



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Márcia Azevedo Bastian Manfredi

**SISTEMAS MUCOADESIVOS COM NISTATINA OBTIDOS POR ELETROFIAÇÃO
COMO ALTERNATIVA AO TRATAMENTO DA INFECÇÃO FÚNGICA PRESENTE
NA MUCOSITE ORAL EM PACIENTES ONCOLÓGICOS**

Florianópolis
2023

Márcia Azevedo Bastian Manfredi

**SISTEMAS MUCOADESIVOS COM NISTATINA OBTIDOS POR ELETROFIAÇÃO
COMO ALTERNATIVA AO TRATAMENTO DA INFECÇÃO FÚNGICA PRESENTE
NA MUCOSITE ORAL EM PACIENTES ONCOLÓGICOS**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Segatto da Silva

Coorientador: Prof^a. Dr^a Claudia Merlini

Florianópolis

2023

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

Manfredi, Márcia Azevedo Bastian
SISTEMAS MUCOADESIVOS COM NISTATINA OBTIDOS POR
ELETROFIAÇÃO COMO ALTERNATIVA AO TRATAMENTO DA INFECÇÃO
FÚNGICA PRESENTE NA MUCOSITE ORAL EM PACIENTES ONCOLÓGICOS /
Márcia Azevedo Bastian Manfredi ; orientador, Marcos
Antonio Segatto da Silva, coorientador, Claudia Merlini,
2023.
160 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Eletrofiação. 3. Sistemas de liberação de
fármacos. 4. Tratamento da mucosite oral. 5. Membranas
mucoadesivas nanométricas. I. da Silva, Marcos Antonio
Segatto . II. Merlini, Claudia. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.
IV. Título.

Márcia Azevedo Bastian Manfredi

Título: Sistemas mucoadesivos com nistatina obtidos por eletrofiação como alternativa ao tratamento da infecção fúngica presente na mucosite oral em pacientes oncológicos

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 31 de março de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Lizandra Maria Zimmermann, Dr.(a)
Instituição Universidade Regional de Blumenau - FURB

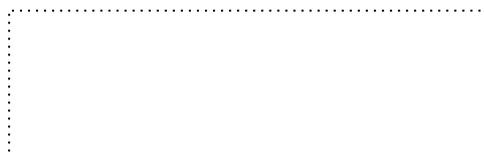
Prof. Ismael Casagrande Bellettini, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.(a) Giovana Carolina Bazzo Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Farmácia.



Prof. (a) Thaís Cristine Marques Sincero, Dr. (a)
Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Marcos Antônio Segatto da Silva, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

RESUMO

Dentre as principais doenças consideradas problema de saúde pública, merece destaque o câncer, pois é responsável pelo adoecimento e óbito de um número significativo de pessoas. De acordo com a literatura, aproximadamente 40% a 80% dos pacientes submetidos à quimioterapia/radioterapia irão apresentar mucosite oral, como efeito colateral. A mucosite se manifesta clinicamente como lesões ulcerativas e pode ser agravada por infecções fúngicas oportunistas. A mucosite é uma lesão localizada e o tratamento é essencialmente tópico, o sistema de liberação de medicamentos deve ser maleável, mucoadesivo, resistente a saliva e ao cisalhamento na região da boca. Além disso, deve ser capaz de permanecer aderido à mucosa por determinado período de tempo e de liberar adequadamente o fármaco na mucosa. Dentro deste contexto, este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar um sistema mucoadesivo para liberação de nistatina (NYS) na cavidade oral, utilizando a técnica da eletrofiação. O desenvolvimento do estudo contemplou a obtenção de membrana eletrofiada com os polímeros poli(ácido láctico) (PLA) e poli(óxido de etileno) (PEO), definição de parâmetros de processo e da solução e incorporação do fármaco nistatina. Foi realizada caracterização das soluções com análise da condutividade e viscosidade e caracterização térmica, química, superficial e morfológica das membranas. Além disso, foi avaliada toxicidade da membrana através da metodologia HETCAM, avaliação da atividade antifúngica através do teste de difusão em ágar, determinação do teor de nistatina por espectrofotometria UV e avaliação sensorial através da utilização da escala hedônica. Os resultados obtidos indicaram que o sistema ideal é composto por PLA 16% (m:m), PEO 12%(m:m) e nistatina 1.200.000 UI. A melhor condição de eletrofiação para membranas de PLA/PEO/NYS é com tensão de 15 kV, distância da agulha ao coletor em 15 cm e vazão de 1 mL/h. A partir da microscopia eletrônica constatou-se que foi possível produzir membrana com fibras submicrométricas lisas e sem defeitos. A análise de DSC apontou o comportamento semicristalino dos polímeros de acordo com o preconizado na literatura. A termogravimetria indicou manutenção da estabilidade térmica da membrana eletrofiada. A análise de FTIR indicou a presença dos grupamentos químicos dos componentes da formulação sem demonstrar decomposição ou interação entre estes. A medida do ângulo de contato evidenciou caráter hidrofóbico da membrana, porém apresentou força de mucoadesão em ensaio com utilização de mucina e mucosa da bochecha de suínos. Os sistemas desenvolvidos apresentaram alto grau de intumescimento, fator determinante na liberação de fármacos. As membranas eletrofiadas foram classificadas como não irritantes, no ensaio HETCAM, uma vez que não foram observados eventos vasculares. A investigação da atividade antifúngica mostrou que a membrana eletrofiada apresenta sensibilidade contra todas as cepas de *Candida* testadas. O teor de nistatina obtido na membrana foi de 94,92%. A avaliação piloto *in vivo* mostrou, através da avaliação global, aceitação da forma farmacêutica desenvolvida, obtendo pontuação de 7,07 pontos em escala de 0 à 10. Este estudo demonstrou que a eletrofiação é uma ferramenta promissora na produção de sistemas de liberação bucal com nistatina e mostrou a boa aceitação dos pacientes na utilização dos dispositivos desenvolvidos.

Palavras-Chaves: Eletrofiação. Nano/microfibras. Liberação bucal de fármacos. Infecção fúngica oral. Tratamento da mucosite oral.

Dedico este trabalho aos meus pais Helena e Herbert e à minha madrinha Márcia, que não estão mais entre nós, mas que com certeza vibram comigo a cada conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças para enfrentar todas as dificuldades que apareceram na minha vida até então, e por me proporcionar momentos tão felizes também.

Agradeço aos meus orientadores prof. Dr. Marcos Antônio Segatto da Silva e prof^a. Dr^a. Cláudia Merlini pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança, por me permitirem desenvolver um trabalho com tanta liberdade de atuação, por contribuírem de forma extremamente construtiva e por serem meu apoio incondicional em todas as situações.

Agradeço aos meus colegas de laboratório no LCQ – UFSC Florianópolis e no Laboratório de Transformações e Materiais Avançados – UFSC Blumenau, pelo apoio, amizade, ensinamentos, conversas e parceria, vocês foram fundamentais na execução deste trabalho.

Agradeço à Dra. Lisiane Anzanello por acreditar que o aprendizado é fundamental e por me incentivar a dar mais esse passo. Agradeço também a todas as minhas colegas de trabalho na clínica, pois sempre compreenderam a minha ausência e me apoiaram do início ao fim. Não foi fácil, mas conseguimos.

Agradeço aos meus colegas da Universidade Regional de Blumenau, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio, pela compreensão e pela ajuda em vários momentos.

Agradeço aos pacientes que participaram deste estudo e todos aqueles que fizeram parte desta caminhada, ouvindo sobre meus experimentos, sobre os meus estudos, meus sonhos e conquistas. Vocês me motivam a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Agradeço à minha família, aos meus filhos que provavelmente foram os que mais sentiram a minha ausência durante este período, mas compreenderam o quanto foi importante para mim chegar até aqui.

Por fim, agradeço a todos os envolvidos na realização deste projeto, vocês me ensinaram o principal desta trajetória: sozinho não se constrói nada.

“Só existe uma forma de atingir o sucesso no que você se propõe a fazer: todo dia, trabalho árduo. Não há atalho e o caminho não é fácil. É exatamente no caminho que se aprende a valorizar cada passo dado para alcançar o objetivo”.

(Diogo Viana)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios da Fisiopatologia da Mucosite Oral	28
Figura 2 - Intervenções para o manejo da mucosite oral	32
Figura 3 - Anatomia da cavidade oral	36
Figura 4 - Mecanismos biológicos de transporte de fármacos	39
Figura 5 - Fases do Mecanismo de Mucoadesão	43
Figura 6 - Processo de eletrofiação	47
Figura 7 - Imagem de micrografia de MEV de fibras de PLA eletrofiadas, a fim de exemplificar a formação de contas durante o processo	49
Figura 8 - Fórmula Estrutural da Nistatina	54
Figura 9 - Isômeros do ácido polilático. PDLA, poli (D-ácido lático); PDLLA, poli (D-L-ácido lático); PLLA, poli (L-ácido lático)	56
Figura 10 - Fórmula estrutural do Poli(óxido de Etileno)	58
Figura 11 – Fluxograma da metodologia experimental	61
Figura 12 - Equipamento de Eletrofiação – Laboratório de Transformações e Materiais Avançados - UFSC Blumenau	63
Figura 13 - Processo de eletrofiação de membranas	64
Figura 14 - Membranas de PLA eletrofiadas	66
Figura 15 – Goniômetro	71
Figura 16 - Montagem equipamento	73
Figura 17 - Detalhe sonda 1,5 cm	73
Figura 18 - Detalhe da sonda e da Bochecha Suína	73
Figura 19 - Bochecha Suína	73
Figura 20 - Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar M1, M2, M3 – PLA/PEO/NYS; C – PLA/PEO	76
Figura 21 - Membrana embalada	78
Figura 22 - Mucosa Jugal	78
Figura 23 - Imagens de MEV para membranas eletrofiadas da PLA da solução A (10%), com diferentes parâmetros de processo e solução	85
Figura 24 - Imagens de MEV com aumento de 1000 e 5000 vezes para membranas eletrofiadas de PLA da solução B (12%)	86

Figura 25 - Imagens de MEV com aumento de 1000 e 5000 vezes para membranas eletrofiadas de PLA da solução C (14%)	87
Figura 26 - Imagens de microscopia ótica com aumento de 100 vezes para membranas eletrofiadas de PLA da solução A (10%), B (12%) e C (14%), (vazão 1,20 mL e distância 15 cm)	91
Figura 27 - Imagens de microscopia ótica com aumento 200 vezes para membranas eletrofiadas de PLA/PEO da solução A, B e C (vazão 1,20 mL e distância 15 cm)	93
Figura 28 - Imagens de microscopia ótica com aumento 20 vezes para membranas eletrofiadas de PLA/PEO/NYS da solução A (10:10), B (12:10) e C (14:10) - vazão 1,20 mL e distância 15 cm	95
Figura 29 - Imagens de microscopia ótica com aumento 50 vezes para membranas eletrofiadas de PLA 16% (A); PLA/PEO 16% (B); PLA/PEO/NYS 16% (C) (vazão 1,20 mL e distância 15 cm)	97
Figura 30 - Imagens de microscopia ótica com aumento 50 vezes para membranas eletrofiadas PLA 16%/PEO 12%/NYS	98
Figura 31 – Imagem de MEV e histogramas das membranas eletrofiadas nº 5, 11, 14 e 17	100
Figura 32 – Imagens de MEV e histogramas das membranas eletrofiadas nº 20, 23, 26 e 28	101
Figura 33 - Imagens de MEV e histogramas das membranas eletrofiadas nº 29 e 30	102
Figura 34 - Imagens das membranas com defeitos nº 2 e 8	102
Figura 35 - Imagens da membrana selecionada para sequência de estudos– membrana 31 (PLA/PEO/NYS – 16%:12%:1200.00 UI)	104
Figura 36 - Curva de DSC NYS (matéria-prima), PEO (matéria-prima), PLA (matéria- prima) e membrana PLA/PEO/NYS	105
Figura 37 - Curva de TGA de PLA, PEO, NYS e membrana PLA/PEO/NYS	108
Figura 38 - Espectro FTIR PLA (matéria-prima), NYS (matéria-prima), PEO (matéria-prima) e Membrana NYS/PEO/PLA (16:12)	110
Figura 39 - Representação esquemática da formação de ângulo de contato para materiais hidrofílicos e hidrofóbicos	113

Figura 40 - Molhabilidade das membranas eletrofiadas: a – PLA; b – PLA/PEO; c PLA/PEO/NYS (16:10 m/m); d – PLA/PEO/NYS (16:12 m/m)	114
Figura 41 - Membrana PLA/PEO/NYS aderida ao final do teste de Força de destacamento	119
Figura 42 - Efeitos de irritação observados com a Membrana PLA (16%) (n=3)	122
Figura 43 - Efeitos de irritação observados com a Membrana PLA/PEO (16:12) (n=3)	122
Figura 44 - Efeitos de irritação observados com a Membrana PLA/PEO/NYS (16:12) (n=3)	122
Figura 45 - Controle Negativo (NaCl 0,9 %)	123
Figura 46 - Controle Positivo (NaOH 1 mol/L)	123
Figura 47 - Halos de inibição formados pela membrana PLA/PEO/NYS (16:12) pelo método de disco-difusão; A – <i>C. albicans</i> , B – <i>C. glabrata</i> , C – <i>C. tropicalis</i> , D – <i>C. krusei</i>	122
Figura 48 - Imagens da membrana aderida à mucosa jugal de pacientes após 10 minutos (n=20)	133

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Medida da viscosidade (cP) das soluções de PLA; PLA/PEO; PLA/PEO/NYS, solução à 10 % (A), 12 % (B), 14 % (C) e 16% (D)	80
Gráfico 2 - Ângulos de contato das Membranas PLA, PLA/PEO e PLA/PEO/NYS (16:10) e (16:12)	113
Gráfico 3 - Perfil de intumescimento em 0,5, 1,5 e 3 minutos	117
Gráfico 4 - Perfil de intumescimento em 5, 15, 30, 60 e 90 minutos	117
Gráfico 5 - Avaliação Sensorial – atributo Aparência	128
Gráfico 6 - Avaliação Sensorial: atributo Sabor	129
Gráfico 7 - Avaliação Sensorial: atributo Textura	129
Gráfico 8 - Avaliação Sensorial: atributo Conforto	130
Gráfico 9 - Avaliação Sensorial: atributo Manuseio	130
Gráfico 10 - Avaliação Sensorial: atributo Adesão	131

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escala OMS para avaliação da mucosite oral	30
Quadro 2 - Especificações dos polímeros ideais para desenvolvimento de mucoadesivo	44
Quadro 3 - Soluções de PLA + solvente	63
Quadro 4 - Soluções de PLA/PEO + Solventes	67
Quadro 5 - Soluções de PLA/PEO/NYS + Solventes	68
Quadro 6 - Escala de pontuação para lise vascular, hemorragia e coagulação para o teste HET-CAM	75
Quadro 7 - Categorização da irritação	75
Quadro 8 - Grau de Intumescimento em 0,5, 1,5 e 3 minutos das membranas eletrofiadas PLA/PEO (16:10); PLA/PEO/NYS (16:10); PLA/PEO/NYS (16:12)	115
Quadro 9 - Grau de Intumescimento em 5, 15, 30, 60 e, 90 minutos das membranas eletrofiadas A - PLA/PEO (16:10); B – PLA/PEO/NYS (16:10); C – PLA/PEO/NYS (16:12)	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores relacionados ao paciente que levam ao aumento do risco de mucosite oral	26
Tabela 2 - Fatores que interferem na liberação de fármacos na cavidade oral	38
Tabela 3 - Parâmetros de eletrofiação do PLA	64
Tabela 4 - Condições da eletrofiação de membranas de PLA – A (10%), B (12%), C (14%)	65
Tabela 5 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de PLA – A (10%), B (12%), C (14%)	66
Tabela 6 - Parâmetros de eletrofiação do PLA/PEO	67
Tabela 7 - Parâmetros de eletrofiação da membrana PLA/PEO/NYS	69
Tabela 8 - Condutividade das soluções de PLA D, PLA D/PEO, PLA D/PEO/NYS	81
Tabela 9 – Parâmetros de processo das membranas selecionadas para análise em microscopia eletrônica – Solução A (10% PLA), solução B (12% PLA), solução C (14% PLA)	83
Tabela 10 - Sistema de classificação qualitativo das membranas de acordo com aspecto através da microscopia ótica	90
Tabela 11 - Pontuação das membranas de PLA de acordo com aspecto através da microscopia ótica: 0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10 defeitos); 3 – (11 a 30 defeitos); 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual	92
Tabela 12 - Pontuação das membranas de PLA/PEO de acordo com aspecto através da microscopia ótica – A (10% PLA), B (12% PLA), C (14% PLA) e 10 % PEO	94
Tabela 13 - Pontuação das membranas de PLA/PEO/NYS de acordo com aspecto através da microscopia ótica: 0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10 defeitos); 3 – (11 a 30 defeitos); 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual	96
Tabela 14 - Pontuação das membranas de PLA; PLA/PEO; PLA/PEO/NYS com 16% de PLA de acordo com aspecto através da microscopia ótica: 0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10) defeitos; 3 – (11 a 30) defeitos; 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual	97

Tabela 15 - Pontuação das membranas de PLA/PEO/NYS com 16% de PLA e 12% de PEO de acordo com aspecto através da microscopia ótica: 0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10) defeitos; 3 – (11 a 30) defeitos; 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual	98
Tabela 16 - Membranas selecionadas para análise de MEV – A (10% PLA), B (12 % PLA), C 14 % PLA), D (16% PLA)	99
Tabela 17 - Aspecto e diâmetro médio das fibras das membranas eletrofiadas	99
Tabela 18 - Espectros FTIR: PLA (matéria-prima); PEO (matéria prima); NYS (matéria-prima); membrana eletrofiada PLA/PEO/NYS	111
Tabela 19 - Valores médios para força de destacamento e trabalho de mucoadesão (n=6) para membrana eletrofiadas PLA/PEO/NYS	120
Tabela 20 - Escores de irritação HET-CAM (valores médios, n = 3)	123
Tabela 21 - Valores de diâmetros de zonas de inibição (mm) por disco-difusão, (n=3)	126
Tabela 22 - Resultados da avaliação sensorial através da Escala Hedônica de 9 pontos	128

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Razão Intumescimento (%) = $[(W_s - W_d) / W_d] \times 100$	74
Equação 2 - Equação da Reta $y = 0,0246x - 0,0099$	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
DCE	Dicloroetano
DMF	Dimetilformamida
DOE	Design of experiments
DP	Desvio padrão
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourrie
kV	Kilovolts
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
MM	Massa molar
m/m	Massa/massa
MO	Mucosite oral
N	Grau de polimerização
nm	Nanômetros
NYS	Nistatina
P.A	Pureza analítica
PDLA	Poli(ácido D-láctico)
PDLLA	Poli(ácido DL-láctico)
PEG	Poli(etileno glicol)
PEO	Poli(óxido de etileno)
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Poli(ácido láctico)
PLA/PEO	Poli(ácido láctico)/poli(óxido de etileno)
PLA/PEO/NYS	Poli(ácido láctico)/poli(óxido de etileno)/nistatina
PLLA	Poli(ácido L-láctico)
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
Tm	Temperatura de fusão
µm	Micrômetro
UR	Umidade relativa
V	Voltagem aplicada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVO GERAL	25
2.1 Objetivos Específicos	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 Mucosite Oral Induzida Pela Terapia do Câncer	26
3.1.1 Epidemiologia	26
3.1.2 Fisiopatologia	27
3.1.3 Classificação	29
3.1.4 Prevenção e Tratamento	31
3.1.5 Infecção Fúngica na Mucosite Oral	33
3.2 Administração Oral de Fármacos	34
3.2.1 Anatomia e Histologia da Cavidade Oral	34
3.2.2 A Via Bucal Para Administração de Fármacos	36
3.2.3 Mucoadesão	40
3.2.3.1 Teorias da mucoadesão.....	40
3.2.3.2 Mecanismos da mucoadesão	42
3.2.4 Polímeros Bioadesivos	43
3.2.5 Membranas Bioadesivas Para Liberação Bucal de Fármacos	45
3.3 Eletrofição	46
3.3.1 Processo de Eletrofição.....	46
3.3.2 Parâmetros de Processamento ou Condições Operacionais	48
3.3.3 Parâmetros de Solução	50
3.3.4 Parâmetros Ambientais	52
3.4 Nistatina	53
3.4.1 Características Químicas e Físico-químicas.....	53
3.4.2 Propriedades Farmacológicas	54

3.5 Poli (Ácido Láctico)	55
3.5.1 Características Químicas e Físico-químicas.....	55
3.5.2 Aplicações do Poli (Ácido Láctico).....	56
3.6 Poli (óxido de Etileno)	57
3.6.1 Características Químicas e Físico-químicas.....	57
3.6.2 Aplicações do Poli (óxido de Etileno)	58
4 Desenvolvimento e caracterização de SISTEMA mucoADESIVO contendo nistatina	60
4.1 Materiais	60
4.2 Métodos	60
4.2.1 Caracterização das soluções.....	62
4.2.1.1 <i>Viscosidade das soluções poliméricas</i>	62
4.2.1.2 <i>Condutividade iônica</i>	62
4.2.2 Parametrização do Processo de Eletrofiação de Membranas de PLA	62
4.2.2.1 <i>Etapa 1</i>	63
4.2.2.2 <i>Etapa 2</i>	66
4.2.3 Parametrização do Processo de Eletrofiação de Membranas de PLA/PEO.....	67
4.2.4 Parametrização do Processo de Eletrofiação de Membranas de PLA/PEO/NYS	68
4.2.5 Técnicas de Caracterização	69
4.2.5.1 <i>Caracterização morfológica</i>	69
4.2.5.1.1 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	69
4.2.5.2 <i>Caracterização térmica</i>	70
4.2.5.2.1 <i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	70
4.2.5.2.2 <i>Termogravimetria (TGA)</i>	70
4.2.5.3 <i>Caracterização química</i>	70

4.2.5.3.1 <i>Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	70
4.2.5.4 <i>Caracterização superficial</i>	71
4.2.5.4.1 <i>Medidas de ângulo de contato</i>	71
4.2.6 <i>Teste de bioadesão in vitro</i>	72
4.2.7 <i>Perfil de Intumescimento</i>	73
4.2.8 <i>Ensaio de Toxicidade</i>	74
4.2.8.1 <i>Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)</i>	74
4.2.9 <i>Análise Microbiológica</i>	76
4.2.9.1 <i>Teste de Difusão em Ágar</i>	76
4.2.10 <i>Quantificação da Nistatina por Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta</i>	77
4.2.10.1 <i>Teor de Nistatina contida nas Membranas Eletrofiadas</i>	77
4.2.11 <i>Avaliação piloto in vivo da aceitação, manipulação e aplicação das membranas livres de substância ativa</i>	77
4.2.11.1 <i>Análise Sensorial</i>	77
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1 Caracterização das Soluções	79
5.1.1 <i>Viscosidade das Soluções Poliméricas</i>	79
5.1.2 <i>Condutividade Iônica</i>	81
5.2 Parametrização do Processo de Eletrofição de Membranas de PLA	82
5.2.1 <i>Etapa 1</i>	82
5.2.2. <i>Etapa 2</i>	89
5.3 Parametrização do Processo de Eletrofição de Membranas de PLA/PEO	92
5.4 Parametrização do Processo de Eletrofição de Membranas de PLA/PEO/NYS	94

5.5 Caracterização Morfológica das Membranas	98
5.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	98
5.6 Caracterização Térmica das Membranas	104
5.6.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	104
5.6.2 Análise Termogravimétrica (TGA)	107
5.7 Caracterização Química das Membranas.....	109
5.7.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	109
5.8 Caracterização Superficial das Membranas	112
5.8.1 Medidas de Ângulo de Contato	112
5.9 Caracterização Físico-Química	115
5.9.1 Intumescimento	115
5.10 Teste de Bioadesão <i>in vitro</i> das Membranas.....	118
5.11 Ensaio de Toxicidade.....	121
5.12 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	124
5.13 Determinação do Teor de Nistatina	127
5.13.1 Teor de Nistatina contida nas Membranas Eletrofiadas.....	127
5.14 Avaliação Piloto <i>in vivo</i>	127
6 CONCLUSÕES	135
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
8 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	139
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
10 APÊNDICES	155

1 INTRODUÇÃO

As doenças e agravos não transmissíveis (DANT) são as principais responsáveis pelo adoecimento e óbito da população no mundo. Dentre estas doenças, destaca-se o câncer, configurando-se na atualidade como um dos mais importantes problemas de saúde pública (SILVA, 2017; INCA, 2019; 2021).

O câncer de cabeça e pescoço corresponde a tumores malignos do trato digestivo superior, incluindo a cavidade oral, faringe e laringe, sendo que 40% destes ocorrem na cavidade oral. Para o Brasil, estimam-se 10.900 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.200 em mulheres para o ano de 2023. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,30 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição; e de 3,83 para cada 100 mil mulheres, sendo o 8º mais frequente entre todos os cânceres (INCA, 2023).

Os tratamentos das neoplasias malignas mais comumente utilizados são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. O câncer em sua fase inicial pode ser controlado ou curado através de procedimento cirúrgico, que se caracteriza por ser um tratamento radical, que compreende a remoção do tumor primário com certa margem de segurança e, se indicada, realiza-se também a retirada dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão-sede do tumor (CACCELLI; PEREIRA; RAPOPORT, 2009; CAMPOS *et al.*, 2014).

Diferentemente do tratamento cirúrgico, a radioterapia e a quimioterapia não são específicas para as células neoplásicas e afetam também as células normais que se dividem rapidamente, interferindo na divisão celular. Este fato faz com que ocorram diversos efeitos colaterais, a curto e longo prazos, que interferem de forma muito significativa na qualidade de vida dos pacientes com câncer (AZIZI *et al.*, 2015; GHOLIZADEH; SHEYKHBAHAEI; SADRZADEH-AFSHAR, 2016).

De acordo com a literatura, cerca de 40 % dos pacientes oncológicos submetidos ao tratamento quimioterápico ou radioterápico apresentam complicações orais, dentre estas, destacam-se a mucosite, a xerostomia e as infecções. No tratamento do câncer de cabeça e pescoço, a mucosite oral é verificada em aproximadamente 40 % dos pacientes tratados com quimioterapia e 85 % a 100 % dos pacientes submetidos à radioterapia (CARDONA *et al.*, 2017; CHAVELI-LÓPEZ; BAGÁN-SEBASTIÁN, 2016).

A mucosite se manifesta clinicamente como lesões erosivas e/ou ulcerativas, que podem causar eritema, edema, hemorragia e dor. Sua intensidade e duração estão relacionadas a fatores do tratamento, fatores ambientais do paciente e pode ser agravada pela xerostomia devido à perda de lubrificação dos tecidos. Além disso, associada ao dano à mucosa oral, ocorre predisposição a diversas infecções, entre elas, infecções fúngicas, sendo comum o paciente em tratamento oncológico apresentar concomitantemente, mucosite e infecção fúngica na cavidade oral (CURRA *et al.*, 2018; AGHAMOHAMMADI; HOSSEINIMEHR, 2016).

O manejo da mucosite, para prevenir a sua ocorrência ou acelerar a sua resolução, é de extrema relevância para os pacientes em tratamento oncológico, especialmente aqueles que possuem diagnóstico de neoplasias em cabeça e pescoço, uma vez que a sua presença interfere na qualidade de vida durante e após o tratamento e requer, na maioria dos casos, recálculo de doses a serem administradas, muitas vezes interferindo nos resultados terapêuticos obtidos e nas taxas de sobrevida (AZIZI *et al.*, 2015; GHOLIZADEH, SHEYKHBAHAEI, SADRZADEH-AFSHAR, 2016).

Diversos tipos de intervenções têm sido estudados para a prevenção e tratamento da mucosite oral e suas complicações e visam principalmente o alívio da sintomatologia dolorosa. Neste sentido, vários autores sugerem desde o uso de anestésicos tópicos a analgésicos opióides sistêmicos, aplicação de terapias com laser ou crioterapia, além do uso de produtos de origem natural como própolis, aloe vera e camomila, antibióticos e antifúngicos e outros produtos como glutamina e fatores de crescimento (CAMPOS *et al.*, 2014; MOGENSEN *et al.*, 2016; ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; CARDONA *et al.*, 2017; ORONSKY *et al.*, 2018, CONJUNSKI, 2021).

Contudo, apesar de um número significativo de estudos existentes com várias substâncias, nenhuma estratégia provou-se totalmente efetiva na prevenção e/ou tratamento da mucosite oral. Existem muitos estudos randomizados, com diversos modelos de terapêutica na literatura, porém o seguimento de protocolos semelhantes é quase inexistente, fato este que dificulta a tomada de decisão no ambiente clínico (McCULLOCH, 2014; MIRANDA; QUEIROZ; FREITAS, 2016; GHOLIZADEH; SHEYKHBAHAEI; SADRZADEH-AFSHAR, 2016).

Neste sentido, o estudo de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da mucosite oral e suas complicações é de extrema importância, especialmente no

que se refere a estratégias profiláticas e terapêuticas no combate as infecções orais nos pacientes oncológicos. As infecções fúngicas que ocorrem na presença de mucosite oral, em geral, são tratadas com antifúngicos locais, uma vez que quando comparados aos sistêmicos, apresentam menor risco de efeitos colaterais e interações medicamentosas. Como primeira escolha no tratamento das infecções fúngicas orais destaca-se o fármaco nistatina sob a forma de suspensão (MARIA; ELLOPOULOS; MUANZA, 2017; ZHANG *et al.*, 2020).

A nistatina é um antifúngico polieno usado na profilaxia e tratamento de candidíase de pele e mucosas, com ação principal contra *Candida* spp. É ainda considerada um macrolídeo, ou seja, apresenta uma grande cadeia cíclica. Essas características químicas geralmente são associadas à sua baixa permeabilidade, que a impede de atravessar as células intestinais, quando administrada por via oral (STEFANOVIC *et al.*, 2013; AGUIAR *et al.*, 2010).

Em função de sua baixa solubilidade aquosa, a nistatina é um fármaco que se encontra menos disponível para exercer sua ação tópica, sobretudo no tratamento da mucosite oral, já que esta é banhada por saliva continuamente e de forma bastante expressiva. A produção constante, a distribuição não uniforme e a composição da saliva, podem interferir na absorção do fármaco, pois existe a possibilidade de ocorrer aumento na velocidade de eliminação no local da aplicação, liberação não uniforme de fármaco em locais com mais produção de saliva e modificações químicas do ativo empregado (CALIXTO, 2017; AGUIAR, 2015; STEFANOVIC *et al.*, 2013).

Neste sentido, o pouco contato entre o fármaco e a mucosa oral leva a um efeito terapêutico menos significativo. Assim, o uso de formas farmacêuticas que permitem o contato íntimo com a mucosa e com poder residual mais elevado, podem proporcionar ação mais efetiva do medicamento (AGUIAR, 2015).

O uso de membranas mucoadesivas tende a proteger a superfície lesionada, apresentam maior tempo de residência no local de aplicação e a maior aceitabilidade pelos pacientes, devido ao menor desconforto desta forma farmacêutica em relação aos comprimidos bucais. Além disso, tais sistemas podem permanecer longos períodos no local de aplicação, garantindo a liberação constante do fármaco (MAZZARINO, 2013; PINTO, 2013).

Para o desenvolvimento de membranas mucoadesivas diversos polímeros são utilizados, com destaque o poli(ácido lático) (PLA), uma vez que se trata de um polímero facilmente sintetizado a partir recursos renováveis, é biodegradável e sua

taxa de degradação pode ser modulada para modificar a cinética de liberação de fármacos. Além disso, as moléculas de PLA podem ser modificadas quimicamente por meio de interações com proteínas adesivas e a adsorção de certas proteínas pode determinar as células e tecidos com os quais o polímero tem mais afinidade (NARAYANAN *et al.*, 2016).

Uma das técnicas relatadas na literatura para a obtenção de membranas mucoadesivas a partir de polímeros é o processo de eletrofiação. A eletrofiação é uma técnica utilizada em múltiplas áreas na qual fibras com tamanhos nano ou micrométricos, são criadas em filamentos contínuos a partir de um campo elétrico aplicado a uma solução polimérica. Trata-se de um processo de obtenção de nanofibras, simples, de baixo custo e que resulta em membranas com elevada área de contato, o que pode levar a obtenção de um sistema mucoadesivo de alto desempenho (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; COSTA *et al.*, 2012a).

Além disso, as membranas eletrofiadas podem prolongar o tempo de residência das formas farmacêuticas na camada mucosa, permitindo a otimização da liberação de fármacos onde deve ocorrer o efeito terapêutico, e/ou o íntimo contato da formulação com o local de absorção (FRIDRIKH *et al.* 2003; ENGELKE; WINTER; ENGERT, 2018).

Neste sentido, este estudo tem como objetivo propor o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos eletrofiados para administração do fármaco nistatina no tratamento da infecção fúngica em casos de mucosite oral, induzida pela terapia do câncer. Busca-se obter um sistema que seja capaz de intumescer na presença da saliva, com adequada mucoadesividade, fácil moldagem e que permita receber quantidades de fármacos suficiente para uso como forma farmacêutica.

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver sistemas mucoadesivos com nistatina através da técnica de eletrofiação como alternativa para o tratamento da infecção fúngica presente na mucosite oral induzida pela terapia do câncer.

2.1 Objetivos Específicos

1. Desenvolver membranas mucoadesivas com poli(ácido láctico) e poli(óxido de etileno) através da técnica de eletrofiação e investigar os parâmetros apropriados para obtenção de fibras homogêneas e sem defeitos;
2. Incorporar nistatina na solução polimérica e avaliar o comportamento da solução polímero/fármaco quanto aos parâmetros de processo e solução estabelecidos para a eletrofiação;
3. Avaliar a mucoadesividade das membranas através de análise em Texturômetro;
4. Avaliar o teor de nistatina contida nas membranas eletrofiadas;
5. Investigar a atividade antifúngica das membranas com nistatina em estudos por teste de difusão em ágar *in vitro*;
6. Testar o efeito citotóxico das membranas através da metodologia HETCAM para investigar sua biocompatibilidade *in vitro*;
7. Realizar avaliação piloto *in vivo* da aceitação, manuseio e aplicação das membranas livres de substância ativa em um grupo de pacientes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mucosite Oral Induzida Pela Terapia do Câncer

3.1.1 Epidemiologia

A mucosite oral (MO) está entre as complicações graves que são secundárias à terapia oncológica, com incidência superior a 90% em praticamente todos os pacientes em tratamento de cânceres na região da cabeça e pescoço que se submetem a radioterapia. Além da radioterapia, vários fatores relacionados ao paciente, como idade, peso, sexo, estado nutricional, microbiota bucal e estado de saúde bucal são considerados fatores de risco associados ao desenvolvimento da mucosite oral (Tabela 1). Outros fatores importantes a serem considerados são a administração intravenosa de medicamentos antineoplásicos e a administração simultânea da quimioterapia com a radioterapia, uma vez que aumentam de forma significativa a incidência e a gravidade da MO (AL IBRAHEEMI; SHAMOUN, 2016; PARK; LEE, 2019; LIU *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Fatores relacionados ao paciente que levam ao aumento do risco de mucosite oral

Idade	Aumento do risco em jovens devido à alta taxa de renovação celular e em idosos o processo de cura é mais lento.
Gênero	Tendência de aumento de risco em mulheres.
Saúde e higiene Oral	A manutenção da saúde e higiene oral reduzem os riscos do surgimento e do agravamento da mucosite oral.
Secreção de saliva	Diminuição da produção de saliva aumento o risco de mucosite oral.
Fatores genéticos	Polimorfismos genéticos relacionados com a expressão de mediadores inflamatórios, a exemplo do TNF-alfa.
Índice de massa corporal	Retardo no processo de cura especialmente em indivíduos desnutridos
Função renal	Aumento da mucotoxicidade associado ao alto nível de creatinina.
Tabagismo	Retarda o processo de cicatrização.
Tratamento de câncer anterior	Histórico de mucosite anterior aumenta os riscos de novas afecções.

Fonte: Blakaj *et al.* (2019)

Aproximadamente 20% a 40% dos pacientes submetidos à quimioterapia convencional desenvolvem mucosite durante o tratamento e 80% dos pacientes submetidos à quimioterapia de alta dose, devido ao transplante hematopoiético de células-tronco podem apresentar a afecção (HASHEMINASAB *et al.*, 2021).

A MO causa dor e consequente dificuldade na deglutição, o que leva em alguns casos à necessidade de nutrição enteral ou parenteral, ao aumento do uso de opióides e até à interrupção do tratamento quimioterápico ou radioterápico. Além disso, associada à imunossupressão, também pode favorecer a ocorrência de bacteremia e resultar em hospitalização, por vezes prolongada e resultar ainda, na morte do paciente. Quando ulcerativa, a MO pode tornar-se uma porta de entrada aos microrganismos oportunistas, especialmente as espécies gram negativas e fungos, que podem causar piora na lesão e retardar o processo de cicatrização (SHARON *et al.*, 2020; LESSA *et al.*, 2020; MARINHO *et al.*, 2021).

Dentre os medicamentos antineoplásicos destacam-se os agentes antimetabólitos e agentes alquilantes como os principais causadores da mucosite oral grave e estudos tem revelado que a incidência é maior em pacientes com estadiamento III ou IV, o que demonstra a influência de doses cumulativas na gravidade e surgimentos das lesões (LESSA *et al.*, 2020).

3.1.2 Fisiopatologia

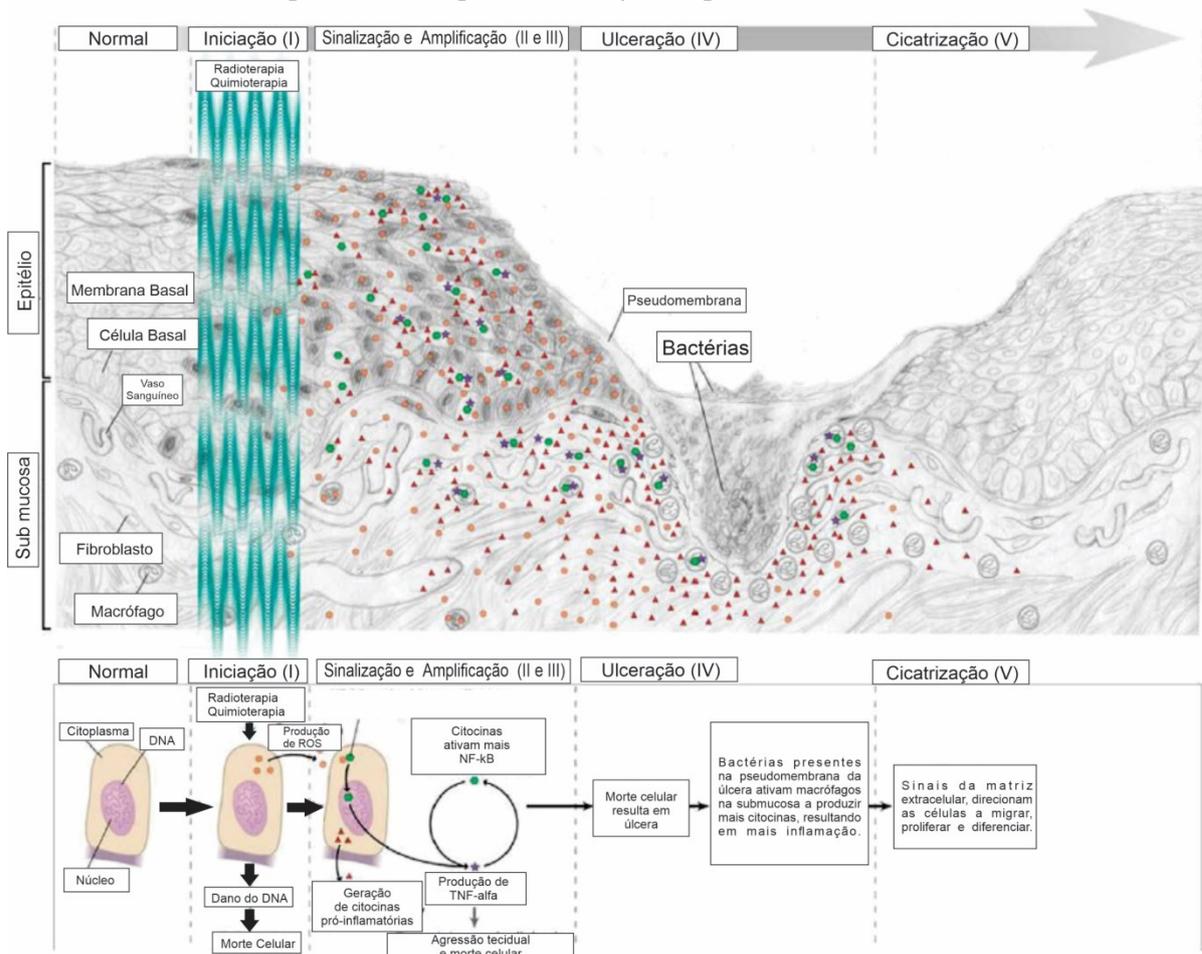
A MO pode ser definida como todo processo inflamatório que ocorre na mucosa oral com presença de edema e eritema, progredindo para o desenvolvimento de úlceras e formação de pseudomembrana. De acordo com o *guideline* da *Multinational Association of Supportive Care in Cancer* (MASCC), a mucosite é o dano na mucosa da cavidade oral secundária à terapia do câncer, quimio e/ou radioinduzido e, se não manejado adequadamente, pode causar consequências extremamente deletérias, uma vez que, de acordo com a severidade do quadro, pode afetar a condição clínica do paciente, a realização das atividades cotidianas diárias e levar a complicações infecciosas (ELAD *et al.*, 2020; SONIS, 2004).

A MO surge em média de 7 a 10 dias após a administração da quimioterapia e a partir da segunda semana de radioterapia, contudo, a mucosite oral não é afecção exclusiva de pacientes em tratamento de neoplasias malignas e pode ser

diagnosticada também em pacientes sob cuidados paliativos (BARASCH, 2003; ZHANG *et al.*, 2020).

Os mecanismos moleculares e celulares da mucosite oral começaram a ser desvendados recentemente o que contribui para o desenvolvimento de novos protocolos de profilaxia e tratamento. A fisiopatologia da mucosite oral é dividida em cinco fases: iniciação, sinalização e amplificação, ulceração e cicatrização (Figura 1).

Figura 1 - Estágios da Fisiopatologia da Mucosite Oral



Fonte: Adaptado de Sonis (2009)

Na iniciação, o estágio inicial de agressão aos tecidos ocorre de forma rápida e assintomática podendo haver lesão direta no DNA das células basais do epitélio e aparecimento de radicais oxidativos. O DNA lesionado ativa algumas vias de transduções que irão ativar a transcrição de fatores como p53 e fator nuclear Kapa-Beta que conseqüentemente estimula a produção (upregulation) de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL1 β e IL-6. A presença destas proteínas causa agressão precoce ao tecido conjuntivo e ao endotélio e reduz oxigenação epitelial causando a

morte das células basais do epitélio e conseqüentemente lesionando o tecido (LESSA *et al.*, 2020).

Na fase de amplificação uma grande quantidade de proteínas biologicamente ativadas atinge a submucosa. As citocinas pró-inflamatórias não só agridem o tecido, mas proporcionam um feedback positivo para aumentar os danos iniciais causados pela quimioterapia ou radioterapia. Aproximadamente 10 dias após a toxicidade inicial produzida pelo tratamento antineoplásico ocorre a desintegração e a ulceração do epitélio e a colonização das úlceras por bactérias residentes na cavidade oral estimulam a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. A presença de fibrina, bactérias e exsudato na superfície das úlceras é conhecida como pseudomembrana (MONEIM *et al.*, 2017).

A quinta etapa, a fase de cicatrização, se define pela proliferação epitelial e pela distinção celular e tecidual, reconstruindo a totalidade do epitélio, o que pode ocorrer em até 21 dias (AGHAMOHAMMADI; HOSSEINIMEHR, 2016).

Clinicamente, a MO surge após 5 a 7 dias da exposição ao agente citotóxico, inicialmente como uma atrofia da mucosa que evolui para eritema e ulceração coberta por pseudomembrana. Quando não controlada, o paciente apresenta sintomatologia dolorosa em boca e em orofaringe (odinofagia) impossibilidade de deglutição (disfagia), dificuldade em realizar a higiene bucal e praticamente não se alimenta. Nestas condições faz-se necessária a introdução do suporte nutricional parenteral e a administração de analgésicos opióides para minimizar o sofrimento do paciente (BERGER *et al.*, 2020).

Cabe ressaltar que a microflora oral tem papel importante na patogênese da MO, uma vez que bactérias e fungos oportunistas podem colonizar as ulcerações, aumentar a gravidade das lesões e retardar o processo de cicatrização (CIDON, 2018).

3.1.3 Classificação

De acordo com o sistema de graduação da Organização Mundial de Saúde (OMS), a MO pode ser classificada em cinco graus diversos, de acordo com o Quadro 1. Nessa escala estão definidos critérios como presença de eritema e ulceração, dor local e capacidade de deglutição.

Quadro 1 - Escala OMS para avaliação da mucosite oral

Grau 0	não há alteração na mucosa oral;
Grau 1:	presença de eritema;
Grau 2	presença de eritema e lesões ulceradas, com aceitação de dieta sólida pela via oral;
Grau 3	presença de eritema e lesões ulceradas, com tolerância apenas de dieta líquida pela via oral;
Grau 4	presença de eritema e lesões ulceradas que impossibilitam a alimentação através da via oral.

Fonte: Pulito *et al.* (2020)

Outra forma de avaliação da MO é através dos critérios de toxicidade preconizados pelo *National Cancer Institute* (NCI), que estabelece:

- Grau 0: não há alteração da mucosa oral;
- Grau 1: úlceras indolores, eritema ou dor leve na ausência de úlceras;
- Grau 2: reação pseudomembranosa focal (zonas e/ou áreas geralmente < que 1,5 cm de diâmetro e não contíguas);
- Grau 3: Reação pseudomembranosa confluenta (zonas e/ou áreas contíguas, geralmente > que 1,5 cm de diâmetro);
- Grau 4: Necrose ou ulceração profunda pode incluir sangramento não induzido por trauma menor ou abrasão;
- Grau 5: caso de morte relacionada à toxicidade (RABER-DURLACHER; ELAD; BARASCH, 2010).

Em pacientes submetidos à quimioterapia, a MO tem duração de aproximadamente uma semana, com resolução em até 21 dias após a administração do ciclo de medicamentos. As lesões orais ocorrem principalmente nas mucosas não queratinizadas do ventre de língua, do assoalho de boca, do palato mole e na mucosa jugal (MENEZES *et al.*, 2014).

Na MO induzida pela radioterapia a inflamação permanece por pelo menos duas semanas após o término do tratamento, e pode atingir tanto a mucosa queratinizada quanto a não queratinizada (RODRÍGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2012).

