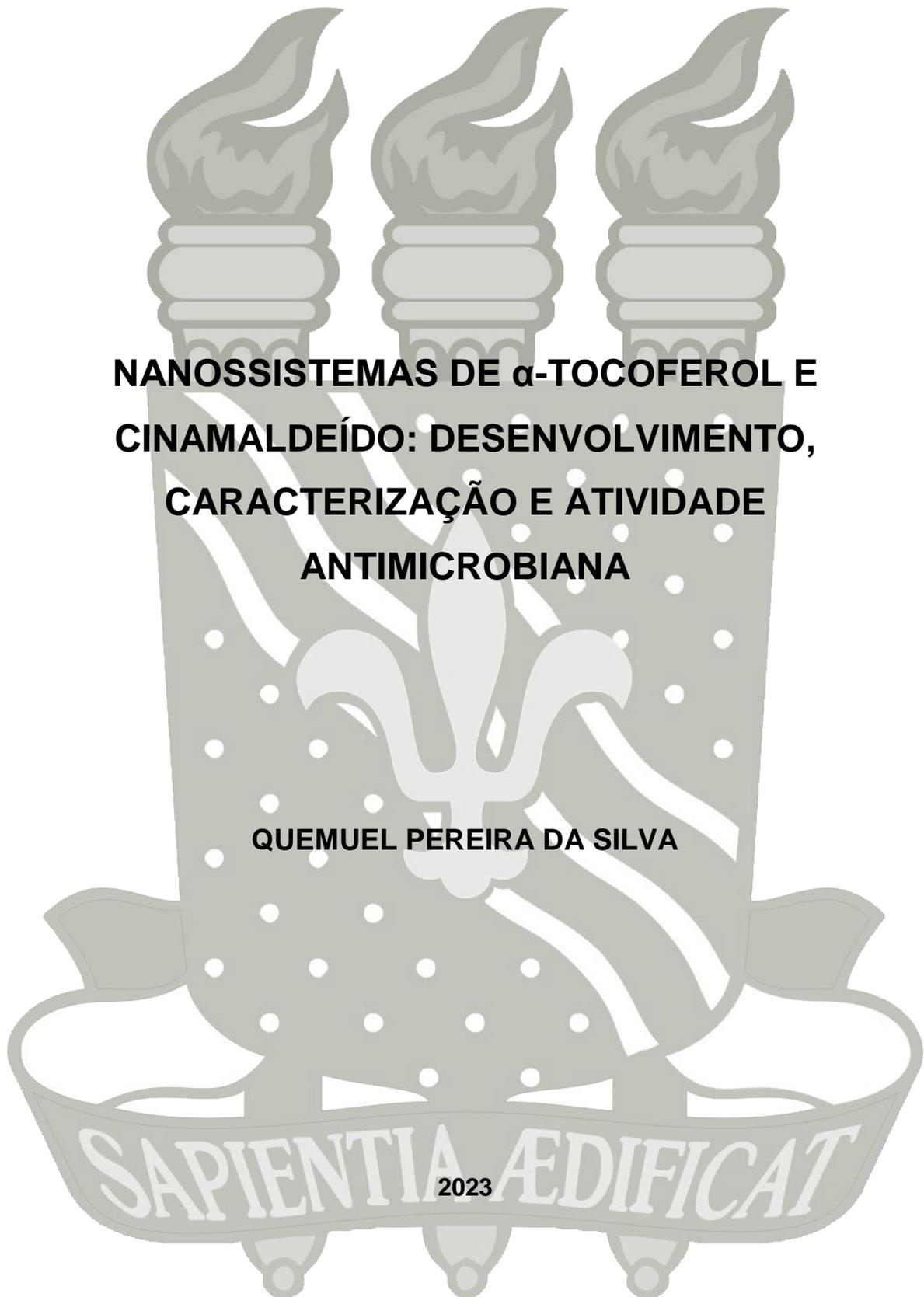


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**NANOSSISTEMAS DE α -TOCOFEROL E
CINAMALDEÍDO: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA**

QUEMUEL PEREIRA DA SILVA



QUEMUEL PEREIRA DA SILVA

**NANOSSISTEMAS DE α -TOCOFEROL E CINAMALDEÍDO:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA**

**α -TOCOPHEROL AND CINNAMALDEHYDE NANOSSYSTEMS:
DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL
ACTIVITY**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração de Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier júnior

João Pessoa

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586n Silva, Quemuel Pereira da.

Nanossistemas de alfa-tocoferol e cinamaldeído: desenvolvimento, caracterização e atividade antimicrobiana / Quemuel Pereira da Silva. - João Pessoa, 2023.

108 f. : il.

Orientação: Paulo Rogério Ferreti Bonan.

Coorientação: Francisco Humberto Xavier Júnior.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Odontologia - Nanotecnologia. 2. Canela. 3. Vitamina E. 4. Infecção. 5. Inflamação. I. Bonan, Paulo Rogério Ferreti. II. Xavier Júnior, Francisco Humberto. III. Título.

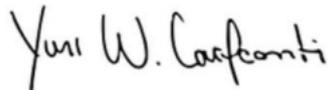
UFPB/BC

CDU 316.314:620.3(043)

QUEMUEL PEREIRA DA SILVA

**NANOSSISTEMAS DE α -TOCOFEROL E CINAMALDEÍDO:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA**

A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a defesa de Dissertação apresentada em sessão pública no dia 25 de Janeiro de 2023 e atribuiu o conceito APROVADO.



Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti
Examinador - UFPB

Documento assinado digitalmente
 ROMUALDO RODRIGUES MENEZES
Data: 25/01/2023 12:26:56-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes
Examinador – UFCG

ANDRE LUIZ SENA
GUIMARAES:0080149
7663

Assinado de forma digital por
ANDRE LUIZ SENA
GUIMARAES:00801497663
Dados: 2023.01.26 18:44:56 -03'00'

Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães
Examinador – Unimontes

DEDICATÓRIA

A minha amiga Carolina Ferreira (*in memoriam*) que lutou bravamente contra o câncer, mas que agora descansa com o Pai. Foi pela tentativa de amenizar as consequências do tratamento dos que estão nessa batalha que você esteve, que dei o meu melhor no desenvolvimento desse trabalho. Muito desse esforço, da determinação e força que tive foi pela memória e exemplo que me deixou. Quem dera todos pudessem ter um pouco do muito que você me ensinou.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita graça e misericórdia. Pelo sustento e pelo discernimento durante toda essa caminhada. Como uma música que costumo escutar diz: “Nunca foi sobre nós”, eu encerro esse ciclo ciente de que não foi sobre mim, sempre foi sobre Deus, Sua graça e Sua misericórdia, sem Ele nada disso seria possível, que toda honra e glória nessa conquista seja d’Ele.

Aos meus pais Adoman José e Deusiene Pereira, por me proporcionarem a certeza de um lar, de um ombro e colo para descansar. Por nunca fazerem disso um processo de cobrança ou pressão, mas em todos os momentos, até mesmo os de sacrifício da parte deles, sempre emanarem amor e apoio. Vocês têm todo meu amor e admiração. Essa vitória é nossa.

Aos meus irmãos, meus confidentes e melhores amigos, vocês sem dúvida são meus exemplos. A minha irmã e também dentista, Dâmilly Duane, meu muito obrigado por ser a profissional que me permitiu um ótimo exemplo na Odontologia. Ao meu irmão Hilquias Pereira, meu muito obrigado pelo melhor exemplo de empatia, de determinação e foco.

Ao meu sobrinho, Josué Pereira, que apesar da pouca idade e do pouco entendimento já é capaz de instigar tanta coisa boa em mim. Quem me proporciona ama saudade diária e uma força de correr atrás de meus sonhos. A quem me ensinou uma nova forma de amar e cuidar, meu muito obrigado!

A toda minha família, Vó Maria do Carmo, Vô Daniel Pereira, tios Natanael Pereira, Delisomar Pereira, Delvan Pereira e Wellington Silva, tias Deusani Pereira, Dilene Pereira, Aleksandra Sousa, Marilene Pereira, Elizângela Silveira e Núbia Silva, primos Haniel Pereira, Micaias Pereira, Esdras Pereira, Pedro Paulo Pereira, Erick Daniel e Jhonatan Pereira e primas Nathana Sousa, Carmem Daniela Pereira, Emanuelle Pereira, Milena Pereira e Mariana Pereira, que me proporcionam o maior orgulho do mundo em carregar o Pereira e Silva como sobrenomes. Abrigo em momentos difíceis, paz em meio a uma mente exausta, amor, oração e torcida quase palpáveis. Muito obrigado por tudo. Amo vocês.

Aos meus cunhados, aos quais também considero irmãos, George Borges e Jaqueline Oliveira, muito obrigado pelo apoio, pelo carinho e força emanada, vocês também me deram a certeza de ter pessoas leais comigo.

As minhas irmãs de vida, Vitória Dantas e Paula Nogueira, com quem compartilho tudo desde a graduação, até aqui e por muito tempo se Deus nos permitir. Falar de vocês nunca vai ser fácil e tentar externar minha gratidão em um parágrafo é uma tarefa fadada a falhar. Vocês sempre terão todo o meu amor e admiração. Obrigado por tudo, por me ouvirem quando precisei falar, por compartilharem medos, incertezas, frustrações e acima de tudo, obrigado por sempre terem um “vai dar certo, conte comigo!” para me falar.

Aos meus amigos da bancada evangélica, ou seriam irmãos? Amanda Araújo, Filipe Lima, Tays Santana e Thallita Alves, obrigado por serem família e representarem tudo o que essa palavra é capaz de representar. Orgulho-me de nossa amizade e parceria e me emociono ao lembrar-me de tudo o que a gente passou e por todo apoio, de longe ou de perto, que vocês me deram. Em qualquer lugar carreguei vocês com amor e com um sorriso, sempre serão ponto de paz, apoio e felicidade. Sou eternamente grato a Deus por vocês, e a vocês por fazerem parte de mim. Amo vocês.

Ao Grupo “Cultura e política” e meus amigos Carmem Daniela, Pedro Paulo, Nathana Vitória e Abigail Costa, por estarem comigo desde o início, inclusive na construção do presente estudo, muito obrigado pela parceria, torcida, paciência e ensinamentos, sejam acadêmicos ou pessoais, vocês são essenciais em minha vida.

Ao meu professor e orientador, Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan, pelos ensinamentos que se estenderam do acadêmico para o profissional e pessoal. Obrigado pela paciência, pelo conhecimento passado, pelas oportunidades e por toda confiança. Por me acolher no universo da pesquisa e por me apresentar e ensinar mais não só sobre o diagnóstico oral, mas de ser também sobre ser um profissional humano e empático. O senhor sem dúvida faz jus ao título de professor, sua forma de ensinar é admirável. És um grande exemplo para mim.

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Humberto Xavier, pela experiência riquíssima em seu laboratório, pela oportunidade de aprender um pouco de uma área tão relevante, atual e aplicável à odontologia. Serei eternamente grato pelos ensinamentos do senhor, sem dúvida és um grande exemplo e referência para mim.

A todos os técnicos e alunos do LaBio, LAFECC e BiotecFarm pela parceria, paciência e disponibilidade, todos foram muito importantes na construção desse trabalho.

A banca avaliadora, Prof. Dr. André Sena e Prof. Dr. Romualdo Menezes pela disponibilidade e por me permitirem aprender e aperfeiçoar o presente trabalho com quem é referência no assunto.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, pela excelência da qualidade técnica e científica de cada um, em especial aos professores Edson Hilan Gomes de Lucena, Ricardo Dias de Castro e Simone Alves com quem pude aprender um pouco mais e contar com a disponibilidade e conselhos.

Aos amigos que ganhei em João Pessoa e aos meus parceiros de laboratório, Helder Alustau, Helder Domiciano, Eduarda Gomes, Cassiane Lucena, Beatriz Andrade, Brenda Fernandes, Maria Isabel, Isis Muniz, Danielle Nóbrega, Livian Medeiros, Ana Karoline Vieira, Gleycy Rodrigues e Lucas Silva, que sempre se mostraram presentes em todos os momentos dessa caminhada, me ajudando em tudo que era possível. Muito obrigado por tudo, vocês também foram pontos de apoio e força para mim.

A todos do grupo de pesquisa do Prof. Paulo Bonan e do Hospital Napoleão Laureano, por tornarem tão rica em ciência e humanidade a nossa convivência, pela ajuda e apoio e pelas inspirações que representam para mim.

A minha amiga de graduação e de luta para conseguir entrar na pós-graduação, quem sempre me faz esquecer um pouco da rotina me permitindo rir do seu jeito e espontaneidade. É isso, Ana, só quem viveu sabe. Tu és admirável, muito obrigado por tudo.

A Panmella Maciel pela amizade e parceria no laboratório, pelo que me foi ensinado e pela disposição em ajudar, esse trabalho não teria sido concluído sem sua ajuda.

Aos meus amigos Laís Sousa, Rebeca Laís e Simão Guedes, que da infância até hoje me deram a certeza de ter com quem contar, e que mesmo com as nossas rotinas e distância, conseguimos nos manter parceiros, vibrando com as vitórias uns dos outros.

A Laís Maia e toda sua família, graças a Deus que passei por tudo isso podendo contar com vocês. Obrigado por me ouvirem, aconselharem, torcerem e

orarem. Obrigado pelas fotos e vídeos de Aurorinha que sempre me trazem tantos sentimentos bons. Sou muito grato a Deus por suas vidas. Amo vocês.

A amigos especiais da graduação, Amanda Oliveira, Maria Gabriella Lacerda, Amanda Carneiro e Ândrezza Sousa, e as que perduraram desde o ensino médio, Layane Lima e Karen Mylana, apoio em dias cansativos, bom humor, otimismo e certeza de que a misericórdia divina se externou também por meio de suas amigades, muito Obrigado por tudo. Amo vocês.

