



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VANESSA MORAIS MUNIZ

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULA CONTENDO
CLOREXIDINA E TIMOL**

Recife-PE
2018

VANESSA MORAIS MUNIZ

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULA CONTENDO
CLOREXIDINA E TIMOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: produção e controle de medicamentos.

Orientador: Rui Oliveira Macedo

Co-orientador: Fábio Santos de Souza

Recife-PE
2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

M963d Muniz, Vanessa Morais.
Desenvolvimento de micropartícula contendo clorexidina e timol / Vanessa Morais Muniz. – Recife: o autor, 2018.
139 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Rui Oliveira Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Inclui referências, figuras e tabelas.

1. Clorexidina. 2. Timol. 3. Insumo farmacêutico. I. Macedo, Rui Oliveira. (orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 136)

VANESSA MORAIS MUNIZ

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULA CONTENDO
CLOREXIDINA E TIMOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 28/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo (Orientador e Presidente da banca)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fábio dos Santos Souza (Co-orientador)
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos (Avaliador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ionaldo José Lima Diniz Basílio (Avaliador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

*Aos meus pais,
Joana e Tavares,
vocês são os melhores!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido estar onde estou e ter vivido tudo isso. Por ter me contemplado com a família, amigos que tenho! Agradeço pelas oportunidades maravilhosas que Ele colocou na minha vida, mesmo sem saber, era justamente este o caminho que eu tinha que seguir.

Agradeço aos meus pais, Joana e Tavares, por terem me auxiliado e me dado todo apoio, do emocional ao financeiro, desde sempre. Por serem presentes, mesmo estando a quilômetros de distância. Vocês são minha inspiração de vida! Quero um dia ter a garra, a vontade e a coragem de vocês. Obrigada por terem me ensinado a ter princípios e por me fazer tentar ser sempre uma pessoa melhor e que busca tudo o que tem vontade! Vocês são os melhores que eu poderia ter.

Ao meu irmão, Vinícius, por ser meu amigo e meu companheiro de todos os dias. À Pretinha, que também é como uma irmã para mim e que cuida de mim e do meu irmão com carinho. A Bia e a Edynha, por todos os anos de convivência. Sei que estas amizades nos sustentam e nos ajudam a dar cada passo. Vocês foram essenciais para que eu conseguisse chegar até aqui, perdoem qualquer estresse, tudo isso faz parte do aprendizado e também do convívio diário.

Ao meu namorado, Luís Eduardo, por sempre estar junto comigo, me apoiando e acreditando em mim. Obrigada pelo carinho e por sempre me mostrar que eu sou capaz de realizar coisas que eu não acredito que conseguiria. Continue acreditando em mim nos próximos momentos! Farei o mesmo por você.

Aos meus avós, aos que já estão no céu e a vovó Maria, por tanto amor. Nos dias de aperto por aqui, a comidinha gostosa fez falta, mas muitos momentos ainda virão! Aos meus tios, tias e primos, por estarem torcendo por mim, mesmo de longe. Sei que todos vocês vibram por mim, assim como vibro por vocês daqui também!

Aos meus amigos do EJC, em especial aos meus Yelloucos por Jesus e ao jota10 (bacuraus). São grupos de pessoas que sempre me levam para mais perto de Deus, em especial nos momentos que mais precisei.

Também aos amigos que estão sempre perto de alguma forma. Fernanda, Amanda, Ramon, Marquinhos, Kleber, Fernando, Laísa, André, Aratã, Jephesson, Bruno, Cleyton, Érika, Katherine, Ana Paula, Aline, Sara, Bebeke, Lukete. Muitos outros também estão no coração! Obrigada a todos os meus amigos que, de forma direta ou indireta, me ajudaram a chegar até aqui.

Aos meus colegas do LCQPF/UFPB pelos dias de trabalho, pelas noites viradas, por tirarem todas as minhas dúvidas e me auxiliarem no decorrer destes dois anos. Rayanne, Taynara, Fabrício, Ertha, Venâncio, Valmir, Glória espero ainda tomar muito café com vocês. Um agradecimento especial a Alessandra, que além de compartilhar assuntos de laboratório, também se tornou minha amiga. Aprendemos juntas no início das nossas pesquisas, com companheirismo nos divertimos muito. Nunca poderei retribuir toda a sua bondade e vontade de me ajudar! À Michelline, por todo apoio no LABIAL e disponibilidade de tempo, mesmo com uma vida tão corrida e cheia de responsabilidades. Espero poder te ajudar de volta também sempre que for preciso.

Ao professor Fábio Sampaio, pela confiança em me permitir trabalhar também no seu espaço. Obrigada por ser um professor tão querido e prestativo, espero que possamos trabalhar muito juntos no futuro!

Aos meus orientadores: Rui Oliveira, pelo seu tempo e pela oportunidade de ingressar no programa de mestrado, e Fábio Souza, que sempre me apoiou e me deu ideias para conseguir concluir o trabalho. Obrigada, professor Fábio, pela disponibilidade, pelo compromisso e pelo valor que o senhor dá a todos os seus alunos. Obrigada pela sua dedicação, esforço e cuidado com o trabalho de todos nós.

À minha banca, Beate e Ionaldo, por aceitarem o convite e se disponibilizarem a avaliar o meu trabalho com dedicação.

Aos professores e funcionários do PPGCF-UFPE. Em especial Nerilin e Rilvan. Obrigada por toda disponibilidade, ajuda e dedicação, para que tudo saia organizado, de forma ética, profissional e cheia de carinho.

Ao CAPES, pelo apoio financeiro durante estes dois anos que passaram. Quando vemos tudo pronto, a satisfação e a sensação de que tudo valeu a pena é muito grande!

Muito obrigada!

“E Maria disse:

*Minha alma glorifica ao Senhor, meu espírito
se alegra em Deus, meu Salvador, porque
olhou para sua pobre serva. [...] porque
realizou em mim maravilhas, aquele que é
poderoso e cujo nome é Santo. Sua misericórdia
se estende de geração em geração.”*

Magnificat

Lc 1, 46-48.49-50

RESUMO

MUNIZ, V.M. **Desenvolvimento de micropartícula contendo clorexidina e timol.** 2018. 137 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

Clorexidina (CLX) e timol apresentam elevada atividade antimicrobiana. Sua utilização é recorrente no tratamento de patologias bucais, pela capacidade em destruir biofilmes microbianos. A utilização conjunta desses insumos, visando sinergismo de ação é interessante, posto a crescente resistência microbiana. O aumento da estabilidade e liberação prolongada de fármacos, usando sistemas de liberação modificada, a exemplo de micropartículas (MP), também auxiliam neste contexto. Assim, objetivou-se desenvolver uma metodologia de obtenção de micropartículas contendo clorexidina e timol. As MP foram produzidas a partir de um planejamento fatorial 3^2 , utilizando diferentes excipientes e secagem por liofilização. Métodos de quantificação e extração dos ativos foram desenvolvidos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos, posteriormente validados segundo a RDC 166/2017. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada preparando-se misturas binárias de clorexidina, timol e excipientes utilizados na MP, a fim de investigar possíveis interações físicas. Estatisticamente foi observado que uma maior proporção de lauril sulfato de sódio e hidroxipropilmetilcelulose aumentam a eficiência de encapsulação. As curvas DSC apresentaram comportamentos térmicos característicos de substância amorfa para CLX e cristalina para o timol. A atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) *in vitro* foram investigadas utilizando a técnica de microdiluição em poços com *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A micropartícula apresentou CIM de 4,8 + 7,5, 4,2 + 6,56 e 4,2 + 6,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$, da associação de CLX + TIMOL na MP, CBM de 6,0 + 9,38, 6,0 + 9,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente para *S. mutans* e *S. aureus* e CFM de 4,2 + 6,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. albicans*.

Palavras-chave: Clorexidina. Timol. Insumo Farmacêutico.

ABSTRACT

MUNIZ, V.M. **Development of microparticles containing chlorhexidine and thymol.** 2018. 137f. Dissertation (master's degree). Federal University of Pernambuco, Recife, 2018.

Chlorhexidine (CLX) and thymol present high antimicrobial activity. Normally, they are used in the treatment of oral pathologies, by the ability to destroy microbial biofilms. The joint of these inputs, aiming for synergism effect is interesting, given the growing microbial resistance. Increased stability and sustained release of drugs using modified release systems, such as microparticles (MP), also assist in this context. Thus, the objective was to obtain a methodology for obtaining microparticles containing chlorhexidine and thymol. The MPs were produced from a 3^2 factorial design using different excipients and freeze drying. Methods of quantification and extraction of the assets were developed using high performance liquid chromatography, with diode array detector, later validated according to RDC 166/2017. Differential exploratory calorimetry (DSC) was performed by preparing binary mixtures of chlorhexidine, thymol and excipients used in the MP, in order to investigate possible physical interactions. Statistically it was observed that a higher proportion of sodium lauryl sulfate and hydroxypropylmethylcellulose increase the encapsulation efficiency. The DSC curves presented thermal behavior characteristic of amorphous substance for CLX and crystalline for thymol. The minimum antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal activity (MBC) in vitro were investigated using the microdilution technique in wells with *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The microparticle presented MICs of $4.8 + 7.5$, $4.2 + 6.56$ and $4.2 + 6.56 \mu\text{g mL}^{-1}$, the association of CLX + TIMOL in MP, CBM of $6.0 + 9.38$, $6.0 + 9.38 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectively for *S. mutans* and *S. aureus*, and CFM of $4.2 + 6.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *C. albicans*.

Keywords: Chlorhexidine. Thymol. Pharmaceutical Raw Material.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula estrutural da molécula clorexidina (C ₂₂ H ₁₀ C ₁₂ N ₁₀)	24
Figura 2 – Fórmula estrutural do timol	27
Figura 3 - Fases da formação de biofilme	31
Figura 4 - Ilustração comparando a concentração do medicamento convencional e de liberação controlada	33
Figura 5 - Ilustração dos tipos de micropartícula	35
Figura 6 - Fases da liofilização	38
Figura 7 - Diagrama de fase da água	39
Figura 8 - Reação de redução da resazurina (púrpura) em resarufina (róseo)	41
Figura 9 - Ilustração das principais partes de um CLAE	43
Figura 10 - Ilustração da placa de microdiluição em triplicata	63
Figura 11 - Interação de amins com grupos silanois livres na superfície da coluna C8	67
Figura 12 - Cromatogramas referentes à seletividade	74
Figura 13 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos ao meio ácido	78
Figura 14 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos ao meio básico	80
Figura 15 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos ao meio oxidativo	82
Figura 16 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos ao meio neutro	83
Figura 17 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos à luz e ao escuro	84
Figura 18 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos à alta temperatura	86
Figura 19 - Gráfico da linearidade da clorexidina	88
Figura 20 - Gráfico da linearidade do timol	89
Figura 21 - Gráfico da análise de resíduos da clorexidina	90
Figura 22 - Gráfico da análise de resíduos do timol	91
Figura 23 - Sequência de preparação da micropartícula	106
Figura 24 - Fotos da preparação da micropartícula	107
Figura 25 - Gráfico de superfície da clorexidina	108
Figura 26 - Gráfico de superfície do timol	110
Figura 27 - Curvas de DSC da CLX, T e MP	112
Figura 28 - Curvas DSC da CLX na forma livre, comparado com as curvas DSC dos excipientes e suas misturas binárias	115

Figura 29 - Curvas DSC do timol na forma livre, comparado com as curvas DSC dos excipientes e suas misturas binárias	117
Figura 30 - Primeira investigação da CIM	120
Figura 31 - Placas teste CIM	124
Figura 32 - Placas teste de CBM e CFM	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores (m/m) analisados do planejamento fatorai 3 ²	59
Tabela 2 - Combinações possíveis para o planejamento fatorai 3 ²	59
Tabela 3 - Volumes e substâncias utilizadas na preparação das placas teste	64
Tabela 4 - Dados do método desenvolvido	68
Tabela 5 - Excipientes e proporções testadas	72
Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos da solução padrão	73
Tabela 7 - Concentrações utilizadas na linearidade de clorexidina e timol	87
Tabela 8 - Áreas de pico da clorexidina	88
Tabela 9 - Áreas de pico do timol	88
Tabela 10 - Dados obtidos pelo parâmetro de linearidade da CLX e do timol	89
Tabela 11 - Teste de Normalidade para a clorexidina	91
Tabela 12 - Teste de Homocedasticidade - Brown Forsythe – clorexidina	91
Tabela 13 - Teste de Normalidade para o timol	92
Tabela 14 - Teste de Homocedasticidade - Brown Forsythe – timol	92
Tabela 15 - Valores da precisão 1 da clorexidina (M-P).....	93
Tabela 16 - Valores da precisão 2 da clorexidina (M-P).....	93
Tabela 17 - Valores da precisão interdía da clorexidina (M-P).....	94
Tabela 18 - Valores da precisão 1 do timol (M-P)	94
Tabela 19 - Valores da precisão 2 do timol (M-P)	94
Tabela 20 - Valores da precisão interdía do timol (M-P).....	95
Tabela 21 - Valores da precisão 1 da clorexidina (PD).....	96
Tabela 22 - Valores da precisão 2 da clorexidina (PD).....	96
Tabela 23 - Valores da precisão interdía da clorexidina (PD).....	96
Tabela 24 - Valores da precisão 1 do timol (PD)	97
Tabela 25 - Valores da precisão 2 do timol (PD)	97
Tabela 26 - Valores da precisão interdía do timol (PD).....	97
Tabela 27 - Valores de exatidão da clorexidina (M-P).....	98
Tabela 28 - Valores de exatidão do timol (M-P).....	98
Tabela 29 - Valores de exatidão da clorexidina (PD).....	99
Tabela 30 - Valores de exatidão do timol (PD).....	99
Tabela 31 - Valores de concentração da clorexidina na robustez (M-P).....	100

Tabela 32 - Valores de concentração do timol na robustez (M-P)	100
Tabela 33 - Valores de concentração da clorexidina na robustez (PD).....	100
Tabela 34 - Valores de concentração do timol na robustez (PD)	101
Tabela 35 - Ordem de preparação da micropartícula	106
Tabela 36 - Resultados da recuperação dos ativos nas micropartículas	107
Tabela 37 - Dados estatísticos obtidos do planejamento fatorial – CLX	108
Tabela 38 - Dados estatísticos obtidos do planejamento fatorial – timol	109
Tabela 39 - Eventos do DSC para CLX, T, para a mistura binária CLX:T e para os quatro excipientes na forma isolada	113
Tabela 40 - Eventos do DSC para CLX na forma isolada e em mistura com os excipientes	115
Tabela 41 - Eventos do DSC para timol na forma isolada e em mistura com os excipientes	118
Tabela 42 - Resultados dos controles	121
Tabela 43 - Valores de CIM baseados na quantidade de ativos da MP	123
Tabela 44 - Valores de CBM de <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i> , e valores de CFM de <i>C.</i> <i>albicans</i>	125

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLX	Clorexidina
CMC	Carboximetilcelulose
CV%	Coefficiente de Variação
C8	Coluna cromatográfica do tipo OCTIL
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EPS	Exopolissacarídeos
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
L	Litro
LD	Limite de Detecção
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LSS	Lauril Sulfado de Sódio
MD	Maltodextrina
M-P	Matéria-prima
MP	Micropartícula

PCB	Placebo
PD	Produto
PTFE	TEFLON
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
SE	Solução Estoque
T	Timol
<i>Tonset</i>	Temperatura inicial
<i>Tpico</i>	Temperatura do pico
UFC	Unidade Formadora de Colônias
M	Molar
m	Metro
mg, mL, mm	Miligrama, mililitro, milímetro
mmHg	Milímetros de mercúrio
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
v/v	Volume/volume
µg, µL, µm	Micrograma, microlitro, micrômetro
g	Gramma
J	Joule
Tg	Transição vítrea
°C	Graus Celsius
ΔH	Variação de entalpia
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3.1	CLOREXIDINA	24
3.2	TIMOL	26
3.3	SINERGISMO DE AÇÃO	29
3.4	BIOFILMES DE MICRORGANISMOS E PROBLEMAS ASSOCIADOS	30
3.5	MICROENCAPSULAÇÃO	33
3.6	TESTES MICROBIOLÓGICOS	40
3.7	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE/HPLC)	41
3.8	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	45
3.8.1	Seletividade	46
3.8.2	Linearidade	47
3.8.3	Limite de Detecção (LD) e Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	47
3.8.4	Exatidão	48
3.8.5	Precisão	48
3.8.6	Robustez	49
3.9	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	49

CAPÍTULO II

4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	LOCAL DA PESQUISA	53
4.2	REAGENTES E MATERIAIS	53
4.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	53
4.3.1	Equipamentos e Materiais	53

4.3.2	Condições Cromatográficas	54
4.3.3	Sistema de Eluição	54
4.3.4	Extração dos Ativos	54
4.3.5	Parâmetros de Validação	54
4.3.5.1	Seletividade	55
4.3.5.2	Seletividade – Condições de Estresse	55
4.3.5.3	Linearidade	56
4.3.5.4	Precisão	57
4.3.5.5	Precisão Intermediária	57
4.3.5.6	Limite de Detecção	57
4.3.5.7	Limite Inferior de Quantificação	57
4.3.5.8	Exatidão	58
4.3.5.9	Robustez	58
4.4	PLANEJAMENTO FATORIAL 3 ²	58
4.5	CONGELAMENTO	60
4.6	LIOFILIZAÇÃO	60
4.7	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	60
4.8	MICRODILUIÇÃO EM CALDO	60
4.8.1	Preparação dos Microrganismos e do Inóculo	61
4.8.2	Preparação dos Meios	61
4.8.3	Preparação das Soluções de Micropartícula (teste)	61
4.8.4	Preparação dos Controles Positivo e Negativo	62
4.8.5	Preparação das Placas para CIM	62
4.8.6	Preparação das Placas para CBM e CFM	64

CAPÍTULO III

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO I	66
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO EM CLAE-DAD	66
5.2	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	69
5.3	PREPARO DAS AMOSTRAS	71
5.3.1	Preparo das Soluções Estoque de Clorexidina e de Timol	71
5.3.2	Preparo da Solução Padrão de Clorexidina e de Timol	71
5.3.3	Preparo do Placebo (PCB)	71
5.3.4	Preparo do Placebo Contaminado	72

5.3.5	Preparo das Soluções para Injeção	72
5.3.6	Preparo da Solução Tampão	72
5.3.7	Preparo da Fase Móvel	73
5.4	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO	73
5.4.1	Seletividade	74
5.4.2	Seletividade - Amostras Submetidas a Situações de Estresse	78
5.4.3	Linearidade	87
5.4.3.1	Diagnóstico de Resíduos	90
5.4.4	Precisão	92
5.4.4.1	Precisão da Matéria-Prima (M-P)	92
5.4.4.2	Precisão do Produto (PD)	95
5.4.5	Exatidão	98
5.4.5.1	Exatidão da M-P	98
5.4.5.2	Exatidão do PD	99
5.4.6	Robustez	99
5.4.6.1	Robustez da M-P	99
5.4.6.2	Robustez do PD	100

CAPÍTULO IV

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO II	104
6.1	DESENVOLVIMENTO DA PREPARAÇÃO DA MICROPARTÍCULA	104
6.2	RECUPERAÇÃO DOS ATIVOS DA MICROPARTÍCULA POR CLAE-DAD	107
6.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA A CLOREXIDINA	108
6.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA O TIMOL	109
6.5	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	111

CAPÍTULO V

7	RESULTADOS E DISCUSSÃO III	120
7.1	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	120
7.2	CONCENTRAÇÕES BACTERICIDAS E FUNGICIDA MÍNIMAS (CBM E CFM)	124

CAPÍTULO VI

8	CONCLUSÕES	127
9	PERSPECTIVAS	128
	REFERÊNCIAS	129
	ANEXO A: Depósito do Pedido de Patente de Invenção Intitulado “Produto Antimicrobiano Composto de Micropartículas Contendo Clorhexidina e Timol e seu Uso”	139

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A clorexidina (CLX) é uma substância que possui uma acentuada atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, é bastante utilizada em ambientes hospitalares e consultórios odontológicos, por sua ação antisséptica de alto espectro (DE MOURA et al., 2012). O timol (T) é um terpeno encontrado de forma branda em diversas espécies de plantas. Assim como a clorexidina, ele também é explorado pela sua grande atividade contra bactérias e fungos, além de outras atividades relatadas na literatura (DE OLIVEIRA et al., 2017). Muitos patógenos bacterianos podem ainda sobreviver e desenvolver resistência quando expostos a um único fator antimicrobiano, então para tentar driblar esta situação, a aplicação de mais de um agente antimicrobiano pode ser uma alternativa, visto que diferentes agentes podem atuar por mecanismos diferentes no mesmo alvo e aumentar a intensidade de danos aos microrganismos (DOS REIS et al., 2011).

O avanço científico está sempre focado no desenvolvimento de soluções inovadoras. A tecnologia de sistemas de liberação controlada de fármacos vem sendo explorada há mais de 30 anos, o número de pesquisas relacionadas a este sistema vem aumentando cada vez mais. A microencapsulação é uma alternativa muito utilizada nas áreas farmacêutica, médica, agrícola e na indústria de alimentos. É uma tecnologia que aumenta a vida útil da substância de interesse, pelo aumento da sua estabilidade, e protegendo-a dos efeitos do meio, além de poder promover uma liberação controlada dos ativos em ambientes específicos, mascarar sabores ou odores, entre outras vantagens (MATTE; DA ROSA, 2013). Esta técnica envolve o empacotamento de substâncias ativas, sejam elas sólidas, líquidas ou gasosas com finos revestimentos poliméricos, formando pequenas partículas (DA SILVA et al., 2014).

As micropartículas podem ser microcápsulas, onde a substância está envolta pelo agente encapsulante; ou como microesferas, em que a substância ativa encontra-se dispersa em toda a matriz. As técnicas utilizadas também vêm crescendo à medida que novos agentes encapsulantes vão começando a ser explorados, e também pela necessidade, pois existem particularidades em relação à certas substâncias ativas (MARTINS, 2012). A liofilização é uma das técnicas mais utilizadas, mostrando-se eficiente para diversos tipos de substâncias, pois é capaz de proteger a estrutura do material e manter a sua atividade. O processo acontece utilizando-se baixas temperatura e umidade, tornando possível a secagem de preparações

contendo substâncias voláteis e diminuindo as chances de degradação química (DA ROSA et al., 2013).

O desenvolvimento de uma micropartícula contendo clorexidina e timol, em associação, visa uma preparação com um maior potencial de atividade antimicrobiana. O uso de substâncias com diferentes mecanismos, mas de mesma finalidade, traz a possibilidade de sinergismo da ação antimicrobiana. Esta atividade sinérgica, associada à utilização de sistemas de liberação controlada, potencializa ainda mais a ação dos insumos farmacêuticos ativos (IFA). Além disso, estas alternativas também possibilitam a diminuição de efeitos indesejados dos ativos. Trata-se, então, de uma nova alternativa, por exemplo, para profissionais da área de odontologia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um processo de obtenção de micropartículas contendo clorexidina e timol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar micropartículas contendo timol e clorexidina pela técnica de liofilização, com auxílio de um planejamento fatorial 3^2 ;
- Desenvolver um método simultâneo de identificação e quantificação dos ativos da micropartícula pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Validar o método de extração e quantificação dos ativos na micropartícula;

- Caracterizar as propriedades térmicas e avaliar o comportamento e a compatibilidade da mistura física dos componentes da formulação por meio da técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- Avaliar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo e, posteriormente, investigar as concentrações bactericidas e fungicidas mínimas (CBM e CFM).

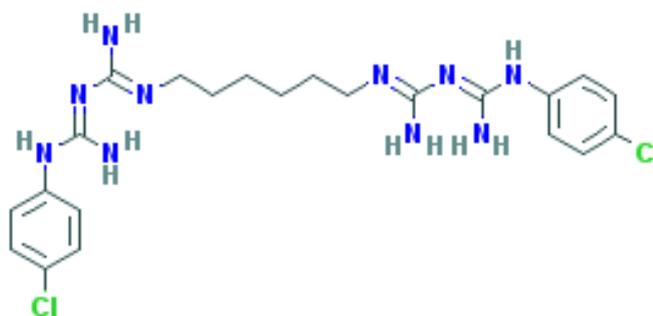
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CLOREXIDINA

A clorexidina é uma substância química muito utilizada por sua atividade antisséptica de alto espectro, como exemplo, em consultórios odontológicos. Ela causa um desequilíbrio osmótico nas bactérias, por ligação dos seus grupos catiônicos a grupos aniônicos presentes na parede celular bacteriana, causando um aumento da permeabilidade celular e consequente morte da bactéria (DE MOURA et al, 2012). Ela foi descoberta na década de 40, quando estavam fazendo uma ampla pesquisa sobre agentes ativos contra a malária. Somente foi introduzida no mercado em 1954 como antisséptico para ferimentos na pele. A sua ação é possível pela sua natureza dicatiônica, onde uma extremidade fica ligada à cavidade bucal e a outra tem a ação junto dos microrganismos (ZANATTA; RÖSING, 2007).

A clorexidina (Figura 1) é uma bisbiguanida (1,1-bis hexametilenos (5-p-Clorofenilbiguanida) di-D-Gluconato) e sua estrutura química consiste em uma cadeia de hexametileno hidrofóbico, que se liga a dois grupos catiônicos de clorofenilbiguanida. A fórmula molecular da clorexidina é $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ (peso molecular, 505 g/mol), mas ela é utilizada na forma de sal depois da reação com duas moléculas: ácido acético ou ácido glucônico, formando acetato e digluconato de clorexidina (CARRIJO-CARVALHO, 2016). O digluconato de clorexidina é efetivo contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, anaeróbias facultativas, aeróbias e leveduras (KIM et al., 2015).

Figura 1 - Fórmula estrutural da molécula clorexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$).



Fonte: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

A principal forma de apresentação da clorexidina é a líquida, em que os pacientes fazem o bochecho, mas em alguns casos, também é utilizada na forma de gel por profissionais dentistas (SOUZA, 2013). É uma substância que combate o aumento de placa bacteriana, também conhecida como biofilme bacteriano, e possíveis alterações na microbiota bucal, por isso é muito utilizada em pacientes com dificuldades de higienização, como o caso de usuários de aparelhos ortodônticos. Eficaz na supressão ou eliminação, por exemplo, de *Streptococcus mutans*, também é um antimicrobiano usado após cirurgias bucais ou periodontais, para evitar infecções (HERRERA et al., 2007). A clorexidina é estável, não é tóxica aos tecidos e é pouco absorvida pela pele e mucosas (ZANATTA; RÖSING, 2007). Apesar de ser bastante utilizada, uma das suas desvantagens é a possibilidade de manchar os dentes, um fator negativo principalmente por causa da estética bucal do paciente. Outra desvantagem é a possibilidade de alterações do paladar (LACHENMEIER, 2017). Também apresenta um sabor desagradável, descama a mucosa e pode causar reações alérgicas (KLUK et al, 2016).

Ainda em relação à área de odontologia, utiliza-se este insumo como enxaguatório bucal para pacientes entubados, prevenindo infecções, como pneumonia, causada pela entubação. Em pacientes conscientes, a concentração comercial de clorexidina é de 0,12% na preparação, já para pacientes inconscientes, a concentração sobe para 0,2% (KAMPF, 2016). Outra característica é a presença de substantividade, ou seja, após o bochecho, ainda permanece cerca de 30% da clorexidina na boca, adsorvida em glicoproteínas salivares (que são compostos aniônicos) em radicais do biofilme, na película bucal. Também em macromoléculas, que estão presentes na mucosa oral e na superfície do esmalte dental, sendo liberada de forma lenta num período de 12 horas. Então, tem uma ação imediata, mas também prolongada, e durante todo esse período ela é capaz de reduzir a quantidade de microrganismos na cavidade oral (ZANATTA; RÖSING, 2007; SOUZA, 2013).

Com a sua ação bactericida e bacteriostática, é capaz de evitar cáries e doenças periodontais. Em baixas concentrações, tem um poder bacteriostático, já em altas tem uma atividade bactericida. Como vai sendo liberada aos poucos, consegue manter o seu poder bacteriostático durante horas. O bochecho com solução de clorexidina ainda consegue diminuir a intensidade, dor e desconforto de mucosites orais, frequente em pacientes em quimioterapia por conta de leucemias agudas (KLUK et al., 2016).

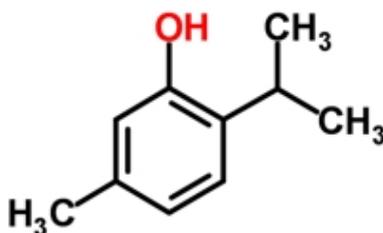
Além da área odontológica, a clorexidina também é utilizada na pele no intuito de profilaxia pré-operatória. Associada ao álcool em locais de punção de cateteres venosos centrais, ela reduz a chance de infecção sanguínea (KAMPF, 2016). Cai et al. (2017) realizaram uma revisão bibliográfica de trabalhos sobre pacientes que foram submetidos à cirurgia de artroplastia articular total, cirurgia esta serve para reduzir dores e melhorar a vida de pacientes que sofrem de artrose no joelho ou quadril. Foi feita uma comparação entre pessoas que utilizaram ou não o pano com clorexidina na pele antes da cirurgia. A revisão mostra que existe uma redução significativa da chance de infecção nos pacientes que fizeram uso do pano com o ativo no local da cirurgia.

Este IFA também é usado para assepsia de materiais de água, como mostra Pinheiro et al., (2012) em um trabalho que mostrou que a adição de 0,5% de clorexidina à unidade de reservatório de água ajudou significativamente no controle de contaminação microbiana em um consultório odontológico. Assim, é um ativo que pode ser utilizado como desinfetante hospitalar, odontológico e de cosméticos. Kampf (2016) nos traz a informação de que, em alguns países, ela também é utilizada em sabões líquidos (de 2 a 4%) para higienização das mãos em ambientes cirúrgicos. Outras preparações com álcool e 0,5% da clorexidina também são encontrados para desinfecção das mãos.

3.2 TIMOL

Metabólitos secundários são compostos bioativos extremamente comuns nas plantas, como exemplo, temos os compostos fenólicos. Os fenóis são substâncias que podem ser voláteis ou não. Dentre os compostos não voláteis temos os flavonoides, os ácidos fenóis, os taninos. E em relação aos compostos voláteis, podemos citar o timol. O timol (2-isopropil-5-metilfenol), representado na Figura 2, é o principal monoterpene encontrado nos óleos essenciais de espécies, como *Thymbra spicata*, *Thymus vulgaris*, *Thymus ciliates*, *Monarda fistulosa* (Lamiaceae), *Lippia sidoides* (Verbenaceae), *Nigella sativa* (Ranunculaceae) e *Trachyspermum ammi* (Apiaceae) (MARCHESE et al., 2016; JAFARI et al., 2017). O padrão do timol é apresentado na forma de um sólido cristalino branco (ZHU et al., 2015).

Figura 2 - Fórmula estrutural do timol.



Fonte: oleosessenciais.org

Este fenol possui múltiplas atividades biológicas, algumas delas são a antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, anti-mutagênica, analgésica, anticonvulsivante, antiepiléptica, anti-hemolítica, radioprotetora, hipocolesterolêmica, imunossupressora, cicatrizante e antioxidante (JAFARI et al., 2017; BELATO, 2018).

Uma das principais atividades do timol, presente em óleos essenciais de diversas plantas é a sua atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras. O seu mecanismo compreende na ruptura da membrana citoplasmática dos microrganismos, aumentando a permeabilidade celular, causando extravasamento do material celular e a desregulação da sua função (MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK; SIONKOWSKA, 2017; LI et al., 2017). É considerado um antimicrobiano de amplo espectro, atuando sobre espécies de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus plantarum*, *Candida spp*, vírus e protozoários. Outro efeito relatado é a inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus* e a prevenção contra cáries dentárias (BELATO et al., 2018).

Em um trabalho realizado por Belato et al. (2018), foi feito um teste com timol com microrganismos para avaliar a sua atividade antimicrobiana, foi demonstrado um poder significativo em diminuir culturas das espécies *S. mutans*, *S. aureus* e *C. albicans*. De oliveira et al. (2017) estudaram o extrato da planta *Thymus vulgaris*, composto especialmente por timol, o seu isômero carvacrol e outros constituintes. É relatada a diminuição de biofilmes de vários microrganismos, incluindo os citados no trabalho anterior, além de *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Também de biofilmes polimicrobianos composto por *C. albicans* com *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* ou *P. aeruginosa*. Nikolić et al. (2014) também realizaram testes antimicrobianos com óleos de três espécies do gênero *Thymus* para

tratamento de menores feridas, distúrbios da cavidade oral, bem como a higiene bucal, justificando o uso dos óleos para tais fins.

A *Lippia sodoides* também é uma espécie que tem o timol como componente principal de seus óleos essenciais. É uma planta que possui uma atividade antimicrobiana já comprovada. Alguns de seus óleos essenciais e extratos mostraram atividades biológicas contra vários fungos, bactérias e outros organismos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Corynebacterium xerose*, *Candida albicans*, *Trichophytum rubrum* e *Trichophytum interdigitale* (FERNANDES; CANDIDO; OLIVEIRA, 2012). Mostrou grande atividade anticariogênica, justamente por combater bactérias do gênero *Streptococcus* e leveduras, como a *C. albicans*, que são causadoras de cáries (DE SIQUEIRA et al., 2011). Num trabalho realizado por Albuquerque et al. (2013), *Lippia sidoides* inibiu a adesão do agente *Streptococcus mutans* à parede do tubo de vidro até à diluição de 1:16, seguido por *S. sanguinis* até 1:5, eles são microrganismos responsáveis por grande parte da microbiota oral e mostrou atividade similar à atividade da clorexidina.

Óleos essenciais das famílias citadas são largamente usados na indústria de alimentos como agentes aromatizantes e conservantes, graças as suas atividades antimicrobianas e antioxidantes. Além da indústria de alimentos, o timol também é usado em formulações comerciais pela sua ação repelente sobre os mosquitos. O uso do timol deve ser controlado, visto a sua citotoxicidade moderada apresentada em estudos *in vitro* com células humanas e animais, bem como *in vivo* em animais. Ele também demonstrou como principal componente da *Lippia gracilis*, atividades antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo* em testes de edema de pata, peritonite e número de contorções. Também em testes com a *L. gracilis*, encontrou-se uma atividade cicatrizante, pelo teste com filmes curativos à base de colágeno com óleos essenciais da planta, mostrando potencial de cura da ferida. Existem ainda pesquisas sobre atividades de anestesia local e hipotensão (MARCHESE, 2016).

O timol tem como desvantagens a baixa solubilidade em água, além de ter sabor e odor muito fortes. Levando isso em consideração, Nieddu et al. (2014) prepararam uma inclusão de timol em β -ciclodextrina. Os pesquisadores conseguiram, por meio desta inclusão, mascarar as propriedades organolépticas do óleo essencial, além de alcançarem um aumento da sua solubilidade, absorção e um maior tempo para eliminação. A meia-vida permaneceu longa, permitindo a possibilidade de um menor número de administrações diárias.

3.3 SINERGISMO DE AÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o número de bactérias resistentes aos medicamentos vem crescendo cada vez mais no decorrer dos anos (OMS, 2014). Até infecções menores podem se tornar mortais. Pela diversidade de microrganismos e a possível resistência deles a certos medicamentos, encontramos o uso de antibacterianos variados para poder contornar esta situação (SOKOLIK et al., 2017). Em relação aos biofilmes bacterianos e a grande resistência deles aos antimicrobianos usuais, surgiu uma nova estratégia que é a combinação de moléculas nem tão usuais com antimicrobianos já existentes. O objetivo desta mistura é a potencialização dos efeitos antimicrobianos (ZACCHINO et al., 2017).

Algumas formulações de enxaguatórios bucais apresentam a mistura de alguns ativos, como a clorexidina, timol, triclosan, tirotricina, entre outros. A clorexidina é a solução mais utilizada e mais estudada na área de odontologia, visto que é um antimicrobiano extremamente eficaz. No entanto, há também novos estudos relacionados a compostos naturais, que mostram a capacidade que alguns deles têm de diminuir a quantidade de microrganismos da cavidade oral. Destes compostos, estão em destaque os óleos essenciais, como timol, mentol, eucaliptol e metilsalicilato. O uso dessas substâncias mostra um bom efeito no controle de biofilmes e proteção contra microrganismos (KLUK, 2016).

Alguns produtos, como vernizes bucais, fazem uso da clorexidina e timol em associação. Brailsford et al. (2003) fizeram um estudo com idosos, onde a pesquisa foi realizada por meio de uma comparação entre dois grupos: o grupo que utilizou verniz de flúor em combinação com verniz de clorexidina-timol, o outro grupo que fez uso de verniz de flúor com verniz placebo. A utilização dessa associação no grupo teste, que utilizou também o verniz de clorexidina-timol, mostrou que não houve uma evolução significativa das lesões, que são causadas por cáries radiculares, durante o tempo de tratamento.

Baca et al. (2009) fizeram testes de um produto já existente no mercado, cujos princípios ativos são clorexidina e timol. O produto consiste em um verniz bucal de aplicação local, que protege raízes expostas, evitando o aparecimento de cáries e outras doenças. O estudo foi feito com idosos para avaliar o progresso das lesões de cáries radiculares existentes, bem como a incidência de novas. O produto foi usado como complemento de práticas de higiene bucal. O grupo de idosos que utilizou o produto apresentou uma significativa melhora das lesões já existentes e uma diminuição do aparecimento de novas lesões, quando comparado com o grupo placebo. Anand et al. (2012) também realizaram um trabalho

testando o mesmo produto com pacientes que sofriam de periodontite. O produto também se mostrou adequado no controle de infecção subgengival, ele foi utilizado de forma complementar aos procedimentos do tratamento de periodontite.

