

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA AENISHANSLIN

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES MUCOADESIVAS  
BUCAIS INCORPORADAS COM COMPLEXOS DE INCLUSÃO  $\beta$ -CICLODEXTRINA  
E FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

PONTA GROSSA  
2022

JULIANA AENISHANSLIN

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES MUCOADESIVAS  
BUCAIS INCORPORADAS COM COMPLEXOS DE INCLUSÃO  $\beta$ -CICLODEXTRINA  
E FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de concentração: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Priscileila Colerato Ferrari

PONTA GROSSA  
2022

Aenishanslin, Juliana

A251        Desenvolvimento e avaliação de formulações mucoadesivas bucais incorporadas com complexos de inclusão  $\beta$ -ciclodextrina e fármacos antifúngicos/ Juliana Aenishanslin. Ponta Grossa, 2022. 61 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos), Universidade Estadual de PontaGrossa.

Orientadora: Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari.

1 Afecções bucais. 2. Clorexidina. 3. Nistatina. 4. Biodisponibilidade. 5. Mucoadesão. I. Ferrari, Priscileila Colerato (orient.). II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. III.T.

CDD: 615.321



**Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Associação Ampla entre a  
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO **07/2022** DA MESTRANDA **JULIANA AENISHANSLIN**, REALIZADA NO DIA 02 DE SETEMBRO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dois dias do mês de setembro de dois mil e vinte e dois, às 14h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão fechada, por videoconferência (<https://meet.google.com/jxt-dbfaemu>), sob a presidência da Professora Doutora Priscileila Colerato Ferrari, reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda **JULIANA AENISHANSLIN**, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos, constituída pela Professora Doutora Priscileila Colerato Ferrari (UEPG/PR - presidente) e demais Doutores (membros titulares): Karin Hermana Neppelenbroek (USP/SP) e Juliana Bonametti Olivato (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: **“DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES MUCOADESIVAS BUCAIS INCORPORADAS COM COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE  $\beta$ CICLODEXTRINA E FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS”**. Encerrada a defesa, a banca considerou

\_\_\_\_\_ a Dissertação, considerada **cAPROVADA** como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): \_\_\_\_\_

Alteração de título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

Priscileila Colerato Ferrari (UEPG/PR)  
Presidente

Karin Hermana Neppelenbroek (USP/SP)  
Titular

Juliana Bonametti Olivato (UEPG/PR)  
Titular

Ponta Grossa, 02 de setembro de 2022.

## RESUMO

Diversas afecções da cavidade oral, como periodontite, estomatite, gengivite e úlceras são geralmente tratadas por meio de formulações orais tópicas. Essas formulações têm a vantagem de reduzir o grau de efeitos colaterais sistêmicos, mas apresentam como a maior desvantagem o curto período de permanência no local aplicado, sendo necessárias repetidas aplicações para obtenção de níveis adequados de concentração do fármaco. Mucoadesivos como sistema de liberação de fármacos são uma tendência na tecnologia farmacêutica, pois podem atuar diretamente no local da infecção, em menor dose e por tempo determinado. Com isso, é possível ter um impacto significativo no tratamento, uma vez que esse sistema tem como efeitos a otimização da biodisponibilidade dos agentes terapêuticos e um tempo de ação prolongado no local de administração, além da absorção mais rápida do fármaco nos tecidos locais. Visando otimizar a ação de fármacos antifúngicos e antissépticos como a nistatina e a clorexidina na mucosa oral, complexos de inclusão com ciclodextrinas têm sido sugeridos para aumentar a solubilidade dos fármacos e a estabilidade da molécula. Diante desse quadro, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar mucoadesivos contendo nistatina (Nis) ou clorexidina (Clx) pura ou complexada com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) para o tratamento de afecções bucais. Géis mucoadesivos formulados utilizando os polímeros quitosana e hidroxietilcelulose, foram desenvolvidos e testados para a incorporação dos fármacos puros ou complexados. Para determinar a composição das formulações, a caracterização envolveu ensaios de mucoadesão, tempo de residência, espalhabilidade, reologia e estabilidade. Após a incorporação dos fármacos, as formulações mucoadesivas foram avaliadas de acordo com suas propriedades reológicas em reômetro oscilatório, bioadesivas em texturômetro, liberação in vitro e permeação, em células de difusão vertical do tipo Franz. Os resultados obtidos mostraram que os géis são estáveis, apresentam propriedades mucoadesivas e comportamento elástico capazes de aumentar a retenção no local da aplicação, importante para que o fármaco permaneça em contato com a mucosa por maior período. Houve aumento considerável na velocidade da dissolução dos fármacos nos complexos de inclusão em comparação com sua forma pura e baixa permeação, indicando que o fármaco deve atuar na mucosa oral. Dessa maneira, os géis mucoadesivos apresentam-se como uma alternativa promissora para tratamento de afecções bucais, através do aumento do tempo de contato da formulação com a mucosa oral e da maior biodisponibilidade destes fármacos, causados pela formação dos complexos de inclusão com a  $\beta$ -ciclodextrina.

**Palavras-chave:** Cavidade oral; afecções bucais; clorexidina; nistatina; biodisponibilidade; mucoadesão; quitosana; hidroxietilcelulose.

## ABSTRACT

Several conditions of the oral cavity, such as periodontitis, stomatitis, gingivitis and ulcers are usually treated with topical oral formulations. These formulations have the advantage of reducing the degree of systemic side effects, but the main disadvantage is the short period of permanence in the applied site, requiring repeated applications to obtain adequate levels of drug concentration. Mucoadhesives as a drug delivery system are a trend in pharmaceutical technology, as they can act directly at the site of infection, in a lower dose and for a determined time. With this, it is possible to have a significant impact on the treatment since this system has the effect of optimizing the bioavailability of therapeutic agents and a prolonged action time at the administration site, in addition to the faster absorption of the drug in local tissues. Inclusion complexes with cyclodextrins have been suggested to increase the drugs' solubility and stability, aiming to optimize the action of antifungal and antiseptic drugs such as nystatin and chlorhexidine in the oral mucosa. Given this framework, this study aimed to develop and characterize mucoadhesive gels containing nystatin (Nys) or chlorhexidine (Clx) pure or complexed with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) for the treatment of oral conditions. Mucoadhesive gels formulated using chitosan and hydroxyethylcellulose polymers were developed and tested for the incorporation of pure or complexed drugs. Characterization involved mucoadhesion, residence time, spreadability, rheology, and stability tests in determining the composition of the formulations. After drug incorporation, the formulations were evaluated according to their rheological properties in an oscillatory rheometer, bioadhesive properties in texturometer, in vitro release, and permeation in vertical Franz diffusion cells. The results showed that the gels are stable and have mucoadhesive properties and elastic behavior capable of increasing retention at the application site, which is essential for the drug to remain in contact with the mucosa for a more extended period. There was a considerable increase in the speed of dissolution of the drugs in the inclusion complexes compared to their pure form and low permeation, indicating that the drug should act in the oral mucosa. Thus, mucoadhesive gels are a promising alternative for the treatment of oral disorders, by increasing the contact time of the formulation with the oral mucosa and the greater bioavailability of these drugs caused by the formation of inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrin.

**Keywords:** Oral cavity; oral diseases; chlorhexidine; nystatin; bioavailability; mucoadhesion; chitosan; hydroxyethyl cellulose.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
3.1 CAVIDADE ORAL .....	11
3.2 MUCOSA .....	13
3.3 MUCOADESÃO .....	13
3.4 FORMULAÇÕES MUCOADESIVAS ORAIS.....	15
3.5 POLÍMEROS MUCOADESIVOS.....	16
3.5.1 <i>Quitosana</i> .....	16
3.5.2 <i>Hidroxietilcelulose</i> .....	17
3.6 FÁRMACOS DE ESCOLHA E COMPLEXOS DE INCLUSÃO.....	18
3.6.1 <i>Nistatina (Nis)</i> .....	18
3.6.2 <i>Clorexidina (Clx)</i> .....	20
3.6.3 <i>β-ciclodextrinas</i> .....	21
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 REAGENTES E SOLVENTES .....	23
4.1.1 <i>Fármacos</i> .....	23
4.1.2 <i>Polímeros</i> .....	24
4.1.3 <i>Água purificada</i> .....	24
4.1.4 <i>Solventes e demais reagentes</i> .....	24
4.1.5 <i>Materiais</i> .....	25
4.2 MÉTODOS.....	25
4.2.1 <i>Desenho experimental</i> .....	25
4.2.2 <i>Desenvolvimento dos géis mucoadesivos</i> .....	26
4.2.3 <i>Caracterização dos géis mucoadesivos</i> .....	27
4.2.3.1 <i>Preparação do tecido</i> .....	27
4.2.3.2 <i>Preparação da saliva artificial</i> .....	27
4.2.3.3 <i>Ensaio de mucoadesão</i> .....	27
4.2.3.4 <i>Reologia</i> .....	28

4.2.3.5	Tempo de residência .....	29
4.2.3.6	Espalhabilidade .....	30
4.2.3.7	Estabilidade macroscópica .....	30
4.2.4	<i>Preparação dos complexos de inclusão</i> .....	30
4.2.5	<i>Incorporação dos fármacos e complexos de inclusão no gel mucoadesivo</i> .....	31
4.2.6	<i>Caracterização físico-química dos fármacos e complexos de inclusão</i> .....	31
4.2.6.1	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	31
4.2.6.2	Análise térmica .....	32
4.2.7	<i>Caracterização dos géis contendo os complexos de inclusão</i> .....	32
4.2.7.1	Análise da mucoadesão .....	32
4.2.7.2	Análise da reologia .....	32
4.2.7.3	Ensaio de liberação in vitro .....	33
4.2.7.4	Ensaio de permeação in vitro .....	33
4.2.8	<i>Método analítico por CLAE para quantificação de clorexidina</i> .....	33
4.2.9	<i>Método analítico por CLAE para quantificação de nistatina</i> .....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
5.1	OBTENÇÃO DOS GÉIS MUCOADESIVOS E ANÁLISES MACROSCÓPICAS .....	36
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS MUCOADESIVOS PARA A SELEÇÃO DA FORMULAÇÃO .....	37
5.2.1	<i>Ensaio de mucoadesão</i> .....	37
5.2.2	<i>Reologia</i> .....	38
5.2.3	<i>Tempo de residência</i> .....	40
5.2.4	<i>Espalhabilidade</i> .....	41
5.2.5	<i>Estabilidade macroscópica</i> .....	42
5.3	PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO E INCOPORAÇÃO NO GEL .....	43
5.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FÁRMACOS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO .....	44
5.4.1	<i>Análise termogravimétrica (TG)</i> .....	44
5.4.2	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i> .....	46
5.4.3	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	47

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS MUCOADESIVOS CONTENDO COMPLEXO DE INCLUSÃO .....	49
5.5.1 <i>Ensaio de mucoadesão</i> .....	49
5.5.2 <i>Reologia</i> .....	50
5.5.3 <i>Ensaio de liberação e permeação in vitro</i> .....	51
5.5.4 <i>Método analítico por CLAE para quantificação de clorexidina</i> .....	52
5.5.5 <i>Método analítico por CLAE para quantificação de nistatina</i> .....	53
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral é um ambiente complexo composto por língua, mucosa oral, dentes, palato mole e palato duro, sendo colonizada por diferentes habitats microbianos que formam um sistema heterogêneo. Além de bactérias e vírus, os fungos podem estar presentes no ambiente oral, sendo as espécies de *Candida* as mais importantes entre humanos. Tais espécies vivem em relação de comensalismo com a cavidade oral quando a microbiota está saudável. No entanto, se essa se apresenta desequilibrada, os fungos do gênero *Candida* passam a atuar como patógenos oportunistas, podendo causar doenças ao tecido bucal (LU; XUAN; WANG, 2019).

As formulações de medicamentos bucais tópicos são amplamente utilizadas no tratamento de uma série de afecções da cavidade oral, como gengivite, periodontite, estomatite e úlceras. Apresentam diversas vantagens, entre elas a redução da dose do medicamento, que é direcionado diretamente ao tecido alvo e a consequente diminuição do grau de efeitos colaterais sistêmicos. Porém, um problema comum das formulações convencionais voltadas para o tratamento de doenças da cavidade oral é o curto tempo de residência no local da aplicação, o que requer repetidas aplicações para obter níveis eficazes do fármaco. Portanto, nos últimos anos, várias formulações mucoadesivas têm sido estudadas a fim de prolongar a retenção do fármaco na cavidade oral (MURA; CORTI; CIRRI; MAESTRELLI; MENNINI; BRAGAGNI, 2010).

Agentes como a nistatina têm sido os fármacos de ação tópica mais utilizados para o tratamento de candidoses bucais, pois apresenta uma ação de amplo espectro e é considerada fungicida. A nistatina apresenta alta efetividade na inibição de *Candida* spp., rara detecção de cepas fúngicas resistentes e custo acessível, tornando esse fármaco vantajoso quando comparado a outros antifúngicos. A clorexidina tem sido amplamente utilizada para prevenção e tratamento de infecções bucais, como antisséptico e desinfetante para próteses removíveis. Apresenta uma ação de amplo espectro, incluindo efetividade contra *Candida albicans* e outros fungos, podendo ser considerada uma alternativa apropriada aos fármacos convencionais no tratamento da candidose bucal (MORIKAVA, 2020).

As ciclodextrinas são produtos cíclicos da hidrólise enzimática do amido por alguns microrganismos. Esses compostos possuem em sua estrutura grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior, assim, possuem exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica. Tal cavidade permite às ciclodextrinas

complexarem moléculas que apresentem dimensões compatíveis e alterarem as propriedades físico-químicas destas moléculas, como solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade. As ciclodextrinas apresentam a capacidade de solubilizar fármacos hidrofóbicos por meio da formação de complexos de inclusão solúveis em água (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

Dentre as ciclodextrinas, as  $\beta$ -ciclodextrinas são as mais amplamente utilizadas na complexação com várias classes de fármacos (FRACETO et al., 2007).

A formação de complexos de inclusão de nistatina e clorexidina com  $\beta$ -ciclodextrinas promove uma maior solubilidade desses fármacos em água, melhorando assim a sua biodisponibilidade, além de possuir um efeito protetor dessas moléculas, reduzindo sua degradação (SOMER et al., 2020).

Polímeros mucoadesivos como quitosana e hidroxietilcelulose, são excelentes alternativas para incorporação destes complexos de inclusão, promovendo uma maior aderência da formulação à mucosa oral. Assim, a proposta do presente estudo foi desenvolver e caracterizar géis mucoadesivos contendo nistatina e clorexidina puras ou complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina para o tratamento de afecções bucais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver géis mucoadesivos incorporados com os fármacos nistatina e clorexidina puros e complexados com  $\beta$ -ciclodextrina para uso bucal.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver diferentes géis e selecionar o que apresente melhor adesividade à mucosa oral, por meio de ensaios de reologia, mucoadesão, tempo de residência e espalhabilidade, para a incorporação dos fármacos;
- Incorporar nistatina e complexos de inclusão nistatina: $\beta$ -ciclodextrina ao gel selecionado;
- Incorporar clorexidina e complexos de inclusão clorexidina: $\beta$ -ciclodextrina ao gel selecionado;
- Avaliar a liberação *in vitro* dos fármacos e complexos de inclusão;
- Avaliar a permeação *in vitro* na mucosa bucal suína dos fármacos e complexos de inclusão;
- Analisar, por meio de testes reológicos, a viscosidade e elasticidade dos géis incorporados com os fármacos e complexos de inclusão;
- Realizar testes de mucoadesão em discos de mucina dos géis incorporados com os fármacos e complexos de inclusão;
- Avaliar a estabilidade dos géis desenvolvidos.

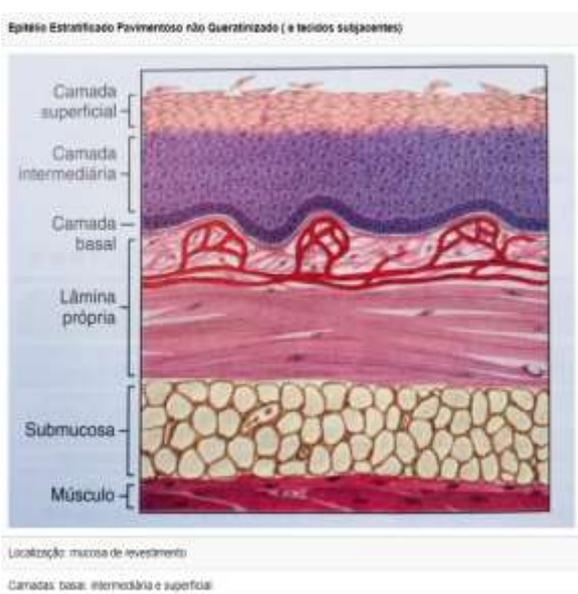
### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CAVIDADE ORAL

A cavidade oral é descrita algumas vezes como um espelho que reflete a saúde do indivíduo. Alterações na mucosa oral, podem ser vistas como indicativas de doenças, podendo revelar condições sistêmicas, como diabetes ou deficiência de vitamina, ou efeitos locais do tabaco ou álcool crônico (SQUIER; KREMER, 2001).