A todos da Universidade Federal de Campina Grande que contribuíram para a realização desse sonho, Profa. Angélica Sátyro, Profa. Bárbara Monteiro, Profa. Cyntia Helena, Profa. Rosana Araújo, Profa. Elizandra Penha, Profa. Luana Abílio, Profa. Tássia Sarmiento, Prof. Rodrigo Alves, Prof. Rodrigo Rodrigues e Macário. Sem vocês isso não seria possível.

A todos meus irmãos em Cristo da igreja Evangélica Congregacional de brejo dos Santos e Presbiteriana dos Bancários, pelas orações, acolhimento e por sempre garantirem uma renovação de forças.

A minha amiga Carolina Ferreira (*in memorian*), que compartilhou comigo a felicidade da minha aprovação no vestibular, e que infelizmente já não estava presente na conclusão da minha graduação e também não poderá comemorar comigo a conclusão desse sonho que há muito tempo compartilhei com ela. Sua memória é o que proporciona boa parte da minha força e que me instiga a ver as coisas com positividade. A saudade aperta, mas as lembranças de tudo que a gente viveu me fazem lembrar de você como determinação, amor e cuidado, muito obrigado por isso.

A minha avó Antônia Silva e meu tio Raimundo Ananias (*in memorian*), muito obrigado por terem feito questão de me manterem por perto através de suas preocupações e cuidado, Obrigado por terem zelado de mim e me colocado em suas preces. Vocês são eternos exemplos para mim, também dedico essa vitória a vocês.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço à CAPES e à Universidade Federal da Paraíba, pelo apoio institucional recebido.

RESUMO

Introdução: O uso tópico do α -tocoferol (α -toc) e do cinamaldeído (CNM) em conjunto na cavidade oral ainda é pouco explorado, porém somaria as características antioxidante e proliferativa do α -toc com as anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana do CNM. A encapsulação destes em nanossistemas recobertos com quitosana podem potencializar seus efeitos terapêuticos, promovendo mucoadesão e melhor permeabilidade. **Objetivo:** avaliar *in silico* o potencial anti-inflamatório do CNM e α -toc e antimicrobiano do CNM, bem como, desenvolver e caracterizar nanocápsulas e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com esses ativos e avaliar seus potenciais antimicrobianos *in vitro*. **Metodologia:** Foi avaliada *in silico* por meio do *docking molecular* a atividade anti-inflamatória do CNM e α -toc e antimicrobiana do CNM. Posteriormente foi realizada a análise de composição dos óleos por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). O desenvolvimento das nanocápsulas foi realizado através da técnica termossensível do poloxamer 407 e determinado o tamanho das partículas (D), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ), assim como, foram submetidas à espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR), desempenhados estudos de propriedades das fases sol-gel, de estabilidade, ensaios reológicos e de atividade antimicrobiana. Os CLN foram desenvolvidos através da emulsificação a quente seguido da sonicação ultrassônica, para os mesmos foram feitos estudos de pré-formulação, delineamento do tipo Box-Behnken para seleção de uma formulação otimizada, desenvolvimento e análise do D, PDI e PZ das formulações otimizadas com CNM e α -toc, avaliando sua atividade antimicrobiana *in vitro*. **Resultados:** Os resultados demonstraram *in silico*, a partir do *docking molecular*, uma predição de afinidade do CNM e α -toc para todos os alvos avaliados, aumentando a probabilidade de êxito nas atividades anti-inflamatória e antimicrobiana. A CG-EM revelou o CNM como o principal constituinte do óleo de CNM e o acetato de α -toc como o principal constituinte do óleo de α -toc. Nas dispersões de nanocápsulas foram observadas partículas com tamanho variando entre 135.7 a 1997 nm e potencial zeta com valores entre -3.76 a +11.1; o FTIR confirmou a encapsulação dos ativos nas dispersões; a transição de fase sol-gel se deu em temperaturas entre 20°C e 30°C e permaneceram em forma de solução quando armazenados à

temperatura ambiente pelo tempo que variou entre 15.9 a 47.27 s, as mesmas também demonstraram estabilidade quanto ao pH, homogeneidade, odor e coloração; nas análises reológicas foi visto que as dispersões de nanocápsulas possuem comportamento pseudoplástico, o que facilita sua aplicação pela diminuição da viscosidade com o esforço, bem como, apresentam melhor atividade antimicrobiana *in vitro* do CNM encapsulado (CIM a partir de 3,12 µg/mL) quando comparado ao CNM livre (CIM a partir de 39 µg/mL) contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. O estudo de pré-formulação dos CLN permitiu a análise de variáveis que basearam o delineamento do tipo Box-Behnken, que forneceu as concentrações tidas como ideais dos componentes após avaliação estatística (25mg/ml de quitosana, 50mg/ml de precinol e 100mg/ml do CNM e/ou α-toc), de forma a prover uma produção otimizada das mesmas. Os ensaios antimicrobianos evidenciaram ação incrementada e sinérgica dos ativos encapsulados nesse sistema (CIM a partir de 8 µg/mL para o CNM, 6 µg/mL para o α-toc e 8 µg/mL para a quitosana) quando comparado as formas livres (CIM a partir de 39 µg/mL para o CNM, α-toc sem atividade na maior concentração testada [50 mg/ml] e 260 µg/mL para a quitosana) contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. **Conclusão:** Com isso, viu-se que os ativos apresentaram *in silico*, na análise do *docking* molecular, uma predição de afinidade do CNM e α-toc para todos os alvos avaliados. Também foi possível desenvolver ambos os sistemas com boas características e com atividades antimicrobianas potencializadas, embora os CLN tenham seu uso visto como mais promissor em mucosa oral.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Canela; Vitamina E; Infecções; Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: The topical use of α -tocopherol (α -toc) and cinnamaldehyde (CNM) together in the oral cavity is still little explored, but it would add the antioxidant and proliferative characteristics of α -toc with the anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial of the CNM. The encapsulation of these in nanosystems coated with chitosan can enhance their therapeutic effects, promoting mucoadhesion and better permeability. **Objective:** to evaluate *in silico* the anti-inflammatory potential of CNM and α -toc and antimicrobial potential of CNM, as well as to develop and characterize nanocapsules and nanostructured lipid carriers (CLN) with these actives and evaluate their antimicrobial potential *in vitro*. **Methodology:** The anti-inflammatory activity of CNM and α -toc and antimicrobial activity of CNM were evaluated *in silico* using molecular *docking*. Subsequently, the composition analysis of the oils was carried out using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The development of the nanocapsules was carried out using the thermosensitive technique of poloxamer 407 and the particle size (D), polydispersion index (PDI) and zeta potential (PZ) were determined, as well as being submitted to infrared spectroscopy by Fourier transform (FTIR), carried out studies of properties of the sol-gel phases, stability, rheological tests and antimicrobial activity. The CLN were developed through hot emulsification followed by ultrasonic sonication, pre-formulation studies, Box-Behnken type design for selection of an optimized formulation, development and analysis of the D, PDI and PZ of the optimized formulations were carried out with CNM and α -toc, evaluating its *in vitro* antimicrobial activity. **Results:** The results demonstrated *in silico*, from molecular docking, a prediction of CNM and α -toc affinity for all evaluated targets, increasing the probability of success in anti-inflammatory and antimicrobial activities. GC-MS revealed CNM as the main constituent of CNM oil and α -toc acetate as the main constituent of α -toc oil. In the dispersions of nanocapsules, particles with size ranging from 135.7 to 1997 nm and zeta potential with values between -3.76 to +11.1 were observed; FTIR confirmed the encapsulation of assets in dispersions; the sol-gel phase transition occurred at temperatures between 20°C and 30°C and remained in the form of a solution when stored at room temperature for a time that varied between 15.9 to 47.27 s, they also demonstrated stability in terms of pH, homogeneity, odor and coloration; in the

rheological analyses, it was seen that the dispersions of nanocapsules have a pseudoplastic behavior, which facilitates their application due to the decrease in viscosity with effort, as well as, they present better antimicrobial activity *in vitro* than the encapsulated CNM (MIC from 3.12 µg/mL) when compared to free CNM (MIC from 39 µg/mL) against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The pre-formulation study of the CLN allowed the analysis of variables that based the Box-Behnken type design, which provided the concentrations considered ideal for the components after statistical evaluation (25mg/ml of chitosan, 50mg/ml of precinol and 100mg/ ml of CNM and/or α-toc), in order to provide an optimized production of them. Antimicrobial assays showed increased and synergistic action of the actives encapsulated in this system (MIC from 8 µg/mL for CNM, 6 µg/mL for α-toc and 8 µg/mL for chitosan) when compared to the free forms (MIC from 39 µg/mL for CNM, α-toc without activity at the highest concentration tested [50 mg/ml] and 260 µg/mL for chitosan) against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Conclusion:* With this, it is seen that the actives presented *in silico*, in the molecular *docking* analysis, a prediction of CNM and α-toc affinity for all evaluated targets. It was also possible to develop both systems with good characteristics and potentiated antimicrobial activities, although the use of CLN is seen as more promising in the oral mucosa.

Keywords: Nanotechnology; Cinamomo; Vitamin E; Infections; Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1CX2** – Alvo ciclooxygenase-2 complexada com um inibidor seletivo;
- 1KVO** – Alvo fosfolipase a2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente;
- 1SVC** - Alvo homodímero nfkb p50 ligado ao dna;
- 2GE5** – Alvo mutante de deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca²⁺;
- 2H29** – Alvo mononucleotídeo de ácido nicotínico Adenililtransferase;
- 3FXI** – alvo complexo humano TLR4/MD-2;
- 3ZFK** – Alvo Domínio de Nuclease N-terminal truncado de Colicina E7;
- 4KIK** – Alvo IκB quinase beta humana;
- 4MAI** – Alvo esqualeno epoxidase;
- 4QUV** - Alvo δ-14-esterol redutase;
- 5TZ1** - Alvo 14-α-desmetilase;
- BHI** - Brain Heart Infusion;
- CBiotech** - centro de Biotecnologia;
- CBM** – Concentração bactericida mínima;
- CCEN** - Centro de Ciências exatas e da Natureza;
- CCS** - Centro de Ciências da Saúde;
- CFM** – Concentração fungicida mínima;
- CG-EM** - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- CIM** – Concentração inibitória mínima;
- CLN** – Carreador lipídico nanoestruturado;
- CNM** – Cinamaldeído;
- COX 2** – Ciclooxygenase 2;
- CSD** - Caldo Sabouraud Dextrose;

D – diâmetro das partículas;

DLS - Espalhamento de luz dinâmico;

DNA - ácido desoxirribonucleico;

EGF - fator de crescimento epitelial;

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal;

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio;

HO-1 - heme oxigenase-1;

IκB – I kappa B quinase;

IL – 8 – Interleucina 8;

IL-1β - Interleucina 1 beta;

IpeFarm - Instituto de Pesquisa com Fármacos e medicamentos;

JNK - c-Jun N-Terminal Cinase;

KGF - Receptor de crescimento de queratinócitos;

LaBio - Laboratório de Biomateriais;

LAFECC - Laboratório de Farmacologia experimental e cultivo celular;

LEM - Laboratório de Espectroscopia Molecular;

LPS – Lipopolissacarídeos;

MAPK- Proteína Cinase Ativada por Mitogênio;

MCT – Lipídios de cadeia média;

MD2- fator de diferenciação mielóide 2;

MVD - Molegro Virtual Docker;

MyD88 - proteína de diferenciação mielóide;

NF-E2 – Fator eritróide 2;

NFκB – Fator nuclear kappa B;

NFR2 - fator 2 relacionado ao p45;

NH₂ – Amida;

OH – Hidroxila;

P407 – Poloxamer 407;

PDB – Protein Data Bank;

PDI – Índice de polidispersão;

PEG – Polietilenoglicol;

PGE2 - prostaglandina E2;

PPO - polióxido de propileno;

PZ – Potencial Zeta;

ROS - Reactive Oxygen Species/Espécies reativas de oxigênio;

Th1 – Linfócito T helper 1;

Th2 – Linfócito T helper 2;

TLR2 - Receptor do tipo Toll 2;

TLR4 - Receptor do tipo Toll 4;

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa;

TPP – Tripolifosfato de sódio;

Tsol / gel – Temperatura e tempo de transição da fase em solução para a fase gel;

UFPB - Universidade Federal da Paraíba;

α -toc - α -tocoferol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações dos materiais utilizados na confecção dos grupos das dispersões de nanocápsulas.	38
Tabela 2. Concentrações de lipídios, solventes e tensoativos nas 8 formulações teste de CLN.	45
Tabela 3. Codificação das variáveis e dos níveis no estudo da metodologia de superfície de resposta do planejamento experimental Box-Behnken.	46
Tabela 4. Formulações aleatorizadas utilizadas para produção de CLN através do planejamento experimental Box-Behnken.	46
Tabela 5. Concentrações dos componentes para as formulações otimizadas de CLN.	47
Tabela 6. Valores energia de ligação para os compostos estudados e os alvos: 1CX2 (ciclooxigenase 2), 1KVO (fosfolipase A2), 1SVC (homodímero nfkb p50 ligado ao dna), 3FXI (complexo humano TLR4/MD-2), 4KIK (Ikb quinase beta humana), 4MAI (esqualeno epoxidase), 4QUV (δ -14-esterol redutase), 5TZ1 (14- α -desmetilase), 2GE5 (mutante de deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca ²⁺), 3ZFK (Domínio de Nuclease N-terminal truncado de Colicina E7) e 2H29 (mononucleotídeo de ácido nicotínico Adenililtransferase).	56
Tabela 7. Composição do óleo de CNM obtido por CG-EM.	58
Tabela 8. Composição do óleo de α -toc obtido por CG-EM.	59
Tabela 9. Resultado de análise no DLS dos grupos testados em relação ao D, PDI e PZ.	61
Tabela 10. Temperatura e tempo de gelificação das dispersões.	64
Tabela 11. Avaliação do pH inicial e após 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente, geladeira e estufa.	66
Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das dispersões de nanocápsulas frente as cepas de <i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>C.albicans</i>	70