3.4 BIOFILMES DE MICRORGANISMOS E PROBLEMAS ASSOCIADOS

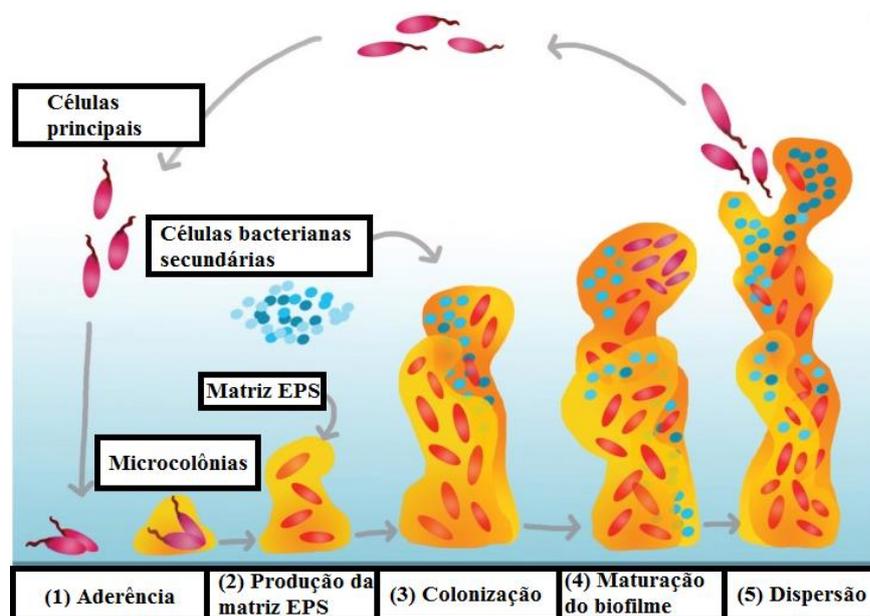
Os microrganismos possuem vários mecanismos que têm por intuito viabilizar a sua sobrevivência e crescimento, inclusive em condições de estresse. Um exemplo desses mecanismos é a formação de biofilmes em superfícies vivas ou dispositivos médicos (próteses dentárias, lentes de contato, válvulas, cateteres etc), onde habitam e crescem. Biofilmes são estruturas altamente organizadas, podendo ser formados por espécies de diferentes gêneros. Eles formam tapetes densos, que se ligam às superfícies, onde os microrganismos ficam incluídos em uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), EPS estes que são produzidos por eles mesmos. Componentes como proteínas, DNA, íons e, principalmente, água também compõe a matriz. Esta matriz funciona como uma barreira contra fármacos e fornece uma estrutura protetora para essas bactérias e fungos. Alguns microrganismos como, por exemplo, o *Staphylococcus aureus*, são até 1000 vezes mais resistentes a antibióticos quando no biofilme, comparado a sua forma planctônica (NIKOLIĆ et al., 2014; KUMAR et al, 2017).

Existem vários benefícios para os microrganismos que estão em uma população no biofilme: proteção contra o meio, resistência ao estresse químico e físico, cooperação metabólica, entre outros. Este desempenha um papel de fonte persistente de infecções nos hospedeiros, especialmente em pacientes com a imunidade comprometida (RAMAGE et al., 2012). Os biofilmes também são caracterizados por possuir uma grande resistência a antimicrobianos, explicado pelo fato da existência de células persistentes, protegidas pelo EPS, que não são susceptíveis à ação dessas substâncias e ao sistema imunológico. Assim, quando a concentração dos antimicrobianos passa a diminuir, estas células passam a repovoar o biofilme. A persistência dele pode causar doenças, como otite média, periodontite, endocardite, entre outras (NIKOLIĆ et al., 2014).

A formação dos biofilmes está demonstrada em cinco estágios na Figura 3. (1) Ligação inicial das células microbianas na superfície bucal – reversível. Esta ligação ocorre por meio de apêndices, como flagelos e pili, e também por ligações químicas, como forças de Van der Waals e interações eletrostáticas. (2) A matriz EPS é produzida, formando uma

estrutura fortemente aderida. (3) A arquitetura inicial do biofilme é desenvolvida, com a colonização de células secundárias. Essas microcolônias passam a viver em comunidade, elas trocam substratos, distribuem metabólitos importantes e também excretam produtos metabólicos finais, que são utilizados por microrganismos diferentes da mesma comunidade. (4) O biofilme atinge a maturação, as células passam a se comunicar umas com as outras por sinais chamados de auto indutores - etapa irreversível. São também formados espaços chamados de vazios intersticiais, formados por água, responsável pela circulação dos nutrientes e remoção de resíduos. (5) Nesta etapa, as células do biofilme estão em intensa multiplicação, então passa a acontecer a dispersão de algumas células, que mudam da forma sésil para a forma móvel, estresse mecânico também pode levar a isso. Durante o destacamento das células, os microrganismos passam a produzir enzimas sacarolíticas, que ajudam a liberar a superfície da matriz para uma nova área de colonização (JAMAL et al., 2018).

Figura 3 - Fases da formação de biofilme.



Fonte: TREMBLAY; HATHROUBI; JACQUES, 2014 – adaptada.

O acúmulo de biofilme nos dentes pode gerar a formação de cáries, causada especialmente pelo *Streptococcus mutans*, que apresenta uma forte adesão ao dente. A diminuição deste tipo de microrganismo na cavidade oral pode contribuir para um menor

índice no surgimento desta doença, que afeta cerca de 91% da população adulta ocidental (SZAFRAŃSKI; WINKEL; STIESCH, 2017). A formação da cárie se dá por conta do metabolismo do microrganismo no esmalte do dente, onde acontece a desmineralização do esmalte e a degradação da dentina. Este processo pode evoluir na perda total do dente, quando a doença não é tratada (SOARES et al., 2012).

Os dentes possuem uma camada de glicoproteínas salivares, conhecida como película adquirida e que existe normalmente. No entanto, é por meio desta película que acontece a ligação do EPS e a formação do biofilme no dente. A película possui uma forte aderência ao dente, permanece ligada mesmo com os movimentos de mastigação e fluxo salivar (BARBIERI, 2014). Em relação à prótese dentária, os biofilmes podem colonizar facilmente. A microbiota presente nas próteses removíveis é semelhante à microbiota encontrada nos dentes. A resina acrílica gera uma carga positiva, fazendo com que as glicoproteínas salivares, com carga negativa, tenham uma boa aderência, gerando uma estrutura parecida com a da película adquirida presente no dente. A partir disso, a colonização dos microrganismos se torna ideal, tornando a prótese uma fonte de infecção. A superfície porosa e irregular beneficia a incorporação do biofilme (BERGAMO et al., 2018).

A *Candida albicans* vive comensalmente na cavidade oral humana, é o fungo mais presente no local. Porém pode trazer grandes malefícios, principalmente em pacientes imunossuprimidos, com câncer, que passaram por processo de transplante ou que ficaram hospitalizados durante um longo período. Na cavidade bucal, pode ser responsável por candidíase orofaríngea, e também por outras doenças, como estomatite em pacientes que utilizam prótese. As infecções por *C. albicans* vêm aumentando nos últimos anos, além das candidíases superficiais e sistêmicas. Ela é capaz de formar um biofilme resistente às defesas do hospedeiro e a certos antimicrobianos (NIKOLIĆ et al., 2014; BELATO et al., 2018).

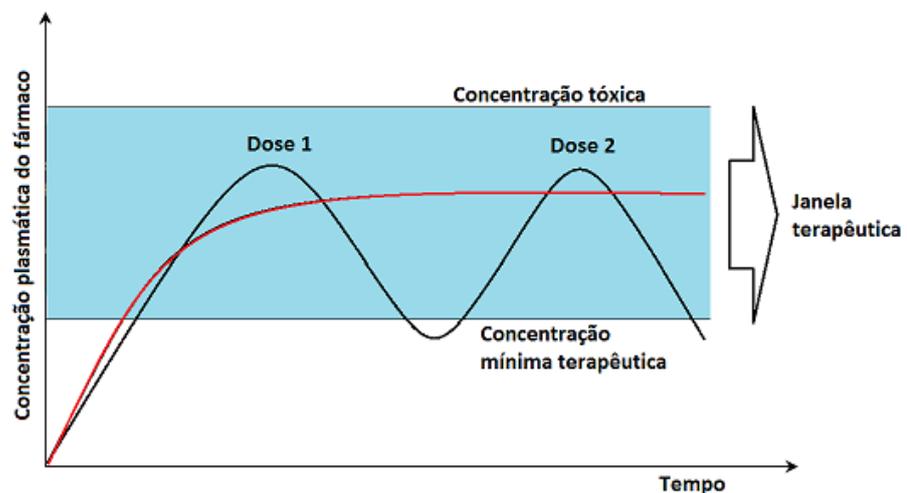
Staphylococcus aureus está ligado a casos de periodontite, biofilmes na gengiva e infecções causadas pelo uso de implantes. Além das infecções causadas pelo *S. aureus*, em especial no âmbito hospitalar, ele também é capaz de produzir toxinas e causar intoxicações alimentares (BELATO et al., 2018). Dentre os problemas mais graves estão a osteomielite, endocardite, pneumonia e septicemia. Os biofilmes de *C. albicans* e de *S. aureus* podem se unir e formar um biofilme heterotípico. Os biofilmes de *C. albicans* também ajudam no desenvolvimento de biofilmes de *S. mutans*, fazendo uma associação direta e produzindo cáries (NIKOLIĆ et al., 2014). Existe uma necessidade atual de medicamentos e terapias

capazes de superar a resistência adquirida pelos microrganismos, especialmente no tratamento de doenças que envolvem a presença dos biofilmes (BORGHI et al., 2015).

3.5 MICROENCAPSULAÇÃO

O avanço científico traz sempre soluções cada vez mais inovadoras, um exemplo disso são os sistemas de liberação controlada. A incorporação de substâncias incluídas a estes sistemas vem sendo utilizada cada vez mais, devido as suas variadas vantagens. Como adaptação ao perfil de liberação desejado e, dependendo da situação, também permite a liberação do fármaco em locais específicos do organismo (MONTEIRO et al., 2015). O principal objetivo deste tipo de sistema é prolongar o tempo de contato dos fármacos no local de ação ou absorção, por causa da liberação mais lenta. Isto pode trazer como benefício um aumento da eficiência terapêutica, por meio da redução da dose e da frequência de administração, quando comparado a fármacos tradicionais, como ilustra a Figura 4 (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

Figura 4 - Ilustração comparando a concentração do medicamento convencional (preto), mostrando a concentração plasmática em duas doses, com a concentração do medicamento de liberação controlada (vermelho).



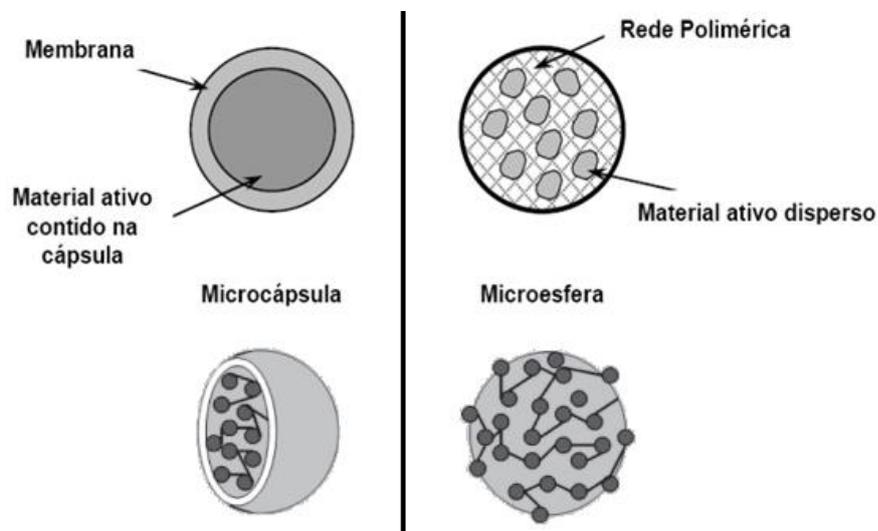
Fonte: elaborada pela autora.

A técnica de microencapsulação corresponde ao revestimento de partículas ou gotículas, que permite a liberação do seu conteúdo de forma controlada e/ou também sob condições específicas (ETCHEPARE et al., 2015). Elas também podem ter a função de separar materiais reativos, diminuir a toxicidade de algum composto ativo, mascarar odor ou sabor de certas substâncias, reduzir a volatilidade de líquidos, estender o prazo de validade, controlar a liberação do ativo, fazendo com que ele seja liberado de forma gradual e/ou com afinidade por um local específico do organismo. Além disso, são capazes de proteger a substância ativa contra agentes que podem diminuir a sua estabilidade, como umidade, luz e calor (DE MENEZES et al., 2013; NIEDDU, 2014).

Existem metodologias para a preparação de microssistemas, que podem envolver micropartículas, emulsões múltiplas e microemulsões. As micropartículas podem ainda ser de dois tipos: microcápsulas ou microesferas (Figura 5), a depender de como está o arranjo entre fármaco e agente encapsulante (PIMENTEL et al., 2007). A sua forma diferencia dependendo dos materiais e do método utilizados. A microcápsula é composta por duas partes: núcleo, que é onde se encontra o ativo; e a parede, também chamada de membrana ou cápsula, que envolve e protege o material do núcleo, formada pelo polímero encapsulante (MARTINS, 2012). As cápsulas podem ser classificadas em macrocápsulas ($> 5.000 \mu\text{m}$), microcápsulas ($0,2$ a $5.000 \mu\text{m}$) e nanocápsulas ($< 0,2 \mu\text{m}$). Elas podem ser mononucleares ou polinucleares, dependendo se têm um ou mais núcleos da substância ativa, respectivamente. Já as microesferas são sistemas matriciais, em que o agente ativo está disperso (homogêneo) e/ou dissolvido (heterogêneo) numa rede de polímeros (DA SILVA et al., 2014).

Os mecanismos de liberação dos compostos ativos são divididos em duas categorias: mecanismos químicos e mecanismos físicos. O primeiro deles inclui degradação enzimática, formação ou quebra de ligações entre o composto e o ambiente externo ou a matriz. O segundo aborda difusão do ativo para o meio externo, dissolução da matriz, pressão osmótica ou permuta iônica. Alguns fatores são responsáveis pela forma de liberação, tais como o caráter químico do ativo e do material que o envolve e o tipo de rede polimérica que é formada (ROGOBETE; DRAGOMIRESCU; BEDREAG, 2016). A utilização de solvente, mudança de pH, temperatura e pressão também são fatores que afetam a liberação. Geralmente, faz-se uso de uma combinação de fatores. A difusão, por exemplo, ocorre quando a parede da microcápsula está intacta e, assim, a velocidade de liberação do ativo é regulada pelas propriedades químicas do núcleo e do agente encapsulante, de acordo com o meio (DA SILVA et al., 2014).

Figura 5 - Ilustração dos tipos de micropartícula.



Fonte: MATTÉ, DA ROSA, 2013; PIMENTEL et al., 2007 - adaptado.

Uma das vantagens da microencapsulação é a diminuição do uso de aditivos, no caso de alimentos, e de muitos excipientes, no caso de medicamentos. Uma desvantagem que pode ocorrer é a interação entre o núcleo e a membrana encapsulante. O tamanho da partícula contida no núcleo e o grau de viscosidade do agente encapsulante também podem interferir na liberação do material do núcleo (MARTINS, 2012).

O material encapsulante geralmente é semipermeável, esférico e envolto de uma membrana resistente, que se desfaz com um estímulo específico. Estes materiais são preparados para resistir às condições ácidas do estômago, por exemplo, e, assim, serem absorvidos de forma intacta (DE MENEZES et al., 2013; DA SILVA et al., 2015). A escolha correta do agente encapsulante determina a estabilidade e a eficiência da microencapsulação, e deve ser feita com base na aplicação final do produto. Não pode reagir com o material do núcleo, deve selar e manter o ativo dentro da cápsula e proteger o núcleo de eventos externos e esconder o sabor ou odor da substância encapsulada. Somente deve romper quando chegar ao ambiente desejado. Uma prática comum é, se necessário, unir mais de um tipo de agente para conseguir as características desejadas (DA SILVA et al., 2014; FERNANDES; CANDIDO; OLIVEIRA, 2012).

Diferentes polímeros podem ser utilizados, de modo que haja uma liberação controlada do material nuclear (CANO-HIGUITA et al., 2015). Pode-se fazer a mistura de

dois ou mais materiais sintéticos ou naturais. Alguns materiais encapsulantes são: amido, celulose, maltodextrina (MD), ciclodextrinas, quitosana, alginato, lipídios (cera, parafina, mono e diglicerídeos), óleos hidrogenados, gorduras, materiais inorgânicos (sulfato de cálcio e silicatos), proteínas (glúten, caseína, gelatina e albumina), polivinilpirrolidona (PVP), a hidroxipropilcelulose (HPC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose de sódio (NaCMC), entre outros (DA SILVA et al., 2014; CANO-HIGUITA et al., 2015; MARASINI et al., 2013; FERNANDES; CANDIDO; OLIVEIRA, 2012; MATTÉ; DA ROSA, 2013; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A MD foi utilizada como agente encapsulante, sendo um polissacarídeo altamente solúvel em água e de baixa viscosidade. É o principal material utilizado como parede na microencapsulação, pelo seu baixo custo e alta eficiência. Pode ser utilizada de forma individual ou em associação com outros agentes de mesma finalidade (MAHDAVI et al., 2016; NEGRÃO-MURAKAMI et al., 2016; TUPUNA et al., 2018). Possui sabor e aroma neutros, que atua como uma proteção efetiva em relação às propriedades organolépticas dos ativos (BALLESTEROS et al., 2017).

O HPMC é um polímero derivado da celulose, extremamente explorado na produção de produtos farmacêuticos e alimentos. É utilizado também como agente encapsulante, no intuito de prolongar a liberação de substâncias pela formação de um sistema matricial (RUIZ-HENESTROSA et al., 2017; PHADTARE et al., 2014). É um material hidrofílico, inerte, também bastante utilizado na preparação de formas farmacêuticas, como cápsulas, por possuir menos problemas de incompatibilidade entre excipientes (BARHAM; TEWES; MARIE, 2015). Alguns estudos demonstraram que o HPMC é muito usado para substâncias solúveis em água. O seu mecanismo de liberação envolve a sua rápida hidratação, quando em contato com a água. Este agente é um éter de celulose, não iônico e, por ser uma substância de baixo custo, pode ser usado em formulações orais, tem boa aplicabilidade para vários fármacos e é de simples fabricação (SAEIDIPOUR et al., 2017).

Muitos métodos têm sido propostos para a produção das microcápsulas (MARTINS, 2012). As técnicas usadas para a microencapsulação podem ser divididas em: métodos químicos, métodos físicos e físico-químicos. Os métodos físicos são: liofilização (sublimação), *Spray drying* (secagem em atomização); *Spray chilling* (nebulização em corrente ar frio) e *Spray cooling*; os químicos: inclusão molecular e polimerização interfacial; e os físico-químicos: coacervação e separação de fase orgânica em formação de lipossomas

(MATTÉ; DA ROSA, 2013). Dependendo das características da substância do núcleo a ser encapsulado, a técnica escolhida pode diferir (MARTINS, 2012).

A liofilização é uma técnica de secagem usada desde 1906, mas que era utilizada apenas em laboratório até a segunda guerra mundial. Nesta época, ela foi necessária para preservar o plasma de soldados quando a demanda se tornou maior. Hoje em dia, ela é utilizada por indústrias farmacêuticas e de alimentos para preservar materiais na forma seca. Ela é extremamente utilizada para impedir que reações químicas afetem os produtos, o que aconteceria na presença de água ou umidade, aumentando a estabilidade do produto (MORAIS et al., 2016).

Esta técnica tem como princípio o fenômeno físico da sublimação do solvente sob vácuo, que antes passa por um processo de congelamento. É uma forma eficaz para secar materiais sem prejudicar a estrutura do material (ANNIE et al., 2016).

Preparações que necessitam de muita água podem ter grandes desvantagens, como a redução da estabilidade do produto final, maior chance de contaminação por agentes microbianos, hidrólise de certas substâncias. Tudo isso promove uma diminuição do efeito terapêutico no final da preparação, mas a liofilização é uma técnica que supera estas desvantagens, que estão presentes em outras técnicas de secagem. Na liofilização é necessária uma menor quantidade de solvente, que na maioria das vezes é a água, ainda mais porque o uso de solventes orgânicos traz um grau de toxicidade para os produtos. Outra vantagem da liofilização é a temperatura utilizada no processo, sempre muito baixa. Isto permite que substâncias voláteis sejam liofilizadas com uma menor volatilização do seu conteúdo e perda mínima no processo. Uma desvantagem é que, a depender do tipo de material, a secagem pode requerer muito tempo (MORAIS et al., 2016).

O equipamento consiste em uma câmara de secagem, aquecedor, bomba de vácuo e condensador. A câmara de secagem é um local fechado hermeticamente, onde ficam as amostras, o aquecedor fornece o calor necessário para estas amostras, a bomba de vácuo fornece as baixas pressões e o condensador impede que a água que evapora chegue na bomba de vácuo. O processo resulta em um material final com estrutura porosa, que pode ser reconstituído facilmente com a adição de água (BANDO et al., 2017).

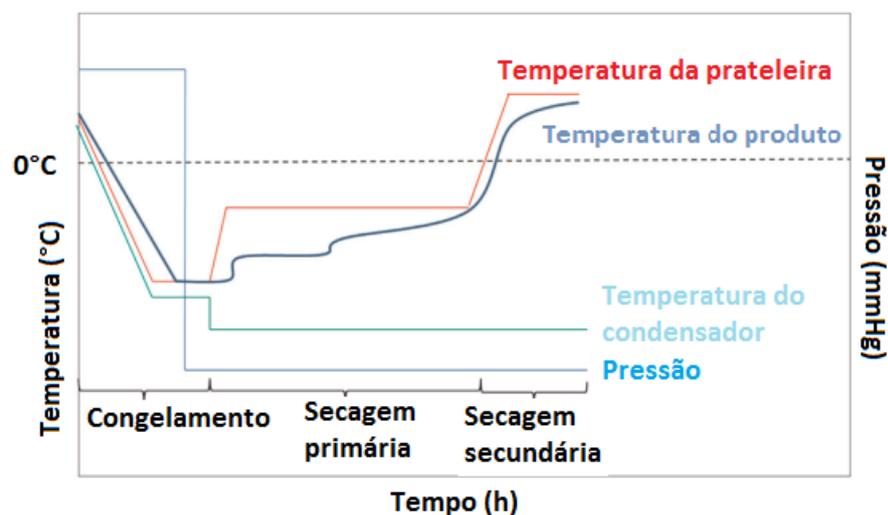
A técnica de liofilização é dividida em três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A primeira etapa consiste em congelar o material para que todos os

componentes líquidos congelem e formem cristais de gelo. É uma etapa fundamental, pois determina a formação, o tamanho e a conexão entre os poros, que determinam a troca de calor. A formação dos cristais de gelo também vai influenciar no aspecto e consistência do produto final. Quando a estrutura dos cristais de gelo é pequena e descontínua, acontece uma limitação da transferência do vapor d'água para a camada seca. Um congelamento rápido é interessante, porque permite uma distribuição uniforme dos cristais de gelo e uma maior rapidez e eficiência de secagem (BOSS, 2004; MORAIS et al., 2016).

No segundo estágio, acontece a sublimação dos cristais de gelo por aplicação de baixa temperatura e pressão. A pressão sobre o material é constantemente reduzida e o calor é aplicado lentamente, de forma a manter a capacidade de sublimação, para que o gelo se torne vapor de água (~90%). A temperatura fica em torno de -10°C e a pressão em torno de 2 mmHg. À medida que o gelo sublima, vão sendo formados poros no interior do produto. O vapor de água vai em direção à câmara de secagem. A terceira fase é importante para retirar a água que ainda está presente de forma ligada (10-35%), a temperatura fica entre -20 e -50°C , com pressão ainda mantida baixa. Esta técnica remove a água aplicando temperaturas e pressões abaixo do ponto triplo (T) (BOSS, 2004; MORAIS et al., 2016.).

A Figura 6 mostra as fases da liofilização, expressando temperatura e pressão em cada etapa, bem como as temperaturas do produto, da prateleira e do condensador.

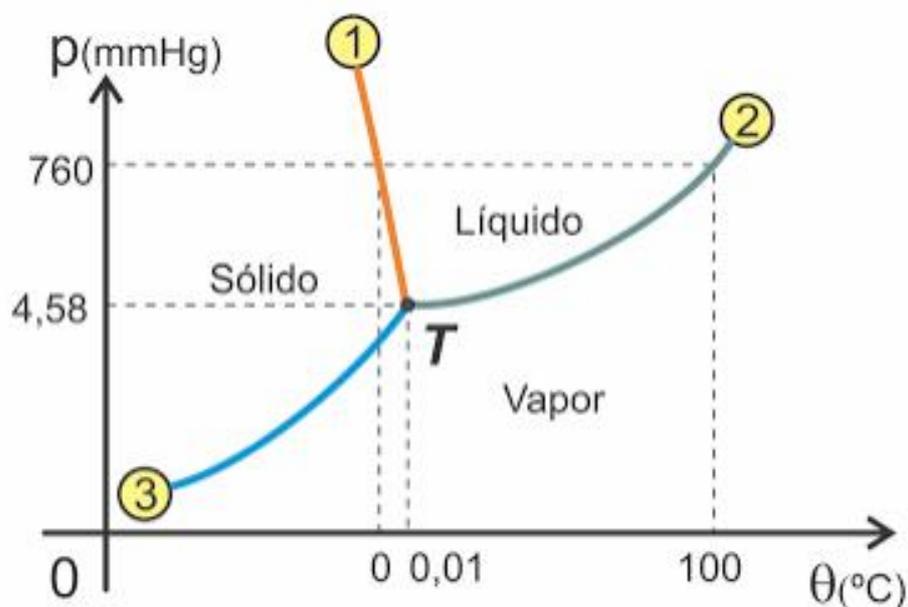
Figura 6 - Fases da liofilização



Fonte: MORAIS et al., 2016 – adaptado.

O ponto triplo é o ponto onde há a coexistência da água (Figura 7) nas 3 fases: sólida, líquida e gasosa. A rigidez obtida no congelamento é importante para evitar colapsos do produto durante o processamento (BOSS, 2004).

Figura 7 - Diagrama de fase da água



Fonte: osfundamentosdafisica.blogspot.

Os pontos (1) curva de fusão, equilíbrio entre fase sólida e líquida. (2) curva de vaporização, equilíbrio entre os estados líquido e gasoso. (3) curva de sublimação, equilíbrio entre fases sólida e gasosa. (T) ponto triplo, equilíbrio entre as três fases.

O tipo de secagem e o material usado como revestimento geralmente afetam a capacidade de retenção dos ativos no interior da matriz. Por isso, a seleção do material de revestimento e a técnica de secagem são de extrema importância para maximizar a incorporação e retenção dos ativos dentro da matriz de encapsulamento (BALLESTEROS et al., 2017).

3.6 TESTES MICROBIOLÓGICOS

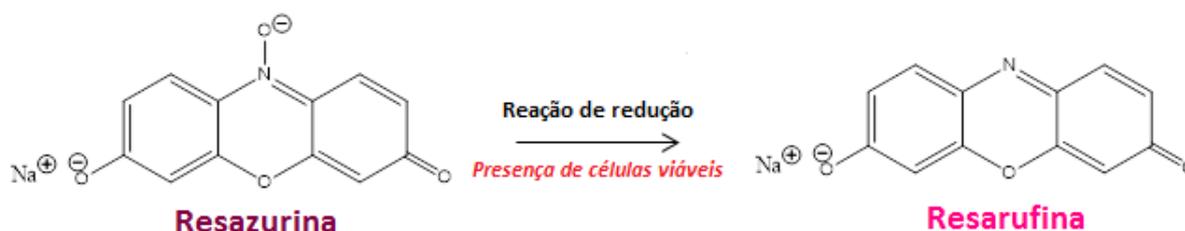
Em preparações onde se utilizam agentes antimicrobianos, são necessários ensaios microbiológicos, que mostram a capacidade antimicrobiana das substâncias frente a microrganismos. A técnica de microdiluição, que pode ser em caldo ou em ágar, é utilizada para a investigação das concentrações inibitórias (CIM), bactericidas (CBM) e fungicidas mínimas (CFM) das substâncias em relação aos microrganismos. Esta técnica foi desenvolvida por Ellof em 1998 e tem diversas vantagens, como: mais sensível do que a maioria das técnicas, precisam de uma pequena quantidade de amostra, pode ser usada para um grande número de amostras e é barata. É considerada a técnica mais adequada para este tipo de investigação (OSTROSKY et al., 2008).

Para a microdiluição em caldo, são utilizadas placas de 96 poços, com 12 colunas (1-12) e 8 linhas (A-H). Devem ser determinados um controle positivo e um negativo, bem como escolher concentrações dos ativos de forma decrescente. A incubação acontece geralmente numa temperatura de 37°C, durante o tempo que for necessário para cada microrganismo. Corantes são utilizados para acusar o crescimento ou não dos microrganismos nos poços (SANTOS, 2012).

A resazurina, indicador de reação, é muito utilizada. Após a adição deste indicador, os poços ficam com seu conteúdo na cor rósea, ou permanecem na cor púrpura, que é a cor deste indicador antes da reação. Quando o poço apresenta uma solução de coloração rósea, indica que houve a redução da resazurina em resarufina, que acontece na presença de células vivas (KUMAR et al. 2, 2017).

A reação está apresentada na Figura 8. A menor concentração de um agente antimicrobiano que impede a aparência de crescimento visível de um microrganismo dentro de um período de tempo definido e, em condições *in vitro* definidas, é conhecida como CIM (PALOMBO, 2011).

Figura 8 - Reação de redução da resazurina (púrpura) em resarufina (róseo).



Os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* são responsáveis pelo desenvolvimento de diversas infecções, por isso possuem relevância na área da saúde e pesquisa (FREIRE et al., 2014). O biofilme formado por *C. albicans* é de interesse clínico, visto que são muito resistentes à ação de antifúngicos existentes e às defesas do hospedeiro (BELATO et al., 2018). Os três, de interesse clínico, foram investigados neste trabalho.

3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE/HPLC)

Dentro do controle de qualidade, algumas técnicas são utilizadas para auxiliar nas etapas de pesquisa de medicamentos, como neste caso, na quantificação de ativos em uma matriz. A cromatografia líquida de alta eficiência, em especial a cromatografia em fase reversa, é uma técnica usada frequentemente na indústria farmacêutica. É a principal técnica de análise nas etapas de desenvolvimento de medicamentos (GALEA; MANGELINGS; HEYDEN, 2015). E com a crescente adoção de novas técnicas, instrumentação avançada, variedade de colunas, ela mostra que continuará dominando o campo farmacêutico. Este é um equipamento que nos permite uma aplicação simplificada, pela gama de instrumentação, softwares modernos, além dos muitos métodos conhecidos. O CLAE está inserido desde as investigações iniciais até as etapas dos processos de liberação do produto final (MATTREY et al., 2017).

A separação por CLAE é baseada nas diferentes afinidades das substâncias químicas com o material da coluna e/ou da fase móvel. Essas diferentes afinidades fazem com que os componentes passem pela coluna com velocidades diferentes. A separação também depende de alguns fatores, como a polaridade, pH, composição e fluxo da fase móvel, tipo e natureza

da fase estacionária, temperatura e tipo de detector. O método vai compreender um conjunto de características que permitem a análise de substâncias (SAHU, 2017).

A fase móvel, também chamada de eluente, fica acondicionada em um recipiente e é impulsionada por meio da pressão empregada pela (s) bomba (s). O eluente passa pela válvula de injeção da amostra, levando consigo o material injetado em direção à coluna cromatográfica (fase estacionária), dando início à separação. O que eflui da coluna passa pelo detector, que acusa a presença do analito. O sinal gerado será captado pelo software do computador, gerando o cromatograma, que traz como informação a intensidade do pico e o seu tempo de retenção (LANÇAS, 2009).

Os componentes básicos de um CLAE incluem: (1) recipientes que acondicionam os solventes (fase móvel), (2) um sistema de bombeamento de alta pressão, (3) um injetor, que pode ser manual ou automático, (4) um suporte de coluna com um forno, para regular a temperatura, (5) a coluna cromatográfica, (6) um ou mais detectores e (7) a unidade de processamento dos dados, como ilustrado na Figura 9. As bombas geram uma alta pressão na fase móvel, para que ela supere a resistência ao material da coluna cromatográfica, possibilitando a passagem. O fluxo varia de 0,1 a 10 mL min⁻¹, dependendo da bomba. Os sistemas de injeção atuais são capazes de injetar entre 1 e 100 µL de amostra, mas o recomendado é até 25 µL, porque em alguns casos, acima disso pode afetar a forma do pico cromatográfico (MOLDOVEANU; DAVID., 2017).

A fase móvel constitui um solvente ou uma mistura de solventes relativamente polares (para colunas de fase reversa), como água, metanol, acetonitrila ou tetraidrofurano. Ela deve ser filtrada e degaseificada antes de ser usada no equipamento. Um filtro adicional também é adicionado na mangueira de entrada da fase móvel, evitando a entrada de possíveis impurezas e precipitados da fase. A eluição pode ser do tipo isocrática, em que durante todo o tempo de corrida não há variação do tipo de fase móvel, já o tipo gradiente, implica na mudança da fase móvel no decorrer da corrida, de acordo com o objetivo da análise (LACOURSE, 2017).

Figura 9 - Ilustração das principais partes de um CLAE.



Fonte: LANÇAS, 2009 - adaptado.

A coluna cromatográfica é um tubo, geralmente feita de metal (aço inoxidável), o diâmetro interno de colunas para CLAE varia de 2 a 10 mm, e o comprimento varia de 50 a 250 mm. Ela pode ser recheada por partículas grandes ou pequenas ligadas, um exemplo de cadeias longas que preenchem colunas são os hidrocarbonetos. As partículas porosas de sílica, que é um material inerte, são as mais utilizadas na CLAE, isso porque elas são recobertas com partículas ativas, os silanois (Si-OH), que vão interagir com as moléculas da amostra. Além disso, elas têm uma alta rigidez e resistência a compressões, alta estabilidade química a alta transferência de massa. As colunas que possuem grupos hidrofóbicos, como o octadecil (C18) e octil (C8) ligados à sílica, são chamadas de coluna de fase reversa e são as mais utilizadas. Um problema encontrado é a presença de porções ativas, além das que são usadas na separação. Grupos silanois residuais podem atrapalhar a separação cromatográfica, um procedimento comum é o bloqueio desses grupos (MOLDOVEANU; DAVID, 2017).

O CLAE é um equipamento de nos permite a quantificação e separação de substâncias, incluindo matrizes complexas, como fluidos biológicos e produtos naturais. Este é um equipamento capaz de realizar análises qualitativas e quantitativas. Um impasse em relação a isso é que nas análises qualitativas podemos encontrar mais de um composto com o mesmo tempo de retenção de outro, nas mesmas condições cromatográficas empregadas. Isso traria a

dúvida de qual composto se trata, trazendo respostas inconclusivas. Neste contexto, torna-se interessante a utilização de detectores que possam operar em regiões ultravioleta e visível (UV-VIS) do espectro, permitindo o monitoramento de um comprimento de onda específico. Comparando-se o comprimento de onda do pico do padrão com o do pico da amostra, seria possível uma fiel conclusão. A grande desvantagem deste tipo de detector é a impossibilidade de monitorar mais de um comprimento de onda na mesma análise (LANÇAS, 2009).

O detector de arranjo de diodos (DAD) tem a capacidade de monitorar uma faixa espectral e, conseqüentemente, vários compostos de forma simultânea (LANÇAS, 2009). Por meio dele, se consegue selecionar o comprimento de absorção máxima para a quantificação dos analitos, além de conseguir observar a pureza do pico, também é um ajudante na detecção qualitativa de algum composto. A faixa espectral varia de 195 a 600nm (MONDOVEANU, DAVID, 2017). A fase móvel, junto da amostra, passa através de uma célula de fluxo, onde está o feixe de radiação. À medida que o soluto passa pela célula, um sinal, proporcional à concentração, é gerado. Os compostos devem possuir cromóforos (alcenos, aromáticos, ligações múltiplas entre C e O, N ou S) para serem detectados. É importante que os componentes da fase móvel absorvam nada ou muito pouco da radiação UV. A absorção de radiação é uma função de concentração, c , conforme descrito pela lei Beer-Lambert: $A = \epsilon bc$, onde A = absorvância, ϵ = coeficiente de extinção molar e b = comprimento do caminho da célula de fluxo (LACOURSE, 2017).

Alguns pontos são observados em relação aos picos, além da área e tempo de retenção. São eles: pureza do pico, resolução (R), fator de cauda (T), número de pratos teóricos (N) e fator de retenção (k).

A pureza do pico mostra a homogeneidade espectral do pico cromatográfico, que indica a pureza cromatográfica. O cálculo é definido pelo software utilizado (BRASIL, 2017).