Outras lesões orais podem se desenvolver nos pacientes em tratamento oncológico, o que pode ser um fator de confundimento no diagnóstico da mucosite. Para o correto diagnóstico a utilização de sistemas de classificação, informações sobre as terapias tóxicas às mucosas e medicamentos profiláticos, bem como tempo de aparecimento e localização das lesões são imprescindíveis. Além disso,

recomenda-se a inspeção oral frequente de pacientes em tratamento quimio ou radioterápico para detecção das lesões em estágio inicial (LI *et al.*, 2020).

3.1.4 Prevenção e Tratamento

Apesar de um número expressivo de estudos realizados nos últimos anos sobre prevenção e tratamento da MO decorrente de tratamento oncológico, não há até o momento uma medida preventiva e terapêutica estabelecida. Sabe-se que, o tratamento da MO é, quase que exclusivamente, sintomático e dependerá do grau de severidade da lesão (ELAD *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2021).

Atualmente é possível encontrar na literatura o registro do emprego de mais de 20 medidas profiláticas para a mucosite provocada pelo tratamento oncológico, como: crioterapia, gluconato de clorexedina, higiene oral, glutamina, benzydâmica, sucralfato, vitamina E e vários enxaguatórios bucais contendo fitoterápicos e probióticos. No entanto, devido à escassez de evidências a prevenção da MO é predominantemente baseada nos cuidados paliativos e na prevenção de infecções secundárias (AZIZI *et al.*, 2015; AGHAMOHAMMADI; HOSSEINIMEHR, 2016; MONEIM *et al.*, 2017; BLACKER *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2020).

Todavia, alguns estudos tem documentado o uso do laser de baixa potência como medida preventiva, pelo fato deste possuir mecanismos de ação biológica capaz de interferir nas fases da MO (ELAD *et al.*, 2020).

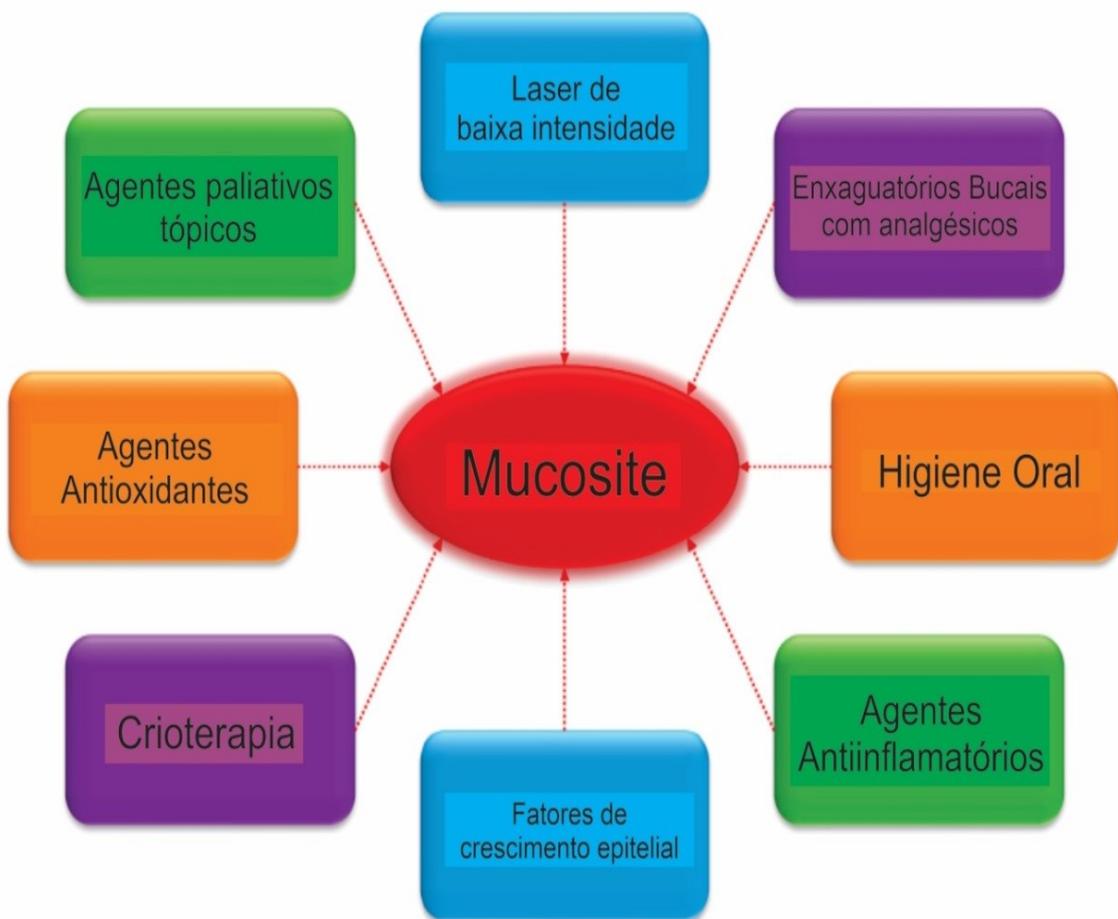
Segundo Sonis (2009), um dos principais desafios para o desenvolvimento de qualquer tratamento capaz de modular a toxicidade da terapia oncológica é garantir que ela atinja o tecido em quantidades adequadas sem diminuir os efeitos da terapia contra o tumor. A MO por ser uma condição de natureza multifatorial e que implica uma série de eventos em várias áreas afetadas, justifica a relevância dos estudos sobre o tema para que se tenham dados e parâmetros de análise suficientes para melhorar a qualidade de vida dos pacientes em tratamento oncológico, o qual por si só já representa uma situação de extrema fragilidade.

De acordo com a *Multinational Association of Supportive Care in Cancer e International Society of Oral Oncology* (MASCC/ISOO), as intervenções para manejar a mucosite oral podem ser subdivididas em oito linhas de atuação (Figura 2): cuidados básicos com a cavidade oral, uso de agentes anti-inflamatórios, fotoestimulação (luz e laser), crioterapia, agentes antimicrobianos/anestésicos/analgésicos (incluindo

coberturas), fatores de crescimento e citocinas, produtos naturais e outras intervenções para mucosites no trato gastrointestinal (ELAD *et al.*, 2020).

Considerando a MO associada à quimioterapia, a diretriz MASCC/ISOO recomenda a higiene oral básica com vários agentes combinados para prevenção da mesma. Entretanto, reforça ainda que não há evidências consistentes para indicar higiene oral profissional, bem como menciona que soluções salinas, com bicarbonato de sódio ou clorexidina também não apresentam evidências robustas para serem recomendadas pela diretriz (ELAD *et al.*, 2020).

Figura 2 - Intervenções para o manejo da mucosite oral



Fonte: Adaptado de Moneim *et al.* (2017)

3.1.5 Infecção Fúngica na Mucosite Oral

A microflora oral é definida como o conjunto de diferentes microrganismos que habitam a cavidade oral, principalmente bactérias, mas também, fungos e vírus. A relação existente entre microrganismos e o hospedeiro é basicamente de comensalismo proporcionando uma barreira protetora, no entanto, uma alteração no equilíbrio de seus componentes pode desencadear processos patológicos na saúde bucal do hospedeiro. Durante o tratamento radioterápico e quimioterápico, os pacientes apresentam um quadro de imunossupressão transitória que predispõe a proliferação de microrganismos oportunistas, especialmente fungos (ROCHA *et al.*, 2017; CARNEIRO; VILELA JÚNIOR, 2022; PATEL, 2022).

A candidíase oral é a infecção oportunista mais prevalente relacionada aos tratamentos antineoplásicos e se manifesta em cerca de 70 a 85% dos pacientes oncológicos (FUNAHARA *et al.*, 2022; RIERA *et al.*, 2022). O risco aumentado para a candidíase oral em pacientes oncológicos ocorre pela diminuição e (ou) depleção das células do sistema imunológico e também pela diminuição da produção de saliva (VADOVICS *et al.*, 2022). As manifestações orofaríngeas da candidíase podem ser agudas ou crônicas. A candidíase aguda apresenta-se sob as formas pseudomembranosa e eritematosa, enquanto que a forma crônica da doença é conhecida como atrófica (RODRÍGUEZ-FUENTES *et al.*, 2022).

A candidíase pseudomembranosa é caracterizada pela presença de placas ou nódulos branco-amarelados, de consistência mole a gelatinosa, localizados na mucosa bucal, no palato, na orofaringe ou na língua. Em relação à candidíase eritematosa, ela pode ocorrer independente ou simultaneamente à forma pseudomembranosa. Em ambos os casos, o paciente relata sensibilidade intensa, devido às numerosas erosões dispersas na mucosa (RODRÍGUEZ-FUENTES *et al.*, 2022; RIERA *et al.*, 2022).

A candidíase atrófica crônica ocorre em pessoas que usam próteses totais superiores. Por esse motivo, essa lesão também é denominada como “estomatite por dentadura”. Nesse tipo de lesão, é comum que o palato se encontre hiperemiado e doloroso (RODRÍGUEZ-FUENTES *et al.*, 2022; RIERA *et al.*, 2022).

Dentre as espécies, *Candida albicans* é a principal causadora de candidíase oral. Outras espécies também podem ser patogênicas, como *C. glabrata*, *C.*

parapsilosis, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondi* e *C. tropicalis* (FUNAHARA *et al.*, 2022).

O diagnóstico da candidíase oral é estabelecido através de exame físico acurado, porém a citologia esfoliativa também é útil para a identificação de hifas e leveduras. O tratamento é feito à base de antifúngicos, e o prognóstico é favorável na maioria dos casos, porém, se não for devidamente tratada, pode evoluir para quadros clínicos crônicos, invadir outros tecidos e até mesmo causar uma infecção sistêmica. Além disso, a candidíase oral associada ao tratamento antineoplásico pode aumentar sintomatologia e a resistência, de fungos do gênero *Candida*, aos antifúngicos convencionais (SOUTOME *et al.*, 2022).

3.2 Administração Oral de Fármacos

3.2.1 Anatomia e Histologia da Cavidade Oral

A cavidade oral é a parte inicial do sistema digestório. Localiza-se no terço inferior da face e comunica-se com o exterior pela abertura oral e com a parte oral da faringe (orofaringe) através de uma abertura ampla denominada istmo da garganta. A cavidade da boca tem como limites anterior e lateralmente os lábios e bochechas; posterior, o istmo da garganta, superior, o palato e inferiormente o assoalho da boca, onde encontra-se a língua (Figura 3). São formações limitantes da cavidade da boca: os lábios, bochechas, palato, assoalho e istmo da garganta (MADEIRA; LEITE; RIZZOLO, 2016).

A mucosa oral é formada por duas camadas de tecido de origens embriológicas distintas, a saber, o epitélio e a lâmina própria. O epitélio pode ser do tipo não-queratinizado, para-queratinizado ou queratinizado, e é classificado como estratificado pavimentoso. O tecido conjuntivo que forma a lâmina própria é composto por fibras colágenas, fibroblastos, células que fazem parte do sistema imunológico, vasos sanguíneos e nervos. Os dois tecidos interagem por meio das papilas conjuntivas da lâmina própria e as cristas epiteliais que se formam no epitélio subjacente (ANDRETTO *et al.*, 2021).

A mucosa da cavidade bucal é dividida em mastigatória, de revestimento e especializada. A divisão da mucosa em três grandes grupos está relacionada ao tipo de epitélio que reveste o tecido conjuntivo subjacente. Nas regiões nas quais ocorrem

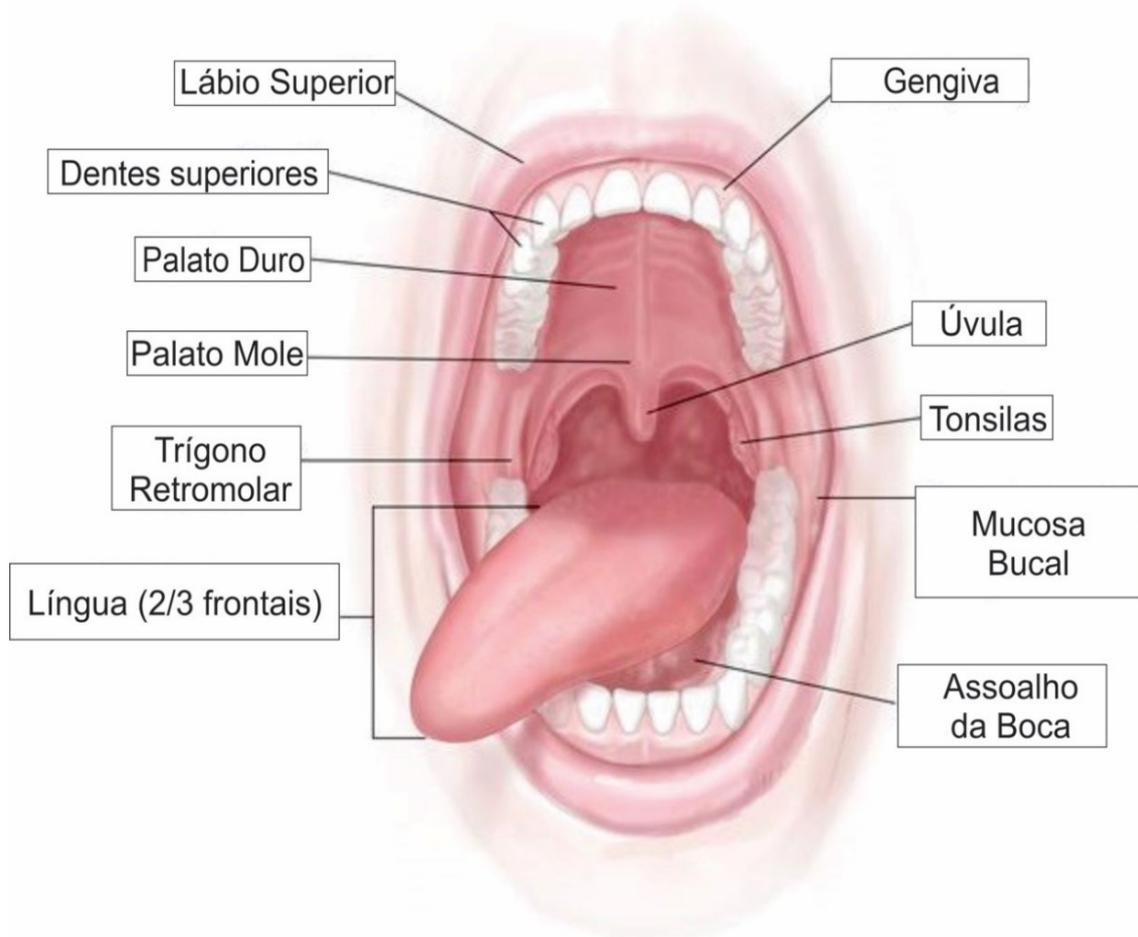
maiores impactos pela mastigação, a mucosa deve ser mais firme e resistente e, portanto, recoberta por um epitélio que pode variar entre o paraqueratinizado e o queratinizado. A mucosa mastigatória estende-se sobre a região do palato duro e gengiva que circunda os dentes inferiores e superiores. O epitélio que reveste o palato duro é do tipo queratinizado e está sobreposto a uma lâmina própria rica em tecido conjuntivo fibroso. Com exceção da região da rafe palatina, na qual a lâmina própria está diretamente inserida sobre o periósteo, existe uma extensa camada de submucosa entre o osso e a lâmina própria (BHUTANI; BASU; MAJUMDAR, 2021).

Nas áreas onde a demanda mastigatória não é tão grande, o epitélio de revestimento é normalmente bastante fino e composto por células não queratinizadas. A mucosa de revestimento é composta pela mucosa que reveste internamente os lábios e a bochecha, o ventre da língua, o assoalho da cavidade bucal, o palato mole e parte da porção lingual do processo alveolar mandibular. Tem como característica apresentar uma fina camada de tecido epitelial recobrimo uma lâmina própria altamente vascularizada e menos fibrosa quando comparada à lâmina própria da mucosa mastigatória. Recobre essencialmente tecido muscular e, em função dessa característica, apresenta certa flexibilidade (GEBRI *et al.*, 2020).

A região da língua distingue-se das demais áreas da cavidade bucal por apresentar uma grande quantidade de botões gustativos. Por esta razão, a região do dorso da língua é classificada como mucosa especializada e protege a musculatura lingual e, nos 2/3 anteriores da língua, as papilas filiformes e fungiformes, são recobertas por epitélio queratinizado e não queratinizado, respectivamente (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAN; 2004).

As camadas celulares da mucosa bucal contêm grânulos de revestimento de membrana (MCGs), que são esféricos ou organelas ovais com 100–300 nm de diâmetro. Os MCGs parecem fundir-se com as membranas celulares e expulsar seu conteúdo, principalmente lipídios, para o espaço intercelular (BLAKAJ *et al.*, 2019).

Figura 3 - Anatomia da cavidade oral



Fonte: Madeira, Leite e Rizzolo (2016)

3.2.2 A Via Bucal Para Administração de Fármacos

A via bucal é estudada há muitos anos como local de administração de fármacos tanto para distribuição via circulação sistêmica, como para o tratamento tópico. A via bucal pode ser considerada uma alternativa à via oral convencional, uma vez que oferece vantagens sobre as rotas convencionais de administração de medicamentos (SHIRVAN; BASHARI; HEMMATINEJAD, 2019).

Em algumas regiões a via é caracterizada por um alto suprimento sanguíneo, o que garante a biodisponibilidade sistêmica, evitando o metabolismo hepático de primeira passagem e a degradação enzimática do fármaco, permite um rápido início dos efeitos sistêmicos e possibilita maior adesão ao tratamento pelo paciente, principalmente pela facilidade de administração (SANDRI *et al.*, 2020).

Além disso, a taxa de absorção do fármaco quando administrado por via bucal não é influenciada pela taxa de esvaziamento gástrico observada na administração

oral e a fácil remoção do sistema de liberação é considerado um fator importante para redução de efeitos irritantes ou toxicidade local (ANSARI; SADARANI; MAJUMDAR, 2018).

A mucosa bucal é considerada uma barreira de permeabilidade, imposta principalmente pela membrana epitelial que atua como uma camada protetora que impede à entrada de materiais estranhos e microorganismos. No entanto, a sua permeabilidade é de 4 a 4000 vezes maior que a da pele, o que a torna uma via promissora para a administração de fármacos (CAMPOS *et al.*, 2018).

A administração de fármacos através da via bucal envolve principalmente o epitélio não queratinizado, de forma que as mucosas gengivais e o palato não devem ser utilizados para administração visando a ação sistêmica. Embora a mucosa sublingual seja mais permeável e delgada, com alta vascularização, é geralmente utilizada para o tratamento de condições sintomáticas agudas, uma vez que possibilita rápido início da absorção do fármaco. Porém, a mucosa sublingual não é adequada para terapias prolongadas, pois sua superfície é constantemente lavada pela saliva e o cisalhamento da língua não permite que a forma farmacêutica permaneça no local da aplicação e mantenha o contato com a mucosa (ANDRETTO *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de sistemas de liberação oral de fármacos depende da compreensão da anatomofisiologia da cavidade oral, e avaliação de formulação capaz de superar as limitações e explorar as vantagens desta via. A Tabela 2 resume as características mais relevantes da cavidade oral que influenciam a administração do medicamento pela via bucal.

Tabela 2 - Fatores que interferem na liberação de fármacos na cavidade oral

Fatores	Vantagens	Desvantagens
Saliva	<ul style="list-style-type: none"> - Dissolve fármacos; - Promove a hidratação do sistema de liberação do fármaco; - Possui menos mucina e menor atividade enzimática que a mucosa do trato gastrointestinal. 	<ul style="list-style-type: none"> - Deglutição e secreção constante podem remover precocemente o fármaco do seu local de absorção; - Movimentação da saliva dificulta a interação do fármaco com a mucosa bucal.
Mucosa Sublingual, palato duro e mole, bochecha e gengivas	<ul style="list-style-type: none"> - Disponível para absorção de fármacos. 	<ul style="list-style-type: none"> - O movimento da língua durante a fala ou deglutição podem remover a forma farmacêutica.
pH ~ 6.0	<ul style="list-style-type: none"> - O pH ligeiramente ácido da saliva aumenta a dissolução de fármacos que são ácidos fracos, aumentando sua absorção; - Fácil modificação do valor de pH na cavidade bucal. 	<ul style="list-style-type: none"> - O pH bucal pode desestabilizar o fármaco ou levar a liberação antes do previsto.
Mucosa queratinizada	<ul style="list-style-type: none"> - A baixa permeabilidade garante efeito local de fármacos altamente potentes. 	<ul style="list-style-type: none"> - É uma barreira para a absorção de fármacos.
Mucosa não queratinizada	<ul style="list-style-type: none"> - Mais permeável do que a mucosa queratinizada (como a mucosa bucal e a área sublingual). 	<ul style="list-style-type: none"> - Permite obter altas concentrações plasmáticas de fármacos, aumentando a possibilidade de efeitos colaterais potenciais.
Cavidade Oral	<ul style="list-style-type: none"> - Via de administração acessível. 	<ul style="list-style-type: none"> - É relativamente espessa e a absorção pode ser baixa dependendo do sistema de liberação escolhido.
Camada Superficial	<ul style="list-style-type: none"> - Grande o suficiente para permitir a absorção de fármacos que apresentem adequadas propriedades físico-químicas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor vascularização do que outras vias de administração de fármacos.

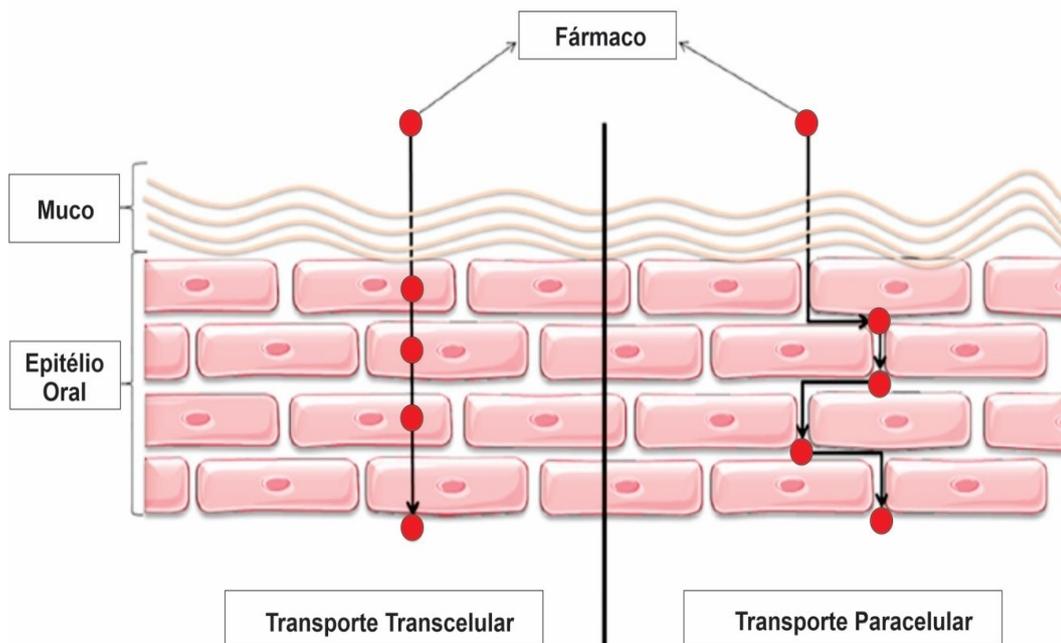
Fonte: Macedo *et al.* (2020); Andretto *et al.* (2021)

O tempo de permanência da formulação no meio bucal pode ser alterado pela deglutição acidental dos sistemas de liberação, e pela regular produção de saliva que dilui constantemente a substância ativa, o que pode gerar diminuição na distribuição do fármaco. O cisalhamento na cavidade oral, provocado pela mastigação de alimentos, deglutição ou até mesmo pela fala, podem impedir a bioadesão de dispositivos de liberação de medicamentos à mucosa bucal, diminuindo a sua eficácia (QIN *et al.*, 2019).

Em contrapartida, a mucosa na região da bochecha apesar de ser menos permeável, a sua superfície sofre menor interferência de agentes como saliva e movimentos bucais, que outras regiões da cavidade oral e pode ser empregada preferencialmente para administração de medicamento para efeitos locais, através de sistemas de liberação que necessitem aderir a mucosa por determinados períodos de tempo.

O principal mecanismo envolvido na permeação dos fármacos nas mucosas orais é a difusão passiva pelas membranas lipídicas através da via paracelular ou da via transcelular. A via paracelular envolve o transporte de fármacos através dos espaços intercelulares das células, enquanto a via transcelular refere-se a passagem através das células (Figura 4).

Figura 4 - Mecanismos biológicos de transporte de fármacos



Fonte: Adaptado de Muheem *et al.* (2016)

A natureza hidrofílica dos espaços intercelulares e citoplasmáticos promove uma barreira para a permeabilidade dos fármacos lipofílicos, no entanto, pode ser favorável para o transporte dos fármacos hidrofílicos. Em contrapartida, a via transcelular é preferencialmente utilizada para fármacos que conseguem penetrar através da membrana celular lipofílica, até atingirem a circulação sistêmica (CHEN *et al.*, 2018a).

Pode-se então dizer que os espaços intercelulares apresentam-se como a principal barreira à penetração de compostos lipofílicos e, a membrana celular como a principal barreira para o transporte de compostos hidrofílicos (BHUTANI; BASU; MAJUMDAR, 2021). Contudo, os fármacos podem utilizar ambas as vias simultaneamente, sendo uma sempre preferencial em relação à outra, dependendo de suas propriedades físico-químicas.

Do ponto de vista dinâmico, os fármacos difundem-se através da via que lhes oferece menor resistência. Quanto menor o coeficiente de partição, mais hidrofílico é o fármaco e, conseqüentemente, menor será a sua permeabilidade, considerando o mecanismo de difusão passiva transcelular. Outro aspecto importante a considerar é a massa molar, uma vez que, quanto maior, mais dificilmente este será solubilizado e permeado pela via paracelular. Contudo, a via transcelular vem apresentando excelentes resultados de permeabilidade para derivados de peptídeos e para complexos imunobiológicos, apesar do tamanho das moléculas, pois não ocorre degradação a partir de variação de pH e menor atividade enzimática na cavidade bucal quando comparada à mucosa gastrintestinal (PATEL; LIU; BROWN, 2012).

Embora a difusão passiva seja o principal mecanismo de transporte para a penetração de fármacos através da mucosa oral, a absorção de certos nutrientes a partir da cavidade oral pode envolver outros sistemas de transporte denominado transporte mediado por transportador, porém ocorrem em menor escala e dependem da concentração e da afinidade do fármaco pelo transportador. Contudo, existem poucos relatos sobre transportadores específicos presentes na mucosa bucal.

3.2.3 Mucoadesão

3.2.3.1 Teorias da mucoadesão

Um dos principais fatores para garantir a eficácia terapêutica do sistema de liberação de fármacos é a adequada adesão à mucosa bucal, chamada de bioadesão. A bioadesão pode ser definida como o estado no qual dois materiais, pelo menos um de natureza biológica, são mantidos juntos por um determinado período de tempo, por meio de forças interfaciais. Sistemas bioadesivos aplicados em mucosas frequentemente são definidos como mucoadesivos (ZHAO *et al.*, 2022).

Para ocorrer o fenômeno da mucoadesão é necessária uma sequência de eventos, intensidade da força mucoadesiva e da natureza do polímero. A primeira etapa envolve o contato entre o sistema mucoadesivo e a camada de muco, que requer umedecimento da superfície do polímero ou a intumescência do sistema (SHIPP *et al.*, 2022).

Na segunda fase, após estabelecida a conexão, ocorre a penetração do polímero mucoadesivo em fendas da superfície da mucosa ou interpenetração das cadeias poliméricas e estabelecem-se novas ligações químicas entre o muco e o polímero mucoadesivo (SHAKYA *et al.*, 2011; RUSSO *et al.*, 2016).

A mucoadesão ocorre a partir do estabelecimento de ligações das moléculas do sistema com a superfície da mucosa e estas podem ser classificadas principalmente em dois tipos de ligações:

a) Ligações químicas primárias fortes: basicamente são as covalentes, que consistem no compartilhamento de elétrons dos átomos para sua formação.

b) Ligações químicas secundárias fracas: são as iônicas, ligações de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas. Estas forças secundárias apesar de individualmente apresentarem caráter muito fraco, quando somadas, conduzem à fortes adesões, uma vez que se produz numerosos locais de interação (BODDUPALLI *et al.*, 2010).

Muitas teorias têm sido propostas para explicar as forças que mantêm a mucoadesão, no entanto, uma vez que se trata de um mecanismo complexo, não existe nenhuma teoria universalmente aceita e que elucide completamente o fenômeno. Várias teorias podem complementar-se na tentativa de esclarecer o mecanismo da formação de ligações mucoadesivas, entre estas se destacam:

1) Teoria eletrônica: a teoria eletrônica supõe que o material mucoadesivo e o material biológico alvo apresentam estruturas eletrônicas diferentes (ZAHIR-JOUZDANI *et al.*, 2018). Quando estas duas superfícies entram em contato, ocorre a transferência de elétrons, resultando na formação de uma dupla camada de carga elétrica na sua interface. A força de interação parece estar presente devido às forças atrativas resultantes da dupla camada elétrica.

2) Teoria da adsorção: a teoria de adsorção pressupõe que a formação de interações adesivas entre o polímero e a membrana mucosa ocorre por ação de forças secundárias fracas. Apesar de individualmente apresentarem um caráter fraco, o

conjunto destas interações resulta na maioria dos casos em uma força mucoadesiva intensa (ZAHIR-JOUZDANI *et al.*, 2018).

3) Teoria da molhabilidade: a teoria da molhabilidade pode ser utilizada principalmente a sistemas mucoadesivos líquidos ou semissólidos e avalia a capacidade de um polímero mucoadesivo se estender ao longo da superfície biológica. Esta teoria permite calcular o coeficiente de difusão e avaliar a intensidade da ligação mucoadesiva (ZAHIR-JOUZDANI *et al.*, 2018).

4) Teoria da difusão: a teoria da difusão considera o conceito de interpenetração e enrolamento das cadeias do polímero mucoadesivo e das cadeias poliméricas do muco e a partir destes fenômenos se desenvolve ligação adesiva semipermanente (ZAHIR-JOUZDANI *et al.*, 2018).

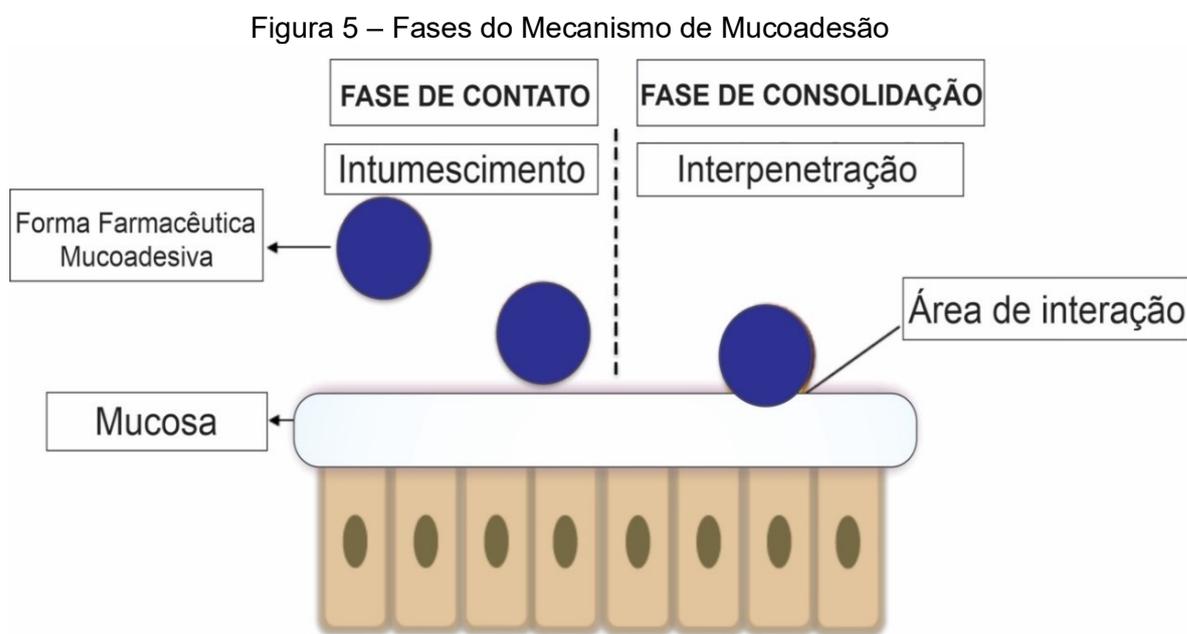
5) Teoria da fratura: na teoria da fratura, a força de adesão relaciona-se com a força necessária para que ocorra a separação das duas superfícies envolvidas através das forças mucoadesivas. Esta teoria considera a força necessária para separar os materiais, e não tem em conta a difusão ou a interpenetração das cadeias de polímero. Dessa forma, a teoria da fratura auxilia para calcular a força necessária para a fratura das ligações adesivas que envolvem materiais mucoadesivos rígidos ou semirrígidos, nos quais as cadeias de polímero não penetram na camada de muco (BODDUPALLI *et al.*, 2010; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005).

3.2.3.2 Mecanismos da mucoadesão

Conforme visto na seção anterior, várias teorias têm sido propostas para explicar o mecanismo da mucoadesão e sabe-se que uma ou mais teorias podem complementar-se para elucidar o fenômeno da formação de ligações bioadesivas. Contudo, a mucoadesão pode ser descrita como um fenômeno que ocorre basicamente em duas etapas: a fase de contato e a fase de consolidação (Figura 5). Na fase de contato se estabelece o contato íntimo entre o polímero bioadesivo e a membrana mucosa e na fase de consolidação ocorrem interações físico-químicas que irão contribuir para a formação da ligação bioadesiva duradoura (RUSSO *et al.*, 2016).

Para estimular o mecanismo de mucoadesão e, para que as etapas de contato e consolidação ocorram, é imprescindível a prévia hidratação do polímero mucoadesivo, deve ocorrer o intumescimento e dessa forma, dá-se a transferência de água da camada de muco para o polímero, fenômeno designado por *swelling*. A

hidratação é determinante para que ocorra desenrolamento e interpenetração das cadeias poliméricas na rede glicoproteica de muco, existente na superfície das mucosas (ZAHIR-JOUZDANI *et al.*, 2018).



Fonte: Adaptado de Mazzarino, Borsali e Senna (2014)

Atualmente são aceitas duas teorias que definem a etapa de consolidação: a teoria da interpenetração e a teoria da desidratação. A teoria da interpenetração baseia-se no fenômeno da difusão, em que moléculas mucoadesivas e as glicoproteínas do muco interagem por meio da interpenetração das suas cadeias resultando em ligações secundárias intermoleculares. De acordo com a teoria da desidratação, quando um material com uma elevada capacidade de gelificação é colocado em ambiente aquoso em contato com outro gel, ocorre movimentação da água entre ambos os materiais até que seja atingido equilíbrio (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

3.2.4 Polímeros Bioadesivos

Os polímeros fazem parte da composição de inúmeros produtos utilizados no nosso cotidiano e representam uma classe de materiais extremamente versáteis, apresentando inúmeras aplicações, entre as quais, o desenvolvimento de formas farmacêuticas (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Os polímeros mucoadesivos são macromoléculas hidrofílicas com numerosos grupos funcionais, carboxílicos, hidroxilas, amidas e aminas, capazes de estabelecer ligações químicas primárias fortes e/ou secundárias fracas, quando hidratados e intumescidos em contato com uma solução aquosa. A hidratação é etapa primordial para que o polímero adquira propriedades adesivas, porém quando em excesso pode originar mucilagem fluída ocasionando diminuição das propriedades adesivas (MUPPALANENI; MASTROPIETRO; OMIDIAN, 2013).

De forma geral, os polímeros mucoadesivos podem classificar-se quanto à sua origem, em naturais ou sintéticos, quanto à sua solubilidade em água, em solúveis ou insolúveis, quanto à sua carga iônica, em catiônicos, aniônicos ou não iônicos e podem, ainda, ser chamados como polímeros de primeira geração ou segunda geração (H.R. *et al.*, 2019).

A escolha criteriosa do polímero é etapa fundamental para o sucesso do sistema mucoadesivo desenvolvido, uma vez que as propriedades mucoadesivas devem ocorrer tanto no estado sólido como no estado líquido, pois não devem ser afetadas pelas condições de hidratação da cavidade oral, nem pelas condições hidrodinâmicas, presença de alimentos ou alterações de pH. Entre as várias especificações necessárias, são consideradas de maior relevância as listadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Especificações dos polímeros ideais para desenvolvimento de mucoadesivo

1. Adequada tensão superficial	8. Natureza predominantemente aniônica
2. Elevada massa molar (> 100 000 g/mol)	9. Flexibilidade adequada
3. Conformação preferencialmente linear	10. O polímero e os seus produtos de degradação não devem ser tóxicos
4. Não irritantes para as mucosas	11. Não devem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal
5. Devem aderir rapidamente ao tecido úmido	12. Devem possuir alguma especificidade local
6. Não devem se decompor durante o tempo de armazenamento da forma farmacêutica	13. Devem permitir uma fácil incorporação do fármaco
7. Não devem causar qualquer impedimento à liberação do fármaco	14. Devem apresentar custo acessível

Fonte: Carvalho, Chorilli e Gremião (2014).

Os polímeros considerados de primeira geração aderem à mucosa através do estabelecimento de ligações não específicas, logo, não apresentam seletividade na adesão a diferentes regiões do trato gastrointestinal a partir da administração oral.

Contudo, as propriedades fisiológicas do trato gastrointestinal como pH, renovação do muco, volume de fluidos, viscosidade, entre outros, podem influenciar o perfil mucoadesivo destes materiais (RITA; FIGUEIRAS; COIMBRA, 2016).

Os polímeros mucoadesivos de segunda geração foram desenvolvidos na tentativa de melhorar a capacidade e especificidade mucoadesiva. São enquadrados nesta categoria os polímeros que possuem as seguintes características: incorporação de fármacos solúveis em água e/ou óleo permitindo a administração prolongada do fármaco; inibição enzimática local, capacidade de ligação específica a um alvo celular; estímulo a endocitose e elevada margem de segurança em nível local e sistêmico (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

3.2.5 Membranas Bioadesivas Para Liberação Bucal de Fármacos

As formas farmacêuticas mucoadesivas bucais são consideradas alternativas aos medicamentos orais convencionais, porém, para o seu desenvolvimento, algumas características importantes devem ser levadas em consideração, como tempo de permanência da formulação na cavidade oral, a deglutição, a produção de saliva e a mucoadesão (SATTAR; SAYED; LANE, 2014).

Os filmes mucoadesivos bucais podem ser definidos como formas farmacêuticas de uma ou mais camadas, que são fixados na mucosa bucal e liberam o fármaco para ação local ou sistêmica, de forma rápida, controlada ou retardada e são muito bem aceitos pelos pacientes, uma vez que as formulações apresentam tamanho e espessura reduzidos, são fáceis de transportar e manusear, facilmente removíveis se necessário, podem ser administradas sem água e são adequadas em casos em que haja dificuldades de deglutição (AMARAL *et al.*, 2020).

Um sistema ideal para administração bucal deve ser de fácil aplicação, resistir à ação da saliva, aos movimentos da língua e a deglutição. Além disso, o sistema deve ser suficientemente hidrofílico para permitir a adesão e o íntimo contato com a mucosa oral, porém com uma hidratação limitada para manter a coesão. Também deve possuir mecanismos para resistir à cargas de tração e cisalhamento evitando ou retardando sua eliminação do local de ação e deve proteger o fármaco da degradação enzimática devido à presença de saliva ou microrganismos (TARDELLI, 2010).

Os sistemas mucoadesivos podem ser produzidos visando permitir intervalos de administração mais espaçados, mantendo-se o sistema em contato com a mucosa,

por períodos prolongados. A concentração do fármaco no sistema mucoadesivo deve ser adequada à sua potência, para que sejam alcançadas as doses terapêuticas desejáveis. Por outro lado, este sistema não deve causar qualquer irritação ou inconveniência para o paciente e deve interferir minimamente com as funções normais, como a fala e a deglutição (BHUTANI; BASU; MAJUMDAR, 2021).

No entanto, a baixa permeação do fármaco pela mucosa bucal é uma das principais barreiras das formulações, causando baixa biodisponibilidade e eficácia. Nessa perspectiva o estudo e os avanços da nanotecnologia vêm fornecendo ferramentas para superar essas limitações e entre as técnicas utilizadas para a obtenção de nanosistemas, destaca-se a eletrofiação. Em particular, os nanosistemas eletrofiados podem aumentar permeação do fármaco através da mucosa bucal, uma vez que a taxa de dissolução de um fármaco aumenta com o aumento da área superficial e, podem ainda, evitar a degradação e promover a liberação diretamente no local de ação (MERCANTE *et al.*, 2021).

3.3 Eletrofiação

3.3.1 Processo de Eletrofiação

A técnica de eletrofiação (ou fiação eletrostática) ganhou grande notoriedade nas últimas décadas, principalmente pela sua capacidade de produção de materiais constituídos por nanofibras (COSTA *et al.*, 2012a). As nanofibras dão origem a membranas e apresentam características como, elevada área de superfície específica, alta porosidade e interconectividade, tornando-as adequadas em várias aplicações biomédicas, inclusive na obtenção de sistemas mucoadesivos de liberação de fármacos (CHEN *et al.*, 2018a).

O método de eletrofiação foi inicialmente proposto por Formhal, em 1938, porém, somente a partir de 1964, Sir Geoffrey Ingram Taylor estudou e contribuiu com a área de mecânica de fluidos submetidos ao efeito de um campo elétrico, elaborando uma base teórica conhecida como cone de Taylor. Considerou o modelamento matemático de um cone, que se forma através da gota no fluido que está sob o efeito de uma diferença de potencial de alta tensão (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

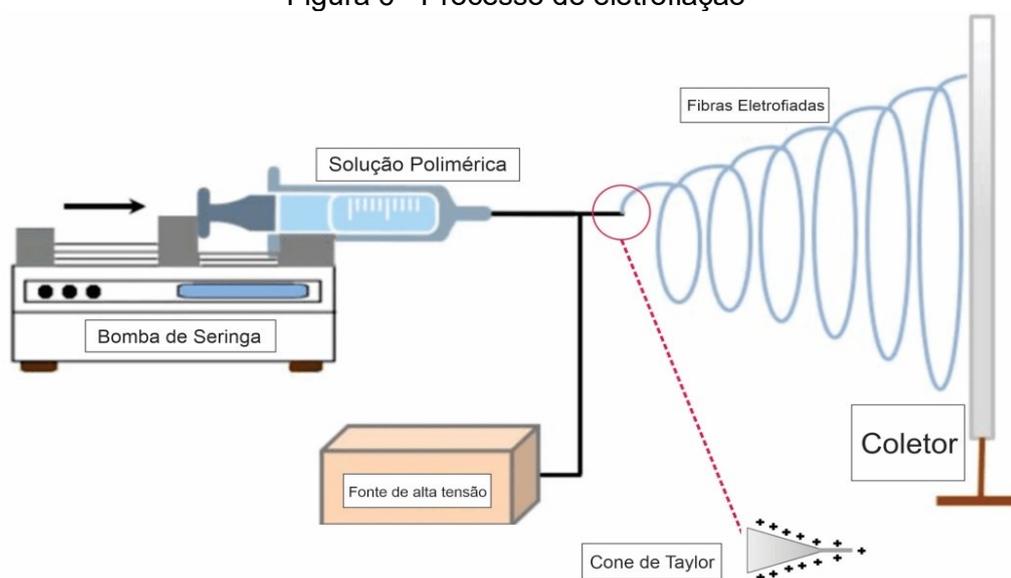
O método foi então retomado em 1995 por Reneker e Doshi e tem sido extensivamente estudado para a produção de diversos tipos de nanofibras ou nanofios

de diferentes polímeros permitindo produzir fibras submicrométricas com diâmetros variando entre 10 nm a 10 μm que resultam na formação de tecidos não tecidos (TNT) ou membranas poliméricas (COSTA *et al.*, 2012a).

A eletrofiação é uma técnica de execução simples, na qual se aplica um campo elétrico de alta tensão e baixa corrente entre uma placa coletora e a agulha do aparato, instalado transversalmente a uma determinada distância da placa coletora. O equipamento consiste de uma fonte de alta tensão, uma bomba de infusão com seringa, com controle automático de fluxo da solução polimérica, e um coletor metálico aterrado (Figura 6) (SOFI *et al.*, 2020).

As membranas eletrofiadas apresentam elevada área de superfície, podem ser produzidas em várias formas e tamanhos e o controle da composição das nanofibras permite estabelecer propriedades e funcionalidades específicas (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Além disso, podem ser fabricadas com uma grande variedade de polímeros (SILVA *et al.*, 2015).

Figura 6 - Processo de eletrofiação



Fonte: Adaptado de Sill e Von Recum (2008)

A solução polimérica é mantida inicialmente pela sua tensão superficial, na extremidade da agulha conectada na seringa, na forma de gota. A superfície da gota se alonga com o aumento da tensão elétrica para formar o cone de Taylor (COSTA *et al.*, 2012a). Quando as forças eletrostáticas, de ação repulsiva, superam a tensão superficial, de ação coesiva, um jato carregado da solução na extremidade do cone é ejetado e atraído pelo coletor. Na ponta da agulha, o jato permanece estável, porém,

essa estabilidade é alterada quando o jato se direciona ao coletor. Durante essa trajetória, ocorre evaporação do solvente e precipitação do polímero, o que dá origem a uma membrana de fibras de diâmetros submicrométricos (COSTA *et al.*, 2012b).

O processo de eletrofiação depende de vários parâmetros que desempenham um importante papel no processo de geração das nanofibras e o ajuste destes permite a obtenção de fibras com dimensões e qualidade diversas (ALAZAB *et al.*, 2017).

Os parâmetros da técnica de eletrofiação são classificados em parâmetros da solução, parâmetros ambientais e parâmetros do processo. Em relação aos parâmetros da solução destacam-se a massa molar do polímero, a viscosidade da solução, a tensão superficial e a condutividade iônica. Já, os parâmetros ambientais a considerar são temperatura do ambiente e umidade relativa do ar e os parâmetros do processo são a tensão utilizada, vazão da solução na bomba de seringa, diâmetro da agulha, distância da ponta da agulha até o coletor.

