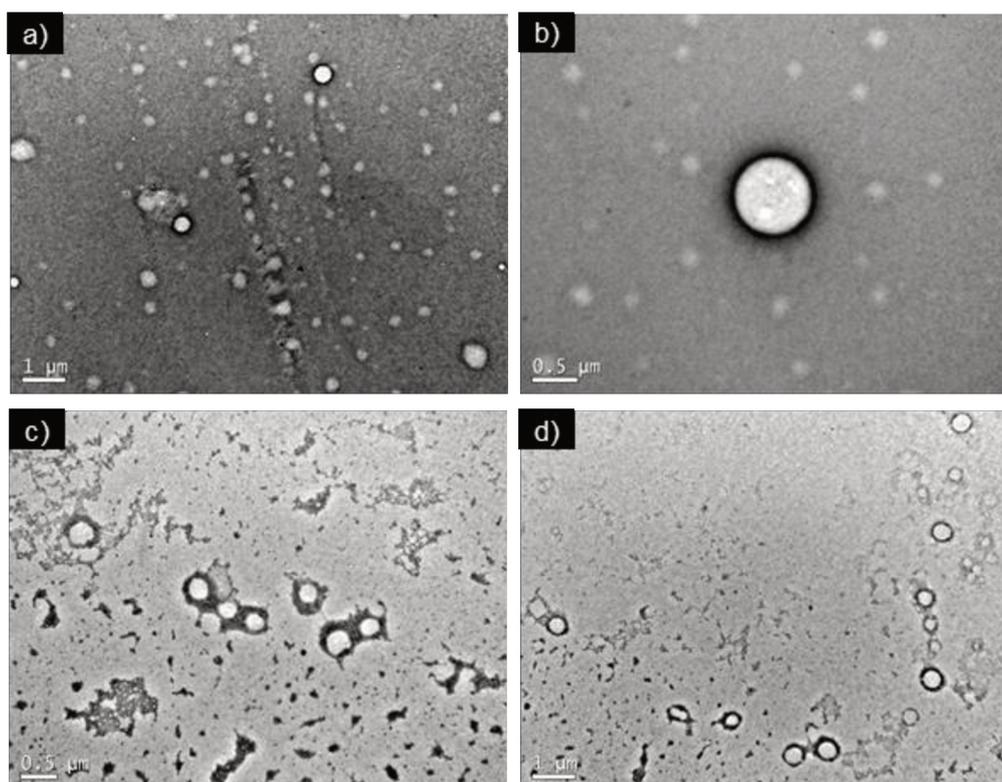
<sup>a</sup> nm

<sup>b</sup> medida  $\pm$  DP, n = 3

### 6.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para as NE recobertas por Qts

As imagens de TEM para os sistemas NEB@Qts e NET@Qts são mostradas na Figura 25 (a e b) e Figura 25 (c e d), respectivamente. Avaliando as micrografias, observa-se a presença de uma banda de contraste ao redor das NEs, indicando que houve recobrimento das mesmas por Qts. Esta camada pode ser visualizada de maneira mais clara nas Figuras 25b e 25d. Estudos apresentados na literatura mostram de forma similar este tipo de recobrimento, justificado pela atração eletrostática da NE negativamente carregada e das cargas positivas da Qts (SOUZA et al., 2014; HHONKER et al., 2015; HASAN et al., 2016).

Figura 25 - Imagens de TEM da amostra NEB@Qts em que em (a) a barra de escala é de 1  $\mu\text{m}$  e em (b) é de 0,5  $\mu\text{m}$ . Para a amostra NET@Qts em que em (c) a barra de escala é de 1  $\mu\text{m}$  e em (d) é de 0,5  $\mu\text{m}$ .



Nota-se também que não é possível fazer uma distinção clara entre os tamanhos das camadas de Qts pelas micrografias, do mesmo modo feito anteriormente para o  $R_H$ . O raio médio das partícula medida a partir das imagens de TEM são de  $168 \pm 50$  nm para NEB@Qts e  $136 \pm 20$  nm para NET@Qts e seus respectivos valores de  $R_H$  são 144 e 140 nm, mostrando concordância entre a técnica

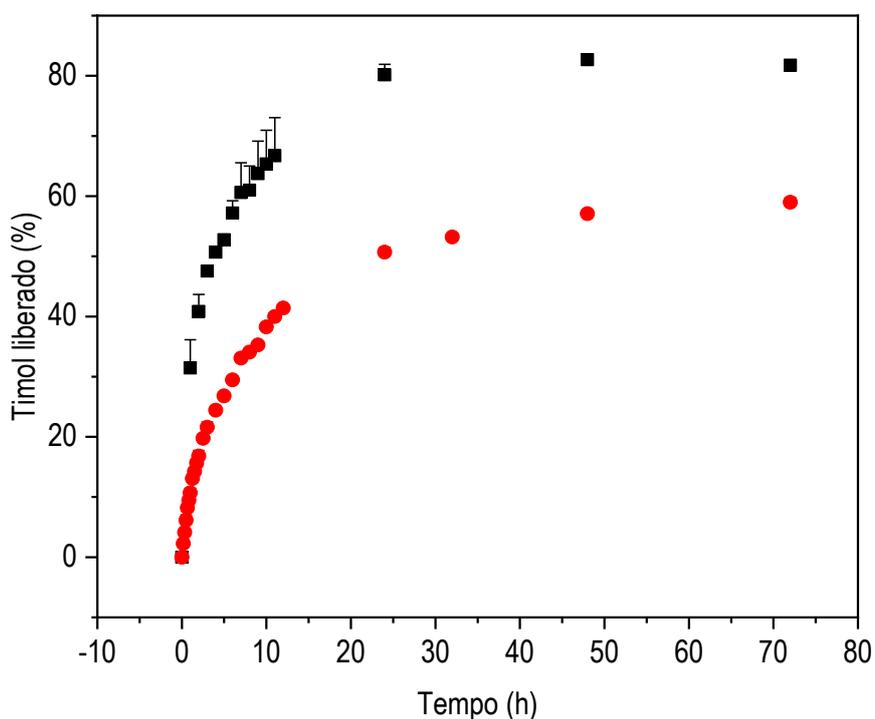
de microscopia e espalhamento de luz. Nota-se apenas a pequena variação gerada pelo efeito de secagem da amostra NET@Qts, apresentando mais um indicativo de que as amostras contendo timol, forma um sistema com maior rigidez e organização.

## 7 LIBERAÇÃO CONTROLADA DO TIMOL A PARTIR DAS NANOEMULSÕES

### 7.1 LIBERAÇÃO POR MEMBRANA DE DIÁLISE

Utilizando os dados da Figura 26 e a equação 4 foi determinado o valor de  $81 \pm 1 \%$  para a eficiência de encapsulação. O estudo de liberação *in vitro* foi conduzido com o objetivo de compreender o mecanismo de liberação do timol dos sistemas NET. Observa-se na Figura 26 o perfil de liberação para os dois meios estudados, água e tampão saliva analisados por 72 horas.