Tabela 13. Resultado da análise do tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta.	72
Tabela 14. Respostas observadas no delineamento Box-Behnken para desenvolvimento e otimização das formulações de CLN.	74
Tabela 16. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das as formulações de CLN frente as cepas de <i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>C.albicans</i>	82
Tabela 17. Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) derivado das combinações: CNM + α -TOC; Quitosana + CNM e Quitosana + α -TOC.	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do α -toc.	25
Figura 2. Estrutura dos nanocarreadores organizados em carreadores vesiculares, carreadores sólidos, carreadores micelares.	28
Figura 3. Fluxograma das etapas das metodologia empregadas na pesquisa	34
Figura 4. Ilustração esquemática do desenvolvimento das dispersões de nanocápsulas.....	38
Figura 5. Ilustração esquemática do desenvolvimento dos CLN.	44
Figura 6. Mapa de interações entre os compostos CNM e α -toc com os alvos em estudo. a. interação CNM/ ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo; b. Interação α -toc/ ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo; c. Interação CNM/ fosfolipase a2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente; d. Interação α -toc/ fosfolipase a2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente; e. Interação CNM/ homodímero nfkb p50 ligado ao DNA; f. Interação α -toc/homodímero nfkb p50 ligado ao DNA; g. Interação CNM/complexo humano TLR4/MD-2; h. Interação α -toc/ complexo humano TLR4/MD-2; i. Interação CNM/ Ikb quinase beta humana; j. Interação α -toc/ Ikb quinase beta humana.	53
Figura 7. Mapa de interações entre o composto CNM com os alvos em estudo. a. Interação CNM/esqualeno epoxidase (4MAI); b. Interação CNM/ δ -14-esterol redutase (4QUV); c. Interação CNM/14- α -desmetilase (5TZ1); d. Interação CNM/ deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca ²⁺ (2GE5); e. Interação CNM/ domínio de Nuclease N-terminal truncado de Colicina E7(3ZFK); f. Interação CNM/mononucleotídeo de ácido nicotínico Adenililtransferase (2H29).....	55
Figura 8. Cromatograma do CNM por CG-EM.....	57
Figura 9. Cromatograma do α -toc por CG-EM.....	59
Figura 10. Aspecto macroscópico das dispersões de nanocápsulas.	60

Figura 11. a. Espectros de FTIR dos componentes das formulações (TPP, P407, Quitosana, Cinamaldeído e α -toc); b. Espectros das formulações (GC, G α -TOC, G α -TOC + CNM 0,2, G CNM 0,2, G α -TOC + CNM 0,4 e G CNM 0,4).....	63
Figura 12. a. dispersão em fase de solução; b. dispersão após gelificação.	65
Figura 14: Tangente de perda ($\tan\delta$) em função da temperatura. a. amostra controle e amostras com α -TOC e CNM; b. amostra controle e amostras com CNM.....	68
Figura 15. Aspecto macroscópico das formulações teste.	71
Figura 16. Aspecto macroscópico das formulações para o delineamento box-benhken.	74
Figura 17. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas: tamanho (D) para o delineamento experimental Box-Behnken de CLN	75
Figura 18. Gráfico de correlação linear entre os valores observados e previstos, correspondentes a resposta: tamanho	76
Figura 20. Gráficos de superfície de resposta 3D mostrando o efeito das variáveis independentes (quitosana, MCT e precírol) no tamanho (D) dos CLN. a. Relação quitosana/MCT; b. Relação MCT/precírol; c. Relação quitosana/precírol.....	77
Figura 21. Gráfico de médias marginais e limites de confiança.	79
Figura 22. Aspecto macroscópico das formulações otimizadas.....	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1. Potencial terapêutico do α -toc e CNM.....	24
2.2. Nanopartículas na encapsulação de fármacos.....	27
2.2.1 Nanopartículas na encapsulação de α -toc e CNM	30
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.2. Objetivos Específicos.....	33
4. METODOLOGIA	34
4.1. Local da pesquisa	34
4.2. Caracterização <i>in silico</i> através do <i>docking</i> molecular do CNM e α -toc	35
4.3. Caracterização dos óleos por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	36
4.4. Nanocápsulas	36
4.4.1. Materiais utilizados	36
4.4.2. Desenvolvimento	36
4.4.3. Caracterização das nanocápsulas	39
4.4.3.1. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta	39
4.4.3.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)	39
4.4.3.3. Avaliação das propriedades de transição sol-gel	39
4.4.3.4. Estudo de estabilidade.....	40
4.4.3.5. Ensaio reológicos.....	41
4.4.3.6. Ensaio microbiológicos	41
4.4.3.6.1. Microrganismos	41
4.4.3.6.2. Concentração inibitória mínima das dispersões de nanocápsulas com CNM e α -toc e do CNM livre contra <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus</i>	

<i>aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	41
4.5. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)	43
4.5.1. Materiais utilizados	43
4.5.2. Desenvolvimento	43
4.5.2.1 Estudos de pré-formulação do CLN	44
4.5.2.2 Planejamento experimental do tipo box-behnken para otimização da produção de CLN	45
4.5.2.3 Desenvolvimento das formulações otimizadas de CLN com α -toc e CNM	47
4.4.5.3.2. Ensaio microbiológico.....	48
4.4.5.3.2.1 Microrganismos	48
4.4.5.3.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos CLN com CNM e α -toc e do CNM livre contra <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia</i> <i>coli</i>	48
5. RESULTADOS	50
5.1. Caracterização <i>in silico</i> através do <i>docking</i> molecular do CNM e α -toc	50
5.2. Caracterização dos óleos por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	57
5.3. Nanocápsulas	59
5.3.1 Desenvolvimento	60
5.3.2. Caracterização.....	60
5.3.2.1. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas	60
5.3.2.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	62
5.3.2.3. Avaliação das propriedades de transição sol-gel	64
5.3.2.4. Estudo de estabilidade.....	65
5.3.2.5. Ensaio reológico.....	66
5.3.2.6. Concentração inibitória mínima (CIM) das dispersões com nanocápsulas	

de CNM e α -toc e do CNM livre contra <i>C. albicans</i> , <i>S.aureus</i> e <i>E.coli</i>	69
5.4. CLN	70
5.4.1.1. Estudos de pré-formulação do CLN	71
5.4.1.2. Planejamento experimental do tipo box-behnken para otimização da produção de CLN	73
5.4.1.3. Desenvolvimento das formulações otimizadas de CLN com CNM e α -toc	79
5.4.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos CLN com CNM e α -toc e do CNM livre contra <i>C. albicans</i> , <i>S.aureus</i> e <i>E.coli</i>	81
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral pode ser sítio de diversas condições inflamatórias e infecciosas, onde é possível observar diferentes apresentações clínicas e etiologias distintas, desde condições dentárias e periodontais a condições virais, imunomediadas e decorrentes de quadros de imunossupressão. Em se tratando das condições infecciosas, é sabido que a cavidade oral fornece um ambiente diverso para a colonização por uma ampla variedade de microorganismos, tanto fúngicos quanto bacterianos. Já em se tratando das condições inflamatórias, as mesmas podem corroborar com o aumento da sintomatologia dolorosa e do risco do desenvolvimento de infecções secundárias a depender de sua apresentação clínica e condição do paciente, podendo acrescer a morbimortalidade, principalmente em indivíduos com problemas sistêmicos concomitantes, logo, é relevante o tratamento ou, a depender do caso, a prevenção dessas condições inflamatórias e infecciosas (1,2).

Levando em consideração os produtos naturais e seus constituintes como agentes terapêuticos para essas condições, têm-se o cinamaldeído (CNM) (3-fenil-2-propenal; C_9H_8O), um fenilpropanóide encontrado no estado líquido/oleoso de coloração amarelada, com odor de canela e sabor doce, sendo o principal constituinte do óleo de plantas do gênero *Cinnamomum* (3,4), que se mostra promissor para aplicação em diversas patologias da cavidade oral por apresentar atividade anti-inflamatória, antitumoral, analgésica e antimicrobiana (5–7).

Além desse, podem-se destacar os antioxidantes, os quais têm sido usados e sugeridos para o protocolo terapêutico de condições inflamatórias e ulceradas em boca por abrandar o processo inflamatório, corroborando com a reparação tecidual. Na atualidade, a vitamina E vem sendo utilizada devido a esse poder antioxidativo. Esta faz parte de uma família de 8 tocômeros, sendo o α -tocoferol (α -toc) o mais comum, bem reconhecido pelo seu poder antioxidante, promovendo a proliferação e a migração celular (8–10).

O uso tópico do α -toc e CNM em conjunto é pouco explorado, no entanto, somaria as características antioxidante e proliferativa do α -toc com as anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana do CNM. Já o uso isolado dessas substâncias são comumente feitos em sua forma oleosa, porém, a interação de

substâncias lipofílicas, como as supracitadas, com o ácido siálico e outras moléculas de carga negativa encontradas na superfície da mucosa oral, pode diminuir o tempo de contato e a biodisponibilidade do fármaco, devido principalmente a falta de atração eletrostática (11). Com isso, a encapsulação destes pode promover mucoadesão, melhor permeabilidade e potencialização de suas atividades anti-inflamatória e antimicrobiana (12).

Ativos como os supracitados podem ser encapsulados em nanocápsulas, que se constituem de um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, com o ativo de interesse podendo estar dissolvido em seu núcleo ou adsorvido à sua parede polimérica (13–16), ou ainda, em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN), que vêm despertando grande interesse nas aplicações em superfícies cutâneas e mucosas devido suas propriedades, as quais, em comum com as nanocápsulas são: controle da liberação de ativos, recobrimento de lipídios naturais ou sintéticos biodegradáveis, ótima tolerância e boa resposta farmacológica, além de vantagens como a proteção de substâncias quimicamente lábeis, ampliação da capacidade de adição de princípios ativos, reduzida excreção do fármaco em seu armazenamento e, devido as suas dimensões, assegurarem um contato maior com a superfície de aplicação, o que poderia aumentar a biodisponibilidade do α -toc e do CNM em mucosas (17–19).

Contudo, esses sistemas não são caracteristicamente mucoadesivos, sendo assim, pode-se fazer o uso da quitosana. A mucoadesividade provida da quitosana, um polímero de natureza policatiônica, permite um maior tempo de contato da formulação com a mucosa. Além da atração eletrostática, que pode ser indicada como um dos principais mecanismos responsável pela mucoadesividade, esta pode ser potencializada pela presença de pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals (20,21).

Assim, o presente estudo objetivou avaliar *in silico* o potencial anti-inflamatório do CNM e α -toc e antimicrobiano do CNM, incorporar esses ativos em nanocápsulas e CLN a base de quitosana, caracterizar os nanossistemas físico-quimicamente e avaliar *in vitro* suas propriedades antimicrobianas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Potencial terapêutico do α -toc e CNM

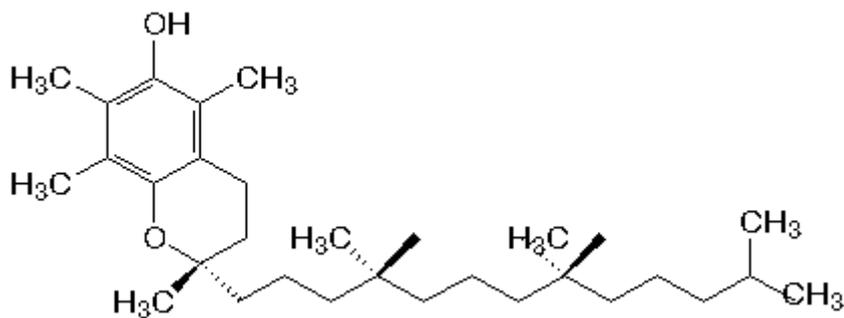
Dada a elevada incidência de condições inflamatórias, fúngicas e bacterianas em cavidade oral, é relevante a prevenção ou tratamento, quando já instaladas, dessas condições. Diante disto, vê-se a necessidade da procura de métodos terapêuticos para patologias dessas naturezas que abrandem características como: alto custo, toxicidade e resistência aos fármacos comumente utilizados. Em se tratando da resistência microbiana, no caso dos antifúngicos, observa-se um pequeno arsenal de fármacos e o aumento da resistência fúngica, que pode ter relação com a capacidade dos fungos de mutação gênica, troca de cepas sensíveis por resistentes, expressão gênica transitória e alteração celular, o que pode dificultar os mecanismos de ação dos fármacos que já são utilizados. Na terapia antibiótica, têm-se um vasto arsenal de fármacos, porém, os agentes microbianos também apresentam mecanismos de resistência semelhantes, sendo assim, a resistência aos antibióticos comumente utilizados também é uma realidade (1,22–24).

Nesse contexto, o α -toc e o CNM seriam boas opções, visto que se tratam de produtos naturais com características antioxidantes e com potencial anti-inflamatório e antimicrobiano, que apresentam de forma reduzida as características indesejadas supracitadas (25–27).

O α -toc se apresenta sob a forma de um óleo viscoso amarelo-pálido, insolúvel em água, muito solúvel em gorduras, óleos e solventes orgânicos (éter, acetona, clorofórmio, metanol, álcool etílico e metílico), pouco sensível ao calor, luz e ácido, e muito sensível à oxidação e bases (28,29).