3.3.2 Parâmetros de Processamento ou Condições Operacionais

Para se obter nanofibras com morfologia e diâmetros adequados, faz-se necessário ajustar os parâmetros do processo na técnica da eletrofiação. Dentre as principais condições operacionais que requerem ajustes destacam-se a tensão elétrica, a distância do coletor, a vazão da solução e efeito do tipo de coletor (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

A tensão induz a carga necessária na solução iniciando o processo de eletrofiação, o que a torna um parâmetro de extrema importância, sendo que valores típicos se situam na faixa de 5 a 30 kV. Em geral tensões superiores a 6 kV já são suficientes para superar a tensão superficial da gota e formar o cone de Taylor, no entanto deve ser ajustada para cada sistema polímero/solvente, tendo em vista que influencia na formação das fibras e no diâmetro das mesmas (AL-HAZEEM, 2018).

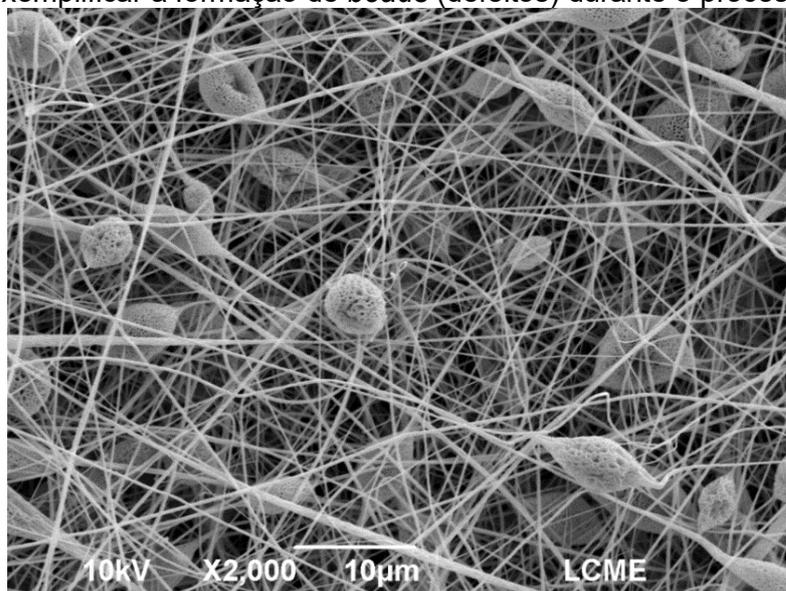
Tensões elevadas promovem o estiramento da solução, esse efeito gera redução do diâmetro da fibra e evaporação mais rápida do solvente, contudo também pode levar à formação de imperfeições pela maior instabilidade do jato. O campo elétrico formado pode interferir também na ordenação das moléculas, de modo a induzir uma maior cristalinidade em polímeros cristalizáveis (CHEN *et al.*, 2018b).

A distância entre a ponta do bico injetor e o coletor é outra variável que influencia no diâmetro médio e na morfologia das fibras eletrofiadas. Também

denominada distância de trabalho, deve ter um valor mínimo para garantir a total evaporação do solvente, antes da fibra atingir o coletor, e um valor máximo para que o campo elétrico seja efetivo na estabilização do cone de Taylor e, conseqüentemente, na formação das nanofibras. Distâncias maiores ou menores que o necessário, tendem a originar defeitos, também denominados *beads* (Figura 7) nas fibras eletrofiadas (ALAZAB *et al.*, 2017).

Para o coeficiente de vazão, de forma geral, o aumento deste gera maior produtividade, mas pode resultar no aumento do diâmetro das nanofibras, no aumento da porosidade e em algumas situações, na formação de *beads*. Uma taxa de fluxo alta normalmente dificulta a evaporação do solvente, o que pode levar a secagem incompleta. Normalmente baixas vazões são desejadas pois permitem evaporação completa do solvente e resultam em nanofibras com diâmetros menores, o que é ocasionado pelo aumento da densidade de carga volumétrica. Em altas taxas de fluxo a corrente no jato é aumentada enquanto a densidade de carga da superfície é diminuída, resultando em menos chicoteamento e alongamento (LALIA *et al.*, 2013).

Figura 7 - Imagem de micrografia de MEV de fibras de PLA eletrofiadas, a fim de exemplificar a formação de *beads* (defeitos) durante o processo



Fonte: Autoria própria

Considerando que a vazão de solução influencia na quantidade e velocidade de material que chega até a ponta da agulha é necessário que haja um fluxo contínuo e que seja estabelecido o intervalo de trabalho para os valores de fluxo de injeção de solução. Se o fluxo de solução for insuficiente, não haverá formação do cone de Taylor

e se o fluxo da solução for excessivo, as forças do campo elétrico não irão agir na orientação do jato, podendo formar gotículas ou *spray* no coletor e não fibras contínuas (DEEPAK; GOYAL; RATH, 2018).

Outro parâmetro que influencia no processo de eletrofiação, principalmente na morfologia das fibras, é o coletor utilizado. O coletor deve apresentar boa condutividade elétrica para não impedir a formação do campo elétrico entre a ponta da agulha e o coletor e, por isso, geralmente é constituído de alumínio. São descritos na literatura diversos tipos, formas e mecanismos para os coletores utilizados no processo de eletrofiação: fixo, coberto com folha de papel alumínio, coletor com superfície texturizada com tela de arame ou grade e coletores giratórios (FRENOT; CHRONAKIS, 2003; PORTER; HENSON; POPAT, 2009). A utilização de coletores giratórios permite o processamento por eletrofiação de fibras orientadas e o alinhamento destas está diretamente relacionado com a velocidade do disco giratório.

3.3.3 Parâmetros de Solução

Os parâmetros da solução como viscosidade, condutividade elétrica, tensão superficial e propriedades do solvente influenciam diretamente na morfologia e na geometria das nanofibras. Estes parâmetros estão relacionados com as propriedades físico-químicas dos polímeros, dos solventes e com as interações do tipo polímero-solvente (NISTA, 2012; DESTEFANO; KHAN; TABADA, 2020; MERCANTE *et al.*, 2021).

A concentração do polímero e, conseqüentemente, as propriedades viscoelásticas da solução, são parâmetros fundamentais na eletrofiação. Com o aumento da viscosidade e mantendo-se fixo os demais parâmetros do processo, existe probabilidade no aumento no diâmetro das fibras (FERREIRA, 2017).

Para se obter nanofibras uniformes é necessário que haja um grau de emaranhamento de cadeias na solução polimérica, que corresponda a um valor de concentração mínima. Se a eletrofiação ocorre em concentrações nas quais não existe um emaranhamento polimérico em solução, não ocorre o estiramento da fibra durante o processo, causando instabilidade capilar na extremidade do jato ocasionando o espalhamento eletrostático (*electrospraying*) e possibilitando a formação de defeitos (RUITER *et al.*, 2017).

A massa molar (MM) de um polímero também é fator que deve ser considerado, uma vez que soluções poliméricas que possuem baixa MM tendem a favorecer o aparecimento de defeitos e as soluções com MM altas, produzem fibras mais uniformes e com diâmetros médios maiores (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; LIU *et al.*, 2020; MERCANTE *et al.*, 2021). Com o aumento da massa molar, ocorre alteração no tamanho das cadeias poliméricas, afetando o emaranhamento entre elas, incrementando assim a viscosidade da solução.

Neste sentido, a viscosidade é uma propriedade que define o tamanho e morfologia das fibras. A obtenção de fibras poliméricas contínuas é muito difícil, quando eletrofiadas a partir de soluções com baixa viscosidade, porém, se a viscosidade for muito alta, existe um obstáculo na formação do jato durante processo de eletrofiação (FATTAHI; KHODDAMI; AVINC, 2019).

Outro parâmetro de solução a considerar é a condutividade iônica. A condutividade iônica da solução é estabelecida pela facilidade que essa tem em conduzir corrente elétrica. Depende diretamente do solvente e do polímero que está sendo utilizado. Em geral, a adição de um sal à solução faz com que a condutividade da solução aumente e tende a favorecer a formação de fibras mais finas e uniformes. Por outro lado, as fibras poliméricas eletrofiadas, obtidas a partir de soluções com baixa condutividade, não apresentam uniformidade devido ao surgimento de defeitos (YANG *et al.*, 2016a).

A tensão superficial está diretamente relacionada com a formação do cone de Taylor, pois este fenômeno ocorre quando a tensão aplicada é suficientemente alta para fazer com que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da gota. A partir desse valor de tensão, chamada de tensão crítica, inicia-se o processo de fiação (COSTA *et al.*, 2012b; DESTEFANO; KHAN; TABADA, 2020) .

A tensão superficial está associada com a natureza do solvente utilizado na solução polimérica, podendo ocorrer diminuição da tensão superficial da solução e obtenção de fibras com poucos ou sem defeitos. Contudo, o aumento da tensão superficial pode gerar a necessidade de se utilizar tensões mais altas para diminuir ou eliminar a presença de defeitos nas fibras eletrofiadas ou pode ocasionar instabilidade do jato na ponta da agulha, promovendo a formação de gotículas que serão lançadas até o coletor, sem formação de fibras contínuas (COSTA *et al.*, 2012b; SILVA; PAULA; BORGES, 2021).

A utilização de um solvente volátil como veículo para um determinado polímero em solução é um dos critérios fundamentais na eletrofição, pois determina em grande parte as propriedades da solução de eletrofição. A escolha do solvente é importante na determinação da concentração crítica mínima da solução que é variável de acordo com a solução polimérica. A concentração mínima permitir a transição do espalhamento eletrostático da eletrofição, que afeta significativamente a capacidade de fiação da solução e a morfologia das nanofibras. É importante que a solução a ser eletrofiada seja homogênea para que o processo seja estável e as nanofibras uniformes (SUN; BOLUK; AYRANCI, 2015).

Neste sentido, o ponto de ebulição do solvente é um parâmetro que deve ser considerado, pois afeta a taxa de evaporação deste durante o percurso do jato em direção ao coletor. Os solventes com ponto de ebulição muito alto provavelmente não evaporam completamente antes que o jato alcance o coletor e isso pode causar o achatamento das nanofibras após o impacto neste, resultando em morfologias de fibras tipo fita ou pode causar fusão de fibra no ponto de contato entre elas ou até mesmo perda completa da morfologia da fibra (LANNUTTI *et al.*, 2007). Em contrapartida, o uso de solventes com ponto de ebulição muito baixo pode causar evaporação muito rápida na ponta da agulha, causando obstrução da agulha e interrupção do processo de eletrofição (FATTAHI; KHODDAMI; AVINC, 2019).

3.3.4 Parâmetros Ambientais

Os parâmetros ambientais, como a temperatura, a umidade e a composição do ar, também podem influenciar na formação e na morfologia das nanofibras. Alguns autores constataram que o aumento da temperatura ambiente diminuiu o diâmetro das fibras eletrofiadas. A temperatura tem efeito na taxa de evaporação do solvente e, conseqüentemente, na viscosidade da solução. Assim, em temperaturas mais baixas, mais tempo leva para que o jato se solidifique, continuando o alongamento e produzindo fibras mais espessas (MERCANTE *et al.*, 2021). O segundo efeito da temperatura é a influência sobre a rigidez das cadeias poliméricas. As cadeias de polímero se movem mais livremente a temperaturas mais altas, resultando em menor viscosidade da solução e tensão superficial (COSTA *et al.*, 2012a; AMIRAH MD ZUBIR *et al.*, 2020).

A umidade relativa do ambiente também pode afetar o processo de eletrofiação, diminuindo a taxa de evaporação do solvente, favorecendo a formação de fibras mais finas. A umidade muito alta no ambiente de eletrofiação pode fazer com que o solvente não evapore completamente durante todo o processo ou que a água condense na superfície das fibras, formando poros circulares. A baixa taxa de evaporação do solvente pode levar também a fusão das nanofibras, aumentando o seu diâmetro médio (CHEN *et al.*, 2018b).

3.4 Nistatina

3.4.1 Características Químicas e Físico-químicas

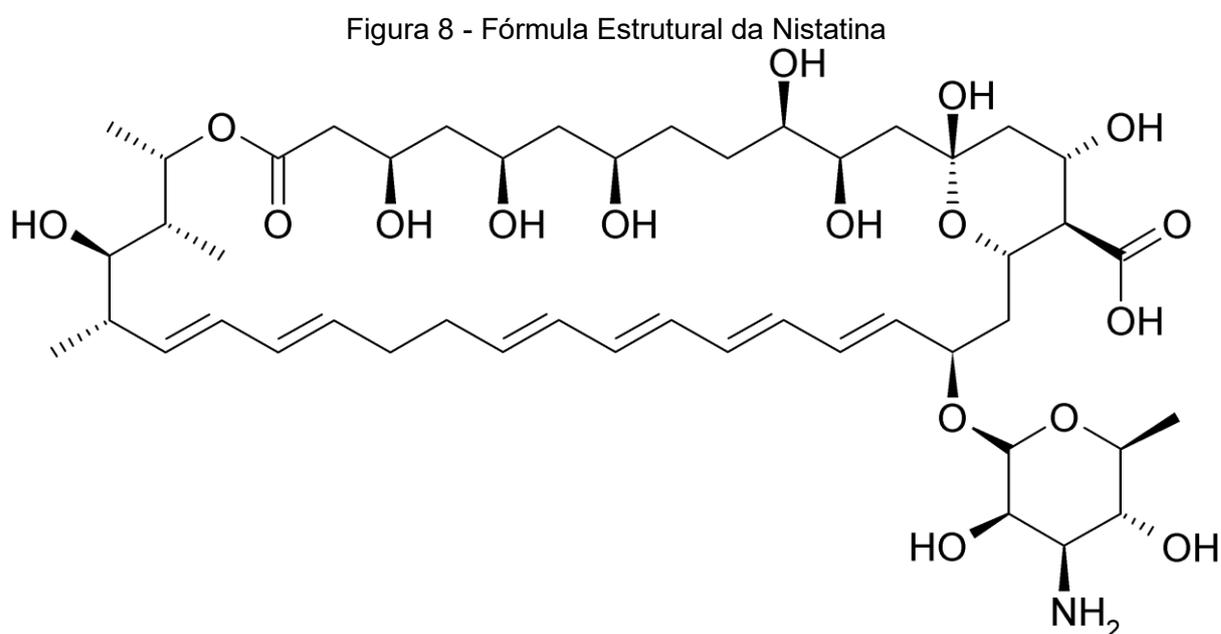
A nistatina (NYS) ($C_{47}H_{15}NO_{17}$) é um antifúngico extraído de culturas de *Streptomyces*, que foi descoberta em 1950 por Hazen e Brown, pesquisadoras dos Laboratórios de Pesquisas do Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque, EUA. A nistatina tem sido empregada na terapêutica por mais de 50 anos e pertence ao grupo dos polienos, classe de substâncias formadas por átomos de carbono com dupla ligação e, mais especificamente, do grupo dos tetraenos, que são polienos que apresentam quatro duplas ligações não-saturadas em sequência. Também é considerada um macrolídeo, uma vez que possui estrutura química grande e cíclica e uma molécula anfotérica e anfifílica devido a presença de grupos carboxílicos e amino e possui uma extremidade polar e outra apolar em sua molécula. O fármaco nistatina consiste na mistura de duas ou mais substâncias relacionadas e ativas biologicamente denominadas A1 ($C_{47}H_{75}NO_{17}$), A2 ($C_{47}H_{75}NO_{16}$) e A3 ($C_{53}H_{85}NO_{20}$), porém o principal composto do complexo é o A1, que apresenta em sua estrutura um amino açúcar ligado ao oxigênio do carbono-19 (SZOMEK *et al.*, 2021).

A nistatina é praticamente insolúvel em água, etanol, clorofórmio e em saliva, porém é bastante solúvel em dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO). Apresenta-se como um pó higroscópico, de coloração amarela a marrom claro e de odor semelhante a cereais. O pH da suspensão aquosa a 3 % m/v encontra-se entre 6,0 e 8,0. Soluções e suspensões aquosas de nistatina começam a perder a atividade após a preparação. Calor, luz e presença de oxigênio aceleram a sua decomposição, logo, o acondicionamento da nistatina (matéria-prima) deve ser em recipiente hermeticamente fechado, protegido da luz e a uma temperatura em torno de 2 a 8 °C.

3.4.2 Propriedades Farmacológicas

A nistatina (Figura 8) possui ampla atividade antifúngica, fungicida e/ou fungistática *in vitro*, inclusive mais ampla do que o principal membro desta classe de fármacos, a anfotericina B. É efetiva contra a maioria das infecções causadas pelas espécies de *Candida* spp., porém na prática médica é empregada apenas na profilaxia e tratamento de candidíases superficiais de pele e mucosas, além de demonstrar atividades contra *Aspergillus*, *Cryptococcus* e outros fungos (MARTIN-VILLENA *et al.*, 2013; RAI *et al.*, 2022).

O uso da nistatina é limitado por via tópica, uma vez que pertence a classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), o que representa baixa solubilidade e permeabilidade quando administrado pela via oral. Além disso, apresenta alta toxicidade quando administrada através da via parenteral e sua absorção é quase nula em pele intacta, membranas mucosas ou trato gastrointestinal.



Fonte: Szomek *et al.* (2021)

A ação antifúngica da nistatina ocorre através da sua interação com ergosterol, esterol presente na membrana plasmática das células fúngicas, o que gera uma desorganização funcional, devido à formação de canais transmembrana, por onde ocorre a saída de água e íons essenciais para a sobrevivência celular. Essas alterações levam à perda da permeabilidade seletiva das células fúngicas, ocasionando danos celulares e, posteriormente, morte celular.

A nistatina também se liga, mais fracamente, ao colesterol, outro tipo de esteroide, presente na membrana plasmática das células de mamíferos. Essa ligação pode provocar efeitos adversos e tóxicos. Dessa forma, a nistatina é muito tóxica quando administrada por via intramuscular ou intravenosa, pois é capaz de causar hemólise, necrose e abscessos nos locais da injeção, devido à sua ligação imediata com as membranas plasmáticas das hemácias, destruindo-as (TAVARES, 2001; GILMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2003; HADY *et al.*, 2022).

De acordo com suas características farmacológicas, a nistatina é empregada para uso tópico, mesmo quando usada por via oral, desenvolvendo um efeito superficial na mucosa oral e digestiva. Os efeitos adversos da nistatina, quando usada na forma tópica, são incomuns, podendo ocorrer episódios de náuseas, vômitos e diarreia. Muitas vezes as náuseas estão relacionadas ao sabor desagradável, que pode interferir na adesão ao tratamento pelo paciente.

Já existem trabalhos com formulações lipossômicas de nistatina, que permitem a sua administração pela via intravenosa devido à menor toxicidade e menos efeitos adversos (AMIR; LEVIN-KHALIFA; DVASH, 2022). Contudo, um número maior de estudos ainda precisa ser desenvolvido, tendo em vista que poucas pesquisas envolvendo novas formulações de nistatina encontram-se relatadas na literatura.

3.5 Poli (Ácido Láctico)

3.5.1 Características Químicas e Físico-químicas

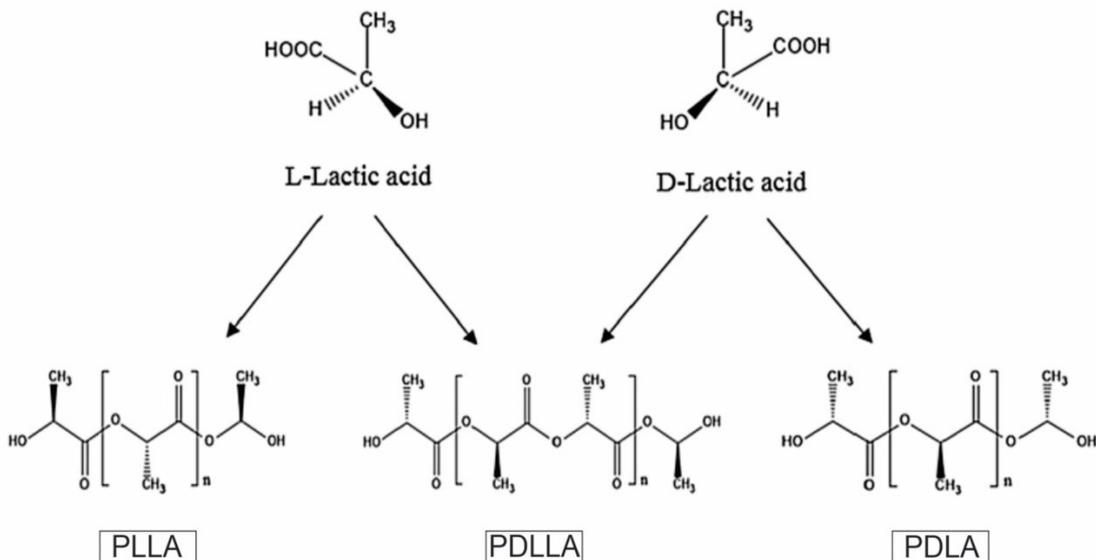
O PLA é um polímero hidrofóbico pertencente à família dos poliésteres alifáticos, com fórmula estrutural $C_3H_4O_2$ e é obtido a partir de monômeros de ácido láctico na fermentação do trigo, milho, batata, sacarose ou lactose. Além de ser derivado de recurso renovável, é biocompatível, biodegradável, reciclável e compostável. A primeira síntese registrada de PLA foi em 1932 por Wallace Carother nos laboratórios da DuPont. Os produtos de degradação do PLA não são tóxicos para os seres humanos e o meio ambiente e usa-se 25-55% menos energia para sua produção quando comparada à polímeros à base de petróleo (CASALINI *et al.*, 2019; DESTEFANO; KHAN; TABADA, 2020).

O PLA possui três isômeros: poli(ácido L-láctico) (PLLA), poli(ácido D-láctico) (PDLA) e poli(ácido DL-láctico) (PDLLA) (Figura 9). O PLA tem uma temperatura de

transição vítrea (T_g) de cerca de 60 °C e temperatura de fusão (T_m) no intervalo de 130-180 °C. A T_g e a T_m dependem da estrutura cristalina, da história térmica e da massa molar. Embora PDLLA seja um polímero amorfo, o PLLA e PDLA são polímeros semicristalinos que apresentam temperatura de fusão (T_m) em torno de 180 °C (DESTEFANO; KHAN; TABADA, 2020).

O PLA é degradado por hidrólise simples da ligação éster, produzindo uma redução sucessiva da massa molar, não havendo a necessidade da presença de enzimas para catalisarem sua hidrólise. A velocidade de degradação é dependente da cristalinidade do PLA, massa molar, morfologia, taxa de difusão da água dentro do polímero e conteúdo estereoisomérico. Sua degradação térmica ocorre em temperaturas acima de 200 °C e seus produtos de degradação não são tóxicos, o que contribui para a sua aplicação na área biomédica (LIU *et al.*, 2020).

Figura 9 - Isômeros do ácido polilático. PDLA, poli (D-ácido láctico); PDLLA, poli (D-L-ácido láctico); PLLA, poli (L-ácido láctico)



Fonte: Jonoobi *et al.* (2010)

3.5.2 Aplicações do Poli (Ácido Láctico)

O PLA vem sendo amplamente utilizado na área biomédica, em implantes (pinos, parafusos, etc.) por ser biodegradável, o PLA pode ser absorvido pelo corpo em um período de 6 meses a 2 anos. Essa propriedade é interessante por permitir uma recuperação gradual do paciente, sendo que em um implante com função de suporte, o polímero vai sendo absorvido pelo corpo, conforme ocorre a regeneração

do tecido. A biodegradabilidade do PLA se deve ao fato do mesmo ser formado por monômeros de ácido láctico, que é um produto natural da respiração anaeróbica do corpo humano, que é absorvido pelo corpo sem causar toxicidade. Também é muito utilizado em embalagens de alimentos, copos e sacolas por ser pouco reativo (SINGHVI; ZINJARDE; GOKHALE, 2019).

O PLA é utilizado na engenharia de tecidos como *scaffold* para regeneração tecidual cutânea e também na distribuição e liberação de fármacos, fatores de crescimento e fitoativos, que auxiliam o crescimento e regeneração tecidual. Devido a seu caráter hidrofóbico, o PLA apresenta baixa compatibilidade com fármacos hidrofílicos e, quando misturados, podem sofrer separação de fases. Além disto, quando obtida a nanofibra, o fármaco se distribui predominantemente na sua superfície. Esta característica influenciará nas propriedades da nanofibra, como por exemplo, no aumento da velocidade de liberação do fármaco em meio fisiológico, promovendo o efeito *burst* (liberação instantânea), devido a maior disponibilidade de fármaco na superfície da nanofibras (DESTEFANO; KHAN; TABADA, 2020).

Como forma de minimizar esta condição, faz-se necessária a utilização de blendas poliméricas, associando ao PLA outro polímero com caráter hidrofílico, como por exemplo, o poli(óxido de etileno) (PEO). Este é um polímero sintético, que assim como o PLA, é um biomaterial por suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e citocompatibilidade. Por apresentar caráter hidrofílico, quando associado ao PLA na forma de blenda polimérica, promove a modulação no perfil de liberação do fármaco incorporado, já que o fármaco teoricamente estará disperso mais no interior das nanofibras (TYLER *et al.*, 2016).

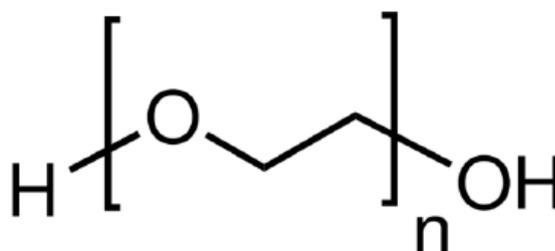
3.6 Poli (óxido de Etileno)

3.6.1 Características Químicas e Físico-químicas

O poli (óxido de etileno) (PEO) é um homopolímero sintetizado a partir do monômero óxido de etileno e teve sua comercialização iniciada em 1957. A fórmula estrutural do PEO está representada na Figura 10. Quando o grau de polimerização (n) é menor que 150, ou seja, para baixas massas molares, o composto é geralmente chamado de poli(etileno glicol) (PEG). Já para massas molares maiores, valores de n maior que 150, chama-se de PEO. Trata-se de um polímero neutro (não iônico),

termoplástico e semicristalino, com estrutura linear ou ramificada, que quando submetido à tração, apresenta alta alongação, moderado módulo de tensão e boa capacidade de orientação.

Figura 10 - Fórmula estrutural do Poli(óxido de Etileno)



Fonte: Dreyer (2015)

O PEO é solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos e insolúvel em hidrocarbonetos alifáticos, dietilenoglicol, etilenoglicol e glicerina. Tem seu ponto de fusão variando entre 30 a 60 °C e a viscosidade das soluções depende da massa molar média do polímero. Polímeros com maiores massas molares médias apresentam maiores viscosidades em comparação a um mesmo solvente (DREYER, 2015).

O PEO apresenta, também, capacidade lubrificante, estabilidade, pequena volatilidade e sua estrutura é de fácil modificação química. A biocompatibilidade o faz ser o polímero de escolha em diversos setores como a indústria farmacêutica e médica, onde é usado como matriz para o controle de liberação de fármacos, como adesivos para próteses dentárias e também em filmes de embalagem (MEDEIROS, 2018).

3.6.2 Aplicações do Poli (óxido de Etileno)

O poli(óxido de etileno) tem sido amplamente estudado devido a sua biocompatibilidade e à sua biodegradabilidade, características que lhe conferem grande potencial de aplicações biomédicas como, em sistemas para liberação de fármacos, reposição de tecidos, como películas envolvendo materiais que são aplicados em organismos vivos para tratamento de feridas (NISTA, 2012).

As diferentes massas molares médias disponíveis comercialmente é um fator importante para o desenvolvimento de fibras, uma vez que essa característica é um dos parâmetros determinantes do processo de eletrofiação. Além de estudos

envolvendo o PEO puro no processo de eletrofição, encontra-se na literatura a associação do PEO com outros polímeros na formação de blendas poliméricas, afim de complementar as propriedades dos polímeros. Em muitos estudos, o PEO é utilizado como polímero auxiliar, especialmente em sistemas que requerem mucoadesividade pois apresenta características mucoadesivas, além de facilitar a eletrofição por diminuir a condutividade da solução e aumentar o entrelaçamento das cadeias (SHANKAR *et al.*, 2009; NISTA, 2016).

4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA MUCOADESIVO CONTENDO NISTATINA

4.1 Materiais

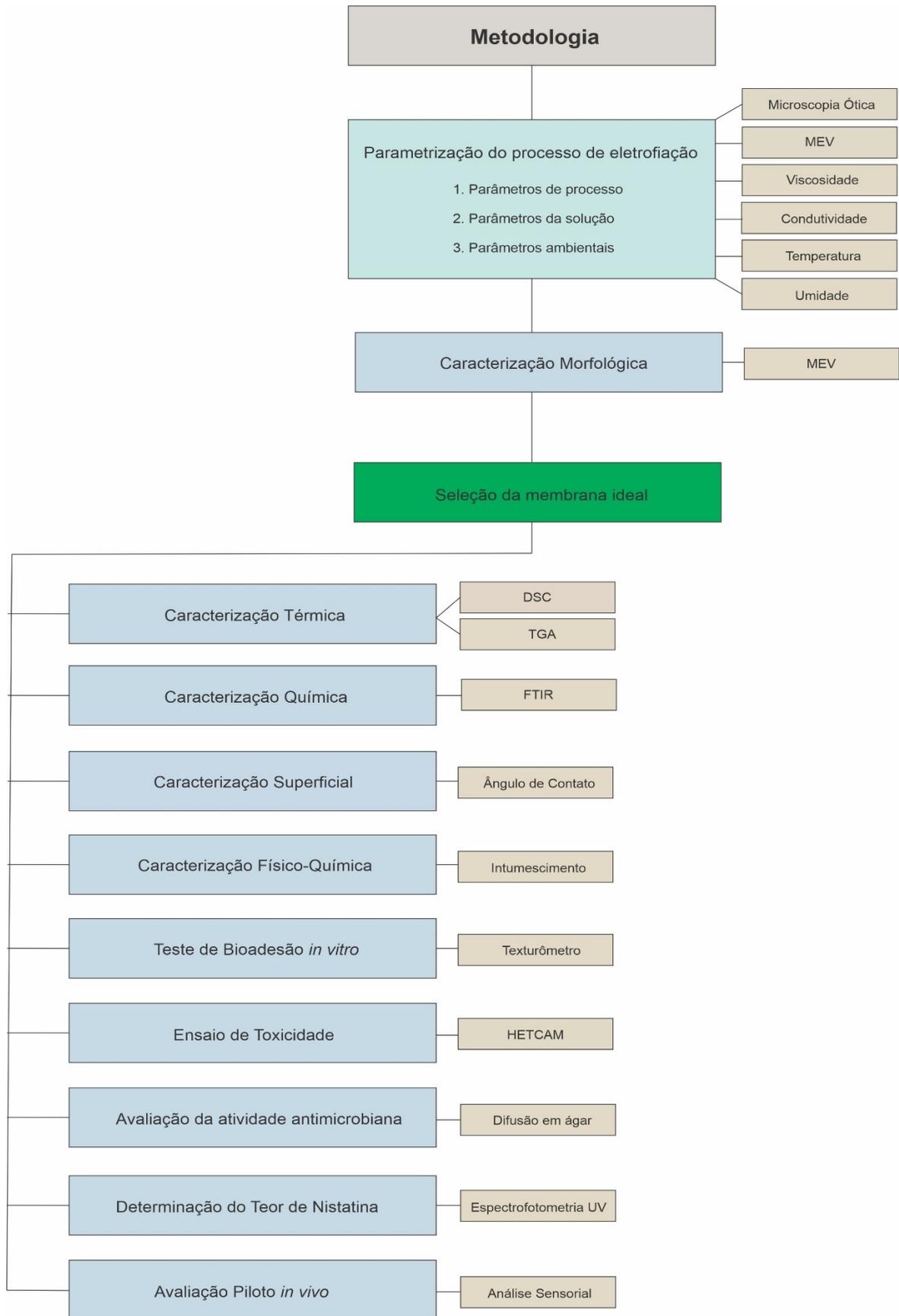
Neste trabalho foram empregados:

Nistatina (NYS): Lote 19L 19-B-056902, título 5858,46 UI/mg, produzido por Antibioce (Romênia) e fornecido por SM empreendimentos Farmacêuticos LTDA. Poli (ácido L-láctico) PLA Polymer 2002D (4% D-lactide, 96% L-lactide), fabricado pela empresa Nature Works, com massa molar média nominal de 199.590 g/mol. Poli (óxido de etileno) PEO massa molar ~ 100.000 g/mol, Sigma-Aldrich. 1,2-Dicloroetano P.A (Vetec). Dimetilformamida-N,N P.A. ACS (Vetec). Solução tampão fosfato 0,1 mol/L pH7,4 (solução saliva artificial). Mucina de estômago de porco tipo II (Sigma-Aldrich).

4.2 Métodos

A rota metodológica experimental incluiu a preparação das soluções poliméricas, eletrofiação das soluções e caracterizações conforme mostra o fluxograma a seguir (Figura 11).

Figura 11 – Fluxograma da metodologia experimental



Fonte: Autoria própria

4.2.1 Caracterização das soluções

4.2.1.1 Viscosidade das soluções poliméricas

Todas as soluções poliméricas foram caracterizadas através das análises de viscosidade. Utilizou-se um viscosímetro rotativo Brookfield DVII + PRO. Foram preparados 30 mL de cada solução, PLA, PLA/PEO, PLA/PEO/NYS e adicionados em recipiente de aço inoxidável conectado ao viscosímetro. A leitura foi feita a 50, 100, 150 e 200 rpm, com *spindle* 62, a 25° C.

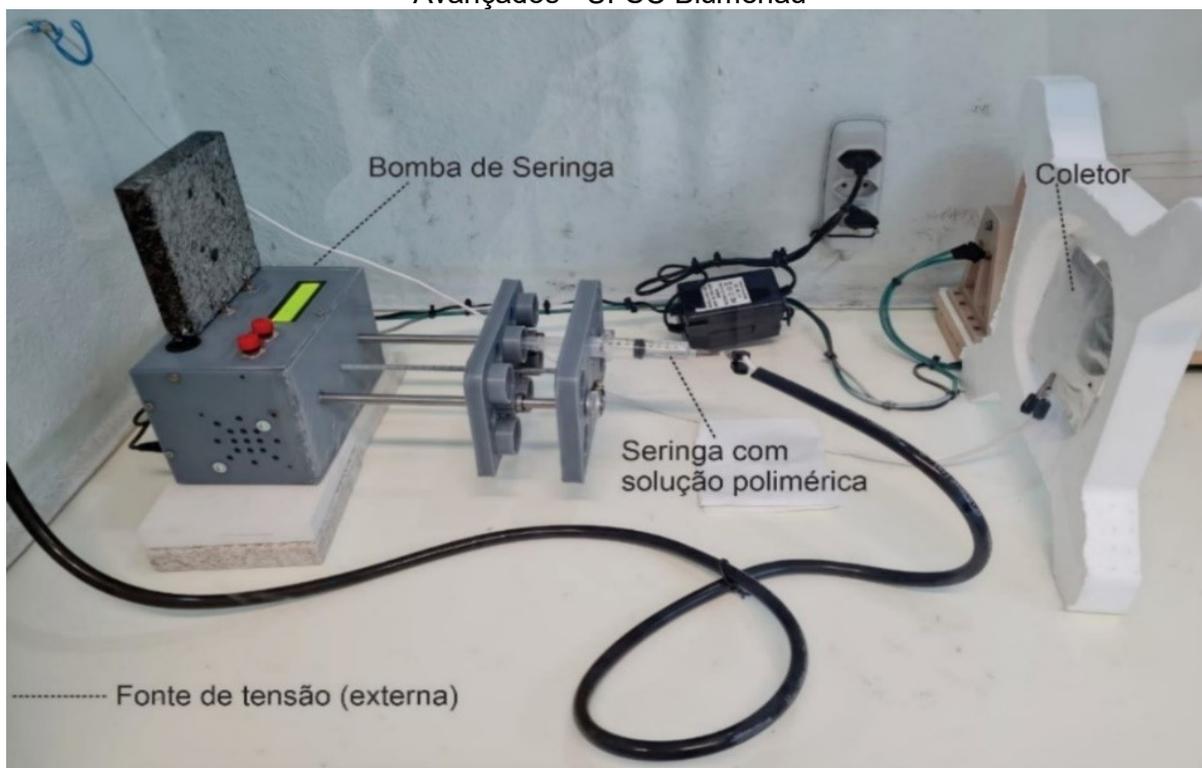
4.2.1.2 Condutividade iônica

A condutividade iônica das soluções poliméricas foi determinada utilizando um condutivímetro (MS TECNOPON, modelo mCA 150P, Brasil), a sonda foi colocada em 30 mL das 3 soluções (PLA, PLA/PEO e PLA/PEO/NYS) obtidas. As medições foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C).

4.2.2 Parametrização do Processo de Eletrofiação de Membranas de PLA

O Equipamento utilizado possui configuração padrão do sistema de eletrofiação e consiste em uma fonte de alimentação de alta tensão, uma bomba de seringa, uma seringa, uma agulha metálica e um coletor aterrado. O equipamento utilizado para eletrofiação (Figura 12), encontra-se localizado no Laboratório de Transformações e Materiais Avançados-UFSC Blumenau.

Figura 12 - Equipamento de Eletrofiação – Laboratório de Transformações e Materiais Avançados - UFSC Blumenau



Fonte: Autoria própria

4.2.2.1 Etapa 1

Para a eletrofiação do PLA puro, foram preparadas soluções com 10% m/m, 12% m/m e 14% m/m de PLA em uma mistura de solventes. Foram utilizados como solventes dicloroetano (DCE) e dimetilformamida DMF (razão volumétrica 3:1), de acordo com Yang *et al.* (2016) (Quadro 3).

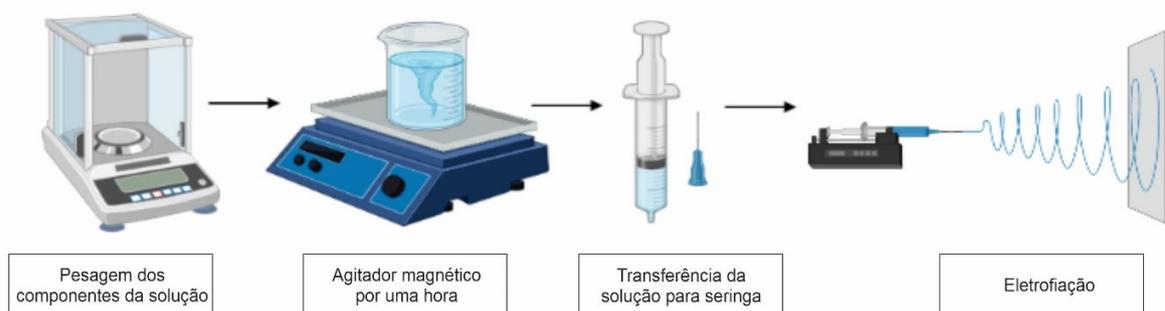
Quadro 3 - Soluções de PLA + solvente

	A – 10% m/m de PLA	B – 12% m/m de PLA	C – 14% m/m de PLA
PLA	1,4880 g	1,7856 g	2,0832 g
DCE	9 mL	9 mL	9 mL
DMF	3 mL	3 mL	3 mL

Fonte: Autoria própria

A solubilização do PLA foi realizada sob agitação magnética a uma temperatura de 50 °C, por aproximadamente uma hora (LI; FREY; BAEUMNER, 2005). Após a solubilização completa do PLA, a solução foi transferida para uma seringa de vidro de 5 mL, com agulha tamanho 30 x 08, calibre 21 G1 ¼, e foi fixada no equipamento de eletrofiação para ajustes de parâmetros e início do processo (Figura 13).

Figura 13 - Processo de eletrofiação de membranas



Fonte: Autoria própria, criado com Biorender.com

Um coletor metálico foi colocado à frente da seringa e uma diferença de potencial elétrico foi aplicada entre o mesmo e a agulha da seringa, variando de 10 à 25 kV). A distância entre a agulha e o coletor variou de 10 a 30 cm e a vazão da bomba de seringa foi testada em dois volumes 0,74 e 1,34 mL/h. Nesta etapa de parametrização do processo a eletrofiação foi realizada durante 30 minutos. Os parâmetros testados para o sistema de solventes DCE/DMF estão apresentados na Tabela 3. A eletrofiação foi realizada em temperatura de 23 ± 2 °C e umidade relativa na faixa de 45 a 55 %.

Tabela 3 - Parâmetros de eletrofiação do PLA

Parâmetro	Valores testados
Vazão da bomba de seringa (mL/h)	0,74 – 1,34
Diferença de Potencial Elétrico (kV)	10 – 15 – 20 – 25
Distância entre agulha e coletor (cm)	8 – 15 – 22
Concentração da Solução (%)	10 – 12 – 14

Fonte: Autoria própria

Para se obter a melhor condição no processo de eletrofiação de fibras de PLA com um maior grau de organização e menor produção de defeitos, variou-se os parâmetros selecionados conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros da eletrofiliação de membranas de PLA – A (10%), B (12%), C (14%)

	% PLA		Potencial Elétrico (kV)		Distância agulha/coletor (cm)		% PLA		Potencial Elétrico (kV)		Distância agulha/coletor (cm)		% PLA		Potencial Elétrico (kV)		Distância agulha/coletor (cm)	
	PLA	Vazão (mL)	Elétrico (kV)	Distância (cm)	PLA	Vazão (mL)	Elétrico (kV)	Distância (cm)	PLA	Vazão (mL)	Elétrico (kV)	Distância (cm)	PLA	Vazão (mL)	Elétrico (kV)	Distância (cm)		
1	10	1,34	10	8	30	0,74	15	8	59	1,34	20	15	14	0,74	20	15		
2	10	1,34	15	8	31	0,74	20	8	60	1,34	25	15	14	1,34	25	15		
3	10	1,34	20	8	32	0,74	25	8	61	0,74	10	15	14	0,74	10	15		
4	10	1,34	25	8	33	1,34	10	15	62	0,74	15	15	14	0,74	15	15		
5	10	0,74	10	8	34	1,34	15	15	63	0,74	20	15	14	0,74	20	15		
6	10	0,74	15	8	35	1,34	20	15	64	0,74	25	15	14	0,74	25	15		
7	10	0,74	20	8	36	1,34	25	15	65	1,34	10	22	14	1,34	10	22		
8	10	0,74	25	8	37	0,74	10	15	66	1,34	15	22	14	1,34	15	22		
9	10	1,34	10	15	38	0,74	15	15	67	1,34	20	22	14	1,34	20	22		
10	10	1,34	15	15	39	0,74	20	15	68	1,34	25	22	14	1,34	25	22		
11	10	1,34	20	15	40	0,74	25	15	69	0,74	10	22	14	0,74	10	22		
12	10	1,34	25	15	41	1,34	10	22	70	0,74	15	22	14	0,74	15	22		
13	10	0,74	10	15	42	1,34	15	22	71	0,74	20	22	14	0,74	20	22		
14	10	0,74	15	15	43	1,34	20	22	72	0,74	25	22	14	0,74	25	22		
15	10	0,74	20	15	44	1,34	25	22										
16	10	0,74	25	15	45	0,74	10	22										
17	10	1,34	10	22	46	0,74	15	22										
18	10	1,34	15	22	47	0,74	20	22										
19	10	1,34	20	22	48	0,74	25	22										
20	10	1,34	25	22	49	1,34	10	8										
21	10	0,74	10	22	50	1,34	15	8										
22	10	0,74	15	22	51	1,34	20	8										
23	10	0,74	20	22	52	1,34	25	8										
24	10	0,74	25	22	53	0,74	10	8										
25	12	1,34	10	8	54	0,74	15	8										
26	12	1,34	15	8	55	0,74	20	8										
27	12	1,34	20	8	56	0,74	25	8										
28	12	1,34	25	8	57	1,34	10	15										
29	12	0,74	10	8	58	1,34	15	15										

Fonte: Própria Autora

Foram eletrofiadas 72 membranas com objetivo de encontrar a melhor condição para a obtenção de nanofibras com menor diâmetro e uniformidade de fibras, para posteriormente se adicionar PEO (Figura 14).

Figura 14 - Membranas de PLA eletrofiadas



Fonte: Autoria própria

4.2.2.2 Etapa 2

Com base nos resultados obtidos na parametrização inicial através da microscopia eletrônica de varredura, considerada o melhor parâmetro de análise do processo de eletrofiação, as condições de obtenção de membranas de PLA foram otimizadas. Fez-se um fatorial 3^2 (2 fatores e 3 níveis) e definiu-se os limites dos parâmetros, com a distância entre agulha e coletor em 15 cm, a vazão em 1,20 mL/h e variou-se a voltagem aplicada de 10, 15 e 20 kV e concentração de PLA de 10 (A), 12 (B) e 14 % (m/m) (C), conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de PLA – A (10%), B (12%), C (14%) m/m

	Solução	Vazão (mL)	Potencial Elétrico (Kv)	Distância (cm)
1	A	1,20	10	15
2	A	1,20	15	15
3	A	1,20	20	15
4	B	1,20	10	15
5	B	1,20	15	15
6	B	1,20	20	15
7	C	1,20	10	15
8	C	1,20	15	15
9	C	1,20	20	15

Fonte: Autoria própria

As membranas obtidas nesta etapa foram avaliadas através da microscopia ótica, no intuito de visualizar a formação de fibras e defeitos durante o processo. Foi utilizado um microscópio ótico binocular, Mod. Primo Star 3, fabricante Carl Zeiss, objetivas com ótica corrigida a infinito do tipo “Plano-ACHROMAT”, com aumentos de 100 x para campo claro, campo escuro, disponível no laboratório de microscopia da Universidade Regional de Blumenau – Campus 3.

4.2.3 Parametrização do Processo de Eletrofiação de Membranas de PLA/PEO

Para a eletrofiação do PLA/PEO, foram preparadas soluções com 10 %, 12 %, 14 % e 16 % (m/m) de PLA e incorporou-se ao sistema o PEO na concentração de 10 % (m/m), quantidade calculada em relação à massa de PLA. Também foram utilizados como solventes dicloroetano (DCE) e dimetilformamida DMF (razão volumétrica 3:1), nesta etapa do processo (Quadro 4).