Figura 26 - Curvas de liberação par a amostra NET em água (■) e tampão saliva (●)



Para ambos os meios se observa dois estágios de liberação. O primeiro estágio chamado de “efeito burst”, ocorre a liberação rápida do ativo para o meio nas

3 e 4 primeiras horas para água e a saliva, respectivamente. Esta etapa é caracterizada pela liberação do timol adsorvido na superfície da NE e timol não encapsulado, que inicia a partir do contato da amostra com o meio de dissolução (HUANG; BRAZEL, 2001). Em casos de liberação de ativos em que podem ser aplicados *in vivo* é importante ter-se conhecimento claro a respeito do efeito burst para se evitar o risco de alta exposição local e de overdose temporal do ativo (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

O segundo estágio de liberação é caracterizado pela liberação lenta até a estabilização, etapa na qual o timol é liberado do sistema. A estabilização foi alcançada em 24 horas na água liberando aproximadamente 81% e 48 horas na saliva liberando cerca de 58% de timol. Assim, nota-se que a quantidade e o tempo de liberação, resultam do meio em que o experimento é realizado. O potencial químico do tampão que simula a saliva é maior, resultando em menor fluxo osmótico de timol da nanopartícula para o meio de liberação.

Para se entender o mecanismo de liberação realizou-se o estudo cinético a partir de modelos matemáticos bem estabelecidos na literatura. Os cálculos foram realizados com o auxílio do suplemento para o Microsoft Excel, Dissolution Data Modeling (DD Solver) (ZHANG et al., 2011). Os dados foram ajustados para os modelos cinéticos de Higuchi (equação 6), Korsmeyer- Peppas (Equação 7), ordem zero (Equação 8), e primeira ordem (Equação 9) de acordo com as seguintes equações:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t} \quad (6)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (7)$$

$$F(t) = kt \quad (8)$$

$$\ln \left[ 1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right] = -kt \quad (9)$$

Para todas as equações acima,  $M_t$  representa a quantidade absoluta de do composto ativo liberado no tempo  $t$  e  $M_\infty$  a quantia total do composto ativo liberado no tempo infinito.

$k_H$  corresponde a constante de Higuchi, que representa as características da estrutura da formulação. Na equação de Korsmeyer- Peppas,  $k$  é a constante cinética

que se trata a respeito do mecanismo estrutural e as características geométricas dos sistemas. O expoente  $n$  denota o mecanismo de liberação do composto ativo em avaliação. Para amostras esféricas, como no caso da NET deste trabalho, se  $n \leq 0,43$  significa que o mecanismo de liberação é puramente Fickiano, regido puramente pelo processo de difusão. Se  $n = 0,85$  ocorre o Caso II de transporte de massa, onde ocorre relaxação da matriz polimérica ou liberação por erosão. Valores de  $n$  intermediários  $0,43 < n < 0,85$  indica que ocorre transporte cinético anômalo, ou seja, a combinação de difusão com intumescimento da matriz do sistema (L. RITGER; A. PEPPAS, 1987; SIEPMANN; PEPPAS, 2011) Se  $n > 0,85$  ocorre o super Caso II de transporte, que é a sobreposição dos mecanismos de intumescimento, difusão, erosão e dissolução da matriz polimérica.

Os parâmetros cinéticos obtidos estão apresentados na Tabela 8. Para ambos os meios estudados não houve ajuste para o modelo de ordem zero visto que este modelo se baseia na liberação da substância ativa a partir de sistemas que não se desagregam e depende exclusivamente do tempo.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos para liberação in vitro do timol em água e meio aquoso de tampão saliva

Modelo	R <sup>2</sup>	Água		Saliva		
		k	n	R <sup>2</sup>	k	n
Korsmeyer-Peppas	0,997	8,77	0,318	0,801	1,10	0,560
Higuchi	-	-	-	0,867	0,001	
Primeira ordem	-	-	-	0,566	0,01	

Os modelos de Higuchi e de primeira ordem não se ajustaram quando o estudo de liberação foi realizado em água. Para este meio, o melhor ajuste foi obtido para o modelo de Korsmeyer- Peppas a partir do plote de  $\ln M_t/M_\infty$  contra  $\ln t$ , onde  $R^2 = 0,997$  e a constante cinética  $k = 8,77 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Analisando o valor do expoente  $n = 0,318$  indica-se que a liberação do timol da NE decorreu-se puramente por

mecanismo de Fick. Isso pode ocorrer devido à ausência de uma camada protetora que facilita a liberação pelo mecanismo de difusão.

Em meio simulado de saliva a liberação de timol para o ajuste de primeira ordem não houve boa correlação entre os dados, onde o  $R^2 = 0,566$ , desta forma, a discussão seguirá para os outros dois modelos. O tratamento seguindo Korsmeyer-Peppas resultou em  $R^2 = 0,801$  e o valor obtido para o expoente  $n = 0,560$  aponta que o mecanismo de liberação ocorre pela combinação da relaxação das cadeias poliméricas seguido de difusão do ativo. Contudo, o melhor ajuste para o meio de saliva sucedeu-se com o modelo de Higuchi que resultou no maior valor de coeficiente de Pearson  $R^2 = 0,867$ .

Comparando-se os valores das constantes  $k$  de liberação obtidas do modelo de Korsmeyer-Peppas nos dois meios estudados, observa-se que o valor para a água é muito maior que para o tampão saliva, confirmando a ideia de que para este sistema de liberação, diferentes potenciais químicos resultam em diferentes fluxos osmóticos. Para uma maior elucidação deste mecanismo cinético faz-se necessário a avaliação das curvas obtidas por um mecanismo de segunda ordem, composto de constantes de velocidade complexas. Tratamento este que será realizado em trabalhos futuros.

## 7.2 ESTUDO DE PERMEABILIDADE *EX VIVO*

Como já reportado na literatura, o timol é uma molécula com boa permeabilidade em mucosa, o que também é observado para os dados obtidos (GAO; SINGH, 1998; KAJI; KARAKI; KUWAHARA, 2011). Foi encontrado de maneira significativa a presença de timol na fase aceptora já nas primeiras horas, como observado na curva (a) da Figura 27 para a fase controle e os dados apresentados na Tabela 9.

Figura 27 - Dados de permeabilidade para o timol em diferentes sistemas: (a) solução controle, (b) NET e (c) NET@Qts, apresentados no formato de massa de timol permeada por área ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) por tempo (A) e porcentagem de timol liberada pelo tempo (B).

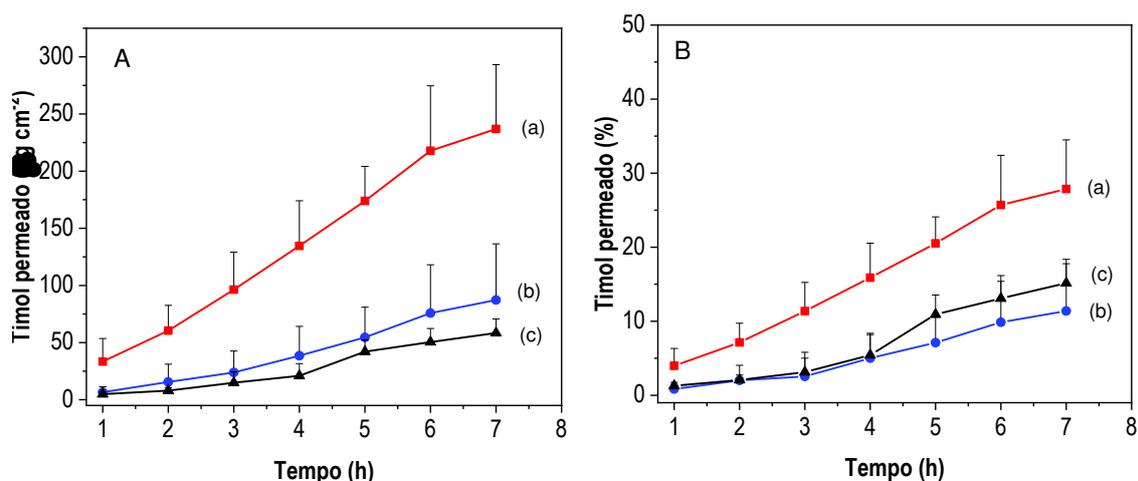


Tabela 9 – Parâmetros de permeabilidade para a solução controle e as amostras NET e NET@Qts.