Em decorrência de suas particularidades físico-químicas, em especial, a presença de um anel de cromanol (**Figura 1**), o α -toc é tido como um potente antioxidante capaz de evitar a propagação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), principalmente os radicais peroxil, prevenindo alterações em proteínas plasmáticas e das membranas celulares (29).

Figura 1. Estrutura química do α -toc.



Fonte: <https://www.infoescola.com/bioquimica/vitamina-e/>.

O α -toc tem sua ação antioxidante fundamentada na estabilidade elevada de seu radical α -tocoferil que é gerado logo após a perda do hidrogênio fenólico. Esse radical, quando recém-gerado, tem a capacidade de ligar-se a um radical livre ou se transformar novamente em α -toc (29).

O processo de neutralização das ROS pelo α -toc se dá pelas desativações de várias vias pró-inflamatórias e pró-apoptóticas. Sua propriedade de bloqueio da fosforilação da enzima I κ B quinase (I κ B), precursora do fator nuclear kappa B (NF κ B), proporciona uma diminuição do processo de apoptose fator de necrose tumoral α (TNF- α) dependente (30,31), logo, essa redução dos níveis TNF- α , diminui a liberação de citocinas e enzimas como as interleucinas (IL-1 β , IL-8) e a Cicloxigenase 2 (COX-2) (32), além de prover a adesão leucocitária pelas células epiteliais(33). Pesquisas também tem elucidado a participação do α -tocoferol no bloqueio da fosforilação da proteína p38, inativando a via apoptótica p38-MAPK-JNK (34).

Em adição a inativação do NF κ B e conseqüente ação sobre as citocinas pró-inflamatórias, o α -toc, tanto em humanos quanto em animais, ampliou a resposta imune, permitindo uma melhor proteção contra várias condições infecciosas. Essas mudanças podem ser elucidadas a partir das seguintes hipóteses: (1) diminuição nos níveis de PGE2 (prostaglandina E2), devido o bloqueio da atividade da COX-2 como conseqüência da produção diminuída de óxido nítrico (NO); (2) ampliação da efetividade de comunicações no sistema imune em células do tipo T nativas e início de sua sinalização de ativação; (3)

através da modulação na proporção e ativação de células T Helper (Th1/Th2) (28).

Além disso, o α -toc apresenta baixa toxicidade, sem atividade mutagênica, carcinogênica ou teratogênica em humanos, com poucos efeitos adversos, até mesmo em doses elevadas (3200mg/dia) (27).

Por outro lado, o CNM também vem se destacando devido suas características farmacológicas, por se tratar de um produto renovável, bem como, por indicar formas de se aperfeiçoar drogas já existentes ou até mesmo seus próprios constituintes de forma sintética, apresentando suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antioxidantes bem estabelecidas na literatura. O mesmo se apresenta em estado líquido/oleoso de coloração amarelada, pouco solúvel em água e muito solúvel em óleos (4,35,36).

No que diz respeito ao potencial anti-inflamatório e antioxidante, pesquisas tem revelado que o CNM atenuou a atividade dos lipopolissacarídeos (LPS), induziu a resposta imune em macrófagos (37), bem como, reduziu o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através do fator eritróide 2 (NF-E2), o fator 2 relacionado ao p45 (NFR2) e heme oxigenase-1 (HO-1) na polpa dental humana (38). Em modelo animal, o CNM reduziu a inflamação intestinal através da supressão de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL-1 β , IL-6) e TNF- α , inibindo a ativação da sinalização via NF κ B e atenuando a apoptose da caspase 3 no enterócito (39), assim como, demonstrou efeitos protetores na resposta inflamatória, diminuindo o estresse oxidativo e a apoptose no fígado de camundongos desafiados com *Salmonella typhimurium*, sendo essas alterações associadas a um efeito regulador do CNM no receptor do tipo Toll 2 e 4 (TLR2 , TLR4) e na proteína de diferenciação mielóide (MyD88) (35).

Em queratinócitos humanos o CNM reduziu a extensão do dano induzido pelo estresse oxidativo além de melhorar a lesão inflamatória através da diminuição notável dos níveis expressos do inibidor (p) fosforilado do NF κ B, p-p65 e p-JNK(40). Em se tratando de cavidade oral, em um ensaio clínico controlado, randomizado e duplo cego, foi avaliado o uso de placas mucoadesivas de CNM na estomatite aftosa recorrente menor e observado que o mesmo foi capaz de reduzir efetivamente e melhorar as lesões aftosas e a intensidade da dor nos pacientes (41).

Esse composto também foi avaliado na mucosite oral, apresentando-se promissor para o tratamento dessa condição devido seu desempenho como antioxidante e sua ação na conhecida via inflamatória (NFkB) observada nesse quadro (42). Em estudo que teve como objetivo investigar o efeito do CNM na mucosite oral e na capacidade antioxidante total salivar em ratos com radiação gama, foi visto que a gravidade foi significativamente maior no grupo não tratado com o CNM e que na avaliação da capacidade antioxidante salivar, a concentração salivar de antioxidantes foi significativamente maior nos grupos tratados com o CNM (43).

O efeito antifúngico do CNM também já vem sendo relatado pela literatura e apresenta valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando entre 18,3 µM a 30.266,6 µM (4,44,45). Também possui ação antibiofilme, inclusive sobre o biofilme multiespécies de *Candida*, conhecido por ser comumente encontrado em infecções de superfícies e/ou oportunistas, incluindo as da cavidade oral (45).

Em se tratando do efeito antibacteriano, o CNM vem demonstrando possuir atividade antimicrobiana substancial, representando um composto de sucesso intrigante do qual muitos derivados foram confeccionados. Esses compostos puros e seus derivados, também demonstraram possuir atividade antibacteriana considerável quando comparado inclusive com antibióticos comumente utilizados (46). O CNM tem propriedades antibacterianas conhecidas e já estabelecidas em uma série de bactérias Gram-positivas e negativas, incluindo *E. coli* (47), *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) (48), *Staphylococcus spp.* (49), *Listeria spp.* e *Salmonella spp.* (48–50), *Lactobacillus sakei* (51), *Campylobacter jejuni* (47), *Vibrio spp.* (52), *Pseudomonas spp.* (50,52), *Porphyromonas gingivalis* (52), *Streptococcus pyogenes* (53) e *Cronobacter sakazakii* (49,52).

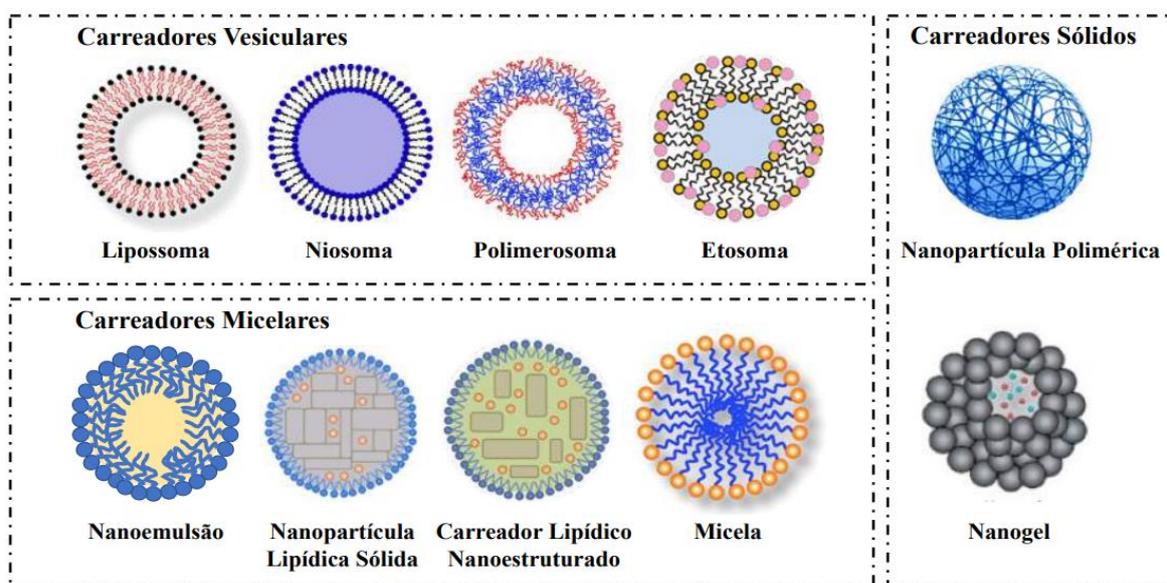
2.2. Nanopartículas na encapsulação de fármacos

As nanopartículas no campo da saúde se constituem em sistemas que proporcionam a liberação de fármacos que originalmente se apresentam com grandes dimensões, fornecendo uma direção mais eficiente dos mesmos para os seus alvos devido a redução de suas dimensões para a escala nanométrica, resultando na ampliação da ação terapêutica, podendo induzir uma redução na

posologia dos princípios ativos e, conseqüentemente, de seus efeitos colaterais e adversos (54).

Os sistemas coloidais (**Figura 2**) podem ser classificados em três grandes classes: os carreadores vesiculares, que normalmente encapsulam ativos em um núcleo aquoso, estando os lipossomas, niossomas e polimerossomas; os carreadores micelares, que normalmente encapsulam ativos em um núcleo hidrofóbico, como os CLN, micelas, nanoemulsões e nanopartículas lipídicas sólidas; e os carreadores em fase sólida, que encapsulam ativos em uma matriz sólida ou que apresentam fármacos conjugados a ela, incluem-se as nanopartículas metálicas, as nanopartículas poliméricas e os nanogéis (55).

Figura 2. Estrutura dos nanocarreadores organizados em carreadores vesiculares, carreadores sólidos, carreadores micelares.



Fonte: Adaptado de Murphy; Schaffter; Friedman, 2019.

Nanoencapsulação envolve incorporação, absorção ou dispersão de combinações de bioativos sólidos, líquidos ou gasosos dentro de vesículas pequenas, com diâmetro na escala nanométrica. Os bioativos que podem ser incorporados têm sua proteção contra a degradação e melhoria da estabilidade e solubilidade, como por exemplo, solubilização de agentes hidrofílicos em matrizes hidrofóbicas e vice-versa.

Em se tratando das nanocápsulas, essas se constituem de um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, com o ativo de interesse podendo

estar dissolvido em seu núcleo ou adsorvido à sua parede polimérica (56). A apreensão dos núcleos é ditada pela sua funcionalidade química, solubilidade, polaridade e volatilidade. Esses sistemas apresentam vantagens como: estabilidade de compostos ativos sensíveis à luz, diminuição da oxidação ou hidrólise, liberação controlada e aumento da penetrância dos ativos. O material de parede se dá por uma barreira externa e geralmente é feito de compostos que formam uma rede com a estrutura (56,57).

Um dos polímeros mais estudados no processo de formação de nanocápsulas é o polietilenoglicol-poli(óxido de propileno)-polietilenoglicol (PEG-PPO-PEG, Pluronic®), como o Poloxamer 407 (P407) (58,59). O P407, quando em soluções aquosas, apresenta propriedades anfipáticas, isso com base na hidrossolubilidade do PEG e na lipossolubilidade do PPO (60). É capaz de apresentar gelificação térmica reversível, que é caracterizada por uma mudança em seu estado sol-gel que acontece a partir de determinada temperatura. Quando se encontra em temperaturas inferiores a capaz de ocasionar essa mudança, a solução continua líquida; quando ultrapassa essa temperatura, se apresenta em gel. A temperatura sol-gel depende da concentração e é diminuída à medida que a concentração do P407 é acrescida(61).

Já os CLN são nanossistemas que foram introduzidos na literatura na década de 90 por Muller e colaboradores e compõem o grupo dos nanocarreadores com menor tempo entre sua invenção e aplicação no mercado (62). Os mesmos são constituídos por uma matriz lipídica sólida à temperatura ambiente e corporal, essa matriz consiste em uma mistura entre lipídios sólidos e líquidos, de preferência em uma proporção de 70:30 até uma razão de 99,9:0,1, logo, há a formação de uma matriz lipídica menos ordenada com mais espaços para os ativos a serem incorporados (63).

O uso de uma combinação de lipídios muito estruturados e diversificados (de tamanho) corrompe a formação de um cristal perfeito, assim como observado nos CLN, essa matriz com muitas “imperfeições” permite uma maior quantidade de espaços para acomodar os ativos em suas formas moleculares ou como aglomerados amorfos (64,65).

Os CLN conseguem imobilizar de forma eficaz o ativo encapsulado, bem como, são capazes de impedir que as partículas coalesçam em virtude da matriz rígida, quando comparados com as emulsões (66). Ademais, as gotas de lipídeo

líquido na matriz sólida ampliam a capacidade de encapsulação do ativo quando comparado a outros nanocarreadores sólidos (67).

Os CLN e as nanocápsulas apresentam algumas vantagens para aplicação cutânea e mucosa como, por exemplo, permitem uma composição de lipídeos biodegradáveis bem tolerados, mantêm a estabilidade de compostos ativos sensíveis à luz, oxidação ou hidrólise, apresenta perfil de liberação controlada, aumento da penetrância de compostos ativos, bem como, direcionamento de fármacos na pele e mucosa ou mesmo em subestruturas, como por exemplo, células microbianas (68,69).