O epitélio da mucosa oral é uma barreira que separa os tecidos subjacentes de seu ambiente. A mucosa oral é formada por diferentes fenótipos: mucosa de revestimento, mucosa mastigatória e mucosa especializada. A mucosa de revestimento está localizada sobre estruturas móveis como palato mole, bochechas, lábios, mucosa alveolar, fórnice vestibular e assoalho da boca e é extensível e fracamente ligada a estruturas adjacentes por um tecido conjuntivo rico em elastina e tem um epitélio escamoso não queratinizado. A mucosa mastigatória é a capa protetora rígida e resistente da gengiva e do palato duro, formada por epitélio queratinizado e fortemente ligada por tecido conjuntivo denso ao osso subjacente. A mucosa especializada está localizada no dorso da língua, apresenta epitélio queratinizado e inclui papilas linguais e papilas gustativas como estruturas especializadas (GROEGER; MEYLE, 2019). Nas Figura 1, 2 e 3, podemos observar a formação histológica das diferentes mucosas.

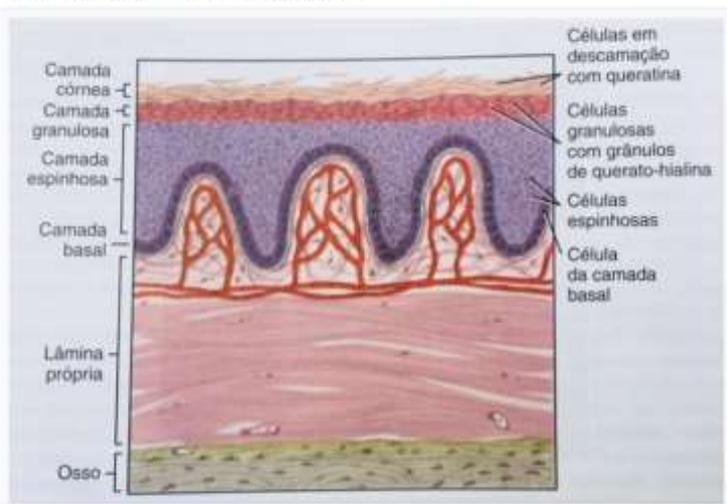
Figura 1- Mucosa de revestimento



Fonte: NANCI, 2013.

Figura 2- Mucosa mastigatória

Epitélio Estratificado pavimentoso Ortoqueratinizado



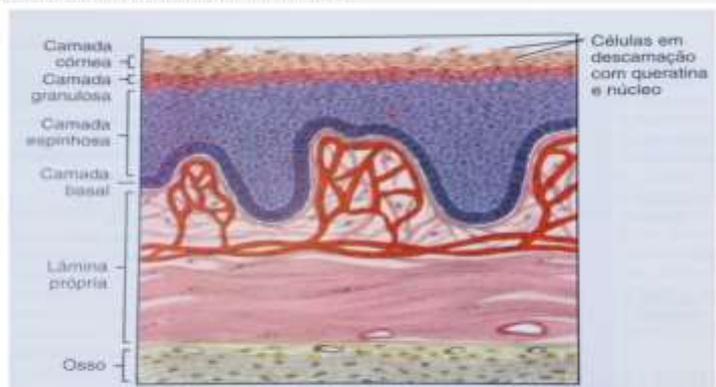
Localização: mucosa mastigatória

Camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea (células sem núcleo contendo apenas queratina)

Fonte: NANCI, 2013.

Figura 3- Mucosa especializada

Epitélio Estratificado Pavimentoso Paraqueratinizado



Localização: mucosa mastigatória

Camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea (células contendo queratina e núcleo)

Fonte: NANCI, 2013.

A cavidade oral é um ambiente complexo formado por habitats microbianos distintos, como dentes, mucosa bucal, palato mole e palato duro e língua, que representam um sistema ecológico heterogêneo rico em espécies. A microbiota oral pode ser usada como alvo para o tratamento de doenças orais e sistêmicas (LU; XUAN; WANG, 2019).

Existem muitos microorganismos na boca, entre os quais estão bactérias, fungos e vírus. Apesar das bactérias serem as mais abundantes na microbiota humana, podem ser encontradas 85 espécies de fungos. Entre esses fungos destacam-se as

espécies de *Candida*, que se apresentam comensais quando a microbiota oral está normal e patogênicas, quando ocorrem situações de desequilíbrio (LU; XUAN; WANG, 2019).

### 3.2 MUCOSA

As membranas mucosas são superfícies úmidas que revestem as paredes de várias cavidades do organismo e são uma camada de tecido conectivo alojada sobre uma camada de tecido epitelial. A umidade dessas superfícies se deve a presença de uma camada de muco, secretadas por células caliciformes sobre o tecido epitelial (COOK, KHUTORYANAKIY, 2015; SMART, 2005).

O muco é um produto biológico, heterogêneo, de aspecto viscoso, responsável pelo revestimento da maioria das superfícies epiteliais do organismo humano. Apresenta diversas funções, como lubrificar, diminuir o atrito ocasionado pelo contato e fazer uma barreira protetora contra substâncias estranhas ao organismo. Sua composição apresenta mais de 95% de água, e o restante corresponde a lipídios, hidratos de carbono, sais inorgânicos e glicoproteínas, das quais a mucina é a predominante, representando mais de 5% do peso total do muco, sendo a responsável por sua consistência de gel. As mucinas apresentam um núcleo proteico, composto predominantemente por aminoácidos serina e treonina, e desse, se ramificam cadeias de oligossacarídeos, as quais aumentam a solubilidade aquosa e conferem ação protetora sobre o núcleo proteico contra degradação proteolítica. Diversos fatores podem influenciar a produção de muco, dentre eles o sexo, idade, localização corporal ou a presença de alguma afecção (PEREIRINHA; FIGUEIRAS, 2016).

### 3.3 MUCOADESÃO

O termo bioadesão pode ser definido como um estado de adesão entre dois materiais, sendo um deles uma superfície biológica, podendo permanecer juntos por longos períodos. Quando essa adesão ocorre entre uma forma farmacêutica e uma membrana mucosa, ou muco, usa-se o termo mucoadesão (ANDREWS, LAVERTY, JONES, 2009; BAGAN et al., 2012; COOK, KHUTORYANAKIY, 2015; SMART, 2005).

Materiais mucoadesivos possuem alta afinidade pelas superfícies mucosas, aderindo à superfície desses tecidos. Assim, os fármacos podem ser unidos a esses mucoadesivos de forma física ou química, com o objetivo de aumentar seu tempo de residência em um local específico e determinado (AGUIAR, 2016).

A mucoadesão pode resolver muitos dos problemas relacionados com a administração de fármacos, na medida em que permite posicionar o fármaco em uma região alvo específica, e assim melhorar a sua biodisponibilidade, por meio do estabelecimento de fortes interações entre o polímero e o muco, aumentando o tempo de contato entre as duas superfícies, e inibindo a metabolização enzimática do fármaco em uma área localizada (PEREIRINHA, 2016).

Os mecanismos de mucoadesão ainda não encontram-se completamente elucidados e existem diferentes teorias sobre como isso acontece. Apesar disso, é essencial uma visão aprofundada das principais forças envolvidas. Assim, podemos distinguir três etapas fundamentais, representadas na Figura 4:

1) o estabelecimento de um contato íntimo entre o sistema mucoadesivo e a camada de muco, o que permite a mistura de ambos, conduzindo à intumescência e consequente desenrolamento das cadeias poliméricas;

2) seguidamente ocorre a interpenetração das cadeias poliméricas bioadesivas desenroladas, no interior da rede glicoproteica do muco (nessa etapa, é essencial que o polímero apresente uma boa capacidade de intumescimento);

3) por último, após o estabelecimento do contato íntimo, ocorre a formação de ligações interfaciais entre as cadeias poliméricas e a rede glicoproteica de muco (PEREIRINHA, 2016).

Figura 4- Mecanismo de mucoadesão



Fonte: PEREIRINHA, 2016.

A maneira com que esta ligação ocorre também dependerá do tipo de formulação farmacêutica e características fisiológicas onde acontecerá o processo de mucoadesão (VARUM et al., 2008).

### 3.4 FORMULAÇÕES MUCOADESIVAS ORAIS

Com o desenvolvimento de materiais adesivos mais eficientes, é possível obter sistemas com propriedades mucoadesivas mais adequadas para incorporação de vários fármacos para serem administrados por diferentes vias e mucosas. Eles podem ser destinados tanto para aderir à pele quanto às mucosas e, assim, controlar a liberação, diminuindo os efeitos sistêmicos indesejáveis ou melhorar a absorção e o transporte de fármacos pela membrana biológica. Por meio desses sistemas é possível desenvolver formulações com fármacos já existentes e produzir novos produtos com menores custos e com respostas terapêuticas mais adequadas. As estratégias utilizadas no desenvolvimento de sistemas com propriedades mucoadesivas estão relacionadas com a habilidade do polímero ou sistema ficar aderido ao muco ou à pele. Para tanto o material deve interagir com os componentes do muco ou alterar sua estrutura por estímulos fisiológicos como pH, força iônica e temperatura. Entretanto, a eficiência de um sistema com propriedades mucoadesivas não está apenas na sua capacidade de aderir à mucosa durante um tempo, mas também na capacidade de liberar o fármaco nessa mucosa (KOCKISCH; REES; YOUNG; TSIBOUKLIS; SMART, 2001).

O desenvolvimento de sistemas que prolonguem o tempo de residência no local de aplicação e ainda permitam o íntimo contato com a membrana biológica representa uma excelente estratégia para aumentar a concentração local ou a permeabilidade do fármaco pela membrana, e, conseqüentemente, melhorar sua absorção. As vantagens que sistemas de liberação mucoadesivos oferecem no direcionamento e controle da liberação de fármacos têm levado cientistas a delinear numerosos sistemas poliméricos para serem aplicados nas mais variadas superfícies mucosas do organismo, tanto para efeitos locais como sistêmicos (KREILGAARD; PEDERSEN; JAROSZEWSKI, 2000).

A eficiência de sistemas de liberação de fármacos com propriedades mucoadesivas está relacionada não só na sua capacidade de aderir ao muco durante um período, mas também pela capacidade de modificar a liberação do fármaco (ENSIGN; CONE; HANES, 2012). É possível delinear sistemas bioadesivos nas mais variadas formas farmacêuticas, uma vez que a propriedade da adesão depende das características do material utilizado na sua preparação e do muco (EVANGELISTA, 2006).

As características do polímero mucoadesivo empregado (peso molecular, concentração, flexibilidade das cadeias poliméricas, conformação espacial e grau de intumescimento e reticulação) estão intimamente relacionadas com seu desempenho, o qual também dependerá do ambiente biológico (pH, força aplicada e temperatura), tempo de turnover de mucina, espessura da camada de muco, condições da mucosa e do muco (BRUSCHI, 2006). A estrutura química do polímero determina algumas propriedades importantes na mucoadesão. A presença de grupos hidroxila, carboxila ou amina podem contribuir para o estabelecimento de ligações de hidrogênio ou pontes dissulfeto no caso de presença de grupos sulfidrilo. Polímeros com grupos ionizáveis podem atuar por interação eletrostática com o muco carregado negativamente, que é dependente do pH do meio (TOBYN; JOHNSON; DETTMAR, 1996). Há polímeros que intumescem ou aumentam a viscosidade quando entram em contato com algum estímulo fisiológico, sendo sua mucoadesão resultado da formação de uma matriz mais reticulada. Esses polímeros podem ser empregados no desenvolvimento dos mais diferentes tipos de sistemas de liberação, como sistemas sólidos multiparticulado, sistemas líquidos, como microemulsões, dispersões coloidais de polímeros bioadesivo, sistemas semissólidos e hidrogéis (CARVALHO; CALIXTO; HATAKEYAMA; LUZ; GREMIÃO; CHORILLI, 2013).

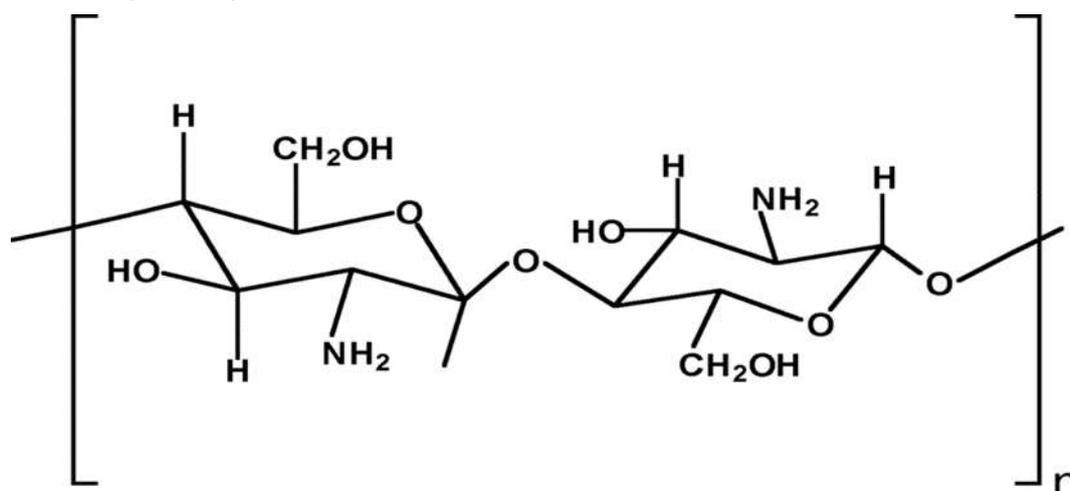
### 3.5 POLÍMEROS MUCOADESIVOS

#### 3.5.1 *Quitosana*

A quitosana é um copolímero biodegradável, biocompatível, catiônico e hidrofílico obtido por desacetilação parcial da quitina (Figura 5). Esse polissacarídeo é abundante no exoesqueleto de crustáceos, insetos e em fungos (SANTOS; MOURA; NERVO, 2016).

A quitosana é um polímero mucoadesivo e essa propriedade está relacionada com a interação eletrostática do polímero com os grupos siálicos da mucina (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). Sua estrutura pode ser observada na Figura 5.

Figura 5- Estrutura química quitosana



Fonte: (SANTOS; MOURA; NERVO, 2016).

Devido à natureza catiônica, esse polímero apresenta interação com biomoléculas carregadas negativamente, como proteínas, polissacarídeos aniônicos e ácidos nucleicos, promovendo maior bioadesão (SHAMLOO et al., 2020; TAHERI et al., 2020). A quitosana é solúvel em soluções diluídas de ácidos orgânicos, devido à presença de pares de elétrons livres nos grupos amino, que são protonados em meios ácidos. Além disso, devido ao comportamento nucleofílico desses elétrons, a quitosana reage com grupos ativos como o aldeído e a cetona (FALAMARZPOUR; BEHZAD; ZAMANI, 2017; KARKI et al., 2016; TAHERI et al., 2020).