A resolução é o parâmetro que calcula o grau de separação entre dois compostos numa mistura. Ela garante que as substâncias eluidas tenham uma separação satisfatória, e pode ser calculado pela seguinte equação, onde os valores resultantes são maiores do que 2,0:

$$R = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$$

Em que, t_2 e t_1 = tempos de retenção das duas substâncias da mistura; W_1 e W_2 = respectivas larguras dos picos na linha de base, pelo método da triangulação (BRASIL, 2010).

O fator de cauda (T) indica a simetria do pico, quanto mais próximo de 1, maior a simetria. Este fator pode ser calculado de acordo com a seguinte equação:

$$T = W_{0,05} / 2f$$

Em que, $W_{0,05}$ = largura do pico a 5% da altura; f = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura (BRASIL, 2010).

O número de pratos teóricos (N), que pode ser expresso por coluna ou por metro, diz respeito à eficiência da coluna. O número de pratos teóricos em picos com formato gaussiano pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$N = 16 \times (t/w)^2$$

Onde temos, w = largura do pico na linha de base; t = tempo de retenção da substância analisada (BRASIL, 2010).

O fator de retenção (k) é a razão entre a quantidade de substância que tem afinidade pela fase estacionária, em relação à quantidade que tem afinidade pela fase móvel. A retenção aumenta à medida que também aumenta a afinidade pela coluna cromatográfica. Ela pode ser calculada pela seguinte equação:

$$k = \frac{t - t_0}{t_0}$$

Onde, t = tempo de retenção da substância analisada; t_0 = tempo morto (BRASIL, 2010).

3.8 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

As estratégias para o desenvolvimento do método devem ser escolhidas de acordo com o tipo de técnica a ser utilizada. As análises utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência são consideradas algumas das mais relevantes na área farmacêutica atualmente. O desenvolvimento do método vai depender principalmente da complexidade da amostra, também da disponibilidade de materiais e do objetivo da separação (PARR; SCHMIDT, 2017).

Os métodos utilizados são bem particulares para cada substância estudada, representando um desafio para o pesquisador, que deve encontrar algo personalizado para cada situação. Os requisitos do método podem mudar de forma extrema entre as diferentes áreas farmacêuticas. Os desafios aparecem desde o estudo de um único analito, até separação de dois componentes, como, por exemplo, enantiômeros. Os requisitos do método podem mudar de forma drástica entre as diferentes áreas farmacêuticas. Embora existam essas dificuldades, existem triagens e informações que servem de base para a pesquisa (MATTREY et al, 2017).

A validação do método analítico é a garantia de confiabilidade dos resultados, mostrando a eficiência do método. São testes que fazem a comparação entre os resultados encontrados e os pretendidos (GRANATO; NUNES, 2016). Métodos analíticos que não estão descritos em compêndios oficiais reconhecidos pela ANVISA requerem uma validação analítica. A validação serve para mostrar, por meio de testes analíticos, que o método proposto produz resultados que são confiáveis e reproduzíveis para a finalidade pretendida (BRASIL, 2017). A RDC 166, de 2017, traz os parâmetros que devem ser atendidos para a validação de métodos analíticos, são eles: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite inferior de quantificação, exatidão, precisão e robustez.

3.8.1 Seletividade

A seletividade mostra a capacidade do método em identificar e quantificar o analito de interesse, mesmo na presença de outros compostos que podem estar presentes na amostra (BRASIL, 2017).

Este é um parâmetro que avalia o grau de interferência de outras substâncias, como outro ativo, impurezas, outros componentes da matriz, ou até de produtos de degradação. É por meio deste parâmetro que se tem a garantia de que o pico corresponde exclusivamente ao analito em questão. Uma das formas mais utilizadas de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta do analito com a matriz contendo o mesmo (RIBANI, 2004). A utilização de detectores específicos, como o detector de massas e o detector de diodos (DAD) também é uma ferramenta que auxilia na especificidade do método (GRANATO; NUNES, 2016).

3.8.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, segundo a RDC 166/17. Este parâmetro pode ser demonstrado através do coeficiente de correlação do gráfico da curva de calibração. Este valor de coeficiente não deve ser menor do que 0,990.

A curva analítica ou de calibração, deve ser definida por pelo menos cinco pontos que vão definir uma reta. É feita uma série de leituras de padrões com concentrações crescentes conhecidas, para a avaliação entre o sinal medido (área do pico) e a concentração conhecida do analito. A partir desses pontos experimentais é possível a medição de alguns parâmetros, como o coeficiente de correlação (r). Quanto mais próximo de um, significa que menor é a dispersão do conjunto de dados experimentais e melhor é a curva. A equação da reta é calculada através do método dos mínimos quadrados e, a partir dela, é possível determinar as concentrações de analitos através do conhecimento da área do pico (BRITO, 2003; RIBANI, 2004).

3.8.3 Limite de Detecção (LD) e Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

De acordo com a RDC 166/17, o limite de detecção corresponde à menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada através do método analítico. Ele pode ser calculado de três maneiras: método visual, relação sinal-ruído ou baseado nos parâmetros da curva analítica.

O limite de detecção, baseado na curva analítica, pode ser calculado através da equação:

$$LD = \frac{3,3 \times s}{S}$$

Em que, s é a estimativa do desvio padrão e S é o coeficiente angular da curva analítica. Deve-se preparar uma curva de calibração próxima ao limite de detecção, mas softwares como Microsoft Excel[®] e Microcal Origin[®] podem auxiliar nos cálculos (RIBANI, 2004).

O limite de quantificação é a menor concentração do analito capaz de ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições de análise estabelecidas (RDC 166/17).

O LQ pode ser medido das mesmas formas que o LD, sendo que se utilizando a relação 10:1, como mostra a seguinte equação (BRITO, 2003).

$$LIQ = \frac{10 \times s}{S}$$

O melhor caminho para fazer os cálculos de LIQ e LD é por meio da curva analítica, pois gera resultados estatisticamente mais confiáveis (RIBANI, 2004).

3.8.4 Exatidão

A exatidão é um parâmetro de validação que mede o grau de concordância entre os resultados individuais em relação a um valor considerado verdadeiro, através do método analítico (RDC 166/17). Ela pode ser expressa por quatro formas diferentes: 1) o estudo comparativo com materiais de referência (MRC); 2) comparação de um método proposto com outro que já é considerado padrão pela literatura; 3) estudos interlaboratoriais; e 4) testes de recuperação (GRANATO; NUNES, 2016).

Ela é sempre considerada dentro de certos limites, ou seja, sempre vem ligada à precisão. As análises dos testes de recuperação podem ser feitas adicionando o analito à matriz em três concentrações diferentes, dentro do intervalo linear (RIBANI, 2004). A recuperação reflete a quantidade de analito que foi recuperada em relação à quantidade que foi adicionada, o ideal é que esses valores sejam próximos. A exatidão corresponde ao erro inerente ao processo, que pode ter sido por: recuperação baixa do processo de extração, imprecisão nas medidas volumétricas e a presença de interferentes (BRITO, 2003).

A recuperação é calculada através da seguinte fórmula:

$$R\% = \frac{(\text{valor obtido} - \text{valor real})}{\text{valor real}} \times 100$$

3.8.5 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados que são obtidos através de análises com amostras que são preparadas, de acordo com o descrito no método analítico a ser

validado. Ela deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (RDC 166/17). Este parâmetro é avaliado pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número geralmente maior do que 20 de amostras. Na prática, faz-se um número de determinações pequenas e calcula-se a estimativa do desvio padrão absoluto (s) (RIBANI, 2004).

A repetibilidade é expressa pela medição da mesma amostra em diferentes preparações, nas mesmas condições laboratoriais (equipamento, analista, reagentes, dia). É avaliada com, no mínimo, nove determinações, sendo três réplicas de três concentrações diferentes, que estão dentro do intervalo. A precisão intermediária diz respeito à proximidade entre análises feitas em dias diferentes e por analistas diferentes no mesmo laboratório. A reprodutibilidade corresponde à concordância dos resultados das medições de uma mesma amostra. Medições essas realizadas em lugares diferentes, por operadores diferentes (BRITO, 2003; RIBANI, 2004).

3.8.6 Robustez

A robustez é um parâmetro que analisa a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas mudanças nas condições analíticas (RDC 166/17). As mudanças introduzidas refletem as possíveis variações dos resultados quando o método for aplicado em outros lugares, por exemplo. No CLAE, a robustez pode ser feita por meio da mudança da proporção da fase móvel, do pH da fase móvel, da temperatura do forno da coluna, entre outras. Se as variações estiverem dentro dos limites de exatidão e precisão, além da seletividade, aceitáveis, o método é considerado robusto (RIBANI, 2004).

3.9 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A análise térmica consiste num conjunto de técnicas que tem por objetivo acompanhar uma determinada propriedade física do objeto em estudo, em função da temperatura e/ou tempo, à medida que a substância é submetida a uma programação de temperatura, em uma atmosfera específica (SILVA; PAOLA; MATOS, 2007). Algumas das vantagens desta técnica são a não dependência de substâncias de referência, a facilidade na preparação das amostras e o tempo de análise, comparada a outras técnicas de análise térmica (MOREIRA et al., 2010).

DSC (do inglês “Differential Scanning Calorimetry”) é uma técnica de análise térmica, onde são monitoradas as variações de entalpia da amostra em relação a um material de referência, que é inerte. A amostra e o material inerte são submetidos igualmente a uma programação crescente de temperatura. Existem duas modalidades de DSC, a primeira é a calorimetria exploratória diferencial por compensação de potência, onde a amostra e o material de referência são colocados em compartimentos separados, mas aquecidos a uma mesma temperatura e potência de entrada no forno. A segunda é a calorimetria exploratória diferencial por fluxo de calor, onde a amostra e o material inerte são depositados num disco termoeletrico de metal, o aquecimento ocorre por uma única fonte de calor. São sistemas diferentes, mas que fornecem informações semelhantes, onde os eventos são apresentados em formato de picos nas curvas de DSC. No primeiro caso, os picos ascendentes correspondem a eventos endotérmicos e os descendentes a exotérmicos. Já no segundo caso, os ascendentes caracterizam eventos exotérmicos e os descendentes, eventos endotérmicos (DA SILVA, DE PAOLA, MATOS, 2007; DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

À medida que acontece o processo de aquecimento, a amostra pode sofrer alterações pela temperatura, quando comparada ao material de referência. Essas alterações geram o aparecimento de eventos endo ou exotérmicos. Então, registra-se o fluxo de calor diferencial necessário para deixar a amostra e o material inerte de referência à mesma temperatura. Esta diferença de temperatura acontece por conta de mudança de estado (fusão, sublimação) ou por transições cristalinas, que correspondem a transições de primeira ordem. Nestas transições, a área sob o pico representa a variação de entalpia (ΔH) que a amostra sofre. Já transições de segunda ordem não são representadas por picos, mas por uma variação na linha de base no sentido endotérmico, que é o caso da transição vítrea, que corresponde à temperatura que separa um comportamento sólido do comportamento líquido em um composto amorfo (DA SILVA, DE PAOLA, MATOS, 2007).

As substâncias sólidas podem ser cristalinas, amorfas ou semicristalinas. Um cristal é representado por uma substância sólida, em que os átomos, íons e moléculas são arranjados de forma regular, num padrão tridimensional. A substância amorfa não possui um arranjo regular interno de seus constituintes e, nesse aspecto, se assemelha aos líquidos. Os semicristais, como alguns polímeros, possuem caráter tanto cristalino, como amorfo. Quando os polímeros são pequenos, eles podem ser totalmente amorfos, mas quando são grandes, eles possuem regiões amorfas e regiões cristalinas (CERQUEIRA, 2006).

A temperatura diferencial (ΔT) é dada pela temperatura da amostra (T_a) menos a temperatura da referência (T_r), resultando na equação: $T = T_a - T_r$. Na condição de fluxo de calor, o sinal medido (ΔT) é proporcional à diferença nos fluxos de calor ($\Delta \phi$) da amostra (ϕ_A), em relação à referência (ϕ_R), representada pela $\Delta \phi = \phi_A - \phi_R = -k \Delta T$. Onde, k é uma constante determinada por calibração, por meio de padrões com uma constante física conhecida, como a entalpia de fusão (BERNAL et al., 2002).

Se não houver nenhum fenômeno físico, que é o que se analisa no DSC, observa-se uma reta no gráfico de temperatura em relação ao tempo. Esta técnica permite determinações quantitativas, onde a área do pico se relaciona com a energia que foi utilizada no processo, em que padrões são utilizados para a calibração do equipamento. Estes padrões apresentam uma variação de entalpia conhecida, de fusão, na maioria das vezes, são eles índio, estanho, chumbo, zinco e alumínio (BERNAL et al., 2002).

CAPÍTULO II

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos (LCQPF), localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL), localizado na mesma instituição (UFPB).

4.2 REAGENTES E MATERIAIS

O padrão de clorexidina a 20% (m/v) (Sigma-Aldrich®, Brazil), o padrão de timol (Sigma-Aldrich®, Brazil), o metanol grau CLAE (Sigma-Aldrich®, Brazil), etanol P.A. (Neon®, Brazil), fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (Vetec®, Brazil), trietilamina P.A. (Dinâmica®, Brazil), ácido fosfórico P.A. (CRQ®, Brazil), filtro de seringa PTFE não estéril 13 mm x 0,45 µm (importado da China por Saint Vallen & Aprolab), membrana filtrante PTFE 0,45 µm (Anow®, China). Caldo Sabouraud dextrose broth (Kasvi®), ágar Sabouraud dextrose (Merck®, USA), caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi®), ágar BHI (Kasvi®), resazurina (Sigma®, Alemanha), placa de microdiluição em caldo tipo “U”, 96 poços. Lauril sulfato de sódio (manipulado – Dilecta®). Carboximetilcelulose (manipulado - ArtFarma®). Hidroxipropilmetilcelulose (manipulado – Teixeira ®). Maltodextrina (DynamicLab®).

4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

4.3.1 Equipamentos e Materiais

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu (Série Prominence), com injetor automático (SIL-20^a), bomba multissolvente (LC-20AT), sistema de degaseificação (DGU-20^a5), forno para coluna (CTO-20^a) e detector com arranjo de díodos (SPDM20A). A coluna utilizada foi uma NST® Octilsilano – C8 120^a (250 mm x 3,9 mm i.d., com 5 µm de tamanho de partícula).

4.3.2 Condições Cromatográficas

O comprimento de onda monitorado para a clorexidina foi de 258 nm e do timol foi 275 nm, o volume de injeção foi de 20 μL e a temperatura do forno a 40 °C se mantiveram fixos durante todo o desenvolvimento e validação do método. O fluxo escolhido foi de 0,8 mL min^{-1} . A cada análise foi realizada a adequabilidade do equipamento com injeção do padrão da solução de clorexidina e timol (24 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) em triplicata.

4.3.3 Sistema de Eluição

A fase móvel filtrada e desgaseificada por sonicação foi constituída de 60% de metanol grau CLAE, 40% de tampão de fosfato de sódio monobásico 0,03 M, 0,04% de trietilamina P.A. e ácido fosfórico P.A., até alcançar o pH 2,8, com pHmetro de bolso (Kasvi®, China) em modo isocrático.

4.3.4 Extração dos Ativos

A quantidade da micropartícula era pesada de acordo com os valores teóricos de clorexidina e timol, nas concentrações equivalentes às concentrações do padrão (24 e 37,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). O pó foi adicionado a um balão de 25 mL e diluído em 12,5 mL de etanol P.A. A sonicação aconteceu por 10 minutos, adicionava-se água e sonicava-se por mais 10 minutos. Filtrou-se com seringas do tipo PTFE e o material foi adicionado ao vial e injetado no CLAE.

4.3.5 Parâmetros de Validação

A metodologia analítica foi validada de acordo com a RE ANVISA nº 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e conforme a classificação para os testes analíticos, descritos nesta resolução, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, precisão intermediária, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

4.3.5.1 Seletividade

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise dos perfis cromatográficos de quatro tipos de amostras: branco, solução padrão, solução placebo (apenas os excipientes) e placebo contaminado com clorexidina e timol para investigar a existência de alguma substância que possa estar em coeluição com os ativos, levando também em consideração os comprimentos de onda utilizados. Preparo das amostras para a seletividade:

- 1) Timol – preparado em água destilada filtrada, a partir da solução estoque, na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- 2) Clorexidina – preparada em água destilada filtrada, a partir da solução estoque, na concentração de $24 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- 3) Timol + clorexidina – nas mesmas concentrações das amostras anteriores, porém em uma solução só, a partir das soluções estoque;
- 4) Excipientes (placebo) – amostras foram preparadas a partir de um placebo preparadas com as maiores proporções utilizadas no planejamento fatorial de cada um dos excipientes. A diluição foi feita em água, até chegar à concentração padrão de leitura;
- 5) Placebo contaminado (timol + clorexidina) – preparados a partir das soluções estoque e da preparação placebo, nas mesmas concentrações das substâncias isoladas. Antes da leitura, passou pelo processo de extração com etanol:água;
- 6) Branco - etanol:água (60:40), usado na extração dos ativos.

4.3.5.2 Seletividade – Condições de Estresse

Segundo a RDC 166/17, é necessário demonstrar a ausência de interferentes de produtos de degradação. Este teste é feito por meio da exposição da amostra a condições de degradação em ampla faixa de pH, de oxidação, de calor e de luz.

- a) Ampla faixa de pH – meios neutro, ácido, básico e estresse oxidativo

Os testes foram realizados utilizando soluções de água (neutro), HCl 0,1 M (ácido), NaOH (básico) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 a 3%).

- b) Calor – temperatura ambiente e estufa a 60°C

As soluções foram preparadas com água e depois submetidas à temperatura ambiente e à temperatura de 60°C em estufa, durante 24h. É importante ressaltar que as amostras em análise ficaram em condições ao abrigo da luz.

c) Luz – claro e escuro

As soluções foram preparadas com água e submetidas à temperatura ambiente, com e sem a interferência da luz.

d) Preparação das soluções

Para o preparo das soluções, partimos de uma solução de clorexidina + timol (0,24 mg mL⁻¹ + 0,4 mg mL⁻¹). Destas soluções, foram retirados 2 mL e adicionados em um balão volumétrico de 10 mL. Os balões foram completados com as soluções a serem testadas (água, HCl 0,1M, NaOH 0,1 M e H₂O₂ a 3%). Após as 24 horas, 5 mL destas soluções foram transferidos para um balão de 10 mL e completados com água. As soluções foram filtradas e injetadas em HPLC-DAD. A concentração final dos ativos permaneceu igual à concentração do padrão de leitura (fazer pequeno fluxograma).

4.3.5.3 Linearidade

Foi obtida solução estoque (SE) dos padrões de clorexidina e timol a 2,4 e 4,0 mg mL⁻¹, respectivamente. A partir da SE foram retiradas alíquotas, que foram diluídas mais duas vezes com água, para obter os pontos correspondentes aos níveis (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175%), sendo de 24 e 40 µg mL⁻¹ as concentrações de ativos no nível de 100%. As concentrações correspondem aos pontos: 6,0; 12; 18; 24; 30 e 36 µg mL⁻¹ para a clorexidina e 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 70 µg mL⁻¹ para o timol. As soluções foram analisadas por CLAE-DAD e os resultados obtidos foram relacionados em um gráfico da concentração da solução em função da área sob o pico. Foram realizadas três curvas (triplicata) e uma curva média foi obtida. A análise da linearidade seguiu o método dos mínimos quadrados de regressão linear, estabelecendo a curva de calibração média proporcional à concentração e resposta, mediante determinação do coeficiente de correlação linear, coeficiente angular e desvio padrão relativo. Aplicou-se análise estatística ANOVA com auxílio do programa Action Stat 3.4.124.1308 build 3.

4.3.5.4 Precisão

A repetibilidade do método, ou precisão intra-corrída, foi verificada por 9 (nove) determinações, três no nível baixo 50%, três no nível médio 100% e três no nível alto malto, contemplando o intervalo linear do método. Utilizando o mesmo analista e mesma instrumentação, foi calculado o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação percentual (CV%). Para a precisão do produto, foi realizado o teste com as concentrações nos mesmos níveis, mas as amostras foram preparadas com o placebo contaminado. O método é considerado preciso quando apresenta CV% menor ou igual a 5%, de acordo com a legislação vigente.

4.3.5.5 Precisão Intermediária

Para determinação da precisão intermediária ou inter-corrída, realizou-se o mesmo método utilizado para avaliação da repetibilidade do método. Foram utilizados os mesmos parâmetros amostrais e estatísticos para análise dos dados, sendo avaliada pela concordância entre os resultados obtidos. As análises foram realizadas no mesmo laboratório, em dias diferentes, com analistas diferentes.

4.3.5.6 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção foi estabelecido por meio da análise de soluções com concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável, através da equação estabelecida pela legislação vigente.

4.3.5.7 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O limite de quantificação foi estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável, através da equação estabelecida pela legislação vigente.

4.3.5.8 Exatidão

Para avaliação da exatidão, foram realizados os cálculos de recuperação de 9 (nove) determinações, três no nível baixo 50%, três no nível médio e três no nível alto 150%, contemplando o intervalo linear do método. A recuperação é calculada pela razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Para a exatidão do produto, tudo foi realizado da mesma forma, mas as amostras foram preparadas com o placebo contaminado.

4.3.5.9 Robustez

Para análise do parâmetro de robustez foram preparadas amostras no nível 100% da concentração teórica do teste, em triplicata, avaliando três condições: o fluxo da corrida ($0,8 \pm 0,1 \text{ mL min}^{-1}$), o pH da fase móvel ($2,8 \pm 0,1$) e proporção da fase móvel ($60 \pm 2\%$ de MeOH). Para a robustez do produto, foram analisados os mesmos parâmetros, mas as amostras foram preparadas com o placebo contaminado. Para fins estatísticos utilizou-se o cálculo do desvio padrão relativo, sendo considerado robusto o método quando não ultrapassado o desvio de até 5%.

4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL 3^2

A preparação das micropartículas foi feita a partir de um planejamento fatorial do tipo 3^2 , ou seja, dois fatores foram testados em três níveis diferentes (baixo, médio e alto). O planejamento fatorial é uma estratégia para determinar a influência de uma ou mais variáveis sem a necessidade de inúmeros experimentos. Os fatores são os nossos objetos de estudo, são variados e colocados em níveis diferentes para a avaliação da sua possível influência naquilo que está se estudando. Também é possível verificar se há influência entre os diferentes fatores por meio deste planejamento. Os níveis são as variações, que podem ser baixa, média e alta. Os fatores são variáveis que o pesquisador tem condição de controlar. As respostas são as variáveis que podem ser influenciadas ou não pelas manipulações realizadas no sistema (BARROS-NETO; SCARMINO; BRUNS, 2010).

O tipo de planejamento é escolhido de acordo com o objetivo do pesquisador. Como o objetivo, neste caso, era saber a influência de alguns excipientes na preparação da

micropartícula e na eficiência de encapsulação, optou-se por realizar o planejamento 3^2 . Portanto, foram investigados os efeitos individuais e interativos dos excipientes LSS (X_1) e HPMC (X_2). As variações utilizadas estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores (m/m) analisados do planejamento fatorial 3^2 .

Fatores e níveis analisados no planejamento fatorial 3^2.			
Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
LSS	1,0%	1,33%	1,67%
HPMC	1,67%	2,5%	3,33%

Fonte: elaborada pela autora.

O planejamento 3^2 resulta num total de nove experimentos, que estão expressos a seguir. Os experimentos foram realizados num mesmo dia e no mesmo tempo de congelamento e processo de liofilização, sem réplica. Na Tabela 2, estão dispostos os valores das possíveis combinações.

Tabela 2 - Combinações possíveis do planejamento fatorial 3^2 .

Experimentos	X_1 (LSS)	X_2 (HPMC)	LSS (%)	HPMC (%)
1	-1	-1	1,0	1,67
2	0	-1	1,33	1,67
3	+1	-1	1,67	1,67
4	-1	0	1,0	2,5
5	0	0	1,33	2,5
6	+1	0	1,67	2,5
7	-1	+1	1,0	3,33
8	0	+1	1,33	3,33
9	+1	+1	1,67	3,33

Fonte: elaborada pela autora.

Para a avaliação dos resultados, utilizou-se o software Statistica 8.0, com um nível de significância de 5%.

4.5 CONGELAMENTO

Antes da secagem, as amostras de micropartícula eram submetidas a congelamento logo após a sua preparação. O ultra freezer 80V QUIMIS®, com a temperatura de aproximadamente -80°C , acondicionava as amostras durante 14 horas.

4.6 LIOFILIZAÇÃO

As amostras de micropartícula foram submetidas à secagem por meio de um equipamento de liofilização LIOTOP L101. A temperatura no interior do equipamento era de -40°C e a pressão de vácuo era inferior a 500 mmHg. As amostras permaneciam no equipamento durante 13 horas até secagem total.

4.7 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Foi realizado o estudo de compatibilidade física entre ativos e excipientes por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Para isso, foram feitas corridas das substâncias isoladas e das suas misturas. Para análise por DSC, utilizou-se um calorímetro Shimadzu, modelo DSC-50, e em cadinhos de alumínio pesou-se o equivalente a 3 mg de cada mistura e de cada componente isoladamente, para fins comparativos, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} , submetida ao aquecimento com razão de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, em intervalo de temperatura de $25\text{-}450^{\circ}\text{C}$. A célula de DSC foi calibrada com índio (In) (pf $156,6^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{\text{fus}} = 28,54\text{ J g}^{-1}$) e zinco (pf $419,6^{\circ}\text{C}$). A análise dos dados obtidos por DSC foi realizada utilizando o software TASYs, da Shimadzu.

4.8 MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A técnica utilizada foi a de microdiluição em poços para a investigação das concentrações inibitórias mínimas da MP para cada um dos microrganismos, da CBM para as bactérias e CFM para o fungo. Os testes foram realizados seguindo-se o “Protocolo para a técnica de MIC em microdiluição para bactérias aeróbias, microaerófilas e anaeróbias” do Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL/UFPB). Microrganismos de referência (ATCC-American Type Culture Collection/INCSQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em

Saúde) de *C. albicans* (ATCC 76645), *S. mutans* (INCSQS 00446) , *S. aureus* (ATCC 15656) do LABIAL foram usados para a realização dos testes de CIM, CBM e CFM. Todo o procedimento foi realizado com o auxílio de uma capela de fluxo laminar, os materiais utilizados foram anteriormente autoclavados, evitando a possibilidade de contaminação por microrganismos.

4.8.1 Preparação dos Microrganismos e do Inóculo

Os microrganismos utilizados nos testes foram: bactérias *S. aureus*, *S. mutans* e o fungo *C. albicans*. Antes de serem iniciados os experimentos, foram semeados em placas para observar se estavam viáveis para crescimento. Quando cresceram nas placas com meio, o experimento se tornou confiável, pois sabe-se que há microrganismos vivos.

Para a preparação do inóculo, foram retiradas cepas prontas que estavam armazenadas em congelador. Esperou-se descongelar, em temperatura ambiente, e preparou-se o inóculo com solução salina 0,9% em um tubo Falcon, previamente esterilizado. A absorbância foi observada no comprimento de onda de 540 nm, com auxílio do espectrofotômetro OPTIMA®. O valor de absorbância que corresponde a 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC mL⁻¹) é de 0.135 para bactérias (podendo variar entre 0.125 e 0.145). Para fungos, valor de absorbância que corresponde a 0,5 da escala de McFarland (10^6 UFC mL⁻¹) é de 0.100 (podendo variar entre 0.090 e 0.110).

4.8.2 Preparação dos Meios

Os meios BHI e o Sabouraud dextrose foram preparados com água deionizada, em recipiente de vidro e autoclavados durante 45 minutos. Só foram utilizados após total resfriamento.

4.8.3 Preparação das Soluções de Micropartícula (teste)

A solução contendo a micropartícula foi preparada com água deionizada estéril. A esta primeira diluição deu-se o nome de solução mãe zero (SM0) e, a partir dela, foram preparadas as soluções mãe 1, 2 e 3 (SM1, SM2, SM3). Estas últimas não foram preparadas com água,

mas com os meios BHI, quando se testam bactérias, e Sabouraud dextrose, quando para fungos. A concentração da SM0 foi de 0,12 mg mL⁻¹ para a clorexidina, 0,1875 mg mL⁻¹ para o timol e da MP foi de 7,6 mg mL⁻¹.

Foram utilizadas microplacas estéreis, com 96 poços em forma de “U”, distribuídos em 9 linhas e 12 colunas. O volume final de cada poço, após a adição de inóculo, meio de cultura e teste/controlado é de 100 µL. As SM1, 2 e 3 foram distribuídas nos poços de modo a obter concentrações finais da MP de 400 a 15 µg mL⁻¹ para o primeiro teste, no segundo teste os valores obtidos eram dez vezes mais diluídos.

4.8.4 Preparação dos Controles Positivo e Negativo

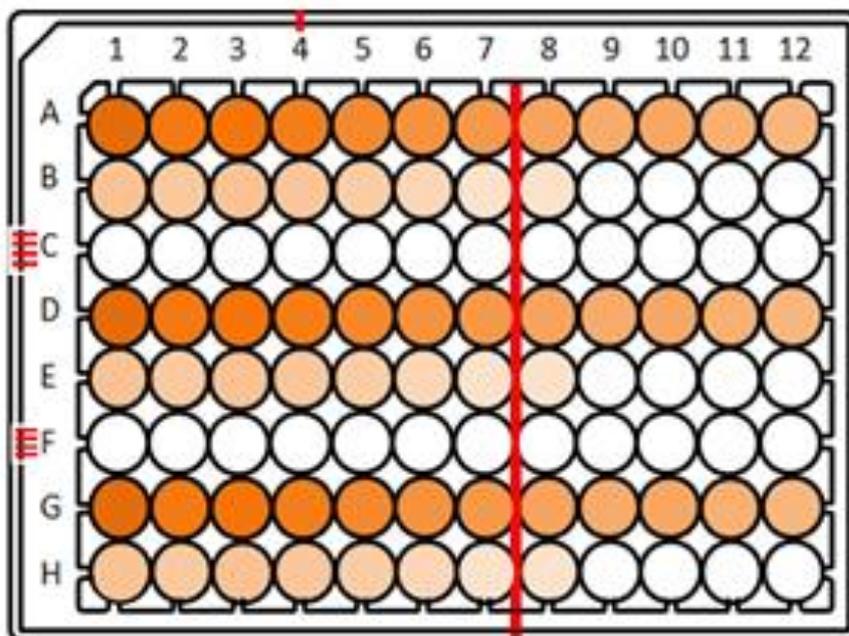
Foram utilizados dois controles positivos: solução de clorexidina a 0,012% (m/v) e solução de timol 0,018% (m/v), nas mesmas concentrações dos ativos na solução da MP. A clorexidina foi preparada com água a partir de uma solução a 20% (m/v) e o timol foi preparado por meio de uma solução de Tween 80 (5% v/v) e DMSO (dimetilsulfóxido) (2,5% v/v), sob agitação com o auxílio de vórtex, até completa dissolução. O controle negativo utilizado foi uma solução de Tween 80 (5%) e DMSO (2,5%).

4.8.5 Preparação das Placas para CIM

Em todos os poços foram adicionadas quantidades crescentes de meio BHI ou Sabouraud dextrose. Após a adição do meio, foram adicionadas concentrações decrescentes da solução de MP para as placas testes, de clorexidina e timol para as placas de controle positivo e de Tween 80 (5%) e DMSO (2,5%) para as placas de controle negativo. O último a ser adicionado foi o inóculo (Tabela 3), em todos os poços foram adicionados 20 µL do inóculo. Após a preparação das placas, elas foram incubadas a 37°C, por 24 horas para as bactérias e 48 horas para o fungo. Após esse período, todos os poços foram preenchidos com 30 µL de solução de resazurina, preparada em solução aquosa a 0,01% (Sigma®, Alemanha). As placas voltaram a ser incubadas por um período de uma hora, quando depois foram retiradas e foi feita a análise visual. Quando o poço apresentou uma solução de coloração rosa, quer dizer que houve a transformação de resazurina em resorfurina, que indica a presença de células vivas (KUMAR et al. 2, 2017).

A análise foi feita em triplicata, onde cada placa possuía três fileiras repetidas das concentrações (Figura 10). A CIM é representada pela menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo. A última fileira da triplicata não recebeu resazurina junto com as duas primeiras fileiras, pois é a partir dela que se retirou o material para fazer a análise da CBM e CFM.

Figura 10 - Ilustração da placa de microdiluição em triplicata.



Fonte: protocolo do LABIAL.

A cor laranja decrescente nos poços representa as diferentes concentrações da MP, onde o laranja mais escuro representa a solução mais concentrada. A marcação em vermelho é para auxiliar no momento de preenchimento dos poços.

Tabela 3 - Volumes e substâncias utilizadas na preparação das placas teste.

Poços	Poços Duplicata	Poços Triplicata	Número da Solução Mãe	Volume de Solução Mãe - SM (μL)	Meio caldo BHI (μL)	Inóculo Bacteriano (μL)	Vol. final (mL)
A1	D1	G1	1	80	-	20	0,1
A2	D2	G2	1	70	10	20	0,1
A3	D3	G3	1	60	20	20	0,1
A4	D4	G4	1	50	30	20	0,1
A5	D5	G5	1	40	40	20	0,1
A6	D6	G6	1	30	50	20	0,1
A7	D7	G7	1	20	60	20	0,1
A8	D8	G8	2	55	25	20	0,1
A9	D9	G9	2	50	30	20	0,1
A10	D10	G10	2	45	35	20	0,1
A11	D11	G11	2	40	40	20	0,1
A12	D12	G12	2	35	45	20	0,1
B1	E1	H1	3	50	30	20	0,1
B2	E2	H2	3	45	35	20	0,1
B3	E3	H3	3	40	40	20	0,1
B4	E4	H4	3	35	45	20	0,1
B5	E5	H5	3	30	50	20	0,1
B6	E6	H6	3	25	55	20	0,1
B7	E7	H7	3	20	60	20	0,1
B8	E8	H8	3	15	65	20	0,1

Fonte: protocolo do LABIAL.

4.8.6 Preparação das Placas para a CBM e CFM

A placa com ágar BHI ou Sabouraud dextrose foi dividida em seis partes. Em cada uma dessas partes foram adicionados 30 μL do conteúdo dos seguintes poços: os três poços anteriores ao poço da CIM, o do próprio poço da CIM e os dois poços subsequentes. Cada um deles ocupou uma fatia com a divisão da placa, com o cuidado de não invadir o espaço de outra análise. As placas foram incubadas a uma temperatura de 37°C durante 24 horas para bactérias e 48 horas para fungos. A leitura foi feita visualmente, foi considerada a CBM e CFM, aquele espaço cujo poço não apresentou crescimento bacteriano ou fúngico.

CAPÍTULO III

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO I

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO EM CLAE-DAD

Na tentativa de desenvolver um método que possibilitasse a identificação e quantificação de forma simultânea dos compostos clorexidina e timol foi utilizado o equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de diodos (DAD). Inicialmente, foram consultadas metodologias analíticas presentes em artigos científicos e nas farmacopeias brasileira, americana e britânica, em suas últimas edições. Foi verificado que não existe metodologia analítica descrita para a análise destes dois ativos de forma simultânea. No entanto, os testes foram iniciados a partir das metodologias encontradas para a análise de CLX.

O CLAE é um equipamento que nos permite uma análise eficiente, sensível e com alta resolução. Com o detector DAD, foi possível monitorar os dois comprimentos de absorção máxima, da clorexidina (258 nm) e do timol (275 nm), em uma mesma análise. Os comprimentos de onda foram indicados após a análise em SCAN-UV, que nos apresentou os comprimentos de absorção máxima. A fase estacionária (FE) utilizada foi uma coluna cromatográfica de fase reversa, tipo C18, posteriormente substituída pela C8. A primeira fase móvel (FM) testada era composta por metanol (MeOH) e água. As proporções testadas foram: 65:35; 62:38; 60:40 (MeOH:H₂O) (DA SILVA, 2009). Inicialmente, sem ajuste de pH, com fluxo 0,5 mL min⁻¹, em modo isocrático, temperatura do forno 40°C. Cada uma das proporções foi testada sem e com a presença de 0,4% de trietilamina. Em nenhuma destas fases foi possível a visualização de picos com boa resolução de nenhum dos dois picos.

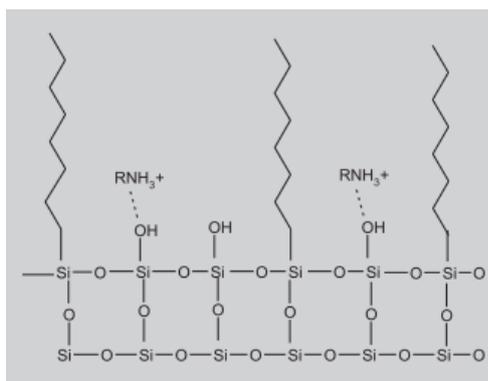
Os primeiros picos com boa resolução foram conseguidos na seguinte tentativa: ajuste do pH final da solução para 2,8 com ácido fosfórico; a introdução de um tampão monobásico de sódio (NaH₂PO₄) 0,03 M, como fase aquosa, no intuito de manter o pH da fase móvel, bem como a utilização de uma coluna de fase reversa do tipo C8. Este mesmo método foi testado com 0%, 0,2% e 0,4% de trietilamina.