Quadro 4 - Soluções de PLA/PEO + Solventes

	A – 10 % PLA	B – 12 % PLA	C – 14 % PLA	D – 16 % PLA
PLA (g)	1,4880	1,7856	2,0832	2,3808
DCE (mL)	9	9	9	9
DMF (mL)	3	3	3	3
PEO (g)	0,1488	0,1786	0,2083	0,2381

Fonte: Autoria própria

A solubilização do PLA/PEO foi realizada sob agitação magnética a uma temperatura de 50 °C, por aproximadamente uma hora. Após a solubilização completa dos polímeros, a solução foi transferida para uma seringa de vidro de 5 mL, com agulha tamanho 30 x 08, calibre 21 G1 ¼, e foi fixada no equipamento de eletrofiação para ajustes de parâmetros e início do processo. Os parâmetros de processo foram otimizados de acordo com os resultados obtidos na etapa anterior (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros de eletrofiação do PLA/PEO

Parâmetro	Valores testados
Vazão da bomba de seringa (mL/h)	1,20
Diferença de Potencial Elétrico (kV)	10 – 15 – 20
Distância entre agulha e coletor (cm)	15
Concentração da Solução (%) (m/m)	10 – 12 – 14 (PLA) 10 (PEO)

Fonte: Autoria própria

As membranas obtidas nesta etapa foram avaliadas através da microscopia ótica no intuito de visualizar a formação de fibras e imperfeições durante o processo e, as que apresentaram melhores características, foram encaminhadas para realização de análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.2.4 Parametrização do Processo de Eletrofiação de Membranas de PLA/PEO/NYS

Para a eletrofiação do PLA/PEO/NYS, foram preparadas soluções com 10 % m/m, 12 % m/m, 14 % m/m e 16 % m/m de PLA, 10 % e 12 % de PEO calculado em relação à massa de PLA e 1.200.000 UI de NYS (Quadro 5), dosagem conforme apresentações comerciais disponíveis no mercado, em suspensão, para utilização na cavidade oral. Também foram utilizados como solventes dicloroetano (DCE) e dimetilformamida DMF (razão volumétrica 3/1), nesta etapa do processo.

Quadro 5 - Soluções de PLA/PEO/NYS + Solventes

Sistemas	PLA	PEO	NYS (g)	DCE (mL)	DMF (mL)
Sistema A	1,4880 g (10 %)	0,1488 g (10 %)	0,1891	9	3
Sistema B	1,7856 g (12 %)	0,1786 g (10 %)	0,1891	9	3
Sistema C	2,0832 g (14 %)	0,2083 g (10 %)	0,1891	9	3
Sistema D	2,3808 g (16 %)	0,2381 g (10 %)	0,1891	9	3
Sistema D*	2,3808 g (16 %)	0,2857 g (12 %)	0,1891	9	3

Fonte: Autoria própria

A solubilização do PLA/PEO foi realizada sob agitação magnética a uma temperatura de 50 °C, por aproximadamente uma hora. Após completa solubilização dos polímeros foi adicionado NYS (Tabela 7) e novamente realizada agitação em agitador magnético por 15 minutos, em recipiente protegido da luz e sem aquecimento. A solução resultante foi transferida para uma seringa de vidro de 5 mL, com agulha tamanho 30 x 08, calibre 21 G1 ¼, e foi fixada no equipamento de eletrofiação para ajustes de parâmetros e início do processo. Nesta etapa a seringa utilizada para a eletrofiação foi protegida da luz a para evitar degradação da NYS. Os parâmetros de processo foram otimizados de acordo com os resultados obtidos na etapa anterior.

Tabela 7 - Parâmetros de eletrofiação da membrana PLA/PEO/NYS

Parâmetro	Valores testados
Vazão da bomba de seringa (mL/h)	1,20
Diferença de Potencial Elétrico (kV)	10 – 15 – 20
Distância entre agulha e coletor (cm)	15
Concentração da Solução (%) (m/m)	10 – 12 – 14 – 16 (PLA) 10 – 12 (PEO)

Fonte: Autoria própria

As membranas obtidas nesta etapa foram avaliadas através da microscopia ótica no intuito de visualizar a formação de fibras e imperfeições durante o processo e as que apresentaram melhores características foram encaminhadas para realização de análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.2.5 Técnicas de Caracterização

Diferentes técnicas de caracterização foram utilizadas para avaliar características básicas dos sistemas desenvolvidos como composição, estrutura, morfologia e comportamento. Os resultados obtidos em algumas etapas da caracterização auxiliaram na seleção dos melhores sistemas desenvolvidos para seguimento dos estudos.

4.2.5.1 Caracterização morfológica

4.2.5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de MEV apresentadas neste trabalho foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), localizado na Universidade Federal de Santa Catarina. O microscópio utilizado é da marca Jeol modelo JSM6701F e foi operado a uma diferença de potencial elétrico de 10 kV. Os aumentos utilizados foram 1000 e 5000 x e antes da análise as amostras foram recobertas com camada de ouro. A partir das imagens obtidas, o diâmetro médio das fibras foi calculado utilizando o *software* livre ImageJ.

4.2.5.2 Caracterização térmica

4.2.5.2.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu) utilizando cadinhos de alumínio, contendo aproximadamente 5 mg de amostra. A faixa de temperatura analisada foi de 25 a 250 °C, a uma razão de aquecimento de 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de N₂ de 100 mL/min. A primeira varredura foi realizada de 25 a 250 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min, o resfriamento com razão de resfriamento de 10 °C/min e segunda varredura de 25 a 220 °C com taxa de 10 °C/min. Os dados obtidos foram processados em software Tasy-60.

4.2.5.2.2 Termogravimetria (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um equipamento modelo TGA 4000 do fabricante Perkin Elmer®, no CLAIMS da FURB, Campus Blumenau. As análises foram realizadas no intervalo de temperatura entre 30° C e 700° C, com razão de aquecimento de 10 °C/min para as membranas eletrofiadas, sob fluxo de nitrogênio de 20 mL.min⁻¹ e utilizando um cadinho de alumina. Foram analisadas a matéria prima e as membranas PLA, PLA/PEO e PLA/PEO/NYS que obtiveram os melhores resultados no processo de eletrofiação.

4.2.5.3 Caracterização química

4.2.5.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FTIR), foi realizada com a matéria prima e com as membranas de PLA, PLA/PEO e PLA/PEO/NYS que obtiveram os melhores resultados no processo de eletrofiação. A análise permitiu identificar funções químicas características dos compostos. Os espectros de absorção na região do infravermelho dos polímeros e da nistatina e das membranas eletrofiadas foram obtidos em equipamento FTIR Frontier (PerkinElmer, Brasil) na faixa entre 4000 e 600 cm⁻¹, com uma média de 32 scans, na resolução do

espectro de 4 cm^{-1} , no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

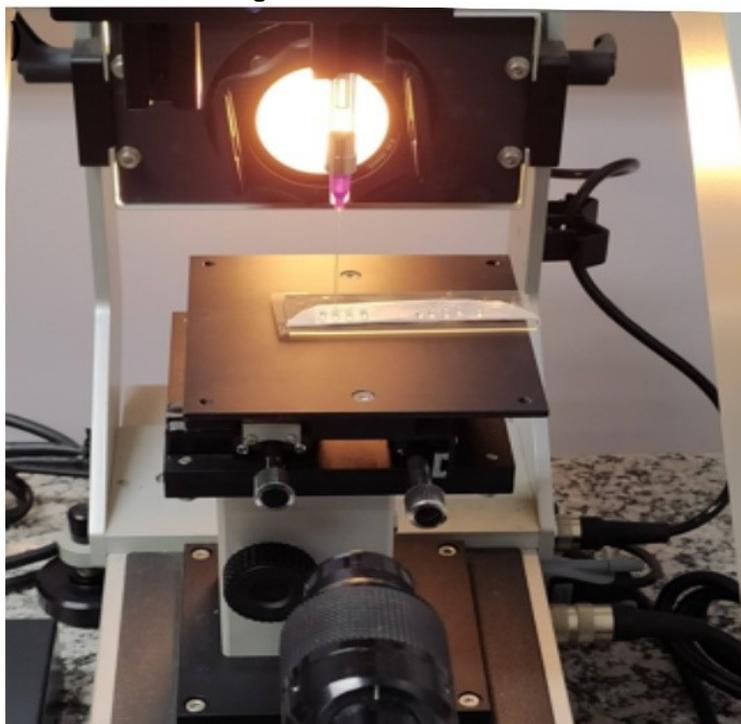
4.2.5.4 Caracterização superficial

4.2.5.4.1 Medidas de ângulo de contato

Para determinar mudanças no caráter hidrofílico/hidrofóbico das membranas após a eletrofição, foram realizadas medidas de ângulo de contato no Goniômetro modelo Co-250-F1 da Ramé-Hart Ins (Figura 15), na Central de Análises do EQA/UFSC.

Cortou-se a membrana eletrofiada no tamanho 3 cm de comprimento x 1 cm de largura e, na sequência, uma gota de 10 μL de água destilada foi depositada na superfície da membrana e as respectivas imagens capturadas por um sistema óptico para a determinação do ângulo de contato. As imagens foram capturadas durante 60 segundos após a deposição da gota na superfície para determinar a molhabilidade em função do tempo. A análise foi realizada à temperatura de 25 °C.

Figura 15 - Goniômetro



Fonte: Autoria própria

4.2.6 Teste de bioadesão *in vitro*

A primeira etapa da análise da bioadesão das membranas eletrofiadas foi avaliada por meio do texturômetro modelo TA. HD plus da marca Stable Micro Systems, localizado na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da UFSC. O equipamento utilizado mede a força necessária para destacar o sistema mantido em contato com um modelo de membrana, tal como um disco composto por mucina (CARVALHO *et al.*, 2010).

A preparação de discos de mucina foi realizada por compressão por meio do equipamento compressor da marca Specac. Foram pesados para cada disco, 250 mg de mucina suína usando uma prensa de anel com matriz de 13 mm de diâmetro e uma força de compressão de 10 toneladas, aplicada por 30 segundos.

O método utilizado para realizar o teste foi descrito por Bruschi *et al.* (2007), que consiste no acoplamento dos discos de mucina na extremidade inferior da sonda cilíndrica (comprimento 5 cm, diâmetro 5 cm) utilizando adesivo dupla face (Figura 17). Os discos de mucina foram embebidos em solução a 5% de mucina por 30 segundos e as amostras de cada formulação foram colocadas sob uma superfície plana também preso com fita dupla face. Posteriormente, uma força de 0,1 N foi aplicada por 30 segundos para garantir contato entre a camada de mucina e a amostra, a sonda foi movida para cima a uma velocidade constante de $1,0 \text{ mms}^{-1}$ e a força necessária para retirar os discos de mucina da superfície de cada formulação foi determinada a partir do resultado gráfico de força-tempo.

A segunda etapa da análise da bioadesão foi realizada em texturômetro modelo TA. HD plus da marca Stable Micro Systems, localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e utilizou-se mucosa da bochecha suína (Figura 18 e 19) que foi gentilmente cedida pela equipe de pesquisa da professora Dra. Luiza Abraão Frank. A bochecha suína foi limpa suavemente com água ultrapura e cortada em pedaços de aproximadamente 1,5 cm e presa com fita dupla face na base do equipamento, voltada para cima. A membrana teste embebida em saliva artificial foi acoplada na extremidade inferior da sonda cilíndrica (diâmetro 1 cm), fazendo-se uso de fita dupla face e foi aplicada força de 0,1 N durante 30 segundos, quando então a sonda foi movida para cima a uma velocidade constante de $1,0 \text{ mms}^{-1}$. A montagem do equipamento está ilustrada na Figura 16.

Figura 16 - Montagem equipamento



Fonte: Autoria própria

Figura 17 - Detalhe sonda 1,5 cm



Fonte: Autoria própria

Figura 18: Detalhe da sonda e da Bochecha Suína



Fonte: Autoria própria

Figura 19: Bochecha Suína



Fonte: Autoria própria

4.2.7 Perfil de Intumescimento

As propriedades hidrofílicas das membranas eletrofiadas também foram estudadas por medidas de grau de intumescimento (P) em função do tempo. O intumescimento é descrito como o aumento do volume do polímero quando este está imerso em determinado solvente ou também pode ser determinado a partir da quantidade da massa de fluido absorvida pelo polímero em relação a massa inicial (FERREIRA *et al.*, 2013).

As membranas secas em triplicata foram pesadas previamente e colocadas

imersas em água deionizada, a 37°C, por tempos pré-estabelecidos (30 s, 1,5 min, 3 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min). O excesso de água das membranas foi removido com um papel absorvente e as amostras foram pesadas a cada tempo (SHANKAR *et al.*, 2009).

A razão de intumescimento foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{Razão Intumescimento (\%)} = [(W_s - W_d) / W_d] \times 100 \quad (1)$$

Onde W_s é a massa da amostra úmida e W_d trata-se da massa da amostra seca.

4.2.8 Ensaio de Toxicidade

4.2.8.1 Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)

A avaliação do potencial irritante das formulações frente à membrana corioalantoide seguiu o método descrito no *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM, 2010). Foram adquiridos ovos de galinha fertilizados *in vitro* do tipo *Specific Pathogen Free* (SPF), da raça White Leghorn e inspecionados quanto à presença de rachaduras. Todos os ovos foram limpos com cloreto de sódio a 0,9 % e pré-incubados a 38 °C em 60 % de umidade por 8 dias, em incubadora com rotação automática de 30 em 30 minutos. No 9º dia, os ovos foram retirados para realização do experimento. Foi realizada higienização do centro da concha fora do saco aéreo, um orifício foi destacado com lápis, higienizado e perfurado suavemente com uma pinça para não quebrar a concha, sendo que a zona vascular foi facilmente identificada na membrana corioalantóica (CAM).

Duas gotas de solução salina 0,9 % foram, então, adicionadas para umedecer a membrana interna do invólucro adjacente à CAM, processo este que facilitou a separação da membrana interna da membrana corioalantóica. Depois de pinçada e elevada por pinça oftálmica, a membrana e a CAM se separaram sem força e, em seguida, uma janela de cerca de 1 x 1 cm na membrana foi seccionada para expor a zona vascular.

Foram aplicados 300 µL de salina 0,9 % (controle negativo), hidróxido de sódio 1 mol/L (controle positivo) e membranas compostas por PLA; PLA/PEO;

PLA/PEO/NYS diretamente sobre à zona vascular e foram utilizados três ovos por grupo de forma randomizada. Após a aplicação dos compostos, os ovos foram observados por 300 segundos. Durante este período, foi possível observar se houve o aparecimento de efeitos como hemorragia, coagulação ou lise vascular, indicadores de irritação.

Os resultados foram observados, fotografados e filmados, sendo atribuído scores conforme o Quadro 6.

Quadro 6 - Escala de pontuação para lise vascular, hemorragia e coagulação para o teste HET-CAM

Efeito	Escore		
	0,5 min (30 s)	2 min (120 s)	5 min (300 s)
Lise Vascular	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: Derouiche e Abdennour (2017)

As escalas de pontuação individuais para lise vascular, hemorragia e coagulação foram obtidos de acordo com o tempo em que determinado efeito foi observado (30", 120" ou 300"). O valor final é obtido a partir da somatória dos valores dos escores e indica o potencial irritante da substância testada, com valor máximo de 21. Após obtidos os valores individuais para cada ovo, foi realizada a média dos scores para cada composto testado, categorizando o nível de irritação de acordo com o Quadro 7.

Quadro 7 - Categorização da irritação

Média dos Scores	Categoria de Irritação
0 a 0,9	Não irritante
1 a 4,9	Irritação leve
5 a 8,9	Irritação moderada
9 a 21	Irritação severa

Fonte: Adaptado de Derouiche e Abdennour (2017)

A pontuação da substância testada foi a média aritmética, obtida dos três ovos utilizados, com uma pontuação máxima de 21. Os resultados para irritação foram avaliados seguindo a metodologia apresentada por Derouiche e Abdennour (2017).

4.2.9 Análise Microbiológica

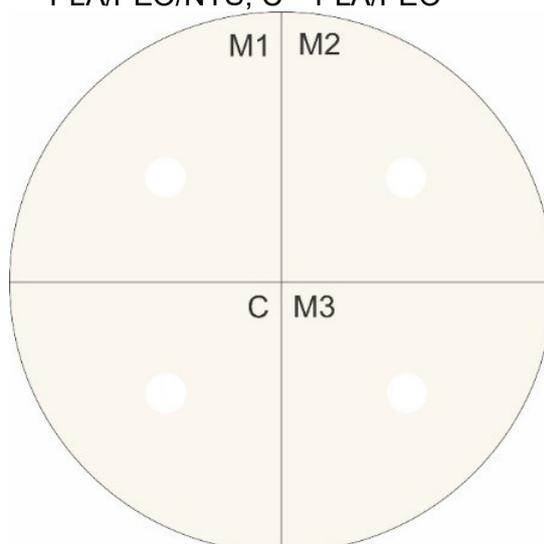
4.2.9.1 Teste de Difusão em Ágar

Para determinação da atividade antifúngica das membranas eletrofiadas optou-se pelo teste de difusão em ágar. Foram utilizadas das cepas de *Candida albicans*, *Candida Glabrata*, *Candida kruzei* e *Candida tropicalis*, todas cepas clínicas isoladas e mantidas no laboratório de micologia da Universidade Regional de Blumenau.

Para o preparo do meio de cultura mediu-se 400 mL de água destilada em um erlenmeyer e 26 g de meio ágar *Sabouraud* dextrose e dissolveu-se com aquecimento. Após completa dissolução, o meio foi transferido para placas de petri e estas foram armazenadas fechadas por 24 horas em geladeira. Foram preparados inóculos fúngicos nos quais as densidades das suspensões de leveduras foram lidas e ajustadas em 530 nm e absorvância entre 0,08 a 0,1.

No dia seguinte, quatro placas de petri com o meio ágar *Sabouraud* receberam os inóculos com um swab estéril. Membranas eletrofiadas com fármaco e também sem o fármaco, de aproximadamente 13 mm de diâmetro, foram colocadas nas placas com o auxílio de uma pinça em pontos equidistantes conforme Figura 20.

Figura 20 - Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar M1, M2, M3 – PLA/PEO/NYS; C – PLA/PEO



Fonte: Autoria própria

A avaliação foi realizada, verificando-se a presença ou ausência dos halos de inibição ao redor dos discos, contra um fundo azul marinho. O diâmetro do halo foi

medido com um paquímetro em mm, para posterior avaliação dos resultados. Foi considerado sensível quando o halo de inibição apresentou tamanho ≥ 10 mm e resistente ≤ 10 mm. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.10 Quantificação da Nistatina por Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta

4.2.10.1 Teor de Nistatina contida nas Membranas Eletrofiadas

O teor de nistatina contido nas membranas eletrofiadas foi determinado de acordo com a validação parcial de método analítico, conforme Apêndice 3. Pesou-se uma membrana com tamanho de 2 cm x 2 cm, esta foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL com metanol e ácido acético glacial (5:1). O balão foi mantido em repouso, protegido da luz e calor e, após 30 minutos, foi retirada uma alíquota de 5 mL e transferida para um balão volumétrico de 10 mL contendo metanol e ácido acético glacial (5:1). Considerando a necessidade de avaliar a uniformidade de deposição de fibras durante o processo de eletrofiação, optou-se por realizar o estudo em triplicata, avaliando-se o teor de nistatina em 3 locais distintos equidistantes na membrana eletrofiada. Foi realizada leitura em 279 nm. Para os cálculos dos teores, os valores de absorvância foram substituídos na seguinte equação:

$$y = 0,0246x - 0,0099 \quad (2)$$

4.2.11 Avaliação piloto in vivo da aceitação, manipulação e aplicação das membranas livres de substância ativa

4.2.11.1 Análise Sensorial

Segundo a NBR ISO 5492:2017, publicada pela ABNT (2017), a análise sensorial pode ser definida como uma disciplina científica usada para analisar, medir e interpretar reações características dos alimentos e dos materiais como são percebidas pelos órgãos da visão, olfato, tato, audição e gustação. O teste sensorial afetivo do tipo aceitação foi realizado em um grupo composto por 20 pacientes, homens e mulheres adultos, portadores de neoplasias, assistidos em Clínica de Oncologia na cidade de Blumenau, com protocolos quimioterápicos, radioterápicos ou

combinação de ambos, porém sem diagnóstico de mucosite oral, que concordaram livremente em fazer parte do experimento e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Regional de Blumenau sob o parecer nº 5.695.197.

Os participantes do estudo foram orientados sobre os objetivos e procedimentos metodológicos do teste e ressaltou-se a importância em alertar imediatamente a pesquisadora, de qualquer desconforto que pudesse ocorrer.

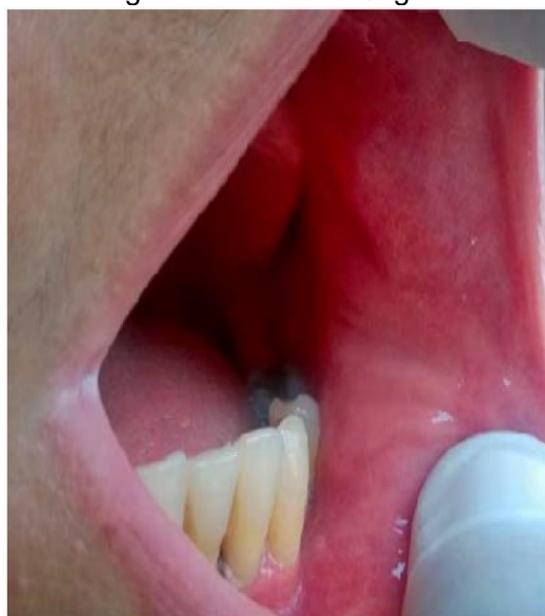
As membranas mucoadesivas sem fármaco, medindo 2x2 cm, foram embaladas individualmente em papel grau cirúrgico (Figura 21) e colocadas na cavidade oral, na mucosa jugal (Figura 22), pelo próprio indivíduo participante do estudo e este foi orientado a permanecer por 30 minutos sem ingerir alimentos e bebidas.

Figura 21 - Membrana embalada



Fonte: Autoria própria

Figura 22 - Mucosa Jugal



Fonte: Madeira, Leite e Rizzolo (2016)

O procedimento foi acompanhado pela pesquisadora responsável e foram registradas imagens fotográficas da membrana na cavidade oral. Esta etapa do experimento teve como objetivo avaliar a mucoadesão, tempo de permanência e alteração de cor do dispositivo na mucosa.

Os participantes do estudo também analisaram características do dispositivo como aparência, manuseio, sabor, conforto, textura e adesão à mucosa através da

ficha de análise sensorial com a escala hedônica estruturada de 9 pontos (Apêndice 2). Os dados da Aceitação Hedônica foram analisados através da estatística descritiva, considerando resultados de média e desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

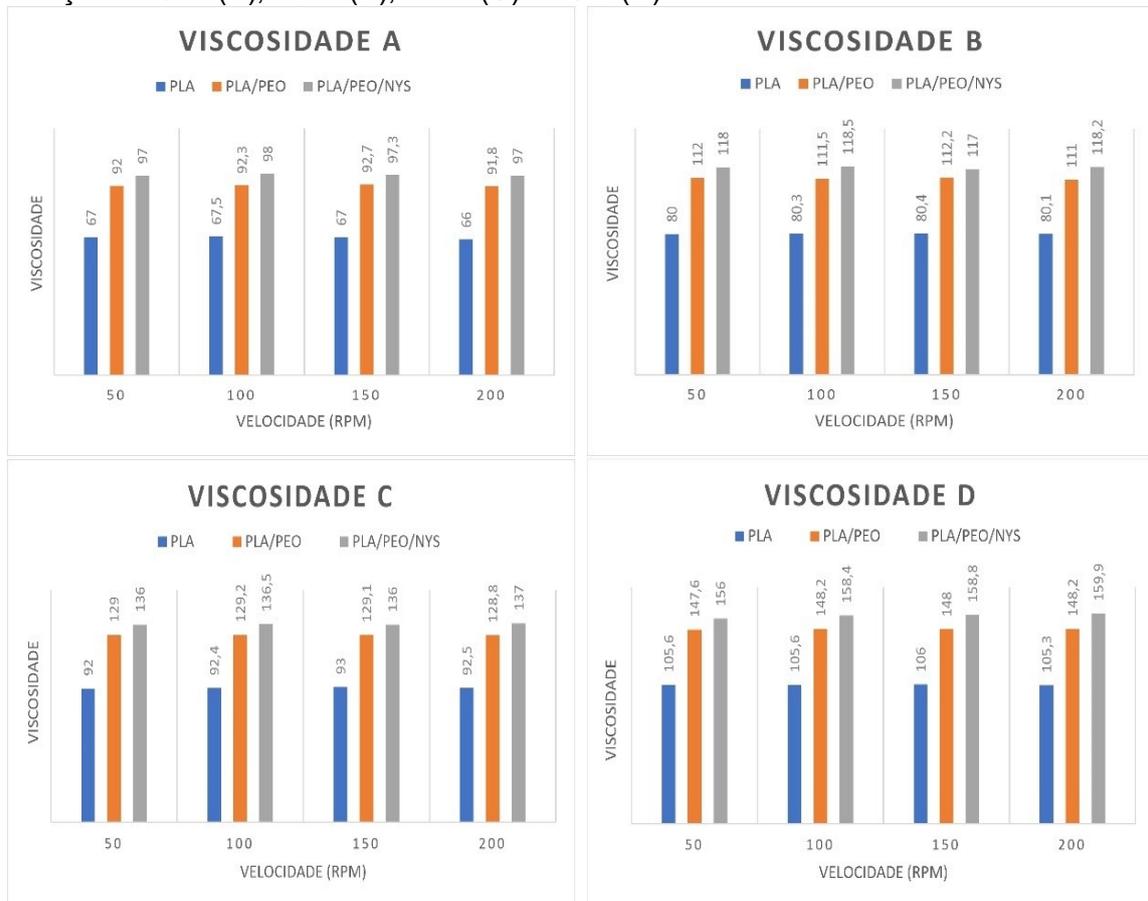
5.1 Caracterização das Soluções

Conhecer as características das soluções poliméricas para produção de fibras eletrofiadas é de extrema importância, pois influenciam em sua morfologia e estrutura. Desta forma, as medidas de viscosidade e condutividade elétrica das soluções de PLA, PLA/PEO, PLA/PEO/NYS foram avaliadas.

5.1.1 Viscosidade das Soluções Poliméricas

Foram medidas as viscosidades das soluções preparadas com PLA, PLA/PEO e PLA/PEO/NYS nas diferentes concentrações estudadas (Gráfico 1). Verificou-se, como esperado, que a adição de poli(óxido de etileno) aumenta de forma significativa a viscosidade da solução, sendo que, quanto mais concentrada a solução polimérica, maior a viscosidade. A adição de nistatina à solução não interferiu de forma significativa na viscosidade e permitiu a obtenção de fibras sem defeitos, com superfície lisa e homogêneas. Este fato pode ser explicado devido a alta solubilidade do fármaco nos solventes utilizados para preparo da solução.

Gráfico 1 - Medida da viscosidade (cP) das soluções de PLA; PLA/PEO; PLA/PEO/NYS, solução à 10 % (A), 12 % (B), 14 % (C) e 16% (D)



Fonte: Autoria própria

Neste estudo a viscosidade mínima necessária para a obtenção de fibras sem defeitos da solução polimérica PLA/PEO/NYS foi de 156 cP. A viscosidade é um parâmetro extremamente importante no processo de eletrofiação e pode sofrer alteração conforme concentrações dos componentes da solução. Para a obtenção de nano/microfibras é necessário que a solução tenha uma viscosidade mínima, uma vez que em soluções pouco concentradas pode ocorrer instabilidade na formação do cone de Taylor, o que pode gerar espalhamento eletrostático ao invés de formação de fibras ou formar nanofibras com defeitos e imperfeições devido ao baixo emaranhamento das cadeias poliméricas (GUERRINI *et al.*, 2009; SHAO *et al.*, 2015).

Cabe ressaltar que o aumento da viscosidade está relacionado diretamente com o aumento no diâmetro das fibras e pode ocasionar a formação de fibras fora da escala nanométrica. Assim, com o aumento da viscosidade e mantendo-se fixo os demais parâmetros do processo, existe uma tendência ao aumento no diâmetro das fibras. Deste modo, é fundamental que se encontre um balanço para que a

viscosidade da solução a ser eletrofiada não produza membranas com defeitos, mas em escala que atenda o tamanho das fibras conforme utilização desejada (COSTA *et al.*, 2012a; RAY *et al.*, 2016).

5.1.2 Condutividade Iônica

A condutividade iônica da solução tem um efeito nas cargas elétricas presentes na solução polimérica, e pode influenciar no estiramento das fibras durante o processo e conseqüentemente, no tamanho da fibra obtida. Uma solução muito condutora é submetida a uma força de tração, maior na presença de um campo elétrico, do que uma solução com menor condutividade. De forma geral, soluções com maior condutividade elétrica são capazes de proporcionar um menor diâmetro de fibra, devido ao aumento da densidade da carga em solução que aumenta a força elétrica exercida no jato precursor das fibras (AHMED; LALIA; HASHAIKEH, 2015; SILL; VON RECUM, 2008).

Considerando que a parametrização da solução foi realizada concomitantemente com a parametrização do processo de eletrofiação, optou-se por avaliar a condutividade iônica (Tabela 8) das soluções de PLA (16%), PLA/PEO (16:10%) e PLA/PEO/NYS (16:10%), pois nessa concentração a obtenção de fibras uniformes era mais evidente.

Tabela 8 - Condutividade das soluções de PLA D, PLA D/PEO, PLA D/PEO/NYS

	PLA	PLA/PEO	PLA/PEO/NYS
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	3,42	2,2	1,56

Fonte: Autoria própria

A solução que apresentou maior valor de condutividade foi a solução com poli (ácido láctico) puro e observou-se que esta solução é a que mais facilmente eletrofia. Este fato pode estar relacionado com a orientação das cargas da solução que permitem que a gota sofra um maior alongamento, resultando na deposição de fibras no coletor e provável menor diâmetro das fibras (COSTA *et al.*, 2012a). A eletrofiação envolve estiramento da fibra causada por repulsão das cargas na sua superfície e, quanto maior a condutividade elétrica da solução, mais cargas são carregadas pelo jato, ocorrendo um aumento do estiramento o que reduz o diâmetro das fibras. Na eletrofiação de PLA puro as cargas existentes geram instabilidade no jato e, como

resultado, observa-se o aumento na área de deposição das fibras (DESTEFANO; KHAN; TABADA, 2020).

A adição de PEO e NYS diminuiu a condutividade elétrica da solução, porém, apesar da diminuição, foi possível a obtenção de fibras uniformes, lisas e sem defeitos em todos os sistemas. A diminuição da condutividade com a adição de PEO e NYS pode ser explicada pela menor quantidade de carga presente nestas substâncias, o que levou a um menor valor de densidade de carga em solução, contudo, não houve interferência no processo de eletrofição (YANG *et al.*, 2016).

5.2 Parametrização do Processo de Eletrofição de Membranas de PLA

5.2.1 Etapa 1

Após testes iniciais com diferentes parâmetros de solução e processo de eletrofição foram obtidas 72 membranas, e entre estas, foram selecionadas (Tabela 9) as que apresentaram deposição de fibras no coletor de forma mais homogênea, para análise em microscopia eletrônica. As condições testadas foram tensão, distância entre agulha e coletor, vazão e concentração de PLA, que foram levadas aos extremos verificando-se a fiabilidade da solução. Nesta etapa a análise de microscopia eletrônica serviu como um norteador do processo de parametrização, sendo que as imagens obtidas possibilitaram avaliar a influência dos parâmetros do processo na obtenção das fibras eletrofiadas.

Tabela 9 – Parâmetros de processo das membranas selecionadas para análise em microscopia eletrônica – Solução A (10% PLA), solução B (12% PLA), solução C (14% PLA)

Membranas selecionadas	Solução	Vazão (mL)	Potencial Elétrico (kV)	Distância (cm)
1	A	1,34	10	8
2	A	1,34	15	8
4	A	1,34	25	8
10	A	1,34	15	15
11	A	1,34	20	15
18	A	1,34	15	22
25	B	1,34	10	8
26	B	1,34	15	8
28	B	1,34	25	8
34	B	1,34	15	15
35	B	1,34	20	15
42	B	1,34	15	22
50	C	1,34	15	8
52	C	1,34	25	8
53	C	0,74	10	8
58	C	1,34	15	15
59	C	1,34	20	15
66	C	1,34	15	22

Fonte: Autoria própria

Os resultados encontrados na microscopia eletrônica de varredura podem ser verificados nas Figuras 23, 24 e 25. Para melhor compreensão foram selecionadas imagens em diferentes ampliações. A partir das imagens, avaliou-se a formação das fibras, porosidade e presença de imperfeições, especialmente na forma de gotas (*beads*).

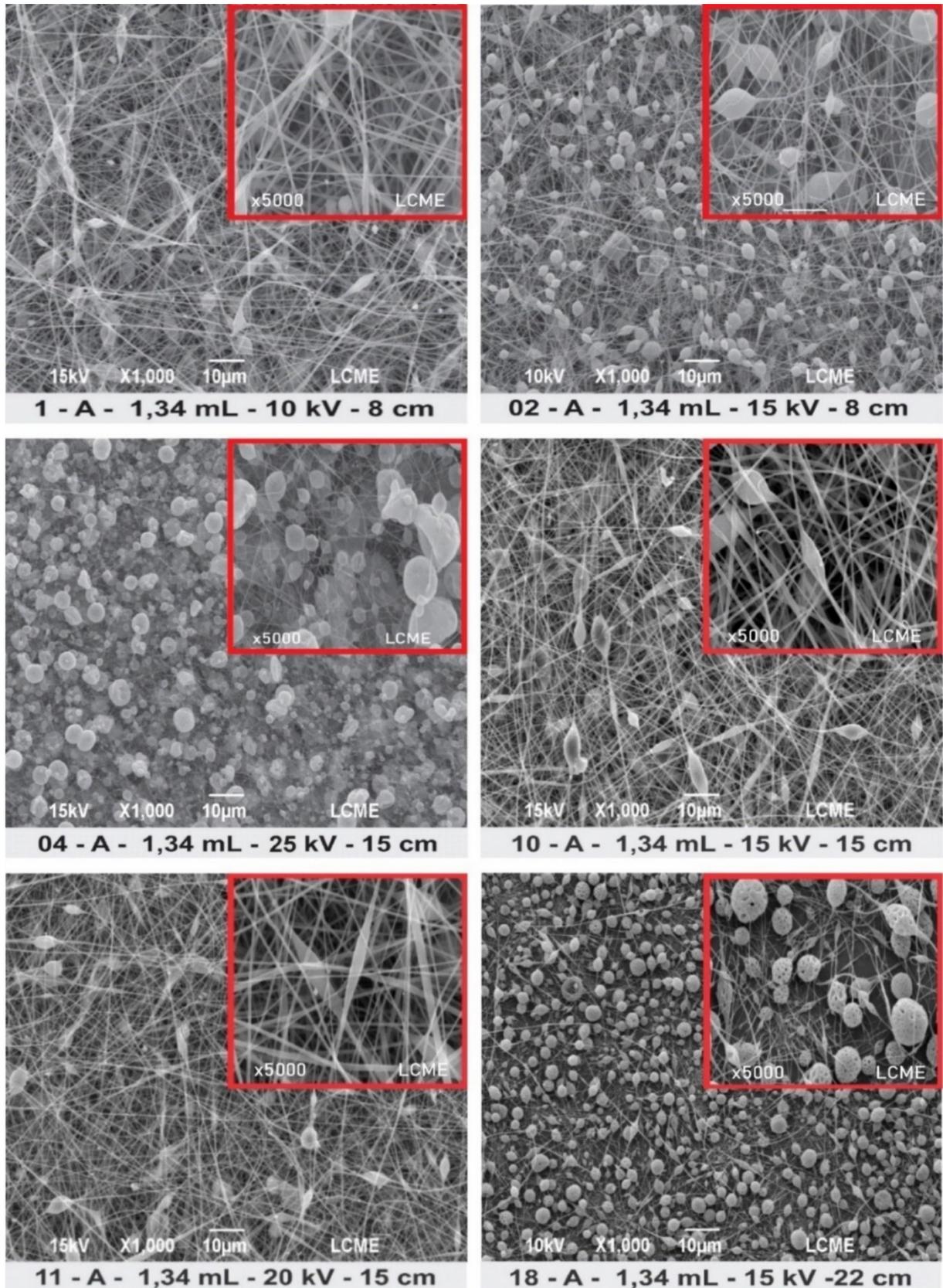
Constatou-se nesta etapa que as membranas obtidas a partir de soluções menos concentradas apresentaram maior quantidade de defeitos. Sabe-se que a baixa viscosidade da solução polimérica, pode levar ao processo de eletropulverização, em que o jato da solução precursora se divide em gotículas durante o trajeto até o coletor, levando a formação de partículas no lugar de fibras, o que pode ser observado nas membranas 2, 4 e 10 (Figura 23).

Em concentrações intermediárias (12%), formou-se misturas de partículas e fibras, porém pouco estáveis como na membrana 34 (Figura 24).

De acordo com Zeng *et al.* (2003) e Amirah MD Zubir *et al.* (2020), o fator mais crítico no controle da morfologia de fibras eletrofiadas é a viscosidade da solução polimérica. Para a formação da fibra, a viscosidade do polímero deve estar em uma

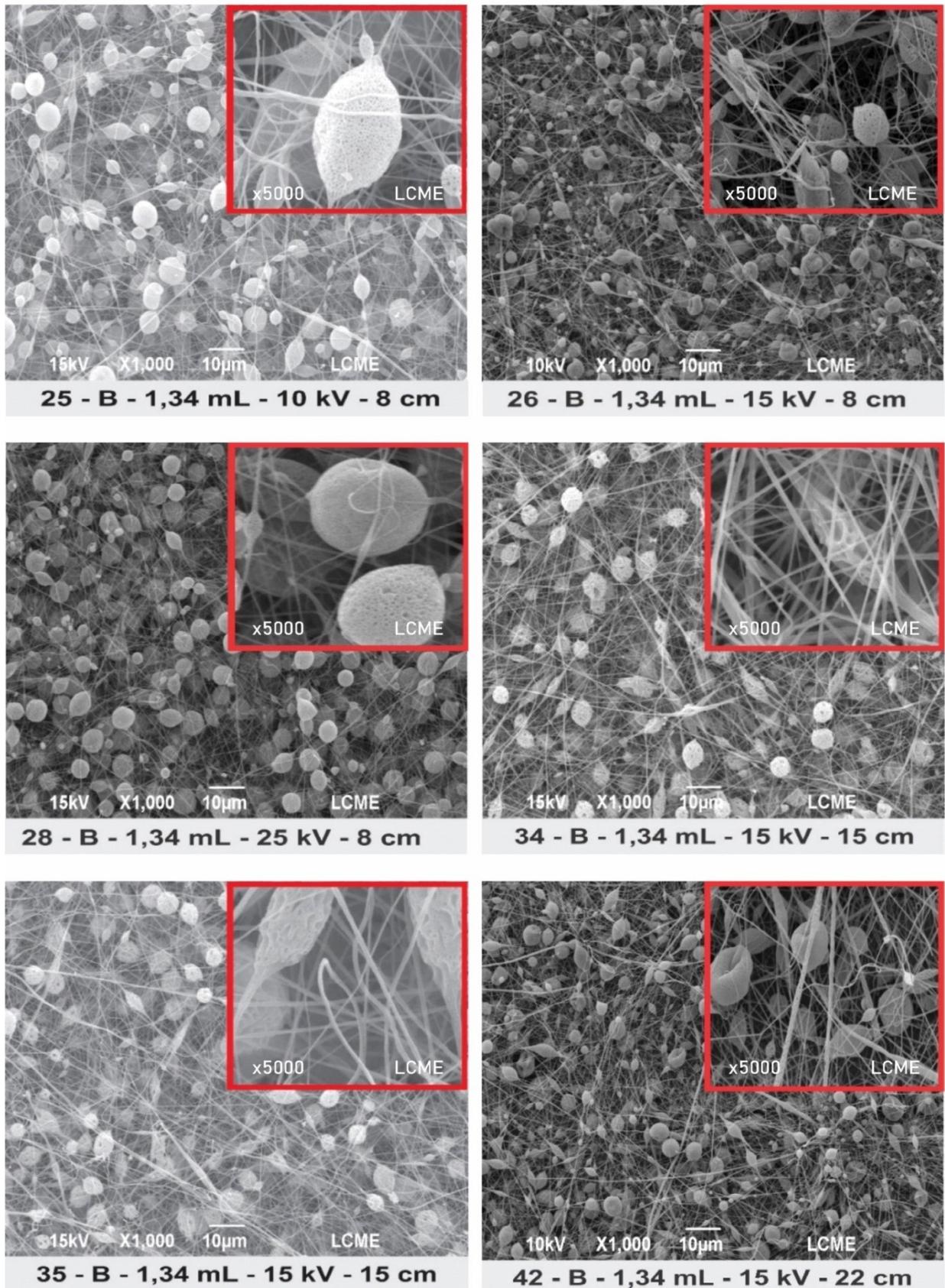
faixa particular, dependendo do tipo de polímero e solvente usados. Com o aumento da viscosidade da solução, os *beads* tendem ao alongamento e em forma de fuso e originam fibras maiores (AL-HAZEEM, 2018). Observou-se que com a viscosidade obtida a partir da concentração de PLA/PEO (12:10) foi possível a obtenção de fibras, porém ainda com defeitos. A partir da concentração PLA/PEO (14:10), observou-se diminuição dos defeitos e obtenção de fibras mais contínuas, contudo somente com a concentração PLA/PEO (16:10) foi possível eletrofiar fibras contínuas, homogêneas e sem defeitos.

Figura 23 - Imagens de MEV para membranas eletrofiadas da PLA da solução A (10%), com diferentes parâmetros de processo e solução



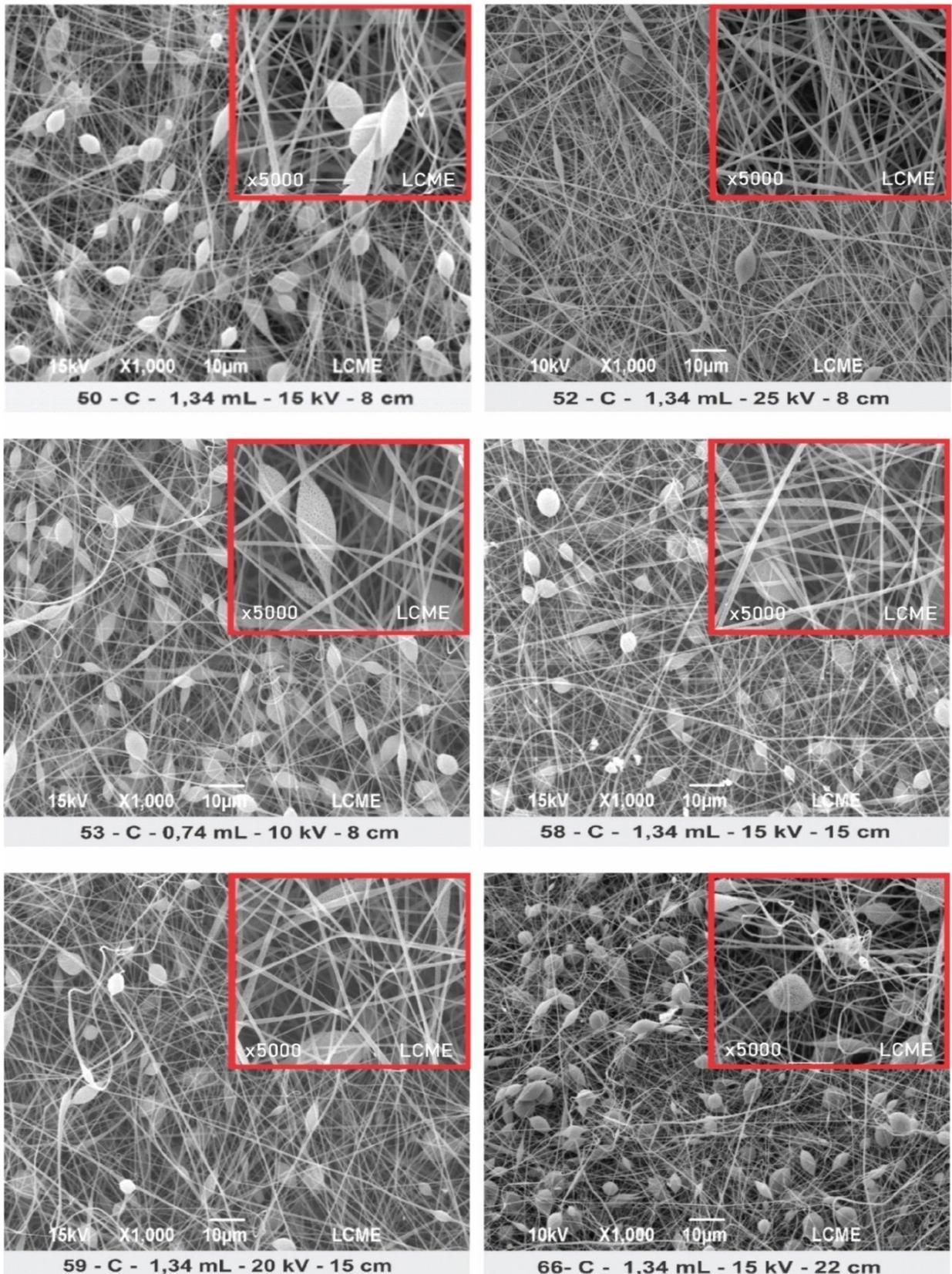
Fonte: Autoria própria

Figura 24 - Imagens de MEV com aumento de 1000 e 5000 vezes para membranas eletrofiadas de PLA da solução B (12%)



Fonte: Autoria própria

Figura 25 - Imagens de MEV com aumento de 1000 e 5000 vezes para membranas eletrofiadas de PLA da solução C (14%)



Fonte: Autoria própria

A distância da ponta da agulha até o coletor apresentou-se como fator importante na obtenção de fibras durante o processo de eletrofiação. As imagens de MEV mostraram que distâncias menores que 15 cm dificultam a formação das fibras, pois ocorre aumento do campo elétrico, da força de alongamento e diminuição do tempo em que a fibra passa pelo campo, o que pode ocasionar evaporação insuficiente do solvente das fibras (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

De acordo com Frenot e Chronakis (2003), a redução da distância entre a agulha e o coletor na maioria das situações pode promover aumento do diâmetro das fibras e gerar deformidades estruturais, uma vez que as fibras se unem em suas interseções, após a evaporação incompleta do solvente, antes que o jato chegue ao coletor, porém não se observou este efeito nas fibras eletrofiadas neste estudo. A maior distância avaliada (22 cm) também promoveu a formação de defeitos ao longo das fibras, fato este que pode ser justificado pela perda da efetividade do campo elétrico na estabilização do cone de Taylor, e conseqüentemente, na formação das fibras (COSTA *et al.*, 2012b).

Importante salientar que, para que as fibras se formem, o jato de eletrofiação deve ter tempo suficiente para que o solvente evapore e deve estar sob efeito do campo elétrico até a sua deposição no coletor. Em suma, a distância entre a ponta da agulha e o coletor exerce influência direta no tempo de voo da solução e na intensidade do campo elétrico (YANG *et al.*, 2016).

As taxas de injeção da solução polimérica variaram de 0,74 a 1,34 mL/h no estudo preliminar. De acordo com Moutsatsou, Coopman e Georgiadou (2017), uma baixa taxa de fluxo resulta em nanofibras, com diâmetro menor e maior homogeneidade, o que é ocasionado pelo aumento da densidade de carga volumétrica e rápida secagem das fibras. Contudo, a análise de MEV das membranas selecionadas, demonstrou que a formação de defeitos durante o processo ocorreu em ambas taxas de vazão, provavelmente devido à baixa viscosidade das soluções avaliadas nesta fase do estudo.