Amostra	$J_s^a$ ( $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	$T_L^a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$P^a$ ( $\text{cm h}^{-1}$ )
Controle	$35,82 \pm 7,340$	$0,220 \pm 0,439$	$0,048 \pm 0,010$
NET	$13,84 \pm 7,481$	$0,899 \pm 0,421$	$0,018 \pm 0,010$
NET@Qts	$9,668 \pm 1,969$	$1,061 \pm 0,279$	$0,013 \pm 0,028$

$J_s$  = fluxo;  $T_L$  = tempo de latência;  $P$  = coeficiente de permeabilidade;  
<sup>a</sup> (média  $\pm$  DP)

Constata-se que a amostra controle apresentou o maior fluxo de permeabilidade, seguido da amostra NET e NET@Qts, da mesma forma tem-se um maior tempo de latência e uma diminuição do coeficiente de permeabilidade. Este comportamento é consequência de erro de planejamento, já que as concentrações de princípio ativo utilizadas em cada amostra não foram iguais. É de suma importância a utilização das mesmas concentrações iniciais do ativo em cada sistema, para que possa ser realizada a comparação direta entre os parâmetros obtidos por cada sistema. Deste modo, será utilizado em paralelo as curvas apresentadas na Figura 27B, que mostram a porcentagem de timol permeada e são comparáveis, pois o cálculo considera a concentração inicial de cada sistema.

É esperado, a partir das características físico-químicas das amostras, que a amostra controle tenha uma maior liberação na metodologia de análise utilizada. Trata-se de um sistema composto por uma elevada concentração de timol, próximo do limite de solubilidade, o que resultando em um elevado potencial químico para esta solução. Esta solução está em um contato indireto com uma solução de PBS + etanol

15 % de menor potencial químico, gerando desta forma um maior fluxo de timol. Outro ponto é a elevada solubilidade do timol em etanol, o qual está presente na fase aceitadora. Desta maneira esta diferença de potencial químico e afinidade pelo solvente resulta em um elevado  $J_s$ ,  $T_L$  e um  $P$  pequeno. Este comportamento é também reforçado pela maior porcentagem de permeação.

Mediante aos dados apresentados e já discutidos é importante considerar a especificidade da técnica utilizada para a quantificação do timol. A fluorescência é uma técnica utilizada para a quantificação de fármacos que apresentam possibilidade de excitação e emissão, porém, o timol é um composto com baixa emissão em soluções aquosas, devido ao rendimento quântico de fluorescência e baixa solubilidade. No entanto, para adquirir dados de maior confiabilidade seria necessário o uso de metodologia validada de HPLC, que será empregada em estudos futuros. Esta técnica estava disponível no momento dos testes pois a utilização da técnica de UV-Vis se torna inviável pela presença de proteínas e enzimas presentes na mucosa, que absorvem em comprimentos de onda próximo aos do timol. Logo, adquirir dados de maior confiabilidade se faz necessário a utilização de um método de HPLC validado, procedimento adequando quando se trata de experimentos de liberação de fármaco em baixas concentrações.

Quando analisados os parâmetros de permeabilidade, nota-se que os valores da amostra NET são mais promissores a aplicação, do que a NET@Qts. Este resultado está em concordância com os sistemas tratados, pois é esperado que o sistema recoberto com uma camada de Qts apresentará um menor fluxo e menor permeabilidade. Em geral este problema é possivelmente compensado quando se pensa em um sistema real de aplicação, já que a NET@Qts permanecerá mais tempo em contato com os tecidos, através do muco adesão, proporcionando uma liberação local prolongada. Entende-se então que apesar da solução controle e a amostra NET mostrarem valores de permeabilidade promissores, apresentam limitações no requisito permanência nos tecidos alvos.

Apesar das conclusões frente aos parâmetros de solubilidade serem favoráveis para a amostra NET, quando se observa as curvas em porcentagem na Figura 27B, constata-se que a permeabilidade da amostra NET@Qts apresentou uma maior permeabilidade após 4 horas, do que a amostra NET. Fato este que reforça a ideia de que a mucoadesão é uma condição favorável para a cinética de liberação do

timol, pois terá uma liberação com maior direcionamento quando as NPs estão aderidas ao tecido. A interpretação deste resultado pode ser esclarecida descrevendo o caminho a ser percorrido pelo timol até a solução aceptora. Quando ocorre a adesão das NPs a mucosa, o timol pode ser liberado diretamente no tecido, aumentando a velocidade com que o mesmo permeia. Em contra partida, as NPs dispersas inicialmente liberam o ativo para a solução e em seguida ocorre a do mesmo até a mucosa, para que ocorra o processo de permeação.

Tabela 10 - Comportamento dos sistemas baseados nos valores de potencial zeta antes e após a liberação em mucosa de porco

	NET <sup>a</sup>	NET@Qts <sup>a</sup>
Antes da liberação	-36,5	31,6
Após a liberação	-41,6 ± 2,8183	33,9 ± 3,8336

<sup>a</sup> mV

A liberação também pode ser compreendida como efetiva quando se observa os dados de potencial zeta (Tabela 10), que apresentam valores mais negativos para as amostras NET após a liberação e valores mais positivos para as amostras de NET@Qts o que indica a saída de timol das NPs.

## 8 SECAGEM DAS NANOEMULSÕES UTILIZANDO SPRAY DRYER

Uma terceira etapa realizada no trabalho, foi realizar a secagem das NE recobertas com Qts utilizando a técnica de atomização por spray drying, para a obtenção de um pó fino, carregado com timol. Foram realizados diversos testes com o intuito de ajustar uma mistura que contivesse massa satisfatória para que após a secagem fosse obtido um pó fino. A massa de matéria seca contida na solução a ser injetada é de grande importância, principalmente quando compostos voláteis e óleos estão envolvidos em sua composição. Em resumo, quantidades pequenas de massa podem acarretar a formação de um material pastoso e o contrário, inviabilizar o processo de liberação e impor barreiras econômicas.

Inicialmente, verificou-se que a solução contendo 0,3 % de Qts não possuía massa suficiente para incorporação de um mínimo de 10 % de NE, dessa maneira

foram realizados diversos testes arbitrários onde se encontrou a necessidade de utilizar uma solução de 0,4 % (m/v) de Qts para incorporação destes mesmos 10 % de NE. Os testes foram baseados em misturas de diferentes porcentagens onde o resultado foi avaliado pela aparência visual do produto, pois quanto menor a massa de NE ou menor a massa de Qts, ocorre a formação de um material pastoso, devido a quantidade de OSU. Desta maneira foi designada que a mistura para obtenção do pó contivesse 10 % de NE com solução de Qts de 0,4 % (m/v).