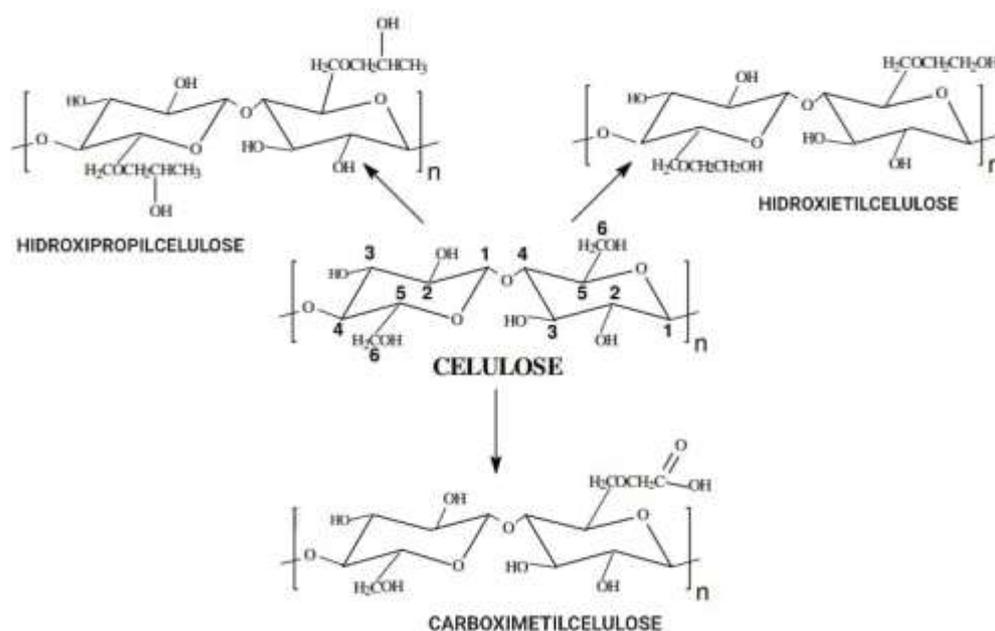
### 3.5.2 Hidroxietilcelulose

A estrutura rígida da celulose pode ser modificada a partir de reações de derivatização, que consistem na introdução de diversos grupos funcionais em sua cadeia tais como éteres e ésteres. Esse processo pode desarranjar as regiões cristalinas dessa molécula e promover a formação de produtos predominantemente amorfos. Alguns exemplos de derivados de celulose são a carboximetilcelulose (CMC), hidroxietilcelulose (HEC) e hidroxipropilcelulose (HPC), (Figura 6). A HEC é um polímero não iônico, solúvel em água, que apresenta a capacidade de espessar, suspender, aglutinar, emulsificar, formar películas, estabilizar, dispersar e reter água. Na síntese deste polissacarídeo, a celulose é intumescida com hidróxido de sódio para obtenção da álcali celulose que reage com óxido de etileno (CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>) na produção do éter. Nessa reação, os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxilas da celulose são

substituídos por grupos hidroxietil, os quais conferem, a esta macromolécula, solubilidade em água (MACHADO et al., 2009).

Os derivados da celulose apresentam boa performance mucoadesiva, e pertencem à classe dos polímeros aniônicos, estabelecendo uma ligação forte devido à formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carboxila não ionizados com a mucina (PEREIRINHA, 2016).

Figura 6- Derivados de celulose



Fonte: (MACHADO et al., 2009)

### 3.6 FÁRMACOS DE ESCOLHA E COMPLEXOS DE INCLUSÃO

#### 3.6.1 *Nistatina (Nis)*

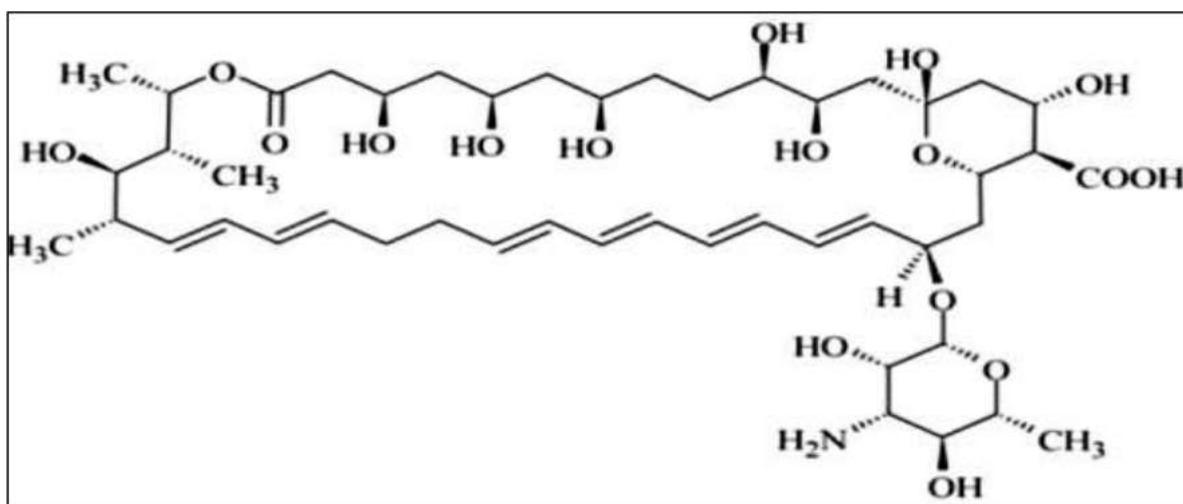
Do ponto de vista químico, a Nis é considerada um tetraeno, que são substâncias formadas por átomos de carbono, os quais apresentam quatro duplas ligações não-saturadas em sequência. Apresenta uma cadeia cíclica grande, sendo chamada assim de macrolídeo (Figura 7). Por fim, essa molécula possui grupamentos carboxílicos e aminos, o que a leva a possuir dois pKa: 3,62 (de caráter ácido) e 9,11 (de caráter básico). A Nis é considerada praticamente insolúvel em água, clorofórmio, éter etílico e etanol e saliva, pouco solúvel em metanol, e facilmente solúvel em dimetilformamida e dimetilsufóxido (AGUIAR, 2016; F. Bras., 2010; TALLURY et al., 2007). Esse fármaco apresenta-se como um pó higroscópico, amarelo, fino e deve possuir potência mínima de 4.400 UI/mg (F. Bras., 2010), e tem um odor característico,

muitas vezes relatado como semelhante a cereais e com sabor extremamente desagradável (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003). Além disso, a Nis apresenta sensibilidade ao calor, luz e presença de oxigênio (STEFANOVIC et al., 2012).

A Nis é classificada como Classe IV, do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Devido à sua baixa permeabilidade é fracamente absorvida pela pele, mucosas ou trato gastrointestinal, sendo seu uso terapêutico restrito ao tratamento de infecções fúngicas de modo tópico (AGUIAR, 2016). Em função de sua baixa solubilidade aquosa, oferece dificuldades no preparo de medicamentos, além de estar menos disponível para exercer sua ação topicamente, sobretudo no tratamento da candidose oral, já que a mucosa oral é banhada por saliva (SAKEER et al., 2010; SPULBER, et al., 2011).

O mecanismo de ação antifúngica da nistatina ocorre por meio de sua interação com ergosterol, esteroide presente na membrana plasmática das células fúngicas, ocasionando uma desorganização na membrana plástica do fungo, já que canais são formados, o que leva à perda da permeabilidade seletiva (HAC-WYDRO; DYNAROWICZ-LATKA, 2006; SILVA *et al.*, 2006). Por esses canais ocorre a saída de água e íons essenciais para a sobrevivência celular, o que culmina em danos celulares e em seguida, na morte celular (DOROCCA-BOBKOWSKA et al., 2003; CROY; KNOW, 2004; GROESCHKE et al., 2006; SILVA et al., 2006; STEFANOVIC et al., 2012).

Figura 7: Estrutura química nistatina

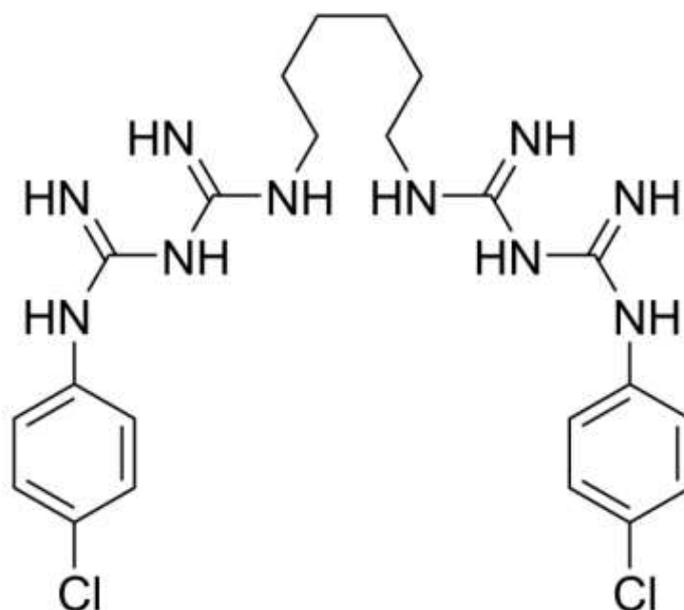


Fonte: F. Bras. (2010)

### 3.6.2 Clorexidina (Clx)

A Clx é um potente antimicrobiano de amplo espectro empregado como princípio ativo em diversos antissépticos e desinfetantes, em diferentes concentrações. Atua, ligando-se a parede celular bacteriana, permitindo que as moléculas de clorexidina adentrem ao citoplasma, rompam a membrana celular e promovam extravasamento de suas estruturas (ZANATTA; ANTONIAZZI; RÖSING, 2007; ARAÚJO, et al., 2015). Esse fármaco tem ação nas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e em fungos filamentosos e leveduras, podendo permanecer quimicamente ativo nos tecidos por até 6 horas (VILELA et al., 2015). A clorexidina base (CLX) é representada pela fórmula molecular de  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ , com massa molar de  $505,447 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . É composta estruturalmente por dois anéis clorofenólicos nas extremidades, ligados a um grupamento biguanida de cada lado, conectados por uma cadeia central de hexametileno (Figura 8) (ZANATTA; ANTONIAZZI; RÖSING, 2007).

Figura 8- Estrutura química da clorexidina base



Fonte: GASPAR (2020)

Essa biguanida catiônica é uma base, mais estável na forma de sal, sendo praticamente insolúvel em água. Os sais originalmente produzidos foram o acetato de clorexidina e o cloridrato de clorexidina, mas devido à baixa solubilidade em água, de  $26,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , foram substituídos, com o passar do tempo, pelo sal atualmente usado, o digluconato de clorexidina que apresenta maior solubilidade em água e em

pH fisiológico, dissociando-se e liberando o fármaco ativo (ZANATTA; ANTONIAZZI; RÖSING, 2007; HUMAN METABOLOME DATABASE, 2017).

### 3.6.3 $\beta$ -ciclodextrinas

As ciclodextrinas são compostas por oligossacarídeos cíclicos com características hidrofílicas em seu exterior e hidrofóbicas em seu interior, sendo úteis como potencializadores da solubilidade de fármacos lipofílicos, aumentando assim a biodisponibilidade dos fármacos (DE OLIVEIRA, et al., 2015). Podem aumentar a estabilidade de medicamentos destinados a diversas vias de administração não invasivas, incluindo cutânea, nasal, oftálmica, bucal tópica, vaginal e retal.

São compostos em forma de anel ou tronco de cone biossintetizados pela bactéria *Bacillus macerans* (LEEMHUIS, 2010).

Essas ciclodextrinas têm propriedades importantes, como a capacidade de formar complexo com o fármaco, resultando na proteção do fármaco contra a luz e degradações oxidativas e também de sustentar uma liberação controlada (HADARUGA, 2019).

Outras vantagens incluem a estabilidade e aumento da taxa de dissolução, redução da toxicidade e ulceração de alguns fármacos, mascaramento do sabor e odor, redução da volatilização de óleos essenciais, fácil manuseio e baixo custo (AGRAWAL, 2012).

A inclusão do fármaco nas cavidades internas das ciclodextrinas ocorre por interações supramoleculares, incluindo interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações  $\pi$ , interações de van der Waals, dipolo-dipolo e efeito hidrofóbico. Devido a essas interações, uma estrutura única é formada onde o hospedeiro (ciclodextrina) se liga ao hóspede (fármaco) (ZHOU, 2010).

Após a dissolução em meio aquoso ou a administração desses complexos, eles tendem a entrar em equilíbrio entre os complexos formados e o fármaco dissociado da ciclodextrina. As moléculas continuam a desmontar e remontar e, à medida que o fármaco é liberado e transportado para os tecidos, a quantidade de ciclodextrinas dissociadas aumenta (JANSOOK, 2018).

A caracterização físico-química é utilizada para analisar se e como o fármaco está encapsulado e a integridade do complexo. Exemplos são a espectrofotometria UV/Vis (para quantificação), difratometria de raios X, espalhamento dinâmico de luz, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, microscopia eletrônica

de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, calorimetria exploratória diferencial e ressonância magnética nuclear (MURA, 2015; SWAMINATHAN, 2010).

Em geral, em soluções aquosas, as ciclodextrinas são capazes de solubilizar fármacos hidrofóbicos por meio da formação de complexos de inclusão solúveis em água. Nenhuma ligação covalente é formada ou quebrada durante a formação do complexo e as moléculas no complexo estão em equilíbrio rápido com moléculas na solução. As moléculas hidrofóbicas ou algumas porções lipofílicas de moléculas maiores têm maior afinidade para a cavidade hidrofóbica do que as hidrofílicas (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

- Agitador magnético com aquecimento (WARMNEST, modelo HJ-3, São Paulo, Brasil);
- Agitador magnético com aquecimento (SPLABOR, modelo SP-162-, Presidente Prudente, Brasil);
- Agitador magnético com aquecimento (BIOMIXER, modelo 78 HW-1, Curitiba, Brasil)
- Agitador mecânico (QUIMIS, modelo Q235, Diadema, Brasil);
- Analisador de textura (Texturômetro TA-XT Plus, Itatiba, SP, Brasil);
- Balança analítica (SHIMADZU, modelo ATX224, Quioto, Japão);
- Balança semi-analítica (MARTE CIENTÍFICA, modelo 029/A, São Paulo, Brasil);
- Banho-maria (BIOMATIC, modelo 1052, Porto Alegre, Brasil);
- Banho de ultrassom (ULTRASONIC CLEANER, modelo 1440D);
- BOD;
- Capela de segurança biológica classe II (VECO, Campinas, Brasil);
- Célula de difusão vertical do tipo Franz (UNIVIDROS, Ribeirão Preto, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a detector de fotodiodos (SHIMADZU, modelo Nexera X2 System®, Quioto, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Equipamento DSC/TG (STA 6000, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos);
- Estufa de secagem (BIOMATIC, modelo 1306, Porto Alegre, Brasil);
- Geladeira;
- Máquina de comprimir;
- pHmetro digital (HANNA, HI 2221, São Paulo, Brasil);
- Reômetro de placas paralelas (DHR-2/ TA Instruments);
- Ultrapurificador de água Mili-Q® (MERCK, Integral 5, Darmstadt, Alemanha);
- Ultraturrax (IKA, modelo T18 basic, Deutschland, Alemanha).

### 4.1 REAGENTES E SOLVENTES

#### 4.1.1 Fármacos

- Nistatina (Farmácia Amanda);
- Clorexidina ( $\geq 99.5\%$ , Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil).

#### 4.1.2 Polímeros

- Hidroxietilcelulose (HEC);
- Quitosana de baixo peso molecular – QS (75-85% desacetilada, 20-300 cP, 50000-190000 Dalton, Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil).

#### 4.1.3 Água purificada

- Água purificada pelo processo de destilação em equipamento tipo Pilsen (Fanem LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Água ultrapurificada em equipamento Milli-Q (Merck, Integral 5, Darmstadt, Alemanha).

#### 4.1.4 Solventes e demais reagentes

- Acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) grau HPLC (Neon Comercial Ltda, Suzano, Brasil);
- Ácido acético glacial (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) P.A. (Anidrol Produtos para Laboratórios, Diadema, Brasil);
- Albumina bovina 40 µg/mL (Sigma-Aldrich);
- Álcool etílico 99,5% P.A. (Biotec®);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (LabMaster Ltda, Pinhais, Brasil);
- EDTA;
- Dimetilformamida;
- Fosfato de potássio anidro monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) P.A. (Synth, Diadema, Brasil);
- Gel de petrolato (Chemygel®);
- Hidróxido de sódio (NaOH) P.A. (LabMaster Ltda, Pinhais, Brasil);
- Lisozima de ovo de galinha 10 µg/mL (Fluka Bio-chemika);
- Metabissulfito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) P.A. (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil);
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH) grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Metilparabeno;
- Mucina tipo III, de estômago de porco 850 mg/L (Sigma-Aldrich®);
- Mucosa suína;
- Saliva artificial;
- Trietilamina;
- α-amilase de pâncreas de porco 1 mg/mL (Fluka Bio-chemika).