As taxas de injeção mais baixas geralmente produzem fibras com diâmetros menores, no entanto, podem gerar processos de fiação descontínuos e defeitos nas fibras. Neste estudo, apenas uma membrana com taxa de injeção de 0,74 mL/h foi selecionada para avaliação em MEV, visto que, com as demais soluções eletrofiadas nesta vazão, não houve deposição de fibras adequadas no coletor (AMIRAH MD ZUBIR *et al.*, 2020).

Em contrapartida, as taxas de injeção maiores podem causar deformidades no formato de gotas, pois não ocorre secagem adequada da fibra antes de atingir o coletor, ou ainda, a fonte de tensão não consegue gerar campo elétrico suficiente para formar um jato uniforme e contínuo, fenômenos que podem justificar o grande número de defeitos nas fibras depositadas, conforme mostram as figuras 23, 24 e 25. Constatou-se então, que os resultados obtidos nesta etapa indicaram a necessidade de alteração no parâmetro vazão, tendo em vista que a diminuição da vazão favorece a formação de fibras com menor diâmetro (ALAZAB *et al.*, 2017).

Na etapa inicial de parametrização não foi possível perceber diferenças significativas na morfologia das fibras com a variação da tensão, porém constatou-se a necessidade de estabelecer uma tensão fixa para analisar de fato a interferência no processo. Não existe consenso entre os autores na literatura quanto a influência da tensão na uniformidade das fibras. Reneker e Chun (1996) afirmaram que a variação do campo elétrico não influenciou diretamente no diâmetro de fibras de PEO eletrofiadas. Zuo *et al.* (2005) constataram que quanto maior a tensão aplicada, maior foi o diâmetro das fibras eletrofiadas, devido ao aumento da quantidade de polímero ejetado e, em contrapartida, Bhardwaj e Kundu (2010) reportaram que o aumento da tensão aplicada diminuiu o diâmetro das fibras, uma vez que favoreceu o aumento da repulsão eletrostática. Em suma, sabe-se que a tensão aplicada deve ser suficiente para fornecer força motriz para estirar as fibras e transmitir carga à gota de polímero. A tensão também pode influenciar na morfologia e quando tensões mais altas são aplicadas, mais polímero é ejetado o que origina uma fibra com maior diâmetro (ALAZAB *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos nesta etapa ainda não foram satisfatórios apesar da variação de diversos parâmetros de eletrofiação no pré-teste de desenvolvimento das membranas com PLA. As imagens obtidas por MEV indicaram a formação de fibras nanométricas, porém com uma quantidade de defeitos acima do esperado para possibilitar a obtenção de um sistema apropriado para o seguimento do estudo.

5.2.2. Etapa 2

Nesta etapa de estudo foram redefinidas as variáveis de análise no processo de eletrofiação. Foram fixados como parâmetros de processo, 15 cm de distância entre agulha e coletor, vazão 1,2 mL e variou-se somente a tensão entre 10, 15 e 20

kV. Com o intuito de agilizar a obtenção de resultados optou-se pela microscopia ótica como ferramenta para auxiliar a avaliação do sistema. Esta técnica de análise foi utilizada para verificar se o processo de eletrofiação possibilitou a formação de fibras e, se as membranas eletrofiadas formaram fibras com morfologia adequada, sem a presença de *beads*.

Visando otimizar as condições de obtenção das membranas, desenvolveu-se o seguinte sistema de classificação qualitativa baseada em pontuação conforme aspecto final (Tabela 10):

Tabela 10 - Sistema de classificação qualitativo das membranas de acordo com aspecto final através da microscopia ótica: 0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10 defeitos); 3 – (11 a 30 defeitos); 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual

Aspecto da membrana através da MO	Pontuação
Não fiou	0
0 a 2 defeitos por campo visual	1
3 a 10 defeitos por campo visual	2
11 a 30 defeitos por campo visual	3
Acima de 30 defeitos	4

Fonte: Autoria própria

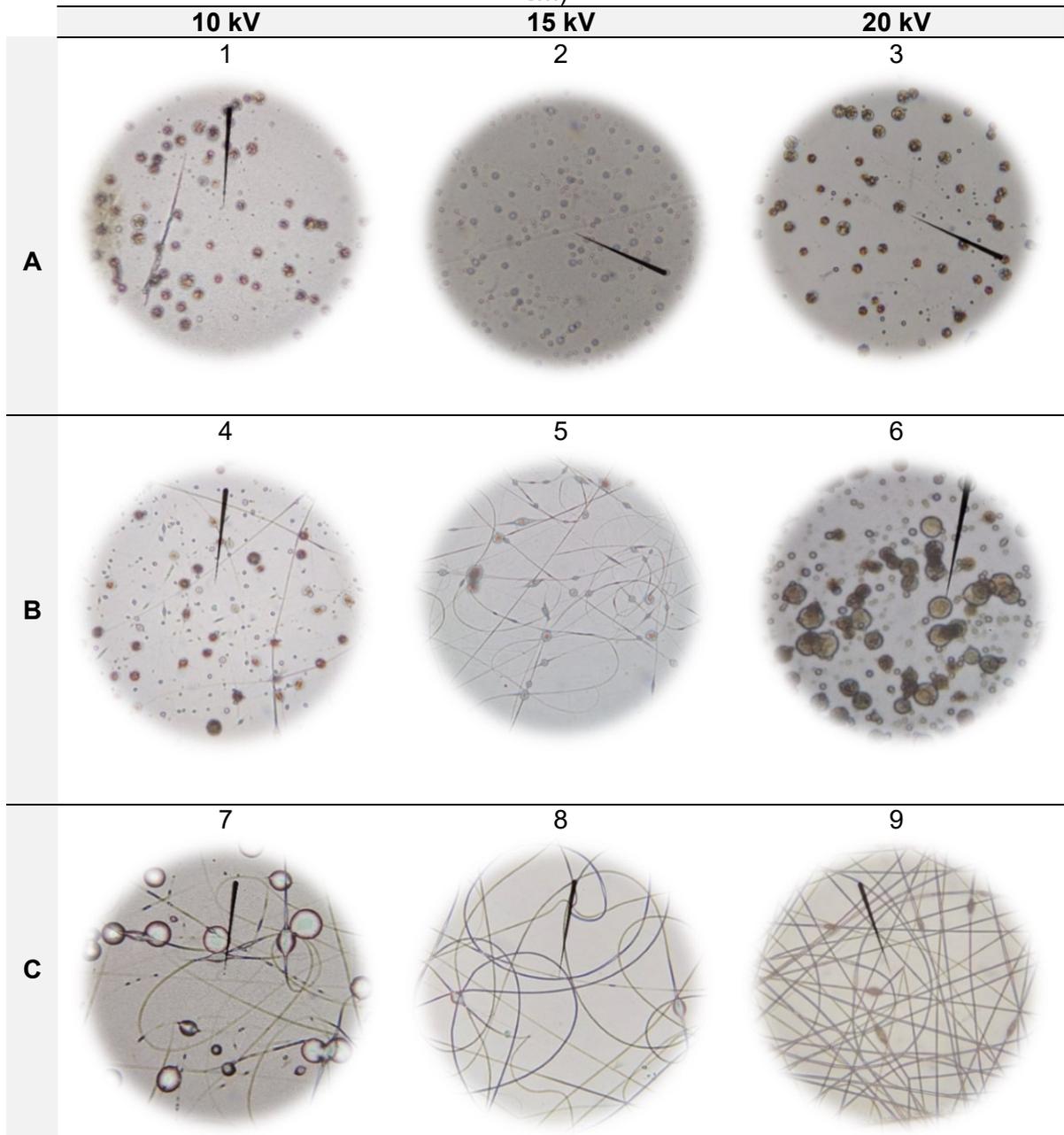
As imagens de microscopia ótica (Figura 26) permitiram verificar que as soluções poliméricas de 10 e 12% não formaram fibras no processo de eletrofiação ou os sistemas gerados eram formados por poucas fibras com grande quantidade de defeitos. Contudo, com o aumento da concentração de PLA (14%) foi possível constatar melhora significativa na formação das fibras, uma vez que o aumento da concentração da solução resulta em um maior entrelaçamento das cadeias poliméricas, necessário para manter a continuidade do jato durante o processo de eletrofiação (NISTA, 2012).

Na eletrofiação de soluções com baixa concentração de polímeros, é comum a formação de contas ao longo das fibras, conforme observado nas concentrações de 10 e 12% de PLA, devido a uma grande quantidade de moléculas de solvente e poucas cadeias entrelaçadas, o que faz com que aumente a tensão superficial do sistema ao longo do jato eletrofiado gerando instabilidade (AMIRAH MD ZUBIR *et al.*, 2020).

Outro fator relacionado com a viscosidade da solução é a formação de um segundo jato a partir do jato principal. O segundo jato formado é estável para produzir fibras de pequenos diâmetros quando a solução apresenta baixa viscosidade, porém,

na maioria das vezes as fibras formadas são acompanhadas de numerosos defeitos. Este fenômeno não foi observado nesta etapa, corroborando com os achados na literatura que mencionam que quando a viscosidade é suficientemente alta, a formação do segundo jato é pouco provável, sendo apenas o jato principal o responsável pela formação das fibras (ALAZAB *et al.*, 2017).

Figura 26 - Imagens de microscopia ótica com aumento de 100 vezes para membranas eletrofiadas de PLA da solução A (10%), B (12%) e C (14%), (vazão 1,20 mL e distância 15 cm)



Fonte: Autoria própria

Os resultados qualitativos obtidos com a eletrofição da solução de PLA em diferentes concentrações estão demonstrados na Tabela 11. Na eletrofição das

membranas 1, 2, 3 e 6 não houve obtenção de fibras, as membranas 4 e 5 apresentaram mais de 30 defeitos no campo visual analisado, a membrana 7 apresentou até 30 defeitos por campo visual, a membrana 8 apresentou até 2 defeitos por campo visual e a membrana 9 apresentou até 10 defeitos por campo visual.

Tabela 11 - Pontuação das membranas de PLA de acordo com aspecto através da microscopia ótica: 0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10 defeitos); 3 – (11 a 30 defeitos); 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual

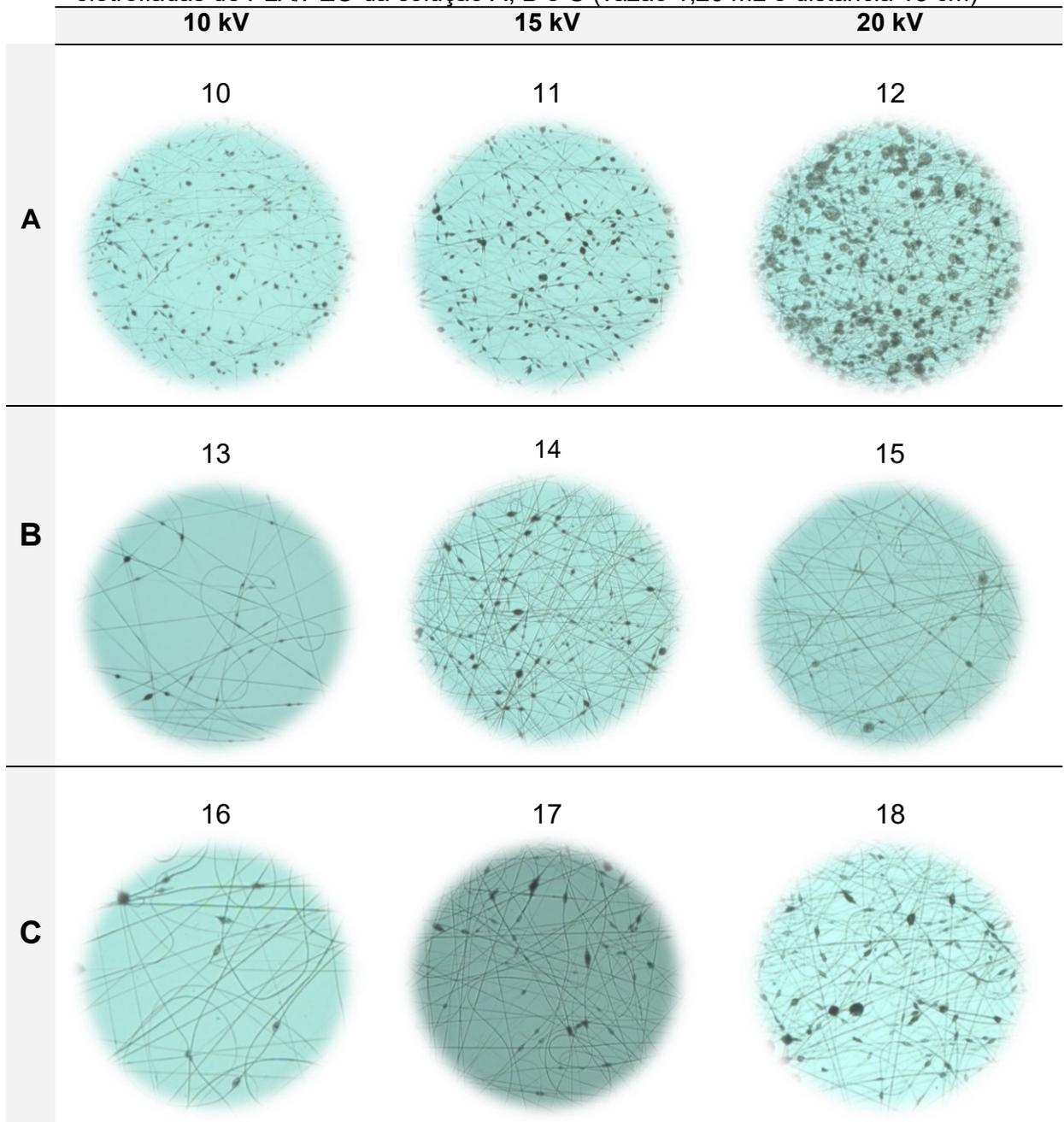
	Solução	Vazão (mL)	Potencial Elétrico (kV)	Distância (cm)	Aspecto da Membrana
1	A (10 %)	1,20	10	15	0
2	A (10 %)	1,20	15	15	0
3	A (10 %)	1,20	20	15	0
4	B (12 %)	1,20	10	15	4
5	B (12 %)	1,20	15	15	4
6	B (12 %)	1,20	20	15	0
7	C (14 %)	1,20	10	15	3
8	C (14 %)	1,20	15	15	1
9	C (14 %)	1,20	20	15	2

Fonte: Autoria própria

5.3 Parametrização do Processo de Eletrofição de Membranas de PLA/PEO

Em paralelo com as etapas de estudo anteriores, avaliou-se o comportamento das fibras eletrofiadas com a adição de um segundo polímero, o poli(óxido de etileno) que foi adicionado em todas as soluções de PLA (10, 12 e 14%). Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 27. Observa-se nas imagens maior número de fibras depositadas, pois a adição de um novo polímero aumentou a viscosidade da solução e o processo de eletrofição melhorou. Nesta etapa todas as soluções eletrofiadas produziram fibras mais uniformes e com menos defeitos.

Figura 27 - Imagens de microscopia ótica com aumento 200 vezes para membranas eletrofiadas de PLA/PEO da solução A, B e C (vazão 1,20 mL e distância 15 cm)



Fonte: Autoria própria

De acordo com a Tabela 12, a membrana que apresentou menor número de defeitos foi a nº 16 com 14% de PLA. Contudo, foi possível ainda perceber grande quantidade de defeitos ao longo das fibras, indicando que a viscosidade ideal ainda não havia sido atingida.

Tabela 12 - Pontuação das membranas de PLA/PEO de acordo com aspecto através da microscopia ótica – A (10% PLA), B (12% PLA), C (14% PLA), e 10 % PEO.

	Solução	Vazão (mL)	Potencial Elétrico (kV)	Distância (cm)	Aspecto da Membrana
10	A	1,20	10	15	4
11	A	1,20	15	15	4
12	A	1,20	20	15	4
13	B	1,20	10	15	3
14	B	1,20	15	15	4
15	B	1,20	20	15	3
16	C	1,20	10	15	2
17	C	1,20	15	15	3
18	C	1,20	20	15	3

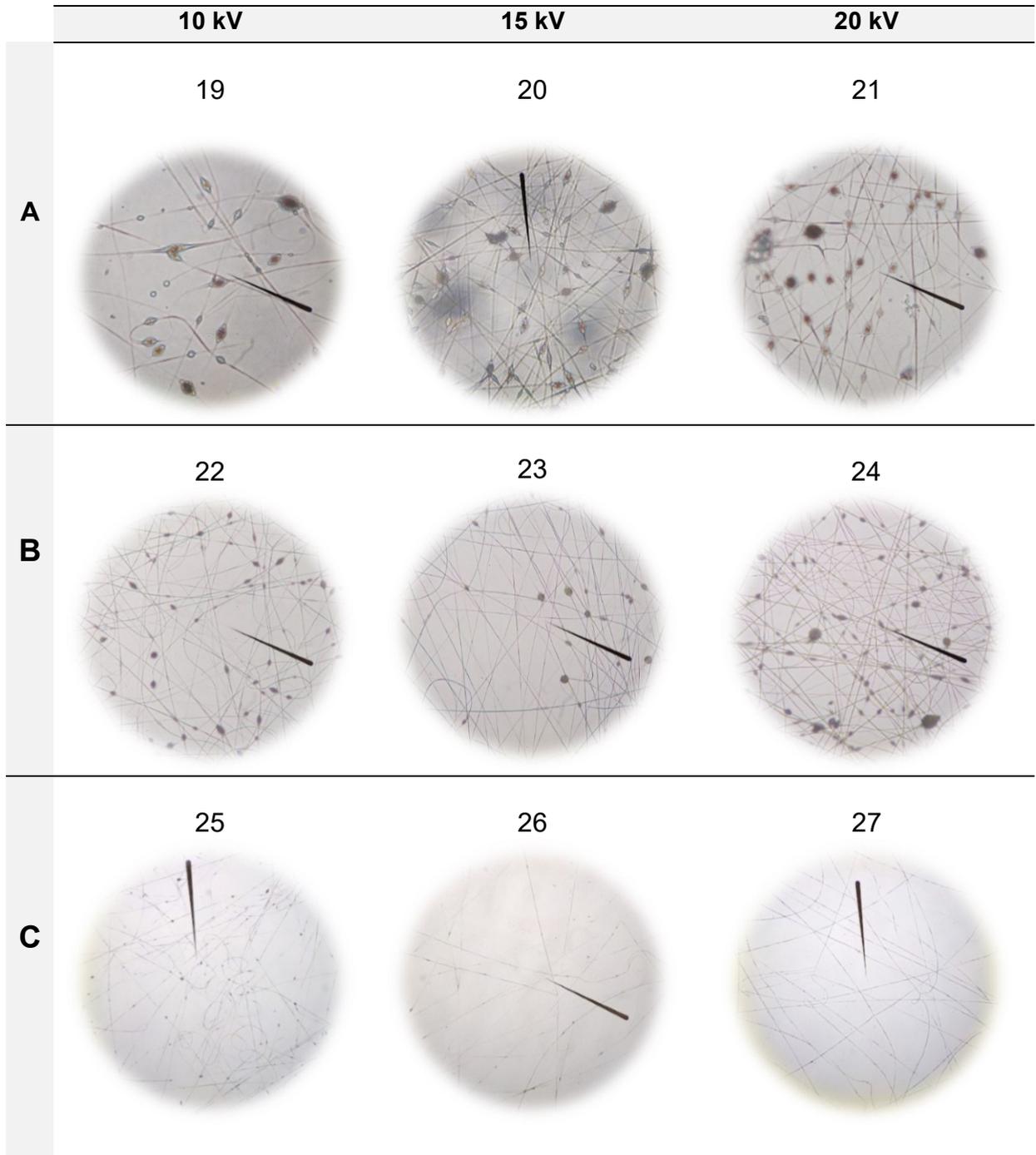
0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10 defeitos); 3 – (11 a 30 defeitos); 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual

Fonte: Autoria própria

5.4 Parametrização do Processo de Eletrofição de Membranas de PLA/PEO/NYS

Na etapa seguinte do estudo foi adicionada à solução polimérica o fármaco Nistatina visando avaliar o processo de eletrofição de acordo com os parâmetros estabelecidos nas etapas anteriores. Foram eletrofiadas soluções com 3 concentrações de PLA (10, 12 e 14%), PEO (10% m/m) e 1.200.000 UI de nistatina. Foram mantidas constantes a distância entre a ponta da agulha e o coletor e a taxa de vazão da bomba de seringa, variando-se somente a tensão em 10, 15 e 20 kV. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 13 e Figura 28.

Figura 28 - Imagens de microscopia ótica com aumento 20 vezes para membranas eletrofiadas de PLA/PEO/NYS da solução A (10:10), B (12:10) e C (14:10) - vazão 1,20 mL e distância 15 cm.



Fonte: Autoria própria

Tabela 13 - Pontuação das membranas de PLA/PEO/NYS de acordo com aspecto através da microscopia ótica: 0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10 defeitos); 3 – (11 a 30 defeitos); 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual

	Solução	Vazão (mL)	Potencial Elétrico (kV)	Distância (cm)	Aspecto da membrana
19	A	1,20	10	15	3
20	A	1,20	15	15	3
21	A	1,20	20	15	3
22	B	1,20	10	15	3
23	B	1,20	15	15	3
24	B	1,20	20	15	3
25	C	1,20	10	15	3
26	C	1,20	15	15	3
27	C	1,20	20	15	2

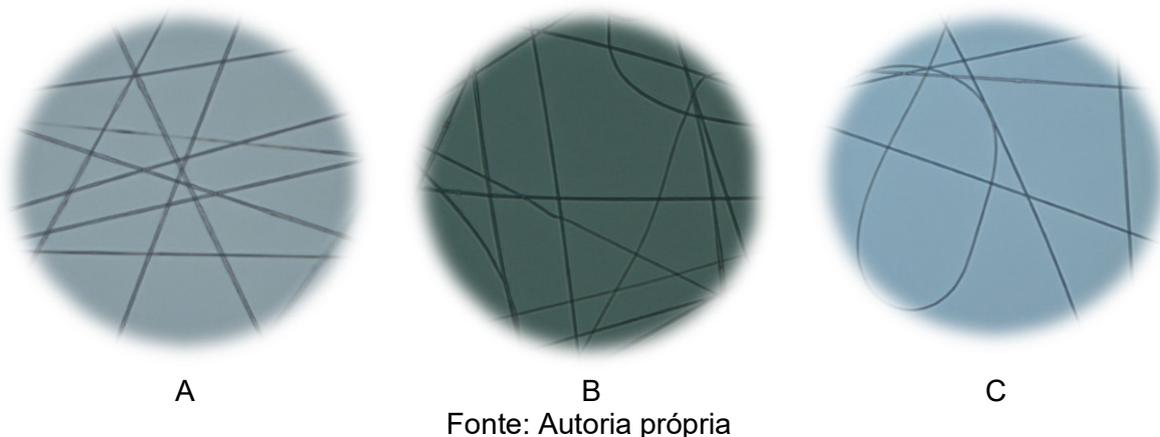
Fonte: Autoria própria

Foi possível constatar que a adição de nistatina aumentou a viscosidade da solução, confirmando os achados na avaliação da viscosidade e, conseqüentemente, houve formação de fibras em todas as amostras, porém ainda com a formação de defeitos, mas estes com aspectos mais alongados e em menor quantidade. Constatou-se também que valores maiores de tensão foram mais eficazes na formação das fibras, pois propiciaram que a diferença de potencial resultante fosse maior que a tensão superficial da solução, facilitando a ejeção até o coletor.

Com base nos resultados obtidos, mesmo com a elevada quantidade de sistemas eletrofiados e com a variação de praticamente todos os parâmetros de eletrofiação, a membrana considerada ideal para ser avaliada como um sistema de liberação de fármaco na cavidade oral ainda não havia sido obtida.

Assim, considerando os resultados obtidos na parametrização do processo de eletrofiação do PLA puro (etapa 1) e, tendo em vista que diversos estudos relatam que o principal fator que interfere na obtenção de um sistema eletrofiado com morfologia micro/nanométrica é a viscosidade, optou-se por avaliar solução de poli(ácido láctico) na concentração de 16% mantendo poli(óxido) de etileno e nistatina conforme sistemas anteriores. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 14 e Figura 29.

Figura 29 - Imagens de microscopia ótica com aumento 50 vezes para membranas eletrofiadas de PLA 16% (A); PLA/PEO 16% (B); PLA/PEO/NYS 16% (C) (vazão 1,20 mL e distância 15 cm)



O aumento da concentração da solução polimérica possibilitou a obtenção de sistemas homogêneos e com fibras aparentemente uniformes na microscopia ótica. O aumento na concentração de PLA resultou em um maior entrelaçamento das cadeias poliméricas na solução, necessário para manter a continuidade do jato durante o processo de eletrofiação, impedindo a formação de defeitos.

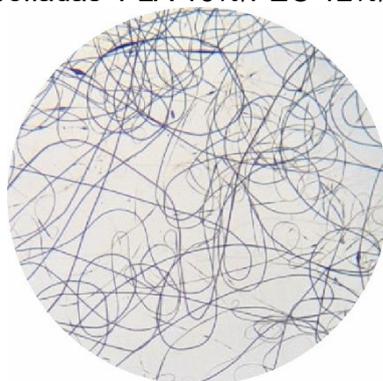
Tabela 14 - Pontuação das membranas de PLA; PLA/PEO; PLA/PEO/NYS com 16% de PLA de acordo com aspecto através da microscopia ótica: 0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10) defeitos; 3 – (11 a 30) defeitos; 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual

	Solução	Vazão (mL)	Potencial Elétrico (Kv)	Distância (cm)	Aspecto da membrana
A	PLA 16%	1,20	10	15	1
B	PLA 16%/PEO	1,20	15	15	1
C	PLA 16%/PEO/NYS	1,20	20	15	1

Fonte: Autoria própria

A parametrização do processo permitiu definir até este momento a utilização de PLA à 16%, PEO 10% e NYS 1.200.000 UI para obtenção de fibras uniformes e sem defeitos. Contudo, com o intuito de avaliar o efeito do PEO na hidrofobicidade e mucoadesividade das membranas obtidas, foi testada a adição de 12% na solução de PLA à 16%. A eletrofiação do novo sistema proposto foi também avaliada preliminarmente através da microscopia ótica e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 30 e Tabela 15.

Figura 30 - Imagens de microscopia ótica com aumento 50 vezes para membranas eletrofiadas PLA 16%/PEO 12%/NYS



Fonte: Autoria própria

Tabela 15 - Pontuação das membranas de PLA/PEO/NYS com 16% de PLA e 12% de PEO de acordo com aspecto através da microscopia ótica: 0 – (não fiou); 1 – (0 a 2 defeitos); 2 – (3 a 10) defeitos; 3 – (11 a 30) defeitos; 4 – (acima de 30 defeitos) por campo visual

	Solução	Vazão (mL)	Tensão (kV)	Distância (cm)	Aspecto da membrana
D	PLA 16%/PEO12%/NYS	1,20	15	15	1

Fonte: Autoria própria

O aumento da concentração da solução polimérica através do aumento da concentração de poli(óxido de etileno) possibilitou a obtenção de sistemas sem defeitos e com fibras aparentemente uniformes na microscopia ótica. Este sistema foi definido como o sistema ideal na fase de desenvolvimento e foi utilizado em todas as demais etapas do estudo.

5.5 Caracterização Morfológica das Membranas

5.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fibras obtidas através da eletrofição de PLA puro normalmente tem formato circular homogêneo, porém outros estudos revelaram que as fibras podem apresentar-se no formato de fita e morfologias de cordões, geralmente causado pela aglomeração de fibras após a evaporação do solvente. Além disso, a eletrofição pode proporcionar a formação de fibras porosas também causados pela evaporação do solvente ou pela umidade do ambiente, visto que quanto mais alta a umidade, maior a quantidade e tamanho de poros produzidos (FRENOT; CHRONAKIS, 2003; UNILA, 2007; AMIRAH MD ZUBIR *et al.*, 2020).

Para prever as propriedades biológicas das membranas produzidas, é necessário estudar suas microestruturas. As imagens de MEV mostraram a superfície das fibras e o diâmetro médio foi calculado.

Tendo em vista as etapas preliminares de parametrização do processo de eletrofição, foram selecionadas as membranas eletrofiadas com parâmetros fixos de vazão (1,20 mL), tensão (15 kV) e distância entre agulha e coletor 15 cm, já estabelecidos através da microscopia ótica, para então confirmar a influência da concentração da solução polimérica na formação e no diâmetro das fibras. As membranas selecionadas para MEV estão descritas na Tabela 16 e os resultados obtidos quanto ao aspecto da membrana e diâmetro das fibras, na Tabela 17 e Figuras 31, 32, 33 e 34.

Tabela 16 - Membranas selecionadas para análise de MEV – A (10% PLA), B (12 % PLA), C (14 % PLA), D (16% PLA)

	Concentração	Distância agulha/coletor	Tensão	Vazão
2	PLA A	15 cm	15 kV	1,20 mL
5	PLA B	15 cm	15 kV	1,20 mL
8	PLA C	15 cm	15 kV	1,20 mL
11	PLA A/PEO	15 cm	15 kV	1,20 mL
14	PLA B/PEO	15 cm	15 kV	1,20 mL
17	PLA C/PEO	15 cm	15 kV	1,20 mL
20	PLA A/PEO/NYS	15 cm	15 kV	1,20 mL
23	PLA B/PEO/NYS	15 cm	15 kV	1,20 mL
26	PLA C/PEO/NYS	15 cm	15 kV	1,20 mL
28	PLA D	15 cm	15 kV	1,20 mL
29	PLA D/PEO	15 cm	15 kV	1,20 mL
30	PLA D/PEO/NYS	15 cm	15 kV	1,20 mL

Fonte: Autoria própria

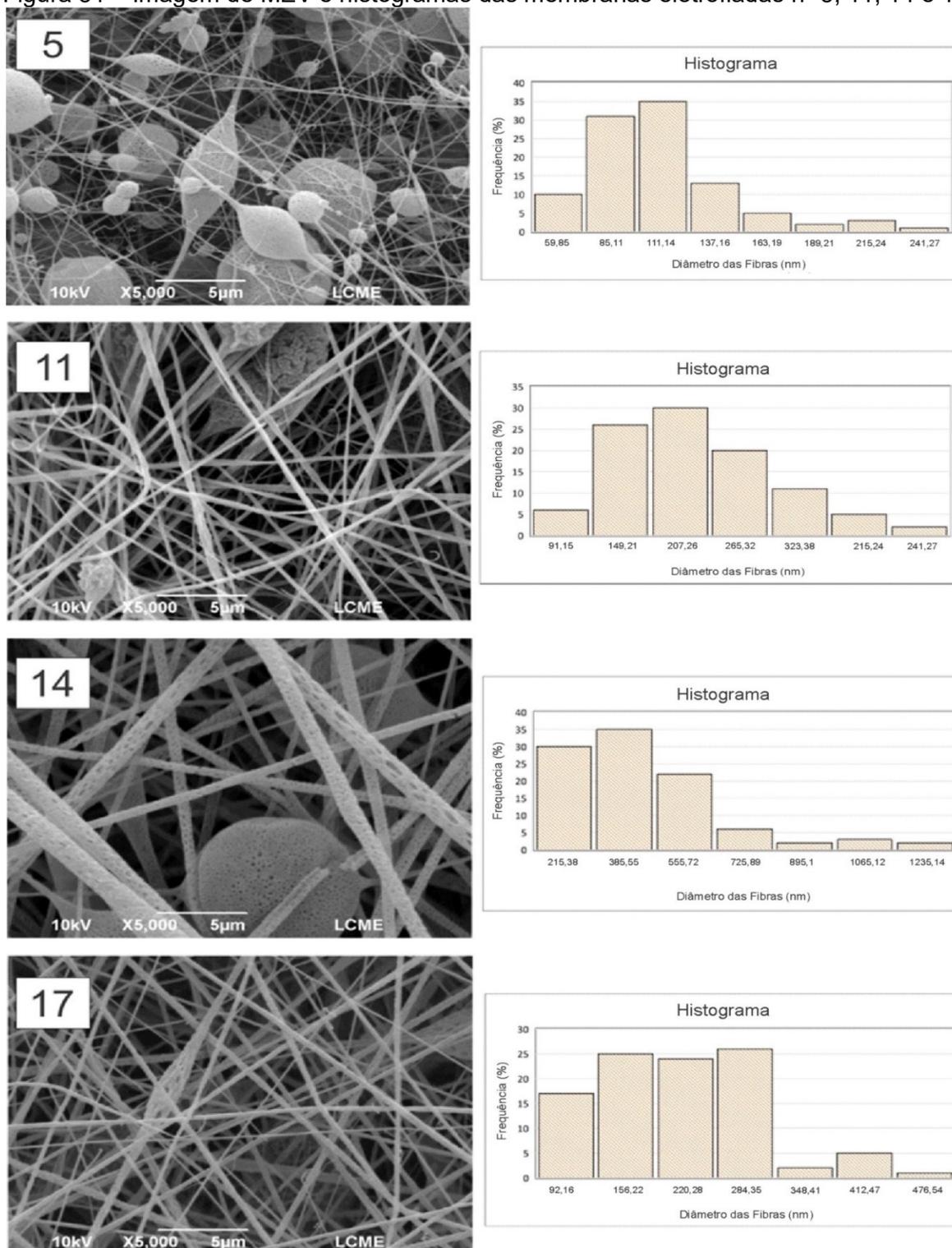
Tabela 17 - Aspecto e diâmetro médio das fibras das membranas eletrofiadas

	Concentração	Aspecto da Membrana	Diâmetro médio das fibras (nm)	Desvio Padrão
2	PLA A	Não formou fibra	-	-
5	PLA B	Defeitos	122	35
8	PLA C	Não formou fibra	-	-
11	PLA A/PEO	Lisa e defeitos	253	77
14	PLA B/PEO	Poros e defeitos	516	230
17	PLA C/PEO	Defeitos	245	85
20	PLA A/PEO/NYS	Defeitos	637	230
23	PLA B/PEO/NYS	Poros e sem defeitos	587	244
26	PLA C/PEO/NYS	Lisa e homogênea	400	137
28	PLA D	Lisa e defeitos	229	50
29	PLA D/PEO	Lisa e homogênea	640	220
30	PLA D/PEO/NYS 16:10	Lisa e Homogênea	922	584
31	PLA D/PEO/NYS 16:12	Lisa e Homogênea	420	104

Fonte: Autoria própria

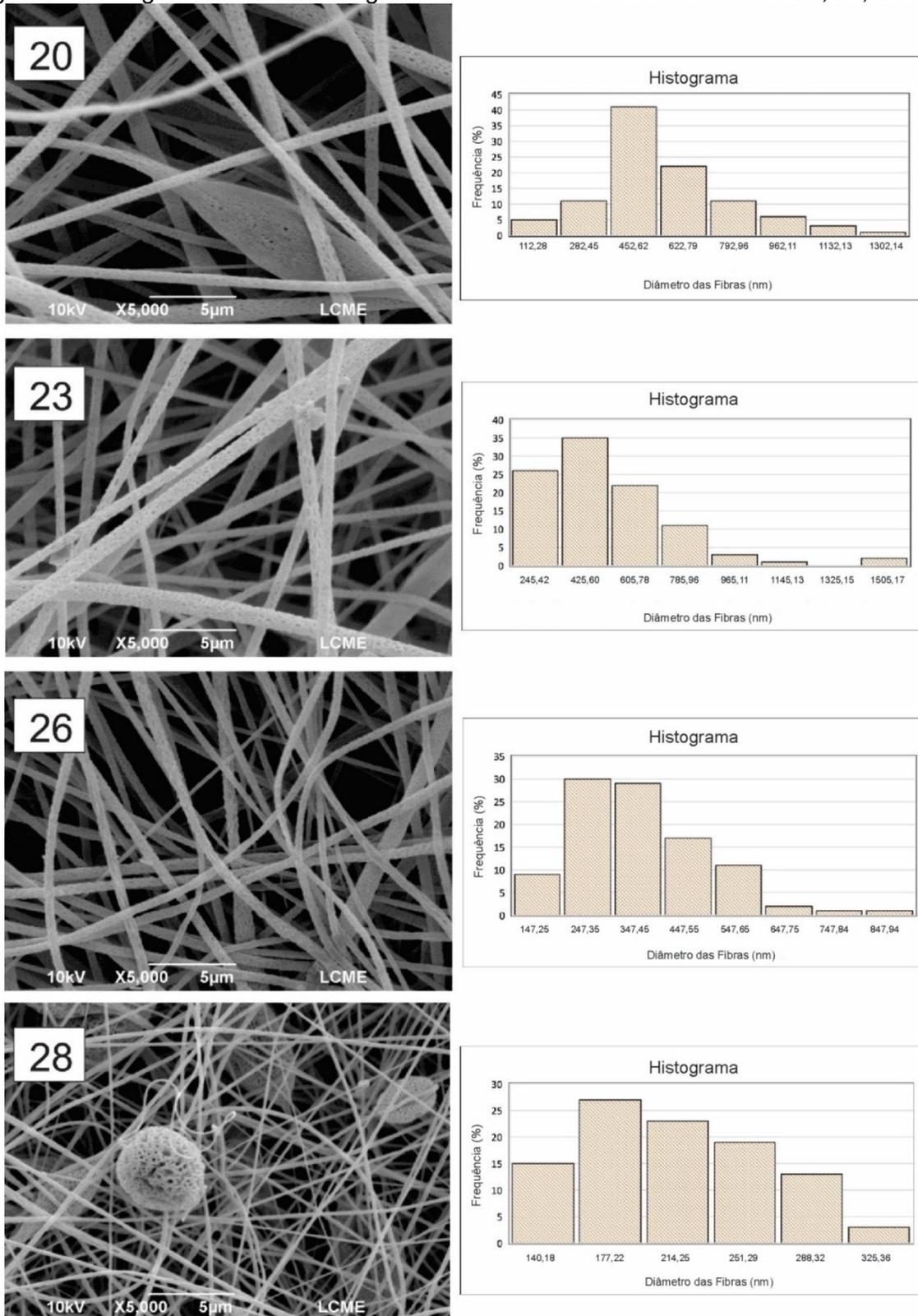
Os resultados obtidos demonstraram que o aumento da viscosidade da solução permitiu a obtenção de fibras sem defeitos e mais homogêneas, corroborando com estudos de ZENG, 2003 e SOFI, 2020, onde variações morfológicas nas fibras podem ser o resultado de modificações na viscosidade da solução polimérica.

Figura 31 – Imagem de MEV e histogramas das membranas eletrofiadas nº 5, 11, 14 e 17



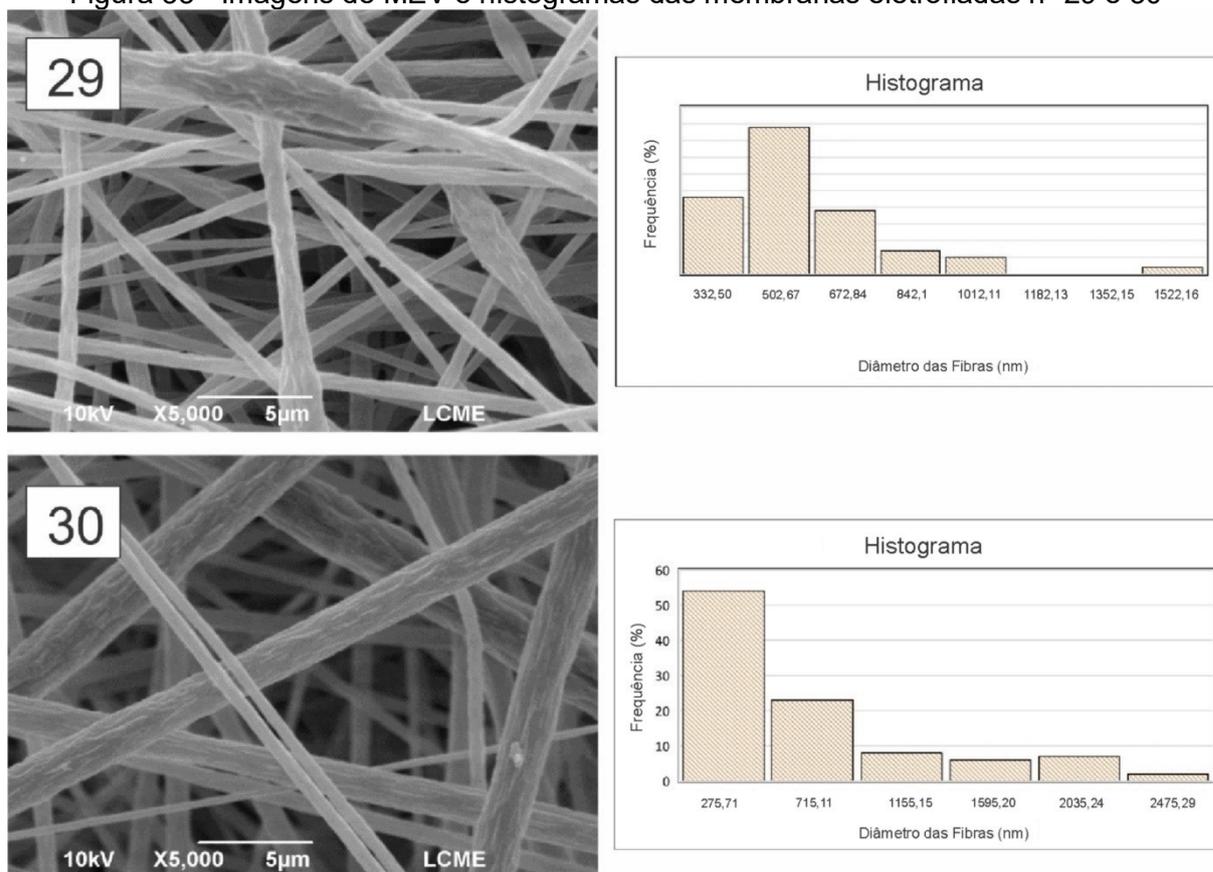
Fonte: Autoria própria

Figura 32 – Imagens de MEV e histogramas das membranas eletrofiadas nº 20, 23, 26 e 28



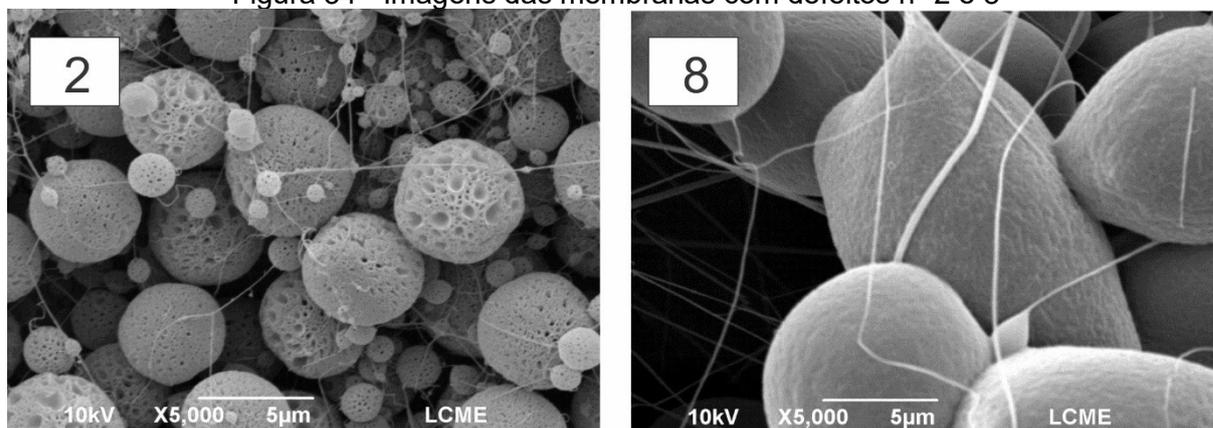
Fonte: Autoria própria

Figura 33 - Imagens de MEV e histogramas das membranas eletrofiadas nº 29 e 30



Fonte: Autoria própria

Figura 34 - Imagens das membranas com defeitos nº 2 e 8



Fonte: Autoria própria

As membranas 29 e 30 (Figura 33), concentração de PLA/PEO (16:10) e PLA/PEO/NYS (16:10) respectivamente, apresentaram aspecto liso e eletrofiaram livres de defeitos ao longo da formação das fibras, porém verifica-se o aumento significativo do diâmetro médio das fibras. Este fato pode ser justificado pelo aumento da viscosidade da solução, devido ao aumento da concentração do PLA e da adição de nistatina, e das forças viscoelásticas que reduzem o alongamento do jato durante

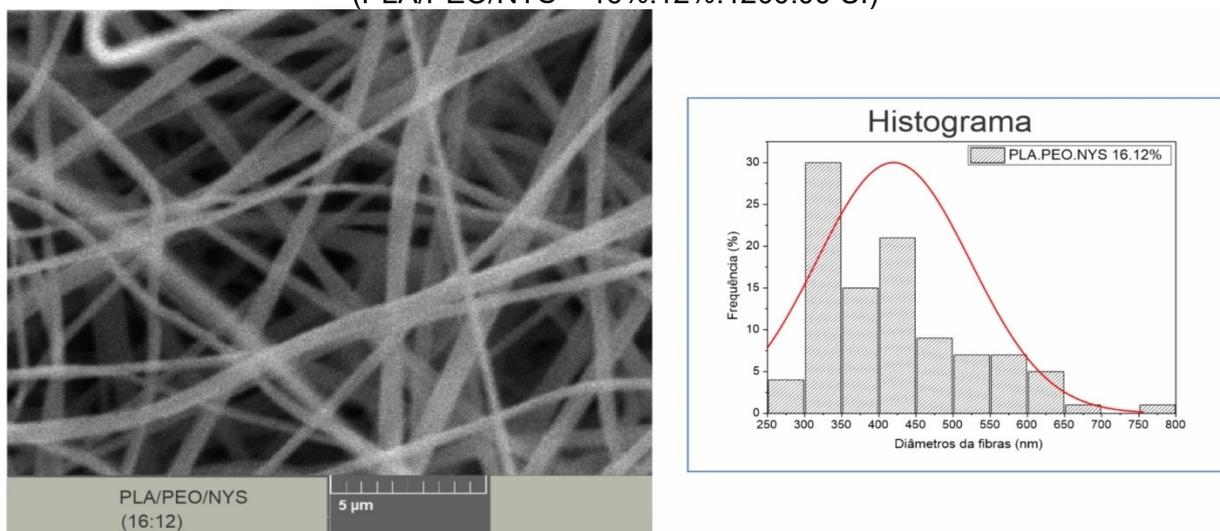
o estiramento e favorecem o emaranhamento das cadeias poliméricas. As membranas nº 2 e 8 (Figura 34) apresentaram uma quantidade muito elevada de defeitos e não foi possível avaliar o diâmetro das poucas fibras obtidas.