Sem a presença de trietilamina, foi observado apenas um pico completamente distorcido para a clorexidina, em que não seria possível a identificação/quantificação da mesma, somente foi possível observar bem o pico do timol. Com 0,2 ou 0,4% da trietilamina, não houve diferença significativa de resolução ou intensidade dos picos, e nas duas

proporções foram observados dois picos com boa resolução, correspondentes aos analitos em questão. Assim, percebemos a necessidade do uso da trietilamina, como pareador iônico, no intuito de manter a neutralidade elétrica da CLX.

O uso da trietilamina permitiu uma maior simetria do pico da CLX. Esta última é uma molécula de caráter básico, que sofre ionização pela grande quantidade de nitrogênios em sua estrutura. As moléculas ionizadas possuem diferente interação com a fase estacionária em relação às moléculas não ionizadas, resultando em picos que apresentam caudas e distorções (NETO, 2010). A trietilamina foi utilizada no intuito de diminuir a interação entre os grupos silanois residuais presentes na superfície da coluna C8 (Figura 11) com os solutos básicos, neste caso uma amina, diminuindo a ionização da CLX e a consequente formação de caudas (DONATO, ZANOTTO, BERGOLD, 2004).

Figura11 - Interação de aminas com grupos silanois livres na superfície da coluna C8



Fonte: DONATO; ZANOTTO; BERGOLD, 2004.

O uso do tampão é de extrema importância no CLAE quando se trabalha com a separação de compostos ácidos ou básicos, devido a necessidade de se manter o pH constante da FM. A mudança de pH pode interferir na ionização dos analitos e, conseqüentemente, uma diferente interação dos mesmos com a FE, causando deformações no pico cromatográfico. É sugerido o uso de concentrações do tampão acima de 10 mmol/L (NETO, 2010).

A utilização de uma FM com o pH ácido inibe a desprotonação de grupos doadores de prótons, como os fenóis. Sem o meio ácido, o timol seria completamente ionizado e não teria

interação com a coluna cromatográfica, saindo completamente no V_0 . A supressão iônica ajuda o timol a permanecer na forma molecular e aumentar a interação dele com a coluna.

Por último, foram testadas diferentes proporções dos solventes, utilizando 0,4% de trietilamina. Os solventes foram testados nas proporções 50:50 e 60:40 (MeOH:NaH₂PO₄ 0,03 mol L⁻¹). Foi possível concluir que quanto menor a quantidade de MeOH, maior o tempo de retenção dos picos. Então, no intuito de diminuir o tempo total de corrida, foi escolhida a segunda proporção, com 60% do solvente orgânico. Além disso, existe um bom tempo entre a eluição dos dois picos, diminuindo a possibilidade de coeluição entre eles e os seus possíveis produtos de degradação. O primeiro pico, com o tempo de retenção de ± 7 min, é correspondente a CLX. O segundo pico, com o tempo de retenção de ± 22 min, é correspondente ao timol. Todos os parâmetros utilizados estão dispostos na tabela 4.

Foram testados o fluxo de 1 mL min⁻¹, mas o pico da clorexidina ficou muito próximo do V_0 , além de aumentar bastante a pressão, mais do que suportada pela bomba, bem como o fluxo de 0,9 mL min⁻¹. O fluxo escolhido foi de 0,8 mL min⁻¹, ideal para manter a pressão em níveis normais (até 200 mmHg), tornar o tempo de corrida até 25 minutos, que é relativamente bom, e manter a boa distância entre os picos.

Tabela 4 - Dados do método desenvolvido.

Parâmetros cromatográficos do método analítico	
Parâmetros	Especificações
Equipamento	CLAE
Detector	DAD
Fase estacionária	Coluna C8
Eluição	Isocrática
Fase móvel	MeOH: NaH ₂ PO ₄ 0,03 mol L ⁻¹ + 0,4% de trietilamina
Proporção da fase móvel	60:40
Fluxo da corrida	0,8 mL min ⁻¹
Tempo de retenção da CLX	± 7 minutos
Tempo de retenção do timol	± 22 minutos
Tempo total de corrida	25 minutos
Comprimento de onda da CLX	258 nm
Comprimento de onda do timol	275 nm
pH da fase móvel	2,7
Temperatura do forno da coluna	40°C

Fonte: elaborada pela autora.

As análises foram feitas por meio da comparação entre os picos das amostras e dos padrões de cada dia, de acordo com o tempo e o espectro de absorção, utilizando o método desenvolvido para a análise simultânea dos dois compostos.

5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

O método de extração foi desenvolvido no intuito de recuperar os ativos que estão presos na matriz polimérica da micropartícula, com o objetivo de quantificá-los e expressar as suas recuperações em cada uma das preparações.

As primeiras tentativas foram realizadas tomando como base a solubilidade dos excipientes em água. Todas as diluições foram feitas no intuito de, no final, atingirmos as mesmas concentrações da solução de injeção dos ativos. Inicialmente, pesamos uma quantidade de material microparticulado, depois de uma pequena agitação feita à mão até observar a mistura completa do material. Foram feitas duas diluições em balões de 10 mL, completando apenas com água, até atingir a concentração de leitura. Esta segunda solução foi filtrada e injetada no CLAE-DAD. Observou-se o aparecimento de um pico no tempo de retenção do timol, mas não no da CLX, isso nos trouxe a informação de que esta forma de preparação não seria capaz de liberar esta última substância da matriz. Nas tentativas seguintes, continuamos fazendo o uso apenas de água para diluição, mas fazendo uma agitação ultrassônica durante 10 minutos e, posteriormente, 20 minutos, mas os resultados foram semelhantes aos da tentativa anterior.

Preparou-se também uma solução 10 vezes mais concentrada do que a usual, em água, com 20 minutos de sonicação, mas também não foi possível a observação do pico da clorexidina. O primeiro pico apareceu apenas quando contaminamos uma amostra de micropartícula com alguns microlitros do padrão de clorexidina, mas a área mostrou uma concentração menor do que a que tinha sido adicionada. Este teste confirmou que o método de identificação no HPLC estava de acordo, e que parte do padrão usado para contaminar foi incorporada à matriz polimérica.

Os testes seguiram utilizando as soluções com o placebo contaminado, repetindo os primeiros testes realizados com água, sem e com agitação no sonicador, ele apresentou os mesmos resultados da micropartícula, ou seja, ainda sem o pico da clorexidina. Este último teste descartou a possibilidade de degradação da clorexidina na micropartícula, visto que os

ativos eram adicionados ao placebo e, imediatamente, eram preparadas as soluções, que eram levadas ao CLAE poucos minutos depois, e, mesmo assim, não conseguimos detectar a clorexidina.

Foram testados também dois tipos de placebo, onde um deles foi preparado como o descrito na Tabela 5, com todos os excipientes, e no segundo, retirou-se o excipiente HPMC. Em cada um deles, adicionamos 1, 2 e 3 mL das soluções estoque, a fim de obtermos soluções com a concentração normalmente utilizada, e também com o dobro e o triplo das concentrações de ativos em relação à solução de leitura. Foram testadas as mesmas condições novamente: água com e sem agitação. Não foi observado o pico da clorexidina em nenhuma das condições, apenas um pico crescente do timol, à medida que a sua concentração também aumentava. Ainda com a água, tentamos preparar uma solução na concentração da solução padrão, mas utilizando um balão maior e, conseqüentemente, um volume maior da água, para aumentar o contato do material com o solvente e tentar facilitar a liberação dos ativos, mas também não foi possível a liberação da clorexidina.

Foi observado que apenas a água, independente da agitação, não era capaz de extrair a clorexidina da matriz polimérica. Tentou-se, então, acidificar a água com ácido fosfórico. Foram testadas quantidades crescentes, de 10, 30, 50 e 100 μ L num balão de 10 mL com uma pequena quantidade de placebo e ativos, já na concentração do padrão, mas ainda sem sucesso em relação à extração da clorexidina.

Por último, testou-se a diluição com álcool etílico, numa quantidade correspondente à metade do balão volumétrico, seguido de uma sonicação de 10 minutos e completando o balão com água. Nesta tentativa, conseguimos observar dois picos, que correspondiam aos ativos adicionados no placebo. Porém fizemos o mesmo teste utilizando o material microparticulado, e percebeu-se que algumas partes do pó não dissolviam completamente na solução. Então, adicionou-se água, mas sem chegar até o menisco, e, sem seguida, mais uma sonicação por mais 10 minutos. Somente depois de 15 minutos após a última agitação, o balão era completado com água. Isto possibilitou a dissolução total do pó na solução, visto que os pós são solúveis em água, e a agitação facilitou a dissolução do material.

5.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

5.3.1 Preparo das Soluções Estoque de Clorexidina e de Timol

As soluções eram preparadas a partir de duas soluções estoques diferentes: a de CLX e a de timol. A solução de CLX a 20% é acondicionada em geladeira entre 2 e 8°C e em frasco âmbar, como recomendado pelo fabricante. Antes do preparo da solução estoque da CLX, a solução a 20% era retirada da geladeira e mantida à temperatura ambiente por pelo menos uma hora.

Para o preparo da solução estoque de CLX, eram adicionados 120 µL (correspondente a 24 mg de CLX) da solução a 20% a um balão de 10 mL e completado com água destilada, filtrada. A concentração da solução estoque de CLX foi de 2,4 mg mL⁻¹. Na preparação da solução estoque do timol, pesava-se 40 mg do timol e transferia-se para um balão volumétrico de 10 mL. O balão era completado com uma solução de MeOH:água (60:40). A concentração da solução estoque do timol era de 4,0 mg mL⁻¹.

5.3.2 Preparo da Solução Padrão de Clorexidina e Timol

De cada uma das soluções estoques, retirava-se 1 mL, que eram transferidos para um outro balão de 10 mL, que era completado com água. Totalizando uma solução de 0,24 mg mL⁻¹ de CLX e 0,4 mg mL⁻¹ de timol. Por último, para a preparação da solução padrão, retirava-se 1 mL da solução anterior e adicionava-se a outro balão de 10 mL, que era completado com água. A concentração da solução padrão era de 24 µg mL⁻¹ para a CLX e 40 µg mL⁻¹ para o timol.

5.3.3 Preparo do Placebo (PCB)

O placebo é composto por todos os excipientes utilizados na micropartícula. Ele foi preparado utilizando-se as maiores proporções, usadas no planejamento fatorial, de cada um dos excipientes. Os excipientes e proporções usadas estão dispostos da Tabela 5.

Tabela 5 - Excipientes e proporções testadas.

<i>Proporções de excipientes para a preparação do placebo</i>	
Excipiente	Proporção (m/m)
Maltodextrina (MD): Carboximetilcelulose (CMC) :Lauril sulfato de sódio (LSS) Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)	150:1:2,5:5

Fonte: elaborada pela autora.

5.3.4 Preparo do Placebo Contaminado

A solução de placebo contaminado seguia todo o protocolo do processo de extração. Eram adicionados 25 mL de etanol em um balão de 50 mL e, em seguida, adicionava-se 50 mg de PCB e 0,5 mL de cada uma das soluções estoque. Esta solução passava por um processo de sonicação durante 10 min, depois adicionava-se água, mas sem completar até o menisco. Esta solução, agora também com água, passava novamente por 10 minutos no processo de sonicação. Depois de sonicar, esperava-se 15 minutos até esfriar e completava-se com água até o menisco. As concentrações finais de CLX e timol eram iguais as da solução padrão.

5.3.5 Preparo das Soluções para Injeção

Antes de serem adicionadas ao vial, as soluções eram filtradas com o auxílio de uma seringa e um filtro PTFE Cromaphil com poros de 0,45 µm de diâmetro. A filtração era feita direta nos vials, que eram tampados com septo e tampa, e levadas à bandeja do autoinjeter.

5.3.6 Preparo da Solução Tampão

A água destilada era filtrada por meio de filtração a vácuo, utilizando-se uma membrana filtrante do tipo PTFE com poros de 0,45 µm de diâmetro. Esta água era utilizada para o preparo de todas as soluções, da fase móvel e das fases móveis de limpeza da coluna cromatográfica. Para o preparo da solução tampão NaH₂PO₄ 0,03M, adicionava-se 1,7997 mg do pó a um balão de 500 mL, que era completado com água. Dependendo da quantidade que fosse necessária para o dia, eram preparados volumes menores ou maiores do que 500 mL. A quantidade de pó necessária para o preparo da solução a 0,03 M era encontrada por meio da fórmula da molaridade:

$$M \text{ (mol/L)} = m \text{ (g)} / MM \text{ (g/mol)} \times V \text{ (L)}$$

Onde, “M” é a molaridade ou massa molar, dada em mol/L. Neste caso a molaridade é 0,03 M. A massa é expressa em gramas, representada pela letra “m”. “MM” é a massa molar, que é 119,98 para o NaH₂PO₄. E, por último, “V” corresponde ao volume da solução, que corresponde ao volume do balão volumétrico, dado em litros (L).

5.3.7 Preparo da Fase Móvel

Numa proveta, media-se o volume necessário da solução tampão NaH₂PO₄ 0,03M, correspondente a 40% do total de fase. Adicionava-se o tampão a um balão, onde seria feita a agitação da fase. No balão contendo apenas o tampão, adicionava-se 0,4% de trietilamina, em relação ao volume total, com o auxílio de uma pipeta automática. Em seguida, adicionava-se também 0,4% de ácido fosfórico, tornando o pH do meio em torno de 2,5. No mesmo balão, adicionava-se o MeOH, grau HPLC, na quantidade correspondente a 60% do volume total. O pH ficava em torno de 3,5, então adicionava-se ácido fosfórico até o pH chegar em 2,8. Após a adição de cada um dos componentes, a solução era agitada dentro do balão. O pH era medido por meio de um pHmetro portátil. Depois de pronta, a solução era transferida para uma proveta e sonicada durante 10 minutos. Os parâmetros cromatográficos da solução padrão de CLX e timol para a fase móvel MeOH:NaH₂PO₄ (60:40), 0,4% trietilamina estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos da solução padrão.

<i>Parâmetros cromatográficos da solução padrão.</i>		
	Clorexidina	Timol
Tempo de retenção	6,4 minutos	22,6 minutos
Pureza do pico	1.00	1.00
Resolução	2.683	37.771
Fator de cauda	1.347	1.042
Pratos teóricos	6581.155	18080.740
Fator de capacidade (k')	1.478	7.739

Fonte: elaborada pela autora.

5.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO

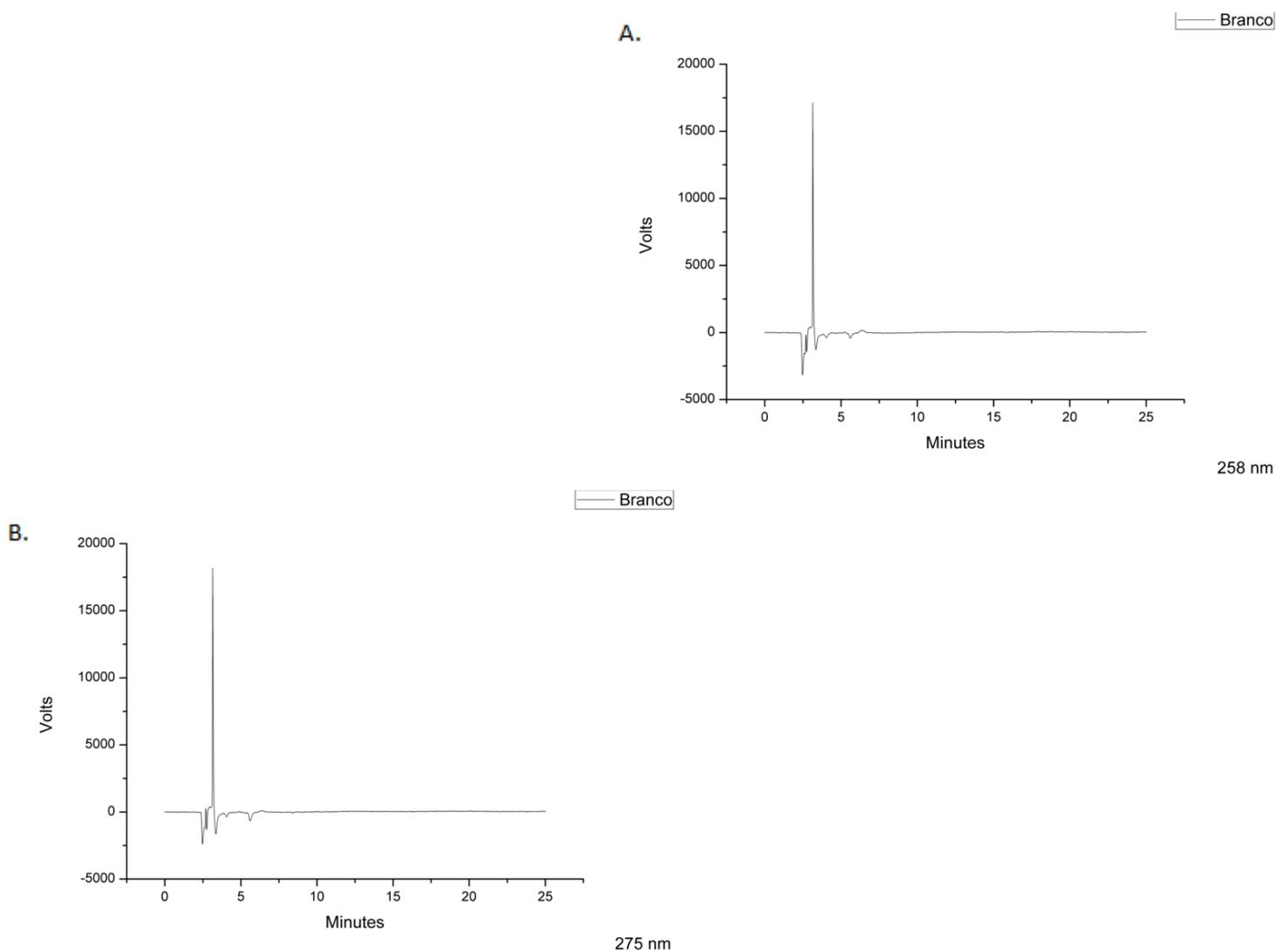
Foram avaliados os parâmetros de validação de acordo com os comprimentos de onda para cada um dos fármacos. A clorexidina foi avaliada no comprimento de onda de 258 nm e

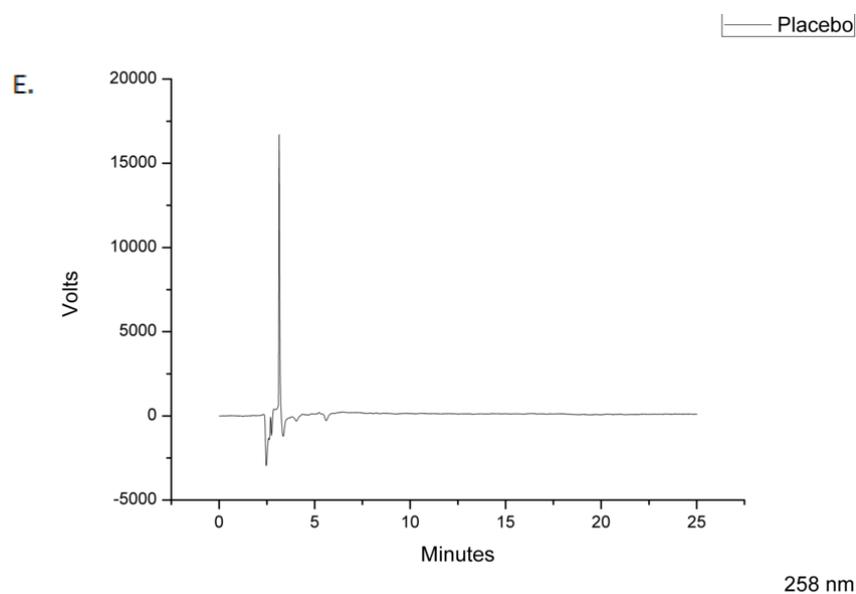
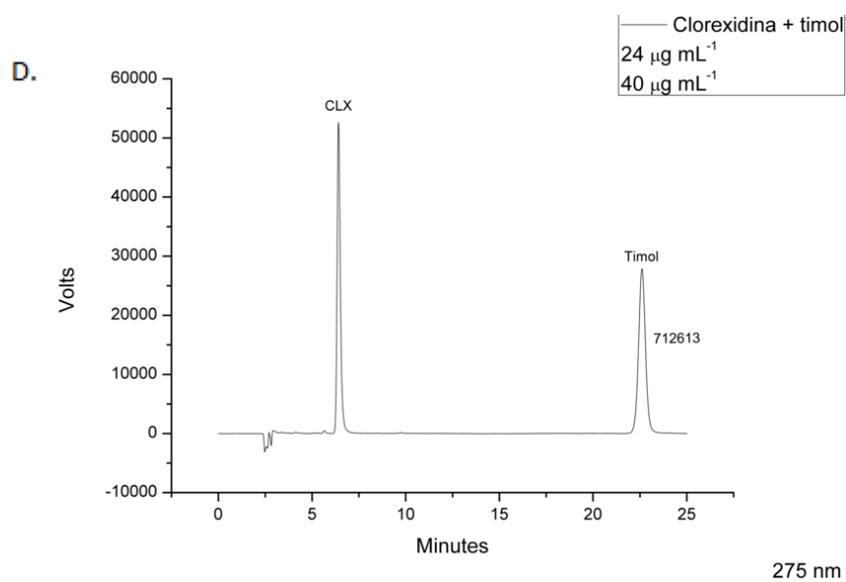
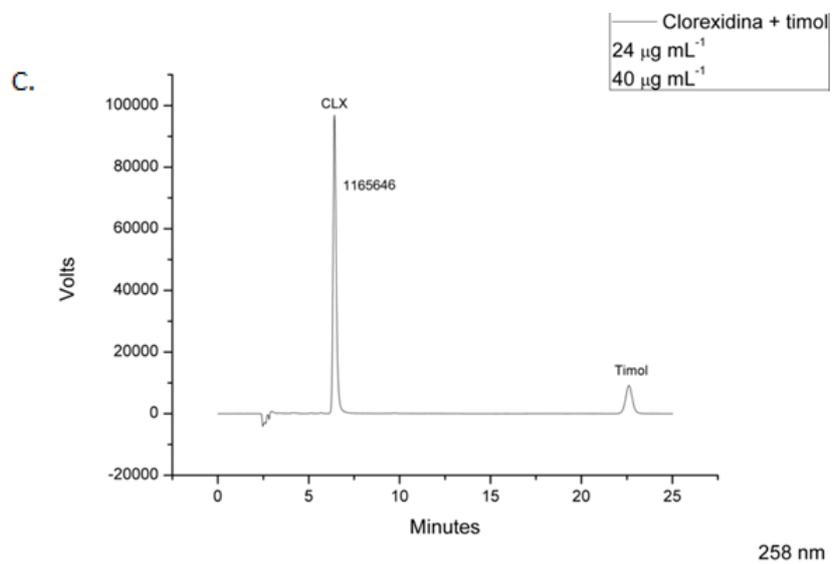
o timol foi em 275 nm. Em outras literaturas, podemos encontrar outros valores de comprimentos de absorção máxima para os ativos. As diferenças não variam muito e podem acontecer por conta de alguns fatores, como a alteração da temperatura, da dissolução ou até da interação com o solvente (BERBENNI et al., 2001).

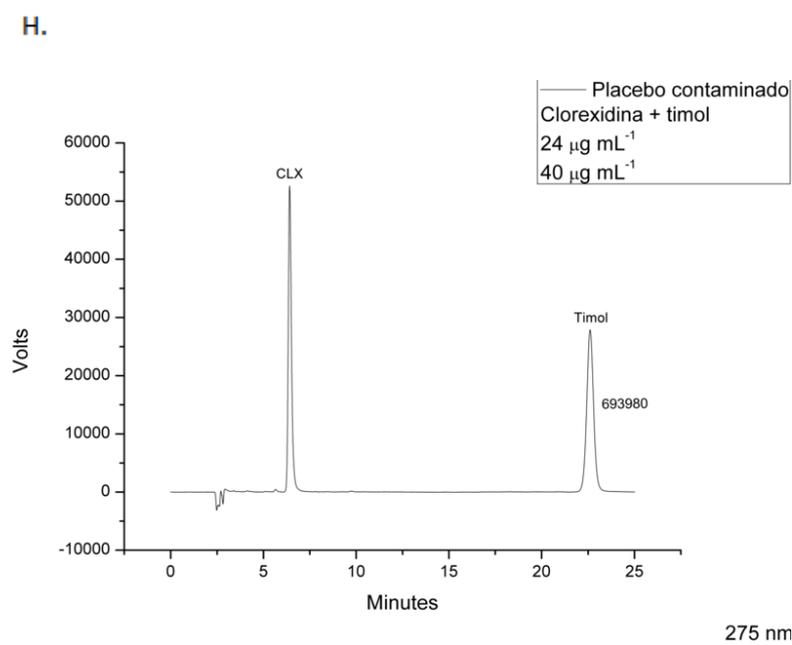
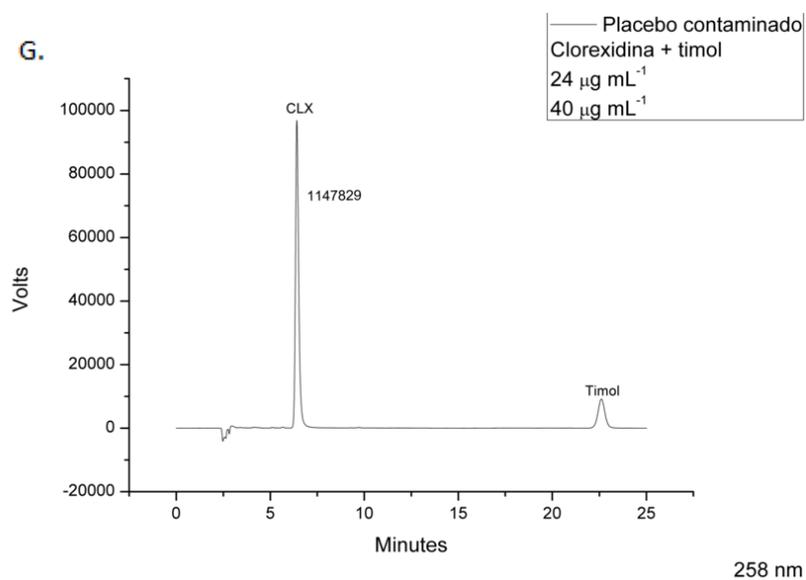
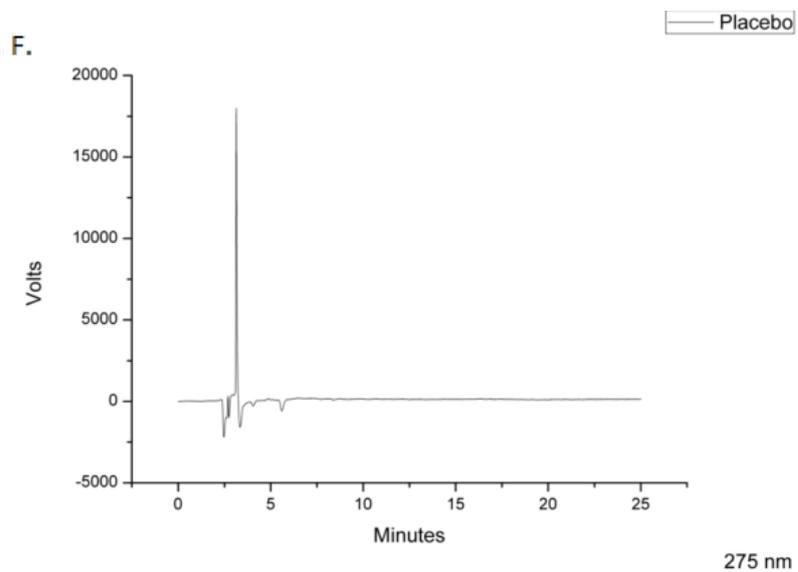
5.4.1 Seletividade

A especificidade mostrou que o método desenvolvido foi seletivo para os picos de timol e clorexidina. Os tempos de retenção da clorexidina e do timol foram, respectivamente, 7 ± 2 minutos e 22 ± 2 minutos. O tempo total de corrida foi de 25 minutos. Os excipientes usados para a preparação da micropartícula também não apresentaram interferência nos picos dos ativos, bem como a mistura de etanol:água (50:50) utilizada para a extração dos ativos da micropartícula. Os cromatogramas estão dispostos na Figura 12 A-H.

Figura 12 - Cromatogramas referentes à seletividade.







No método desenvolvido por Bottcher (2014), foi utilizado um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, modo isocrático de MeOH:água (63:37, v/v), com 4% de trietilamina, pH ajustado para 3,7 com ácido clorídrico, λ em 260 nm, injeção de $20 \mu\text{L}$, uma coluna de fase reversa do tipo Atlantis T3, com o forno na temperatura de 40°C e tempo de corrida em 18 minutos. Portanto, conseguimos um menor tempo de retenção para a clorexidina, utilizando uma proporção de 60% de MeOH. No trabalho de da Silva (2009), foi utilizado um método para a quantificação simultânea de CLX e lidocaína em gel urogenital. O método tem por fase móvel MeOH:água purificada (60 a 65%:40 a 35%), com 0,4% de trietilamina, pH ajustado para 3,5, com fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, $20 \mu\text{L}$ de injeção, coluna de fase reversa do tipo C18, à temperatura ambiente e tempo de retenção variando de acordo com a proporção de MeOH. O que tinha maior quantidade de metanol (65%) teve por tempo de retenção 6,4 minutos e o que tinha menor volume de MeOH (60%), teve 14,5 minutos como tempo de retenção. A quantidade de trietilamina foi dez vezes menor que a do primeiro trabalho citado e igual ao do segundo trabalho.

Provavelmente, o uso de tampão e da coluna C8, diminuiu um pouco a interação com a coluna em comparação aos outros métodos, permitindo uma eluição mais rápida e sem prejuízo na resolução e pureza do pico.

Em relação ao timol, obtivemos um tempo de retenção bem diferente ao que é relatado na literatura, porém isso se dá ao fato de que o método desenvolvido neste trabalho possui características extremamente diferentes dos métodos encontrados, bem como a FM e a FE. No trabalho de Moraes (2015), o timol foi introduzido em nanocápsulas para utilização como repelente de inseto, e a sua quantificação foi feita por meio de CLAE-DAD. Como fase móvel, foi utilizado acetonitrila:água, com ácido fosfórico 0,05% , modelo isocrático, pH 4,00 (60:40, v/v), volume de injeção $20 \mu\text{L}$, detecção em 276 nm, coluna cromatográfica do tipo C18, forno a 32°C , com tempo de retenção de ± 7 minutos para o timol. No trabalho de Leal et al (2003), a análise foi feita por CLAE-UV, com comprimento de onda (λ) em 254 nm, acetonitrila:água, (78:22, v/v), volume de injeção $20 \mu\text{L}$, coluna do tipo C18, com o tempo de retenção também em torno de 7 minutos. Neste caso, não seria um tempo de retenção interessante para esta análise, visto que coincide com o tempo de retenção que obtivemos para a CLX. E o comprimento de absorção máxima adotado seria mais próximo da clorexidina do que do próprio timol.

Ao se analisar os perfis cromatográficos do padrão, placebo, placebo contaminado e branco (diluyente), foi observado que não há nenhum tipo de interferência deles junto aos picos cromatográficos dos ativos em questão. Os resultados mostram que o método é específico para a análise da clorexidina e do timol na micropartícula.

5.4.2 Seletividade- Amostras Submetidas a Situações de Estresse

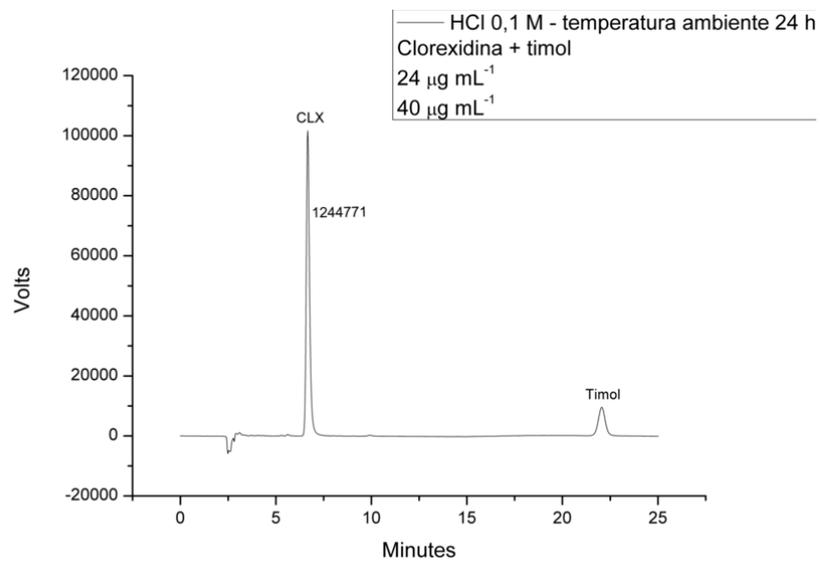
a) Meio ácido – 24 horas, temperatura ambiente e estufa 60°C.

Ao analisar os cromatogramas da Figura 13 (A e B), é possível observar que não houve diferença nos picos de clorexidina e timol quando eles foram submetidos a uma solução de HCl 0,1 M, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente pelo período de 24 horas, em relação ao padrão. Só houve um aumento na área dos dois picos, em seus respectivos λ . Este discreto aumento nos valores de área pode ser explicado pela possível evaporação do solvente durante o período de 24 horas, mesmo que a solução tenha sido acondicionada em frasco fechado.

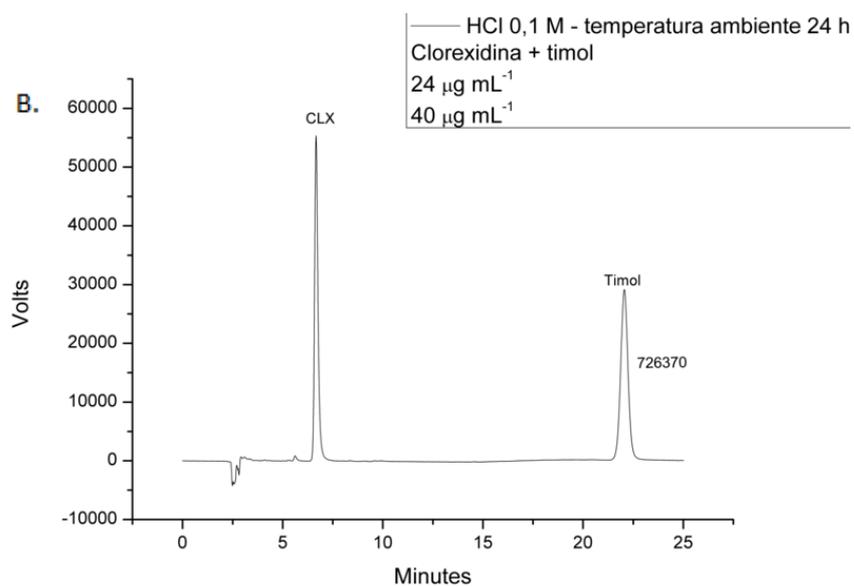
As Figuras 13C e 13D correspondem aos cromatogramas das soluções acondicionadas em meio ácido, temperatura de 60°C, ao abrigo de luz, num período de 24 horas. É possível observar que houve uma diminuição dos picos dos dois ativos, além disso também houve um aparecimento de um pico no tempo de 10 minutos, que corresponde a algum produto de degradação. O pico tem uma maior expressão quando submetido ao λ de 258 nm, o que mostra que possivelmente é um produto de degradação da clorexidina, gerado pela presença de calor. A Figura 13 (A) e (B) são os cromatogramas relacionados às amostras que ficaram em contato com meio ácido durante 24 horas, em temperatura ambiente. Os cromatogramas são representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm, respectivamente. As figuras (C) e (D) representam os cromatogramas das amostras que foram submetidas ao meio ácido durante 24 horas, na temperatura de 60°C. Os cromatogramas são representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm, respectivamente.

Figura 13 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos ao meio ácido

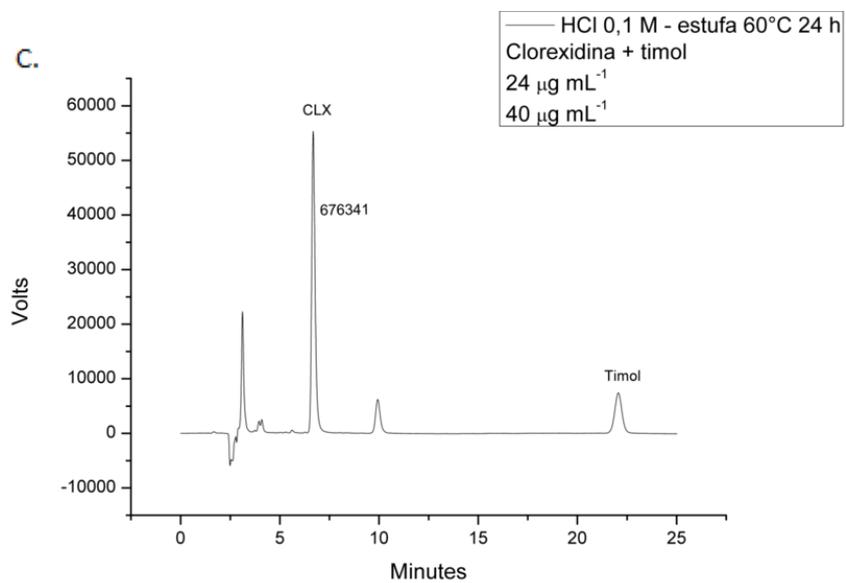
A.