As condições de secagem foram ajustadas para o objetivo de obter um pó muito fino e pelas limitações do equipamento, tais como, taxa de aspiração, temperatura de entrada, fluxo de ar, fluxo de injeção, temperatura de saída e diâmetro de agulha do atomizador. As limitações do equipamento são a agulha com diâmetro 0,5 mm, sendo este um ponto positivo, pois quanto mais fina a agulha, menor serão as partículas formadas pelo atomizador, resultando assim uma secagem mais eficiente e um tamanho de partícula reduzido. A temperatura de saída pode ser um limitador quando se trata de secagem de encapsulados líquidos, voláteis ou com baixa pressão de vapor, pois quanto maior essa temperatura, maior será a temperatura do produto final e aliado ao tempo de exposição a elevadas temperaturas, maior será a variação do produto final em termos de eficiência de encapsulação. A temperatura de saída elevada é característica da falta de um desumidificador de ar no próprio equipamento, peça fundamental, já que quanto menor a umidade do ar de entrada, maior será a eficiência de secagem, diminuindo também a temperatura de saída e a umidade da câmara coletora e do produto final.

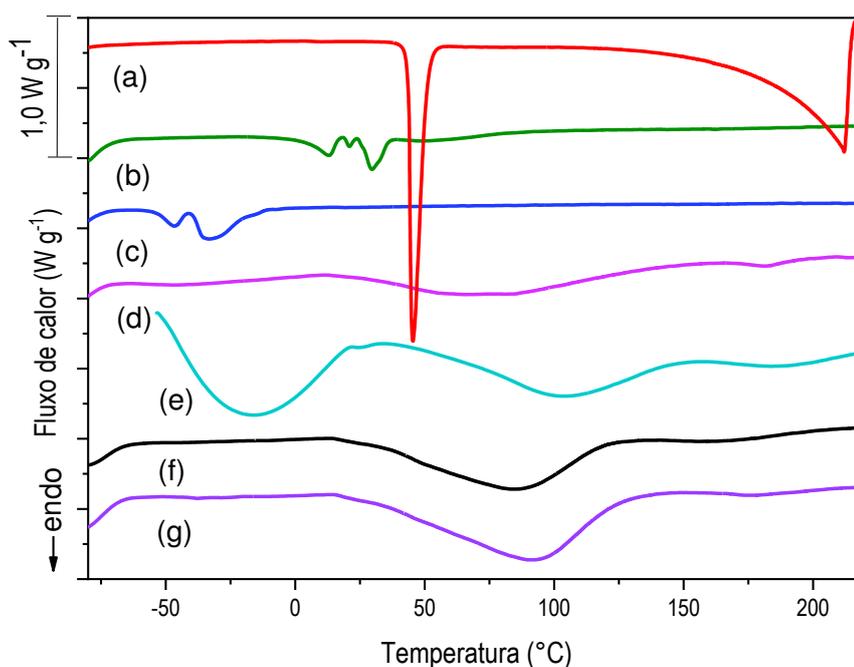
Os parâmetros como baixa taxa de injeção e elevado fluxo de ar no atomizador são estratégias para a formação de um spray fino, formando partículas pequenas e de rápida secagem. Desta maneira a temperatura de entrada foi estabelecida em 120 °C, relativamente baixa para processos utilizando o spray dryer, pois foi levado em consideração a elevada atomização e a presença de OSU e timol na amostra, compostos sensíveis a transições físicas em elevadas temperaturas. Juntamente foi utilizada uma taxa de aspiração de 100 %, o que garante que o equipamento coletará todo o pó gerado na câmara de secagem. De modo geral a aspiração é utilizada para realizar uma seleção das partículas obtidas pelo seu tempo de voo, ou seja, baixos fluxos irão coletar apenas partículas menores (menor peso) e fluxos elevados irão coletar basicamente todas as partículas formadas. Considerando

que o objetivo foi obter a formação de um pó, sem classificação de tamanho, foram utilizadas as condições citadas anteriormente na metodologia. As caracterizações dos materiais secos foram realizadas por SEM e DSC, como mostrado a seguir.

### 8.1 CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (DSC)

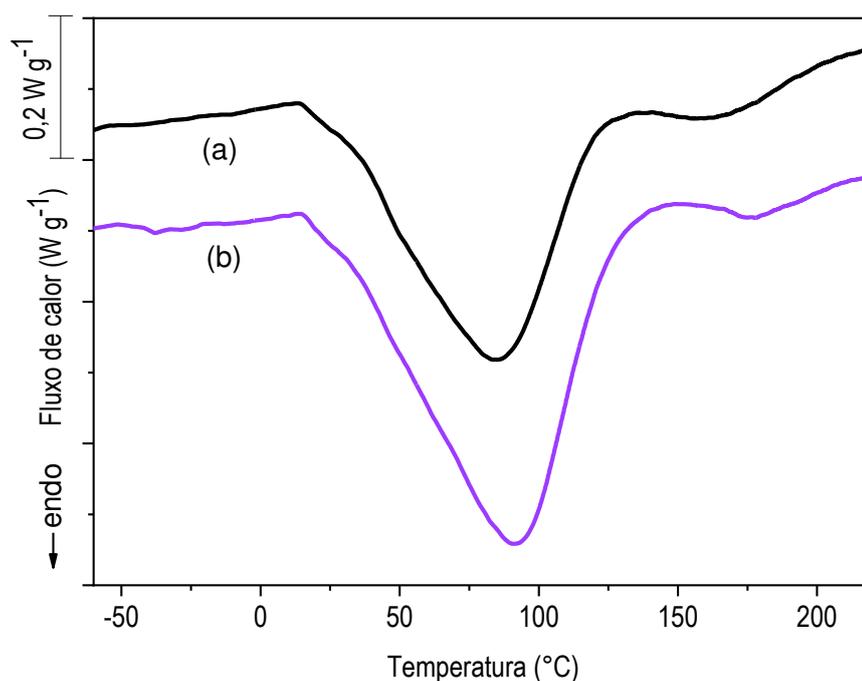
De modo similar aos resultados apresentados anteriormente sobre DSC é mostrado na Figura 28 e 29 as curvas para as NEB@Qts e NET@Qts secas por spray dryer e seus devidos componentes puros, timol, P123, OSU, Lecitina e Qts. A Figura 28 mostra com mais detalhes as entalpias de fusão das curvas (f) e (g) da Figura 28. Para a amostra NEB@Qts, tem-se o primeiro evento entre 14 e 136 °C, com entalpia de fusão de 35,8 J g<sup>-1</sup> e uma segunda no valor de 7,7 J g<sup>-1</sup> entre 136 e 204 °C e para a amostra NET@Qts há alterações, sendo as temperaturas entre 14 e 150°C e 150 a 220 °C e as respectivas entalpias de 49,6 e 9,2 J g<sup>-1</sup>. Os possíveis eventos registrados abaixo de 14 °C, podem ser possíveis transições do sistema referentes ao OSU e serão discriminadas nesta análise pela incerteza de resposta apresentada pela curva.