Esses sistemas, por se apresentarem na escala manométrica, apresentam um bom poder de penetração na mucosa, porém, não são caracteristicamente mucoadesivos, sendo assim, a quitosana pode ser acrescentada a essas formulações a fim de lhes prover a mucoadesão. A quitosana, um polímero obtido a partir da desacetilação da quitina, de baixo custo, biodegradável, natural, de grande importância econômica e principalmente ambiental, possui em sua composição a existência de grupos NH₂ e OH (estrutura catiônica), que podem promover características mucoadesivas, uma vez que estas são baseadas principalmente na interação eletrostática entre partículas de muco carregadas negativamente e moléculas de quitosana carregadas positivamente. Essas propriedades favorecem um longo tempo de contato do fármaco com a mucosa, controlando sua liberação e prolongando sua ação no tecido alvo. A quitosana ainda apresenta propriedades de biocompatibilidade e bioatividade, bem como, comportamento antimicrobiano e pró-cicatrizante (20,21).

2.2.1 Nanopartículas na encapsulação de α -toc e CNM

A literatura já relata o eficiente encapsulamento desses fármacos, isolados ou em conjunto com outros compostos. Saez, Souza, Mansur (2018) (9), realizaram uma revisão de literatura abrangente a cerca do encapsulamento do α -toc em nanopartículas lipídicas. A partir dessa análise, algumas vantagens foram demonstradas, como, o fato deste princípio ativo poder ser encapsulado com alta eficiência (próximo a 100%) devido a sua excelente compatibilidade com diversos sistemas lipídicos, pela possibilidade de ajustar as propriedades das nanopartículas variando a composição dos sistemas e usando diferentes

condições experimentais, pelo α -toc conservar sua atividade antioxidante após o encapsulamento, além do fato da inclusão do α -toc nesses sistemas proteger essa substância contra a fotodegradação e permitir sua liberação controlada.

Caddeo et al. (2018) (10), encapsularam α -toc em transferossomas de polissorbatos (Tween 20, 40, 60 e 80) para aplicação tópica na pele. Os resultados demonstraram ausência de citotoxicidade em queratinócitos epidérmicos (HaCat) independente da concentração utilizada (0,1 – 20 μ g/ml). Os autores concluíram que a confecção de formulações vesiculares de α -toc pode ser usado com segurança no controle do estresse oxidativo, acelerando a cicatrização.

Luo et al. (2011) (70), confeccionaram nanopartículas de quitosana/zeína para a liberação controlada de α -toc no trato gastrointestinal. Os autores relataram que o sistema apresentou mucoadesividade e capacidade de abertura transitória das junções intercelulares epiteliais em decorrência do potencial elétrico de superfície positivo das partículas. A cinética de liberação em meio de PBS demonstrou um processo em duas fases: uma rápida liberação nos primeiros 90 minutos seguida de uma liberação lenta e continuada. O estudo demonstrou que o aumento da concentração de α -toc potencializou as duas fases.

Liu et al. (2020) (73), desenvolveram nanopartículas carregadas de CNM. Os resultados mostraram encapsulamento eficiente desse composto, as nanopartículas também permaneceram estáveis contra um efeito combinado de diferentes pHs, forças iônicas e temperaturas de aquecimento, além disso, possuíam efeito antimicrobiano contra a *E. coli* com halo de inibição com diâmetro médio de 15,46 mm, e após armazenamento por 30 dias, apresentaram capacidade antibacteriana ligeiramente maior com zona de inibição de 17,11 mm.

Gadkari et al. (2019) (72), realizaram um estudo que objetivou sintetizar nanopartículas antimicrobianas de quitosana por reticulação química com CNM. Os autores relataram sucesso nas nanopartículas sintetizadas, com as mesmas exibindo atividade antibacteriana sinérgica contra *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) e *Escherichia coli* (Gram-negativas). Os valores de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima foram de 5 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente, para ambas as bactérias.

Já Gomez, Moreira, Perez (2011) (71), sintetizaram nanopartículas esféricas de poli (DL-láctido-co-glicólido) (PLGA) com eugenol e trans-CNM para aplicação antimicrobiana. O sistema apresentou eficiência no aprisionamento do eugenol e trans - CNM (98% e 92%), respectivamente. Os experimentos de liberação controlada demonstraram um pico explosivo inicial seguido por uma taxa mais lenta de liberação do antimicrobiano aprisionado dentro da matriz de PLGA. Segundo os autores, as nanopartículas com os ativos mostraram-se eficientes na inibição do crescimento de *Salmonella spp.* (bactéria Gram-negativa) e *Listeria spp.* (bactéria gram-positiva).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar *in silico* o potencial anti-inflamatório do CNM e α -toc e antimicrobiano do CNM, bem como, desenvolver e caracterizar nanocápsulas e CLN com esses ativos e avaliar seus potenciais antimicrobianos *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar *in silico* por meio do *docking* molecular a atividade anti-inflamatória do CNM e α -toc e antimicrobiana do CNM;
- Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de CNM e α -toc;
- Desenvolver e caracterizar CLN de CNM e α -toc;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das nanocápsulas e CLN obtidos frente cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

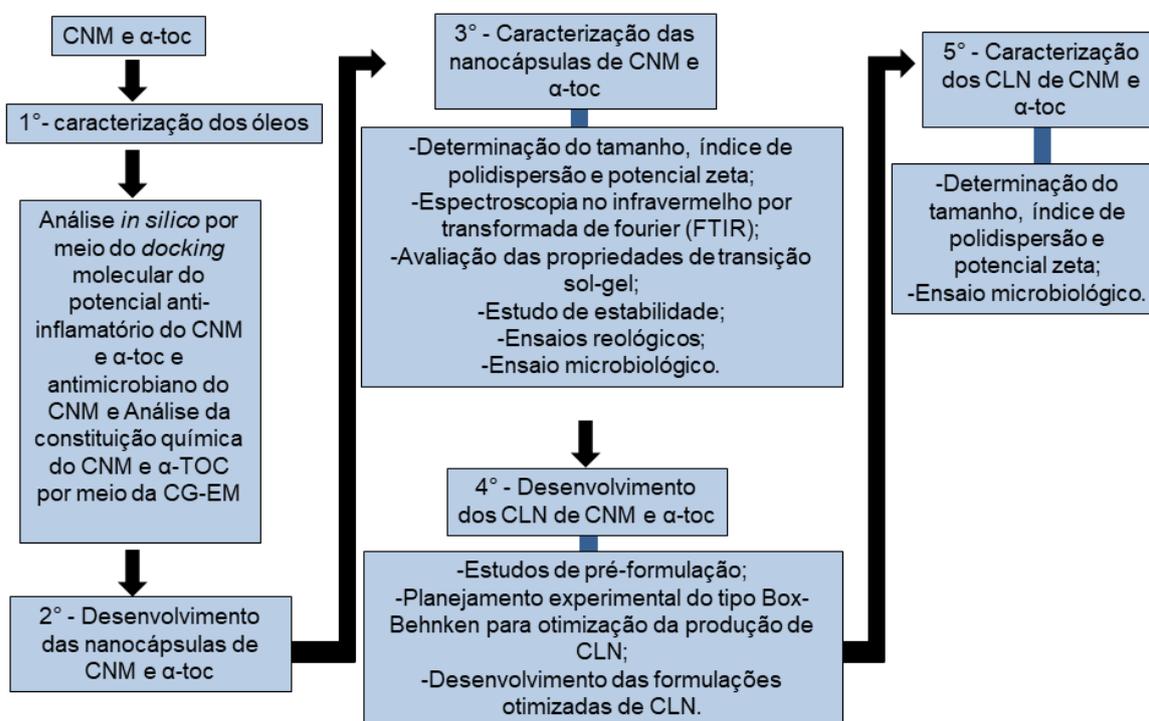
4. METODOLOGIA

4.1. Local da pesquisa

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biomateriais – LaBio, Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular - LAFECC do Centro de Ciências da Saúde - CCS da Universidade Federal da Paraíba - UFPB; laboratório de biotecnologia farmacêutica - BiotecFarm do Instituto de Pesquisa com Fármacos e medicamentos - IPeFarm do Centro de Biotecnologia - CBiotec da UFPB e no Laboratório de Espectroscopia Molecular – LEM do Centro de Ciências exatas e da Natureza – CCEN da UFPB.

O fluxograma abaixo demonstra de forma sucinta como foi realizada a metodologia da pesquisa.

Figura 3. Fluxograma das etapas das metodologias empregadas na pesquisa.



Fonte: Autor, 2023.

CNM: cinamaldeído; **α-toc:** α-tocoferol; **CG-EM:** Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas; **FTIR:** Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.

4.2. Caracterização *in silico* através do *docking* molecular do CNM e α -toc

As estruturas do CNM (CID – 637511) e do α -toc (CID - 14985) e dos fármacos padrões (Ibuprofeno – CID: 3672, dexametasona – CID: 5743, clorexidina – CID: 9552081 e miconazol – CID: 4189) foram baixadas do banco de dados de estruturas químicas PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

As enzimas 1CX2 (ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo), 1KVO (fosfolipase a2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente), 1SVC (homodímero nfkb p50 ligado ao dna), 3FXI (complexo humano TLR4/MD-2), 4KIK (I κ B quinase beta humana), 4MAI (esqualeno epoxidase), 4QUV (δ -14-esterol redutase), 5TZ1 (14- α -desmetilase), 2GE5 (mutante de deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca²⁺), 3ZFK (Domínio de Nuclease N-terminal truncado de Colicina E7) e 2H29 (mononucleotídeo de ácido nicotínico Adenililtransferase) foram baixadas do *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) por meio dos seus respectivos IDs, em formato PDB. Seus ligantes e os receptores foram submetidos ao *docking* molecular utilizando o Molegro Virtual Docker, versão 6.0.1 (MVD)(74). As proteínas e as estruturas do ligante foram preparadas usando as configurações padrões contidas no pacote do software (função Score: MolDock Score; avaliação Ligand: Internal ES, Internal Hbond, Sp2-Sp2 Torsions, todas verificadas; Number of runs: 10 execuções; algoritmo: MolDock SE; interações máximas: 1500; tamanho máximo da população: 50; etapas máximas: 300; fator de distância do vizinho: 1,00; número máximo de poses retornadas: 5).

O procedimento de acoplamento foi realizado usando uma GRID de 15Å^o em raio e resolução de 0,30. As simulações de acoplamento foram realizadas no software AutoDock 4.2. As moléculas foram salvas no formato pdb usando o software Molegro. As estruturas do ligante e receptor foram preparadas no software PyRx 0.9. Uma caixa de grade tridimensional com 50, 44 e 50 pontos para x, y e z com um espaçamento de 0,375Å foi criada. Todos os outros parâmetros seguiram as configurações padrão do AutoDock 4.2.

Os resultados para cada cálculo foram analisados com o intuito de se obter os menores valores de energia de afinidade (Kcal/mol) para cada conformação do

ligante em seu respectivo complexo, correspondendo aos complexos mais estáveis. As imprecisões da estrutura foram ignoradas nos cálculos.

4.3. Caracterização dos óleos por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

A composição química dos óleos de CNM e α -toc foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas realizada em um instrumento da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP 2010 Ultra com coluna da marca RTX-5MS capilar (5% Difenil / 95% dimetilpolisiloxano) com tamanho de 30m (comprimento) / 0.25 mm de diâmetro Interno / 0.25 μ m. A temperatura inicial da coluna variou de 60°C a 90°C a 5°C/mim., permanecendo a 90°C por 15 minutos e de 90°C a 280°C a 20°C/min. A temperatura do injetor e do detector foram 260 e 280°C, respectivamente. O tempo total de corrida foi de 30 minutos e o volume de injeção foi de 1,0 μ L. A identificação dos constituintes foi realizada por meio de busca de dados encontrados na literatura e biblioteca do equipamento (Bancos de Dados: NIST2008 | NIST2008+Shimadzu | FFNSC 1.3).

4.4. Nanocápsulas

4.4.1. Materiais utilizados

Poloxamer 407(Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA); Quitosana de baixo peso molecular(Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA); Água deionizada; Ácido acético glacial; acetato de α -tocoferol (produto manipulado, farmácia Roval®, 99,54% α -Tocoferol, peso molecular: 472,75); Cinamaldeído (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA); Tripolifosfato de sódio (TPP) (ACS® científica).

4.4.2. Desenvolvimento

O desenvolvimento dos géis ocorreu em duas etapas e está ilustrado na **Figura 4**. A primeira etapa se deu pelo preparo das soluções a 20% de Poloxamer 407 (p407) em água deionizada gelada sob agitação magnética

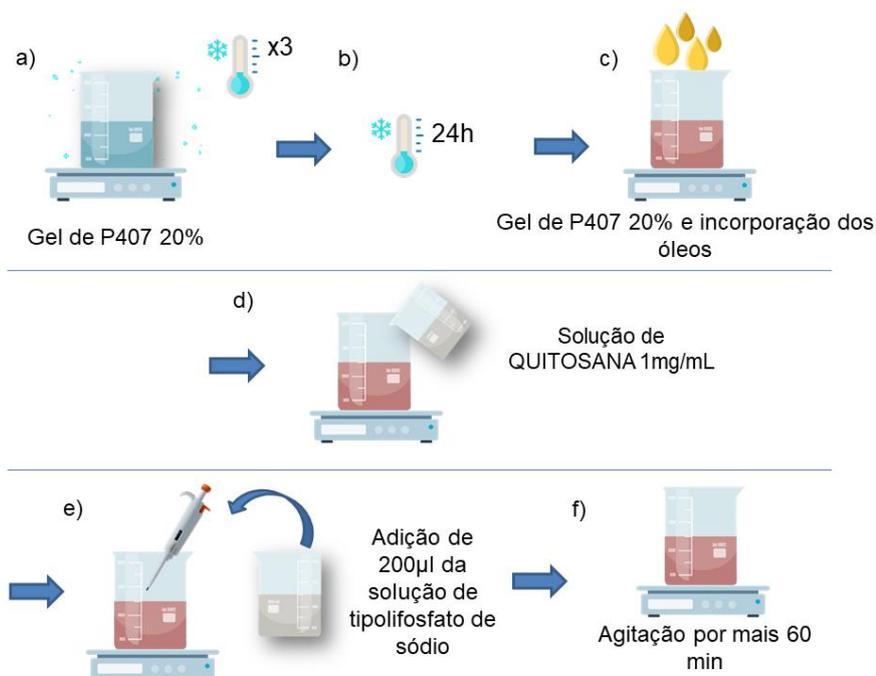
(300rpm) por 10min. As soluções foram submetidas a 3 ciclos de refrigeração/agitação. Após completa solubilização visual do pó do P407, os géis foram mantidos em refrigeração a 6°C sem agitação durante 24 horas.