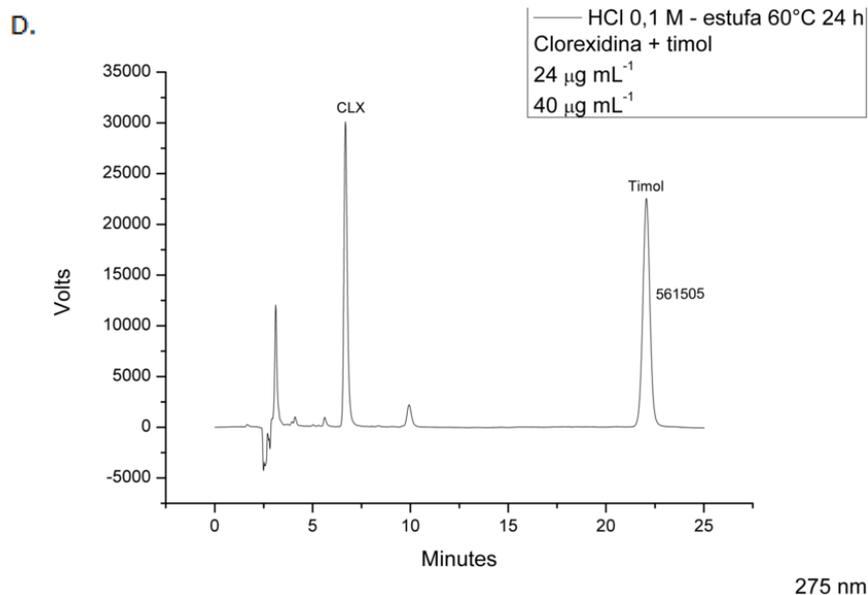


B.



C.





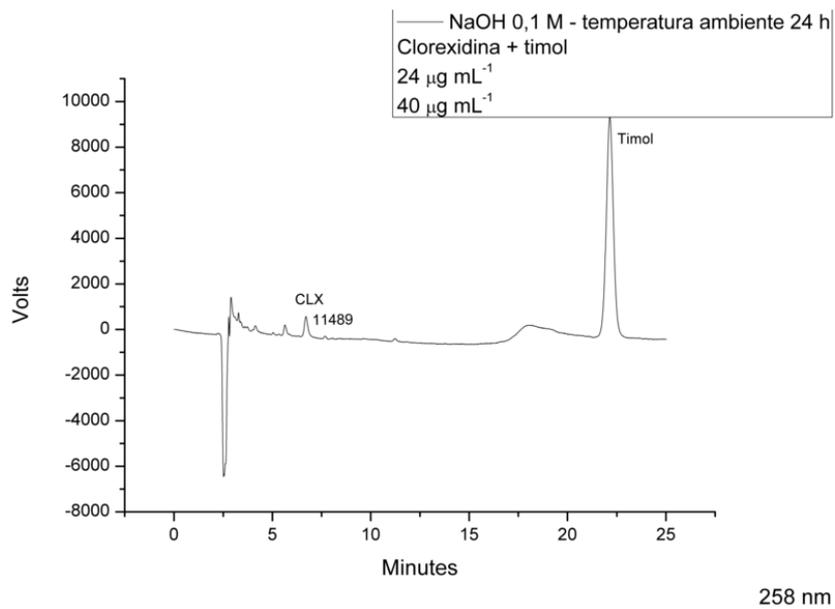
b) Meio básico – 24 horas, temperatura ambiente e estufa 60°C.

Em todos os cromatogramas apresentados na figura 14, é possível perceber a diminuição ou ausência completa do pico da clorexidina. Na presença de um meio básico, a clorexidina é degradada por completo. Em relação ao pico do timol, houve um discreto aumento quanto em temperatura ambiente, como também aconteceu em meio ácido.

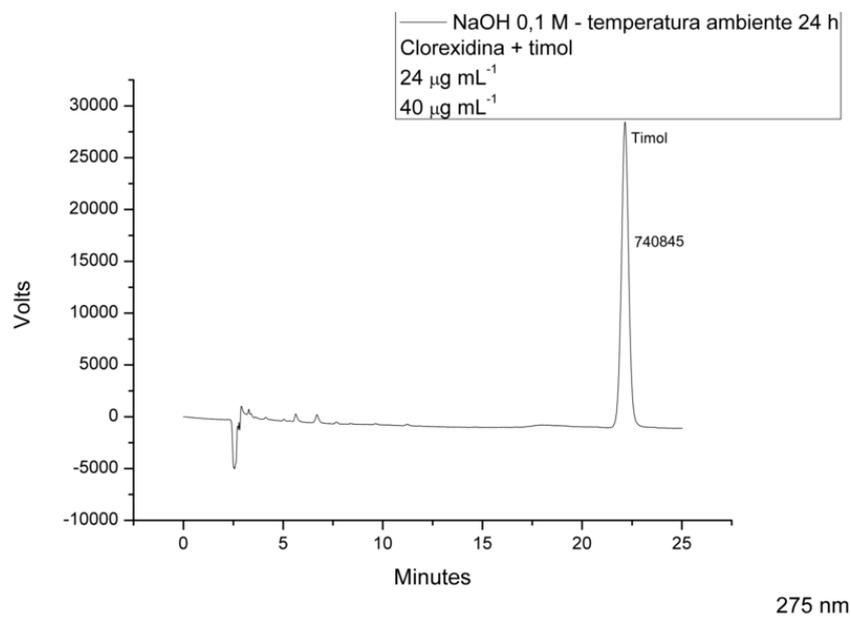
Quando em estufa, foi possível observar o aparecimento de dois picos na região entre 10 e 15 minutos, o primeiro deles tem uma expressão semelhante nos dois λ e o segundo deles tem uma maior expressão no de 275 nm. A Figura 14 (A) e (B) são os cromatogramas relacionados às amostras que ficaram em contato com meio básico durante 24 horas, em temperatura ambiente. Os cromatogramas são representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm, respectivamente. As figuras (C) e (D) representam os cromatogramas das amostras que foram submetidas ao meio básico durante 24 horas, na temperatura de 60°C. Os cromatogramas são representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm, respectivamente.

Figura 14 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos ao meio básico.

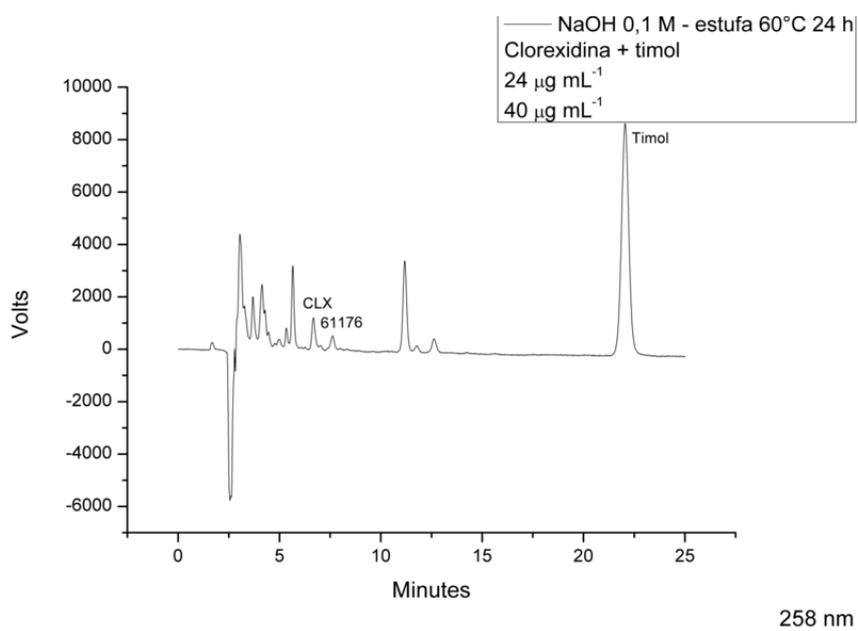
A.

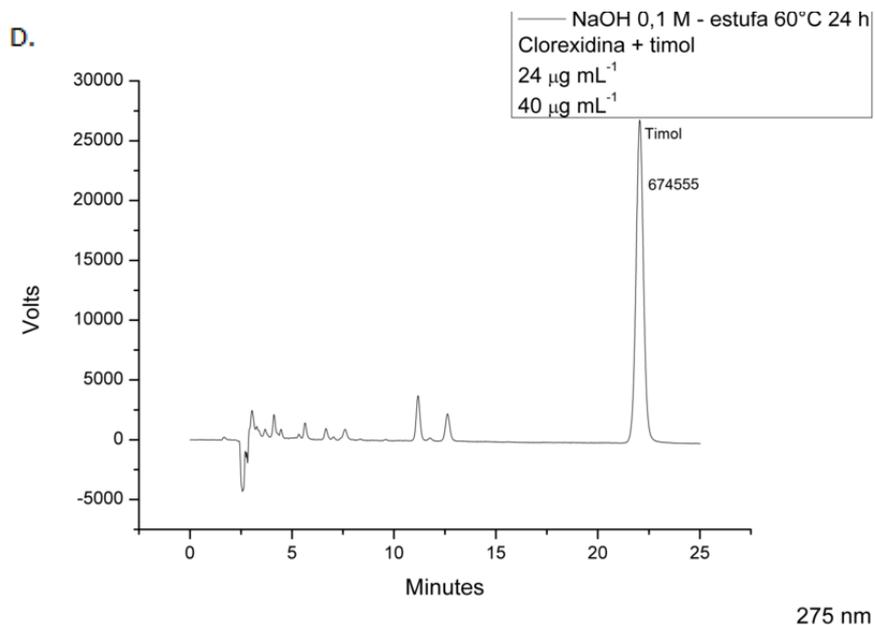


B.



C.

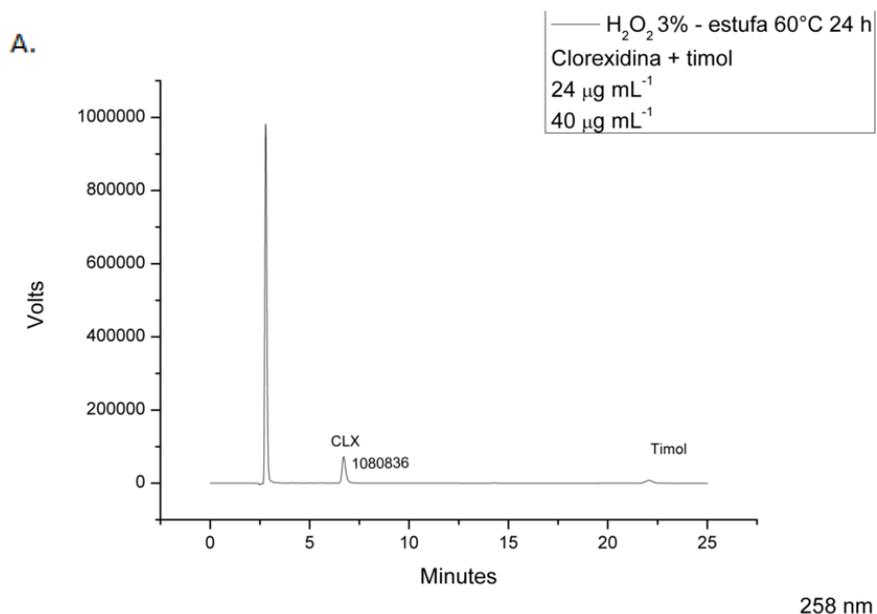


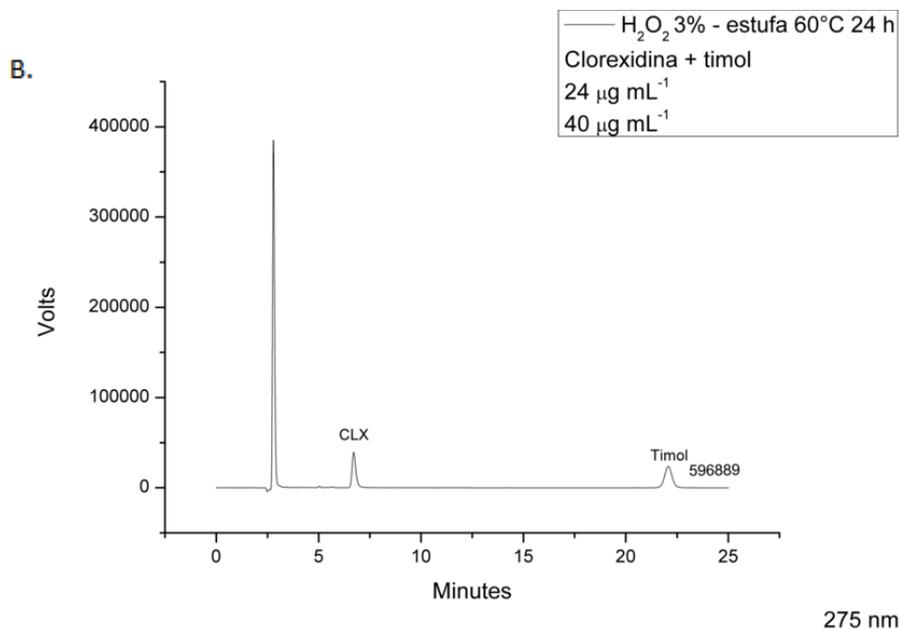


c) Meio oxidativo – 24 horas, temperatura ambiente, ao abrigo de luz.

Nas Figuras 15, foi possível observar uma leve diminuição nos picos dos ativos, mas sem o aparecimento de produtos de degradação. A imagem pode trazer picos menores em relação aos outros, o que acontece pela presença de um pico com uma intensidade bem maior próximo a 2,5 minutos, que deve corresponder à presença do meio oxidativo. A Figura 15 (A) e (B) são os cromatogramas são representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm, respectivamente.

Figura 15 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos ao meio oxidativo.

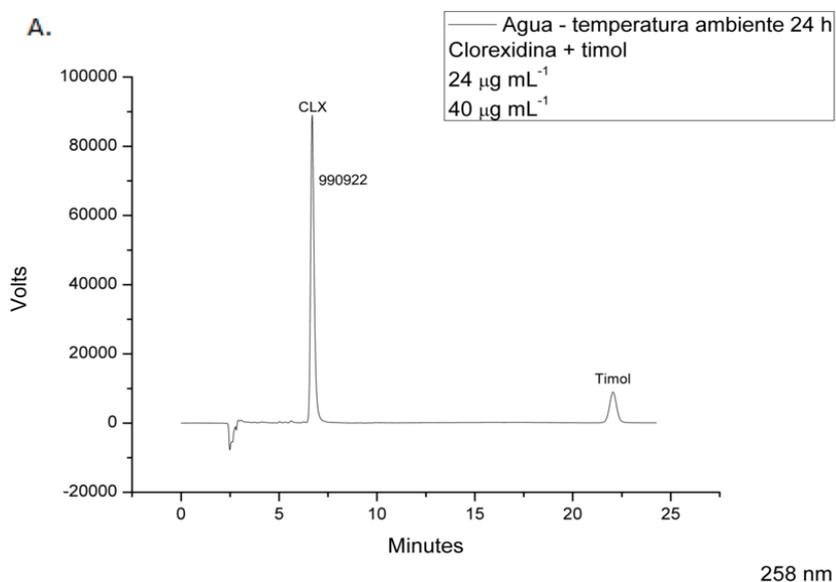


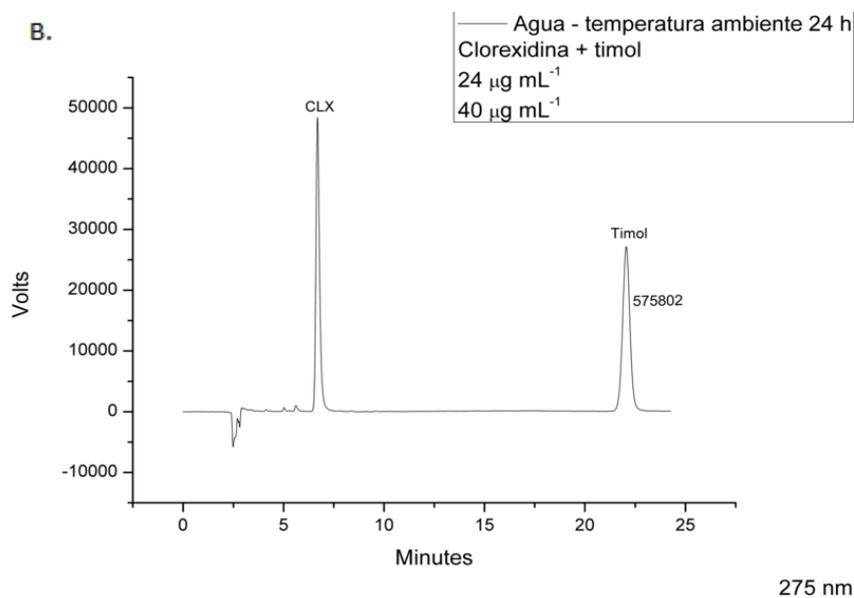


d) Meio neutro – 24 horas, estufa 60°C.

Os cromatogramas apresentados na Figura 16 mostram que não houve o aparecimento de picos de decomposição. Apenas aconteceu uma leve diminuição das concentrações dos ativos, que aconteceu em todas as amostras submetidas à temperatura de 60°C. A Figura 16 As Figuras (A) e (B) são os cromatogramas relacionados às amostras que ficaram em contato com meio básico durante 24 horas, em temperatura ambiente. Os cromatogramas são representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm, respectivamente. As figuras (C) e (D) representam os cromatogramas das amostras que foram submetidas ao meio neutro durante 24 horas, na temperatura de 60°C. Os cromatogramas são representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm, respectivamente.

Figura 16 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos ao meio neutro.

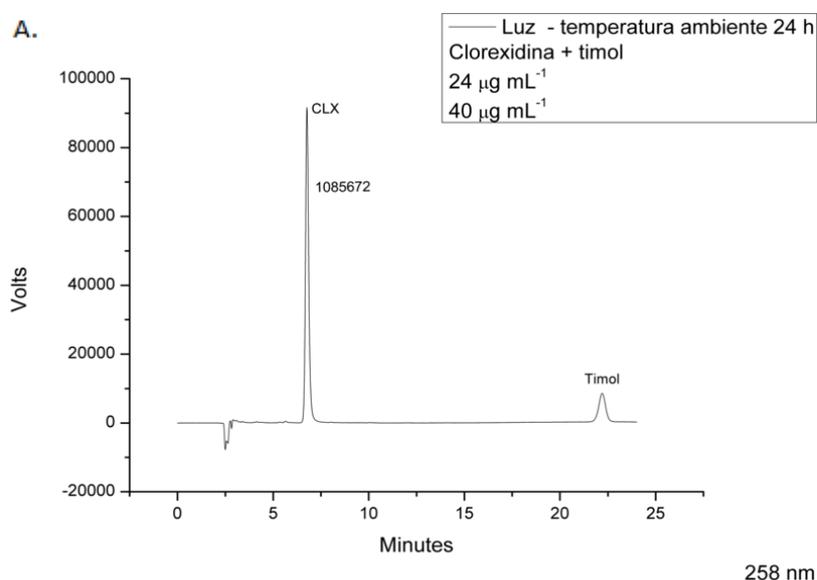


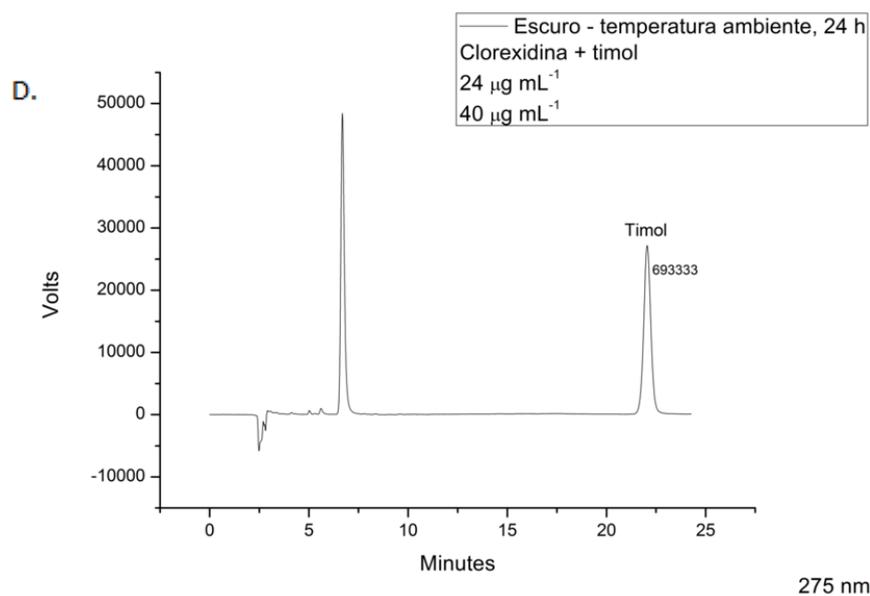
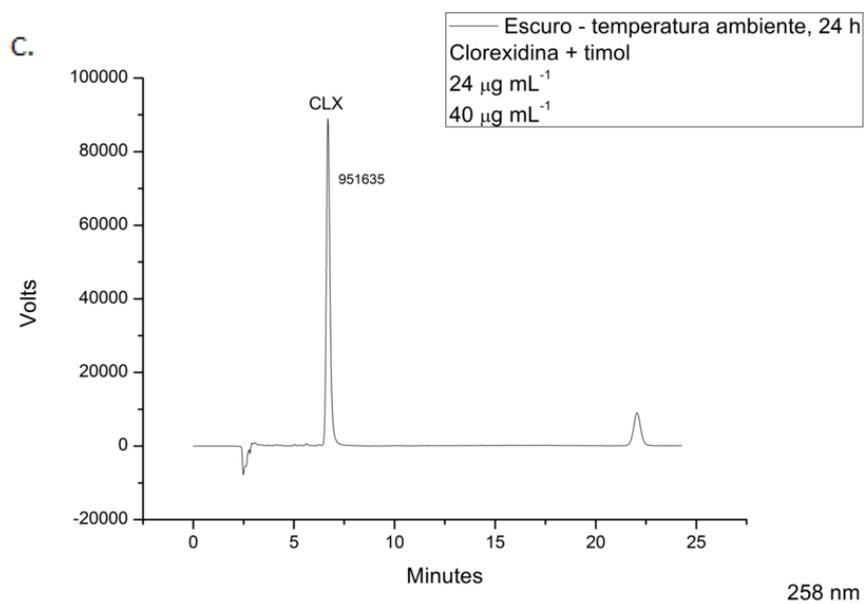
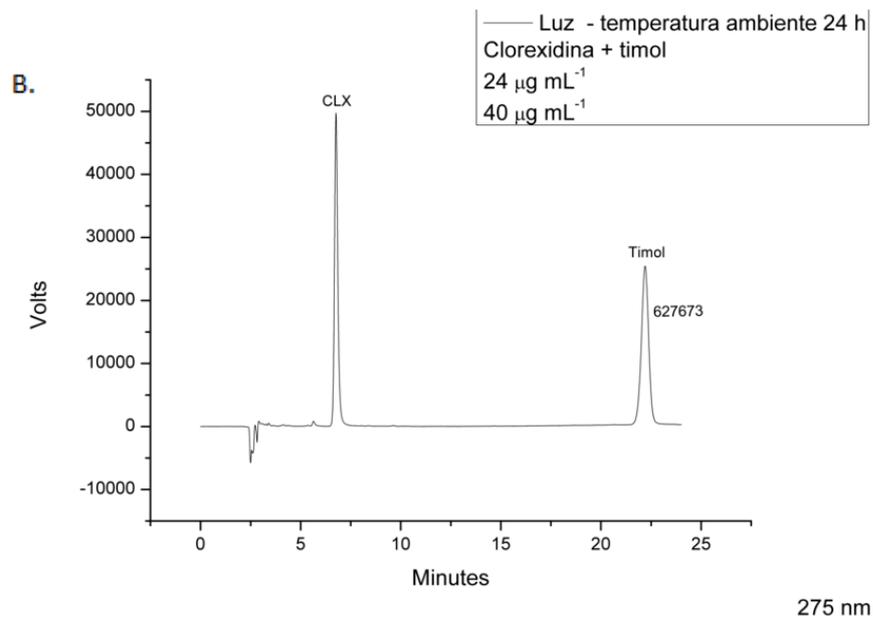


e) Presença e ausência de luz – 24 horas, temperatura ambiente.

Em nenhum dos cromatogramas (Figura 17) foi possível observar a presença deste ou de outros compostos de degradação. Apesar de que houve uma diminuição dos picos da clorexidina e do timol quando em presença de luz (Figura 1C) para este segundo, o fato pode ser explicado por sua elevada volatilidade (SOUZA; FERRAZ-FREITAS; OLIVEIRA, 2016). A Figura 17 (A) e (B) são os cromatogramas relacionados às amostras que ficaram em contato com a luz durante 24 horas, em temperatura ambiente. Os cromatogramas são representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm, respectivamente. As figuras (C) e (D) representam os cromatogramas das amostras que foram ao abrigo de luz durante 24 horas, em temperatura ambiente. Os cromatogramas são representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm

Figura 17 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos à luz e ao escuro.

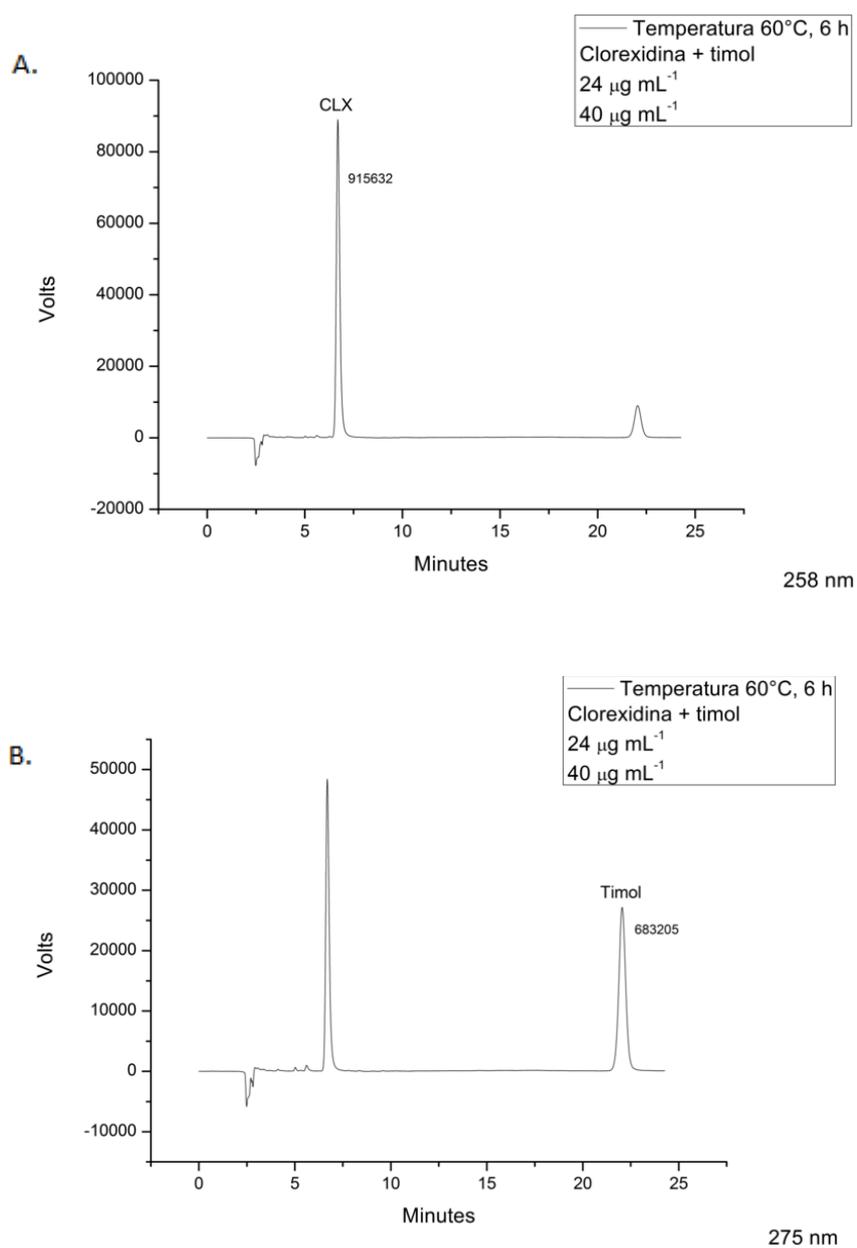




f) Temperatura – 6 horas, 60°C.

Não foi possível observar picos de degradação dos ativos quando submetidos à temperatura de 60°C durante 6 horas (figura 18). Houve apenas uma diminuição das áreas dos picos, que já era esperado, visto que eles foram submetidos à temperaturas mais altas, podendo causar volatilização. A Figura 18 temperatura de 60°C, durante 6 horas, ao abrigo da luz, em seus respectivos comprimentos de onda. As figuras (A) e (B) são os cromatogramas representados nos comprimentos de onda de 258 e 275 nm,

Figura 18 - Cromatogramas dos ativos quando submetidos à alta temperatura.



Foram observados picos de degradação apenas nas amostras submetidas ao meio ácido, quando em estufa e meio básico em qualquer condição de temperatura. A clorexidina é uma substância conhecida por sofrer degradação em presença de luz, se transformando em um composto conhecido como fenilbiguanida. Ela também sofre hidrólise, tendo como produto de degradação a *p*-cloroanilina e a *p*-clorofenilbiguanidina. Isso acontece porque o sítio biguanido é sensível à hidrólise na clorexidina. Em meio ácido, o produto formado é a guanilureia pela hidrólise, seguida de clivagem da dupla ligação C(2)=N(3). Esta clivagem forma a guanidina e a ureia. A clorexidina pode gerar um total de 12 produtos de degradação, mas soluções aquosas da clorexidina diluída são estáveis à temperatura ambiente (DA SILVA, 2009). Já o timol é uma substância altamente volátil, justificando a diminuição de área em alguns dos cromatogramas estudados. Em nenhum dos cromatogramas foi possível observar interações entre os produtos de degradação e os picos dos ativos nos comprimentos de onda estudados.

5.4.3 Linearidade

A linearidade foi realizada por meio da injeção da CLX nas concentrações de 6 a 42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e do timol nas concentrações de 10 a 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida a partir do ajuste de regressão linear, obtendo-se a equação da reta para cada uma das substâncias (Tabela 7). O volume de injeção foi de 20 μL para todas as leituras, com a análise realizada em triplicata. As soluções foram preparadas a partir da solução estoque de cada um dos analitos.

Tabela 7 - Concentrações utilizadas na linearidade de clorexidina e timol.

Tabela: Concentrações utilizadas na linearidade de clorexidina e timol, respectivamente, para o método desenvolvido ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
%	25	50	75	100	125	150	175
Clorexidina	6,0	12	18	24	30	36	42
Timol	10	20	30	40	50	60	70

Fonte: elaborada pela autora.

Clorexidina

Tabela 8 - Áreas de pico da clorexidina.

<i>Áreas do pico da clorexidina em diferentes concentrações (258 nm)</i>							
Curvas	6,0	12	18	24	30	36	42
C1	263327	537754	809019	1077429	1338659	1605606	1868164
C2	263438	535565	807466	1073934	1343734	1605777	1885543
C3	265596	536195	805985	1082293	1335555	1607375	1867670
CV%	0,48	0,21	0,19	0,39	0,31	0,06	0,54
*p-value	0,623						
**F	0,491						

*Valores estatisticamente diferentes para p-value $\leq 0,05$. **F (F calculado) F crítico (3,885).

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 19 - Gráfico da linearidade da clorexidina.

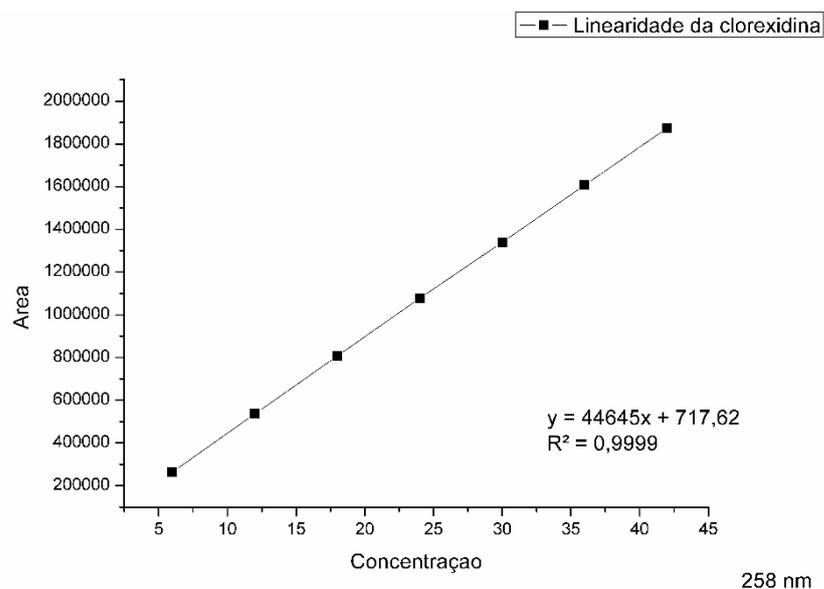
*Timol*

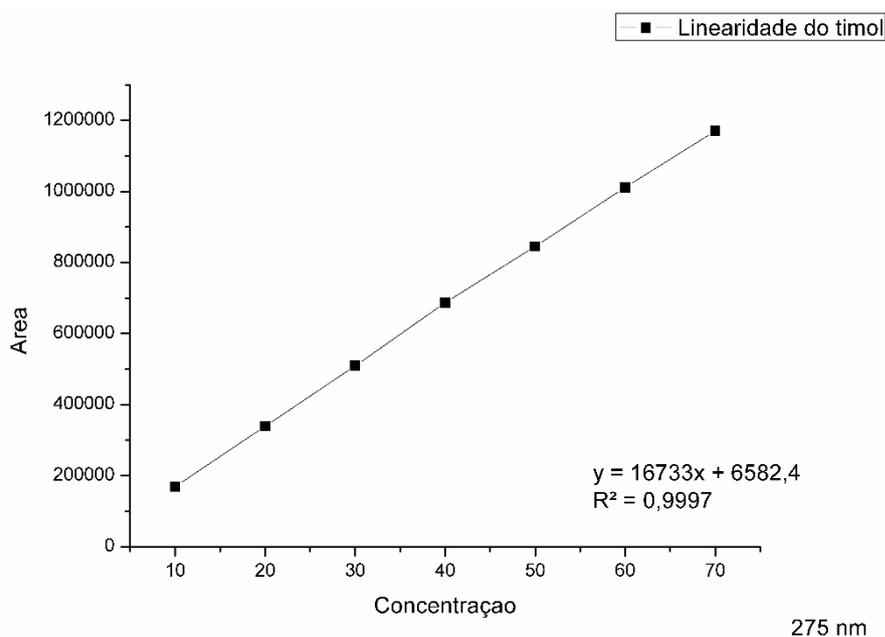
Tabela 9 - Áreas de pico do timol.

<i>Áreas do pico do timol em diferentes concentrações (275 nm)</i>							
Curvas	10	20	30	40	50	60	70
C1	170217	340107	509749	683587	843698	1011581	1174133
C2	169399	339023	510790	690030	847539	1013322	1170260
C3	167567	338220	506061	687876	844022	1010308	1166624
CV%	0,8	0,28	0,49	0,48	0,25	0,15	0,32
*p-value	0,076						
**F	3,21						

*Valores estatisticamente diferentes para p-value $\leq 0,05$. **F (F calculado) F crítico (3,885).

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 20 - Gráfico da linearidade do timol.



A RE ANVISA 166/2017 (BRASIL, 2017) determina que o coeficiente de regressão linear (r^2) deve ser superior a 0,990. O coeficiente de correlação apresenta uma faixa que varia entre $-1 \leq r \leq 1$. Quanto mais próximo de -1 ou +1, menor será o erro em y. Quando o valor de r for -1, os pontos estão numa reta com inclinação negativa e o +1 corresponde a uma inclinação positiva. Os limites inferiores de quantificação e os limites de detecção foram calculados de acordo com os dados da linearidade e expressos na seguinte Tabela (Valores dos coeficientes de correlação, equações da curva de calibração, limites de detecção (LD) e limites inferiores de quantificação (LIQ) expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$ da CLX e timol, respectivamente).

Tabela 10 - Dados obtidos pelo parâmetro de linearidade da CLX e do timol.