Figura 28 - Curvas de DSC para as amostras obtidas via secagem por atomização NEB@Qts {(f), (h)} e NET@Qts {(g), (i)} e seus respectivos componentes puros timol (a), P123 (b), OSU (c), lecitina (d) e Qts (e)



É proposto então que o timol está presente no produto final, fator interessante quando observamos a sua elevada pressão de vapor e da mesma maneira a presença do OSU por ser um constituinte oleoso. A presença do timol no produto final, leva novamente a evidência de que há uma forte interação entre o timol e a lecitina, assim como mostrado anteriormente na Figura 17, a interação entre o timol e o OSU. Desta maneira é importante lembrar a importância deste sistema em compor outros fármacos juntamente com o timol agindo como carreador. Algo a ser considerado em qualquer procedimento de NPs a importância de possuir massa suficiente carregada no sistema e um método de análise adequado para a quantificação nas concentrações necessárias.

Figura 29 - Curvas de DSC para os sistemas NEB@Qts (a) e NET@Qts (b).

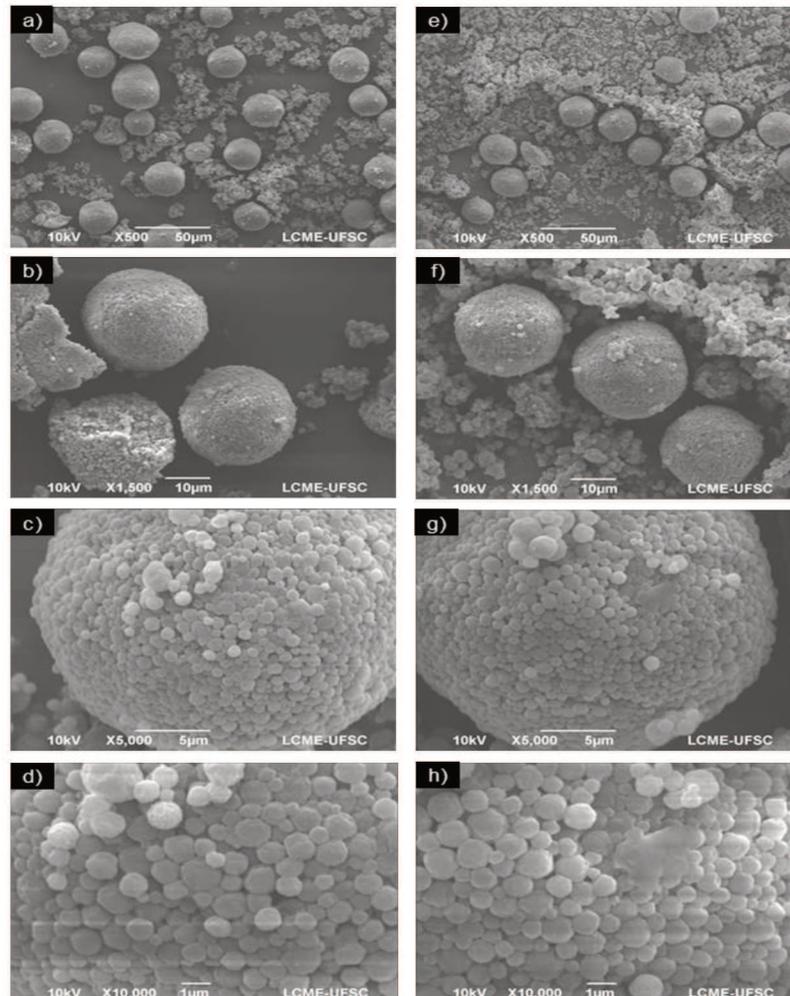


## 8.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

A microscopia eletrônica de varredura, Figura 30 mostra a formação de partículas muito pequenas, em torno de  $757 \pm 16$  e  $720 \pm 26$  nm e aglomerados maiores com tamanho de  $25,2 \pm 3,70$  e  $23,6 \pm 3,20$   $\mu\text{m}$  para as amostras de NEB@Qts e NET@Qts respectivamente. Observa-se então que a obtenção de um pó fino foi possível através da técnica de spray drying, mas em virtude da baixa temperatura de

saída e da alta taxa de umidade do sistema resultante do processo de secagem, estas se aglomeram no coletor de amostras, como são observadas na Figura 30b e Figura 30f (1500 vezes de aumento). Evidencia-se que esta partícula é maciçamente formada por partículas menores. De maneira geral nota-se que as partículas estão com uma morfologia sólida e de tamanhos próximos. Embora o foco do trabalho não foi obter partículas de um mesmo tamanho e sim a quantidade máxima de pó.

Figura 30 – As imagens de SEM para a amostra NEB@Qts são apresentadas com magnificações de 500 vezes (a), 1500 vezes (b), 5000 vezes (c) e 10000 vezes (d). Para a amostra NET@Qts temos magnificações de 500 vezes (e), 1500 vezes (f), 5000 vezes (g) e 10000 vezes (h), secas via secagem por atomização.



Sabe-se que ocorre um aumento do tamanho entre os dias 1 e 15, como visto anteriormente no item 4.1. Deste modo foi realizado um teste onde em que foram atomizadas, 100 mL de solução Qts 0,4 % contendo 10 % de NEB e NET, com 1 e 15 dias de contato. A eficiência deste processo foi calculada pela subtração da massa adicionada, da massa obtida, mostra que para 1 dia de contato obtém-se uma eficiência de  $30 \pm 5 \%$  e para 15 dias um valor de  $54 \pm 5 \%$ . Observa-se então, uma diferença significativa na eficiência do processo, mostrando que o sistema se auto-organiza com o passar do tempo, e desta maneira é esperado uma melhora na formação do spray no atomizador e na eficiência na câmara de secagem. Infelizmente a confirmação deste resultado não pode ser realizada por imagens de SEM, pois não foi possível avaliar a alteração do tamanho, devido a pequena variação do mesmo pela camada de Qts.

Os tamanhos das partículas apresentadas nas micrografias de SEM, mostram novamente a forte interação do timol no sistema, pois o tamanho médio para as amostras contendo timol foi consideravelmente menor, tanto para as partículas medidas separadamente, quanto os aglomerados formados durante o processo. Reforçando a conclusão anterior de que o timol gera uma barreira entre as interações eletrostáticas entre a superfície da NE e a Qts. O pó carregado com timol, mostra grande potencial de aplicação em torno de processos onde há necessidade de uma grande quantidade de timol. Na teoria o processo foi capaz de obter 150 mg de pó contendo 6.7 mg de timol, a partir de 10 mL de NE em 100 mL de solução de Qts 0,4 % (m/v), mas existem fortes indícios de que esta quantidade pode ser maior. O pó adquirido mostra um grande potencial de aplicação quando é visado a incorporação de fármacos sólidos e de difícil solubilização em meios hidrofílicos. Aliado ao processo de formulação de uma NE utilizando OSU como meio dispersante do fármaco, revestida com Qts e obtendo um pó por secagem em spray dryer, torna viável a administração de fármacos por diversos meios. Este potencial pode ser incrementado pelas NPs serem compostas por um fosfolipídio que interagem com diversos tecidos e o timol que atua como um carreador de fármacos.