#### 4.1.5 Materiais

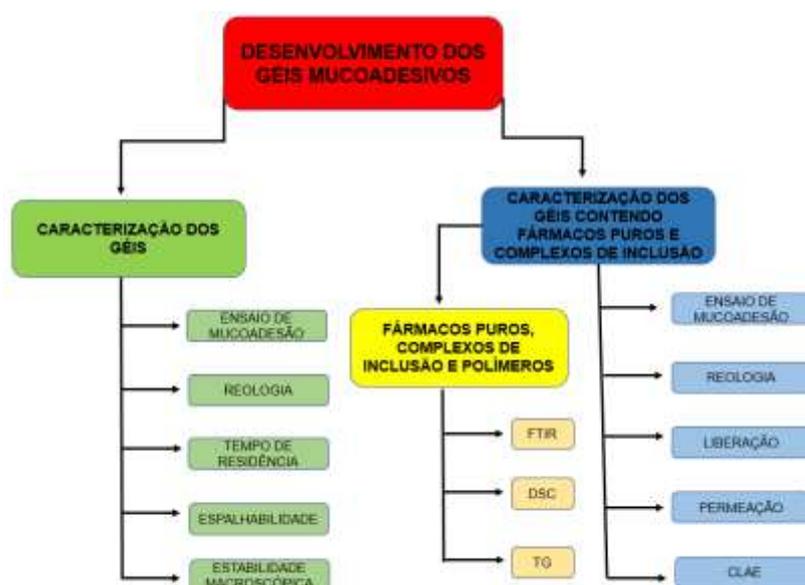
- Cola cianocrilato (SuperBonder®, Loctite, São Paulo, SP, Brasil);
- Coluna analítica de fase reversa C8 XBridge™ (Waters, 75 mm x 4.6 mm, 2.5 µm);
- Coluna analítica de fase reversa Shimadzu Shim-pack XR-ODS III C18 (2,0 mm x 200 mm x 2,2 µm);
- Eppendorf de 2 mL;
- Filme plástico Parafilm®M 10,16 cm x 38,10 m (American, modelo PM996)
- Filtros para seringa GV Millex em polietileno com membrana Durapore® (PVDF), filtros hidrofílicos, com tamanhos de poros de 0,22 µm e diâmetro de 13 mm (MilliUni, Campinas, Brasil);
- Lâminas de vidro;
- Micropipetas de 25, 100 e 1000 µL (Eppendorf®);
- Placas de Petri de plástico (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil);
- Ponteiros para micropipetas;
- Seringas de 3 mL, 5 mL e 10 mL;
- Vials de vidro de 2 mL, específicos para HPLC.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Desenho experimental

As etapas realizadas na parte experimental estão representadas na Figura 9.

Figura 9- Fluxogramas ilustrativo das etapas desenvolvidas nesta pesquisa.



Fonte: A autora.

#### 4.2.2 Desenvolvimento dos géis mucoadesivos

Inicialmente, foram preparadas as dispersões individuais dos polímeros quitosana e HEC, com os quais foram feitas combinações, resultando em diferentes géis, que foram testados para a escolha do gel mucoadesivo com as características mais adequadas para a finalidade desejada.

A dispersão de quitosana (QS) foi preparada a 2 % (m/v) em solução de ácido acético glacial 1 % (v/v). Em seguida, em balão volumétrico, completou-se o volume para 100 mL com água destilada. O conteúdo foi transferido para um béquer, e homogeneizado em agitador mecânico.

A dispersão aquosa de HEC (Natrosol®) foi preparada a 6 % (p/v). Nessa dispersão foram adicionados os seguintes conservantes: metilparabeno 0,15 % (p/p), metabissulfito de sódio 0,1 % (p/p) e EDTA 0,1 % (p/p). Os pós foram diluídos em água destilada, qsp para 100 mL, aquecidos em banho maria, à temperatura de 80°C e agitados em agitador mecânico simultaneamente, para completa dissolução.

Para o preparo dos géis mucoadesivos as dispersões de QS e de HEC foram misturadas em três diferentes proporções em relação a massa dos polímeros em 1:1; 3:1; 1:3 (p/p), obtendo-se, assim três formulações nomeadas por QS1:HEC1, QS3:HEC1 e QS1:HEC3 respectivamente. Além disso, foram preparadas mais três formulações, adicionando 10% de petrolato-polietileno (Chemigel®) em cada uma delas, totalizando seis formulações. A composição dos seis géis mucoadesivos pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2– Composição das formulações

<b>Formulação</b>	<b>QS:HEC</b>	<b>Chemigel (%)</b>
QS1:HEC1	1:1	-
QS3:HEC1	3:1	-
QS1:HEC3	1:3	-
QS1:HEC1+CHEM	1:1	10
QS3:HEC1+CHEM	3:1	10
QS1:HEC3+CHEM	1:3	10

QS: dispersão de quitosana; HEC: dispersão aquosa de hidroxietilcelulose (natrosol); CHEM: Chemigel®.

### 4.2.3 Caracterização dos géis mucoadesivos

#### 4.2.3.1 Preparação do tecido

A caracterização dos géis foi realizada utilizando discos de mucina ou mucosa bucal suína (Langoth, Kalbe e Bernkop-Schnürch, 2005). Os discos de mucina medindo 13 mm cada, foram preparados por compactação de 100 mg de mucina (Mucina tipo III, Sigma-Aldrich) em máquina de comprimir, usando uma força de compactação de 24 N.

As amostras da mucosa de suínos foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Leandro Cavalcanti Lipinski (CEUA: 0193028; Protocolo UEPG: 20.000011339-8; ANEXO 1). A maior parte do tecido subjacente foi removido da mucosa com uma tesoura cirúrgica. O epitélio foi separado do tecido conjuntivo com um eletrodermatoma (Aesculap® Accu Dermatome, Alemanha). Com dimensões aproximadas de 1,5 x 0,6 cm, os tecidos foram cuidadosamente limpos, lavados com solução de cloreto de sódio 0,9% e mantidos congelados. Previamente a sua utilização, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente em solução salina (KOFFI et al., 2006).

#### 4.2.3.2 Preparação da saliva artificial

Saliva artificial foi preparada como meio para realização dos ensaios de caracterização. Ela foi composta por albumina bovina 40 µg/mL (Sigma-Aldrich), α-amilase de pâncreas de porco 1 mg/mL (Fluka Bio-chemika), lisozima de ovo de galinha 10 µg/mL (Fluka Bio-chemika) e mucina de estômago de porco 850 mg/L (tipo III, Sigma-Aldrich). Todos os componentes da saliva artificial foram dissolvidos em solução tampão fosfato salino utilizando agitador magnético (MORIKAVA, 2020).

#### 4.2.3.3 Ensaio de mucoadesão

As propriedades bioadesivas ou mucoadesivas das formulações (n=3), foram avaliadas em analisador de textura (Figura 10, Texturômetro TA-XT Plus, Itatiba, SP, Brasil) em módulo de tensão. A análise foi realizada usando discos de mucina.

O texturômetro foi programado com uma probe cilíndrica de alumínio de 36 mm. As formulações do gel mucoadesivo (2g) foram colocadas, individualmente, em uma placa de Petri, aquecidas em banho-maria a 37°C e fixada na base do equipamento. (ALVES, 2018). A amostra do disco de mucina foi aderida na probe com cola cianocrilato (SuperBonder®, Loctite, São Paulo, SP, Brasil) e umedecida com 0,1 mL

de saliva artificial (EOUANI et al., 2001; ALVES, 2018). Então, a probe foi movimentada em direção à base até tocar a superfície do gel, mantendo contato com força de compressão de 0,5 N, por 120 s. Terminada a avaliação, a probe foi deslocada para cima, em módulo de tensão, à velocidade constante de 1 mm/s até que a formulação se destacasse do disco de mucina.

O teste gerou gráficos de força-distância e força máxima de separação, determinando a adesividade, correspondente ao pico gerado no gráfico, que foi expressa em Newton (N). Ainda foi obtido o trabalho de adesão ou força para descolamento, determinado pela área sob a curva dos gráficos (N.s), que corresponde à energia necessária para o desprendimento dos sistemas (EOUANI et al., 2001; KOFFI et al., 2006; BALOGLU et al., 2011).

Figura 10 - Texturômetro



Fonte: A autora.

#### 4.2.3.4 Reologia

As medidas reológicas foram realizadas em reômetro modo oscilatório ( $n=3$ ) (Figura 11). A análise oscilatória dos géis foi realizada a 25°C, com geometria cone-placa paralelas de 40 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,057 mm. As amostras (2g) foram cuidadosamente aplicadas na placa inferior do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 1 minuto antes de cada determinação. A amplitude utilizada foi de 1% e um intervalo de frequência de 0,01 a 100 Hz, foi analisado para cada amostra. O módulo elástico ( $G'$ ), o módulo

viscoso ( $G''$ ) e a viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) foram determinados. Apenas os géis QS1:HEC1, QS3:HEC1 e QS1:HEC3 foram testados, pois os géis contendo 10% de petrolato-polietileno não ficaram estáveis, apresentando separação de fases e foram excluídos do estudo.

Figura 11 - Reômetro

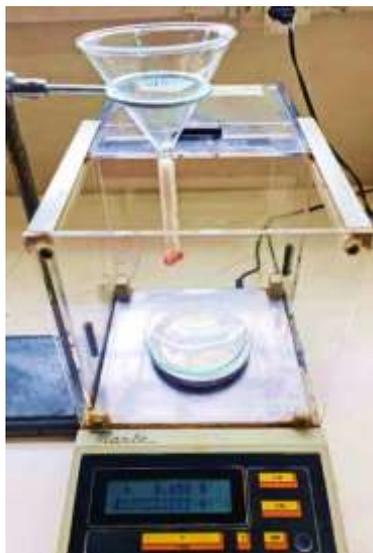


Fonte: A autora.

#### 4.2.3.5 Tempo de residência

O tempo de retenção da formulação foi estudado adaptando o método relatado por Vermani et al. (2002) e Sanz et al. (2018). A mucosa bucal suína foi colada na extremidade de um funil (Figura 12). Uma gaze embebida em saliva artificial foi colocada no interior do funil para manter a mucosa úmida. Uma balança analítica foi colocada abaixo do suporte contendo o tecido suspenso para pesar o gel mucoadesivo que se desprendia da mucosa. As amostras do gel mucoadesivo foram aplicadas na mucosa e a quantidade de gel que caiu sobre um vidro de relógio que estava na balança foi registrada durante 2 h. O ensaio foi realizado em triplicata.

Figura 12 – Teste tempo de residência



Fonte: A autora.

#### 4.2.3.6 Espalhabilidade

A espalhabilidade das formulações de gel foi determinada pressionando 0,3 g de cada formulação de gel (a temperatura ambiente) entre duas lâminas de vidro, pela aplicação de um peso de 185 g no centro da lâmina durante cerca de 3 min. O diâmetro do círculo formado foi mensurado, sendo o ensaio realizado em triplicata (DJEKIC et al., 2016).

#### 4.2.3.7 Estabilidade macroscópica

Inicialmente foram testadas as 6 amostras, em placa de Petri, e deixadas em incubadora BOD por 60 dias. Após este teste inicial, a estabilidade dos géis mucoadesivos QS1:HEC1, QS3:HEC1 e QS1:HEC3, foi realizada mantendo 10 g de cada gel, em béquer fechado com plástico filme, no interior de incubadora BOD, por 30 dias. Após esse período, os géis foram analisados visualmente para observação de possíveis alterações, como crescimento de microrganismos, mudança de coloração, separação de fases e ressecamento das amostras.

#### 4.2.4 *Preparação dos complexos de inclusão*

Foram preparados complexos de inclusão nistatina: $\beta$ -ciclodextrina na proporção molar de 1:1 e de clorexidina: $\beta$ -ciclodextrina na proporção molar de 1:2. Para o preparo de cada complexo, o fármaco foi disperso em etanol absoluto e a  $\beta$ -

ciclodextrina foi dissolvida em água destilada, ambos mantidos em agitação magnética. As duas soluções foram misturadas formando suspensões a 50:50 (v/v) e agitadas à 25 °C por 24 h em agitador magnético. As suspensões obtidas foram congeladas em ultra freezer a -80 °C e liofilizadas (mod. LD1500A; Terroni, São Carlos, SP, Brasil) por 72 h.

#### 4.2.5 Incorporação dos fármacos e complexos de inclusão no gel mucoadesivo

Os fármacos puros e os complexos de inclusão foram incorporados ao gel mucoadesivo QS3:HEC1 em diferentes concentrações pelo método de espatulação. As amostras foram nomeadas conforme apresentado na Tabela 2. As formulações foram mantidas em frascos de vidro âmbar, protegidos de luz e em geladeira até o momento das análises.

Tabela 2. Composição dos géis mucoadesivos com os fármacos.

Gel mucoadesivo	Nistatina (mg/g)	complexo de nistatina:β-ciclodextrina (mg/g)	Clorexidina (mg/g)	complexo clorexidina: β-ciclodextrina (mg/g)
QS3:HEC1-Nis	17,5	-	-	-
QS3:HEC1-Nis:βCD	-	36,0	-	-
QS3:HEC1-Clx	-	-	64,0	-
QS3:HEC1-Clx:βCD	-	-	-	26,0

A concentração dos fármacos está expressa em mg por g de gel.

#### 4.2.6 Caracterização físico-química dos fármacos e complexos de inclusão

##### 4.2.6.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quito, Japão), na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com parâmetro de 32  $\text{scan}\cdot\text{min}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras analisadas foram os fármacos puros, os complexos de inclusão e a mistura física dos complexos de inclusão com QS e com HEC.

#### 4.2.6.2 Análise térmica

Para realizar as análises térmicas as foram acondicionadas em células calorimétricas de alumina e realizadas simultaneamente. O instrumento STA 600 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado previamente usando índio (In; P.F.= 156,6 °C;  $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$ ) como padrão. Os termogramas foram obtidos sob fluxo de nitrogênio ( $50 \text{ mL.min}^{-1}$ ), a uma taxa de aquecimento constante de  $10 \text{ °C.min}^{-1}$  e a faixa de temperatura utilizada foi de 20 °C a 400 °C. As amostras analisadas foram os fármacos puros, os complexos de inclusão e a mistura física dos complexos de inclusão com QS e com HEC.

#### 4.2.7 Caracterização dos géis contendo os complexos de inclusão

Após a incorporação dos complexos de inclusão na formulação selecionada do gel mucoadesivo, os ensaios de mucoadesão e reologia foram realizados novamente, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Além destes, foram realizados os ensaios de liberação e permeação *in vitro*. A quantificação dos fármacos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

##### 4.2.7.1 Análise da mucoadesão

As propriedades bioadesivas ou mucoadesivas das formulações (n=3), foram avaliadas em analisador de textura (Texturômetro TA-XT Plus, Itatiba, SP, Brasil) em módulo de tensão. A análise foi realizada seguindo os mesmos parâmetros usados nos géis sem fármacos, descritos anteriormente neste trabalho.

O teste gerou gráficos de força-distância e força máxima de separação, determinando a adesividade que foi expressa em Newton (N). Ainda foi obtido o trabalho de adesão ou força para descolamento, determinado pela área sob a curva dos gráficos (N.s), que corresponde à energia necessária para o desprendimento dos sistemas (EOUANI et al., 2001; KOFFI et al., 2006; BALOGLU et al., 2011).

##### 4.2.7.2 Análise da reologia

As medidas reológicas foram realizadas em reômetro modo oscilatório, seguindo os mesmos parâmetros descritos na reologia dos géis sem fármacos, descritos anteriormente. As amostras (1g) foram cuidadosamente aplicadas na placa inferior do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 1

minuto antes de cada determinação. A amplitude utilizada foi de 1% e um intervalo de frequência de 0,01 a 100 Hz, foi analisado para cada amostra. O módulo elástico ( $G'$ ), o módulo viscoso ( $G''$ ) e a viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) foram determinados.

#### 4.2.7.3 Ensaio de liberação in vitro

O ensaio de liberação in vitro foi realizado utilizando membranas sintéticas (acetato de celulose, 14,000 Da Sigma-Aldrich, USA), cortadas nas dimensões de 2,5 cm x 2,5 cm e colocadas entre os compartimentos doador e receptor de células de difusão vertical do tipo Franz, estando o diâmetro da membrana correspondente a 1,5 cm com uma face em contato com o meio de dissolução e a outra face em contato com a formulação do gel mucoadesivo. Sobre a membrana foram adicionados 200 mg de cada gel mucoadesivo.

O meio de dissolução utilizado no ensaio com os géis de clorexidina foi tampão fosfato, pH = 7,2, enquanto para os géis de nistatina, o meio de dissolução utilizado foi uma solução hidroalcoólica a 10% de etanol absoluto em água destilada (v/v). Os experimentos foram realizados a temperatura de aproximadamente 37°C e a solução receptora foi mantida sob agitação constante. A capacidade do compartimento receptor presente na célula é de 10 mL, sendo esse volume máximo de meio preenchido para manutenção das condições. As coletas do meio foram realizadas nos tempos de 30 min, 60 min, 120 min, 180 min e 240 min. O volume de meio coletado, para a quantificação do fármaco liberado da amostra, e repostado na célula foi de 1,5ml. O teste foi realizado em triplicata para cada uma das amostras e os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A quantificação do fármaco liberado dos géis foi realizada por CLAE.

#### 4.2.7.4 Ensaio de permeação in vitro

O ensaio de permeação in vitro dos fármacos pela mucosa foi realizado em células de difusão vertical tipo Franz, utilizando-se os mesmos parâmetros descritos no ensaio de liberação in vitro, substituindo a membrana sintética por mucosa bucal suína (CID et al., 2012).