<i>Dados obtidos pelo parâmetro de linearidade da CLX e do timol</i>					
	r^2	Coef. de correlação	Equação da curva	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LIQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Clorexidina	0,9999	0,9999	$y = 44645x + 717,62$	0,378	1,147
Timol	0,9997	0,9998	$y = 16733x + 6582,4$	1,224	3,709

De acordo com os resultados, é possível afirmar que o método possui uma correlação linear. Os resultados foram diretamente proporcionais às diferentes concentrações dos

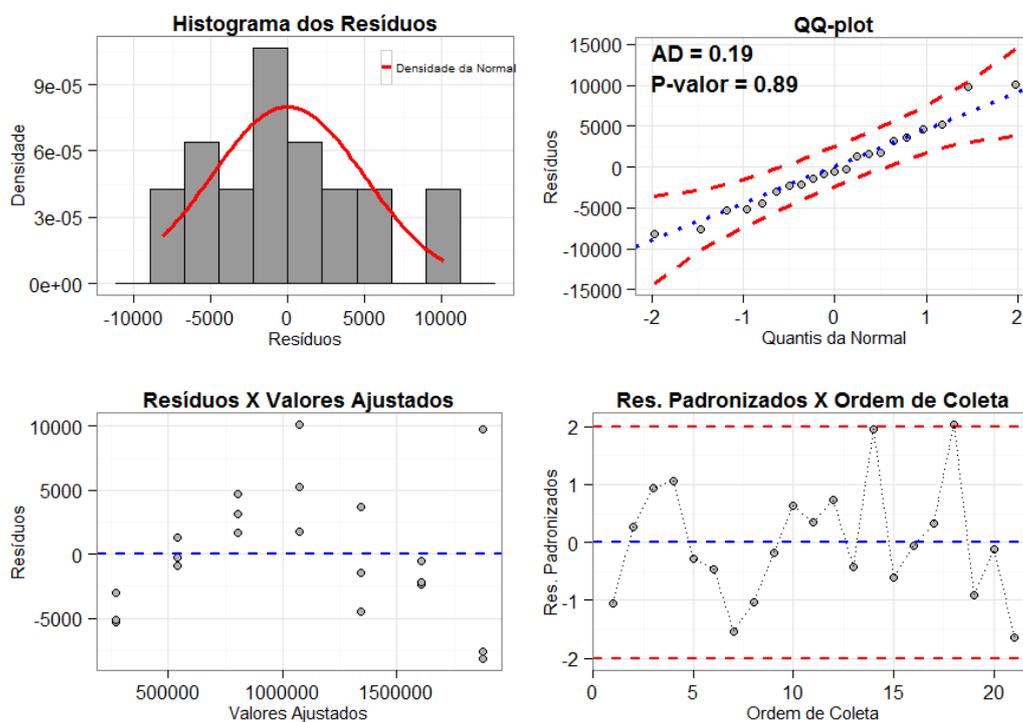
analitos, visto que o coeficiente de correlação encontrado para a CLX foi de 0,9999 e para o timol foi de 0,9998, pelo método utilizando CLAE-DAD. Os gráficos de resíduos também mostram uma homocedasticidade para os dois analitos, confirmando os dados do coeficiente de correlação obtidos nas curvas de calibração.

5.4.3.1 Diagnóstico dos resíduos

Apenas o valor do coeficiente de correlação não é o suficiente para garantir a adequação do ajuste linear, utiliza-se, então, a análise do gráfico de resíduos. A análise deste gráfico nos permite detectar problemas, como desvio da linearidade. Apresenta coeficiente de correlação dentro do preconizado, aqueles gráficos que possuem resíduos com homocedasticidade, ou seja, resíduos distribuídos de forma uniforme e variância constante (RIBEIRO, FERREIRA, 2008).

Figura 21 - Gráfico da análise de resíduos da clorexidina.

Clorexidina



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 11 - Teste de Normalidade para a clorexidina.

	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,1915	0,8853

Fonte: elaborada pela autora.

Como P-valor (0,8853) do teste de Anderson-Darling é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%.

Tabela 12 - Teste de Homocedasticidade - Brown Forsythe – clorexidina.

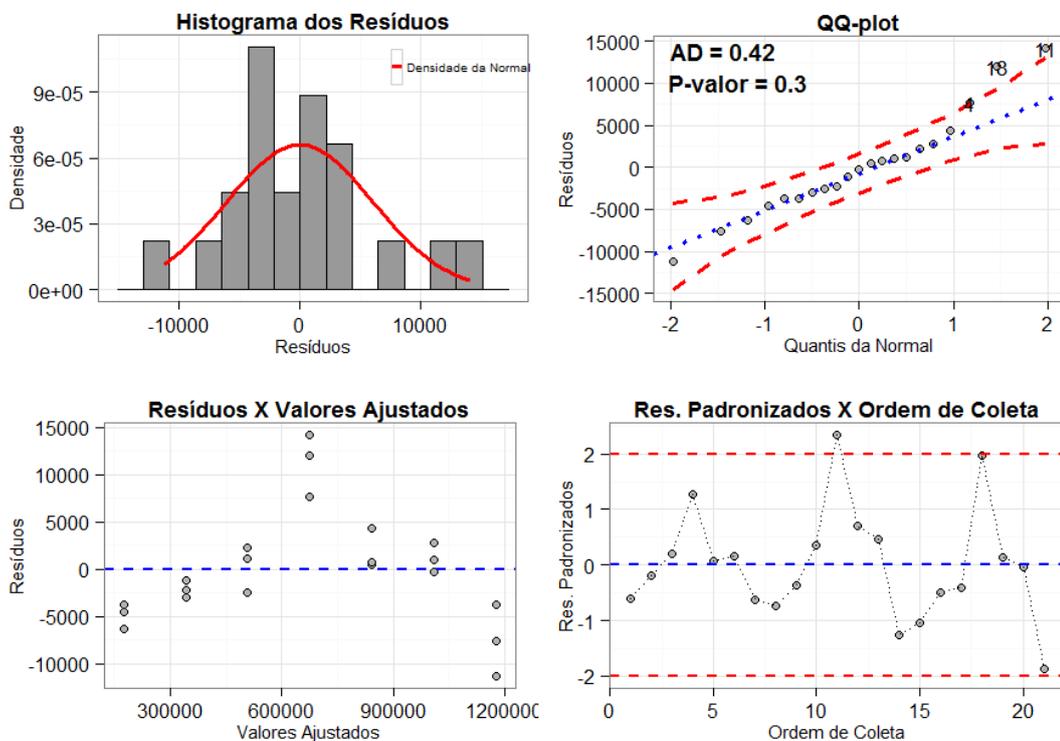
	Estatística	G.L.Num.	G.L.Den.	P-valor
Concentracao	0,7005	6	14	0,6541

Fonte: elaborada pela autora.

Como P-valor (0,6541) do Teste de Brown-Forsythe é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade da variância ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico.

Figura 22 - Gráfico da análise de resíduos do timol.

Timol



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 13 - Teste de Normalidade para o timol.

	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,418	0,2996

Fonte: elaborada pela autora.

Como P-valor (0,2996) do teste de Anderson-Darling é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%.

Tabela 14 - Teste de Homocedasticidade - Brown Forsythe – timol.

	Estatística	G.L.Num.	G.L.Den.	P-valor
Concentracao	0,5307	6	14	0,7763

Fonte: elaborada pela autora.

Como P-valor (0,7763) do Teste de Brown-Forsythe é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade das variância ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico.

5.4.4 Precisão

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre os resultados dos ensaios utilizando um dado método analítico. Ela deve ser expressa por meio da repetibilidade e precisão intermediária ou reprodutibilidade. A repetibilidade é avaliada com análises de três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas em cada nível, também pode ser feito seis réplicas no nível de 100%. A reprodutibilidade é feita pela repetição da mesma análise, no mesmo laboratório, num dia diferente e com um operador diferente (BRASIL, 2017).

5.4.4.1 Precisão da Matéria-Prima (M-P)

A precisão da matéria-prima foi avaliada com as soluções dos ativos na sua forma livre. Os valores de área, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%) das repetições para os dois dias estão dispostos nas Tabelas de 15 a 20. As concentrações das amostras foram calculadas por meio da comparação da área do pico da amostra, com a média das áreas do padrão de concentração conhecida, que são os valores de adequabilidade.

Para a obtenção dos resultados de repetibilidade, foi feita a leitura de nove amostras no primeiro dia, sendo três na concentração baixa, três na média e três na alta. Entre as três amostras diferentes de cada nível, os valores de coeficiente de variação foram 1,17%, 0,88% e 0,17%, respectivamente (Tabela 15). Os valores de CV menor do que 5% confirmam a repetibilidade do método no primeiro dia. O mesmo acontece para o timol, onde os valores do CV no primeiro dia foram 0,43%, 3,33% e 1,73% (Tabela 18). No segundo dia, foi repetida a mesma análise, no mesmo laboratório, com outro operador. Foram comparados os valores das concentrações nos três níveis dos dois dias de análise. Os valores de CV encontrados para a clorexidina na comparação entre os dois dias foram 2,70%, 1,85% e 3,03% e para o timol foram 0,63%, 2,28% e 1,13%. O método também atendeu aos critérios de precisão intermediária, visto que houve concordância entre os resultados dos dois dias, os valores estão dispostos nas Tabelas 17 e 20.

Clorexidina

Tabela 15 - Valores da precisão 1 da clorexidina (M-P).

<i>Precisão M-P 1- Concentrações da clorexidina nos três níveis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
Nível de concentração	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N1	10,21	24,01	34,95
N2	10,40	23,69	34,91
N3	10,51	23,50	34,81
CV%	1,17	0,88	0,17
Média \pm DP	10,37\pm0,12	23,73\pm0,21	34,89\pm0,058

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 16 - Valores da precisão 2 da clorexidina (M-P).

<i>Precisão M-P 2- Concentrações da clorexidina nos três níveis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
Nível de concentração	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N4	10,47	24,60	37,06
N5	11,03	23,62	37,44
N6	10,17	24,58	36,52
CV%	3,37	1,88	1,02
Média \pm DP	10,56\pm0,36	24,26\pm0,46	37,00\pm0,38

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 17 - Valores da precisão interdia da clorexidina.

<i>Precisão M-P interdia- Concentrações da clorexidina nos três níveis nos dois dias ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
Nível de concentração	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N1	10,21	24,01	34,95
N2	10,40	23,69	34,91
N3	10,51	23,50	34,81
N4	10,47	24,01	34,95
N5	11,03	23,69	34,91
N6	10,17	23,50	34,81
CV%	2,70	1,85	3,03
Média \pm DP	10,46\pm0,28	24,00\pm0,45	35,95\pm1,09

Fonte: elaborada pela autora.

Timol

Tabela 18 - Valores da precisão 1 do timol (M-P).

<i>Precisão M-P 1- Concentrações do timol nos três níveis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
Nível de concentração	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N1	19,80	40,95	59,23
N2	19,82	40,57	61,08
N3	19,95	38,47	59,35
CV%	0,43	3,33	1,73
Média \pm DP	19,86\pm0,08	39,99\pm1,33	59,89\pm1,03

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 19 - Valores da precisão 2 do timol.

<i>Precisão M-P 2- Concentrações do timol nos três níveis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
Nível de concentração	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N4	20,12	40,37	59,69
N5	20,03	39,39	59,89
N6	20,02	40,34	60,21
CV%	0,27	1,40	1,73
Média \pm DP	20,06\pm0,05	40,03\pm0,56	59,93\pm0,26

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 20 - Valores da precisão interdia do timol.

<i>Precisão interdia M-P- Concentrações do timol nos três níveis nos dois dias ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
Nível de concentração	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N1	19,80	40,95	59,23
N2	19,82	40,57	61,08
N3	19,95	38,47	59,35
N4	20,12	40,37	59,69
N5	20,03	39,39	59,89
N6	20,02	40,34	60,21
CV%	0,63	2,28	1,13
Média \pm DP	19,96\pm0,13	40,02\pm0,91	59,91\pm0,67

5.4.4.2 Precisão do Produto (PD)

A precisão do produto foi feita da mesma forma da precisão da matéria-prima, porém as amostras utilizadas não foram os padrões, mas sim placebos contaminados, visto que estaria simulando a análise da micropartícula. As amostras foram submetidas ao processo de extração, mencionado anteriormente. Foram também preparadas três amostras em cada um dos níveis baixo, médio e alto, para a análise da repetibilidade. E as mesmas análises foram repetidas no mesmo laboratório, mas com operador e dia diferentes. Também foram avaliados os valores de CV% de cada um dos níveis para cada um dos ativos.

Os valores de CV para a clorexidina no primeiro dia foram 2,4%, 2,7% e 1,91% (Tabela 21). Respectivamente para cada um dos três níveis. Para o timol, temos 2,13%, 1,31% e 2,35%, também para os três níveis (Tabela 24). Os resultados nos mostram que há repetibilidade do método desenvolvido para a extração dos ativos da micropartícula. Os valores interdia da precisão também nos trazem concordância entre os resultados. Os valores de CV para a clorexidina foram 2,69%, 2,79% e 2,41%, e para o timol 2,11%, 2,21% e 2,50%. Todos os valores se encontram abaixo de 5%, que é o valor máximo permitido de coeficiente de variação. Segundo os resultados, o método utilizado para extração foi coerente quanto à exatidão. Todos os valores estão dispostos nas Tabelas 23 e 26.

Clorexidina

Tabela 21 - Valores da precisão 1 do placebo contaminado com clorexidina (PD).

<i>Precisão PD 1- Concentrações da clorexidina nos três níveis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
Nível de concentração	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N1	11,63	23,30	36,89
N2	11,44	24,57	38,00
N3	11,99	24,21	38,26
CV%	2,4	2,7	1,91
Média \pm DP	11,69\pm0,28	24,03\pm0,66	37,71\pm0,72

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 22 - Valores da precisão 2 do placebo contaminado com clorexidina (PD).

<i>Precisão PD 2- Concentrações da clorexidina nos três níveis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
Nível de concentração	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N4	12,08	23,59	39,40
N5	11,47	23,24	37,59
N6	12,15	24,79	37,07
CV%	3,16	3,42	3,21
Média \pm DP	12,21\pm0,13	23,83\pm0,71	38,02\pm0,24

Fonte: elaborada pela autora..

Tabela 23 - Valores da precisão interdia da clorexidina (PD).

<i>Precisão PD interdia- Concentrações da clorexidina nos três níveis nos dois dias ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
Nível de concentração	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N1	11,63	23,30	36,89
N2	11,44	24,57	38,00
N3	11,99	24,21	38,26
N4	12,08	23,59	39,40
N5	11,47	23,24	37,59
N6	12,15	24,79	37,07
CV%	2,69	2,79	2,41
Média \pm DP	11,80\pm0,32	23,95\pm0,67	37,87\pm0,91

Fonte: elaborada pela autora.

Timol

Tabela 24 - Valores da precisão 1 do timol (PD).

<i>Precisão PD 1- Concentrações do timol nos três níveis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N1	20,45	39,59	59,84
N2	19,74	40,31	62,22
N3	20,51	40,61	62,45
CV%	2,13	1,31	2,35
Média \pm DP	20,23\pm0,43	40,17\pm0,53	61,50\pm1,45

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 25 - Valores da precisão 2 do timol (PD).

<i>Precisão PD 2- Concentrações do timol nos três níveis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N4	19,41	39,28	60,19
N5	20,03	41,61	63,56
N6	20,12	41,16	60,20
CV%	1,96	3,04	3,17
Média \pm DP	19,85\pm0,39	40,68\pm1,24	61,31\pm1,94

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 26 - Valores da precisão interdia do timol (PD).

<i>Precisão interdia PD- Concentrações do timol nos três níveis nos dois dias ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>			
	Baixa (50%)	Média (100%)	Alta (150%)
N1	20,45	39,59	59,84
N2	19,74	40,31	62,22
N3	20,51	40,61	62,45
N4	19,41	39,28	60,19
N5	20,03	41,61	63,56
N6	20,12	41,16	60,20
CV%	2,11	2,21	2,50
Média \pm DP	20,04\pm0,42	40,43\pm0,89	61,41\pm1,53

Fonte: elaborada pela autora.

5.4.5 Exatidão

A exatidão diz respeito ao grau de concordância entre os resultados individuais do método em relação ao valor considerado verdadeiro. É feita a partir de nove determinações de acordo com o intervalo linear do método, sendo três no nível baixo, três no médio e três no alto, com três réplicas em cada nível. A recuperação nos dá a informação da quantidade real da substância contida na amostra e é por meio dela que se calcula a exatidão. Abaixo, encontramos os valores de recuperação da clorexidina e do timol tanto de forma livre, como contaminando o placebo. A RDC 166/2017 preconiza que os valores de recuperação devem estar de acordo com o objetivo do método. O nosso objetivo era conseguir uma maior extração dos ativos da matriz e, conseqüentemente, uma maior recuperação. Então, quanto mais próximo de 100%, melhor o resultado. Todos os valores de recuperação estão bem próximos ao valor de 100%, tanto para a matéria-prima, quanto para o produto. Os resultados estão dispostos na Tabela abaixo.

5.4.5.1 Exatidão da M-P

Tabela 27 - Valores de exatidão da clorexidina (M-P).

<i>Recuperação da M-P nos três níveis de concentração da clorexidina</i>					
Nível %	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área média	Concentração experimental média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor médio (%)	CV%
50	12	508086	10,58	88,19	2,70
100	24	1165198	24,27	101,13	1,85
150	36	1745313	36,35	100,98	3,03

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 28 - Valores de exatidão do timol (M-P).

<i>Recuperação da M-P nos três níveis de concentração do timol</i>					
Nível %	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área média	Concentração experimental média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor médio (%)	CV%
50	20	347349	19,96	99,80	0,63
100	40	696388	40,02	100,04	2,28
150	60	1042551	59,91	99,85	1,13

Fonte: elaborada pela autora.

5.4.5.2 Exatidão do PD

Tabela 29 - Valores de exatidão da clorexidina (PD).

<i>Recuperação do PD nos três níveis de concentração da clorexidina</i>					
Nível %	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹⁾	Área média	Concentração experimental média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor médio (%)	CV%
50	12	567887	11,80	98,21	2,69
100	24	1153420	23,95	99,81	2,79
150	36	1822953	37,87	105,19	2,41

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 30 - Valores de exatidão do timol (PD)

<i>Recuperação do PD nos três níveis de concentração do timol</i>					
Nível %	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área média	Concentração experimental média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor médio (%)	CV%
50	20	357423	20,04	100,22	2,11
100	40	720906	40,43	101,07	2,21
150	60	1095017	61,41	102,35	2,50

Fonte: elaborada pela autora.

5.4.6 Robustez

A robustez é o parâmetro utilizado para indicar a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017). As variações utilizadas para a análise da robustez foram: mudança do pH da fase ($2,8 \pm 0,1$), mudança de fluxo ($0,8 \pm 0,1 \text{ mL min}^{-1}$) e mudança das proporções de solvente da fase móvel ($60 \pm 2\%$ de MeOH). As variações foram avaliadas uma de cada vez, ou seja, para a análise de cada parâmetro, os outros não eram alterados.

5.4.6.1 Robustez da M-P

Na robustez da matéria-prima adicionamos mais um parâmetro de comparação, que foi a utilização de duas colunas do tipo C8 de marcas diferentes.

Clorexidina

Tabela 31 - Valores de concentração da clorexidina na robustez (M-P).

Dados da CLX para as mudanças de parâmetros				
Condição	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV%	Teor (%)	CV%
Fluxo 0,7 mL min ⁻¹	23,51	2,62	97,98	2,62
Fluxo 0,9 mL min ⁻¹	24,26	1,26	101,10	1,26
MeOH 58%	24,07	0,27	100,29	0,27
MeOH 62%	23,63	1,92	98,48	1,92
pH 2,7	23,22	2,96	96,75	2,96
pH 2,9	22,95	3,95	95,64	3,95

Fonte: elaborada pela autora.

Timol

Tabela 32 - Valores de concentração do timol na robustez (M-P).

Dados do timol para as mudanças de parâmetros				
Condição	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV%	Teor (%)	CV%
Fluxo 0,7 mL min ⁻¹	39,99	0,03	99,99	0,03
Fluxo 0,9 mL min ⁻¹	40,12	0,31	100,31	0,31
MeOH 58%	40,06	0,17	100,16	0,17
MeOH 62%	40,10	0,24	100,25	0,24
pH 2,7	39,99	0,22	99,98	0,22
pH 2,9	40,00	0,02	100,01	0,02

Fonte: elaborada pela autora.

5.4.6.2 Robustez do PD

A robustez para o produto foi feita utilizando-se amostras de placebo contaminado, que passaram por um processo de extração. Os dados estão expressos nas Tabelas 33 e 34.

Clorexidina

Tabela 33 - Valores de concentração da clorexidina na robustez (PD).

Dados da CLX para as mudanças de parâmetros				
Condição	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV%	Teor (%)	CV%
Fluxo 0,7 mL min ⁻¹	25,23	3,75	105,32	3,75
Fluxo 0,9 mL min ⁻¹	24,93	1,26	103,87	1,26
MeOH 58%	27,66	0,02	115,24	0,016
MeOH 62%	26,63	2,49	110,95	2,49
pH 2,7	25,70	0,39	107,10	0,39
pH 2,9	25,25	0,29	105,21	0,29

Fonte: elaborada pela autora.

Timol

Tabela 34 - Valores de concentração do timol na robustez (PD).

Dados do timol para as mudanças de parâmetros				
Condição	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV%	Teor (%)	CV%
Fluxo 0,7 mL min ⁻¹	37,63	0,04	94,08	0,10
Fluxo 0,9 mL min ⁻¹	38,12	0,07	95,31	0,19
MeOH 58%	41,14	0,41	102,86	0,41
MeOH 62%	40,79	0,21	101,96	0,21
pH 2,7	39,17	0,76	97,93	0,76
pH 2,9	39,25	0,28	98,13	0,28

Fonte: elaborada pela autora.

Foi observado que a mudança no tempo de retenção, ocasionava em valores maiores ou menores de área, tanto para o padrão, quanto para a amostra. Quanto maior o tempo de retenção, maiores os valores de área apresentados, mas sem prejuízo para a análise, visto que os valores diminuam e crescem de maneira diretamente proporcional. Assim, ao se comparar padrão com amostra, os valores de recuperação permaneciam semelhantes.

Com a diminuição do fluxo para 0,7 mL min⁻¹, foi visto que houve um aumento de 0,8 minutos e 4,0 minutos no tempo de retenção da clorexidina e timol, respectivamente. Já no fluxo 0,9 mL min⁻¹, houve uma diminuição no tempo de corrida em 0,8 minutos para a clorexidina e 1,6 minutos para o timol. A pressão da bomba também variou em ± 20 mmHg. Quanto maior o fluxo, maior a pressão.

A mudança de proporção também gerou uma mudança nos tempos de retenção. As análises em que a fase móvel foi preparada com 2% a mais de metanol mostraram uma diminuição de 1,3 minutos para a clorexidina e 1,1 minutos para o timol nos tempos de retenção. Já a fase com 2% a menos do solvente orgânico aumentou em 1,3 minutos e 5,2 minutos os tempos de retenção para clorexidina e timol, respectivamente. Quanto maior a quantidade de MeOH utilizada, menor o tempo de retenção dos dois analitos. A alteração do pH da fase móvel não mostrou mudança significativa nos tempos de retenção de nenhum dos dois ativos.

Em relação ao teor da clorexidina e do timol, não foram observadas alterações nos valores recuperados para nenhuma das condições de mudança avaliadas, visto que os valores estão dentro da normalidade e próximos entre si.

De acordo com os resultados, o método de quantificação é capaz de quantificar as substâncias de forma linear e inequívoca, mesmo com pequenas mudanças dos parâmetros de análise. Também mostrou que, no mesmo laboratório e sob as mesmas condições, fornece os mesmos resultados, independente das análises serem realizadas no mesmo dia. O método demonstrou uma concordância entre os resultados de medições sucessivas de diferentes preparações da amostra. Além disso, os métodos de extração e quantificação mostraram bons valores de recuperação para as duas substâncias de interesse. Desta forma, os métodos de extração e de quantificação cumpriram com todos os parâmetros exigidos pela RDC 166/2017.

CAPÍTULO IV

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO II

6.1 DESENVOLVIMENTO DA PREPARAÇÃO DA MICROPARTÍCULA

Além dos ativos, clorexidina e timol, a micropartícula também foi preparada com alguns outros excipientes a fim de melhorar a preparação e a eficiência da encapsulação. Os excipientes utilizados foram MD, HPMC, LSS e CMC. A micropartícula desenvolvida nesta dissertação está protegida sob o registro de patente de número BR1012019025899-3.

A MD e o HPMC foram utilizados como agentes encapsulantes. O LSS é um agente surfactante aniônico, que consiste em uma molécula anfifílica, que aumenta a taxa de dissolução de compostos pouco solúveis em água. Também auxilia na miscibilidade física dos ativos com polímeros hidrofílicos, evitando a sua precipitação em meio aquoso, na maioria das vezes formando micelas carregadas com fármacos (JUNG et al., 2016). A CMC, também derivada da celulose, foi utilizada para aumentar a viscosidade da emulsão e, conseqüentemente, a sua estabilidade. Este agente espessante é altamente utilizada nas indústrias de alimentos e de medicamentos (SINGH et al., 2016).

Alguns testes foram realizados para determinar a ordem e as quantidades de excipientes que seriam adicionados na preparação da emulsão a ser congelada, para posterior liofilização. Percebeu-se que a ordem em que os excipientes são colocados e o tempo em que eles permanecem em agitação são parâmetros que influenciam na preparação da micropartícula. Todos os excipientes eram adicionados mediante agitação magnética a 1000 rpm, em temperatura ambiente, num Erlenmeyer de 50 mL.

Em todos os testes, o LSS era o primeiro excipiente a ser adicionado na mistura, seu conteúdo era despejado em 10 mL de água, sob agitação. Era adicionado primeiro no intuito de solubilizar o timol, que é uma substância lipofílica. A agitação acontecia por 5 minutos e observava-se a formação de espuma. Os próximos a serem adicionados eram os ativos. Ao adicionar o timol puro, na forma sólida, ele não se misturava ao sistema com até 5 minutos de agitação, mostrando a necessidade de uma solubilização anterior. Então, ele passou a ser diluído num volume de 0,5 mL de etanol P.A. e só então adicionado ao conteúdo. Assim que o timol era adicionado, a solução de digluconato de clorexidina era adicionada em seguida. Dentro de alguns segundos, percebia-se que a espuma desaparecia completamente, e o sistema ficava aparentemente homogêneo e de cor branco leitoso. Depois de adicionados os ativos, a agitação continuava por mais 5 minutos.

Após a agitação com os ativos, os outros excipientes eram misturados depois da pesagem e adicionados todos juntos, aos poucos, com o auxílio de um funil de vidro. Observou-se que em algumas das réplicas, eram formados alguns “grumos”, que não se desfaziam facilmente e não secavam completamente no processo de liofilização. As amostras que possuíam esse tipo de estrutura, após a liofilização, foram aos poucos mudando de aspecto com a presença destes grumos. O que antes era apenas um pó seco se transformava numa massa mais escura e completamente umedecida.

Para saber em que momento estes grumos estavam sendo formados, os excipientes passaram a ser adicionados um a um. Adicionava-se então: LSS, ativos, HPMC, MD e CMC, respectivamente. Percebeu-se que, ao adicionar a CMC, algumas amostras apresentavam estas estruturas de aspecto gelatinoso, ou seja, ao entrar em contato diretamente com o sistema em agitação, ela formava uma espécie de massa, com uma película externa, e que não se misturava ao resto do conteúdo. Com o exposto, percebeu-se a necessidade de solubilização da CMC antes de ser adicionada ao sistema. Então, dos 10 mL de água, 5 mL foram separados para solubilizar a CMC. Ela era colocada num Becker junto da água e, sem necessidade de agitação, ela entumescia e solubilizava completamente, em pelo menos 30 minutos.

Ao adicionarmos os ativos percebíamos que, quando a espuma desaparecia, o sistema ficava completamente fluido, e mesmo com uma pequena agitação, jorrava o conteúdo para fora do Erlenmeyer. Decidiu-se, então, adicionar a CMC após a agitação de 5 minutos dos ativos, não mais no final do processo. Assim, o sistema conseguiria ficar um pouco mais viscoso e os outros excipientes poderiam ser adicionados sem maiores perdas do conteúdo e, conseqüentemente, dos ativos. Com o doseamento, também encontramos valores discrepantes de recuperação em pontos diferentes da mesma amostra onde a CMC foi adicionada no final. Com a CMC sendo adicionado antes, obtivemos valores uniformes, mesmo em diferentes pontos da mesma amostra e ainda resultou em valores mais altos da recuperação de CLX.

Inicialmente, o nível baixo (-1) para o LSS era de 1%, mas essa proporção não foi suficiente para permitir uma mistura homogênea. Os ativos eram adicionados e, na medida em que a agitação acontecia, havia uma separação do conteúdo: uma parte ficava líquida e transparente, outras partes ficavam numa consistência semissólida e esbranquiçada. Por isso, aumentamos a proporção do LSS no nível baixo em 0,5% (resultando em 1,5%) e, conseqüentemente, nos outros dois níveis, que passaram a representar 2,0 e 2,5%.

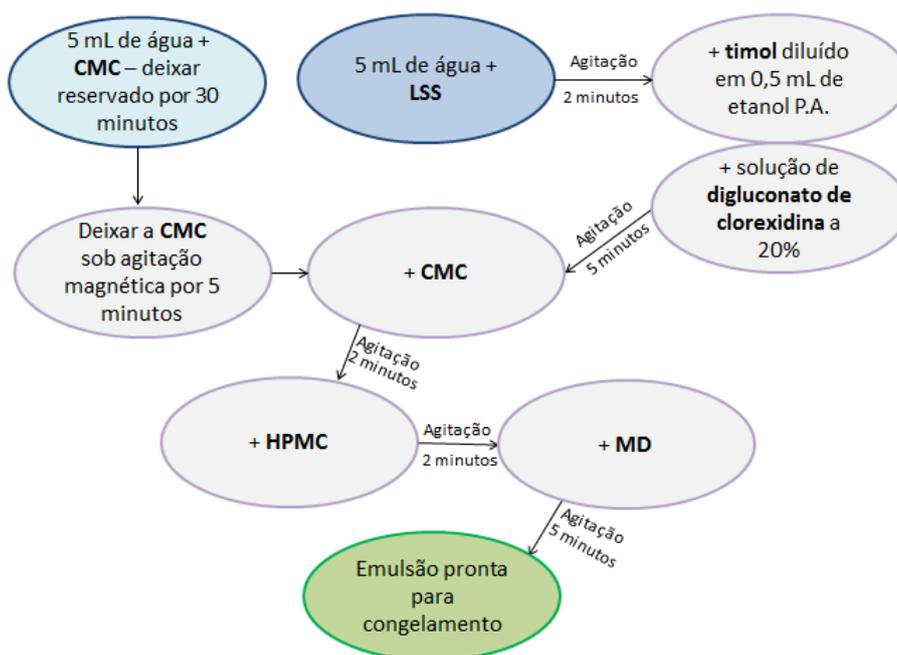
Depois de todos estes testes, a preparação da micropartícula resultou como mostram a Tabela 35 e a Figura 23. Clorexidina: 0,048 g (240 μ L da solução a 20%); timol: 0,075 g + 0,5 mL etanol; MD: 3 g; CMC 0,02 g; LSS e HPMC: três valores diferentes para cada, de acordo com o planejamento fatorial.

Tabela 35 - Ordem de preparação da micropartícula.

<i>5 mL de água + CMC – após 30 minutos entumecendo (separado num Becker à parte), agitação em agitador magnético por 5 minutos – deixar reservado</i>
<i>Num Erlenmeyer, adicionar 5 mL de água e o LSS (sob agitação) – agitar por 2 minutos</i>
<i>Adicionar o timol diluído em etanol e, em seguida, adicionar a clorexidina – agitar por 5 minutos</i>
<i>Adicionar a CMC já diluída em água – agitar por 2 minutos</i>
<i>Adicionar o HPMC – agitar por 2 minutos</i>
<i>Adicionar a MD aos poucos – agitar por 5 minutos</i>

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 23 - Sequência de preparação da micropartícula.



Fonte: elaborada pela autora.

Logo após a preparação, as emulsões eram transferidas para recipientes de acrílico (Figura 24 A), e levadas diretamente para um ultrafreezer, na temperatura de -80°C , depois passavam 13 ± 1 h nesta temperatura. Após esse tempo de congelamento, as tampas eram retiradas e as amostras eram colocadas nas bandejas do liofilizador, previamente ligado e na

temperatura entre $-45\pm 5^{\circ}\text{C}$ (figura 24 B). A pressão do liofilizador, permanecia abaixo de 500 mmHg durante todo o processo. O tempo de liofilização foi de 13h. Ao retirar as amostras do liofilizador, uma pequena parte era separada em um recipiente vedado com plástico parafilm e armazenada ao abrigo da luz. Estas amostras foram separadas para possíveis imagens em microscópio eletrônico. A outra parte do material liofilizado era triturada com grau e pistilo, e posteriormente utilizada para o teste de doseamento (figura 24 C). Todas as amostras foram armazenadas em recipiente vedado, ao abrigo da luz e em dessecador com sílica. As imagens desta preparação estão a seguir na Figura 24 A) amostras recém preparadas, adicionadas ao recipiente para congelamento; B) amostras no processo de liofilização; C) amostras sendo trituradas pós-liofilização.

Figura 24 - Fotos da preparação da micropartícula.



Fonte: fotos da pesquisa.

6.2 RECUPERAÇÃO DOS ATIVOS DA MICROPARTÍCULA POR CLAE-DAD

As amostras trituradas foram utilizadas para o doseamento dos ativos. Eram retiradas quantidades referentes a 100% dos dois ativos, segundo o que havia sido adicionado dos dois em cada preparação. Cada uma das amostras foi analisada em triplicata, onde nenhum CV% foi maior do que 5%. Todas as amostras passaram pelo mesmo processo de extração. Os valores de recuperação são referentes à média das três leituras realizadas para cada condição do planejamento, e estão dispostos na Tabela 36:

Tabela 36 - Resultados da recuperação dos ativos nas micropartículas.

<i>Experimentos</i>	<i>LSS (%)</i>	<i>HPMC (%)</i>	<i>Clorexidina (%)</i>	<i>Timol (%)</i>
1	1,0	1,67	95,8	56,43

2	1,33	1,67	99,91	52,50
3	1,67	1,67	103,23	46,35
4	1,0	2,5	98,49	59,54
5	1,33	2,5	107,49	74,84
6	1,67	2,5	104,06	52,38
7	1,0	3,33	94,43	59,54
8	1,33	3,33	103,59	68,78
9	1,67	3,33	111,05	67,81

Fonte: elaborada pela autora.

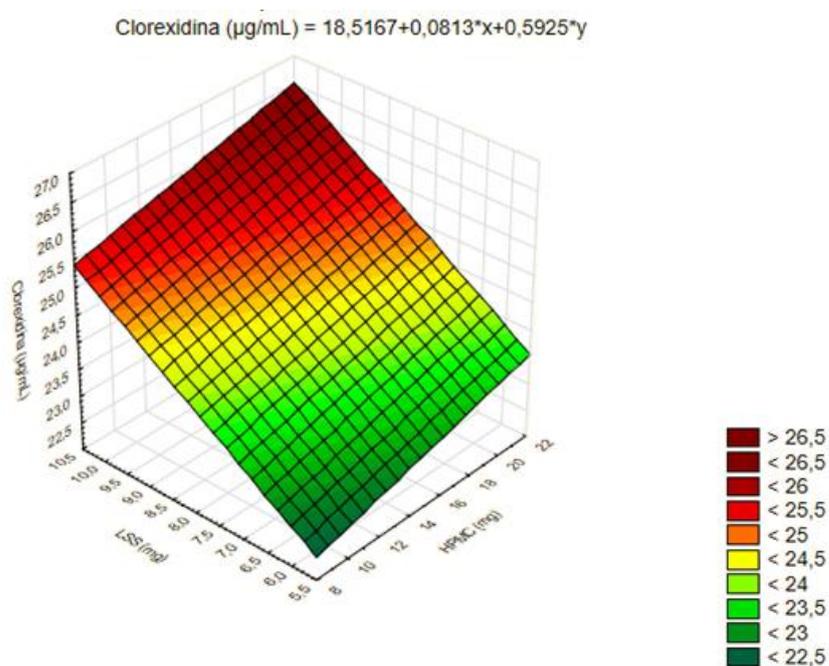
6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA A CLOREXIDINA

Tabela 37 - Dados estatísticos obtidos no planejamento fatorial - CLX

Análise	SQ	GL	QM	F	p
HPMC	4,33	2	2,17	6,56	0,007226
LSS	27,36	2	13,68	41,48	0,000000
HPMC*LSS	8,48	4	2,12	6,43	0,002138
Resíduos	5,94	18	0,33	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 25 - Gráfico de superfície da clorexidina.



Fonte: elaborada pela autora.

O gráfico de superfície foi utilizado para avaliar as influências das variáveis, tanto interações primárias quanto secundárias, em relação à recuperação dos ativos nas diferentes proporções no planejamento fatorial 3^2 da micropartícula. Um plano de superfície de resposta em 3D na Figura 25 nos permite uma melhor visualização destas influências.

A análise estatística dos dados experimentais (Tabela 37) mostrou que existe uma grande influência na quantidade de ativos a ser utilizada, em relação à variável independente, que é concentração da clorexidina no interior da micropartícula. Avaliando o gráfico de superfície para a clorexidina (Figura 25), podemos ver que existe uma interação primária, que quanto maior a quantidade de LSS e de HPMC, individualmente, maior a quantidade recuperada do ativo na micropartícula. Este efeito é maior para o LSS do que para o HPMC. Também é possível perceber uma interação secundária LSS (X_1) x HPMC (X_2), visto que o efeito sinérgico é evidenciado no gráfico de superfície. À medida que a proporção dos dois aumenta concomitantemente, é possível também ver o aumento da concentração da clorexidina. Os valores de p foram menores do que 0,05% para todos os dados, mostrando a significância dos resultados no nível de 95% de confiança.