As fibras obtidas nas membranas nº 14 e 23 apresentaram-se porosas, efeito que pode ser observado quando a eletrofiação é realizada em ambiente com alta umidade e a solução composta de polímeros hidrofílicos. Um outro fator que pode ocasionar a formação de poros nas fibras é a distância pequena (menor que 10 cm) entre a agulha e o coletor. Considerando que no experimento realizado, a distância entre agulha e o coletor foi mantida constante em todos os ensaios, presume-se que a umidade relativa do ar tenha exercido efeitos sobre eletrofiação. A umidade tem sido associada à criação/supressão de defeitos na forma de gotas, bem como a formação de superfícies porosas em fibras, porém o controle deste parâmetro é extremamente difícil, dadas as condições climáticas variáveis em ambientes laboratoriais, o que torna os estudos de difícil reprodução (DESTEFANO; KHAN; TABADA, 2020).

O aumento do diâmetro das fibras pode estar relacionado também com a diminuição da condutividade da solução, pois apesar da formação de defeitos, as fibras da membrana nº 5 apresentaram menor diâmetro médio. Verificou-se em ensaios anteriores que soluções de PLA apresentam valores maiores de condutividade elétrica e essa conseqüentemente, favorece a formação de fibras com diâmetros menores.

A membrana 31 (Figura 35) foi selecionada como membrana de trabalho e a partir dela foram realizados os demais ensaios do estudo. A escolha baseou-se nas avaliações preliminares e nos resultados satisfatórios encontrados através da microscopia eletrônica. A membrana 31 foi desenvolvida visando melhor mucoadesividade do sistema, desta forma, optou-se pelo aumento da concentração de poli(óxido de etileno), porém, houve elevação da viscosidade da solução e conseqüentemente, aumento no diâmetro das fibras. Contudo, a membrana apresentou-se com aspecto liso, homogêneo, sem presença de defeitos, com diâmetro médio das fibras de 420 nm, o que resultou em uma membrana microestruturada que permitiu a incorporação do fármaco através do processamento realizado.

Figura 35 - Imagens da membrana selecionada para sequência de estudos– membrana 31 (PLA/PEO/NYS – 16%:12%:1200.00 UI)



Fonte: Autoria própria

Cabe destacar que o diâmetro médio das fibras é considerado fator importante na cinética de liberação de fármacos, uma vez que se relaciona com a área superficial das fibras. De acordo com Chen *et al.* (2019) e Li *et al.* (2020) as fibras obtidas a partir do polímero PLA com menores diâmetros favorecem o acúmulo do fármaco na superfície e o *efeito burst* e diâmetros ligeiramente maiores podem ser capazes de manter a liberação mais estável. Neste sentido, as fibras obtidas apresentaram-se em sua grande maioria na escala micrométrica e muito próximas da escala nanométrica, o que se pode considerar o sistema promissor para liberação local da nistatina da formulação.

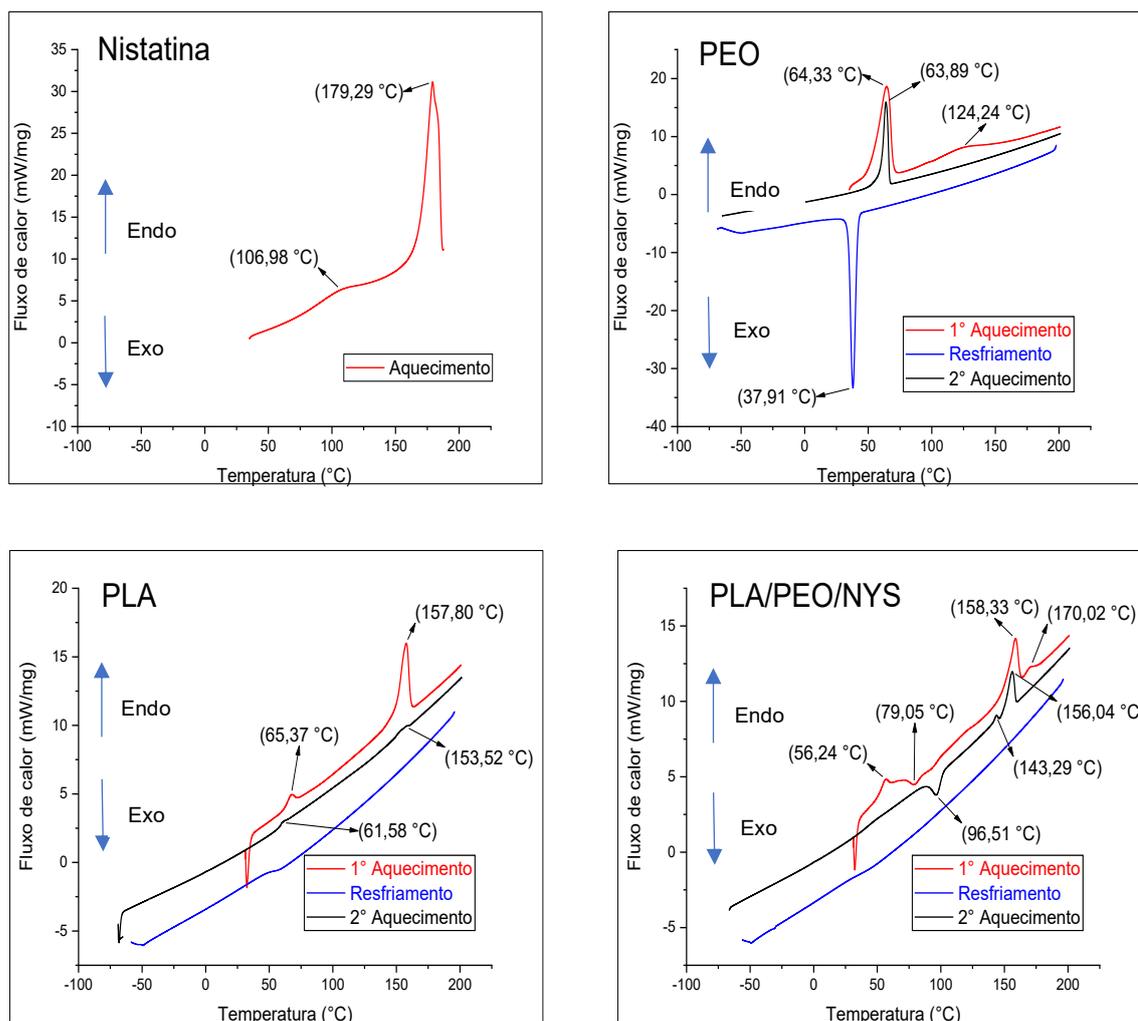
5.6 Caracterização Térmica das Membranas

5.6.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial pode ser definida como uma técnica que mede as temperaturas e o fluxo de calor associados com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Estas medidas fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos, exotérmicos ou mudança de capacidade calorífica (DRZEŹDŹON *et al.*, 2019).

Na Figura 36 são apresentadas as curvas de DSC do PLA matéria-prima, PEO matéria-prima, NYS matéria-prima e da membrana eletrofiada. Para os polímeros foi realizado ciclos de aquecimento, resfriamento e segundo ciclo de aquecimento, de modo a avaliar a apagar o histórico térmico do processo.

Figura 36 - Curva de DSC NYS (matéria-prima), PEO (matéria-prima), PLA (matéria-prima) e membrana PLA/PEO/NYS



Fonte: Autoria própria

A amostra de NYS apresenta um evento endotérmico, largo em 179,29 °C, valor que corresponde à temperatura de fusão da nistatina. O pico largo mostra que a nistatina é composta por uma mistura de NYS A1, A2 e A3. Contudo, a presença de um único pico evidencia a prevalência do composto (A1), normalmente o mais abundante na mistura (KONELL, 2014). Observa-se também um evento endotérmico em 106,98 ° que pode estar relacionado com polimorfismo da amostra.

Para o PEO puro, observa-se no primeiro aquecimento uma transição endotérmica em 64,33 °C relacionada a temperatura de fusão do polímero (em torno de 70 °C). Em 37,91 °C observa-se um pico de cristalização no resfriamento. Para o PLA puro, observa-se a T_g em 65,37 °C, a T_m entre 157,80 °C, valores dentro das faixas típicas reportadas para o PLA de T_g , entre 50 e 80 °C, e de T_m , entre 130 a 180 °C. A T_g indica a transição onde se inicia o movimento de segmentos de cadeias poliméricas, a passagem de um estado vítreo para um estado mais flexível e menos ordenado, é uma transição de segunda ordem, portanto se manifesta como uma alteração da linha de base das curvas de DSC (CANEVAROLO JR., 2004). No resfriamento, não é observada cristalização indicando a característica amorfa do polímero, sendo que no segundo aquecimento o pico de fusão é praticamente imperceptível.

A curva do primeiro aquecimento obtida por DSC da membrana PLA/PEO/NYS, verifica-se pico endotérmico relativo à fusão do PEO em torno de 56,24 °C, um evento em torno de 80 °C referente T_q do PLA e em aproximadamente 158 °C tem-se o pico referente à fusão do PLA. Em aproximadamente 170 °C tem-se um evento referente à fusão da nistatina que ocorre em temperatura menor no sistema eletrofiado quando comparada à temperatura da nistatina pura. A nistatina contida na membrana apresentou pico endotérmico diminuído para aproximadamente 170 °C, e o deslocamento pode estar relacionado com a transformação parcial da NYS para a forma amorfa, ou a interação química entre os componentes da formulação (KONELL, 2014).

O PLA é um polímero de cristalização lenta e a temperatura de transição vítrea encontra-se acima da temperatura ambiente. Destefano, Khan e Tabada (2020) relatam em seus estudos que fibras eletrofiadas de solução de PLA geralmente exibem um pico de cristalização a frio por meio de análise DSC, bem como uma separação de dois picos perto do ponto de fusão, que dá origem a diferentes estruturas cristalinas: α , estrutura com morfologia de cadeia lamelar e β , estrutura com morfologia fibrilar, conforme observa-se no segundo aquecimento para a membrana PLA/PEO/NYS.

As propriedades térmicas de PEO e PLA são muito diferentes individualmente, uma vez que PEO com massa molar de 100.000 g/mol tem um ponto de fusão de 66 °C e a temperatura de transição vítrea cerca de 65 °C. De acordo com a literatura, a mistura de PEO com PLA tende a reduzir a temperatura de transição vítrea, mas

também diminuir a temperatura fusão de PLA, porém, este fato não foi observado nas curvas de DSC realizadas, provavelmente pela baixa concentração de PEO adicionada em relação à massa de PLA na formulação.

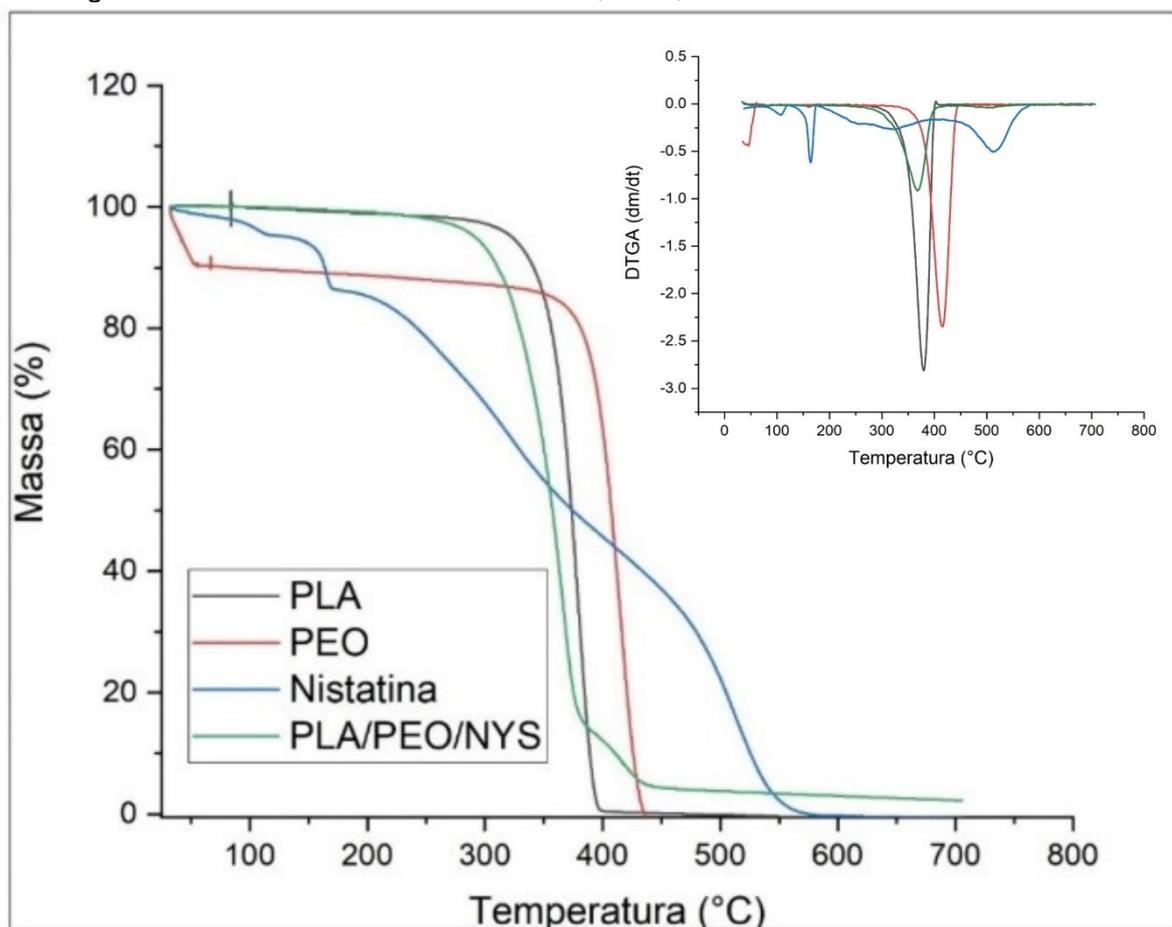
PLA e PEO são polímeros semicristalinos, cuja cristalinidade pode ser estimada a partir de sua entalpia de fusão. A avaliação da miscibilidade de PLA e PEO analisando os valores de T_g das misturas de polímero não foi possível de ser realizada, uma vez que existe uma sobreposição considerável entre a T_g de PLA e a T_m de PEO, tornando a medição quantitativa difícil. No entanto, pesquisas mostram uma tendência decrescente de T_g de PLA, não observada neste estudo, indicando que com o aumento do teor de PEO quando adicionado como segundo polímero em concentrações acima de 10%, pode agir como um plastificante para o PLA.

5.6.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é a técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa da amostra, em função da programação de temperatura. A técnica consiste em aplicar calor ao material a uma razão constante de aquecimento e sua massa é monitorada ao longo do processo, com o auxílio de balança de alta precisão. Permite quantificar a degradação através da variação de massa ao longo do processo de aquecimento do material.

Para determinar a estabilidade térmica das membranas produzidas, foram realizadas análises de TGA em amostras de PLA em grânulo, PEO matéria-prima, NYS matéria-prima e da membrana eletrofiada (Figura 37).

Figura 37 - Curva de TGA/DTGA de PLA, PEO, NYS e membrana PLA/PEO/NYS



Fonte: Autoria própria

Através da análise da curva termográfica de TGA e DTGA para amostras de PEO, PLA, Nistatina e membrana de PLA/PEO/NYS, observou-se que os valores de decomposição térmica apresentam intervalos de decomposição entre 330 a 403 °C para PLA em grânulo. Para o PEO observam-se estágios de perda de massa correspondente à sua desidratação que se inicia em 90 °C devido a presença de água por ser um polímero hidrofílico, com pico máximo em 440 °C e perda de massa de cerca de 98% nesse intervalo.

A perda de massa de NYS ocorreu de forma gradual em mais de uma etapa de degradação, o que pode ser justificado pela sua composição ser de uma mistura dos compostos A1, A2 e A3. A desidratação inicia em 90 °C com a primeira etapa, que pode estar relacionada à água por se tratar de um fármaco higroscópico. Após a perda de água residual, a curva apresenta dois eventos principais de decomposição no intervalo analisado, o primeiro na região entre 178 °C e 186 °C e o segundo, uma etapa não muito bem definida, mas que compreende a região entre 200 °C e 580 °C.

O perfil obtido de perda de massa em função da temperatura obtido para nistatina é semelhante ao resultado obtido por Brescansin (2006) e Konell (2014).

Para a membrana eletrofiada, a perda de massa dos componentes ocorreu de forma gradual em mais de uma etapa de degradação, iniciando em 297 °C com a primeira etapa, e a segunda etapa em aproximadamente 370 °C e apresentou variação de massa em torno de 97% neste intervalo. O perfil obtido de perda de massa em função do aumento da temperatura obtido para a membrana PLA/PEO/NYS é semelhante aos resultados obtidos na literatura (AYDOGDU; SUMNU; SAHIN, 2018).

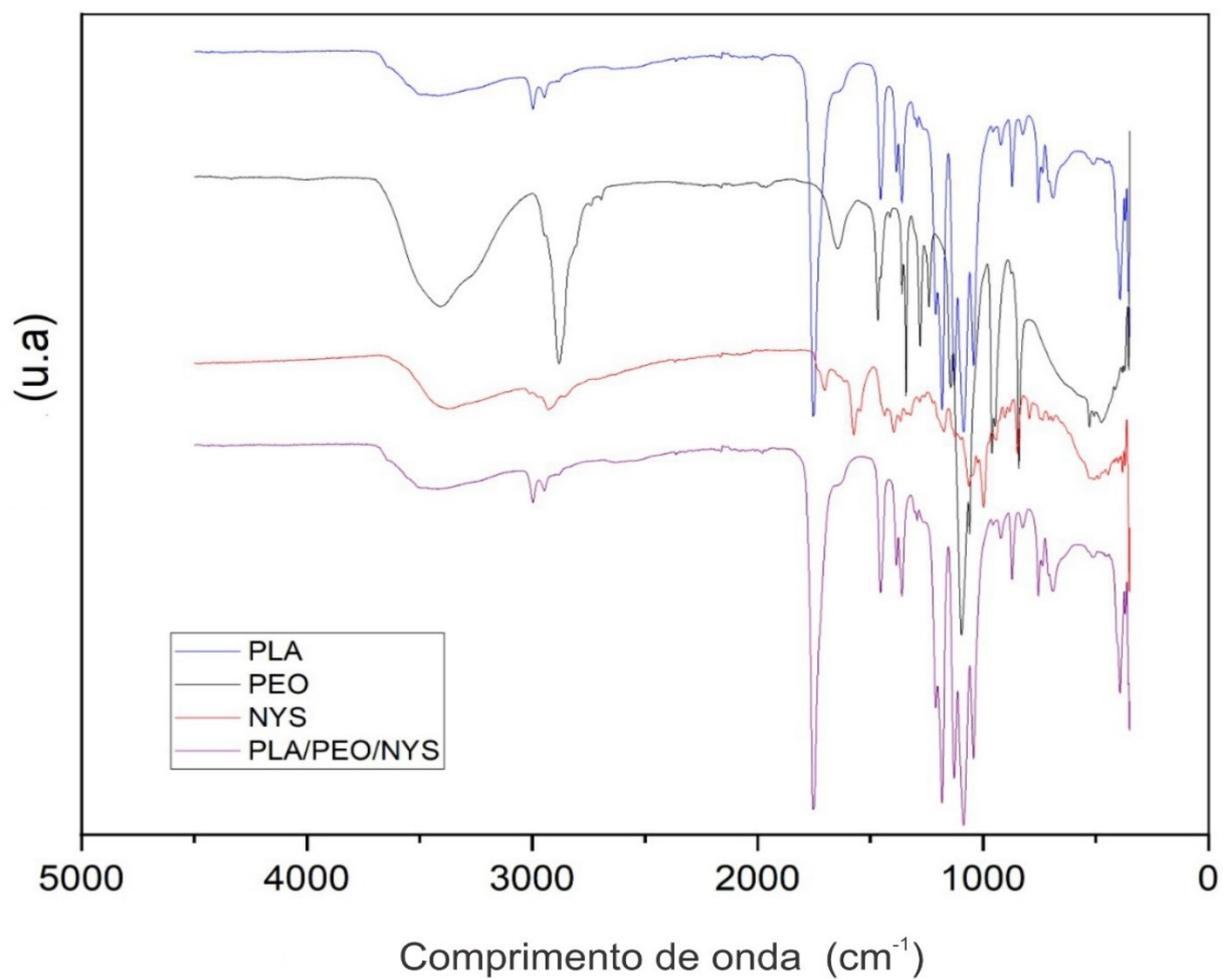
5.7 Caracterização Química das Membranas

5.7.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho fornece informações diretas sobre o comportamento vibracional das moléculas de uma substância. A importância da técnica está no fato de que cada substância possui um conjunto específico de estiramentos que a identifica (BIONANOCOMPOSITES, 2018).

Neste estudo, a espectroscopia de infravermelho foi realizada com intuito de identificar a presença de nistatina na membrana preparada por eletrofição e estudar a interação dos grupos químicos da nistatina, do PEO e do PLA após o processo de eletrofição. As Figuras 38 a 42 mostram os espectros de FTIR obtidos.

Figura 38 - Espectro FTIR PLA (matéria-prima), NYS (matéria-prima), PEO (matéria-prima) e Membrana NYS/PEO/PLA (16:12)



Fonte: Autoria própria

Tabela 18 mostra as bandas relacionadas ao PLA, PEO, NYS e das membranas eletrofiadas de PLA, PLA/PEO e PLA/PEO/NYS.

Tabela 18 - Espectros FTIR: PLA (matéria-prima); PEO (matéria prima); NYS (matéria-prima); membrana eletrofiada PLA/PEO/NYS

PLA (cm ⁻¹)	PEO (cm ⁻¹)	NYS (cm ⁻¹)	PLA/PEO/NYS (cm ⁻¹)	Modo vibracional
3500		3354		Estiramento NH, OH
2995			2947	Estiramento assimétrico de CH ₂
		2928		Estiramento assimétrico de CH ₂
2947	2880			Alongamento C-H e bandas CH ₂
	2743			Alongamento C-H e bandas CH ₂
	2695			Alongamento C-H e bandas CH ₂
1751				Estiramento carbonila C=O
			1747	Estiramento carbonila/Lactona C=O
	1658			Estiramento carbonila C=O
		1708		Lactona
			1456	Hibridização sp ³ do grupo CH ₃
		1438		Hibridização sp ³ do grupo CH ₃
	1467			Hibridização sp ³ do grupo CH ₃
1452				Hibridização sp ³ do grupo CH ₃
		1396		Deformação simétrica de CH ₃
			1380	Deformação simétrica de CH ₃
1385				Deformação simétrica de C-H
	1360			Torção CH ₂ e CH ₂
		1320		Torção CH ₂ e CH ₂
1292				Estiramento C-O
			1183	Estiramento C-O
1209	1059			Estiramento C-O-C
		1174		Estiramento C-O
1182				Estiramento C-O
1126				Estiramento C-O
			1127	Estiramento C-O-C
1086				Estiramento C-O
			1086	Estiramento C-O
		1066		Estiramento simétrico de CH ₃
1041		1000		Estiramento simétrico de CH ₃
	960			Vibração de balanço CH ₂
918			951	Vibração de balanço CH ₂
		883		Vibração de balanço CH ₂
870			867	Estiramento fase cristalina C-C
		847		Duplas ligações CH=CH
687	841			Vibração de balanço CH ₂
		795		Vibração de balanço CH ₂
			754	Vibração de balanço CH ₂

Fonte: Autoria própria

As absorções características do PLA são três fortes bandas devidas a vibrações do grupo C-CO-O-C. São, respectivamente, a banda relativa ao estiramento do C=O em 1751 cm⁻¹, a banda do estiramento assimétrico do C-O em 1182 cm⁻¹ e em 1086 cm⁻¹ ao estiramento simétrico C-O-C. A presença de uma banda intensa na região 3500-3000 cm⁻¹ (estiramento do grupamento O-H) é um indicativo presença de água no PLA (CHOKSI; DESAI, 2017).

Para o PEO, as absorções características são uma banda larga e intensa devido aos grupos hidroxila terminais da cadeia associados por ligações de hidrogênio

(2880 cm^{-1}), e uma banda intensa em 1092 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico C-O-C (ALAKRACH *et al.*, 2018).

O espectro e as bandas características da NYS são encontrados em 847 cm^{-1} relativos às duplas ligações CH=CH, 1066 cm^{-1} devido a estiramento simétrico de CH₃, 1708 cm^{-1} pela lactona, 2928 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico de CH₂ e 3354 cm^{-1} o estiramento NH - OH (STEFANOVIC *et al.*; 2013; KONELL, 2014).

O8 uma vez que ocorreram deslocamentos e desaparecimento de alguns estiramentos na faixa de 2947 cm^{-1} referente à alongamento C-H e banda CH₂ do PEO; o estiramento 2991 cm^{-1} relacionado ao estiramento assimétrico de CH₂ da nistatina e estiramento em 1747 cm^{-1} referente ao grupo lactona. Estas interações podem ocorrer em ligações de hidrogênio que envolvem vários grupamentos (CHOKSI; DESAI, 2017).

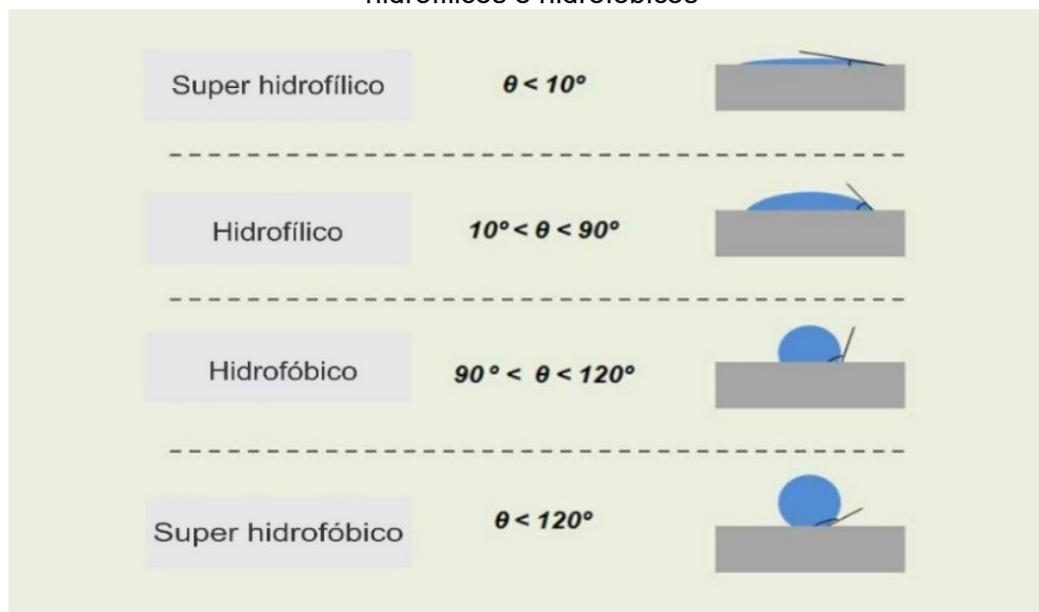
Contudo, o FTIR das membranas produzidas mostrou a manutenção da maior parte das bandas características das matérias-primas. A ausência de bandas novas nos espectros mostra que a interação entre os componentes dos filmes é pontual e não há formação de novas espécies químicas.

5.8 Caracterização Superficial das Membranas

5.8.1 Medidas de Ângulo de Contato

A interação entre uma superfície e um determinado líquido pode ser estudada através da medida do chamado ângulo de contato, definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado (YANG *et al.*, 2020). Através das medidas de ângulo de contato entre uma gota líquida e a superfície de um material sólido é possível investigar propriedades como molhabilidade ou o caráter hidrofílico/hidrofóbico por meio da interação da superfície do sólido e do líquido. Quando um líquido polar se deposita completamente sobre a superfície sólida, quase sempre apresenta um ângulo de contato entre zero e 30°, neste caso o material é considerado hidrofílico e super hidrofílico. Porém, se o líquido polar não se depositar completamente, apresentará ângulos de contato maiores, podendo chegar até 180° e neste caso, o material é considerado hidrofóbico ou super hidrofóbico (Figura 39) (SHARIFI *et al.*, 2020).

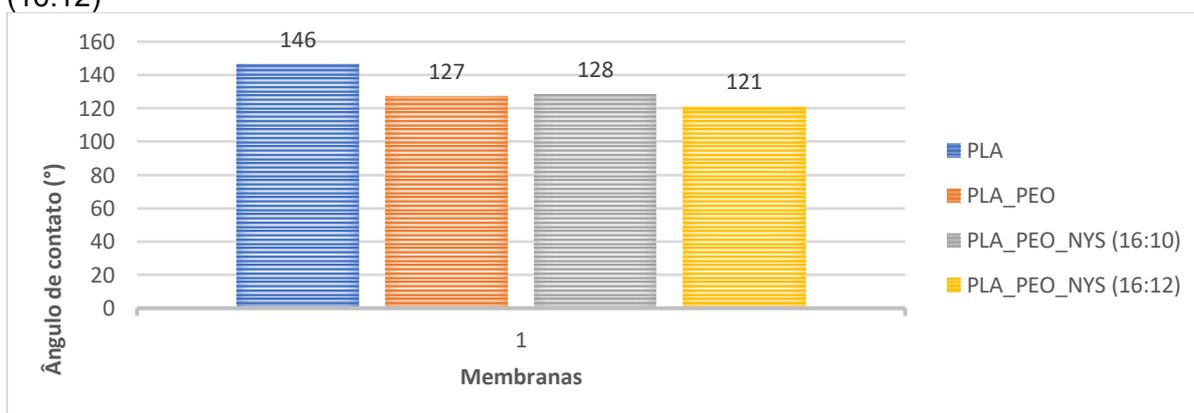
Figura 39 - Representação esquemática da formação de ângulo de contato para materiais hidrofílicos e hidrofóbicos



Fonte: Adaptado de Yang *et al.* (2020)

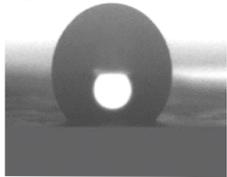
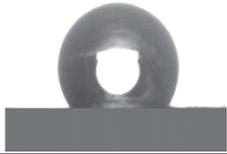
O Gráfico 2 e a Figura 40 mostram os ângulos de contato das membranas eletrofiadas de PLA, PLA/PEO e PLA/PEO/NYS obtidos para estudo da molhabilidade. A membrana de PLA apresentou ângulo de contato de 146°, membrana de PLA/PEO ângulo de 127° e PLA/PEO/NYS (16:10) e PLA/PEO/NYS (16:12) ângulos de 128° e 121°, respectivamente.

Gráfico 2 - Ângulos de contato das Membranas PLA, PLA/PEO e PLA/PEO/NYS (16:10) e (16:12)



Fonte: Autoria própria

Figura 40 - Molhabilidade das membranas eletrofiadas: a – PLA; b – PLA/PEO; c – PLA/PEO/NYS (16:10 m/m); d – PLA/PEO/NYS (16:12 m/m)

Membrana	Ângulo de Contato (°)	Imagem
PLA	146	a 
PLA/PEO (16:10)	127	b 
PLA/PEO/NYS (16:10)	128	c 
PLA/PEO/NYS (16:12)	121	d 

Fonte: Autoria própria

Com base nos resultados obtidos, observa-se que as membranas de PLA apresentam um caráter hidrofóbico, estando esses resultados de acordo com aqueles apresentados na literatura por SHARIFI *et al.* (2020), que reportou ângulo de contato para o PLA (filme) de cerca $100^\circ \pm 1$. O ângulo de contato de uma gota na membrana eletrofiadas depende da energia da superfície do material e da tensão superficial do líquido, micro/nanofibras de PLA possuem caráter hidrofóbico e seu ângulo de contato pode variar de acordo com a concentração do polímero.

A adição de PEO na solução em concentração de 10% (m/m) e 12% (m/m) promoveu um decaimento de ângulo de 19° e 25° respectivamente, aumentando a hidrofiliabilidade da formulação. O (poli)óxido de etileno é solúvel em água e caracteriza-se como uma substância hidrofílica, sendo que a presença de grupos hidroxila ao final da cadeia polimérica pode melhorar parcialmente a absorção de água da superfície das fibras (MORADKHANNEJHAD *et al.*, 2020).

A adição do fármaco nistatina à formulação não apresentou diferença significativa no valor de ângulo de contato, o que pode ser considerado um resultado

favorável, tendo em vista o caráter também hidrofóbico do mesmo. As membranas eletrofiadas PLA/PEO/NYS (16:10 e 16:12), entretanto, permaneceram com caráter hidrofóbico, o que pode ser um fator relevante nos estudos futuros de dissolução e liberação do fármaco, uma vez que a cinética de liberação se relaciona com a hidrofobicidade da matriz polimérica. Matrizes hidrossolúveis possibilitam o desenvolvimento de sistemas de dissolução rápida, enquanto que a combinação de polímeros com características químicas diferentes pode possibilitar a liberação controlada do ativo (DEEPAK; GOYAL; RATH, 2018).

5.9 Caracterização Físico-Química

5.9.1 Intumescimento

As propriedades hidrofílicas das membranas eletrofiadas também foram estudadas por medidas de grau de intumescimento em função do tempo. O intumescimento é descrito como o aumento do volume do polímero quando este está imerso em determinado não solvente ou também pode ser determinado a partir da quantidade da massa de fluido absorvida pelo polímero em relação a sua massa inicial, ou seja, determina a absorção máxima de água que a membrana pode comportar. Inicialmente optou-se por avaliar o intumescimento em água em 0,5, 1,5 e 3 minutos e os resultados obtidos estão apresentados no Quadro 8.

Quadro 8 - Grau de Intumescimento (%) em 0,5, 1,5 e 3 minutos das membranas eletrofiadas PLA/PEO (16:10); PLA/PEO/NYS (16:10); PLA/PEO/NYS (16:12)

	0,5'	1,5'	3'
PLA/PEO (16:10)	542,06 ± 0,0093	566,66 ± 0,0093	569,04 ± 0,0094
PLA/PEO/NYS (16:10)	450,22 ± 0,0071	459,72 ± 0,0213	461,53 ± 0,0068
PLA/PEO/NYS (16:12)	471,83 ± 0,0081	487,35 ± 0,0082	489,65 ± 0,0081

Fonte: Autoria própria

Nos primeiros segundos do experimento, observou-se que o grau de intumescimento é maior na membrana de PLA/PEO (16:10), seguido da membrana PLA/PEO/NYS (16:12) e menor na membrana eletrofiada PLA/PEO/NYS (16:10). Observou-se que após 3 minutos o perfil de intumescimento apresentou pequeno aumento percentual de peso em relação a massa inicial. Com o intuito de determinar

o tempo necessário para estabilizar o processo de intumescimento realizou-se novo experimento em 5, 15, 30, 60 e 90 minutos (Quadro 9).

Quadro 9 - Grau de Intumescimento (%) em 5, 15, 30, 60 e, 90 minutos das membranas eletrofiadas A - PLA/PEO (16:10); B – PLA/PEO/NYS (16:10); C – PLA/PEO/NYS (16:12)

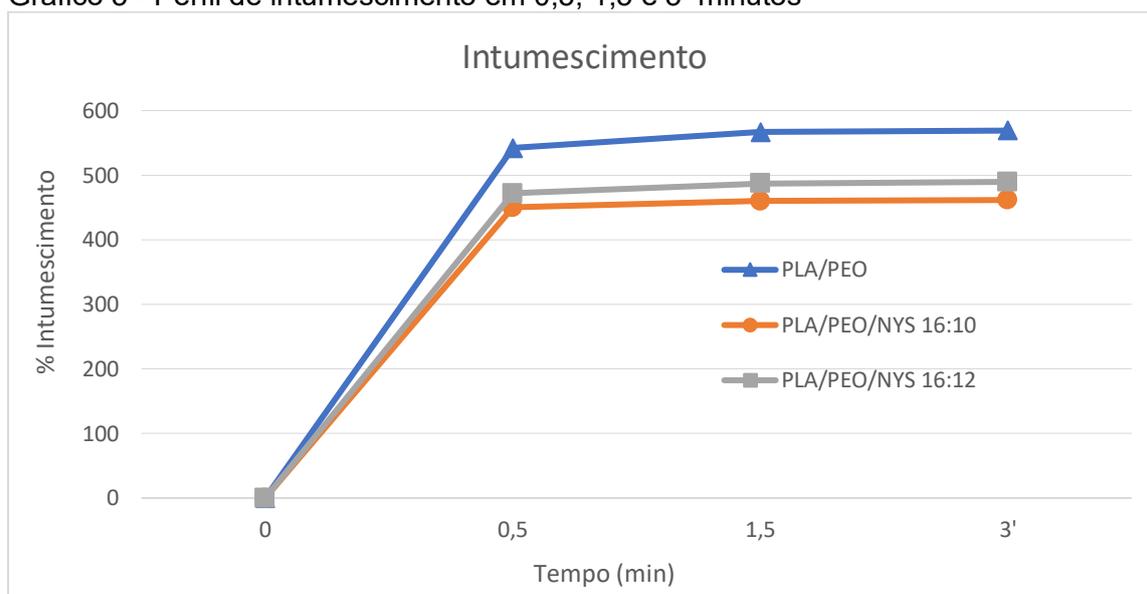
	5'	DV	15'	DV	30'	DV	60'	DV	90'	DV
PLA/PEO (16:10)	439,63	0,0073	443,69	0,0071	444,59	0,0071	443,69	0,0070	444,59	0,0069
PLA/PEO/NYS (16:10)	401,98	0,0066	410,32	0,0064	409,92	0,0065	410,71	0,0065	411,11	0,0065
PLA/PEO/NYS (16:12)	451,57	0,0021	459,84	0,0025	461,87	0,0026	460,12	0,0022	462,88	0,0021

Fonte: Autoria própria

Os resultados obtidos após 5 minutos demonstraram ainda, pequeno aumento percentual de peso em relação à massa inicial, porém, a solvatação pelas moléculas de água foi um processo que ocorreu rapidamente, tornando o intumescimento estável após 15 minutos. Ao analisar os gráficos 3 e 4, foi observado que inicialmente o intumescimento ocorre de forma mais rápida na membrana PLA/PEO (16:10) sem o ativo nistatina. Este fato pode ser justificado uma vez que a nistatina é um fármaco insolúvel em água, o que pode prejudicar o processo de absorção de água pela membrana. Contudo, observa-se que com o passar do tempo, a membrana PLA/PEO/NYS (16:12) apresentou maior grau de intumescimento, devido as características hidrofílicas do poli(óxido) de etileno.

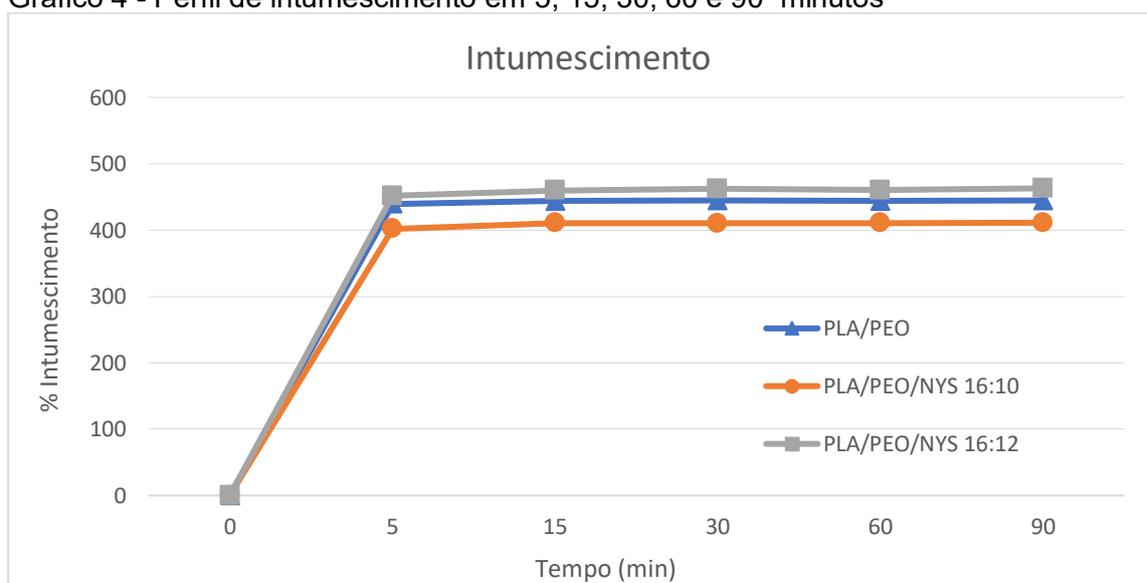
Contudo, observa-se que as diferenças entre os valores de grau de intumescimento são pequenas entre as amostras, de forma que a hidrofobicidade da cadeia do PLA não interferiu significativamente na absorção de água pelas membranas e destaca-se a grande capacidade de absorção dos sistemas, uma vez que, alcançaram valores significativos de intumescimento que variaram de 400 à 570 %.

Gráfico 3 - Perfil de intumescimento em 0,5, 1,5 e 3 minutos



Fonte: Autoria própria

Gráfico 4 - Perfil de intumescimento em 5, 15, 30, 60 e 90 minutos



Fonte: Autoria própria

O intumescimento é uma importante característica em sistemas poliméricos para administração de fármacos, pois exerce efeito sobre a cinética de liberação do ativo incorporado à membrana. Também pode-se mencionar que o intumescimento está diretamente relacionado com a mucoadesividade, uma vez que os grupamentos responsáveis pelas ligações adesivas são expostos na absorção do meio (ANDRETTO *et al.*, 2021). Os sistemas desenvolvidos apresentaram alto grau de intumescimento e este fato pode estar relacionado ao aumento da concentração de

PEO na formulação, que aumenta a hidrofiliabilidade da membrana, favorecendo a entrada de água.

Além disso, é necessário mencionar a importância da técnica de eletrofiação para obtenção do sistema, uma vez que possibilita a formação de fibras submicrométricas, o que aumenta a área superficial, devido à sua estrutura, propiciando elevada superfície de contato da fibra com o meio externo, quando comparadas à filmes tradicionais, ou seja, em um mesmo volume, as fibras abrangem uma área muito maior, o que favorece a absorção da água (SOFI *et al.*, 2020).

Até o presente momento não existem estudos sobre intumescimento de PLA e PEO, porém os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que apesar de higroscópico, o PLA não interfere no intumescimento do sistema e o aumento da concentração de PEO, pode ser considerado um fator chave para a obtenção de sistema ideal para a liberação da nistatina.

5.10 Teste de Bioadesão *in vitro* das Membranas

A mucoadesão é um processo complexo e várias teorias buscam explicar os fenômenos envolvidos. Contudo, as teorias mais aceitas são as fundamentadas na termodinâmica de energia de superfície e difusão interpenetração (NISTA, 2012).

Estudos sobre a obtenção de sistemas poliméricos mucoadesivos preparados por eletrofiação tem aumentado significativamente nos últimos anos, apesar da sua complexidade. Os biopolímeros, na sua grande maioria, apresentam limitada solubilidade em solventes orgânicos e dificuldade no emaranhamento das cadeias poliméricas devido a rigidez e tamanho destas (MOUTSATSOU; COOPMAN; GEORGIADOU, 2017).

Estudos vem demonstrando que a utilização de um polímero auxiliar, também mucoadesivo, que diminua a condutividade da solução e possibilite o emaranhamento das cadeias poliméricas, pode melhorar as condições de eletrofiação. Kazsoki *et al.* (2017) produziram nanofibras com cloridrato de papaverina para administração bucal com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco cristalino. A hidroxipropilcelulose (HPC) foi escolhida como polímero mucoadesivo e para melhorar o processo de eletrofiação do HPC, foi utilizado o também mucoadesivo poli(álcool vinílico) (PVA).

Em outro trabalho, desenvolvido por Mann *et al.* (2022), foram preparadas membranas poliméricas biocompatíveis para a liberação de venlafaxina através da mucosa oral. Foram utilizados os polímeros poli(álcool vinílico) (PVA), carboximetilcelulose e alginato de sódio visando a administração sustentada do fármaco na forma de adesivos bucais.

No estudo de Zhao *et al.* (2022), empregou-se a tecnologia da eletrofiação para preparar filmes orais mucoadesivos de besilato de amlodipina, utilizando como polímeros poli (óxido de etileno) e carboximetilcelulose e goma curdlana.

Neste estudo, a capacidade de eletrofiação e mucoadesividade da formulação foi melhorada através da introdução de poli(óxido) de etileno e a bioadesão foi testada através da análise de mucoadesão em um analisador de textura, utilizando-se mucosa oral suína e discos de mucina como superfície de mucoadesão.

No ensaio com discos de mucina utilizando-se a sonda do analisador de textura com 3 cm de diâmetro não foi possível medir a força de destacamento, fato este que pode ser justificado pela estrutura multicamadas das membranas de nanofibras, formada pela deposição contínua de fibras no coletor de forma aleatória. Esta conformação tridimensional da membrana eletrofiada contribui para a baixa compactação entre as camadas de nanofibras, promovendo o destacamento das camadas mais superficiais no momento do distanciamento da sonda durante o teste (Figura 41). Contudo, observou-se que a membrana permanece aderida aos discos de mucina, que simulam a mucosa oral.

Figura 41 - Membrana PLA/PEO/NYS aderida ao final do teste de Força de destacamento



Fonte: Autoria própria

Optou-se por realizar novo ensaio em equipamento analisador de textura com sonda de 1 cm de diâmetro, no intuito de diminuir a superfície de contato entre a membrana eletrofiada e o equipamento, visando avaliar a força de destacamento. Nesta etapa foram utilizadas como superfície de mucoadesão discos de mucina e mucosa de bochecha suína. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 19. Conforme os dados apresentados na Tabela 19, notou-se que os valores de força e de trabalho mucoadesivo mostraram-se maiores no ensaio com a mucosa suína, o que demonstra maior interação por forças de atração da formulação com esta superfície mucoadesiva.

De acordo com os estudos de Peddapalli *et al.* (2018), a força mucoadesiva quando varia de 0,30 a 0,52 N, indica que a formulação deve aderir adequadamente à mucosa bucal. Os resultados obtidos mostram que como proposto no trabalho, as membranas eletrofiadas apresentam performance de mucoadesão dentro dos limites estabelecidos para outros dispositivos encontrados na literatura e preparados por outras técnicas.

Tabela 19 - Valores médios para força de destacamento e trabalho de mucoadesão (n=6) para membrana eletrofiadas PLA/PEO/NYS

	Força (N)	Distância (mm)	Trabalho-Mucoadesividade (mN.s)	Desvio-padrão
Discos de mucina	0,0392	6,55	0,2092	0,0392
Mucosa suína	0,0832	3,40	0,3232	0,0287

Fonte: A autoria própria

Os discos de mucina e a mucosa suína foram utilizados nos ensaios para simular o muco, camada protetora composta por água, enzimas, eletrólitos, glicoproteínas e mucinas. As mucinas são uma coleção de proteínas glicosiladas e são os principais componentes formadores de gel do muco, responsáveis por sua viscoelasticidade (FRIEDL *et al.*, 2022).