## 9 CONCLUSÃO

A partir dos dados, observa-se que o método de emulsificação espontânea foi eficaz no desenvolvimento de NE para incorporar o timol. As melhores composições para o desenvolvimento das NE foram: 0,35 g L<sup>-1</sup> de lecitina, 3,0 g L<sup>-1</sup> de Pluronic 123 e 0,3 g de OSU (NEB10), observando que esta formulação é a mais estável durante o acompanhamento de 30 dias, apresenta diâmetro de 208nm e potencial zeta negativo de  $-36,73 \pm 1,68$  mV.

Nesta NE, após a incorporação de timol, verificou-se uma eficiência de encapsulação de 81% do timol, originando em NEs carregadas com timol com diâmetro de 160 nm e potencial zeta negativo de  $-37,9 \pm 2,5$  mV. Sugere-se que o timol nas NE obtidas, localiza-se na região polar do fosfolípido PC, interagindo com os grupos fosfato, justificando a redução de tamanho nas NE onde o timol está presente. Com intuito de melhorar as características mucoadesivas do sistema, as NE foram revestidas com Qts. Observa-se que as NEB@Qts apresentaram diâmetro de 288nm e NET@Qts apresentaram diâmetro de 282 nm. Para ambas as amostras o potencial zeta foi positivo, na faixa de + 50 mV, indicando que a Qts está na superfície das NEs. A proporção de solução de Qts utilizada foi de 90 %, devido a não segregação de fase do sistema.

Todos os sistemas apresentaram-se estáveis durante 30 dias, com morfologia esférica. Através do estudo de DSC, observou-se interação entre o OSU com o timol, ocorrendo uma elevação do ponto de congelamento do OSU e diminuição da temperatura de sublimação do timol, devido à forte interação entre estes compostos.

A liberação do timol em tampão simulado de saliva foi mais lenta do que a realizada em água, observando que o timol é liberado por mecanismo de difusão em água e por mecanismo de difusão com intumescimento da matriz em saliva. O entendimento da liberação do timol em cada uma das NE auxilia o estudo de permeação em mucosa para entender a permeação do timol em mucosa.

Como sugestão de aplicação tecnológica dos materiais obtidos, foi realizada a secagem das NE estabilizadas por Qts, para obtenção de material particulado com propriedades, mucoadesiva capaz de encapsular um ativo de elevada pressão de

vapor, assim como um óleo. Como relatado anteriormente, todos os sistemas podem ser utilizados de alguma maneira no tratamento do fungo *C. Albicans*. A obtenção de um pó carregado com timol mostrou-se viável, com a formação de uma amostra com tamanhos homogêneos. A presença do timol nestes sistemas é mostrada pelas curvas de DSC e as respectivas entalpias de fusão.

## REFERÊNCIAS

AKHLAGHI, S. P. et al. Impact of preparation method and variables on the internal structure, morphology, and presence of liposomes in phytantriol-Pluronic® F127 cubosomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 845–853, 2016.

ANDRADE, I. P. et al. Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em micro-organismos da cavidade oral. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 13, n. 3, p. 10–16, 2011.

AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58–63, 2010.

BOKEN, D. J.; SWINDELLS, S.; RINALDI, M. G. Fluconazole-Resistant *Candida albicans*. p. 1018–1021, 1992.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1–2, p. 241–251, 2004.

BRITO, D. I. V. et al. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 836–844, 2015.

BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

C. F. CARSON, K.A. HAMMER, AND T. V. RI. *Melaleuca alternifolia* Flower Photograph. **Atlas of Living Australia**, v. 19, n. 1, p. 50, 2014.

CASANOVA, F.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Preliminary studies of rosmarinic acid microencapsulation with chitosan and modified chitosan for topical delivery. **Powder Technology**, v. 297, p. 44–49, 2016.

CHANAMAI, R.; HORN, G.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of oil polarity on droplet growth in oil-in-water emulsions stabilized by a weakly adsorbing biopolymer or a nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 247, n. 1, p. 167–176, 2002.

CHEN, L. C. et al. Development and Characterization of Lecithin-based Self-assembling Mixed Polymeric Micellar (saMPMs) Drug Delivery Systems for Curcumin.

**Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–12, 2016a.

CHEN, L. C. et al. Development and Characterization of Lecithin-based Self-assembling Mixed Polymeric Micellar (saMPMs) Drug Delivery Systems for Curcumin. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–11, 2016b.

CHEN, Y. C. et al. Physical characterization and in vivo pharmacokinetic study of self-assembling amphotericin B-loaded lecithin-based mixed polymeric micelles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7265–7274, 2015.

CHHONKER, Y. S. et al. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1451–1458, 2015.

DEWHIRST, F. E. et al. The human oral microbiome. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5002–17, 2010.

DORDEVIĆ, S. M. et al. Parenteral nanoemulsions as promising carriers for brain delivery of risperidone: Design, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, n. 1–2, p. 40–54, 2015.

EL-HEFNY, M. et al. Antibacterial activities of the phytochemicals-characterized extracts of *Callistemon viminalis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Conyza dioscoridis* against the growth of some phytopathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, n. October, p. 348–356, 2017.

ENUMO, A.; PEREIRA, C. I. D.; PARIZE, A. L. Temperature Evaluation of Curcumin Keto–Enolic Kinetics and Its Interaction with Two Pluronic Copolymers. **The Journal of Physical Chemistry B**, p. acs.jpcc.9b04150, 2019.

ESTEVINHO, B. N. et al. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 138–155, 2013.

FERREIRA, J. V. N. et al. Mechanism of Action of Thymol on Cell Membranes Investigated through Lipid Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface and Molecular Simulation. **Langmuir**, v. 32, n. 13, p. 3234–3241, 2016.

FERREIRA, J. V. N.; LAGO, J. H. G.; CASELI, L. Thymol in cellular membrane models formed by negative charged lipids causes aggregation at the air-water interface. **Chemical Physics Letters**, v. 717, n. January, p. 87–90, 2019.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190–195, 1975.

GAO, S.; SINGH, J. In vitro percutaneous absorption enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes. **Journal of Controlled Release**, v. 51, n. 2–3, p. 193–199, 1998.

GREENSPAN, D.; FRANCISCO, S. Treatment of oral candidiasis in HIV infection. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 78, n. 2, p. 210–215, 1994.

HAMAD, A. F. et al. **The intertwine of nanotechnology with the food industry** *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2018.

HASAN, M. et al. Curcumin: study of lipid – polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. **RSC Advances**, v. 6, p. 45290–45304, 2016.

HASANI, S.; OJAGH, S. M.; GHORBANI, M. Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 143–151, 2018.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 121–136, 2001.

ILK, S.; SAGLAM, N.; ÖZGEN, M. Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agent. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 5, p. 907–916, 2017.

JAKIEMIU, E. A. R. et al. Study of composition and yield of *Thymus vulgaris* L. oil essential. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 683–688, 2010.

KAJI, I.; KARAKI, S. ICHIRO; KUWAHARA, A. Effects of luminal thymol on epithelial transport in human and rat colon. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 6, p. 1132–1143, 2011.

KHAN, S. T. et al. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **AMB Express**, 2017.

KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 55–76, 2011.