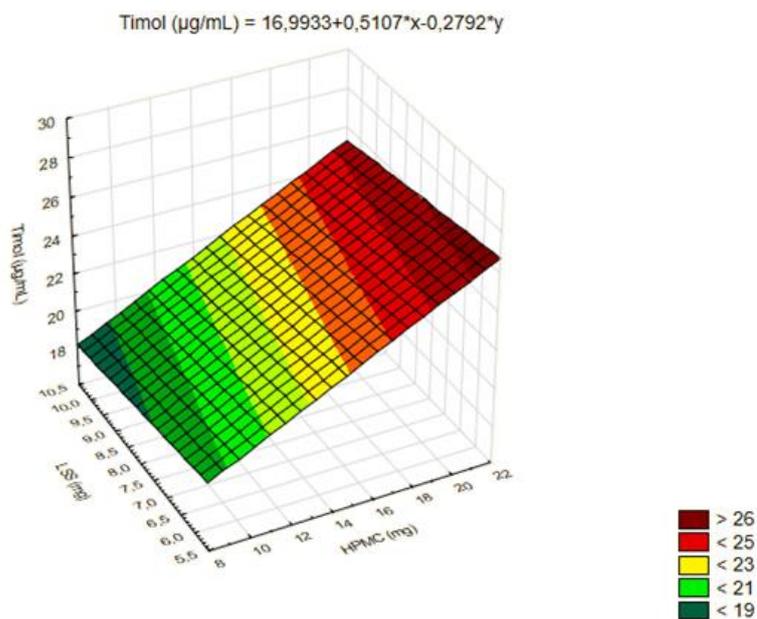
6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA O TIMOL

Tabela 38 - Dados estatísticos obtidos no planejamento fatorial - timol.

<i>Análise</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
HPMC	128,86	2	64,43	403,04	0,000000
LSS	64,68	2	32,34	202,30	0,05
HPMC*LSS	90,00	4	22,50	140,75	0,000000
Resíduos	2,88	18	0,16	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 26 - Gráfico de superfície do timol.



Fonte: elaborada pela autora.

Para o timol, encontramos o mesmo aumento visto para a clorexidina, em especial a interação primária relacionada ao HPMC (Figura 26). A proporção de HPMC exerce uma influência positiva e significativa em relação à quantidade de timol recuperada da micropartícula (Tabela 38). Este efeito pode ser explicado pela volatilidade do timol, onde quanto mais agente encapsulante, maior interação, resultando em uma maior quantidade de timol envolvido na micropartícula. Os valores de p avaliados em relação ao HPMC foram menores do que 0,05% para os dados, mostrando a significância dos resultados no nível de 95% de confiança. Em relação ao LSS, o aumento não foi estatisticamente significativo, com $p \geq 0,05$, na concentração do timol quando houve aumento na proporção deste excipiente. Isso pode ser explicado pelo fato de que a menor proporção de LSS já deve ser o suficiente para solubilizar todo o timol adicionado na preparação. Ou seja, um aumento da concentração de LSS acima de 2,5%, a solubilização do insumo ativo não resultará em melhoria de solubilidade, visto que esta faixa está acima da concentração micelar crítica do agente tensoativo.

6.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As Figuras 27, 28 e 29 mostram a comparação entre as curvas dos ativos e excipientes, bem como de suas misturas binárias 1:1. As Tabelas 39, 40 e 41 trazem os valores de *Tonset*, *Tpico* e ΔH dos picos referentes aos insumos farmacêuticos ativos (IFA) nas misturas binárias.

As curvas de DSC mostraram eventos tanto para a clorexidina, quanto para o timol, como mostra a Figura 27. É possível observar um evento endotérmico para a clorexidina, mas que não pode ser considerado como pico de fusão, visto que não tem forma definida e não se assemelha a um pico que corresponde à fusão de compostos. Como a clorexidina usada foi preparada por meio da liofilização da solução de digluconato de clorexidina a 20%, possivelmente resultou em um material amorfo. Neste tipo de material, conseqüentemente, o evento observado pode corresponder a uma transição vítrea (T_g) ou a uma degradação. No entanto, ainda sim é possível observar um evento da clorexidina sempre na temperatura de 170°C.

Priyadarshini et al. (2017) realizaram curvas de DSC com clorexidina base carregada em nanopartículas, e observaram que o pico de fusão da clorexidina base na forma livre foi em torno de 136°C. Além disso, também não observaram o pico de fusão da CLX na análise nanopartícula. De Oliveira (2004) também analisou a associação de clorexidina a 0,12% com quitosana (m/m), encontrando o seu pico de fusão em 142°C, que é compatível com o valor de ponto de fusão da clorexidina, 142,9°C. No presente trabalho, a temperatura encontrada para o evento da clorexidina na faixa de 178,04°C, com *Tonset* em 155,12°C e *Tpico* em 178,04°C e com características de uma substância amorfa. Isto mostra o processo de obtenção (secagem), diferente natureza (sal ou base) e a concentração do insumo podem influenciar nas propriedades físicas da clorexidina.

Na curva DSC do timol foi observado um evento endotérmico característico de substâncias cristalinas com *Tonset* em 47,57°C e *Tpico* em de 55,04 °C, o qual representa a fusão do insumo farmacêutico ativo (IFA). O valor está de acordo com os valores relatados na literatura. Pochivalov et al. (2017) estudaram o timol e a sua utilização em filmes com atividade antibacteriana, com o DSC também encontraram um pico endotérmico em torno de 50°C na análise do timol isolado. Mourtzinos et al. (2008) prepararam um complexo de inclusão de timol com β -ciclodextrina e confirmaram essa inclusão pela técnica de DSC. No trabalho, o timol puro apresentou um pico endotérmico em 61,6°C e, quando associado ao

complexo, este pico desaparece. Também é possível observar dois eventos após o pico de fusão do timol, na curva DSC deste insumo isolado, eles possivelmente correspondem à degradação do mesmo (Tabela 39, evento T-2-3).

Podemos também perceber que não houve interação entre os insumos quando observamos a curva da mistura dos dois (Figura 27A). Também observa-se a diminuição da entalpia em cerca de 50% para os dois ativos na mistura binária 1:1, quando se comparam as entalpias nas curvas da sua forma pura, como mostra a Tabela 39. A entalpia da clorexidina passa de 110,2 para 51,8 J/g e a do timol de 119,06 para 65,07 J/g. Isto acontece porque na mistura binária temos metade de cada ativo, quando comparado à quantidade utilizada na análise das suas formas puras. Ainda é possível observar os dois eventos endotérmicos de forma separada, apenas com um adiantamento da temperatura dos picos que aparecem na curva do timol, que possivelmente se trata da sua degradação. Estes picos apresentam-se entre 175 e 200°C na curva do timol puro, mas é adiantado para uma temperatura entre 125 e 150°C quando ele está em combinação com a clorexidina.

Na Figura 27B, não é possível observar na curva da micropartícula os mesmos eventos que acontecem para a clorexidina e para o timol. Isso indica que os fármacos estão molecularmente dispostos na matriz desta micropartícula, formando um complexo de inclusão (MOURTZINOS et al., 2008). Ainda é possível observar um pequeno evento exotérmico em 300°C, que pode ser referente à degradação da micropartícula. Na Figura 27 A) curvas DSC de clorexidina, timol e da sua mistura binária. B) Curvas de clorexidina, timol e da micropartícula contendo estes dois ativos.

Figura 27 - Curvas de DSC da CLX, T e MP.

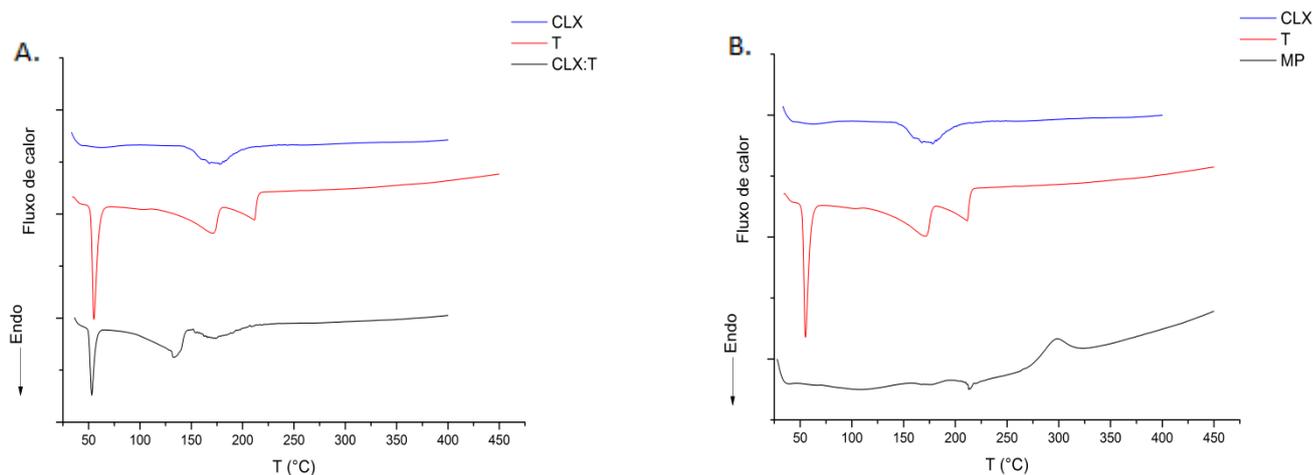


Tabela 39: Eventos do DSC para CLX, T, para a mistura binária CLX:T e para os quatro excipientes na forma isolada.

<i>Eventos do DSC para CLX, T, CLX:T e excipientes isolados</i>				
Amostra	Eventos	Valores		
		Tonset (°C)	Tpico (°C)	$\Delta H/Jg^{-1}$
CLX	1	41,90	62,60	12,98
	2	155,13	178,04	110,2
T	1	47,57	55,04	119,06
	2	110,00	171,79	139,70
	3	181,00	211,59	73,61
CLX:T	1	46,45	53,11	64,91
	2	80,35	132,94	138,79
	3	151,09	171,97	51,8
MD	1	35,00	96,25	168,88
	2	186,27	216,31	18,09
	3	238,00	249,14	61,39
	4 (exo)	249,90	303,36	202,54
HPMC	1	38,56	87,12	75,00
	2	223,01	255,87	21,67
	3	331,95	356,31	92,76
LSS	1	99,87	105,52	21,62
	2	166,00	182,97	12,29
	3	188,00	194,83	6,08
	4	200,00	242,01	52,57
	5	250,00	261,75	9,92
	6	268,00	275,78	10,51
	7	315,16	323,33	4,98
CMC	1	32,65	95,79	293,57
	2 (exo)	250,51	294,60	223,59

Fonte: elaborada pela autora.

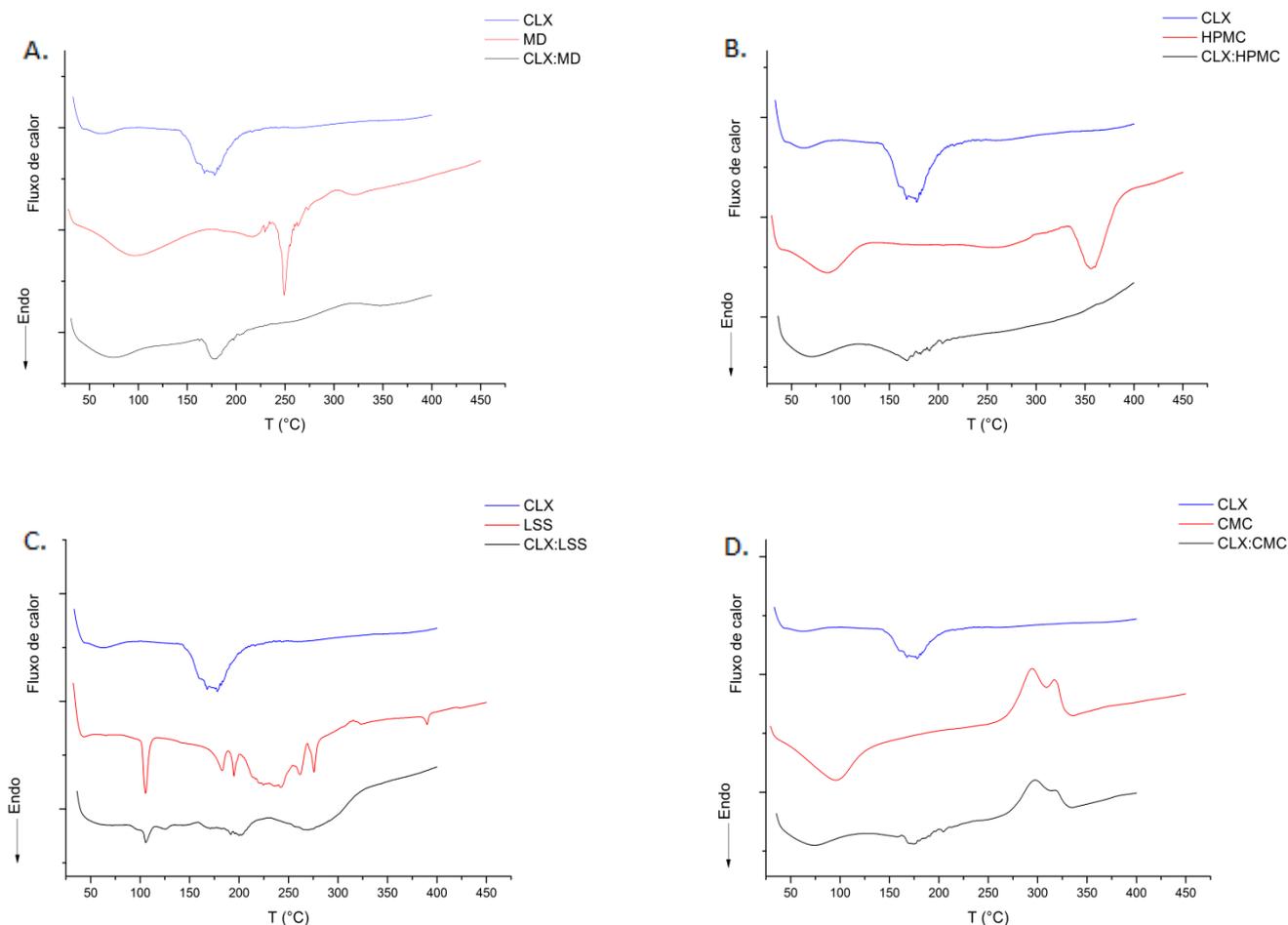
Na Tabela 39 estão representados os valores de *Tonset* (°C), *Tpico* (°C) e a entalpia de fusão (Jg^{-1}) para todos os eventos. Todas as linhas marcadas na cor verde são referentes aos eventos da clorexidina, e na cor azul, ao timol. Em relação às misturas binárias de clorexidina com os excipientes, foram observados eventos da clorexidina em todas as curvas (Figura 28). É possível perceber uma maior supressão da expressão de clorexidina na curva da mistura com LSS (Figura 2C). A única interação física encontrada é justamente nesta mistura, onde há um deslocamento do evento da clorexidina. Na mistura, houve um atraso de quase 30°C no *Tpico* em relação à clorexidina isolada (Tabela 40, eventos CLX-2 e CLX:LSS-3). Ainda em relação ao LSS, também houve uma diminuição da entalpia de 110,2 para 1,94 J/g (Tabela 40, evento CLX:LSS-3). Em relação aos outros excipientes, não foram observadas interações físicas, as temperaturas de *Tpico* permaneceram próximas em relação a da clorexidina livre. Os valores de entalpia do ativo quando em mistura com MD e CMC, ficaram na faixa de 32 J

g^{-1} e com o HPMC, o valor encontrado foi de $45,06 \text{ J g}^{-1}$ (Tabela 40). Estes dados de baixa entalpia não necessariamente significam que há uma interação fármaco-excipiente, visto que não houve uma alteração significativa das temperaturas da clorexidina (LIMA et al., 2014).

O maior evento endotérmico que aparece para o HPMC na sua curva individual (Tabela 39, evento HPMC-3) também desaparece, bem como o evento da MD (Tabela 39, evento MD-3). Na curva do LSS é possível ver consecutivos eventos endotérmicos, possivelmente referentes à recristalização do mesmo (Tabela 39, eventos LSS2-6). Quando em mistura, o LSS apresenta os eventos de forma suprimida, levando a crer que, em mistura com a clorexidina, há um aumento de caráter amorfo do excipiente (Tabela 40, evento CLX:LSS). Os pequenos picos encontrados na região próxima a 100°C para os excipientes, em especial o LSS (Figura 28C) (Tabela 39, evento LSS-1), são referentes à remoção de umidade, visto que eles são higroscópicos (PIRES, 2016).

As curvas de DSC sugerem que não houve nenhum tipo de interação física para a clorexidina e seus excipientes, com exceção do LSS. Apesar de que, mesmo com o baixo valor de entalpia e o deslocamento do evento, ainda sim foi possível observá-lo na curva. Em todas as misturas binárias, foi possível observar de forma clara os eventos da clorexidina. No entanto, este evento não corresponde necessariamente a um pico de fusão, visto que ela está possivelmente na forma amorfa. Na Figura 28 A) curvas DSC de clorexidina, MD e da sua mistura binária; B) curvas DSC de clorexidina, HPMC e da sua mistura binária; C) curvas DSC de clorexidina, LSS e da sua mistura binária; D) curvas DSC de clorexidina, CMC e da sua mistura binária.

Figura 28 - Curvas DSC da CLX na forma livre, comparado com as curvas DSC dos excipientes e suas misturas binárias.



Na tabela 40 estão representados os valores de T_{onset} (°C), T_{pico} (°C) e a entalpia de fusão (Jg^{-1}) de todos os eventos apresentados. Todas as linhas marcadas na cor verde são referentes aos eventos do ativo.

Tabela 40 - Eventos do DSC para CLX na forma isolada e em mistura com os excipientes.

<i>Eventos do DSC para CLX em suas misturas binárias</i>				
		Valores		
Amostra	Eventos	T_{onset} (°C)	T_{pico} (°C)	$\Delta H/Jg^{-1}$
CLX	2	155,13	178,04	110,2
CLX:MD	1	36,06	74,94	61,37
	2	164,96	177,87	32,44
	3 (exo)	273,61	321,19	23,28
	1	40,88	70,90	48,35

CLX:HPMC	2	119,00	167,63	45,06
CLX:LSS	1	90,26	115,32	10,52
	2	116,37	125,17	2,09
	3	159,17	200,09	1,94
	4	229,75	269,02	96,52
CLX:CMC	1	39,59	115,29	280,21
	2	162,19	175,60	32,09
	3 (exo)	264,17	297,81	128,34

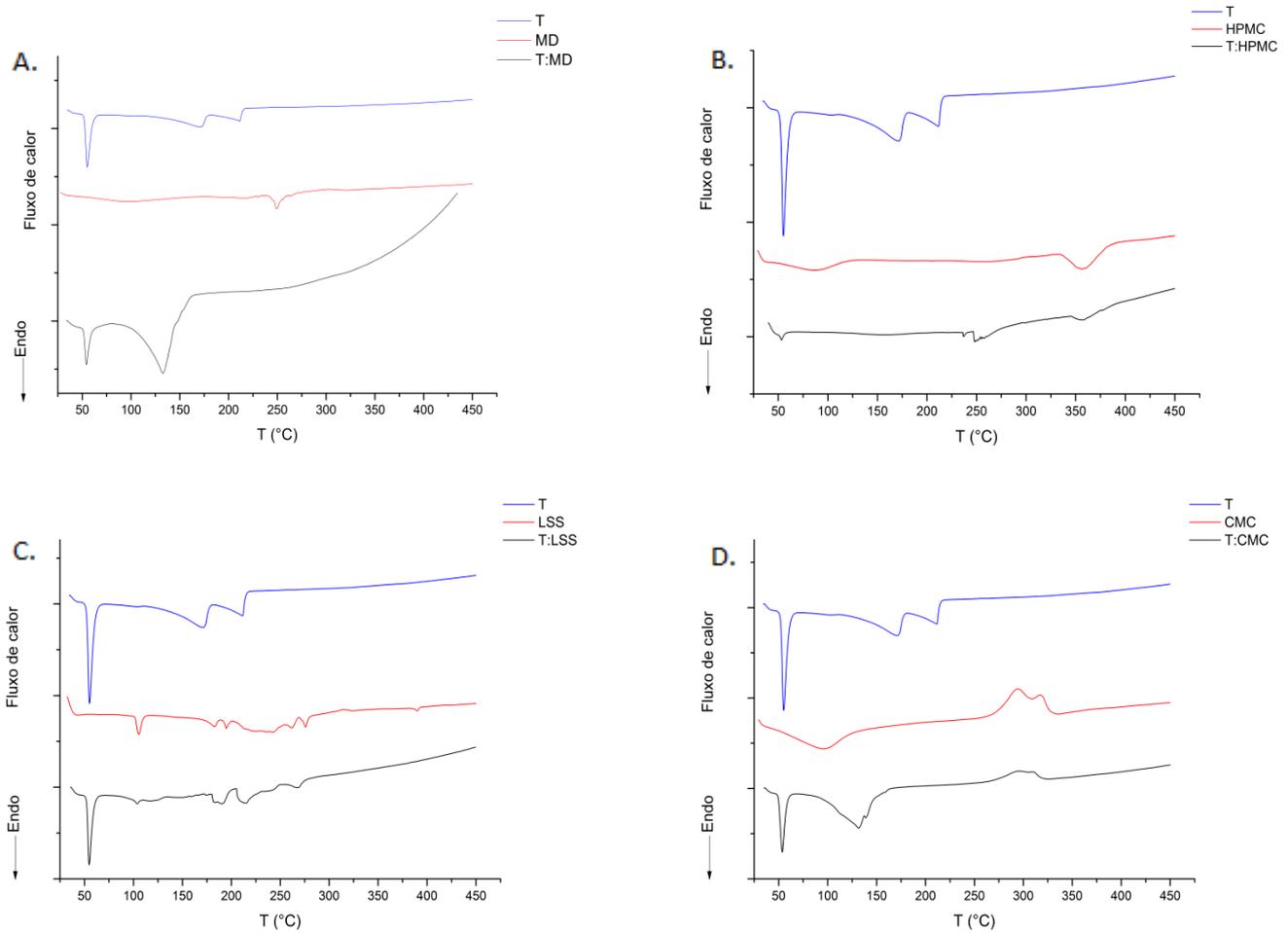
Fonte: elaborada pela autora.

Foi possível avaliar os picos do timol em todas as misturas binárias em que ele está presente. Chamando atenção apenas para uma grande diminuição da sua expressão na mistura com HPMC, bem como o seu valor de entalpia, que diminui de 119,06 para 3,34 Jg⁻¹ (Tabela 41). Em um trabalho de Pires (2016), é também possível observar este mesmo efeito do HPMC com ciprofibrato. A autora explica que o intumescimento do HPMC ocorre quando em presença de líquido e sob aquecimento, que acontece no início da fusão do fármaco, dificultando, então, a continuação do processo de fusão. Isso pode explicar sua ação em envolver o HPMC, que corrobora com os resultados do planejamento fatorial, onde mostra que o aumento de HPMC, aumenta também a quantidade de timol no interior da micropartícula.

Em nenhuma das curvas observou-se o deslocamento do pico de fusão para o timol, sugerindo nenhuma interação física dele com os excipientes. Apesar da diminuição da entalpia e da expressão dele em algumas misturas, isso pode ser justificado. Além disso, não houve mudanças significativas nas temperaturas do pico de fusão do timol em mistura, em relação ao timol puro, como mostra a Tabela 41.

Nas misturas com MD e CMC é possível observar um adiantamento dos picos, que provavelmente se referem à degradação do timol (Figuras 29B e 3D) (Tabela 41, eventos T:MD- 2 e T:CMC-2). Isto também aconteceu na mistura binária entre timol e clorexidina (Figura 27A) (Tabela 39, evento CLX:T-2). Assim como para a clorexidina, o evento que aparece para a MD sofre supressão quando em mistura com o ativo. Já nos outros excipientes, não mostrou alteração no perfil térmico, apenas diminuição da intensidade dos picos. Não houve diferença nas temperaturas e nas entalpias para o timol nas misturas, com exceção da entalpia quando misturado com HPMC (Tabela 41). E por fim, o pico em 100°C encontrado na mistura com LSS, que também acontece com a clorexidina, é referente à perda de água do material.

Figura 29. Curvas DSC do timol na forma livre, comparado com as curvas DSC dos excipientes e suas misturas binárias



. A Figura 29 aponta A) curvas DSC do timol, MD e da sua mistura binária; B) curvas DSC do timol, HPMC e da sua mistura binária; C) curvas DSC do timol, LSS e da sua mistura binária; D) curvas DSC do timol, CMC e da sua mistura binária.

Tabela 41: Eventos do DSC para timol na forma isolada e em mistura com os excipientes.

<i>Eventos do DSC para T em suas misturas binárias</i>				
Amostra	Eventos	Valores		
		Tonset (°C)	Tpico (°C)	$\Delta H/Jg^{-1}$
T	1	47,57	55,04	119,06
T:MD	1	51,54	54,21	78,57
	2	79,73	132,89	915,98
T:HPMC	1	50,98	53,27	3,34
	2	232,89	237,03	1,68
	3	244,88	248,29	33,69
	4	344,57	357,02	26,69
T:LSS	1	52,53	58,74	70,16
	2	97,58	103,75	4,11
	3	176,73	189,57	32,31
	4	204,72	215,34	74,57
	5	253,59	267,80	14,97
T:CMC	1	49,87	53,7	74,42
	2	84,39	131,79	273,27
	3 (exo)	260,87	296,12	68,71

Fonte: elaborada pela autora.

De acordo com Oliveira, Yoshida e Gomes (2011), pequenas alterações podem estar relacionadas à presença dos excipientes na formulação, mas não necessariamente caracterizam a ocorrência de interações ou reação química. Os eventos térmicos mais significativos não caracterizam uma incompatibilidade quando ocorrem nas mesmas faixas de temperatura. É importante observar que na maioria das misturas avaliadas observa-se uma alteração no valor da entalpia de fusão dos fármacos quando em mistura física com os excipientes, porém este valor equivale a praticamente a metade do valor de ΔH do fármaco isolado, isto se explica pelo fato das misturas físicas estarem na proporção 1:1, então a diminuição da entalpia, já esperada, está relacionada a uma menor quantidade do fármaco na mistura (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

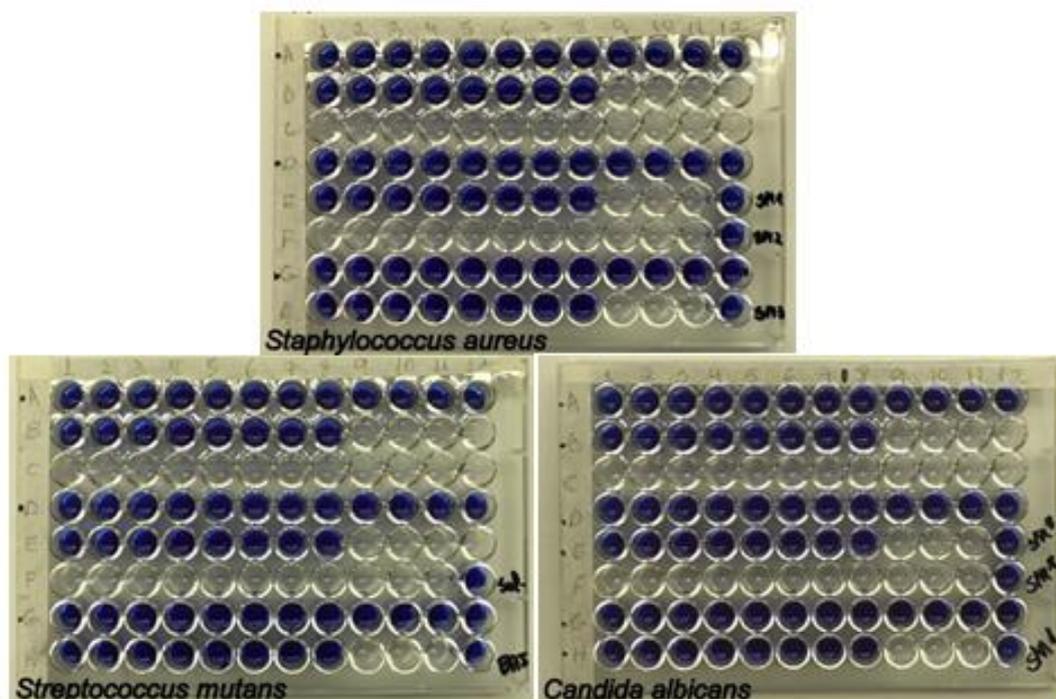
CAPÍTULO V

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO III

7.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Nos primeiros testes realizados, utilizou-se uma quantidade de micropartícula referente a 0,12% de clorexidina. Foi possível observar que em todos os poços, após a coloração com resazurina e cerca de uma hora de espera, não havia sinal de células viáveis de microrganismos nas placas com *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*. A Figura 30 mostra as placas testes dos referidos microrganismos com a micropartícula e, como se pode observar, todos os poços estão azuis. Não foi possível encontrar a concentração inibitória mínima utilizando-se essa concentração da micropartícula. A Figura 30 foi onde utilizamos a MP com concentrações de 0,12 e 0,18% de CLX e T, respectivamente. Não foi possível a observação de células viáveis em nenhum dos poços e, conseqüentemente, não foi possível encontrar a CIM para nenhum dos microrganismos avaliados.

Figura 30 - Primeira investigação da CIM,



Fonte: fotos da pesquisa.

Continuamos a investigação para descobrir a concentração inibitória mínima, realizando a preparação da micropartícula em uma concentração 10 vezes mais diluída. A atividade antimicrobiana da micropartícula contendo clorexidina e timol foi avaliada. Com estes resultados, foi assim determinada, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a cada microrganismo. Em todos os experimentos os controles positivos, negativo, do meio, da salina, das soluções mães e do crescimento microbiano do inóculo foram adequados.

O controle positivo corresponde a substâncias com atividade antimicrobiana. Os controles positivos selecionados foram a clorexidina e o timol, exatamente nas mesmas concentrações dos ativos na MP, mas de forma livre. O controle da clorexidina mostrou-se efetivo contra os três microrganismos, em todas as concentrações. Já o controle do timol, foi utilizado em concentrações insuficiente para matar os microrganismos, pelo menos quando de forma isolada. O controle negativo utilizado foi a solução de Tween 80 5% + DMSO 2,5%, usado para dissolução do timol, ele não apresentou nenhum tipo de atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

Tabela 42 - Resultados dos controles.

Controles			
Controles positivos e negativos	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Clorexidina livre</i> 0,012%	Positivo em todos os poços	Positivo em todos os poços	Positivo em todos os poços
<i>Timol livre</i> 0,018%	Concentração utilizada para o timol não foi suficiente para matar os microrganismos nas placas testadas		
<i>Tween 5% + DMSO 2,5%</i>	Negativo em todos os poços	Negativo em todos os poços	Negativo em todos os poços

Fonte: elaborada pela autora.

É importante ressaltar que neste presente trabalho, todos os valores de concentrações mínimas, sejam inibitórias, bactericidas ou fungicida é sempre da associação dos dois ativos, buscando um sinergismo da atividade antimicrobiana. Os resultados estão dispostos na Tabela 43. Para *S. aureus*, os valores de CIM encontrados são de 4,8 + 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura de CLX e T, respectivamente, na MP. Já para *S. mutans* e *C. albicans* foram encontrados os mesmos valores de 4,2 + 6,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura de CLX e T, respectivamente, na MP. A MP testada continha 0,012% de CLX e 0,018% de T. A Figura 31 mostra as placas testes da

investigação da CIM em triplicata. O *S. aureus* mostrou-se um pouco mais resistente quando comparado aos outros microrganismos, com uma CIM mais alta, mas com uma diferença muito pequena entre eles.

Andrade et al. (2011) fizeram o estudo de enxaguatórios bucais, um deles era à base de clorexidina e outro com óleos essenciais, o timol em associação com o eucaliptol. O valor apresentado de CIM para a clorexidina no enxaguatório foi de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ para *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*. Já no enxaguatório que continha timol + eucaliptol, foram encontrados os valores de $0,16 + 0,23 \text{ mg/mL}$ para *S. aureus*, $0,32 + 0,46 \text{ mg mL}^{-1}$ para *S. mutans* e $0,16 + 0,23 \text{ mg mL}^{-1}$ para *C. albicans*.

Festuccia et al., 2013 investigaram a CIM da clorexidina pelo método de diluição em ágar e obteve valor de CIM de $0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando testada em *S. aureus*. Lee e Lee, (2018) encontraram valores de CIM de $0,4883$ e $0,9766 \mu\text{g mL}^{-1}$ para duas diferentes cepas de *S. mutans* e valores de CBM de $7,8125$ e $15,6250 \mu\text{g mL}^{-1}$, também para as respectivas cepas. Teixeira (2012) também realizou preparações de inclusão de clorexidina com ciclodextrinas (α -Cd, β -Cd e Hp- β -Cd), a MIC variou de $0,25$ a $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ nas diferentes preparações e a CBM para *C. albicans* e entre $2,0$ e $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, ambos para *S. mutans*. Neste último trabalho, os valores de MIC encontram-se mais próximos dos resultados obtidos neste trabalho.

Fernandes (2015) estudou o timol e fez a investigação dos valores de CIM e CBM para *S. mutans* em crescimento planctônico, a pesquisa mostrou valores de CIM $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CBM $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. As células planctônicas são muito mais susceptíveis à ação dos antimicrobianos do que as células de biofilme, visto que elas são individuais e estão livres (OLIVEIRA, BRUGNETRA, PICCOLI, 2010). Almeida (2016) investigou a atividade de óleos essenciais (OE) extraídos de *Lippia sidoides*, onde o componente majoritário é o timol. Os valores de CIM encontrados para *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans* foram $5,9$; $2,4$ e $7,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OE, respectivamente. Os valores de CIM encontrados no segundo trabalho, em relação ao *S. mutans*, foram bem menores, visto que o timol está em associação com outros componentes do óleo essencial, que também tem atividade antimicrobiana. Freire et al. (2014) realizaram trabalho com óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, também rico em timol, a CIM e CBM para *S. mutans* foi de $2,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, já para *S. aureus* obteve valores de CIM e CBM de $0,5625 \mu\text{g mL}^{-1}$.

É possível avaliar que os valores de CIM da clorexidina são mais baixos do que para o timol. Vale ressaltar que os valores encontrados na literatura não necessariamente devem ser

compatíveis ao deste trabalho, visto que os ativos estão incorporados em uma micropartícula. Como já dito, a MP libera uma parte do conteúdo de forma imediata e outra parte durante um tempo mais prolongado. Os valores de CIM da clorexidina na forma livre tendem a ser bem menores. A investigação da microdiluição em caldo ocorre em um período de 24 horas para as bactérias e 48 horas para a levedura, então não necessariamente toda a quantidade de ativos da MP foi liberada nos poços. Os valores de CIM e CBM da literatura para extrato e óleos essenciais, tendem também a ser menores, visto que existe uma quantidade muito grande de componentes.

Os três microrganismos avaliados neste trabalho mostraram-se susceptíveis à ação da micropartícula e com valores relativamente baixos de CIM e CBM. São considerados resultados promissores àqueles onde a CIM é menor do que $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em relação a compostos isolados e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando se trata de extratos (RÍOS; RECIO, 2005). Diante disto, os resultados mostraram-se satisfatórios. É também interessante ressaltar uma proposta em relação à ação da bactéria *S. mutans* frente ao mecanismo de ação da MP, visto que ela é uma bactéria sacarolítica, o que significa que ela consome açúcares como fonte de energia. Um dos mecanismos de formação de cárie por esta bactéria é justamente o rápido consumo dos carboidratos, levando ao que se chama de pH sacarolítico, facilitando o aparecimento de cáries dentárias (SVENSÄTER et al., 2001). A MD, excipiente encapsulante presente em maior quantidade na MP, deve ser consumido por esta bactéria quando presente, facilitando a liberação do seu conteúdo no local de ação.