Em pH fisiológico, a mucosa carrega uma carga líquida negativa, formando um gel coeso que se liga à superfície epitelial bucal. Acredita-se que essa natureza gelatinosa facilite a adesão de sistemas mucoadesivos de administração de fármacos e a subsequente liberação dos mesmos através da membrana bucal (MANN *et al.*, 2022).

A bioadesão é considerado um teste dinâmico, uma vez que força de tração é aplicada sobre a amostra com o objetivo de simular condições da cavidade bucal. A

força de destacamento é dependente da formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos funcionais do polímero e o muco (NISTA; BETTINI; MEI, 2015).

Polímeros mucoadesivos e suas concentrações dentro de uma formulação de filme mucoadesivo podem influenciar diretamente a avaliação da força mucoadesiva, tempo de residência bucal e liberação de fármacos. Devido às altas temperaturas de transição vítrea dos polímeros mucoadesivos. Estudos mostram que a inclusão de plastificantes nas formulações de filmes mucoadesivos podem ser uma alternativa para melhorar as propriedades mecânicas da forma farmacêutica (ZHAO *et al.*, 2022).

Contudo, neste estudo, a inclusão de poli(óxido de etileno) permitiu o preparo de membrana eletrofiada sem o uso de plastificantes, aumentando a hidrofiliabilidade do sistema, indicado condições favoráveis para o carreamento do fármaco. Cabe ressaltar que, em sua maioria, os polióis são compostos osmoticamente positivos, o que pode resultar em um aumento da absorção de água da saliva, porém se usado em excesso, pode causar xerostomia e aumentar a viscosidade salivar (DRZEŹDŹON *et al.*, 2019).

Por fim, o processo de mucoadesão também depende de uma combinação de fatores poliméricos, ambientais e fisiológicos e uma combinação de modalidades teóricas de adesão é observada na prática, sem que nenhuma das teorias atue isoladamente, algo frequentemente negligenciado na literatura (SHIPP *et al.*, 2022).

5.11 Ensaio de Toxicidade

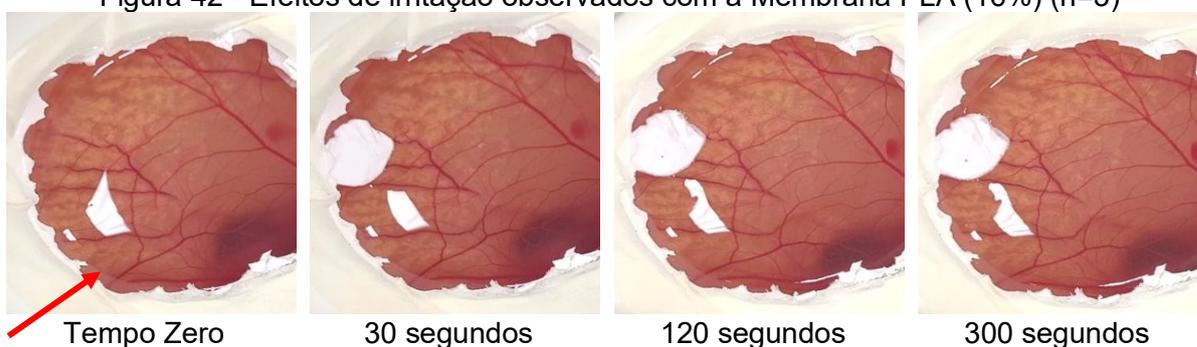
O teste HET-CAM (teste da membrana corioalantóica do ovo de galinha) é um teste usado para determinar o potencial irritante de substâncias químicas. No teste, ovos de galinha incubados são abertos cuidadosamente no nono dia e a membrana corioalantóide (CAM) é exposta. As substâncias avaliadas são colocadas diretamente na membrana CAM exposta e a membrana é inspecionada visualmente através de um microscópio.

O teste HET-CAM é considerado um método alternativo para prever o potencial de irritação validado pelo European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) e pode ser usado para avaliar a toxicidade de formulações líquidas, sólidas e semi-sólidas. De acordo com o estudo de Abdelkader *et al.* (2015), este teste também obteve sucesso na avaliação toxicológica de outras formas farmacêuticas, como microemulsão, emulsão e filmes.

Outra característica fundamental do HET-CAM é o seu baixo custo operacional, uma vez que se trata de um procedimento simples, que não requer alto investimento (DEROUICHE; ABDENNOUR, 2017). Além disso, possibilita a redução do sofrimento animal, avaliando parâmetros igualmente importantes e confiáveis.

Foram usados como controle positivo (Figura 42), solução de hidróxido de sódio 1 mol/L e como controle negativo (Figura 43), cloreto de sódio 0,9 %. Os resultados obtidos no teste HETCAM para as membranas PLA (16%), PLA/PEO (16:12) e PLA/PEO/NYS (16:12) estão apresentados na Tabela 20 e Figuras 42, 43, 44.

Figura 42 - Efeitos de irritação observados com a Membrana PLA (16%) (n=3)



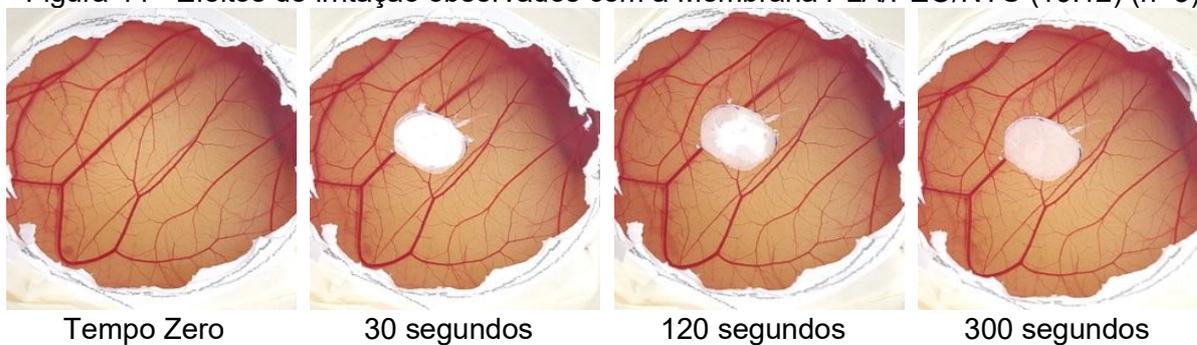
Fonte: Autoria própria

Figura 43 - Efeitos de irritação observados com a Membrana PLA/PEO (16:12) (n=3)



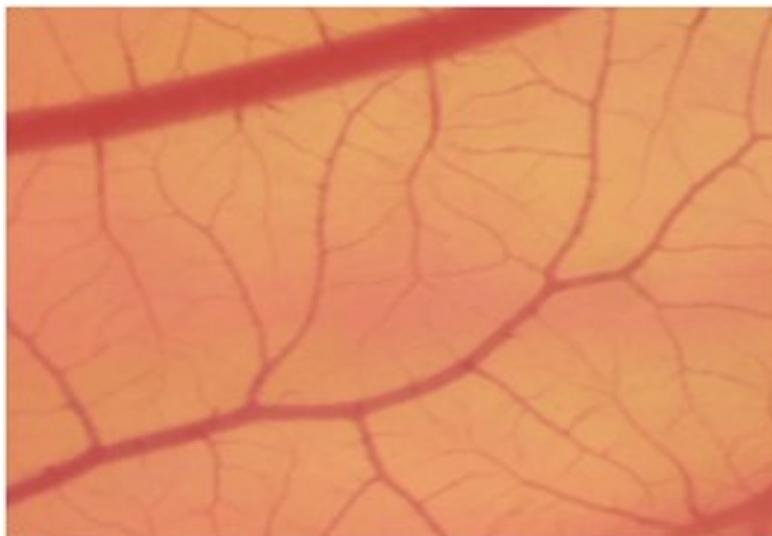
Fonte: Autoria própria

Figura 44 - Efeitos de irritação observados com a Membrana PLA/PEO/NYS (16:12) (n=3)



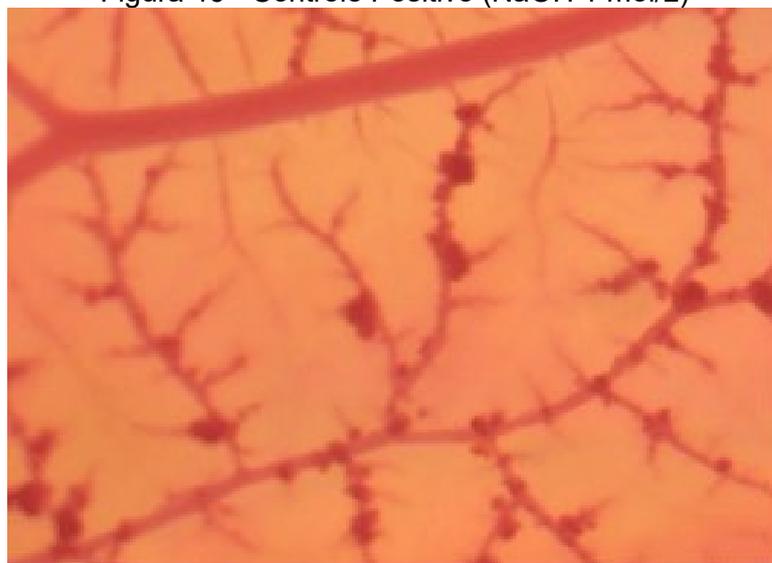
Fonte: Autoria própria

Figura 45 - Controle Negativo (NaCl 0,9 %)



Fonte: Autoria própria

Figura 46 - Controle Positivo (NaOH 1 mol/L)



Fonte: Autoria própria

Tabela 20 - Escores de irritação HET-CAM (valores médios, n = 3)

	Hemorragia	Lise	Coagulação	Média de Escores	Categoria
NaCl 0,9 %	0	0	0	0	Não Irritante
NaOH 1 mol/L	7	5	9	7	Irritante
PLA	0	0	0	0	Não Irritante
PLA/PEO	0	0	2	0,6	Não Irritante
PLA/PEO/NYS	0	1	0	0,3	Não Irritante

Fonte: Autoria própria

Os controles positivos (NaOH 1 mol/L) induziram hemorragia, lise e coagulação, em poucos segundos, portanto, foram classificados como irritantes. O controle negativo (NaCl 0,9 %) não causou nenhum evento vascular.

Três tipos de membranas eletrofiadas foram testadas diretamente na CAM e, com base nos escores estabelecidos por Derouiche e Abdennou (2017), os resultados da avaliação sugerem que não há hemorragia, lise discreta, pontuada no menor escore para a membrana de PLA/PEO/NYS e coagulação leve em uma amostra de PLA/PEO. As membranas eletrofiadas foram classificadas como não irritantes, uma vez que não foram observados eventos vasculares. Estudos de segurança são obrigatórios para biomateriais, portanto, o teste de potencial de irritação pode ser uma solução preventiva e uma opção conveniente para experimentos pré-clínicos de segurança (DANELUTI *et al.*, 2021).

5.12 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

As infecções oportunistas em humanos acometidas por *Candida albicans* e outras espécies relacionadas podem se manifestar clinicamente desde a candidíase oral mais comum, até superinfecções sistêmicas fatais em pacientes com fatores predisponentes locais, como a mucosite oral (SILVA *et al.*, 2020).

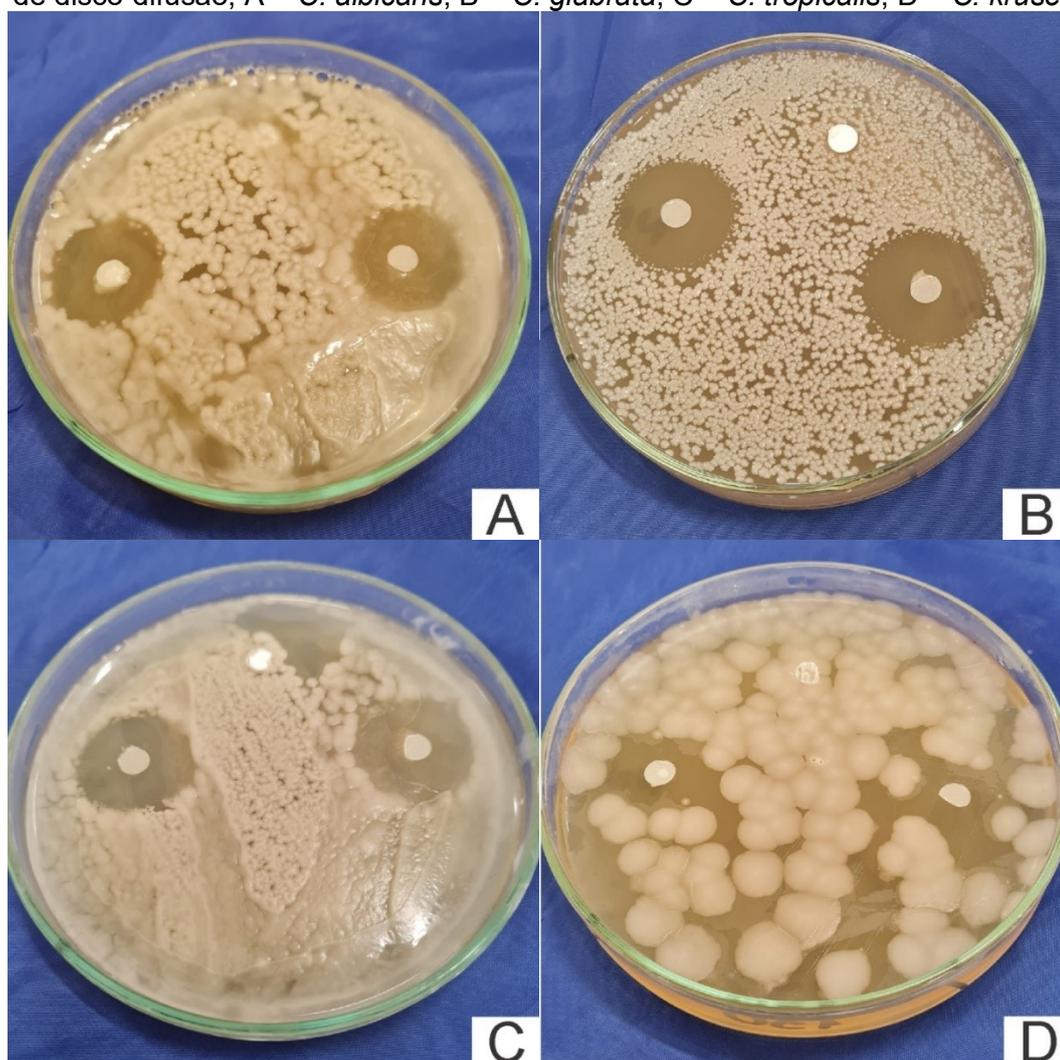
A *Candida albicans* é a espécie de *Candida* mais frequente, presentes como comensal em 26 a 75% dos habitantes saudáveis na ausência de qualquer lesão na cavidade oral, porém, outras espécies foram identificadas como patogênicas para humanos como a *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*.

A susceptibilidade dos fungos aos antifúngicos pode ser estabelecida através de diversos testes, entretanto, os mais utilizados são a microdiluição em caldo, a difusão em ágar e E-test. Neste estudo optou-se pela realização do teste de difusão em ágar, pois é uma técnica simples, barata e reprodutível (SILVA *et al.*, 2016).

O teste de disco-difusão em ágar foi descrito em 1966, por Bauer e Kirby. O teste fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano. Também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com a concentração da substância ensaiada (PINTO, 2013; SHETTY *et al.*, 2022).

Neste estudo, a avaliação realizada foi comparativa frente ao controle negativo, utilizou-se a membrana eletrofiada PLA/PEO (16:12) e a membrana PLA/PEO/NYS (16:12), em discos de 13 mm de diâmetro. A zona ou o halo de inibição de crescimento foi medida partindo-se da circunferência do disco até a margem onde houve crescimento de fungos, conforme Figura 47, tendo sido utilizadas cepas clínicas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. Krusei*.

Figura 47 - Halos de inibição formados pela membrana PLA/PEO/NYS (16:12) pelo método de disco-difusão; A – *C. albicans*, B – *C. glabrata*, C – *C. tropicalis*, D – *C. krusei*



Fonte: Autoria Própria

É possível observar nas imagens que os testes em que foram empregadas as *Candida albicans* (A), *Candida glabrata* (B) e *Candida tropicalis* (C), a execução da leitura foi muito simples de ser realizada, diferentemente da leitura com a utilização da *Candida krusei* (D), onde os halos se apresentaram tortuosos sem margem definida, o que tornou a leitura mais difícil.

Porém, percebeu-se a presença de halo de inibição em todos os testes realizados, indicando que todas as cepas de *Candida* apresentaram sensibilidade à nistatina presente na membrana eletrofiada.

Após a leitura e mensuração dos halos, em milímetros, os resultados foram comparados com a tabela fornecida pelo fabricante de discos para suscetibilidade à antimicrobianos (CECON). Os resultados relativos ao tamanho da zona de inibição estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21 - Valores de diâmetros de zonas de inibição (mm) por disco-difusão, (n=3)

Cepas	Presença de Halo Inibidor	Zona de inibição (mm)	Classificação	Desvio Padrão
<i>C. albicans</i>	(+)	18	Sensível	0,5773
<i>C. tropicalis</i>	(+)	20	Sensível	0,5773
<i>C. Glabrata</i>	(+)	22	Sensível	0,5773
<i>C. Krusei</i>	(+)	16	Sensível	1,0000

Fonte: Autoria própria

Os resultados aqui encontrados não podem ser comparados com estudos anteriores, uma vez que, não existem estudos de membranas eletrofiadas com nistatina na literatura, porém foi adotado o critério interpretativo de sensível para fungos que apresentaram zonas de inibição ≥ 10 mm de acordo com orientações do fabricante. A membrana eletrofiada com nistatina apresentou sensibilidade contra todas as cepas de *Candida* testadas e o desvio padrão extremamente baixo, indicando proximidade da média.

A nistatina é um fármaco com ação antifúngica já estabelecida e estudos recentes como o de Rai *et al.* (2022), onde em uma revisão sistemática com metanálise evidenciaram a eficácia da nistatina na remissão clínica da mucosite oral, bem como uma redução significativa de UFC/mL de espécies de *Candida* de dentaduras e superfícies palatinas dos pacientes. Porém, a nistatina em sua formulação convencional produz efeitos tóxicos que limitam seu uso parenteral, restringindo-se a aplicações superficiais sem efeito residual. Neste sentido, os resultados obtidos nesta etapa do estudo mostraram os benefícios de filmes eletrofiados com nistatina, evidenciando a liberação do fármaco e, conseqüentemente, a ação antimicrobiana.

A difusão em ágar é uma técnica também amplamente empregada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), porém, neste estudo a CIM não foi determinada devido a fatores que podem interferir na difusão da nistatina no

meio de cultura, como espessura do ágar, posição da nistatina na fibra eletrofiada e características da blenda polimérica, o que pode gerar resultados não confiáveis.

5.13 Determinação do Teor de Nistatina

5.13.1 Teor de Nistatina contida nas Membranas Eletrofiadas

O teor de nistatina foi realizado para a membrana eletrofiadas PLA/PEO/NYS (16:12) e o resultado obtido foi de 94,92% (Apêndice 3). O teor maior que 90% indicou que a obtenção da membrana através do processo de eletrofiação, foi eficiente.

5.14 Avaliação Piloto *in vivo*

A norma NBR 5492 de 06/2017 define o termo análise sensorial como a disciplina usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características de um produto da forma como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017). Segundo Oliveira, Andrade e Rezende (2022), os métodos sensoriais são baseados em resposta aos estímulos que são levados por impulsos nervosos ao cérebro, que interpreta as sensações, cujas dimensões são intensidade, extensão, duração, qualidade e gosto em relação ao produto avaliado.

O objetivo final no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas é a aceitação por parte dos consumidores, uma vez que a adesão ao tratamento também está diretamente relacionada com a comodidade posológica, palatabilidade e conforto. Para tanto, a qualidade do produto deve ser delineada a partir das percepções do consumidor, o que pode ser completamente diferente dos conceitos de qualidade pré-estabelecidos (LAMOLHA, 2019).

Os testes de análise sensorial são comumente divididos em testes discriminatórios, testes descritivos e testes afetivos. Os testes discriminatórios avaliam as diferenças entre amostras, os testes descritivos descrevem os componentes ou parâmetros sensoriais e medem a intensidade a que são percebidos e os testes afetivos consistem na avaliação emocional do avaliador (VIEIRA, 2019).

Os testes afetivos podem ser classificados em testes de preferência e teste de aceitação por escala hedônica, no qual o indivíduo expressa o grau de gostar ou de

desgostar de um determinado produto, de forma globalizada ou em relação a um atributo específico. As escalas mais utilizadas são as de 7 e 9 pontos, que contêm os termos definidos situados, por exemplo, entre “gostei muitíssimo” e “desgostei muitíssimo” contendo um ponto intermediário com o termo “nem gostei; nem desgostei” (MEDEIROS; GARRUTI, 2018).

No presente estudo optou-se pela análise sensorial, através de testes afetivos de aceitação por escala hedônica com 9 pontos, com o intuito de avaliar palatabilidade, textura, aparência, conforto, manuseio, bioadesão e aceitação da membrana mucoadesiva eletrofiada. Os resultados obtidos estão apresentados nos Gráficos 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e na Tabela 22.

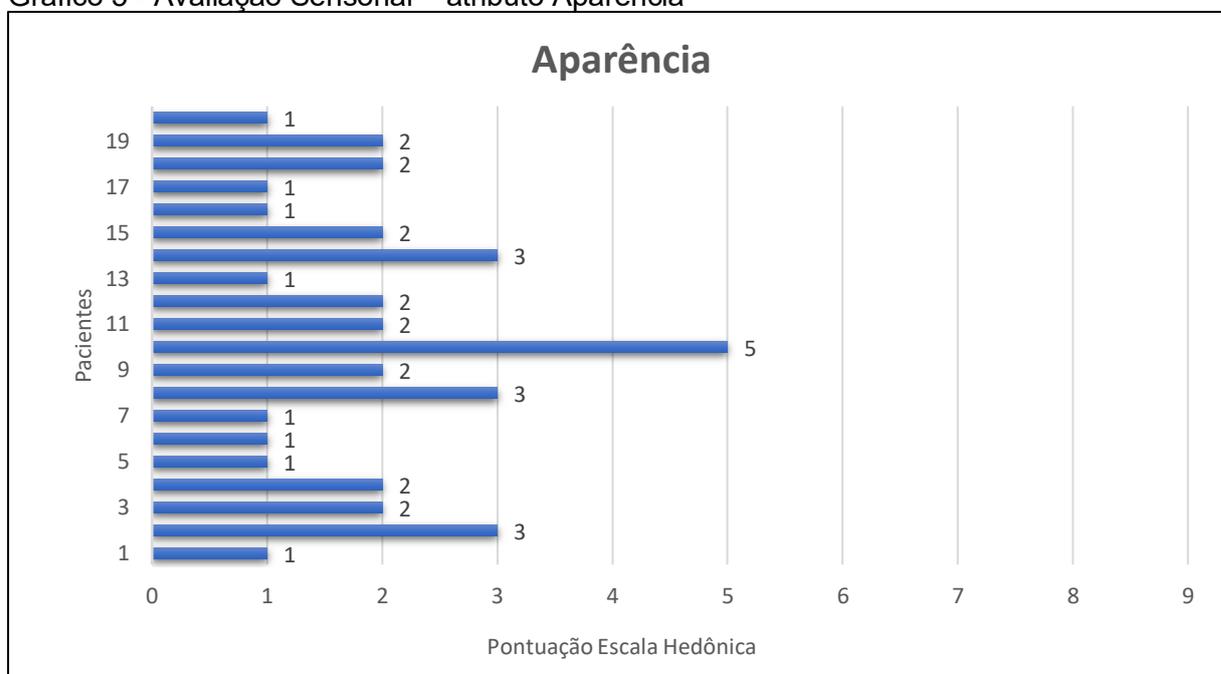
Tabela 22 - Resultados da a avaliação sensorial através da Escala Hedônica de 9 pontos

	Aparência	Sabor	Textura	Conforto	Manuseio	Adesão
Média	2,05	2,8	2,65	2,9	3,3	3,65
Desvio Padrão	1,23	1,64	1,78	2,02	1,34	1,95

Legenda: 1 - gostei extremante; 2 - gostei muito; 3 - gostei moderadamente; 4 - gostei ligeiramente; 5 - indiferente; 6 - desgostei ligeiramente; 7 - desgostei moderadamente; 8 - desgostei muito; 9 - desgostei extremamente.

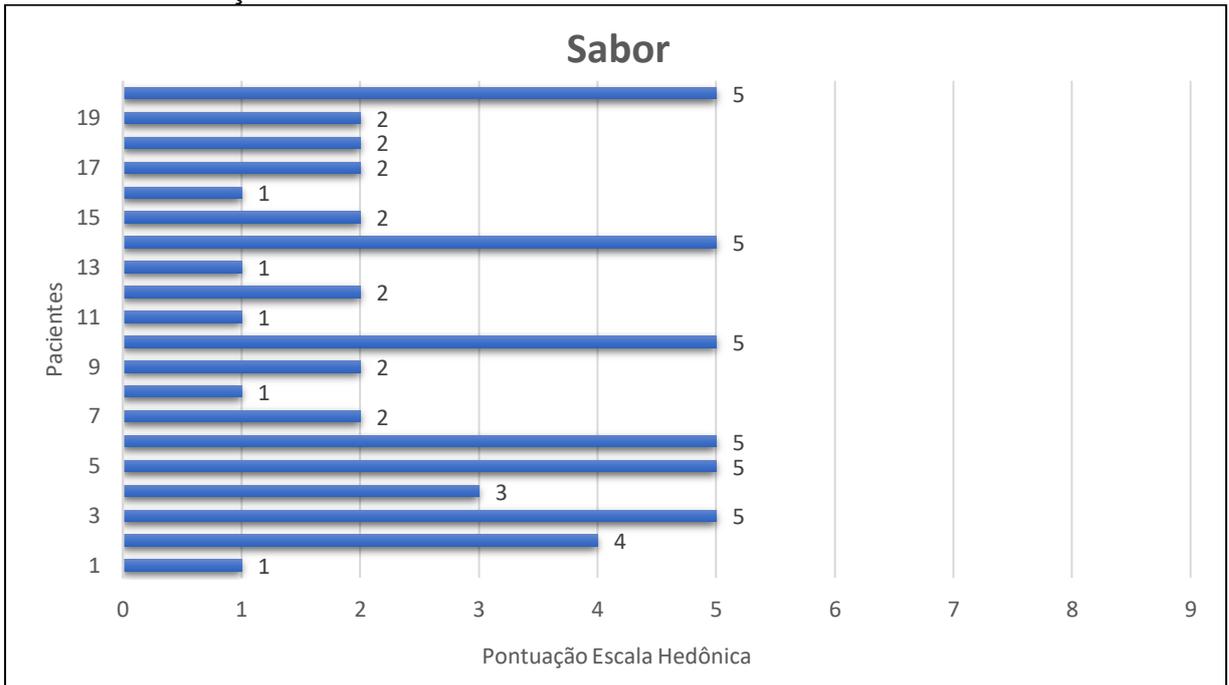
Fonte: Autoria Própria

Gráfico 5 - Avaliação Sensorial – atributo Aparência



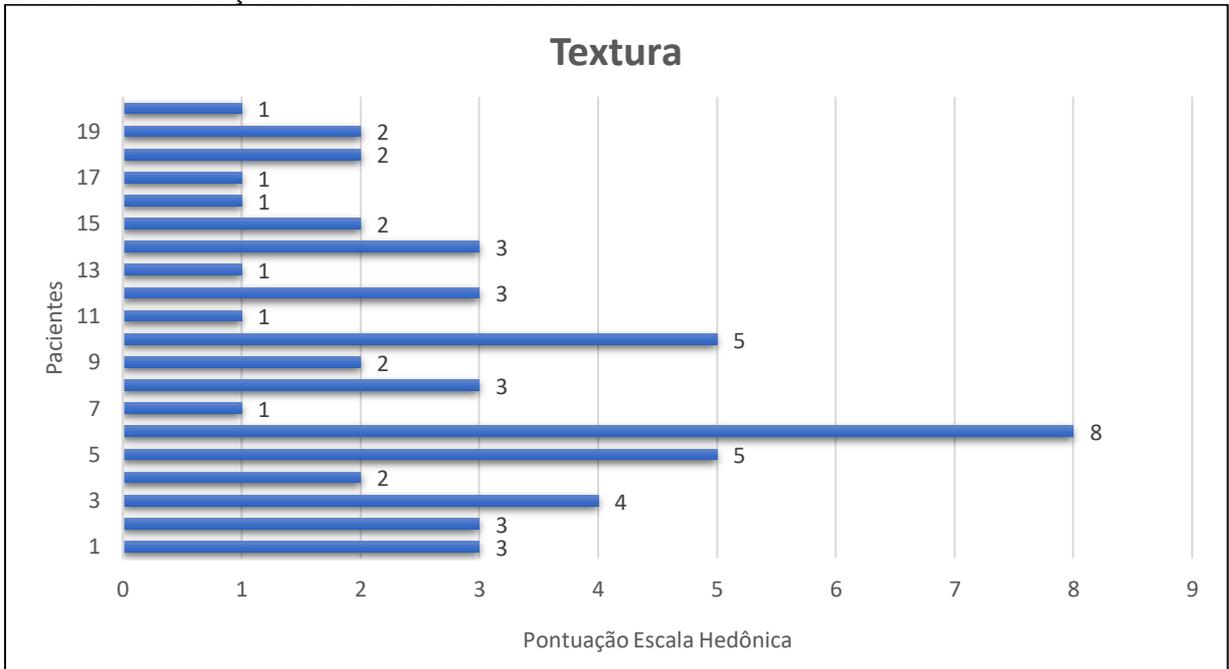
Fonte: Autoria Própria

Gráfico 6 - Avaliação Sensorial: atributo Sabor



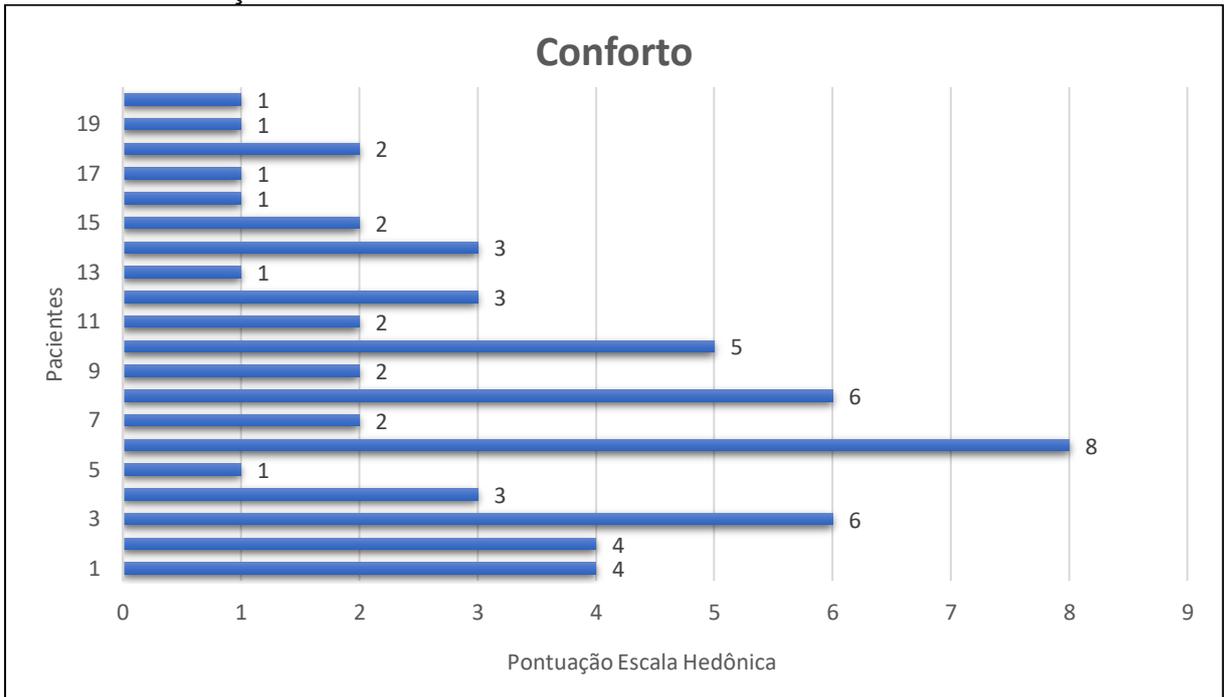
Fonte: Autoria Própria

Gráfico 7 - Avaliação Sensorial: atributo Textura



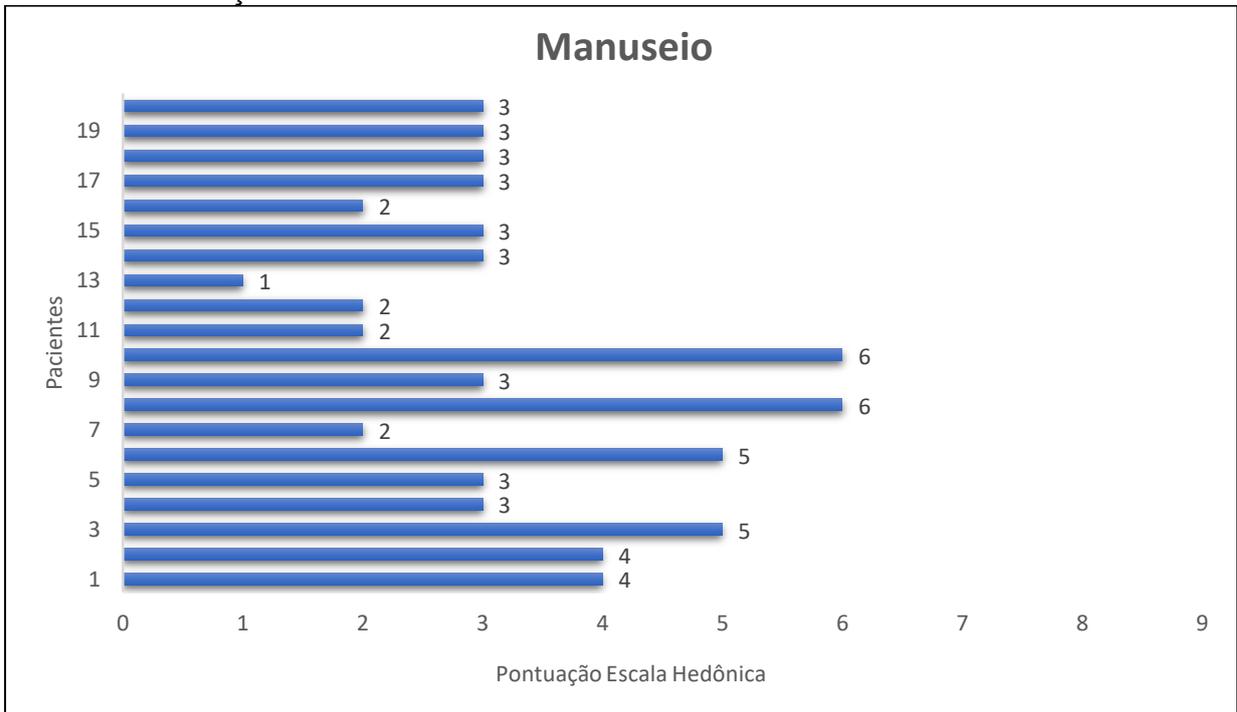
Fonte: Autoria Própria

Gráfico 8 - Avaliação Sensorial: atributo Conforto



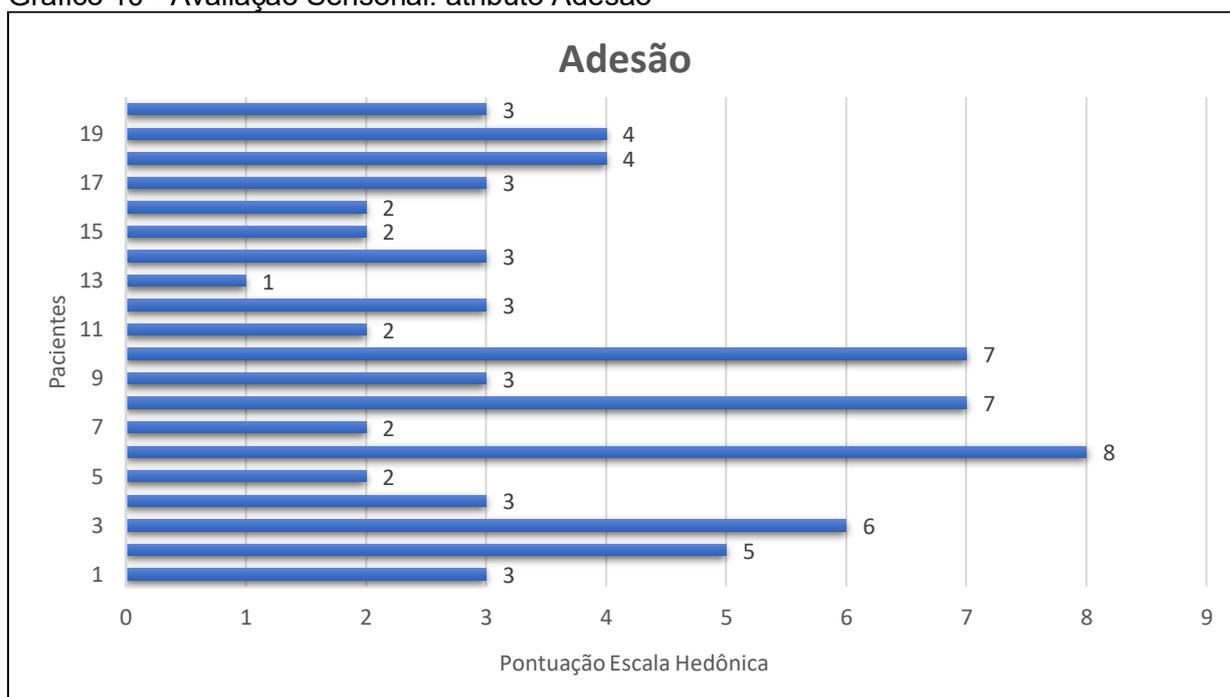
Fonte: Autoria Própria

Gráfico 9 - Avaliação Sensorial: atributo Manuseio



Fonte: Autoria Própria

Gráfico 10 - Avaliação Sensorial: atributo Adesão



Fonte: Autoria Própria

Ao considerar a média das avaliações na Tabela 22 constata-se que todos os atributos se encontram entre os termos hedônicos “gostei muito” e “gostei ligeiramente”, superando os valores de indiferença e de rejeição, o que demonstra boa avaliação dos atributos da membrana eletrofiada pelos participantes do estudo.

Na escala hedônica, a categoria “nem gostei, nem desgostei”, à qual se atribui valor 5, é considerada como uma região de indiferença em relação ao produto. A escala divide-se em outras duas regiões: a região de aceitação, à qual se atribui valores de 1 a 4, e a região de rejeição do produto com valores de 6 a 9. Observa-se que a membrana eletrofiada foi bem aceita, demonstrando a viabilidade futura no desenvolvimento desta como forma farmacêutica.

Os atributos aparência, sabor e textura, foram os que receberam melhor avaliação no estudo. Quando perguntados sobre aparência, a maioria dos participantes respondeu “gostei extremamente” ou “gostei muito”, já quanto ao sabor, a avaliação resultou em aceitação e também indiferença, fato este que pode ser considerado positivo, uma vez que, não foi possível perceber o gosto dos componentes da formulação. Na avaliação da textura, somente um participante desgostou muito deste atributo, o que foi considerado aceitável tendo em vista as características da avaliação sensorial afetiva que pode ser afetada por muitos fatores,

como, influências hormonais, variações genéticas, uso de medicamentos e produtos químicos, doenças, idade e aceitação sociocultural (PENSÉ-LHÉRITIER, 2021).

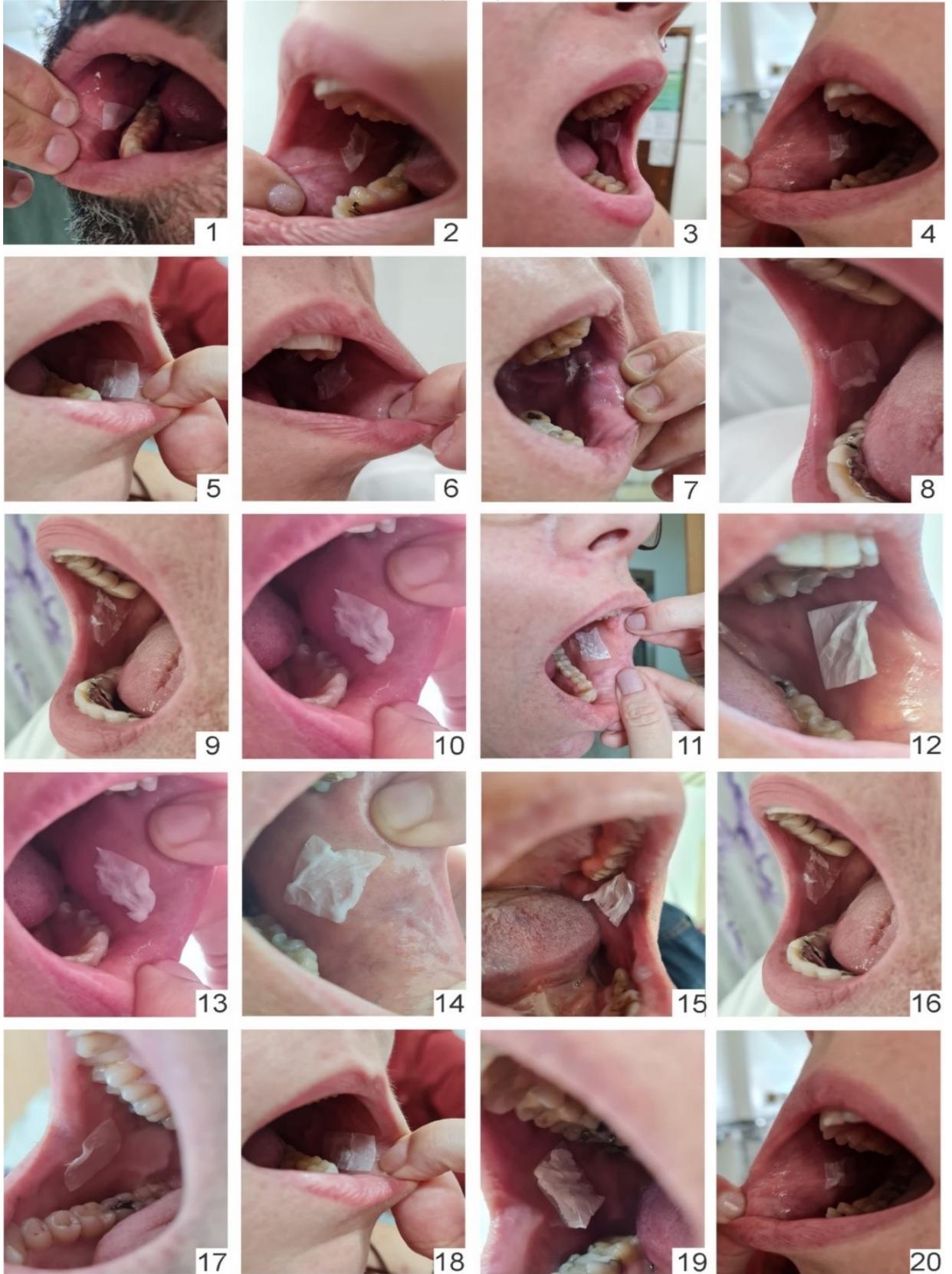
Os atributos manuseio, conforto e adesão, apesar de terem apresentado resultados dentro da escala de aceitação, receberam pontuação mais alta. Isto pode ser justificado pela falta de habilidade no manuseio de filmes orais, tendo em vista que atualmente poucos medicamentos encontra-se disponíveis nesta forma farmacêutica e também devido a mucoadesão ser fortemente influenciada pelo fluxo salivar, e movimento da língua.

Na avaliação global, os pacientes assinalaram a escala constituída por 10 pontos (0-10), conforme a aceitação do dispositivo. O resultado obtido na avaliação global foi de 7,07 pontos (dp 1,34), demonstrando aceitação da forma farmacêutica desenvolvida.

A segurança, qualidade e a funcionalidade do medicamento sempre foram os fatores chave para o seu desenvolvimento, porém a aceitabilidade tem ganhado espaço nesta área. A análise sensorial possibilita caracterizar e medir atributos sensoriais ou determinar se os produtos são aceitos ou não pelo consumidor. No desenvolvimento de novos produtos ou no controle da qualidade, a compreensão, determinação e avaliação das características sensoriais tornam-se importantes na garantia da utilização pelo paciente e, conseqüentemente, na adesão ao tratamento (VIEIRA, 2019).

A Figura 48 mostra imagens da membrana aderida na cavidade oral dos participantes do estudo, onde foi observado que a membrana adere à membrana jugal, porém, ainda sofre efeitos de cisalhamento, especialmente pelo movimento da língua e também devido ao alto grau de hidratação do dispositivo na presença de grande volume de saliva. Em pacientes que apresentavam xerostomia no momento do teste, constatou-se melhor adesão da membrana eletrofiada conforme se pode constatar nas imagens de pacientes 5, 12, 11 e 18. Porém, percebeu-se que a membrana permaneceu íntegra durante todo o período de estudo, manteve coloração inicial e não causou nenhum tipo desconforto aos participantes.

Figura 48 - Imagens da membrana aderida à mucosa jugal de pacientes após 10 minutos (n=20)



Fonte: Autoria Própria

Estudo de Hofmanová (2020), mostrou que a administração de um medicamento é otimizada quando a formulação não demanda tempo no preparo da dose e é de fácil administração. Quando há alternativas similares de eficácia e segurança, alguns fatores são considerados para determinar a escolha, como facilidade de administração, aceitação e adesão ao tratamento, duração do tratamento, o número de doses diárias necessárias e os atributos sensoriais do medicamento.

Neste sentido, a adesão ao tratamento pode ser influenciada por eventos adversos e toxicidade, esquema posológico, duração e frequência da terapia, características individuais, emocionais e cognitivas, a própria doença, entre outros. Considerando-se filmes para liberação oral de fármacos, um sabor aceitável, textura adequada, facilidade no manuseio e mucoadesividade são fatores essenciais para garantir a ação terapêutica do medicamento e a aceitação do tratamento pelo paciente.

Contudo, deve-se ponderar que a análise sensorial é uma ciência que determina, analisa e interpreta as respostas das pessoas aos produtos, percebidos pelos sentidos humanos, o que implica muitos fatores e variabilidade (GÜRBÜZ *et al.*, 2021).