KOLOKOTRONIS, A.; KIOSES, V. Immunologic status in patients infected with HIV with oral candidiasis and hairy leukoplakia. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 78, n. 1, p. 41–46, 1994.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 331–352, 2016.

KSIEZOPOLSKA, E.; GABALDÒN, T. Evolutionary emergence of drug resistance in candida opportunistic pathogens. **Genes**, v. 9, n. 461, p. 25, 2018.

KULKARNI, U. et al. Porcine Buccal Mucosa as an In Vitro Model: Relative Contribution of Epithelium and Connective Tissue as Permeability Barriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 2, p. 471–483, fev. 2009.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

KWON, H. IL et al. Thymol attenuates the worsening of atopic dermatitis induced by Staphylococcus aureus membrane vesicles. **International Immunopharmacology**, v. 59, n. March, p. 301–309, 2018.

LESO, V.; FONTANA, L.; IAVICOLI, I. Biomedical nanotechnology: Occupational views. **Nano Today**, v. 24, p. 10–14, 2019.

LI, J. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 81–98, 2014.

LI, J. et al. Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 232, p. 191–197, 2017.

LIU, B. et al. The environmental fate of thymol, a novel botanical pesticide, in tropical agricultural soil and water. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 99, n. 2, p. 223–232, 2017.

LIU, L. et al. Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation and functional evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 761–769, 2016.

MA, Q.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Nanoemulsions of thymol and eugenol co-emulsified by lauric arginate and lecithin. **Food Chemistry**, v. 206, p. 167–173, 2016.

MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents : a review of their efficacy , development and testing. **Malaria Journal**, v. 10, n. Suppl 1, p. S11, 2011.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, 2016.

MARUNIAK, J. et al. The effect of 3 mouthrinses on plaque and gingivitis development. **Journal clinical Periodontol**, v. 19, p. 19–23, 1992.

MATOS, S. P. DE; LUCCA, L. G.; KOESTER, L. S. Essential oils in nanostructured systems: Challenges in preparation and analytical methods. **Talanta**, v. 195, p. 204–214, 2019.

MATOS, R. S. et al. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 314–320, 2019.

MENDES, C. et al. Self-Nanoemulsified Drug Delivery System of Hydrochlorothiazide for Increasing Dissolution Rate and Diuretic Activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 7, p. 2494–2504, 2017a.

MENDES, C. et al. Chitosan microencapsulation of the dispersed phase of an O/W nanoemulsion to hydrochlorothiazide delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 7, p. 611–622, 2017b.

MUSA TROLIC, I. et al. Corrosion of orthodontic archwires in artificial saliva in the presence of *Lactobacillus reuteri*. **Surface and Coatings Technology**, v. 370, n. April, p. 44–52, 2019.

NAFISI, S.; MAIBACH, H. I. Nanotechnology in cosmetics. **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**, v. 85, p. 337–361, 2017.

NAGOOR MEERAN, M. F. et al. Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: Prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–34, 2017.

NICOLAZZO, J. A.; REED, B. L.; FINNIN, B. C. Buccal penetration enhancers — How do they really work ? **Journal of Controlled Release**, v. 105, p. 1–15, 2005.

NIEDDU, M. et al. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: In vitro and in vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 393–399, 2014.

OLIVEIRA, J. L. DE et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1550–1561, 2014.

PASENKIEWICZ-GIERULA, M. et al. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 3, p. 1228–1240, 1999.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1367–1373, 2006.

PITTO-BARRY, A.; BARRY, N. P. E. Pluronic® block-copolymers in medicine: From chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 3291–3297, 2014.

PIVETTA, T. P. et al. Development of nanoparticles from natural lipids for topical delivery of thymol: Investigation of its anti-inflammatory properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 281–290, 2018.

RAI, M.; ZACCHINO, S.; DERITA, M. G. **Essential Oils and Nanotechnology for Treatment os Microbial Diseases**. [s.l.] 2017, 2017.

RASSU, G. et al. Phytomedicine Encapsulation and modified-release of thymol from oral microparticles as adjuvant or substitute to current medications. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1627–1632, 2014.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37–42, 1987.

ROBLEDO, N. et al. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food Chemistry**, v. 246, n. November 2017, p. 211–219, 2018a.

ROBLEDO, N. et al. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food Chemistry**, v. 246, n. August 2017, p. 211–219, 2018b.

ROMERO, A. L. et al. Atividade do Óleo Essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L .) Contra Fungos Fitopatogênicos. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v. 11, n. 4, p. 15–18, 2009.

ROUFEGARINEJAD, L. et al. Molecular interactions of thymol with bovine serum albumin : Spectroscopic and molecular docking studies. **Journal of Molecular Recognition**, v. 31, p. 1–6, 2018.

SANDRI, G. et al. The role of chitosan as a mucoadhesive agent in mucosal drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 22, n. 4, p. 275–284, 2012.

SANGEORZAN, J. A. et al. Epidemiology of Oral Candidiasis in HIV-Infected Patients: Colonization , Infection , Treatment , and Emergence of Fluconazole Resistance. **The American Journal fo Medicine**, v. 97, p. 339–346, 1994.

SCHAFFER, T. **Lecithin and Phospholipids - the optimal choice for natural cosmetics** Euro Cosmetics, 2007.

SCHUH, R. S.; BRUXEL, F.; TEIXEIRA, H. F. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1193–1198, 2014.

SEVERINO, R. et al. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on

green beans. **Food Control**, v. 50, p. 215–222, 2015.

SHAH, D. O. Interaction of uranyl ions with phospholipid and cholesterol monolayers. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 29, n. 2, p. 210–215, 1969.

SHAO, Y. et al. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, n. December 2017, p. 144–152, 2018.

SHAPIRO, S.; GUGGENHEIM, B. The action of thymol on oral bacteria. **Oral Microbiol Immunol**, v. 10, p. 241–246, 1995.

SHEU, M.-T. et al. Development and characterization of self-assembling lecithin-based mixed polymeric micelles containing quercetin in cancer treatment and an in vivo pharmacokinetic study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1557–1566, 2016.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 6–12, 2011.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SINTOV, A. C.; BOTNER, S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1–2, p. 55–62, mar. 2006.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 223, p. 40–54, 2015.

SOUZA, M. P. et al. Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Functional Food Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 4, p. 1149–1159, 2014.

SPETTEL, K. et al. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 14, p. 1–19, 2019.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

VASCONCELOS, L. C. DE et al. Cell viability of *Candida albicans* against the antifungal activity of thymol. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 4, p. 277–281, 2014.

WADE, W. G. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 137–143, 2013.

WANG, G.; WANG, T. Oxidative Stability of Egg and Soy Lecithin as Affected by Transition Metal Ions and pH in Emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11424–11431, 2008.

WANG, L. et al. Exploration of hydrophobic modification degree of chitosan-based nanocomplexes on the oral delivery of enoxaparin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3–4, p. 263–271, 2013.

WERLANG, C.; CÁRCARMO-OYARCE, G.; RIBBECK, K. Engineering mucus to study and influence the microbiome. **Nature Reviews Material**, v. 4, p. 134 – 145, 2019.

WITT, C. M. A. et al. Crosslinked chitosan/poly(vinyl alcohol) blends with proton conductivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 1692–1698, 2010.