#### 4.2.8 Método analítico por CLAE para quantificação de clorexidina

Foi utilizada a metodologia descrita por Gaspar (2020) com algumas adaptações. As análises foram realizadas em cromatógrafo SHIMADZU (Nexera X2),

equipado com detector de arranjo de fotodiodos-DAD (SPD-M20A), bomba quaternária LC-30AD, degaseificador (DGU-20A5RA), forno (CTO-20A) e injetor/amostrador automático (SIL-30AC, volume de injeção: 5  $\mu$ L), comunicador (CBM-20A), controlado por software Labsolutions versão 5.73. Foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa C8 XBridge™ (Waters, 75 mm x 4.6 mm, 2.5  $\mu$ m), mantidas à temperatura de 40°C. A eluição foi realizada de modo isocrático, fase móvel constituída de acetonitrila: água acidificada com ácido acético até pH 3,5 mais 1,5% de trietilamina (34:66 v/v), volume de injeção 5  $\mu$ L, na temperatura de 40 °C e vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de análise foi de 2 minutos e a detecção ocorreu em 258 nm.

Para a quantificação do fármaco, uma solução padrão (n=3) foi previamente preparada com a transferência de 50 mg de clorexidina para balão volumétrico de 50 mL, e este volume foi completado com a fase móvel. A concentração final de clorexidina obtida foi de 1 mg/mL. A partir da solução padrão, foram preparadas soluções nas concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 e 40,0  $\mu$ g/mL em fase móvel em eppendorf de 2 mL. As diluições preparadas foram filtradas, por meio de filtro hidrofílico, com tamanho de poros de 0,22  $\mu$ m, em vials de 2 mL para análise no equipamento. A curva analítica foi preparada pela área do pico versus concentração de clorexidina a equação da reta foi obtida para a quantificação do fármaco. A especificidade do método foi analisada através do preparo de uma solução de gel mucoadesivo incorporado com clorexidina em fase móvel (30  $\mu$ g/mL).

Para a quantificação do fármaco no teste de liberação e permeação as amostras do meio receptor coletadas foram diluídas em fase móvel na proporção de 1:10 para o gel QS3:HEC1-Clx e 1:1 para o gel QS3:HEC1-Clx: $\beta$ CD.

#### 4.2.9 Método analítico por CLAE para quantificação de nistatina

Foi utilizada a metodologia descrita por Llabot et al. (2007) com algumas adaptações. As análises por cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) foram realizadas em cromatógrafo SHIMADZU (Nexera X2), equipado com detector de arranjo de fotodiodos-DAD (SPD-M20A), bomba quaternária LC-30AD, degaseificador (DGU-20A5RA), forno (CTO-20A) e injetor/amostrador automático (SIL-30AC, volume de injeção: 5  $\mu$ L), comunicador (CBM-20A), controlado por software Labsolutions versão 5.73. Foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa Shimadzu Shim-pack XR-ODS III C18 (2,0 mm x 200 mm x 2,2  $\mu$ m) mantida à

temperatura de 30°C. A eluição foi realizada de modo isocrático, fase móvel constituída de metanol: dimetilformamida: água ultrapura (92:2:6 v/v/v), volume de injeção 5 µL, na temperatura de 30°C e vazão de 0,35 mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de análise foi de 6 minutos e a detecção ocorreu em 305 nm.

Uma solução padrão foi previamente preparada com a transferência de 5 mg de nistatina para balão volumétrico de 10,0 mL, em seguida, foi adicionado 2 mL de dimetilformamida, e colocado em banho de ultrassom por 3 minutos, para completa dissolução do fármaco. Após isto, o balão volumétrico foi completado com metanol até o menisco. A concentração final de nistatina obtida foi de 500 µg/mL.

A partir da solução padrão foram preparadas diluições em fase móvel nas concentrações 5; 10; 20; 30; 40; 45 e 50 µg/mL em eppendorf de 2 mL. As diluições preparadas foram filtradas, por meio de filtro hidrofílico, com tamanho de poros de 0,22 µm, em vials de 2 mL para análise no equipamento. A curva analítica foi preparada pela área do pico *versus* concentração de nistatina a equação da reta foi obtida para a quantificação do fármaco. A especificidade do método foi analisada através do preparo de uma solução de gel mucoadesivo incorporado com nistatina em fase móvel (30 µg/mL).

Para a quantificação do fármaco no teste de liberação e permeação as amostras do meio receptor coletadas foram diluídas em fase móvel na proporção de 1:1.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DOS GÉIS MUCOADESIVOS E ANÁLISES MACROSCÓPICAS

As formulações dos géis mucoadesivos QS1:HEC1, QS3:HEC1 e QS1:HEC3 foram preparadas a partir de dispersões de quitosana e de hidroxietilcelulose nas proporções 1:1, 3:1 e 1:3 respectivamente. As dispersões poliméricas apresentam diferentes características físicas o que impacta nas características dos géis quando se varia a proporção entre elas. Conforme mostra a Figura 13, a dispersão de quitosana a 2% apresentou-se fluida e com coloração amarelada. Já a dispersão de hidroxietilcelulose (HEC) a 6% mostrou maior viscosidade e ausência de coloração, sendo transparente.

Figura 13- Dispersões de hidroxietilcelulose (incolor) e de quitosana (amarelo).



Fonte: A autora.

O gel de petrolato-polietileno (Chemygel®), marca comercial, apresenta coloração esbranquiçada e textura oleosa, com viscosidade intermediária. Esse gel foi adicionado aos géis mucoadesivos, obtendo formulações nomeadas por QS1:HEC1+CHEM, QS3:HEC1+CHEM e QS1:HEC3+CHEM. Tal material é comercialmente utilizado em formulações magistrais de orabase e em medicamentos industrializados como por exemplo o OMCILON®-A Orabase. A adição desse adjuvante nos géis mucoadesivos objetivou avaliar a sua influência na propriedade mucoadesiva das amostras. Contudo, inicialmente foi possível observar separação de fases logo após o preparo.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS MUCOADESIVOS PARA A SELEÇÃO DA FORMULAÇÃO

### 5.2.1 Ensaio de mucoadesão

A Tabela 3 expressa as médias dos resultados das replicatas para os parâmetros descritos, analisados em texturômetro.

Tabela 3. Resultados do ensaio de mucoadesão dos géis sem fármaco.

<b>Amostra</b>	<b>Adesividade (N)</b>	<b>Força para descolar (N.seg)</b>	<b>Distância de descolamento (mm)</b>
QS1:HEC1	7,20±0,55 <sup>a</sup>	4,52±0,18 <sup>a</sup>	12,09±3,17 <sup>a</sup>
QS3:HEC1	7,14±0,46 <sup>af</sup>	5,91±0,68 <sup>be</sup>	11,83±0,88 <sup>ac</sup>
QS1:HEC3	4,41±0,33 <sup>bgk</sup>	6,39±0,97 <sup>ceh</sup>	8,74±0,36 <sup>adg</sup>
QS1:HEC1+CHEM	6,26±0,50 <sup>chln</sup>	2,87±0,27 <sup>deij</sup>	8,45±0,66 <sup>aegi</sup>
QS3:HEC1+CHEM	4,22±1,06 <sup>diknp</sup>	4,88±0,35 <sup>afhjk</sup>	19,34±1,88 <sup>bfhij</sup>
QS1:HEC3+CHEM	3,65±0,32 <sup>ejmop</sup>	4,48±1,00 <sup>aghjk</sup>	11,24±8,88 <sup>acgij</sup>

Letras diferentes indicam diferença estatística entre as amostras (Test-t,  $p < 0,05$ ).

A adesividade é um parâmetro que indica a força máxima para a separação entre a amostra e o disco de mucina. Pelos resultados obtidos, podemos observar que as amostras QS1:HEC1 e QS3:HEC1, possuem adesividade significativamente maior ao disco de mucina do que a amostra QS1:HEC3 ( $p < 0,05$ , test-t). Essa adesividade está relacionada a capacidade bioadesiva dos polímeros utilizados no preparo dos géis, sendo que a quitosana apresenta alta bioadesão, provavelmente por forças eletrostáticas devido aos grupamentos amina protonados da quitosana que interagem com a mucina carregada negativamente (NETSOMBOON; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2016).

Quando avaliamos as amostras preparadas com adição do gel de petrolato-polietileno, observa-se redução significativa da adesividade das amostras, indicando que a sua incorporação impactou de forma negativa na propriedade de mucoadesão dos géis desenvolvidos. Esse fato pode ser devido à instabilidade física dos géis causada pela sua incorporação. Diante dos resultados obtidos as amostras contendo o gel de petrolato-polietileno foram excluídas do estudo.

A força para descolar se refere a área do pico obtido no ensaio que relaciona a força e o tempo necessário para a separação da probe contendo o disco de mucina da amostra que está sendo analisada. No parâmetro de força de descolamento, houve diferença estatística entre as amostras QS1:HEC1 e QS3:HEC1 e entre QS1:HEC1 e QS1:HEC3 ( $p < 0,05$ , test-t), indicando que a maior adesividade do material pode estar também relacionada com a maior viscosidade das amostras, necessitando de maior tempo para o descolamento do gel na probe do equipamento. Já o parâmetro distancia de descolamento apresenta a distância entre a amostra, que está fixada na base do equipamento, e o disco de mucina, preso a probe, após a separação entre eles. Foi observado que após a separação as amostras formavam um “fio” que se rompiam mais rápido ou mais lentamente. Esse parâmetro pode estar relacionado com as propriedades viscoelásticas dos géis, que será melhor discutida no estudo reológico.

### 5.2.2 Reologia

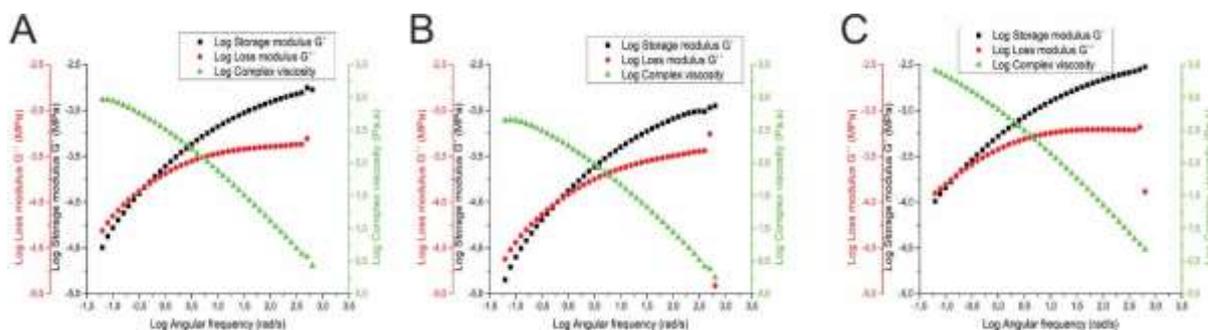
Os géis mucoadesivos foram analisados quanto as suas propriedades viscoelásticas por reologia e as imagens da varredura de frequência estão apresentadas na Figura 14.

Os géis são formulações semi-sólidas, consideradas formulações não-newtonianas com comportamento reológico pseudoplástico, no qual ocorre diminuição gradual da viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento, não podendo ser expressa em valor único (AULTON, 2008). O teste reológico mais empregado é o oscilatório, por ser uma técnica não destrutiva que permite medir, simultaneamente, a viscosidade e o comportamento elástico. Nos ensaios oscilatórios, o valor do módulo elástico ( $G'$ ) é uma indicação qualitativa da estrutura do sistema (CALLENS et al., 2003).

A análise foi realizada pela varredura da frequência, em que o módulo elástico (de armazenamento;  $G'$ ) e o módulo viscoso (de dissipação;  $G''$ ) são determinados em função da frequência a uma temperatura fixa (25°C). O módulo de armazenamento,  $G'$ , expressa a magnitude da energia que é armazenada no material ou recuperada por ciclo de deformação.  $G'$  foi maior que  $G''$ , assim o material se comporta mais como um sólido, isto é, as deformações são essencialmente elásticas ou recuperáveis. No entanto, quando  $G''$  é maior do que  $G'$ , a energia utilizada para deformar o material é dissipada viscosamente e o comportamento do material é semelhante a um líquido. Dessa forma o módulo viscoelástico determinado durante um intervalo de frequências

indica zonas de transição correspondentes aos processos de relaxamento é dependente da estrutura do material (FERRY,1980).

Figura 14- Reologia



Módulo elástico,  $G'$  (preto), e módulo viscoso,  $G''$  (vermelho), para os géis mucoadesivos sem fármaco. A: QS1:HEC1; B: QS3:HEC1; C: QS1:HEC3.

Todas as amostras apresentaram espectros mecânicos com  $G'$  aumentando mais rapidamente do que  $G''$ , ao longo de toda a faixa de frequência, com maior inclinação da curva, que pode ser observado na Figura 14. Nas frequências mais baixas  $G''$  foi maior que  $G'$ , principalmente nas amostras dos géis QS1:HEC1 e QS3:HEC1, apresentando cruzamento. Em todas as amostras a viscosidade complexa reduziu com o aumento da frequência.

Um gel apresenta propriedades intermediárias entre um sólido (elástico) e um líquido (viscoso) e, portanto, apresenta comportamento viscoelástico (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989). Em um líquido perfeitamente viscoso a tensão depende apenas da taxa de deformação. Um líquido viscoso não tem “memória”, o trabalho necessário para produzir qualquer deformação é dissipado instantaneamente. Por outro lado, em um sólido perfeitamente elástico, a tensão depende somente da magnitude da deformação sofrida. O trabalho mecânico empregado na deformação é armazenado na forma de energia elástica. Uma substância viscoelástica apresenta um comportamento híbrido: ao mesmo tempo em que uma parte da energia recebida durante a sua deformação é armazenada, a outra é dissipada. A tensão depende da história da deformação; algum tempo se passa antes que o material “esqueça” sua forma anterior (GRAESSLEY, 1984, ALBANO, 2012).

Segundo Steffe (1996), Chamberlain e Rao (2000), Albano (2012) géis fracos ou géis físicos são dependentes da frequência, apresentam curva de  $G'$  maior que  $G''$ , mas não apresentam cruzamento de  $G'$  e  $G''$ . Em géis elásticos ou verdadeiros, os módulos de armazenamento não variam com a frequência. À diferença de um gel verdadeiro, um gel fraco em altas deformações (ensaios estacionários), escoou, mas um gel verdadeiro sofre ruptura (IKEDA; NISHINARI, 2001). Dessa forma, as amostras apresentaram um comportamento de gel fraco, já que os valores de  $G'$  foram maiores que  $G''$  e dependeram da frequência.

Para polímeros convencionais, como a quitosana e a HEC, com cadeias moleculares flexíveis, tal comportamento surge a partir da influência da massa molar dos polímeros ou de interações entre as macromoléculas. Essas interações são interpretadas em termos de uma rede de entrelaçamento e dois conjuntos de tempo de relaxação: de curta distância (interações entre partes da própria macromolécula) e de longa distância (interações entre macromoléculas adjacentes). A relaxação das interações de longa distância ocorre na escala de tempo da zona terminal, enquanto a relaxação das interações de curta distância ocorre na escala de tempo da zona de transição. Portanto, a transição da zona terminal para a zona de platô aparece em frequências mais baixas na medida em que a massa molar do polímero aumenta, devido ao maior número de interações.

### 5.2.3 Tempo de residência

A Tabela 4 apresenta as médias dos resultados das replicatas para os parâmetros descritos, analisados no teste de residência.

Tabela 4. Resultados do ensaio de tempo de residência na mucosa.

<b>Amostra</b>	<b>Peso inicial na mucosa</b>	<b>Peso desprendido</b>	<b>Percentual desprendido</b>
QS1:HEC1	0,494 g	0,129 g	26,1%±0,04 <sup>a</sup>
QS3:HEC1	0,656 g	0,108 g	16,6%±0,02 <sup>b</sup>
QS1:HEC3	0,580 g	0,349 g	60,6%±0,09 <sup>c</sup>

Letras diferentes indicam diferença estatística entre as amostras (Test-t,  $p < 0,05$ ).

Analisando os valores de gel mucoadesivo que se despreendeu da mucosa em cada uma das amostras, observa-se que o gel QS3:HEC1 apresentou permanência

significativamente maior que os demais ( $p < 0,05$ , test-t) uma vez que uma menor quantidade de gel se despreendeu na mucosa bucal suína durante o período do experimento. Apesar do resultado do ensaio de mucoadesão que mostrou semelhança na adesividade entre os géis QS1:HEC1 e QS3:HEC1, o ensaio de tempo de residência realizado indica que a maior viscosidade do gel QS3:HEC1 também é relevante, pois está, neste caso, relacionada com a ação da gravidade, indicando que este gel permanece aderido à mucosa mesmo em condições afetadas pela gravidade. O gel QS1:HEC3, possui o menor tempo de permanência na mucosa, pois por possuir alta viscosidade ele se despreendeu da mucosa em grande quantidade e na forma de “blocos”.