Na segunda etapa houve a incorporação do α -toc e/ou do CNM nas dispersões. A concentração do α -toc foi fixa (5 mg/ml), levando em consideração o estudo de Coelho-Júnior et al. (2021)(12), já as concentrações do CNM foram de 0,2 mg/ml e 0,4 mg/ml, levando em consideração o estudo de Alves et al.(2022) (4), visto que nessas concentrações o CNM demonstrou efeito antifúngico e segurança em ensaios *in vivo* e clínico fase 1 e, segundo outros estudos, em concentrações menores já foi observado efeito antibacteriano e anti-inflamatório (36,46). O α -toc e o CNM foram adicionadas nas concentrações supracitadas nas dispersões sob agitação magnética (600rpm) por 10min. A solução foi então submetida a 3 ciclos de refrigeração/agitação magnética.

Foi então realizada a etapa de reticulação e formação das nanocápsulas. Inicialmente foi preparada uma solução de 1mg/mL de quitosana em água deionizada que foi homogeneizada com acético glacial a 1% (v/v), sob agitação magnética (300 rpm) durante 24 h. Após a fase de solubilização, 2,4 mL dessa solução foi vertida nas dispersões de cada grupo, seguido de agitação magnética (300rpm) por 20min em temperatura ambiente.

Por fim, 0,2 ml de solução tripolifosfato de sódio (1,5% m/v) foram gotejados em todos os grupos. Os 10ml de cada dispersão resultante foram mantidos sob agitação constante de 300rpm por 60min. A **Tabela 1** descreve os polímeros, óleos e reticuladores usados, bem como, as concentrações utilizadas em cada grupo.

Figura 4. Ilustração esquemática do desenvolvimento das dispersões de nanocápsulas.



Fonte: Autor, 2023

a) Preparo das soluções a 20% de p407 em água deionizada gelada sob agitação magnética por 10min. As soluções foram submetidas a 3 ciclos de refrigeração/agitação; **b)** Após isso, os géis foram mantidos em refrigeração a 6°C por 24 hrs; **c)** Incorporação do α -toc e/ou do CNM nas dispersões sob agitação magnética por 10min sendo submetida a 3 ciclos de refrigeração/agitação magnética; **d)** 2,4 mL da solução de quitosana foi vertida nas dispersões de cada grupo, seguido de agitação magnética por 20min; **e)** 200 μ L de solução tripolifosfato de sódio foram gotejados em todos os grupos; **f)** Agitação constante por mais 60min.

Tabela 1. Concentrações dos materiais utilizados na confecção dos grupos das dispersões de nanocápsulas.

	P407 mg/mL	α-TOC mg/mL	CNM mg/mL	Quitosana mg/mL	TPP mg/mL
GC	20	-	-	0,24	0,3
G α-TOC	20	5	-	0,24	0,3
G α-TOC + CNM 0,2	20	5	0,2	0,24	0,3
G CNM 0,2	20	-	0,2	0,24	0,3
G α-TOC + CNM 0,4	20	5	0,4	0,24	0,3
G CNM 0,4	20	-	0,4	0,24	0,3

Fonte: Autor, 2023.

P407: Poloxamer 407; **α -TOC:** α -tocoferol; **CNM:** Cinamaldeído; **TPP:** Tripolifosfato de sódio. **GC:** Dispersão Controle; **G α -TOC:** Dispersão apenas com α -toc na concentração de 5 mg/ml; **G α -TOC + CNM 0,2:** Dispersão com α -toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de

0,2 mg/ml; **G CNM 0,2**: Dispersão com CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G α -TOC + CNM 0,4**: Dispersão com α -toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,4 mg/ml; **G CNM 0,4**: Dispersão com CNM na concentração de 0,4 mg/ml.

4.4.3. Caracterização das nanocápsulas

4.4.3.1. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho e o índice de polidispersão foram determinados utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), através do Zetasizer® nano ZS90 (Malvern® instrumentos, São Paulo, Brasil), equipado com um raio laser de 633 nm, com espalhamento óptico fixo a 90°, utilizando cubeta descartável de poliestireno de 10 mm. Amostras foram diluídas utilizando água Milli-Q® e 3 medições foram realizadas a 25°C.

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão(75). Para determinação do potencial eletrocinético ou potencial zeta, as amostras foram diluídas em uma solução de cloreto de sódio a 1 mM (76) e inseridas em cubeta descartável de policarbonato DTS 1060C. Foram feitas 3 determinações para cada análise. Os resultados foram expressos por meio da média \pm desvio padrão.

4.4.3.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi utilizada com o objetivo de avaliar possíveis interações entre os compostos das formulações e comprovar a incorporação do CNM e α -toc nos géis. Os espectros foram adquiridos em um Espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer (Estados Unidos, Massachusetts) acoplado com acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) equipado com cristal de Zinco Selênio (ZnSe) em um intervalo de 4000–500 cm^{-1} , 32 scans e com uma resolução de 4 cm^{-1} .

4.4.3.3. Avaliação das propriedades de transição sol-gel

Este ensaio foi realizado objetivando determinar a temperatura e o tempo levado para ocorrer a transição das dispersões de líquido para gel. A temperatura de transição da fase líquida (Sol) para a fase gel (Tsol / gel) é observada em sistemas termossensíveis, quando a dispersão se encontra abaixo desta temperatura, a mesma permanece líquida e quando acima desta temperatura, a solução torna-se semissólida.

A temperatura de transição para cada formulação foi determinada de forma semelhante a descrita por Sharma et al. (2017) (77), utilizando-se o método de inversão de tubos. As amostras com aproximadamente 10 g foram coletadas em tubos de ensaio de diâmetro interno de cerca de 10 mm. As mesmas em uma temperatura inicial de 6 °C, foram submetidas ao banho-maria com temperatura inicial de 20°C, e a cada elevação de aproximadamente 2 °C e banho por 1 min, as amostras foram analisadas visualmente, a temperatura de transição sol-gel foi determinada no momento em que a solução no tubo de vidro parou de fluir quando submetida a inversão. Já para o tempo (Tsol-gel) a temperatura da água do banho foi mantida à 37 °C. A cada 5 segundos o tubo de ensaio foi retirado e inclinado para a observação do estado da amostra. O tempo necessário para gelificação foi determinado pela ausência de fluidez da solução presente no tubo.

4.4.3.4. Estudo de estabilidade

Este estudo foi realizado de forma semelhante ao descrito por Sharma et al. (2017) (77). Inicialmente as amostras foram submetidas ao teste de centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos. Cada dispersão (2mL) à temperatura ambiente, foi disposta em tubos Falcon e submetida à centrifugação. A finalidade do teste é promover um estresse à formulação, simulando um aumento na força de gravidade.

Após a centrifugação, as dispersões foram submetidas a estudos de estabilidade a diferentes condições de armazenamento, geladeira (5 ± 2 °C), temperatura ambiente (T.A) (25 ± 2 °C) e estufa (45 ± 2 °C) por 30 dias em embalagens plásticas seladas. A estabilidade físico-química das dispersões foram observados pelo pH, que foi medido com o auxílio de um pHmetro, cor, separação de fases, que foram avaliadas visualmente e odor, que foi avaliado através do sentido olfatório nos períodos de 7, 15 e 30 dias.

4.4.3.5. Ensaio reológico

Testes reológicos são realizados com o intuito de prever os comportamentos de fluxo e viscoelástico dos materiais quando submetidos a esforços mecânicos. No caso de géis poliméricos destinados à área médica, é imprescindível que apresentem propriedades adequadas à mucosa a que se destinam (78). Partindo desse princípio, foram realizadas varreduras de temperatura de 26 a 40 °C, à frequência constante de 1 Hz, de modo a verificar o estado de gelificação na transição de temperatura ambiente-corporal, e uma varredura de frequência oscilatória de 0,1 a 10 Hz, avaliando a viscosidade aparente das amostras. Os testes foram realizados em um reômetro HAAKE™ MARS™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts), equipado com rotor PP35Til com geometria placa-placa.

4.4.3.6. Ensaio microbiológico

4.4.3.6.1. Microrganismos

Os microrganismos usados para os testes foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 15656), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 60193). As cepas bacterianas foram cultivadas em Brain Heart Infusion (BHI- Sigma, St. Louis, Missouri, USA) e a cepa fúngica foi preparada em caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (KASVI1, Kasv Imp e Dist de Prod / Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil) e foram incubadas em condições aeróbicas em estufa microbiológica a 35°C (fungos) e a 37°C (bactérias) por 24 horas. Os inóculos foram padronizados para 0,5 na Escala de McFarland.

4.4.3.6.2. Concentração inibitória mínima das dispersões de nanocápsulas com CNM e α -toc e do CNM livre contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

A técnica de microdiluição realizada com as cepas fúngicas foi feita segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002) (79) com modificações. A técnica realizada com as cepas bacterianas foi feita segundo a CLSI (2012) (80). A suspensão de cepas de *C. albicans* (ATCC 60193) foi ajustada com turbidez equivalente a 10^6 UFC/mL, 530nm, abs 0,08-0,13. Já as suspensões bacterianas foram ajustadas com turbidez equivalente a 5×10^8 UFC/mL, 625nm, abs 0,08-0,10, e após diluídas para concentração de $2,5 \cdot 10^5$ UFC/mL, sendo utilizadas cepas de *S. aureus* (ATCC 15656) e *E. coli* (ATCC 25922)

Para avaliação da atividade antifúngica por meio da técnica de microdiluição, foram usadas placas esterilizadas com 96 poços de fundo chato, que, inicialmente, receberam 100 μ L de caldo Sabouraud dextrose (CSD). Posteriormente, no primeiro poço de cada coluna foram inseridos 100 μ L das substâncias em estudo e do CNM (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) e α -toc (Produto manipulado, farmácia Roval®, João Pessoa, Brasil) não encapsulados, seguido do processo de microdiluição em série, proporcionando avaliação de concentrações que iniciaram em 100 μ g/ml e finalizaram em 1,5 μ g/ml. Na sequência, foram adicionados 100 μ L do inóculo das cepas fúngicas na concentração 10^3 UFC/mL em cada poço.

Nistatina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) foi utilizada como controle positivo. As formulações sem os ativos também foram testadas para observar se as mesmas apresentavam resposta. Foi realizado controle de viabilidade das cepas e de esterilidade do meio de cultura. As placas foram incubadas por 48h a 35°C. Os testes foram realizados em triplicatas.

Para avaliação da atividade antibacteriana das dispersões de nanocápsulas, o CNM (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) e o α -toc (Produto manipulado, farmácia Roval®, João Pessoa, Brasil) não encapsulados foram diluídos com caldo infusão cérebro coração (BHI) para atingir concentrações iniciais de 100 μ g/mL e finais de 1,5 μ g/ml. As formulações sem os ativos também foram testadas para observar se as mesmas apresentavam resposta. Também foi realizado controle de viabilidade das cepas e de esterilidade do meio de cultura. A clorexidina (Dinâmica®, Brasil) na concentração de 0,12% foi usada como controle positivo. As placas foram incubadas em uma estufa microbiológica por 24 horas a 37°C. Os testes foram realizados em triplicatas.

O resultado da CIM das nanocápsulas contra a cepa fúngica foi lido a partir da observação de agregados celulares no fundo dos poços(45) e da leitura após adição do corante TTC (2,3,5-trifenil tetrazólio cloreto - Sigma-Aldrich) (81). Já contra cepas bacterianas, as CIMs foram determinadas visualmente através da oxidação-redução do indicador resazurina (0,1%) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil).

4.5. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

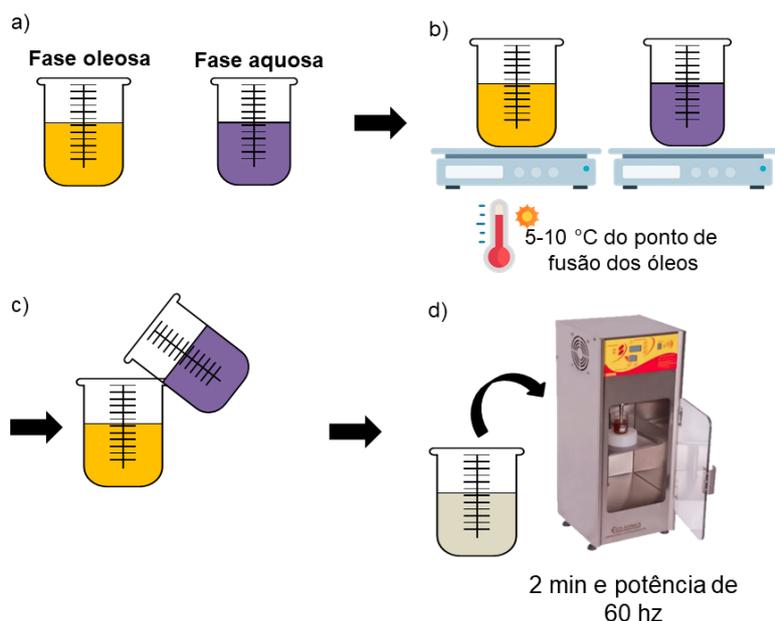
4.5.1. Materiais utilizados

Diestearato de glicerila (Precirol ATO5 I®, marca); Macrogolglycerol ricinoleate 35 (Cremophor® EL, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Lipídios de cadeia média (MCT, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Polioxietileno (80) monoleato de sorbitano (Polisorbato 80, Tween® 80; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Quitosana de médio peso molecular (Polysciences, Inc.®); Água ultrapurificada (Mili-Q® A-10; Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha); Cloreto de sódio P.A (Dinâmica®); Vitamina E (produto manipulado, farmácia Roval®, 99,54% α -Tocoferol, peso molecular: 472,75); Cinamaldeído (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA).