WU, C. et al. Edible coating from citrus essential oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and preservation performance. **RSC Advances**, v. 6, n. 25, p. 20892–20900, 2016.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283–290, 2012.

YEAGLE, P. L. et al. Phospholipid Head-Group Conformations; Intermolecular Interactions and Cholesterol Effects. **Biochemistry**, v. 16, n. 20, p. 4344–4349, 1977.

ZAMANI, Z. et al. Development and evaluation of thymol microparticles using cellulose derivatives as controlled release dosage form. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 1031–1040, 2015.

ZHANG, R. X. et al. Importance of integrating nanotechnology with pharmacology and physiology for innovative drug delivery and therapy - An illustration with firsthand examples. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 39, n. 5, p. 825–844, 2018.

ZHANG, Y. et al. Fabrication of functional colloidal photonic crystals based on well-designed latex particles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 37, p. 14113–14126, 2011.

## ANEXO A – Determinação da massa molar viscosimétrica média de quitosana e alginato de sódio

A massa molar viscosimétrica média ( $M_v$ ) da Qts e do alginato de sódio foi determinada utilizando capilar do tipo Cannon-Fenske a 25°C ( $K= 0,007332 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ ,  $n^\circ 0,75$ ). A massa molar viscosimétrica média, foi calculada a partir da equação de Mark-Houwink (Equação 10).

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (10)$$

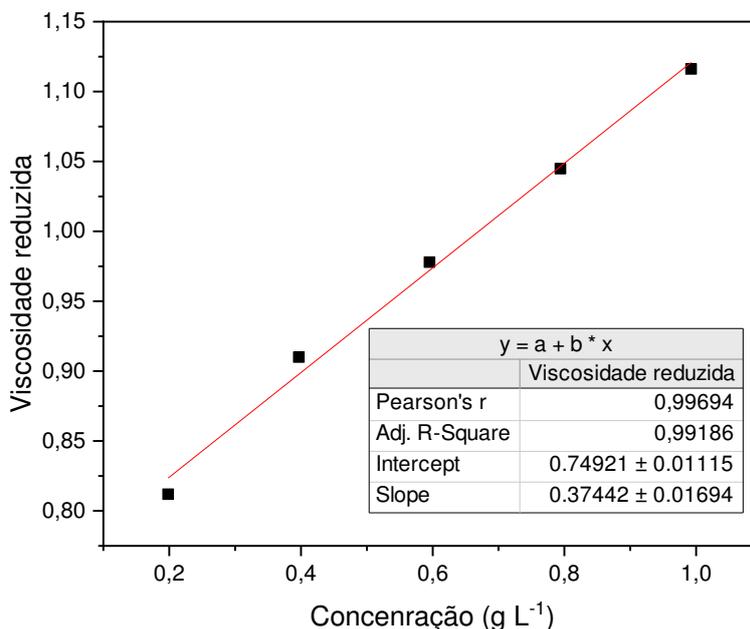
Onde,  $M_v$  é a massa molar viscosimétrica média,  $K$  e  $\alpha$  constantes inerentes do sistema polímero-solvente e  $[\eta]$  é a viscosidade intrínseca, calculada a partir da extrapolação da melhor reta obtida pelo plot dos valores de viscosidade reduzida *versus* concentração, de acordo com o limite expresso na Equação 11, onde  $\eta_{red}$  é a viscosidade reduzida e  $C$  a concentração (WITT et al., 2010).

$$[\eta] = \left[ \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{red}}{C} \right] \quad (11)$$

Os valores de foram obtidos a partir da viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ) que se define como, onde  $\eta_r$  é a viscosidade relativa, determinada pela razão dos tempos de escoamento da solução e do solvente no viscosímetro capilar.

Para determinação da  $M_v$ , a Qts foi dissolvida em solução tampão de acetato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Os tempos de escoamento das soluções através da seção do capilar acima citado foram medidos em triplicata através de um viscosímetro capilar (marca SCHOTT) com unidade medidora AVS 350 (sensor AVS/SHT) imerso em um banho termostaticado (termostato CT 52, marca SCHOTT) a 25,0°C.

Figura 31 - Gráfico referente ao plot da viscosidade reduzida vs concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ), com um  $R^2 = 0,99694$  e o coeficiente angular 0,37442



Através da Figura 30 foi determinado o coeficiente angular  $[\eta]$ , pela extrapolação da reta e o valor da massa molar viscosimétrica da Qts ( $M_v = 10.6 \times 10^4$ ) foi calculado utilizando a equação 11.

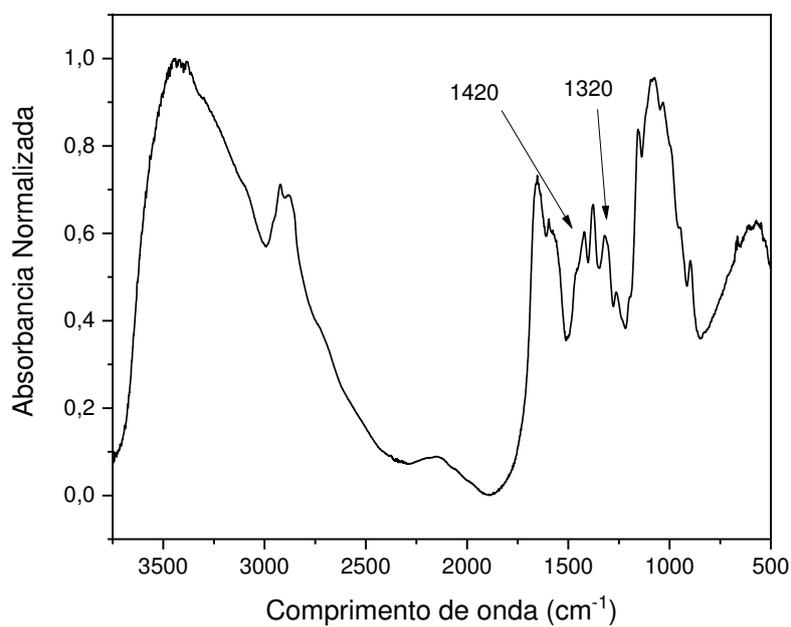
### ANEXO B – Grau de desacetilação da Qts

Em nível investigativo foram obtidos os espectros de infravermelho dos polímeros puros para posterior cálculo do grau de desacetilação (GD) da Qts. Esta caracterização se faz necessária uma vez que são estas porções na cadeia polimérica responsáveis por gerarem as cargas positivas e negativas na Qts e no alginato, respectivamente, responsáveis muitas vezes pela formação de partículas.

O GD da Qts foi calculado de acordo com a metodologia de BRUGNEROTTO et al. (2001), utilizando-se a equação 12. Atentou-se a absorção das bandas em 1320 e 1420  $\text{cm}^{-1}$  pois correspondem à deformação angular de C-H do anel glicosídico e à deformação angular de O-H, respectivamente.

$$\%GD = 100 - \frac{\left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}}\right) - 0,3822}{0,03133} \quad (12)$$

Figura 32 - Espectro de absorção no infravermelho da Qts para determinação %GD



Através do espectro de infravermelho da Figura 31 foram obtidos os valores de  $A_{1320} = 0,4761$  e  $A_{1420} = 0,5988$ , dos quais foram aplicados na equação 12 e o GD foi então determinada como sendo 86,8 %.