#### 5.2.4 Espalhabilidade

A capacidade de espalhabilidade dos géis está apresentada na Tabela 5.

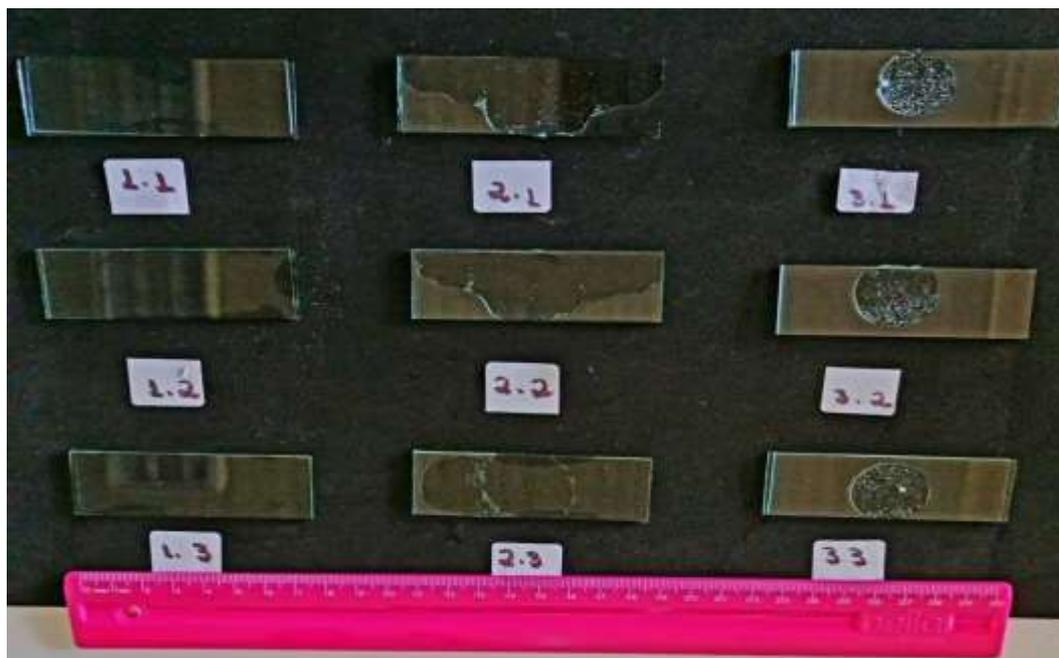
Tabela 5. Valores do ensaio de espalhabilidade.

<b>Amostra</b>	<b>Espalhabilidade (cm)</b>
QS1:HEC1	7,70±0,00 <sup>a</sup>
QS3:HEC1	2,70±0,10 <sup>b</sup>
QS1:HEC3	2,35±0,06 <sup>b</sup>

Letras diferentes indicam diferença estatística entre as amostras (Test-t,  $p < 0,05$ ).

De acordo com as amostras analisadas, observou-se que a amostra QS1:HEC1, apresentou a maior espalhabilidade ( $p < 0,05$ ), porém, mostrou-se bastante fluida, chegando a extravasar as dimensões da lâmina. Isto pode indicar que ela não teria uma boa aderência à mucosa, por poder escorrer após a administração. As amostras QS3:HEC1 e QS1:HEC3 apresentaram valores semelhantes de espalhabilidade, porém, pôde-se observar visualmente que a amostra QS1:HEC3 se distribuiu de forma mais uniforme pela lâmina, o que pode ser visualizado na figura 15.

Figura 15- Teste de espalhabilidade



1: QS1:HEC1; 2: QS3:HEC1; 3: QS1:HEC3.

### 5.2.5 Estabilidade macroscópica

Inicialmente foram avaliados os seis géis, em placa de Petri, e deixadas em incubadora BOD por 60 dias. O resultado está representado na Figura 16.

Figura 16- Estabilidade em placa de Petri



1: QS1:HEC1; 2: QS3:HEC1; 3: QS1:HEC3; 4: QS1:HEC1+CHEM; 5: QS3:HEC1+CHEM; 6: QS1:HEC3+CHEM.

Fonte: A autora.

Como é possível observar, todas as amostras secaram na placa, o que dificultou a observação da estabilidade. Porém, ainda assim, foi possível observar a instabilidade das amostras QS1:HEC1+CHEM, QS3:HEC1+CHEM e QS1:HEC3+CHEM, ou seja, as que possuem o gel de petrolato-polietileno em sua composição apresentaram uma separação de fases.

A Figura 17 apresenta o resultado do teste de estabilidade, agora repetido apenas com os géis QS1:HEC1, QS3:HEC1 e QS1:HEC3 em maior quantidade (10 g) para que não se repetisse a secagem do material, podendo assim a estabilidade ser melhor observada. As três amostras mostraram-se estáveis durante o armazenamento em incubadora BOD no período de 30 dias sem visível crescimento de microrganismos, nem separação de fases, alteração de cor, precipitação ou redução de volume.

Figura 17- Estabilidade dos géis mucoadesivos em béquer fechado.



1: QS1:HEC1; 2: QS3:HEC1; 3: QS1:HEC3.

Fonte: A autora

### 5.3 PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO E INCOPORAÇÃO NO GEL

Os complexos de inclusão foram obtidos na forma de um pó fino após a liofilização. O complexo de inclusão com nistatina apresentou coloração amarelo clara e o complexo de inclusão com clorexidina apresentou coloração branca.

A amostra de gel selecionada para incorporação dos fármacos e complexos de inclusão foi o gel QS3:HEC1 composto por quitosana: HEC na proporção 3:1. Esse gel foi selecionado por apresentar as melhores propriedades mucoadesivas conforme apresentado.

As amostras compostas por clorexidina pura contém 64 mg por grama de gel e foram nomeadas por QS3:HEC1-Clx enquanto as amostras contendo o complexo de inclusão contém o equivalente a 4,8 mg do fármaco por grama do gel e foram nomeadas por QS3:HEC1-Clx: $\beta$ CD.

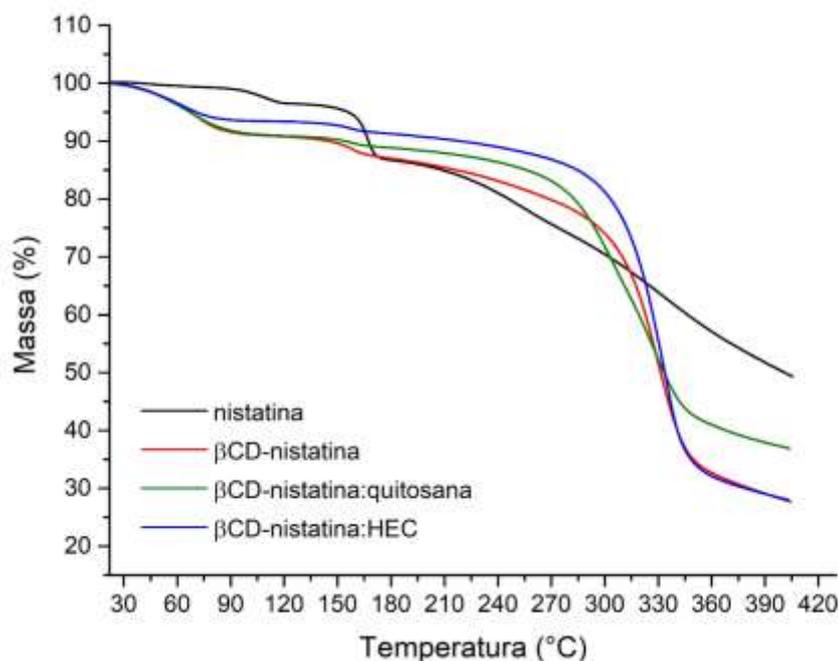
Já as amostras compostas por nistatina pura (QS3:HEC1-Nis) contém 17,5 mg por grama de gel e as amostras contendo o complexo de inclusão (QS3:HEC1-Nis: $\beta$ CD) contém o equivalente a 16,1 mg do fármaco por grama do gel.

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FÁRMACOS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO

### 5.4.1 Análise termogravimétrica (TG)

As Figuras 18 e 19 apresentam os termogramas das amostras de nistatina e de clorexidina respectivamente.

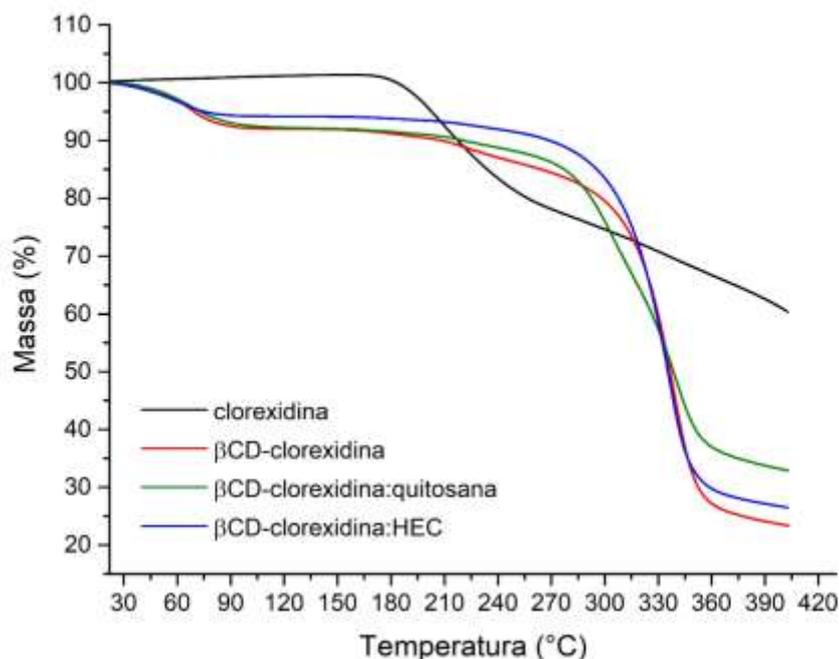
Figura 18. Termograma das amostras com nistatina.



Analisando a curva de TG da nistatina, observa três eventos de perda de massa, uma inicial em torno de 130 °C, sugerindo a saída da água de hidratação. Em seguida, observou-se um perfil de termodecomposição caracterizado por vários eventos térmicos. Em 165 °C a perda de massa pode estar relacionada com a fusão do fármaco. Nos complexos de inclusão, a perda inicial de massa é mais acentuada,

porém é atenuada no segundo evento, indicando que houve melhora na estabilidade do fármaco.

Figura 19. Termograma das amostras com clorexidina.



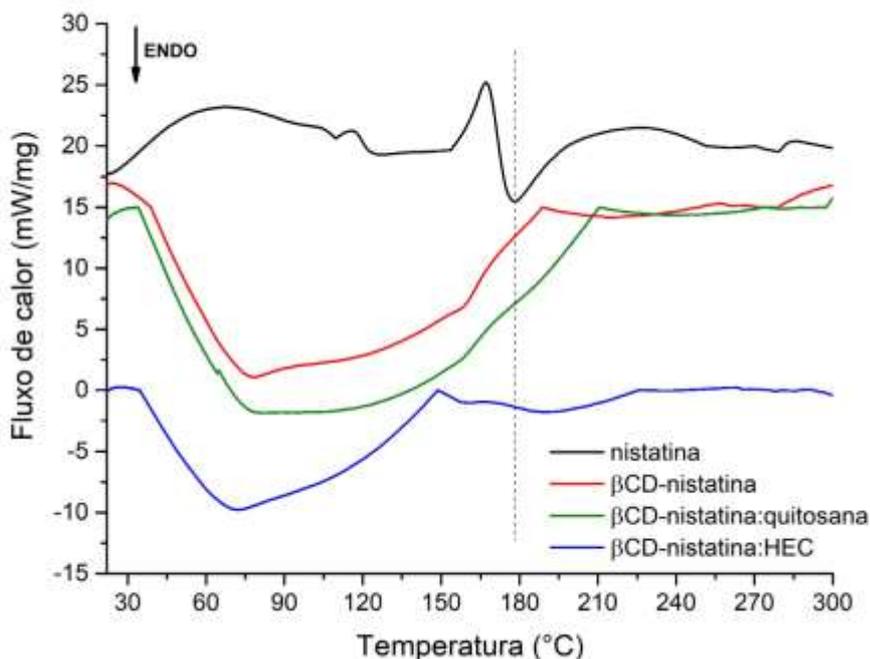
A clorexidina apresentou estabilidade até a temperatura de 176 °C, na qual perdeu 20% de sua massa gradualmente até 255 °C e, a partir dessa temperatura, perdeu gradualmente mais massa. O complexo de inclusão apresentou perda gradual da sua massa inicial desde 20 °C até a temperatura de 80 °C. Sua massa manteve-se constante até 287 °C e, então, ocorreu degradação até a temperatura final de 400 °C.

Comparando o comportamento de termodecomposição dos fármacos não complexados em relação aos complexos de inclusão, ficou claro que houve interação entre as moléculas. Essa interação alterou o perfil de termodecomposição dos fármacos, fazendo com que ocorresse menor perda de massa nos complexos de inclusão, sugerindo que a complexação com a  $\beta$ -ciclodextrina promoveu um aumento da estabilidade térmica dos complexos de inclusão. Além disso, a mistura física com os polímeros base do gel mucoadesivo não indicou alterações na estabilidade térmica dos complexos de inclusão, uma vez que as curvas se apresentaram semelhantes entre si.

### 5.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

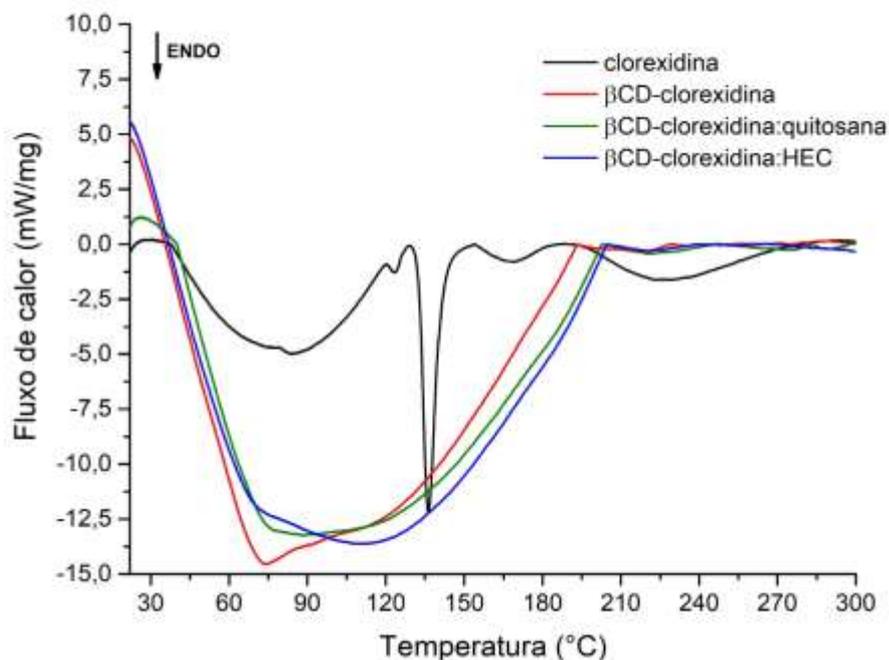
As Figuras 20 e 21 apresentam as curvas de DSC das amostras de nistatina e de clorexidina respectivamente.

Figura 20- Curvas DSC das amostras com nistatina.



Analisando as curvas de DSC das amostras de nistatina, é possível observar o fluxo de calor através das amostras a medida em que ocorre o aquecimento. O fármaco puro apresenta dois picos endotérmicos sendo o pico em 180 °C correspondente ao seu ponto de fusão. Nota-se ainda, que o complexo de inclusão, apresenta um menor fluxo de calor, e seu pico endotérmico ocorre em temperaturas mais baixas, aproximadamente 80 °C. Os termogramas dos complexos de inclusão mostraram uma redução na intensidade do pico correspondente ao ponto de fusão do fármaco evidenciando a complexação. Os complexos de inclusão, quando misturados aos polímeros, apresentam perfil bastante semelhante ao complexo.

Figura 21- Curvas DSC das amostras com clorexidina



Analisando as curvas de DSC das amostras de clorexidina, é possível observar o fluxo de calor através das amostras, a medida em que ocorre o aquecimento. O termograma da clorexidina mostrou dois períodos de fusão a 123 °C e a 135 °C (endotérmicos). Esses picos endotérmicos desapareceram no complexo de inclusão indicando a complexação.