4.5.2. Desenvolvimento

Os CLN foram desenvolvidos utilizando-se a técnica de emulsificação a quente seguido de sonicação ultrassônica, ilustrada na **Figura 5**, isso a partir da confecção de duas fases, uma oleosa (Precirol®, Cremophor® EL e MCT) e uma fase aquosa (água Mili-Q® e Quitosana ou Tween 80). As duas fases foram aquecidas em banho Maria até ultrapassarem 5-10°C do ponto de fusão dos óleos ($\pm 70^\circ\text{C}$), em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, logo após, com a mistura ainda quente, a mesma foi sonicada em sonicador ultrassônico (Ultronique®, Indaiatuba-SP) por 2 min em potência de 60 hz. Após esse processo as amostras foram acondicionadas e resfriadas ($\pm 6^\circ\text{C}$).

Figura 5. Ilustração esquemática do desenvolvimento dos CLN.



Fonte: Autor, 2023.

a) Confeção de duas fases, uma oleosa e uma fase aquosa; **b)** As duas fases foram aquecidas em banho Maria até ultrapassarem 5-10°C do ponto de fusão dos óleos; **c)** Em seguida, a fase aquosa é vertida sobre a fase oleosa; **d)** A mistura ainda quente foi sonicada em sonicador ultrassônico por 2 min em potência de 60 hz.

4.5.2.1 Estudos de pré-formulação do CLN

Os estudos de pré-formulação foram realizados a partir da confecção de 8 grupos com concentrações de lipídios, solventes e tensoativos diferentes, isso, a fim de avaliar as concentrações ideais de lipídeos sólidos e líquidos, constituintes da matriz dos CLN e observar possíveis interações físico-químicas e estruturação dos lipídeos.

Após a produção, as formulações com aspecto macroscópico de leitosas, fluidas e homogêneas, foram analisadas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Zetasizer® nano ZS90, Malvern instrumentos, São Paulo, Brasil) através dos parâmetros: tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. As amostras foram previamente diluídas com água Mili-Q em proporções que variaram de 1:100 a 1:500 e as análises foram realizadas em triplicata, conforme descrito anteriormente no tópico **4.4.3.1**.

A **Tabela 2** descreve os lipídios, solventes e tensoativos, bem como, as concentrações utilizadas em cada grupo.

Tabela 2. Concentrações de lipídios, solventes e tensoativos nas 8 formulações teste de CLN.

Componentes	Formulações							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fase Oleosa (FO, mg)								
Precirol	100	100	50	150	100	100	100	50
Cremophor EL	50	50	50	50	100	50	-	50
MCT	100	300	100	200	300	100	200	100
Fase aquosa (FA, mg)								
Tween	30	30	30	30	50	-	-	-
Quitosana	-	-	-	-	-	10	10	50
Água Milli-q (qsp-2mL)	1720	1520	1770	1570	1450	1740	1540	1790

Fonte: Autor, 2023.

FO: Fase Oleosa; **FA:** Fase Aquosa; **MCT:** Triglicerídeos de Cadeia Média.

4.5.2.2 Planejamento experimental do tipo box-behnken para otimização da produção de CLN

Esse planejamento foi feito com o intuito de otimizar a produção dos CLN que irão encapsular o α -toc e o CNM. Os CLN foram produzidos como descrito no tópico **4.5.1**. As concentrações do Precirol®, MCT e quitosana foram utilizadas como variáveis independentes. Essas concentrações foram baseadas no estudo preliminar das formulações descrito anteriormente. O tamanho das partículas, índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (PZ) foram avaliados como variáveis dependentes (**Tabela 3**). O objetivo dessa otimização foi confeccionar CLN com os menores diâmetros na escala manométrica, baixo PDI e elevado PZ catiônico. Assim, 15 formulações aleatorizadas foram produzidas (**Tabela 4**). As influências das variáveis analisadas foram interpretadas gráfica e estatisticamente utilizando-se o software Statistica 12.0® (StatSoft).

Tabela 3 . Codificação das variáveis e dos níveis no estudo da metodologia de superfície de resposta do planejamento experimental Box-Behnken.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1 (mg/ml)	0 (mg/ml)	1(mg/ml)
Precirol® ATO5	50	100	150
MCT	50	100	150
Quitosana	25	50	75
Variáveis dependentes	Limites		
D	Mínimo		
PDI	Mínimo		
PZ	Máximo		

Fonte: Autor, 2023.

-1: nível mínimo ou concentração mínima da variável independente na formulação; **0:** nível central ou concentração intermediária da variável independente na formulação; **1:** nível máximo ou concentração máxima da variável independente na formulação; **MCT:** Triglicerídeo de Cadeia Média; **D:** Diâmetro médio das partículas; **PDI:** Índice de Polidispersão; **PZ:** Potencial Zeta.

Tabela 4. Formulações aleatorizadas utilizadas para produção de CLN através do planejamento experimental Box-Behnken.

Formulações	Variáveis independentes		
	Precirol®	MCT	Quitosana
FO 1	-1	-1	0
FO 2	0	0	0
FO 3	-1	1	0
FO 4	0	1	1
FO 5	0	-1	1
FO 6	0	1	-1
FO 7	0	0	0
FO 8	-1	0	-1
FO 9	1	0	-1
FO 10	-1	0	1
FO 11	1	1	0
FO 12	0	-1	-1
FO 13	1	-1	0
FO 14	0	0	0
FO 15	1	0	1

Fonte: Autor, 2023.

(-1), (0) e (1) são os níveis mínimo, central e máximo, respectivamente para as variáveis independentes.

4.5.2.3 Desenvolvimento das formulações otimizadas de CLN com α -toc e CNM

A partir do delineamento Box-Benhken, formulações contendo 25mg/ml de quitosana; 100mg/ml de MCT e 50mg/ml de Precirol® ATO5 e 25mg/ml de cremophor foram produzidas removendo o MCT e adicionando a mesma quantidade deste de CNM e/ou α -toc em diferentes proporções (**Tabela 5**). As formulações foram desenvolvidas pela a mesma técnica de emulsificação a quente seguida de sonicação ultrassônica descrita no tópico **4.5.2** .

Tabela 5. Concentrações dos componentes para as formulações otimizadas de CLN.

Formulações otimizadas	Quitosana (mg/mL)	Precirol® ATO 5 (mg/mL)	Cremophor (mg/mL)	MCT (mg/mL)	CNM (mg/mL)	α -TOC (mg/mL)
FO	25	50	25	100	-	-
FO C 100	25	50	25	-	100	-
FO C 75	25	50	25	-	75	25
FO 50/50	25	50	25	-	50	50
FO α TOC 100	25	50	25	-	-	100
FO α TOC 75	25	50	25	-	25	75
FO SQ	-	50	25	100	-	-

Fonte: Autor, 2023.

MCT: Triglicerídios de Cadeia Média; **CNM;** Cinamaldeído; **α -TOC:** α -Tocoferol; **FO:** Formulação controle sem o CNM e α -TOC; **FO C 100:** Formulação apenas com CNM na concentração de 100 mg/ml; **FO C 75:** Formulação com 75 mg/ml do CNM e 25 mg/ml do α -TOC; **FO 50/50:** Formulação com 50 mg/ml do CNM e 50 mg/ml do α -TOC; **FO α TOC 100:** Formulação apenas com α -TOC na concentração de 100 mg/ml; **FO α TOC 75:** Formulação com 75 mg/ml do α -TOC e 25 mg/ml do CNM; **FO SQ:** Formulação controle sem o CNM, α -TOC e quitosana.

4.5.3. Caracterização dos CLN

4.5.3.1. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial foram determinados através da mesma técnica descrita no tópico **4.4.3.1**.

4.4.5.3.2. Ensaio microbiológicos

4.4.5.3.2.1 Microrganismos

Os microrganismos usados para os testes foram preparados conforme o descrito no tópico **4.4.3.6.1**.

4.4.5.3.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos CLN com CNM e α -toc e do CNM livre contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

A técnica de microdiluição realizada tanto para avaliação da atividade antifúngica quanto antibacteriana foi feita conforme já descrito no tópico **4.4.3.6.2**, com a única diferença de que as concentrações dos ativos nos CLN que passaram pelo processo de microdiluição em série, iniciaram em valores entre 3,12-12,5 mg/ml e finalizaram entre 1,5 – 6 μ g/ml.

4.4.5.3.2.3. Avaliação do efeito de associação do CNM, α -toc e quitosana

Para as formulações combinadas, ou seja, com a presença dos três compostos, foi avaliado o efeito de associação dos mesmos, determinado a partir do método da derivação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)(82,83).

O ICIF foi calculado através da soma do CIFA + CIFB (CIFA = Concentração Inibitória Fracionada de um dos compostos; CIFB = Concentração Inibitória Fracionada de um dos compostos). O CIFA foi calculado através da relação CIMA combinado/CIMA isolado, enquanto o CIFB foi calculado através da relação CIMB combinado/CIMB isolado. Este índice foi interpretado da seguinte

forma: sinergismo ($ICIF \leq 0,5$), antagonismo ($ICIF > 4,0$) e indiferença ($0,5 \leq ICIF \leq 4$) (82,83).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização *in silico* através do *docking* molecular do CNM e α -toc

Analisou-se comparativamente, por meio da ancoragem molecular, os valores das energias de ligação do CNM e do α -toc, assim como dos fármacos padrões na odontologia para o tratamento de condições inflamatórias e infecciosas, sendo todas essas substâncias acopladas separadamente com os seus principais alvos moleculares.

Na **Tabela 6** observam-se os resultados das substâncias acopladas com três alvos de células fúngicas, cinco alvos para vias inflamatórias e três alvos para células bacterianas. O estudo de *docking* molecular do α -toc para as vias inflamatórias indicou afinidade para os alvos 1CX2 (ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo), 1KVO (fosfolipase a2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente), 1SVC (homodímero nfkb p50 ligado ao dna), 3FXI (complexo humano TLR4/MD-2) e 4KIK (I κ B quinase beta humana), com valores de energia: -86.5058; -55.7682; -105.297; -126.142; -88.3985 Kcal/mol, respectivamente. O CNM também demonstrou afinidade para esses alvos com valores de energia: -67.2403; -43.7627; -64.7656; -67.5251; -62.664 Kcal/mol, respectivamente. A dexametasona e o ibuprofeno apresentaram valores negativos de energia de ligação demonstrando afinidade e estabilidade com todos os alvos que foram avaliados.

Como também visto na **Tabela 6**, o estudo de *docking* molecular do CNM para células fúngicas indicou afinidade para os alvos: 4MAI (esqualeno epoxidase), 4QUV (δ -14-esterol redutase) e 5TZ1 (14- α -desmetilase), com valores de energia: -61.8555; -57.6392; -68.2284 Kcal/mol, respectivamente. O miconazol apresentou valores negativos de energia de ligação demonstrando afinidade com todos os alvos que foram avaliados. Para células bacterianas, o CNM indicou afinidade para os alvos: 2GE5 (mutante de deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca²⁺), 3ZFK (Domínio de Nuclease N-terminal truncado de Colicina E7) e 2H29 (mononucleotídeo de ácido nicotínico Adenililtransferase), com valores de energia: -73.0828; -57.2467; -71.5017 Kcal/mol, respectivamente. A clorexidina também apresentou valores

negativos de energia de ligação demonstrando afinidade com todos os alvos que foram avaliados.

Observou-se que para os compostos testados, houve uma maior predição de afinidade com os alvos: para vias inflamatórias, o 3FXI (complexo humano TLR4/MD-2), para células fúngicas o 5TZ1 (timidilato sintase) e para células bacterianas o 2GE5 (mutante de deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca²⁺).

Na interação com os alvos ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo, fosfolipase a2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente, homodímero nfkb p50 ligado ao DNA, complexo humano TLR4/MD-2 e Ikb quinase beta humana detectou-se ligações estéricas, formadas entre átomos apolares, (tracejado vermelho) com resíduos de aminoácidos em todos os ligantes avaliados (**Figura 6**). Assim como também, foram observadas ligações de hidrogênio, formadas entre átomos polares (tracejado azul) com resíduos de aminoácidos para o α -toc nos alvos ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo, homodímero nfkb p50 ligado ao DNA e complexo humano TLR4/MD-2, para o CNM nos alvos homodímero nfkb p50 ligado ao DNA, complexo humano TLR4/MD-2 e Ikb quinase beta humana (**Figura 6**), para o ibuprofeno nos alvos ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo, homodímero nfkb p50 ligado ao DNA, complexo humano TLR4/MD-2 e Ikb quinase beta humana; para a dexametasona, também foram observadas ligações desse tipo nos alvos homodímero nfkb p50 ligado ao DNA, complexo humano TLR4/MD-2 e Ikb quinase beta humana.

No alvo ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo, as ligações estéricas (tracejado vermelho) apresentaram resíduos de aminoácidos em comum para todos os fármacos analisados (CNM [**Figura 6a**], α -toc [**Figura 6b**] e Ibuprofeno). As ligações de hidrogênio (tracejado azul), não apresentaram resíduos de aminoácidos em comum entre os ligantes.