6 CONCLUSÕES

Nesse estudo membranas de PLA e PLA/PEO foram obtidas através do processo de eletrofiação. Foram estabelecidos os parâmetros de processo e solução e verificou-se que a melhor vazão é de 1,2 mL, a tensão 15 kV e a distância entre agulha e coletor de 15 cm. A viscosidade da solução é fator essencial para a obtenção de fibras lisas e homogêneas e a condutividade, apesar de menor com a adição de nistatina, não impediu a eletrofiação da solução polimérica.

- A microscopia eletrônica foi parâmetro fundamental para verificar o diâmetro e qualidade das fibras. Neste estudo, a MEV contribuiu para nortear a parametrização do processo de eletrofiação, que apesar de simplicidade dos equipamentos, trata-se de uma técnica que pode sofrer interferência de vários parâmetros simultaneamente, o que a torna complexa e extremamente trabalhosa.

- A eletrofiação de PLA à 16% com adição de 12% de PEO (m/m) e 1.200.000 UI de nistatina produziu membrana com fibras submicrométicas lisas, sem defeitos e mostrou-se um sistema promissor para a liberação do fármaco.

- A mucoadesividade do sistema desenvolvido, devido à adição de poli(óxido de etileno), foi constatada no teste de força de adesão, uma vez que a membrana aderiu de forma significativa à mucosa suína e apresentou performance de mucoadesão dentro dos limites estabelecidos para outros dispositivos de acordo com a literatura.

- A investigação da atividade antifúngica mostrou que a membrana eletrofiada com nistatina apresenta sensibilidade contra todas as cepas de *Candida* testadas.

- O ensaio de toxicidade realizado através da técnica HETCAM mostra que, não há hemorragia, lise discreta, pontuada no menor escore para a membrana de PLA/PEO/NYS e coagulação leve em uma amostra de PLA/PEO. As membranas eletrofiadas foram classificadas como não irritantes, uma vez que não foram observados eventos vasculares.

- O teor de nistatina na membrana eletrofiadas PLA/PEO/NYS (16:12) foi de 94,92%. O teor maior que 90% indicou que a obtenção da membrana através do processo de eletrofiação, foi eficiente.

- A avaliação piloto *in vivo* mostrou, através da avaliação global, aceitação da forma farmacêutica desenvolvida, obtendo pontuação de 7,07 pontos em escala de 0 à 10. Todos os atributos avaliados foram classificados entre os termos hedônicos

“gostei muito” e “gostei ligeiramente”, superando os valores de indiferença e de rejeição. Os atributos aparência, sabor e textura, foram os que receberam melhor avaliação no estudo. O manuseio, o conforto e a adesão, apesar de terem apresentado resultados dentro da escala de aceitação, foram avaliados com menor pontuação pelos participantes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mucosite oral é uma reação tóxica inflamatória que afeta a mucosa bucal, sendo uma seqüela dos tratamentos de radioterapia e/ou quimioterapia. Além disso, associado ao dano à mucosa oral, ocorre uma predisposição a diversas infecções, entre elas, infecções fúngicas. Considerando os vários estudos realizados nos últimos anos sobre prevenção e tratamento da MO decorrente de tratamento oncológico, não há até o momento uma medida preventiva e terapêutica estabelecida.

Neste sentido, o estudo de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da mucosite oral e suas complicações tem grande relevância no contexto da terapia oncológica, especialmente no que se refere a estratégias profiláticas e terapêuticas no combate as infecções orais associadas à mucosite.

O uso da eletrofiação para o desenvolvimento de membranas constituídas de nanofibras é uma possibilidade simples e barata que permite a fabricação de sistemas em várias formas e tamanhos, e o controle da composição permite estabelecer propriedades e funcionalidades específicas.

Contudo, o desenvolvimento de formas farmacêuticas para liberação oral de fármacos é um grande desafio para os pesquisadores, pois a produção constante, não uniforme e a composição da saliva, podem interferir de forma significativa na farmacocinética do ativo. Um sistema ideal para administração bucal possui muitos requisitos para garantir a sua eficácia. Os sistemas devem ser de fácil aplicação, resistir à ação da saliva, aos movimentos da língua e a deglutição. Além disso, o sistema precisa apresentar hidrofiliçidade suficiente para permitir a adesão e o íntimo contato com a mucosa oral, porém com uma hidratação limitada para manter a coesão.

Apesar das dificuldades na obtenção de dispositivos eficazes, a via bucal pode ser considerada uma alternativa à via oral convencional pois, garante a biodisponibilidade sistêmica, evitando o metabolismo hepático de primeira passagem, permite um rápido início dos efeitos sistêmicos e possibilita maior adesão ao tratamento pelo paciente.

Este estudo demonstrou que a eletrofiação é uma ferramenta promissora na produção de sistemas de liberação bucal e mostrou a boa aceitação dos pacientes na utilização dos mesmos. Porém, a mucoadesão segue sendo o grande desafio, pois a

obtenção de sistema que permaneça aderido à mucosa durante tempo adequado, mesmo com as condições desfavoráveis da cavidade bucal é a principal dificuldade.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, o dispositivo desenvolvido não apresentou mucoadesividade suficiente para permanecer na cavidade oral por período prolongado. Porém, apresentou-se como uma alternativa eficaz para liberação imediata do fármaco.

8 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

A continuação desta pesquisa tem como objetivo:

- Avaliar o comportamento da membrana com a inclusão de novo polímero mucoadesivo, com o intuito de aumentar a mucoadesividade do sistema desenvolvido;
- Realizar testes de liberação e permeação da nistatina contida nos sistemas eletrofiados;
- Realizar ensaio clínico com pacientes com infecção fúngica oriunda da mucosite oral devido ao tratamento oncológico, para avaliar a ação da membrana desenvolvida;
- Testar outras técnicas de eletrofiação (coaxial e eletrofiação em emulsão) visando incorporar a nistatina no “core” da fibra para obtenção de sistema para liberação prolongada do fármaco.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELKADER, H. *et al.* Critical appraisal of alternative irritation models: three decades of testing ophthalmic pharmaceuticals. **British medical bulletin**, v. 113, n. 1, p. 59-71, 2015.
- ABDEL MONEIM, A. E. *et al.* Oral mucositis: Melatonin gel an effective new treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 2017.
- AGHAMOHAMMADI, A.; HOSSEINIMEHR, S. J. Natural products for management of oral mucositis induced by radiotherapy and chemotherapy. **Integrative Cancer Therapies**, v. 15, n. 1, p. 60–68, 2016.
- AGUIAR, M. M. G. B. de. **Obtenção de gel mucoadesivo de nistatina para o tratamento da candidíase oral.** Desenvolvimento e caracterização de dispersões sólidas de nistatina. 2015. 231 f. Orientadora: Cristina Helena dos Reis Serra. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- AGUIAR, M. M. G. B. *et al.* Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 5, p. 594-600, 2010.
- AHMED, F. E.; LALIA, B. S.; HASHAIKEH, R. A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. **Desalination**, v. 356, p. 15–30, 2015.
- ALAKRACH, A. M. *et al.* Thermal properties of PLA/HNTs composites: Effect of different halloysite nanotube. **AIP Conference Proceedings**, v. 2030, n. 1, p. 020052, 2018.
- ALAZAB, M. *et al.* Sustainable Electrospinning of Nanoscale Fibres. **Procedia Manufacturing**, v. 12, p. 66–78, 2017.
- ALBUQUERQUE, M. E. C. A. *et al.* Abordagens terapêuticas da mucosite oral. **RvACBO**, v. 26, n. 2, p. 53-57, 2017.
- AL-HAZEEM, N. Z. A. Nanofibers and Electrospinning Method. *In*: KYZAS, G. Z.; MITROPOULOS, A. C. (editores). **Novel Nanomaterials - Synthesis and Applications**. London: IntechOpen, 2018.
- AL IBRAHEEMI, A. A.; SHAMOUN, S. Incidence and risk factors of oral mucositis in patients with breast cancer who receiving chemotherapy in Al-Bashir hospital. **International journal of hematology-oncology and stem cell research**, v. 10, n. 4, p. 217, 2016.
- ALMEIDA, K. V. DE; CRISTIANE, C.; CARVALHO, B. DE. Mucosite oral na terapia antineoplásica. p. 1–14, [s.d.].

- AMARAL, B. R. *et al.* Development and characterization of thermopressed polyvinyl alcohol films for buccal delivery of benznidazole. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 119, p. 111546, 2020.
- AMIR, A.; LEVIN-KHALIFA, M.; DVASH, T. Water-Soluble Nystatin and Derivative. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 2, p. 182–187, 2022.
- AMIRAH MD ZUBIR, A. *et al.* Electrospinning of PLA with DMF: Effect of polymer concentration on the bead diameter of the electrospun fibre. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 778, n. 1, p. 1–8, 2020.
- ANDRETTO, V. *et al.* Nanocomposite systems for precise oral delivery of drugs and biologics. **Drug Deliv Transl Res**, v. 11, n. 2., p. 445-470, 2021.
- ANSARI, M.; SADARANI, B.; MAJUMDAR, A. Optimization and evaluation of mucoadhesive buccal films loaded with resveratrol. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, n. November 2017, p. 278–288, 2018.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 166, de 24 de Julho de 2017. **Ministério da Saúde**, v. 2017, p. 1–21, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5492**: Análise sensorial - Vocabulário. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.
- AYDOGDU, A.; SUMNU, G.; SAHIN, S. A novel electrospun hydroxypropyl methylcellulose/polyethylene oxide blend nanofibers: Morphology and physicochemical properties. **Carbohydr Polym**, v. 181, p. 234-246, feb. 2018..
- AZIZI, A. *et al.* Efficacy of Topical and Systemic Vitamin E in Preventing Chemotherapy-Induced Oral Mucositis. **Reports of Radiotherapy and Oncology**, v. 2, n. 1, p. 2–5, 2015.
- BARASCH, A. P. de. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. **Oral Oncol**, v. 39, n. 2, p. 91-100, 2003.
- BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. *In*: BALOWS, A. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 5 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. p. 1117-1125.
- BERGER, K. *et al.* Epidemiology, patient adherence, and costs of oral mucositis in routine care in stem cell transplantation. **Support Care Cancer**, v. 28, n. 7, p. 3113-3123, 2020.
- BERKOVITZ, B. K. B; HOLLAND, G. R.; MOXHAN, B. J. **Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal**. 3. ed. São Paulo: Artmed – Grupo A, 2004.
- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325–347, 2010.
- BHUTANI, U.; BASU, T.; MAJUMDAR, S. Oral Drug Delivery: Conventional to Long

Acting New-Age Designs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 162, n. September 2020, p. 23–42, 2021.

BIONANOCOMPOSITES, P. L. A. H. Chemical and Hydrophobic Properties of PLA / HNTs-ZrO₂ Bionanocomposites. **Journal of Physics: Conf. Series** **1019**, p. 012065, 2018.

BLACKER, C. *et al.* Primary evaluation of an air-cooling device to reduce oral mucositis: a pilot study in healthy volunteers. **Medical Oncology**, v. 37, n. 12, p. 1–6, 2020.

BLAKAJ, A. *et al.* Oral mucositis in head and neck cancer: Evidence-based management and review of clinical trial data. **Oral Oncol**, v. 95, p. 29-34, aug. 2019.

BODDUPALLI, B. M. *et al.* Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, v. 1, n. 4, p. 381–387, 2010.

BRESCANSIN, E. G. **Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais contendo o fármaco nistatina**. Orientador: Francisco Benedito Teixeira Pessine. 2006. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Departamento de Físico-química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BRUSCHI, M. L. *et al.* Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074–2089, ago. 2007.

CACCELLI, É. M. N.; PEREIRA, M. de L. M.; RAPOPORT, A. Avaliação da mucosite e xerostomia como complicações do tratamento de radioterapia no câncer de boca e orofaringe. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, v. 38, n. 2, p. 80-83, abr./maio./jun. 2009.

CALIXTO, G. M. F. **Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de peptídeo antigelatinolítico associados à terapia fotodinâmica no tratamento do câncer bucal**. 2017. 138 f. Orientador: Marlus Chorilli. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP, 2017.

CAMPOS, J. C. *et al.* Challenges in the local delivery of peptides and proteins for oral mucositis management. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 128, n. April, p. 131–146, 2018.

CAMPOS, M. I. da C. *et al.* Oral mucositis in cancer treatment: Natural history, prevention and treatment (Review). **Molecular and Clinical Oncology**, v. 2, p. 337-340, 2014.

CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo:

Artliber, 2004.

CARDONA, A. *et al.* Efficacy of chlorhexidine for the prevention and treatment of oral mucositis in cancer patients: a systematic review with meta-analyses. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 680–688, 2017.

CARNEIRO, V. R. T.; VILELA JÚNIOR, R. de A. Cuidados paliativos e manifestações orais em pacientes oncológicos: Revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e59911629768, 2022.

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

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

CASALINI, T. *et al.* A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. October, p. 1–16, 2019.

CHAVELI-LÓPEZ, B.; BAGÁN-SEBASTIÁN, J. V. Treatment of oral mucositis due to chemotherapy. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 8, n. 2, p. e201–e209, 2016.

CHEN, J. *et al.* Self-assembled liposome from multi-layered fibrous mucoadhesive membrane for buccal delivery of drugs having high first-pass metabolism. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 303–314, 2018a.

CHEN, J. *et al.* Two types of core/shell fibers based on carboxymethyl chitosan and Sodium carboxymethyl cellulose with self-assembled liposome for buccal delivery of carvedilol across TR146 cell culture and porcine buccal mucosa. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 700–709, 2019.

CHEN, S. *et al.* Electrospinning: An enabling nanotechnology platform for drug delivery and regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 132, p. 188–213, July 2018b.

CHOKSI, N.; DESAI, H. Synthesis of Biodegradable Polylactic Acid Polymer By Using Lactic Acid Monomer. **International Journal of Applied Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 377–384, 2017.

CIDON, E. U. Chemotherapy induced oral mucositis: Prevention is possible. **Chinese Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 6, 2018.

CONJUNSKKI, R. M. Mucosite oral induzida por tratamento oncológico: revisão de literatura. **Revista Voos Polidisciplinar**, Guarapuava (PR), Centro Universitário Uniguairacá, edição especial, v. 10, n. 3, p. 71–92, jul./dez. 2021.

COSTA, R. G. F. *et al.* Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012a.

COSTA, R. G. F. *et al.* Eletrofiação de polímeros em solução. Parte II: Aplicações e perspectivas. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 178–185, 2012b.

CURRA, M. *et al.* Protocolos quimioterápicos e incidência de mucosite bucal. Revisão integrativa. **Einstein**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2018.

DANELUTI, A. L. M. *et al.* Preclinical and clinical studies to evaluate cutaneous biodistribution, safety and efficacy of UV filters encapsulated in mesoporous silica SBA-15. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 169, p. 113–124, 2021.

DEEPAK, A.; GOYAL, A. K.; RATH, G. Nanofiber in transmucosal drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 43, n. November 2017, p. 379–387, 2018.

DEROUICHE, M. T. T.; ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. **Toxicology in Vitro**, v. 45, n. June, p. 393–396, 2017.

DESTEFANO, V.; KHAN, S.; TABADA, A. Applications of PLA in modern medicine. **Engineered Regeneration**, v. 1, n. April, p. 76–87, 2020.

DREYER, J. P. **Eletrofiação do poli(óxido de etileno) e acetato de celulose e a influência da incorporação de aromatizantes no processo de eletrofiação**. 2015. 109 f. Orientador Edson Minatti. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DRZEŹDŹON, J. *et al.* Characterization of polymers based on differential scanning calorimetry based techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 51–56, 2019.

ENGELKE, L.; WINTER, G.; ENGERT, J. Application of water-soluble polyvinyl alcohol-based film patches on laser microporated skin facilitates intradermal macromolecule and nanoparticle delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 128, p. 119-130, july. 2018.

ELAD, S. *et al.* MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 126, n. 19, p. 4423–4431, 2020.

FATTAHI, F. S.; KHODDAMI, A.; AVINC, O. Poly (Lactic Acid) Nano-fibers as Drug-delivery Systems: Opportunities and challenges. **Nanomedicine Research Journal**, v. 4, n. 3, p. 130–140, 2019.

FERREIRA, F. C., *et al.* Absorção de Água, Solubilidade em Água, Propriedades Mecânicas e Morfológicas de Compósitos de Glúten de Milho e Poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) Reforçados com Fibras de Coco Verde. **Polímeros**, v. 23, n. 6, p. 807-813, 2013.

- FERREIRA, K. do N. **Estudo da liberação controlada de sinvastatina utilizando nanofibras de PLA/PEG produzidas por fiação por sopro em solução.** Orientador: Eliton Souto de Medeiros. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.
- FRENOT, A.; CHRONAKIS, I. S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 8, n. 1, p. 64–75, 2003.
- FRIDRIKH, S. *et al.* Controlling the Fiber Diameter during Electrospinning. **Physical Review Letters**, v. 90, n. 14, 2003.
- FRIEDL, J. D. *et al.* SEDDS-loaded mucoadhesive fiber patches for advanced oromucosal delivery of poorly soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 348, n. February, p. 692–705, 2022.
- FUNAHARA, R. *et al.* Effects of a miconazole oral patch on preventing development of oral candidiasis in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy: results of a preliminary study quantifying the prevalence of *Candida albicans* in saliva. **Supportive Care in Cancer**, v. 30, n. 1, p. 907–914, 2022.
- GEBRI, E. *et al.* N-Glycosylation Alteration of Serum and Salivary Immunoglobulin A Is a Possible Biomarker in Oral Mucositis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1747, 2020.
- GHOLIZADEH, N.; SHEYKHBAHAIEI, N.; SADRZADEH-AFSHAR, M.-S. New Treatment Approaches of Oral Mucositis: A Review of Literature. **Advances in Human Biology**, v. 6, n. 2, p. 66, 2016.
- GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003.
- GUERRINI, L. M. *et al.* Thermal and structural characterization of nanofibers poly(vinyl alcohol) produced by electrospinning. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, p. 1680, 2009.
- GÜRBÜZ, B. N. *et al.* Metodologias dinâmicas de avaliação da percepção sensorial: comparação da aplicação do desvanecimento automático (fading) na metodologia Temporal-Check-All-That-Apply para a caracterização de Queijo S. Jorge (DOP). **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. X, ed. esp., p. 1-12, 2021.
- HADY, M. A. *et al.* Design of transfersomal nanocarriers of nystatin for combating vulvovaginal candidiasis; A different prospective. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 211, n. December 2021, p. 112304, 2022.
- HASHEMINASAB, F. S. *et al.* Ethnopharmacological knowledge for management of oral mucositis in zahedan, southeast iran. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 192–203, 2021.
- HOFMANOVÁ, J. K. **Sensory assessment and acceptability of coated tablets**

relationship between instrumental methods and human data. 2020. 332 f. Tese (Doctor of Philosophy) - School of Pharmacy, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, 2020.

H.R., R. *et al.* Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. **J Control Release**, v. 307, p. 393-409, 2019.

ICCVAM. **ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products.** NIH Publication 10-7553. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Detecção precoce do câncer.** Rio de Janeiro: INCA, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Detecção precoce do câncer.** Rio de Janeiro: INCA, 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020 – Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JONOOBI, M. *et al.* Mechanical properties of cellulose nanofiber (CNF) reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion. **Composites Science and Technology**, Malasia, v. 70, p. 1742-1747, 2010.

KAZSOKI, A.; SZABÓ, P.; ZELKÓ, R. Prediction of the hydroxypropyl cellulose—poly(vinyl alcohol) ratio in aqueous solution containing papaverine hydrochloride in terms of drug loaded electrospun fiber formation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 138, p. 357–362, 2017.

KONELL, C. F. **Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de cloridrato de quitosana contendo nistatina visando a liberação tópica.** 2014. 114 f. Orientador: Marcos Antonio Segatto Silva. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

LALIA, B. S. *et al.* A review on membrane fabrication: Structure, properties and performance relationship. **Desalination**, v. 326, p. 77–95, 2013.

LAMOLHA, M. A. **Desenvolvimento e avaliação de formas alternativas de suplementos de cafeína para praticantes de atividades físicas.** Orientador: Érico Chagas Caperuto. 2019. 172 f. Tese (Doutorado em Educação Física), Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, 2019.

LANNUTTI, J. *et al.* Electrospinning for tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, n. 3, p. 504–509, 2007.

LESSA, A. de F. N. *et al.* Epidemiological and Microbiological Aspects of Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients During Radiotherapy. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 90838–90855, 2020.

LI, D.; FREY, M. W.; BAEUMNER, A. J. Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies. **Journal of Membrane Science**, v. 279, n. 1-2, p. 354-363, 2005.

LI, P. J. *et al.* Predictive Model and Precaution for Oral Mucositis During Chemo-Radiotherapy in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. November, p. 1–11, 2020.

LIU, S. *et al.* Current applications of poly(lactic acid) composites in tissue engineering and drug delivery. **Composites Part B: Engineering**, v. 199, n. May, p. 108238, 2020.

LIU, S. *et al.* Status of Treatment and Prophylaxis for Radiation-Induced Oral Mucositis in Patients With Head and Neck Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, n. March, p. 1–14, 2021.

MACEDO, A. S. *et al.* Novel and revisited approaches in nanoparticle systems for buccal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 320, n. October 2019, p. 125–141, 2020.

MADEIRA, M. C.; LEITE, H. F.; RIZZOLO, R. J. C. Anatomia da Cavidade Oral. *In*: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. (orgs.). **Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica**. São Paulo: Blucher Open Access, 2016. p. 25-60.

MANN, G. *et al.* Polymeric and electrospun patches for drug delivery through buccal route: Formulation and biointerface evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 68, n. November 2021, p. 103030, 2022.

MARIA, O. M.; ELLOPOULOS, N.; MUANZA, T. Radiation-Induced Oral Mucositis. **Front. Oncol.**, v. 7, may. 2017.

MARINHO, P. M. L. *et al.* Chemotherapy-related oral mucositis in breast cancer patients: a brief review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e25610313338, 2021.

MARTÍN-VILLENA, M. J. *et al.* Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 1–11, 2013.

MAZZARINO, L. **Sistemas nanoestruturados decorados com quitosana para liberação bucal da curcumina**. 2013. 279 f. Orientadora: Elenara Lemos Senna. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

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

McCULLOUGH, R. W. Prothelial™ (polymerized cross-linked high potency sucralfate): medical device therapy for treatment and prevention of mucositis.

European Journal of Research in Medical Sciences, v. 2, n. 2, p. 30-58, 2014.

MEDEIROS, G. B. **Preparação e caracterização de nanofibras de zeína/poli(óxido de etileno) por eletrofiação em solução**. 2018. 94 f. Orientadora Elisângela Corradini. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2018.

MEDEIROS, M. dos S. G. de; GARRUTI, D. dos S. Estudos de palatabilidade de medicamentos: análise sensorial e aceitabilidade de formulações pediátricas. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 6, n. 2, p. 44, 2018.

MENEZES, A. C. *et al.* Abordagem clínica e terapêutica da mucosite oral induzida por radioterapia e quimioterapia em pacientes com câncer. **Rev. Bras. Odontol.**, v. 71, n. 1, p. 35-38, 2014.

MERCANTE, L. A. *et al.* Electrospun nanofibers and their applications: advances in the last decade. **Química Nova**, v. 44, n. 6, p. 717–736, 2021.

MIRANDA, S. S.; QUEIROZ, L. R.; FREITAS, V. S. Prevenção e tratamento das mucosites orais: uma revisão sistemática. **Rev. Saúde Col. UEFS**, Feira de Santana, v. 6, n. 2, p. 66-73, dez. 2016.

MOGENSEN, S. *et al.* A novel lozenge containing bupivacaine as topical alleviation of oral mucositis pain in patients with head and neck cancer: a pilot study. **PAIN Reports**, v. 1, n. 3, p. e571, sept. 2016.

MONEIM, A. E. A. *et al.* Oral mucositis: Melatonin gel an effective new treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 1003, 2017.

MORADKHANNEJHAD, L. *et al.* The effect of molecular weight and content of PEG on in vitro drug release of electrospun curcumin loaded PLA/PEG nanofibers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, n. January, p. 101554, 2020.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8 ed. Campinas: UNICAMP, 1993.

MOUTSATSOU, P.; COOPMAN, K.; GEORGIADOU, S. Biocompatibility assessment of conducting PANI/chitosan nanofibers for wound healing applications. **Polymers**, v. 9, n. 12, 2017.

MUHEEM, A. *et al.* A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p. 413–428, 2016.

MUPPALANENI, S.; MASTROPIETRO, D.; OMIDIAN, H. Mucoadhesive Drug Delivery Systems. **Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery**, v. 9781118098, p. 319–342, 2013.

NARAYANAN, G. *et al.* Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 107, p. 247–276, 2016.

NISTA, S. V. G. **Desenvolvimento e caracterização de nanofibras de acetato de celulose para liberação controlada de fármacos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

NISTA, S. V. G.; BETTINI, J.; MEI, L. H. I. Coaxial nanofibers of chitosan- alginate-PEO polycomplex obtained by electrospinning. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 222–228, 2015.

OLIVEIRA, C. A. de; ANDRADE, P. L.; REZENDE, T. K de L. Controle de qualidade em análise sensorial: uma revisão. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, São Paulo, v. 8.n. 11, p. 3043-3054, nov. 2022.

OLIVEIRA, J. E. *et al.* Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2013, Article ID 409572, 2013.

ORONSKY, B. *et al.* A Review of Clinical Radioprotection and Chemoprotection for Oral Mucositis. **Translational Oncology**, v. 11, n. 3, p. 771-778, june. 2018.

PARK, S. H.; LEE, H. S. Meta-analysis of oral cryotherapy in preventing oral mucositis associated with cancer therapy. **International Journal of Nursing Practice**, v. 25, n. 5, p. e12759, 2019.

PATEL, M. Oral Cavity and Candida albicans: Colonisation to the Development of Infection. **Pathogens**, v. 11, n. 3, 2022.

PATEL, V. F.; LIU, F.; BROWN, M. B. Modeling the oral cavity: In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 746–756, 10 ago. 2012.

PEDDAPALLI, H.; GANTA, R. P.; BOGGULA, N. Formulation and Evaluation of Transdermal Patches for Antianxiety Drug. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 127-136, aug. 2018.

PENSÉ-LHÉRITIER, A. M. Introduction of nonfood sensory evaluation practices. *In*: PENSÉ-LHÉRITIER, A. M.; BLACE, I.; DELARUE, J. (edits). **Nonfood Sensory Practices**. Elsevier Science, 2021. p. 1–16.

PINTO, M. C. **Otimização da formulação de um medicamento manipulado para o tratamento da mucosite.** 2013. 106 f. Orientadores: Teófilo Vasconcelos; Rita Palmeira de Oliveira. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013.

PORTER, J. R.; HENSON, A.; POPAT, K. C. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 30, n. 5, p.

780–788, 2009.

PREZOTTI, F. G. *et al.* Preparation and characterization of free films of high amylose/ pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, EUA, v. 38, n. 11, p. 1354-1359, nov. 2012.

PULITO, C. *et al.* Oral mucositis: The hidden side of cancer therapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2020.

QIN, Z. *et al.* Fast dissolving oral films for drug delivery prepared from chitosan/pullulan electrospinning nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 224–231, 2019.

RABER-DURLACHER, J. E.; ELAD, S.; BARASCH, A. Oral mucositis. **Oral oncology**, v. 46, n. 6, p. 452–6, 2010.

RAI, A. *et al.* Nystatin Effectiveness in Oral Candidiasis Treatment: A Systematic Review & Meta-Analysis of Clinical Trials. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1677, 2022.

RAY, S. S. *et al.* A comprehensive review: Electrospinning technique for fabrication and surface modification of membranes for water treatment application. **RSC Advances**, v. 6, n. 88, p. 85495–85514, 2016.

RENEKER, D. H.; CHUN, I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. **Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 216, 1996.

RIERA, F. O. *et al.* Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 1–16, 2022.

RITA, A.; FIGUEIRAS, R.; COIMBRA, U. de. Desenvolvimento De Sistemas Mucoadesivos Para a Administração Controlada De Fármacos. **Boletim Informativo Geum**, v. 7, n. 2, p. 63, 2016.

ROCHA, F. G. C. W. *et al.* Ocorrência de candidíase oral em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço submetidos aos tratamentos antineoplásicos. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v. 16, n. 3, p. 318-322, set./dez. 2017.

RODRÍGUEZ-CABALLERO, A. *et al.* Cancer treatment-induced oral mucositis: A critical review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 2, p. 225–238, 2012.

RODRÍGUEZ-FUENTES, M. E. *et al.* Oral microbiome and systemic antineoplastics in cancer treatment: A systematic review. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 27, n. 3, p. e248–e256, 2022.

RUITER, F. A. A. *et al.* A design of experiments approach to identify the influencing parameters that determine poly-D,L-lactic acid (PDLLA) electrospun scaffold morphologies. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 12, n. 5, 2017.

- RUSSO, E. *et al.* A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 113–125, 2016.
- SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1666–1691, 2005.
- SANDRI, G. *et al.* **(Trans)buccal drug delivery**. Vol. 8. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2020.
- SARRIO, R. V.; SILVESTRI, L. J. **Validation of Analytical Assays and Test Methods for the Pharmaceutical Laboratory**. The Regulatory Forum – Sponsors by AccuReg, Flórida, 1996.
- SATTAR, M.; SAYED, O. M.; LANE, M. E. Oral transmucosal drug delivery – Current status and future prospects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1, p. 498–506, 2014.
- SHAKYA, P. *et al.* Palatal mucosa as a route for systemic drug delivery: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 1, p. 2–9, 2011.
- SHANKAR, R. *et al.* Competitive hydrogen-bonding in polymer solutions with mixed solvents. **Soft Matter**, v. 5, n. 2, p. 304–307, 2009.
- SHAO, H. *et al.* Effect of electrospinning parameters and polymer concentrations on mechanical-to-electrical energy conversion of randomly-oriented electrospun poly (vinylidene fluoride) nanofiber mats. **RSC Advances**, v. 5, n. 19, p. 14345-14350, 2015.
- SHARIFI, M. *et al.* Electrospun PCL and PLA hybrid nanofibrous scaffolds containing *Nigella sativa* herbal extract for effective wound healing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 46, p. 9–11, 2020.
- SHARON, E. *et al.* MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 126, n. 19, p. 4423-4431, 2020.
- SHETTY, B. R. *et al.* Role of antimicrobial photodynamic therapy in reducing subgingival oral yeasts colonization in patients with peri-implant mucositis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 38, n. March, p. 102803, 2022.
- SHIPP, L. *et al.* Buccal films: A review of therapeutic opportunities, formulations & relevant evaluation approaches. **Journal of Controlled Release**, v. 352, n. November, p. 1071–1092, 2022.
- SHIRVAN, A. R.; BASHARI, A.; HEMMATINEJAD, N. New insight into the fabrication of smart mucoadhesive buccal patches as a novel controlled-drug delivery system. **European Polymer Journal**, v. 119, n. June, p. 541–550, 2019.
- SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and

tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 1989–2006, 2008.

SILVA, A. C. N. *et al.* Susceptibility testing of *Candida albicans* by disk diffusion method: A comparison of the culture media used. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 4, p. 363–369, 2016.

SILVA, B. M. A. **Oral films**: exploring formulation tailoring and clinical proof of concept. 2017. 169 f. Orientador: Sérgio Simões. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2017.

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

SILVA, C. F.; PAULA, D. D. M. de; BORGES, K. B. Electrospinning applied to the development of adsorbent nanofibers aiming at improving solid phase (micro)extraction techniques. **Química Nova**, v. 44, n. 9, p. 1137–1150, 2021.

SILVA, V. C. DE S. *et al.* Prevalence and susceptibility profile of *Candida* spp. isolated from patients in cancer therapy. **Archives of Oral Biology**, v. 119, n. September, 2020.

SINGHVI, M. S.; ZINJARDE, S. S.; GOKHALE, D. V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 6, p. 1612–1626, 2019.

SOFI, H. S. *et al.* Electrospun nanofibers for the delivery of active drugs through nasal, oral and vaginal mucosa: Current status and future perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 111, p. 110756, 2020.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev. Cancer.**, v. 4, n. 4, p. 277–284, 2004.

SOUTOME, S. *et al.* A preliminary study of suppression of candida infection by miconazole mucoadhesive tablets in oral or oropharyngeal cancer patients undergoing radiotherapy. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2022.

STEFANOVIC, J. *et al.* Synthesis, characterization, and antifungal activity of nystatin-gum Arabic conjugates. **Journal Applied Polymer Science**, v. 127, n. 6, p. 4736–4743, 2013.

SUN, C.; BOLUK, Y.; AYRANCI, C. Investigation of nanofiber nonwoven meshes produced by electrospinning of cellulose nanocrystal suspensions in cellulose acetate solutions. **Cellulose**, v. 22, n. 4, p. 2457–2470, 2015.

SZOMEK, M. *et al.* Direct observation of nystatin binding to the plasma membrane of living cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1863, n. 2, p. 183528, 2021.

TARDELLI, E. R. **Desenvolvimento de pré-formulação de mucoadesivo bucal**

como carreador de fármaco. 2010. 102 f. Orientadora: Marta Maria Duarte Carvalho Vila. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2010.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 3. ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

TYLER, B. *et al.* Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 163–175, 2016.

UNILA. No TitleЫВМЫВМЫВ. **Ятыатат**, v. вы12у, n. 235, p. 245, 2007.

VADOVICS, M. *et al.* Candida albicans Enhances the Progression of Oral Squamous. **American Society for Microbiology**, n. October 2021, p. 1–21, 2022.

VIEIRA, G. S. **Análise sensorial descritiva**: desafios entre a metodologia e a percepção humana. Orientador: Pedro Alves da Rocha Filho. 2019. 234 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

YANG, C. *et al.* A facile electrospinning method to fabricate polylactide/graphene/MWCNTs nanofiber membrane for tissues scaffold. **Applied Surface Science**, v. 362, p. 163–168, 2016.

YANG, H. *et al.* Preparation of hydrophobic surface on PLA and ABS by fused deposition modeling. **Polymers**, v. 12, n. 7, 2020.

YU *et al.* Effects of 9 oral care solutions on the prevention of oral mucositis: a network meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicine**, v. 99, n. 16, p. e19661, 2020.

ZAHIR-JOUZDANI, F. *et al.* In situ gelling and mucoadhesive polymers: why do they need each other? **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 10, p. 1007–1019, 2018.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (coords.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ZENG, J. *et al.* Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning–influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology. **e-Polymers**, v. 3, n. 1, 2003.

ZHANG, X. *et al.* Comparative prevention potential of 10 mouthwashes on intolerable oral mucositis in cancer patients: A Bayesian network analysis. **Oral Oncology**, v. 107, 1 ago. 2020.

ZHAO, Z. *et al.* Nanofiber orodispersible films based on carboxymethyl curdlan and

PEO: New delivery system for amlodipine besylate. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 635, n. December 2021, p. 128096, 2022.

ZUO, W. *et al.* Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning. **Polymer Engineering and Science**, v. 45, n. 5, p. 704–709, 2005.

10 APÊNDICES

Apêndice 1 – Escala Hedônica de 9 pontos

Nome: _____ Data: _____

Avalie a amostra de acordo com a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou não do produto. Marque a posição da escala que melhor reflita seu julgamento.

Atributo: **APARÊNCIA**

- Gostei extremamente
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Indiferente
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei extremamente

Atributo: **SABOR**

- Gostei extremamente
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Indiferente
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei extremamente

Atributo: **TEXTURA**

- Gostei extremamente
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Indiferente
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei extremamente

Atributo: **CONFORTO**

- Gostei extremamente
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Indiferente
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei extremamente

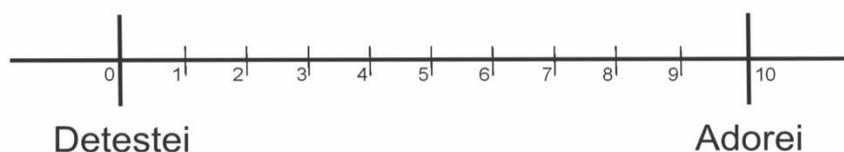
Atributo: **MANUSEIO**

- Gostei extremamente
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Indiferente
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei extremamente

Atributo: **ADESÃO À MUCOSA**

- Gostei extremamente
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Indiferente
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei extremamente

AVALIAÇÃO GLOBAL:



Apêndice 2 – Validação Parcial de Método por Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta para Quantificação da NYS

A validação parcial de método analítico para quantificar a concentração de NYS nas membranas eletrofiadas seguiu a metodologia proposta por Aguiar e colaboradores (2010) e a RDC N° 166 (ANVISA, 2017).

1 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância testada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ANVISA, 2017).

Para a avaliação da linearidade, foi preparada uma solução padrão de nistatina a partir da transferência de 50 mg do fármaco (5858,46 UI/mg) para um balão volumétrico de 100 mL, ajustando-se o volume com metanol e ácido acético glacial (95:5). A partir desta solução estoque, foram preparadas soluções com concentrações no intervalo de 10 µg/mL a 30 µg/mL de nistatina, utilizando os mesmos solventes. Cada solução foi analisada em triplicata pela técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta, em 279 nm. As análises foram realizadas em triplicata conforme Tabela 01.

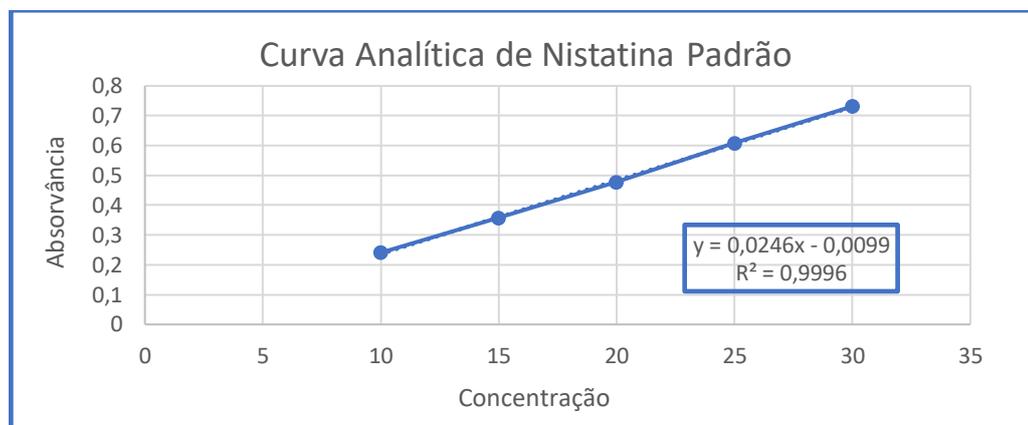
Tabela 01: Curva de calibração Nistatina

Concentração (µg)	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média
10	0,241	0,240	0,241	0,241
15	0,317	0,383	0,372	0,357
20	0,476	0,481	0,475	0,477
25	0,610	0,608	0,607	0,608
30	0,757	0,725	0,712	0,731

Fonte: Própria autora

A partir dos resultados obtidos em três determinações para cada concentração, foi construída a curva analítica média e determinada a equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Curva analítica a partir de soluções de nistatina padrão em concentrações entre 10 e 30 µg/mL com emprego da espectrofotometria de absorção no UV (279 nm).



Fonte: Própria autora

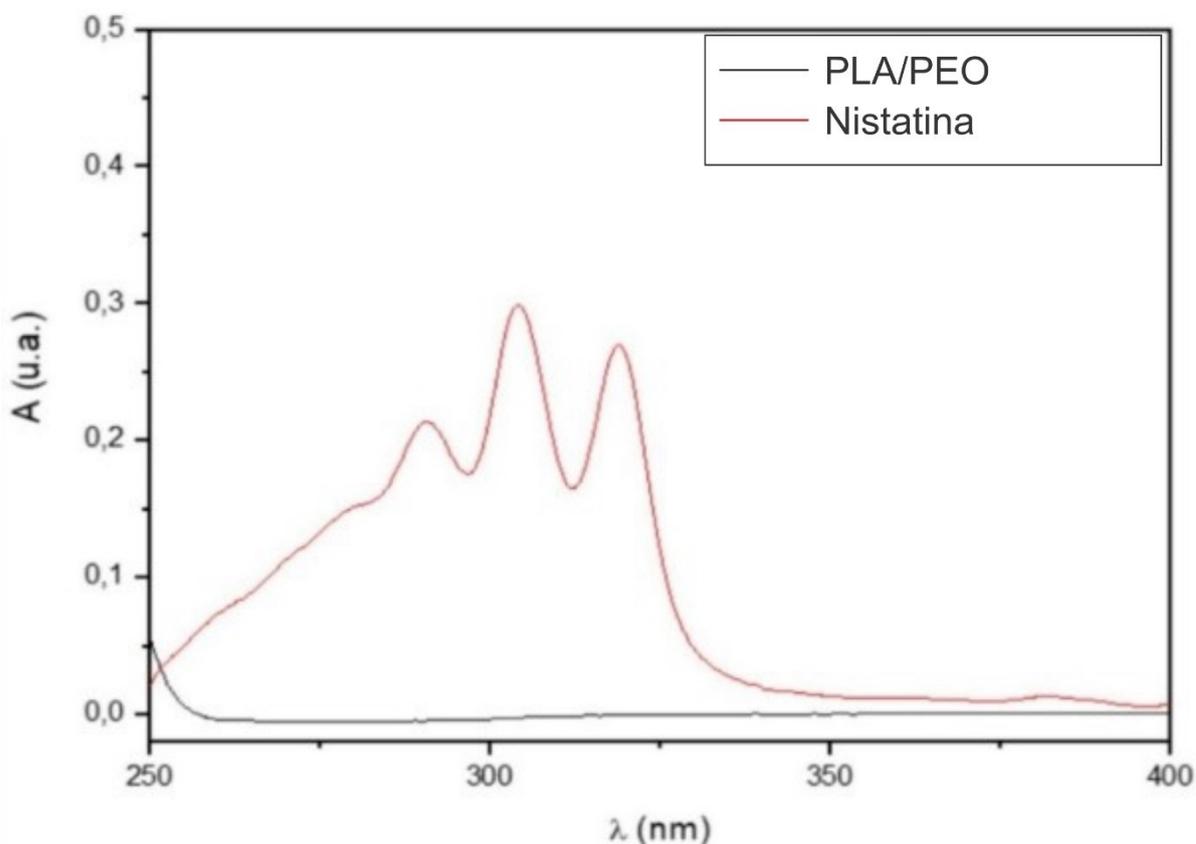
Os resultados demonstraram que a nistatina apresentou uma correlação linear na faixa de 10 a 30 µg/mL. A equação da reta foi $y = 0,0246x - 0,0099$, com um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9996, como preconizado pela RDC nº 166 de 24 de julho de 2017.

2 Especificidade

O termo especificidade, define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da formulação. O método analítico por espectrofotometria no UV considera que a grande maioria das substâncias absorve na faixa do ultravioleta. Porém, para ser usado de forma seletiva faz-se necessário que os demais componentes da formulação não apresentem absorvância no mesmo comprimento de onda do analito a ser quantificado. A especificidade do método foi validada através da comparação dos espectros de absorção de soluções contendo cada um dos componentes das membranas eletrofiadas, a fim de verificar se algum desses componentes absorve próximo ao comprimento de onda característico da Nistatina (279 nm).

Assim sendo, para a avaliação da especificidade foi realizada uma varredura entre 250 e 400 nm, utilizando-se uma solução contendo os componentes da membrana eletrofiada preparadas nas mesmas condições de ensaio e uma solução com os demais componentes da membrana. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1.

Figura 1: Curva analítica a partir de solução de nistatina padrão em concentração de 10 µg/mL com emprego da espectrofotometria de absorção no UV (279 nm).



Fonte: Própria autora

Observa-se na Figura 1 que os resultados obtidos corroboram com os achados na literatura que estabelecem que, a varredura de uma solução de nistatina a 10 µg/mL em metanol deve apresentar um espectro com 4 pontos característicos, na faixa de 220 nm à 350 nm (AGUIAR, 2007).

Considerando que a especificidade é a capacidade do método de medir um composto na presença de outro componente, o resultado exposto indica a habilidade do método de diferenciar e quantificar a nistatina na presença de outros componentes.

3 Precisão

A precisão do método analítico foi determinada a partir da repetibilidade (intradia). A repetibilidade foi avaliada pela determinação de seis análises da mesma concentração de NYS (10 µg/mL), no mesmo dia e sob as mesmas condições. As

medidas foram realizadas em triplicata e expressas como desvio padrão relativo (DPR) (%). A precisão do método analítico para a quantificação da nistatina estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Precisão referente ao método analítico por espectrofotometria de absorção no UV para quantificação de nistatina

Amostra	Absorvância	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média	DP	CV%	%
1	0,289	12,15				99,19
2	0,294	12,35				100,85
3	0,299	12,56	12,27	0,16	1,19	102,51
4	0,291	12,23				99,85
5	0,289	12,15				99,19
6	0,290	12,19				99,52

Fonte: Própria autora

De acordo com a RDC n° 166/2017, os critérios de aceitação para a precisão são definidos conforme o objetivo do método, variabilidade intrínseca do método, concentração de trabalho e concentração do analito na amostra. Seguindo o preconizado na mesma RDC, optou-se por utilizar como referência a faixa de trabalho de 80% (oitenta por cento) a 120% (cento e vinte por cento) para teor, uma vez que, não existem resultados padrões para avaliação da variação do teor de nistatina em membranas eletrofiadas.

Desta forma, os resultados obtidos no ensaio de precisão apresentaram coeficiente de variação baixo nas seis determinações realizadas na mesma concentração, com resultado médio de teor de 100,18%. Este resultado apresentou-se adequado e satisfatório demonstrando que a análise de espectrofotometria no ultravioleta é um método preciso para a forma farmacêutica analisada.

4 Exatidão

A exatidão é obtida pelo grau de concordância dos resultados individuais atingidos pelo método em relação a um valor considerado verdadeiro. A exatidão foi avaliada em triplicata através da análise de soluções teste nas concentrações conhecidas de NYS de 10, 12 e 20 $\mu\text{g/mL}$, com os solventes metanol e ácido acético glacial (95:5), analisadas em triplicata. A exatidão foi calculada como sendo a diferença percentual de recuperação entre a concentração experimental média e a concentração teórica em cada nível.

Os resultados obtidos (tabela 3) para a exatidão da análise de espectrofotometria de absorção no ultravioleta na quantificação de nistatina na

membrana eletrofiada, variaram de 98,2 a 101,8% para as amostras avaliadas no mesmo dia, o que possibilitou considerar o método exato.

Tabela 3: Exatidão referente ao método analítico por espectrofotometria de absorção no UV para quantificação de nistatina

Concentração Adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)
22,25	22,43	101,8	99,75
27,25	26,98	98,2	
32,25	32,10	99,3	

Fonte: Própria autora