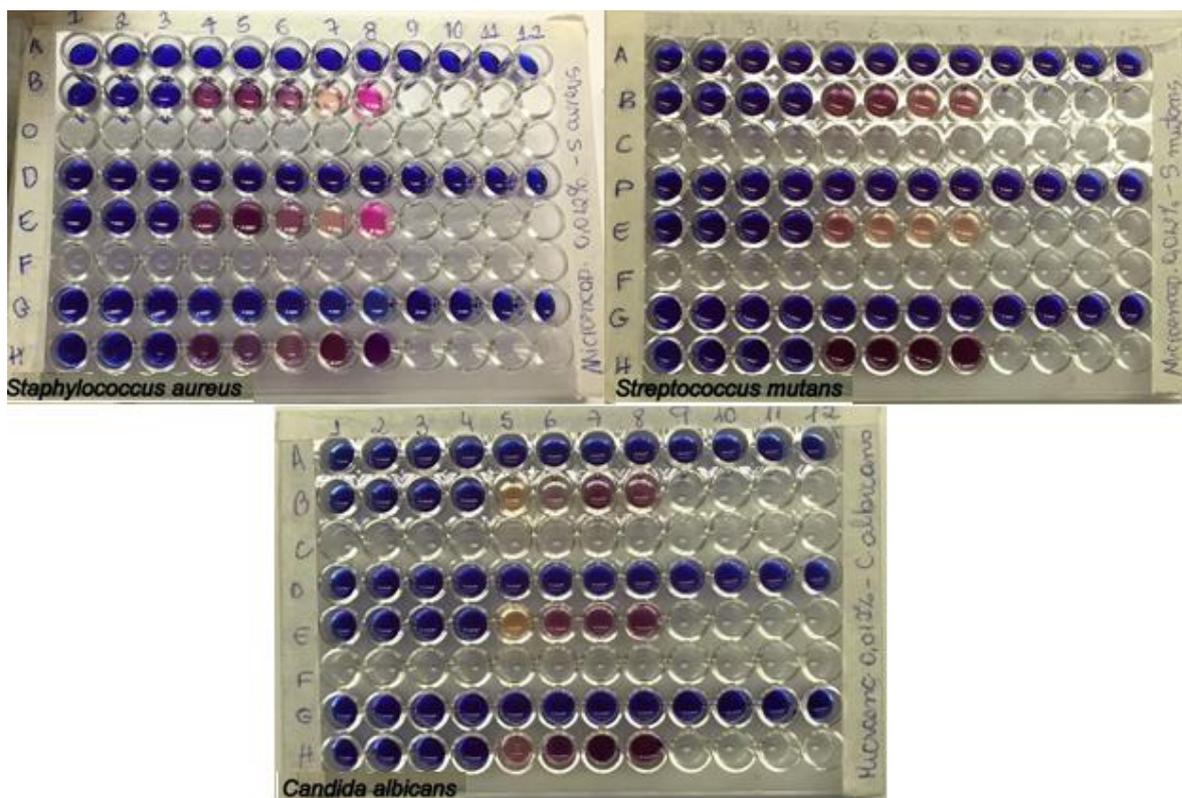
Diante dos resultados, também é possível perceber que a MD e o HPMC mostraram-se favoráveis ao processo de preparação da micropartícula, pois foram capazes de carrear os ativos e libera-los quando em solução para a sua atividade frente aos microrganismos.

Tabela 43 - Valores de CIM baseados na quantidade de ativos da MP.

MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
Teste de MP contendo 0,012% CLX 0,018% TIMOL	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
Número do poço (em triplicata)	B, E, H 3	B, E, H 4	B, E, H 4
Clorexidina + Timol	4,8 + 7,5	4,2 + 6,56	4,2 + 6,56

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 31 - Placas teste CIM.



Fonte: fotos da pesquisa.

Na Figura 31, (A) Placa teste de *S. aureus*, com CIM nos poços B, E e H 4. (B) Placa teste de *S. mutans*, com CIM nos poços B, E e H 5. (C) Placa teste de *C. albicans*, com CIM nos poços B, E e H 5.

7.2 CONCENTRAÇÕES BACTERICIDA E FUNGICIDA MÍNIMAS (CBM E CFM)

Os testes de CBM e CFM (Tabela 44) foram realizados por meio de plaqueamento, ou seja, recultivo dos poços que tenham a concentração do agente antimicrobiano acima e abaixo da CIM. As placas utilizadas continham ágar BHI para as bactérias e ágar Sabouraud dextrose para a levedura. Para a placa de *S. aureus*, considera-se a CBM em H1, visto que não houve um crescimento significativo de células nesta porção da placa. A partir de H2 até H6, observa-se um crescimento mais acentuado. Para *S. mutans*, também considera-se H1, visto que houve crescimento em todas as placas, de H2 a H7. Para as duas bactérias, o valor de CBM foi $6,0 + 9,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ da associação de CLX + T, respectivamente, na MP. Em *C. albicans*, considera-

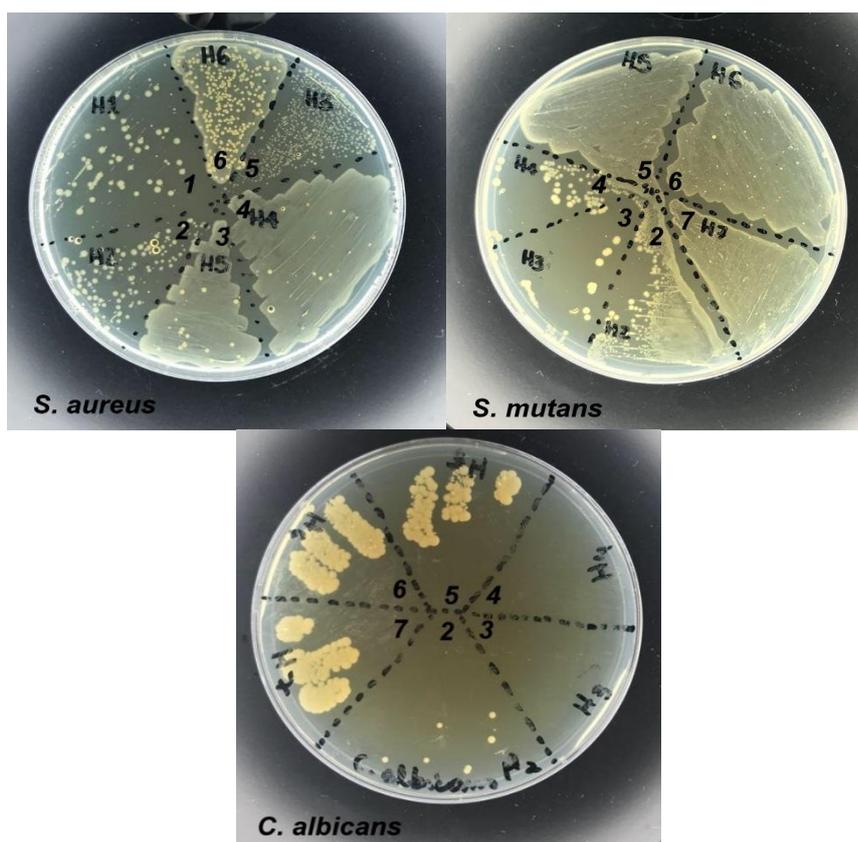
se a CFM em H4, com a concentração de $4,2 + 6,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura de CLX + T na MP. As placas preparadas para o teste estão dispostas na figura 32.

Tabela 44 - Valores de CBM de *S. aureus* e *S. mutans*, e valores de CFM de *C. albicans*.

CBM e CFM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
Teste de MP contendo 0,012% CLX 0,018% TIMOL	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
Poços da CBM e CFM	H1	H1	H4
Clorexidina + Timol	6,0 + 9,38	6,0 + 9,38	4,2 + 6,56

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 32 Placas teste de CBM e CFM.



Fonte: fotos da pesquisa.

CAPÍTULO VI

8 CONCLUSÃO

Foi possível o desenvolvimento de um método para quantificação simultânea de clorexidina e timol. Também foi desenvolvido um método de extração dos ativos do produto. A validação dos dois métodos atendeu a todos os parâmetros exigidos pela RDC 166/17.

O planejamento fatorial 3^2 auxiliou na preparação da micropartícula, fornecendo informações da eficiência dos excipientes LSS e HPMC visando otimizar o processo de encapsulação, tanto para a clorexidina quanto para o timol.

Os resultados de DSC mostraram um perfil amorfo para a clorexidina liofilizada e um perfil cristalino para o timol. Entre as análises das misturas binárias (1:1) de ativos e excipientes, houve possivelmente uma interação física entre a clorexidina e o LSS, com um atraso da temperatura do evento da clorexidina. Na curva da micropartícula não foi possível observar os eventos que acontecem para a clorexidina e para o timol, indicando que os fármacos formaram um complexo de inclusão

O teste de microdiluição realizado com *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* mostraram resultados favoráveis para a CIM, CBM e CFM. A micropartícula apresentou CIM de $4,8 + 7,5$, $4,2 + 6,56$ e $4,2 + 6,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. mutans*, *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente. Os resultados de CBM foram de $6,0 + 9,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as duas bactérias e CFM de $4,2 + 6,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. albicans*. Os valores foram considerados promissores frente a estes três microrganismos, também em comparação com os valores encontrados na literatura.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados da micropartícula mostraram-se promissores nos testes microbiológicos realizados. O produto foi patenteado e o intuito é continuar a realização de testes tanto na área de tecnologia, quanto na área de microbiologia. Além também da produção de trabalhos científicos em diversas áreas, também incluindo o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas e a realização de pesquisa clínica que comprove a segurança e eficácia da atividade antimicrobiana.

O uso da clorexidina e do timol em sua forma livre pode acarretar efeitos indesejáveis, a intenção da micropartícula é também tentar diminuir estes fatores, tendo como objetivo o sinergismo de ação dos dois, além da diminuição da dose individual. A micropartícula também permite mascarar o sabor dos ativos, melhorando a adesão dos pacientes ao tratamento. A utilização deste produto em uma forma farmacêutica para uso em pacientes com problemas bucais, da estética à cárie e também outros acometimentos maiores, deve também ser explorada. Diversas são as vantagens deste produto e os resultados obtidos neste trabalho serão fundamentais para a continuação deste projeto.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. C. L.; PEREIRA, M. S. V.; SILVA, D. F.; PEREIRA, L. F.; VIANA, F. A. C.; HIGINO, J. S.; BARBOSA, M. R. V. The anti-adherence effect of *Lippia sidoides* Cham. Extract against microorganisms of dental biofilm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p. 41–46, 2013.
- ALMEIDA, Isabella Barros. **Desenvolvimento e caracterização de membrans e arcabouços de liberação controlada contendo óleos essenciais extraídos das folhas de *Lippia sidoides* Cham. com potencial antimicrobiano.** Dissertação (Mestrado em odontologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- ANAND, Vishal; GOVILA, Vivek; GULATI, Minkle; ANAND, Bhargavi; JHINGARAN, Rajesh; RASTOGI, Pavitra. Chlorhexidine e thymol varnish as an adjunct to scaling and root planing : A clinical observation. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 2, n. 2, p. 83–89, 2012.
- ANDRADE, I. P.; FARDIN, R. F.; XAVIER, K. B. C.; NUNES, A. P. F. Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microrganismos da cavidade oral. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 13, n. 3, p. 10–16, 2011.
- ANNIE, D.; CHANDRAMOULI, V.; ANTHONYSAMY, S.; GHOSH, C.; DIVAKAR, R. Freeze drying vs microwave drying e methods for synthesis of sinteractive thoria powders. **Journal of Nuclear Materials**, v. 484, p. 51–58, 2016.
- BACA, Pilar; CLAVERO, Javier; BACA, Adela P.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Paloma; BRAVO, Manuel; VALDERRAMA, Mariano J. Effect of chlorhexidine-thymol varnish on root caries in a geriatric population : A randomized double-blind clinical trial. **Journal of Dentistry**, v. 37, p. 679–685, 2009.
- BALLESTEROS, Lina F.; RAMIREZ, Monica J.; ORREGO, Carlos E.; TEIXEIRA, José A.; MUSSATTO, Solange I. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, v. 237, p. 623–631, 2017.
- BANDO, K.; KANSHA, Y.; ISHIZUKA, M; TSUTSUMI, A. Innovative freeze-drying process based on self-heat recuperation technology. **Journal of Cleaner Production**, v. 168, p. 1244–1250, 2017.
- BARBIERI, Dieler de Sant'Anna Vitor. **Variabilidade genética e produção de biofilme *in vitro* por *Streptococcus mutans* em associação com leveduras do gênero *Candida*.** Tese (Doutorado em microbiologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- BARHAM, A. S.; TEWES, F.; MARIE, A. Moisture diffusion and permeability characteristics of hydroxypropylmethylcellulose and hard gelatin capsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 796–803, 2015.
- BARROS-NETO, Benício; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 4. ed. Campinas: São Paulo, 2010. 413p.

BELATO, Kely Karina; DE OLIVEIRA, Jonatas Rafael; DE OLIVEIRA, Fernanda Saraiva; DE OLIVEIRA, Luciane Dias; CAMARGO, Samira Esteves Afonso. Cytotoxicity and genotoxicity of thymol *in vitro* in murine macrophages (RAW 264 . 7) after antimicrobial analysis in *Candida albicans* , *Staphylococcus aureus* , and *Streptococcus mutans*. **Journal of Functional Foods**, v. 40, n. November 2017, p. 455–460, 2018.

BERBENNI, V.; MARINI, A.; BRUNI, G.; CARDINI, A. Thermoanalytical and spectroscopic characterisation of solid-state retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v.221, p.123–41, 2001.

BERGAMO, Vanessa Zafaneli; LANA, Daiane Flores Dalla; PIPPI, Bruna; GUERREIRO, Irene Clemes Kulkamp; FUENTEFRIA, Alexandre Meneghello. Novas tendências de combate ao biofilme de *Candida* em próteses dentárias. **Clin Biomed Res.** v. 38, n. 2, p. 155-166, 2018.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI; CAVALHEIRO, É. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002.

BORGHI, E.; MORACE, G.; BORGIO, F.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; NILE, C.; RAMAGE, G. New strategic insights into managing fungal biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1077, 2015.

BOSS, Edinara Adelaide. **Modelagem e Otimização do Processo de Liofilização: Aplicação para Leite Desnatado e Café Solúvel**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

BÖTTCHER. Daiana Elisabeth. **Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudos *in vitro***. Tese (doutorado em odontologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

BRAILSFORD, S. R.; FISKE, J.; GILBERT, S.; BEIGHTON, D. The combination of fluoride and chlorhexidine-thymol varnishes prevents progression of root surface lesions in institutionalized elderly people. **Article Analysis & Evaluation**, p. 133–134, 2003.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed., São Paulo: Atheneu, 2010.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **“Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos.”**, 2017.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P D.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos : estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, p. 129–146, 2003.

CAI, Yuanzhen; XU, Ke; HOU, Weikun; YANG, Zhi; XU, Peng. Preoperative chlorhexidine reduces the incidence of surgical site infections in total knee and hip arthroplasty: A systematic review and meta-analysis. **Internat. Journal of Surgery**, v. 39, p. 221–228, 2017.

CANO-HIGUITA, Diana Maria; VÉLEZ, Harvey Alexander Villa; TELIS, Vania Regina Nicoletti. Microencapsulation of oleoresin in binary and ternary blends of gum Arabic, maltodextrin and modified starch. **Ciência e Agrotecnologia**, v.39, n.2, p. 173–182, 2015.

CARRIJO-CARVALHO, L. C. et al. Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus. **Survey of Ophthalmology**, v. 62, n. 2, p. 203–218, 2016.

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

CERQUEIRA, Daniel Alves. **Determinação de um novo valor para a entalpia de fusão do cristal perfeito de acetato de celulose**. Dissertação (Mestrado em química). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2006.

DA ROSA, Cleonice Gonçalves; BORGES, Caroline Dellinghausen; ZAMBLAZI, Rui Carlos; NUNES, Michael Ramos; BENVENUTTI, Edilson Valmir; DA LUZ, Suzane Rickes; D'AVILA, Roseane Farias; RUTZ, Josiane Kuhn. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, v.46, p 138-146, 2013.

DA SILVA, Luiz Francisco Jones Soares. **Nova associação de digluconato de clorexidina e cloridrato de lidocaína em gel urogenital. Desenvolvimento farmacotécnico, avaliação da qualidade e da estabilidade da formulação**. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

DA SILVA, Pablo Teixeira; FRIES, Leadir Lucy Martins; DE MENEZES, Cristiano Ragagnin; HOLKEM, Augusto Tasch; SCHWAN, Carla Luisa; WIGMANN, Évelin Francine; BASTOS, Juliana de Oliveira; DA SILVA, Cristiana de Bona. Microencapsulação: conceitos, mecanismos, métodos e algumas aplicações em tecnologia de alimentos. **Ciência Rural**, v.44, n.7, p.1304-1311, 2014.

DA SILVA, Pablo Teixeira; FRIES, Leadir Lucy Martins; DE MENEZES, Cristiano Ragagnin; DA SILVA, Cristiane de Bona; SORIANI, Hilda Hildebrand; BASTOS, Juliana de Oliveira; MOTTA, Mariana Heldt; RIBEIRO, Roseane Fagundes. Microencapsulação de probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Ciência Rural**, v.45, n.7, p. 1342-1347, 2015.

DE MENEZES, Cristiano Ragagnin; BARIN, Juliano Smaniotto; CHICOSKI, Alexandre José; ZEPKA, Leila Queiroz; JACOB-LOPES, Eduardo; FRIES, Leadir Lucy Martins; TERRA, Nelcindo Nascimento. Microencapsulação em probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p. 1309-1316, 2013.

DE MOURA, Carmen Dolores V. Soares; NOGUEIRA, Lorena B. Lima Verde; DO NASCIMENTO, Caroline Costa; SOARES, Isadora Mello Vilarinho; CASTRO, Janaína Cordeiro de Oliveira; DE MOURA, Walter Leal. Avaliação microbiológica da eficácia do bochecho de clorexidina prévio à moldagem da cavidade bucal. **Revista Odonto Ciência**, v.27, n.2, p. 156-160, 2012.

DE OLIVEIRA, Rosemary Aparecida. **Avaliação do efeito antimicrobiano *in vitro* de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre saliva e *Streptococcus mutans***. Dissertação (mestrado em bioengenharia). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

DE OLIVEIRA, Jonatas Rafael; VIEGAS, Daiane de Jesus; MARTINS, Ana Paula Réquia; CARVALHO, Cláudio Antônio Talge; SOARES, Cristina Pacheco; CAMARGO, Samira Esteves Afonso; JORGE, Antônio Olavo Cardoso; DE OLIVEIRA, Luciane Dias. Thymus vulgaris L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. **Archives of Oral Biology**, v. 82, n. April 2016, p. 271–279, 2017.

DONATO, E. M.; ZANOTTO, Â. R.; BERGOLD, A. M. CLAE-PI aplicada ao doseamento de vitaminas do complexo B em misturas : fundamentação e validação de método. v. 40, n. 2001, 2004.

DOS REIS, Fernanda B.; DE SOUZA, Vanessa M.; THOMAZ, Marta R. S.; FERNANDES, Luciana P.; DE OLIVEIRA, Wanderley P.; DE MARTINS, Elaine C. P. Use of Carnobacterium maltaromaticum cultures and hydroalcoholic extract of Lippia sidoides Cham. against Listeria monocytogenes in fish model systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 228–234, 2011.

DE SIQUEIRA, Virginia Medeiros; CONTI, Raphael; DE ARAÚJO, Janete Magali; SOUZA-MOTTA, Cristina Maria. Endophytic fungi from the medicinal plant Lippia sidoides Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, n. 2, p. 89–95, 2011.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, É. T. G. **Princípios e Aplicações de Análise Térmica**. Manual de apoio, Universidade de São Paulo, p. 40, 2012.

ETCHEPARE, Mariana de Araújo; BARIN, Juliano Smanioto; CICHOSKI, Alexandre José; JACOB-LOPES, Eduardo; WAGNER, Roger; FRIES, Leadir Lucy Martins; DE MENEZES, Cristiano Ragagnin. Microencapsulação de probióticos utilizando alginato de sódio. **Ciência Rural**, v.45, n.7, p. 1319-1326, 2015.

FERNANDES, Jocianelle Maria Felix de Alencar. **Incorporação de óleo essencial em cimento de ionômero de vidro: estudos *in vitro* e *in silico***. Tese (doutorado em odontologia). Universidade de Pernambuco, Camaragibe, 2015.

FERNANDES, Luciana P.; CANDIDO, Regina C.; OLIVEIRA, Wanderley P. Spray drying microencapsulation of Lippia sidoides extracts in carbohydrate blends. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 425–432, 2012.

FESTUCCIA, J. M. Z.; DE ANDRADE, D.; BERALDO, C. C.; SHIMURA, C. M. N.; WATANABE, E. *Staphylococcus aureus* e a atividade *in vitro* da clorexidina TT - Evaluation of *in vitro* activity of chlorhexidine against *Staphylococcus aureus*. **Rev. ciênc. farm. básica apl**, v. 34, n. 3, p. 411–415, 2013.

FREIRE, I. C. M.; CARDOSO, A. M. R.; MARIZ, B. A. L. A.; ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI. Y. W.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de óleos essenciais

sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2 SUPPL. 1, p. 372–377, 2014

GALEA, C.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y. V. Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC - a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 886, p. 1–15, 2015.

GRANATO, Daniel; NUNES, Domingos Sávio. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle da Qualidade de Alimentos e Bebidas**. 1ed. Rio de Janeiro, p.576, 2016.

HERRERA, Bruno S.; MENDES, Gerusa I. A. C.; PORTO, Rodrigo M.; RIGATO, Hamilton M.; MOREIRA, Leonard D.; MUSCARA, Marcelo N.; MAGALHÃES, José C. A.; MENDES, Gustavo D. O papel da clorexidina no tratamento de pacientes com gengivite no distrito de São Carlos do Jamari - RO TT - The role of chlorhexidine on the treatment of patients with gingivitis in Sao Carlos's district - RO. **Periodontia**, v. 17, n. 4, p. 60–64, 2007.

JAFARI, Abbas; RASMI, Yousef; HAJAGHAZADEH, Mohammad; KARIMIPOUR, Mojtaba. Hepatoprotective effect of thymol against subchronic toxicity of titanium dioxide nanoparticles: Biochemical and histological evidences. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 29–36, 2017.

JAMAL, Muhsin; AHMAD, Wisal; ANDLEEB, Saadia; JALIL, Fazal; IMRAM, Muhammad; NAWAZ, Muhammad Asif; HUSSAIN, Tahir; ALI, Muhammad; RAFIQ, Muhammad; KAMIL, Muhammad Atif. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.

JUNG, H. J.; AHN, H. I.; PARK, J. Y.; HO, M. J.; LEE, D. R.; CHO, H. R.; PARK, J. S.; CHOI, Y. S.; KANG, M. J. International Journal of Biological Macromolecules Improved oral absorption of tacrolimus by a solid dispersion with hypromellose and sodium lauryl sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 282–287, 2016.

KAMPF, Günther. Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an “antiseptic stewardship” initiative? **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 3, p. 213–227, 2016.

KIM, Ha Yeon; LEE, Woo Kyung; NA, Sungwon; ROH, Yun Ho; SHIN, Cheung Soo; KIM, Jeongmin. The effects of chlorhexidine gluconate bathing on health care-associated infection in intensive care units: A meta-analysis. **Journal of Critical Care**, v. 32, p. 126–137, 2015.

KLUK, edelaine; REINHOLD, Fernanda C. B. Carminati; MELLO, Andrea Malluf Dabul DE; MELLO, Fabiano Augusto Sfier DE. Uma abordagem sobre a clorexidina: ação antimicrobiana e modos de aplicação. **Revista Gestão & Saúde**, v. 14, n.1, p. 07-13, 2016.

KUMAR, Ashutosh; ALAM, Anwar; RANI, Mamta; EHTESHAM. Nasreen Z.; HASNAIN, Seyes E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 481–489, 2017.

KUMAR (2), K.; GIRIBHATTANAVAR, P; SAGAR, C.; PATIL, S. A rapid and simple resazurin assay to detect minimum inhibitory concentrations of first-line drugs for

Mycobacterium tuberculosis isolated from cerebrospinal fluid. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, n. 2010, p. 157–161, 2017.

LACHENMEIER, Dirk W. **Antiseptic Drugs and Disinfectants**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., v. 39, 2017.

LACOURSE, M. E.; LACOURSE, W. R. **Liquid Chromatography**. 2 ed. Elsevier Inc., v. 1, p.808, 2017.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas : finalmente “ compatíveis ”? **Scientia Chromatographics**, v.1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LEE, S.; LEE, S. Minimum Inhibitory Concentration of Chlorhexidine and Cetylpyridinium Chloride against a Mixture of Two Species of Oral Streptococci. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2018.

LI, Jianming; CHANG, Jun Won; SAENGER, Megan; DEERING, Amanda. Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 232, p. 191–197, 2017.

LIMA, Í. P. D. B.; LIMA, N. G. P. B.; BARROS, D. M. C.; OLIVEIRA, T. S.; BARBOSA, E. G.; GOMES, A. P. B.; FERRARI, M.; NASCIMENTO, T. G. D.; ARAGÃO, C. F. S. Compatibility study of tretinoin with several pharmaceutical excipients by thermal and non-thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 733–747, 2015.

MAHDAVI, Sahar A.; JAFARI, Seid M.; ASSADPOOR, Elham; DEHNAD, Danial. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 379–385, 2016.

MATTREY, F. T.; MAKAROV, E. L.; REGALADO, F.; BERNARDONI, M.; FIGUS, M.; HICKS, M. B.; WANG, L.; SCHAFER, W.; ANTONUCCI, V.; HAMILTON, S. E.; ZAWATZKY, K.; WELCH, C. J. Current challenges and future prospects in chromatographic method development for pharmaceutical research. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 95, p. 36–46, 2017.

MATTÉ, Grasielle M.; DA ROSA, Sirlei. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana, **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 14, n. 5, p. 206–218, 2013.

MARASINI, Nirmal; TRAN, Tuan Hiep; POUDEL, Bijay Kumar; CHO, Hyuk Jun; CHOI, Young Keun; CHI, Sang-Cheol; CHOI, Han-Gon; YONG, Chul Soon; KIM, Jong Oh. Fabrication and evaluation of pH-modulated solid dispersion for telmisartan by spray-drying technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1–2, p. 424–432, 2013.

MARCHESE, Anna; ORHAN, Erdogan; DAGLIA, Maria; BARBIERI, Ramona; DI LORENZO, Arianna; NABAVI, Seyed Fazel; GORTZI, Olga; IZADI, Morteza; NABAVI, Seyed Mohammad. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, 2016.

MARTINS, Isabel Maria Duque. **Microencapsulation of Thyme Oil by Coacervation: Production, Characterization and Release Evaluation**. Dissertação de Mestrado (Doctor of Philosophy in Chemical and Biological Engineering). Universidade do Porto, Porto, 2012.

MICHALSKA-SIONKOWSKA, Marta; WALCZAK, Maciej; SIONKOWSKA, Alina. Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. **Polymer Testing**, v. 63, p. 360–366, 2017.

MOLDOVEANU, S; DAVID, V. **Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis**. 1 ed, p.598, 2016.

MONTEIRO, Aliny A. D. S.; RICHTER, Ana R.; MACIEL, Jeanny D. S.; FEITOSA, Judith P. A.; PAULA, Haroldo, C. B.; DE PAULA, Regina C. M. Efeito da modificação química na solubilidade e intumescimento de microesferas à base de goma do cajueiro carboximetilada e quitosana. **Polímeros**, v. 25, p. 31–39, 2015.

MORAES, Anderson de Souza. **Caracterização farmacêutica de nanocápsulas de timol e avaliação da permeação cutânea e da atividade repelente contra *Aedes aegypti***. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

MOREIRA, G. F.; ACHETE, C. A; BARIN, J. S.; NOGUEIRA, R.; BITTENCOURT, C. F; RODRIGUES, J. M. Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para Determinação da Pureza de Fármacos. **Produto & Produção**, v. 11, p. 22–29, 2010.

MORAIS, Andreza R. D. V.; ALENCAR, Éverton D. N.; XAVIER JÚNIOR, Francisco H.; DE OLIVEIRA, Chistian M.; MARCELINO, Henrique R.; BARRATT, Gillian; FESSI, Hatem; DO EGITO, Eryvaldo S. T; ELAISSARI, Abdelhamid. Freeze-drying of emulsified systems : A review. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 503, p. 102–114, 2016.

MOURTZINOS, I.; KALOGEROPOULOS, N.; PAPADAKIS, S. E.; KONSTANTINOU K; KARATHANOS, V. T. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in β -cyclodextrin and modified starch. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, p. 89–94, 2008.

NEGRÃO-MURAKAMI, Aureanna N.; NUNES, Graciele L.; PINTO, Stephanie S.; MURAKAMI, Fábio S.; AMANTE, Edna R.; PRETRUS, José C. C.; PRUDÊNCIO, Renata D. M. C. A. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **LWT - Food Science and Technology**, p. 1–7, 2016.

NIEDDU, Maria; RASSU, Giovanna; BOATTO, Gianpiero; BOSI, Paolo; TREVISI, Paolo; GIUNCHEDI, Paolo; CARTA, Antonio; GAVINI, Elisabeth. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: In vitro and in vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 393–399, 2014.

NETO, Álvares J. D. S. Problemas com o Formato dos Picos em Cromatografia Líquida – Parte 4. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 61–67, 2010.

NIKOLIĆ, Miloš; GLAMOČLIJA, Jasmina; FERREIRA, Isabel C. F. R; CALHELHA, Ricardo C.; FERNANDES Ângela; MARKOVIĆ, Tatjana; MARKOVIĆ, Dejan; GIWELI,

Abdulhamed; SOKOVIĆ, Marina. Chemical composition, antimicrobial, antioxidante and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. And Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, 2014.

OLIVEIRA, M. M. M. D.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos : uma revisão Microbial biofilms in the food industry: a review. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277–284, 2010.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: Bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010.

OLIVEIRA, M. A. DE; YOSHIDA, M. I.; LIMA GOMES, E. C. DE. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224–1230, 2011.

OMS, Organização Mundial da Saúde. "Antimicrobial resistance: global report on surveillance", WHO Press, Geneva, 2014.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PALOMBO, E.A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-15, 2011.

PHADTARE, D.; PHADTARE, G.; ASAWAT, M. Hypromellose: a choice of polymer in extended. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 9, p.551–566, 2014.

PIMENTEL, Lúcio F.; JÁCOME JÚNIOR, Agenor T.; MOSQUEIRA, Vanessa C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, Nereide S. F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev. Brasileira de C. Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503–514, 2007.

PINHEIRO, Mayara Abreu; BRITO, Deborah Brindeiro de Araújo; ALMEIDA, Leopoldina Fátima Dantas; CAVALCANTI, Yuri Wanderley; PADILHA, Wilton Wilney Nascimento. Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 25, n. 2, p. 197–201, 2012.

PIRES, Sumaia Araújo. **Estudos de compatibilidade dos fármacos fenofibrato, ciprofibrato e citalopram com alguns excipientes**. Tese (doutorado em ciências – química). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

POCHIVALOV, K. V.; BASKO, A. V.; LEBEDEVA, T. N.; ANTINA, L. A.; GOLANOV, R. Y.; ARTEMOV, V. V.; EZHOV, A. A.; KUDRYAVTSEV, Y. V. Low-density polyethylene-thymol: Thermal behavior and phase diagram. **Thermochimica Acta**, v. 659, p. 113–120, 2017.

PRIYADARSHINI, B. M.; MITALI, K.; LU, T. B.; HANDRAL, H. K.; DUBEY, N.; FAWZY, A. S. PLGA nanoparticles as chlorhexidine-delivery carrier to resin-dentin adhesive interface. **Dental Materials**, v. 33, n. 7, p. 830–846, 2017.

RAMAGE, Gordon; RAJENDRAN, Ranjith; SHERRY, Leighann; WILLIAMS, Craig. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**. Volume 2012, Article ID 528521, 14 pages, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 80–84, 2005.

ROGOBETE, Alexandru F.; DRAGOMIRESCU, Monica; BEDREAG, Ovidiu H. New aspects of controlled release systems for local anaesthetics: A review. **Trends in Anaesthesia and Critical Care**, v. 9, p. 27–34, 2016.

RUIZ-HENESTROSA, Victor M.; BELLESI, Fernando A.; CAMINO, Nerina A.; PILOSOF, Ana M. R. Food Hydrocolloids The impact of HPMC structure in the modulation of in vitro lipolysis : The role of bile salts. **Food hydrocolloids**, v. 62, p. 251–261, 2017.

SAEIDIPOUR, F. MANSOURPOUR, Z.; MORTAZAVIAN, E.; RAFIEE-TEHRANI, N.; RAFIEE-TEHRANI, M. New comprehensive mathematical model for HPMC-MCC based matrices to design oral controlled release systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 121, n. August, p. 61–72, 2017.

SAHU, P. K.; RAO, R. N.; CECCHI, T.; SWAIN, S.; PATRO, C. S.; PANDA, J. **An Overview of Experimental Designs in HPLC Method Development and Validation**. [s.l.] Elsevier B.V., 2017.

SANTOS, Jander Cainã da Silva. **Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica preliminar de derivados N- acilidrazônicos**. Monografia. (Bacharelado em ciências biológicas). Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, 2012.

SILVA, E. C. DA; PAOLA, M. V. R. V. DE; MATOS, J. DO R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 347–356, 2007.

SINHG, P.; MEDRONHO, B.; ALVES, L.; DA SILVA, G. J.; MIGUEL, M. G.; LINDMAN, B. Development of Carboxymethyl Cellulose- Chitosan Hybrid Micro- and Macroparticles for Encapsulation of Probiotic Bacteria. **Carbohydrate Polymers**, 2017.

SOARES, Genaina Guimarães; SOUZA, Patrícia Regina; PURGER, Flávia Pereira de Carvalho; DE VASCONCELLOS, Adalberto Bastos; RIBEIRO, Apoena Aguiar. Métodos de detecção de cárie. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 1, p. 84–89, 2012.

SOKOLIK, Chana G.; BEN-SHABAT-BINYAMINI, Rina; GEDANKEN, Aharon; LELLOUVHE, Jean-Paul. Proteinaceous microspheres as a delivery system for carvacrol and thymol in antibacterial applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 41, p. 288–296, 2017.

SOUZA, Matheus Albino. **Análise da ação antimicrobiana e da substantividade de diferentes formulações de clorexidina comumente utilizadas durante o tratamento endodôntico**. Tese (Doutorado em Odontologia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SOUZA, C. R. F.; FERRAZ-FREITAS, P. N.; OLIVEIRA, W. P. Complexos de inclusão binários, ternários e quaternários contendo óleo essencial de Lippia sidoides. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 979–986, 2016.

SVENSÄTER, G.; WELIN, J. ; WILKINS, J. C.; BEIGHTON, D.; HAMILTON, I. R. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p.138-146, 2001.

SZAFRAŃSKI, Szymon P.; WINKEL, Andreas; STIESCH, Meike. The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. **Journal of Biotechnology**, p.1-16, 2017.

TEIXEIRA, Karina Imaculada Rosa. **Estudo comparativo de efeitos dos complexos de inclusão de clorexidina em ciclodextrinas em células bacterianas e eucariotas**. Tese (doutorado em Odontologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

TREMBLAY, Y.D.N., HATHROUBI, S., JACQUES, M. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, 2014.

TUPUNA, Diego S.; PAESE, Karina; GUTERRES, Silvia S.; JABLONSKI, André; FLÔRES, Simone H; RIOS, Alessandro D. O. Industrial Crops & Products Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. **Industrial Crops & Products**, v. 111, n. December 2017, p. 846–855, 2018.

WATSON, D. G. Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. **Churchill Livingstone**., p. 237-274, 313-320; 195-204, 1999.

ZACCHINO, Susana A.; BUTASSI, Estefanía; CORDISCO, Estefanía; SVETAZ, Laura A. Hybrid combinations containing natural products and antimicrobial drugs that interfere with bacterial and fungal biofilms. **Phytomedicine**, v. 37, n. August, p. 14–26, 2017.

ZANATTA, Fabrício Batistin; RÖSING, Cassiano Kuchenbecker. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival chlorhexidine: action's mechanisms and recent evidences of it's efficacy over supragingival biofilm context. **Scientific-A**, v. 1, n. 2, p. 35–43, 2007.

ZHU, Peipei; CHEN, Yanxin; FANG, Jing; WANG, Zelin; XIE, Chuag; HOU, Baohong; CHEN, Wei; XU, Fengxia. Solubility and solution thermodynamics of thymol in six pure organic solvents. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 92, p. 198–206, 2015.

ANEXO A: Depósito do Pedido de Patente de Invenção Intitulado “Produto Antimicrobiano Composto de Micropartículas Contendo Clorexidina e Timol e seu Uso” (BR102019025899-3)

Número do Processo: BR 10 2019 025899 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida Professor Moraes Rego, nº 1.235, Cidade Universitária.

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: BRASIL

Telefone: (81) 999 482243

Fax:

Email: almir.wanderley@gmail.com

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (64): PRODUTO ANTIMICROBIANO COMPOSTO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO CLOREXIDINA E TIMOL E SEU USO

Resumo: A presente invenção refere-se a um produto microparticulado contendo digluconato clorexidina e timol com finalidade farmacêutica ou cosmecêutica podendo ser incorporado em produto farmacêutico sólido ou semissólido, no combate a microrganismos, especialmente em infecções da cavidade oral. As suas vantagens envolvem: sinergismo de ação antimicrobiana, liberação controlada dos ativos, diminuição de chance de resistência dos microrganismos pelo uso de uma menor quantidade dos ativos, diminuição do número de efeitos indesejados de ambos os ativos.

Figura a publicar: 5

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 9

Nome: VANESSA MORAIS MUNIZ

CPF: 04618352310

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Luis Moreira Gomes, nº 440, apto. 301, Jardim Cidade Universitária.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58052-295

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 307732

Fax:

Email: nessammuniz@hotmail.com

Inventor 2 de 9

Nome: FÁBIO SANTOS DE SOUZA

CPF: 92771300400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Aderbal Maia Paiva, nº 600, Q 246, L 1299, Portal do Sol.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58046-527

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 134706

Fax:

Email: souzafss@yahoo.com.br

Inventor 3 de 9

Nome: RUI OLIVEIRA MACEDO

CPF: 16622553491

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Benjamim Rabelo, nº 181, apto. 502, Aeroclube.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58036-685

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 991635

Fax:

Email: ruiomacedo@yahoo.com.br