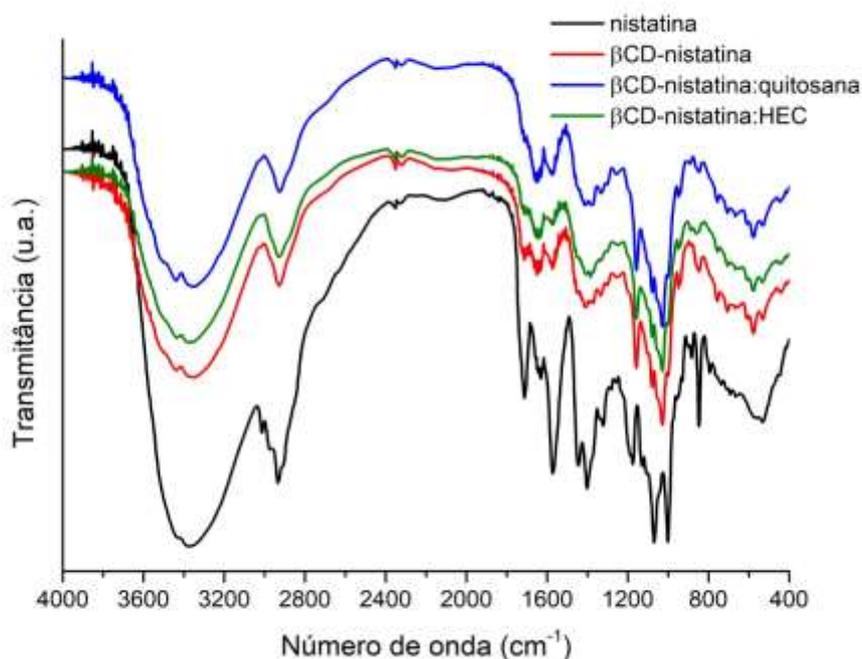
#### 5.4.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As Figuras 22 e 23 apresentam os espectros das amostras de nistatina e de clorexidina respectivamente.

O espectro da nistatina mostra um pico largo em 3367  $\text{cm}^{-1}$ , que pode ser atribuído à vibração de estiramento O-H. O pico localizado a 2937  $\text{cm}^{-1}$  foi identificado como a vibração de estiramento C-H<sub>2</sub>. Os picos a 1709 e 1620  $\text{cm}^{-1}$  são característicos das vibrações de estiramento C=O no grupo carboxílico e de estiramento assimétrico C=C, respectivamente. Os picos a 1575  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionados com as vibrações de C=C do heptano. Os picos em 1439, 1382, e 1175  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídos às vibrações de estiramento C-O e C-O-H. Além disso, foram observados picos a 1069, 848 e 795  $\text{cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídos às vibrações de =C-H, -CH<sub>2</sub> e -C-H (BENAVENT et al., 2021).

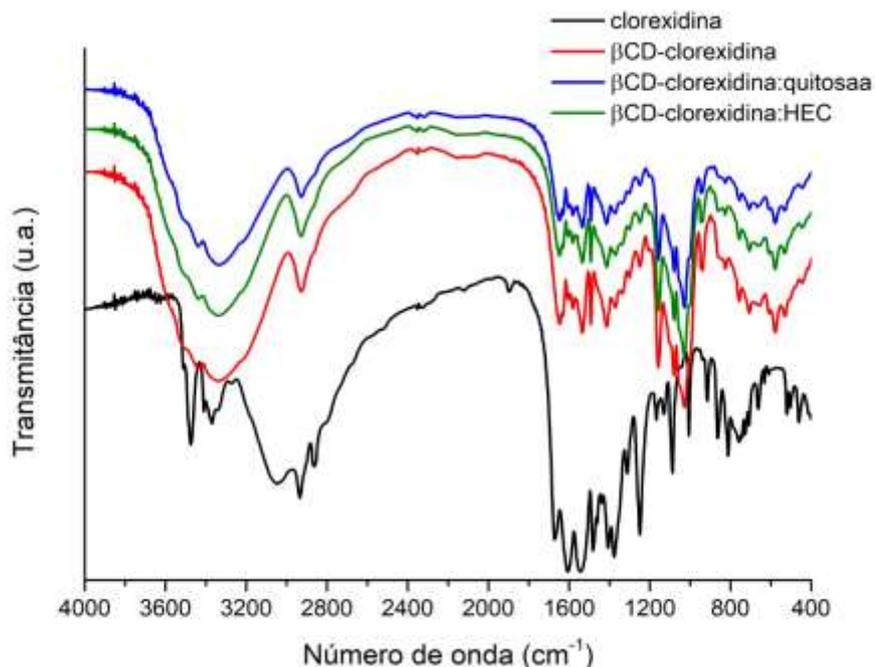
Os espectros dos complexos de inclusão mostraram algumas modificações, por exemplo, a redução da banda de nistatina a  $1728\text{ cm}^{-1}$  (C=O) e  $848\text{ cm}^{-1}$  (CH=CH estiramento das vibrações de nistatina) e um deslocamento da banda da  $\beta$ CD a  $1420$  para  $1404\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) e  $1068$  para  $1079\text{ cm}^{-1}$  (O-H estiramento das vibrações da nistatina) (WANG, 2014).

Figura 22- Espectroscopia das amostra com nistatina



O espectro da clorexidina na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído a -NH. Foram observadas bandas em  $1650$ ,  $1600$ ,  $1550$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  que podem ser atribuídas ao estiramento C=C da fração aromática da clorexidina. O espectro do complexo de inclusão mostrou estreitamento das bandas em  $3500-3300\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ , de OH e C-O-C, respectivamente. Esses resultados confirmam a quebra de algumas ligações de hidrogênio na formação do complexo. Observou-se uma diminuição da intensidade de estiramento de C=C aromático quando comparada com a clorexidina livre (CORTES et al., 2001).

Figura 23- Espectroscopia das amostra com clorexidina



## 5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS MUCOADESIVOS CONTENDO COMPLEXO DE INCLUSÃO

### 5.5.1 Ensaio de mucoadesão

Os resultados deste teste encontram-se em valores de média entre as replicatas, e estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados do ensaio de mucoadesão dos géis com os fármacos.

Amostra	Adesividade (N)	Força para descolar (N.sec)	Distância de descolamento (mm)
QS3:HEC1-Clx	3,24±0,30 <sup>a</sup>	3,48±0,47 <sup>a</sup>	7,21±0,60 <sup>a</sup>
QS3:HEC1-Clx:βCD	3,80±0,37 <sup>ad</sup>	4,56±0,31 <sup>ac</sup>	6,04±0,56 <sup>ab</sup>
QS3:HEC1-Nis	4,097±0,03 <sup>bdf</sup>	4,367±0,29 <sup>ad</sup>	8,470±0,08 <sup>ac</sup>
QS3:HEC1-Nis:βCD*	4,192 <sup>cdg</sup>	4,914 <sup>bcd</sup>	8,140 <sup>a</sup>

Nis: nistatina; Clx: clorexidina; β-CD: β-ciclodextrina. \*Ensaio com n=1. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as amostras (Test-t, p<0,05).

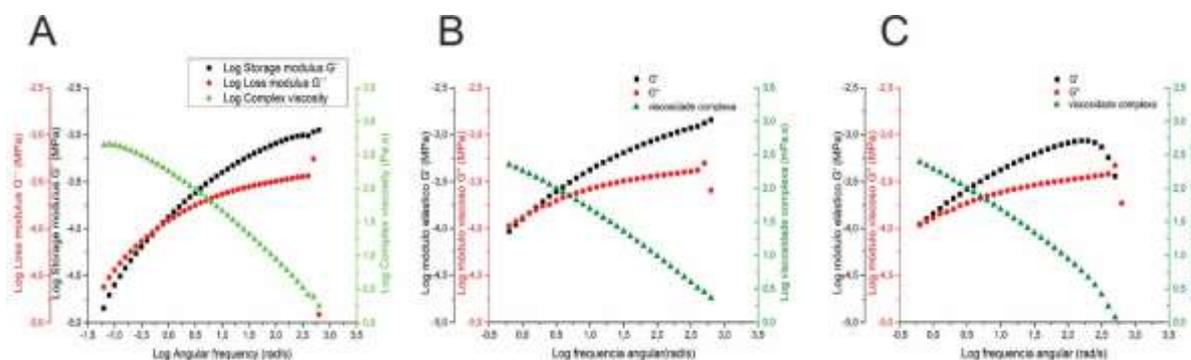
As amostras apresentaram adesividade muito semelhante entre si, tanto com para complexos de inclusão quanto com para fármacos puros. Houve apenas um aumento discreto para os complexos. Comparando com os resultados do ensaio de mucoadesão do gel sem os fármacos, houve redução dos valores obtidos de todos os parâmetros analisados, conforme apresentado na Tabela 3 (adesividade de  $7,14 \pm 0,46$  N, força para descolar de  $5,91 \pm 0,68$  N.sec e distância de descolamento de  $11,83 \pm 0,88$  mm). Essa redução da mucoadesão está relacionada com a incorporação dos pós no gel, o que modificou as propriedades do gel, inclusive na capacidade de interação dos polímeros com a mucina.

### 5.5.2 Reologia

O estudo de reologia dos géis contendo os fármacos e os complexos de inclusão estão apresentados nas Figuras 24 e 25. De acordo com as Figuras, observa-se alteração do comportamento reológico do gel com a incorporação dos pós, com valores iniciais maiores de  $G'$  e  $G''$ .

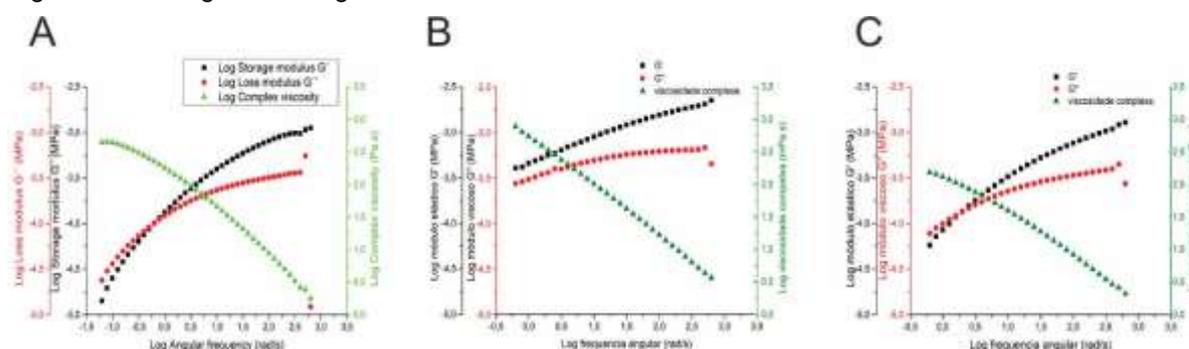
O valor de  $G'$  ultrapassa o valor de  $G''$  em todas as amostras, sendo as formulações classificadas como elásticas. O aumento do comportamento elástico é sugerido para aumentar a retenção no local da aplicação e contribuir para a liberação prolongada do fármaco (BALOGLU et al., 2011). A redução da viscosidade é um comportamento importante para as formulações, uma vez que facilita sua capacidade de espalhamento e aderência após a administração (SANZ et al., 2017).

Figura 24 – Reogramas dos géis com nistatina.



A: QS3:HEC1; B: QS3:HEC1-Nis; C: QS3:HEC1-Nis:βCD.

Figura 25 – Reogramas do gel com clorexidina.

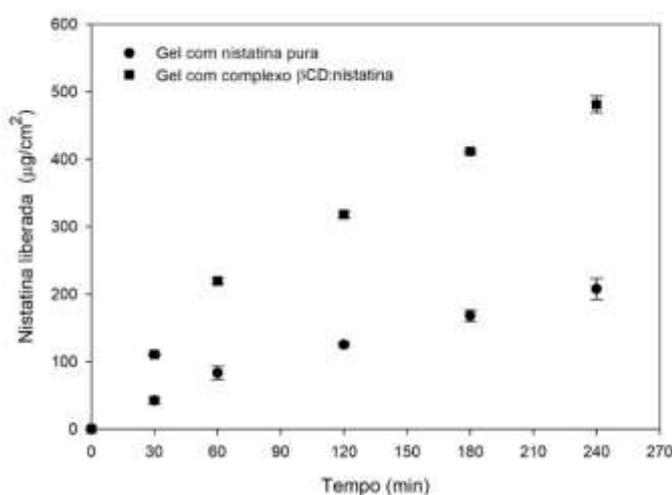


A: QS3:HEC1; B: QS3:HEC1-Clx; C: QS3:HEC1-Clx: $\beta$ CD.

### 5.5.3 Ensaio de liberação e permeação *in vitro*

A Figura 26 representa o perfil de liberação da nistatina a partir dos géis contendo o fármaco puro e o complexo de inclusão. Observa-se que em 4 horas de ensaio foi liberado cerca de 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  do gel contendo o fármaco livre, enquanto que quando a nistatina está complexada a liberação foi de cerca de 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Esse resultado mostra de forma clara o aumento da velocidade de dissolução do fármaco com a formação do complexo de inclusão, resultando em um aumento da biodisponibilidade do fármaco, e conseqüentemente em provável melhora em sua ação no tecido alvo.

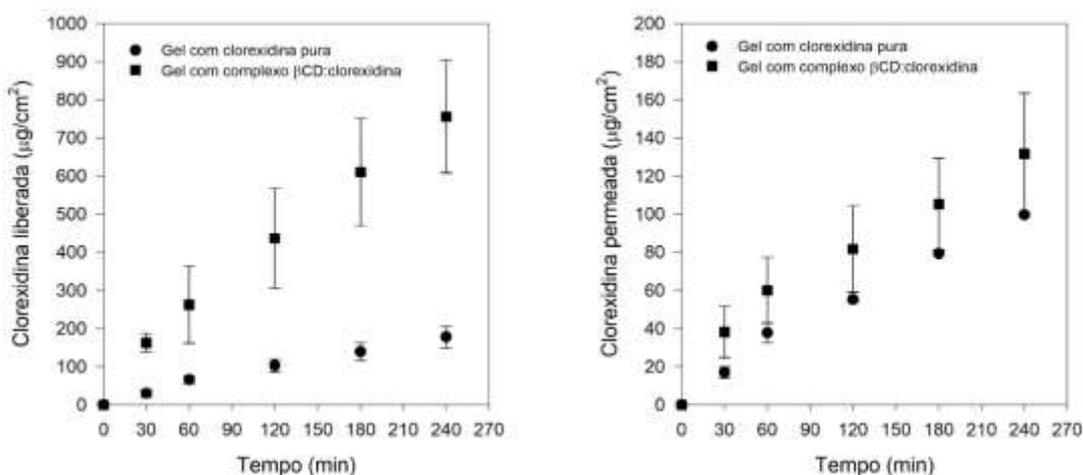
Figura 26- Perfil de liberação da nistatina.



A Figura 27 apresenta o perfil de liberação da clorexidina a partir do gel mucoadesivo. Também é possível observar que o fármaco na forma de complexo de

inclusão apresenta acentuada velocidade de dissolução, uma vez que em 4 horas foi liberado cerca de 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de clorexidina do gel com o fármaco puro e 800  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de clorexidina do gel incorporado com o complexo de inclusão. Isso resulta em uma melhor biodisponibilidade e provável melhora na terapêutica do fármaco.

Figura 27- Perfil de liberação e de permeação da clorexidina.

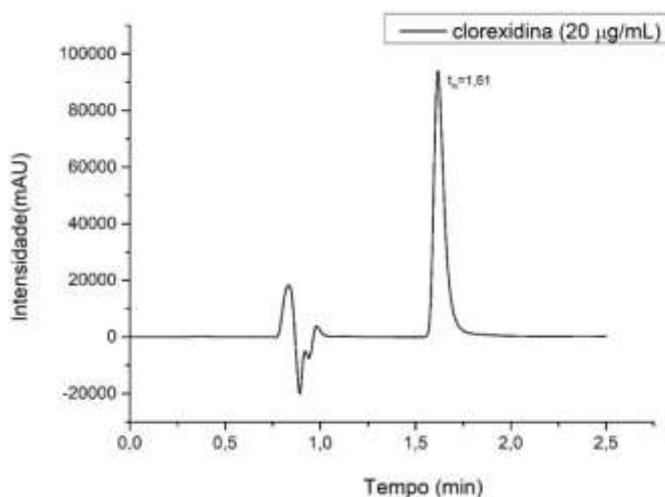


A Figura 27 também apresenta a permeação *in vitro* da clorexidina em mucosa bucal suína. Analisado a Figura observa-se que cerca de 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  do fármaco incorporado no gel mucoadesivo atravessou a mucosa e foi quantificada no meio receptor, enquanto que na amostra de gel incorporado com o complexo de inclusão a concentração de clorexidina permeada pela mucosa bucal suína foi de cerca de 120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Apesar do grande desvio padrão, que está relacionado principalmente com a própria mucosa, observa-se que o aumento da velocidade de dissolução da clorexidina causado pela complexação com a  $\beta$ -ciclodextrina, a quantidade de fármaco que seria absorvida é baixa, e o fármaco provavelmente deve permanecer na mucosa para o tratamento local de infecções bucais.

#### 5.5.4 Método analítico por CLAE para quantificação de clorexidina

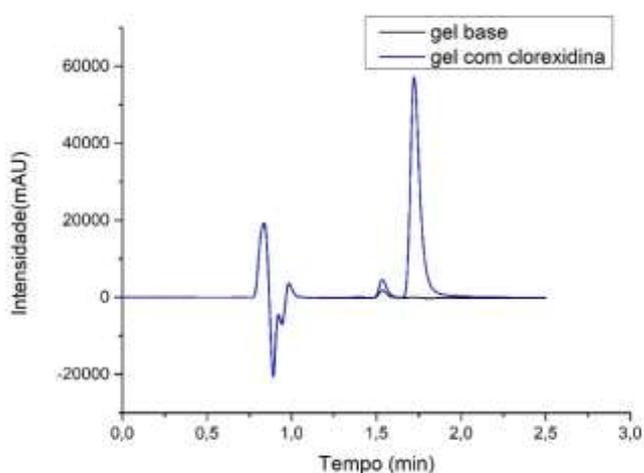
A Figura 28 representa o cromatograma obtido de uma solução de clorexidina a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O tempo de retenção obtido foi de 1,61 minutos. A curva analítica foi preparada com as concentrações de 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que gerou a equação da reta:  $y = 19603,40x - 10058,28$  com  $r^2 = 0,99876$ .

Figura 28- Cromatograma da clorexidina



A avaliação da especificidade do método analítico para quantificação da clorexidina foi avaliada analisando amostras do gel mucoadesivo puro e gel mucoadesivo incorporado com clorexidina. Os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 29, indicando que os componentes do gel não influenciam na quantificação do fármaco.

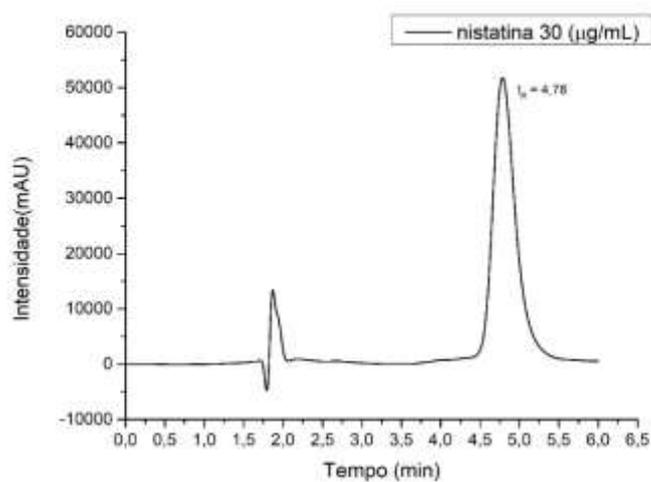
Figura 29- Cromatogramas do gel mucoadesivo com e sem fármaco.



#### 5.5.5 Método analítico por CLAE para quantificação de nistatina

A Figura 30 representa o cromatograma obtido de uma solução de nistatina a 30  $\mu\text{g/mL}$ . O tempo de retenção obtido foi de 4,78 minutos. A curva analítica foi preparada com as concentrações de 5; 10; 20; 30; 40; 45 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , que gerou a equação da reta:  $y=32279,30x+7411,10$  com  $r^2=0,99971$ .

Figura 30- Cromatograma da nistatina.



## 6 CONCLUSÃO

Os géis mucoadesivos incorporados com os complexos de inclusão de nistatina:  $\beta$ -ciclodextrinas e clorexidina:  $\beta$ -ciclodextrinas foram desenvolvidos e caracterizados. A utilização dos polímeros como a quitosana e a hidroxietilcelulose favoreceu a formação de um gel mucoadesivo para a utilização tópica bucal.

A caracterização físico-química dos complexos de inclusão mostrou compatibilidade entre os componentes com aumento da estabilidade térmica dos fármacos. As propriedades mucoadesivas e de residência dos géis na mucosa bucal suína, além do seu comportamento viscoelástico, com deformações elásticas ou recuperáveis sugerem que estas formulações permanecem por maior tempo em contato com a superfície a ser tratada de forma tópica interessantes para aplicação na mucosa. Além disso, os complexos de inclusão de nistatina e de clorexidina incorporados nos géis mucoadesivos promoveram aumento da velocidade de dissolução dos fármacos e baixa permeação, levando a maior biodisponibilidade dos fármacos no local da administração e conseqüentemente maior eficiência para o tratamento das afecções bucais.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, R.; GUPTA, V. CYCLODEXTRINS – A Review on Pharmaceutical Application for Drug Delivery. **Int. J. Pharm. Front. Res.** 2, 95–112, 2012.

AGUIAR, M. M. G. B. **Obtenção de gel mucoadesivo de nistatina para o tratamento da candidíase oral. Desenvolvimento e caracterização de dispersões sólidas de nistatina.** Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-06052016-102001/>>.

AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, J. - **Drug Dev. Ind. Pharm.**, 23, p.489 (1997). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/03639049709148498>.

ALBANO, K. M. **Comportamento reológico de géis de amido de mandioca salsa (Arracacia xanthorrhiza B.).** Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.

ALVES, F. M. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas mucoadesivos fitoterápicos de camomila (Matricaria recutita L.) para aplicação local durante a erupção dentária.** Dissertação [Mestrado em Odontologia - na área de concentração Clínica Integrada] Mestrado em Odontologia, Área de concentração: Clínica Integrada] - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2018.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 505-518, 2009.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BAGAN, J. et al. Mucoadhesive polymers for oral transmucosal drug delivery: a review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 34, p. 5497-5514, 2012.

BALOGLU, E.; KARAVANA, S. Y.; SENYIGIT, Z.; AGUNERI, T. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharm Dev Technol**, 16 (6):627-635, 2011.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology.** Elsevier, p.37-54, 1989.

BENAVENT, C.; TORRADO-SALMERÓN, C.; TORRADO-SANTIAGO, S. Development of a Solid Dispersion of Nystatin with Maltodextrin as a Carrier Agent: Improvements in Antifungal Efficacy against Candida spp. Biofilm Infections. **Pharmaceutics**, 14, 397, 2021.

BRUSCHI, M. L. - “**Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**”, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil (2006).

CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J. P.; Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, 55: 323-328, 2003.

CARVALHO, F. C.; CALIXTO, G.; HATAKEYAMA, I. N.; LUZ, G. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based Polymeric Bio(muco)Adhesive Platforms for Controlling Drug Delivery - properties, Methodologies and Applications- **Drug Develop. Ind. Pharm.** (2013).

CARVALHO, F. C.; SILVA, H. R.; LUZ, G. M.; BARBI, M. S.; LANDGRAF, D. S.; CHIAVACCIA, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; GREMIÃO, M. P. D. - **J. Biomedical. Nanotechnology** (2012).

CHAMBERLAIN, E. K.; RAO, M. A. Effect of concentration on rheological properties of acid-hydrolyzed amylopectin solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 2, p. 163-171, 2000.

CID, Y. P. et al. In vitro characterization of chitosan gels for buccal delivery of celecoxib: Influence of a penetration enhancer. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, p. 101–111, 2012.

COOK, M. T.; KHUTORYYANAKIY, V. V. Mucohesion and mucosa-mimetic materials – A mini-review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, p. 991-998, 2015.

CORTÉS, M. E.; SINISTERRA, R. D.; AVILA-CAMPOS, M. J. et al. The Chlorhexidine: beta;-Cyclodextrin Inclusion Compound: Preparation, Characterization and Microbiological Evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena** 40, 297–302 (2001).

DE OLIVEIRA, M. G. et al. Cyclodextrins: Improving the therapeutic response of analgesic drugs: A patent review. **Expert Opin. Ther. Pat.** 25, 897–907, 2015.

DJEKIC, L. et al. Formulation and physicochemical characterization of hydrogels with 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid/phospholipid complex phytosomes. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 35, p. 81–90, 2016.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES J. – **Adv. Drug Del. Rev.**, 64, p.557 (2012). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009>

EOUANI, C.; PICCERELLE, P.; PRINDERRE, P.; BOURRET, E.; JOACHIM, J. In-vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films. **Eur J Pharm Biopharm.**, 52(1):45-55, 2001.

EVANGELISTA, R. C. – “**Sistemas de liberação controlada de fármacos**”, Tese de Livre Docência, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brasil (2006).

FALAMARZPOUR, P.; BEHZAD, T.; ZAMANI, A. Preparation of nanocellulose reinforced chitosan films, cross-linked by adipic acid. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 1–12, 2017.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5. ed. Brasília: Agência de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz, 2010, volume 1, p. 267, 268.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5. ed. Brasília: Agência de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz, 2010, volume 2, p. 1160.

FERRY, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**. New York: John Wiley; Sons, 1980.

FRACETO, L. F.; GONÇALVES, M. M.; MORAES, C. M.; DE ARAÚJO, D. R.; ZANELLA, L.; DE PAULA, E.; PERTINHEZ, T. D. A. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína:  $\beta$ -ciclodextrina. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1203–1207, 2007.

GASPAR, M. D. R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação in vitro de nanocápsulas poliméricas contendo clorexidina com aplicação potencial na prevenção de infecções respiratórias**. Doutorado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2020.

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, p.413, 867, 971, 972, 982.

GRAESSLEY, W. W. **Viscoelasticity and flow in polymer melts and concentrated solutions**.1984.

GROEGER, S.; MEYLE, J. Oral mucosal epithelial cells. **Front. Immunol**- v. 10, 1–22. 2019.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Lagmuir monolayers – the role of a phospholipids in the mechanism of polyenes mode of action. **Biophysical Chemistry**, v. 123, p. 154-161, 2006.

HĂDĂRUGĂ, N. G.; BANDUR, G. N.; DAVID, I.; HĂDĂRUGĂ, D. I. A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Environ. Chem. Lett.** 17, 349–373, 2019.

HANES, J. – **Adv. Drug Del. Rev.**, 61, p.73 (2009). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.01.002> 23.

IKEDA, S.; NISHINARI, K. "Weak-gel" type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated r- carrageenan helices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.9, p. 4436-4441, 2001.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal Of**

**Pharmaceutics**, [S.L.], v. 535, n. 1-2, p. 272-284, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018>.

JONES, D. S. et al. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1–2, p. 49–58, 2009.

KARKI, S.; KIM, H.; NA, S. J.; SHIN, D.; JO, K.; LEE, J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 559–574, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004>>

KOCKISCH, S.; REES, G. D.; YOUNG, S. A.; TSIBOUKLIS, J.; SMART, J. D. - **J. Control. Release**, 77, p.1 (2001). Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00444-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00444-8).

KOFFI, A. A.; AGNELY, F.; PONCHEL, G.; GROSSIORD, J. L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **Eur J Pharm Sci.**, Mar;27(4):328-35, 2006.

KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E. J.; JAROSZEWSKI, J. W. - **J. Control. Release**, 69, p.421 (2000). Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00325-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00325-4).

LLABOT, J. M.; ALLEMANDI D. A.; Manzo R. H.; LONGHI M. R. HPLC method for the determination of nystatin in saliva for application in clinical studies. **J Pharm Biomed Anal.**, 5;45(3):526-30, 2007.

LEEMHUIS, H., KELLY, R. M.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 85, 823–835, 2010.

LOPES, J. C. G. **Administração transmucosal: estratégias tecnológicas para a administração de fármacos**. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2014.

LU, M.; XUAN, S; WANG, Z. Oral microbiota: a new view of body health. **Food Science And Human Wellness**, v. 8, n. 1, p. 8-15, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2018.12.001>.

MACHADO, G. D. O.; PAWLICKA, A.; HILLIG, E.; NAGEL, W. Eletrólitos Sólidos Poliméricos a partir da Hidroxietilcelulose. **Anais.Unicentro.Br**, [s. l.], p. 1–16, 2009. Disponível em: <http://anais.unicentro.br/sef/isef/palestrantes/Minicurso 14.pdf>

MORIKAVA, F. S. Incorporação de Complexos de Inclusão Nistatina: ou Clorexidina: B-Ciclodextrina em Material Condicionador de Tecido: Efetividade Antifúngica e Caracterização Físico-Mecânica. **Sustainability (Switzerland)**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–9, 2020.

MURA, P.; CORTI, G.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; MENNINI, N.; BRAGAGNI, M. Development of Mucoadhesive Films for Buccal Administration of Flufenamic Acid: effect of cyclodextrin complexation. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 99, n. 7, p. 3019-3029, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.22068>.

NANCI, A. **Ten Cate, histologia oral**. 8 ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NETSOMBOON, K.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 98, p. 76–89, 2016.

PEREIRINHA, P. R. R.; FIGUEIRAS, A. R. R. Desenvolvimento de sistemas mucoadesivos para a administração controlada de fármacos. **Boletim Informativo Geum-** v. 7, n. 2, p.63-81, abr./jun., 2016

SAKEER, K. et. al. Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 11, p. 1771-1779, 2010.

SANTOS, J. V.; MOURA, T. F. A.; RAFFIN, F. N. Otimização dos Parâmetros de Secagem por Aspersão de Micropartículas de Quitosana Como Carreadores de Insulina. **Lat. Am. J. Pharm.** 22 (4): 327-33 (2003).

SANZ, R. et al. Development of a mucoadhesive delivery system for control release of doxepin with application in vaginal pain relief associated with gynecological surgery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 393–401, 2018.

SQUIER, C. A.; KREMER, M. J. Biology of Oral Mucosa and Esophagus. Jnci Monographs, [S.L.], v. 2001, n. 29, p. 7-15, 1 out. 2001. **Oxford University Press (OUP)**. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003443>.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1556-1568, 2005.

SOMER, A.; ROIK, J. R.; RIBEIRO, M. A.; URBAN, A. M.; SCHOEFFEL, A.; URBAN, V. M.; FARAGO, P. V.; CASTRO, L. V.; SATO, F.; JACINTO, C.; CAMPESATTO, E.; MOREIRA, M. S. A.; NOVATSKI, A. Nystatin complexation with  $\beta$ -cyclodextrin: Spectroscopic evaluation of inclusion by FT-Raman, photoacoustic spectroscopy, and  $^1\text{H}$  NMR, **Materials Chemistry and Physics**, Volume 239, 2020,

STEFANOVIC, J. et al. Syntesis, characterization, and antifungal activity of nystatin-gum Arabic conjugates. **Journal Applied Polymer Science**, v. 127, p. 4736-4746, 2012.

STEFFE, F. L. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. Freeman Press, East Lansing, 418 p, 1996.

SWAMINATHAN, S. et al. Cyclodextrin-based nanospheres encapsulating camptothecin: Physicochemical characterization, stability and cytotoxicity. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 74, 193–201, 2010.

TAHERI, P.; JAHANMARDI, R.; KOOSHA, M.; ABDI, S. Physical, mechanical and wound healing properties of chitosan/gelatin blend films containing tannic acid and/or bacterial nanocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 154, p. 421–432, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.114>

TALLURY, P. et al. Effects of solubilizing surfactants and loading of antiviral, antimicrobial and antifungal on their release rates from ethylene vinyl acetate copolymer. **Dental Material**, v. 23, p. 977-982, 2007.

TOBYN, M. J.; JOHNSON, J. R.; DETTMAR, P. W. - **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 42, p.56 (1996).

VARUM, F. O. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 535-548, 2008.

VERMANI, K.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J. D. Assemblies for In Vitro Measurement of Bioadhesive Strength and Retention Characteristics in Simulated Vaginal Environment. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 9, p. 1133–1146, 1 jan. 2002.

WANG, J., JIN, Z.; XU, X. Gamma-cyclodextrin on enhancement of water solubility and store stability of nystatin. **J Incl Phenom Macrocycl Chem** 78, 145–150, 2014.

ZANATTA, F. B.; ANTONIAZZI, R. P.; RÖSING, C. K. The effect of 0.12% chlorhexidine rinsing in previously plaque-free and plaquecovered urfaces. A randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 78, n. 11, p. 2127-34, 2007.

ZHOU, Z. M.; LI, X., CHEN, X. P.; FANG, M.; DONG, X. Separation performance and recognition mechanism of mono(6-deoxy-imino)-  $\beta$ -cyclodextrins chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. **Talanta** 82, 775–784, 2010.