Em relação ao alvo fosfolipase a2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente, as ligações estéricas (tracejado vermelho) apresentaram resíduos de aminoácidos em comum para o α -toc (**Figura 6d**) e a dexametasona. Não foram observadas ligações de hidrogênio (tracejado azul) entre os fármacos e os alvos.

Para o alvo homodímero nfkb p50 ligado ao DNA, ligações estéricas (tracejado vermelho) apresentaram resíduos de aminoácidos em comum para os todos os fármacos (CNM [Figura 6e], α -toc [Figura 6f] dexametasona e ibuprofeno). As ligações de hidrogênio (tracejado azul) apresentaram resíduos de aminoácidos em comum entre o CNM (Figura 6e) e a dexametasona e entre o α -toc (Figura 6f), a dexametasona e o ibuprofeno.

O complexo humano TLR4/MD-2, demonstrou ligações estéricas (tracejado vermelho) com resíduos de aminoácidos em comum para o CNM (Figura 6g) e a dexametasona e para o α -toc (Figura 6h) com a dexametasona e o ibuprofeno. Nas ligações de hidrogênio (tracejado azul), resíduos de aminoácidos em comum foram observados apenas entre a dexametasona e o ibuprofeno.

No I κ B quinase beta humana, as ligações estéricas (tracejado vermelho) apresentaram resíduos de aminoácidos em comum para o α -toc (Figura 6j), a dexametasona e o ibuprofeno. Nas ligações de hidrogênio (tracejado azul), resíduos de aminoácidos em comum foram observados apenas entre o CNM (Figura 6i) e o ibuprofeno.

Com os alvos esqualeno epoxidase e δ -14-esterol redutase foram observadas ligações estéricas (tracejado vermelho) com resíduos de aminoácidos para os ligantes avaliados (Figura 7a e b). Também foram observadas ligações de hidrogênio (tracejado azul) com resíduos de aminoácidos para o CNM no alvo esqualeno epoxidase (Figura 7a) e para o miconazol no alvo δ -14-esterol redutase.

Ligações estéricas (tracejado vermelho) e ligações de hidrogênio (tracejado azul) com resíduos de aminoácidos foram observadas no CNM e na clorexidina para os alvos mutante de deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca²⁺ (Figura 7d), domínio de Nuclease N-terminal truncado de Colicina E7 (Figura 7e) e mononucleotídeo de ácido nicotínico adenililtransferase (Figura 7f).

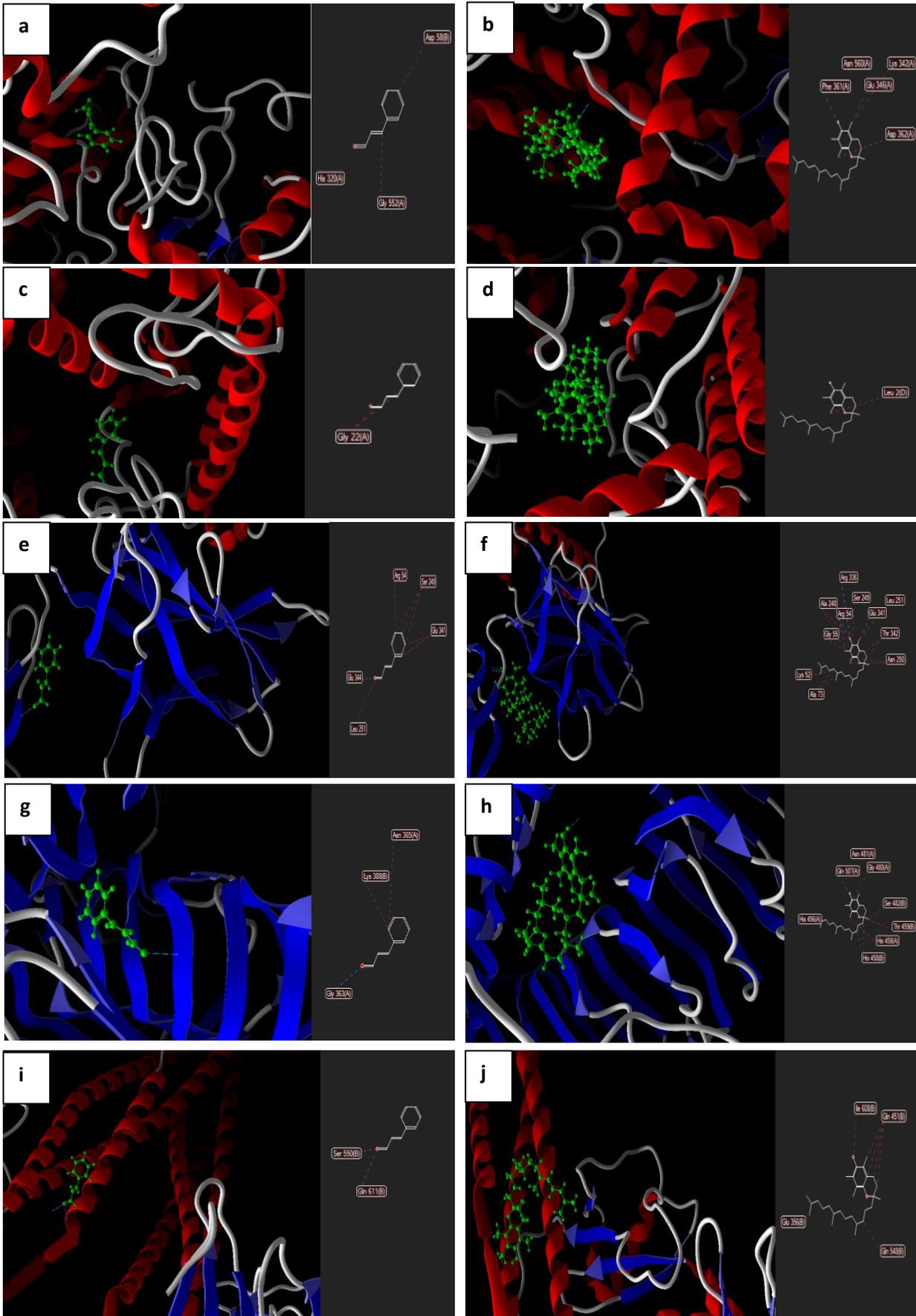
No alvo mutante de deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca²⁺, foram observadas ligações estéricas (tracejado vermelho) com resíduos de aminoácidos em comum para o CNM (Figura 7d) e clorexidina. Não foram observadas ligações de hidrogênio (tracejado azul) em comum entre os fármacos.

O domínio de Nuclease N-terminal truncado de Colicina E7, não apresentou ligações estéricas (tracejado vermelho) e ligações de hidrogênio (tracejado azul) com resíduos de aminoácidos em comum para o CNM (**Figura 7e**) e a clorexidina.

Já no mononucleotídeo de ácido nicotínico Adenililtransferase, foram observadas ligações estéricas (tracejado vermelho) e ligações de hidrogênio (tracejado azul) com resíduos de aminoácidos em comum para o CNM (**Figura 7f**) e a clorexidina.

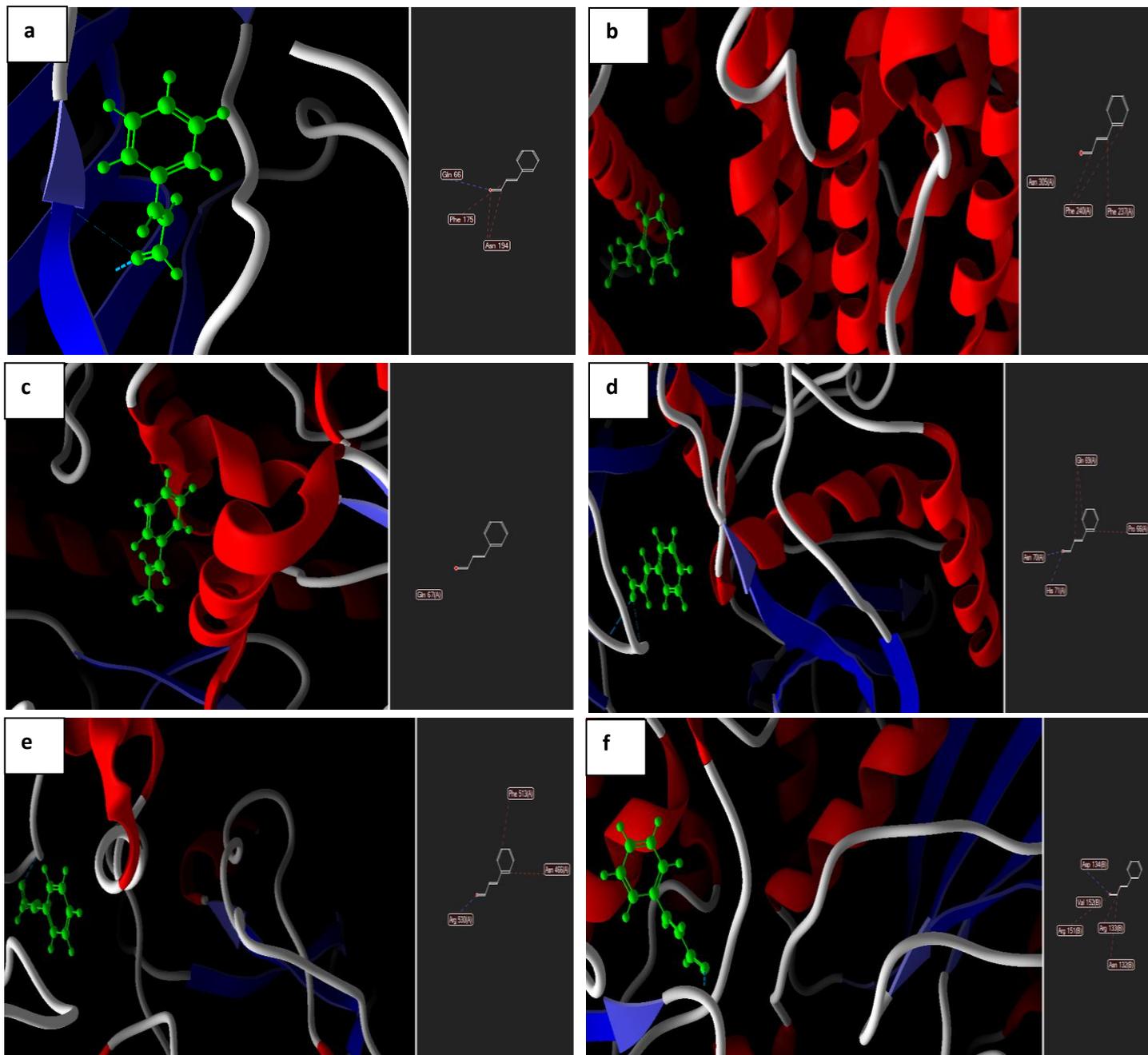
Os resultados da análise de *in silico* indicaram uma predição de afinidade do CNM e α -toc para todos os alvos avaliados, indicando a probabilidade de êxito nas atividades anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana.

Figura 6. Mapa de interações entre os compostos CNM e α -toc com os alvos em estudo. **a.** interação CNM/ ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo; **b.** Interação α -toc/ ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo; **c.** Interação CNM/ fosfolipase a2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente; **d.** Interação α -toc/ fosfolipase a2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente; **e.** Interação CNM/ homodímero nfkb p50 ligado ao DNA; **f.** Interação α -toc/homodímero nfkb p50 ligado ao DNA; **g.** Interação CNM/complexo humano TLR4/MD-2; **h.** Interação α -toc/ complexo humano TLR4/MD-2; **i.** Interação CNM/ I κ B quinase beta humana; **j.** Interação α -toc/ I κ B quinase beta humana.



Fonte: Autor, 2023

Figura 7. Mapa de interações entre o composto CNM com os alvos em estudo. **a.** Interação CNM/esqualeno epoxidase (4MAI); **b.** Interação CNM/ δ -14-esterol redutase (4QUV); **c.** Interação CNM/14- α -desmetilase (5TZ1); **d.** Interação CNM/ deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca²⁺ (2GE5); **e.** Interação CNM/ domínio de Nuclease N-terminal truncado de Colicina E7(3ZFK); **f.** Interação CNM/mononucleotídeo de ácido nicotínico Adenililtransferase (2H29).



Fonte: Autor, 2023

Tabela 6. Valores energia de ligação para os compostos estudados e os alvos: 1CX2 (cicloxiogenase 2), 1KVO (fosfolipase A2), 1SVC (homodímero nfkb p50 ligado ao dna), 3FXI (complexo humano TLR4/MD-2), 4KIK (Ikb quinase beta humana), 4MAI (esqualeno epoxidase), 4QUV (δ -14-esterol redutase), 5TZ1 (14- α -desmetilase), 2GE5 (mutante de deleção C-terminal de endonuclease de restrição de EcoRV/GATATC/Ca2+), 3ZFK (Domínio de Nuclease N-terminal truncado de Colicina E7) e 2H29 (mononucleotídeo de ácido nicotínico Adenililtransferase).

Substâncias	Alvos para vias inflamatórias				Alvos fúngicos			Alvos bacterianos			
	1CX2	1KVO	1SVC	3FXI	4KIK	4MAI	4QUV	5TZ1	2GE5	3ZFK	2H29
Energia de ligação (kcal/mol)											
CNM	-67.2403	-43.7627	-64.7656	-67.5251	-62.664	-61.8555	-57.6392	-68.2284	-73.0828	-57.2467	-71.5017
α-toc	-86.5058	-55.7682	-105.297	-126.142	-88.3985	-	-	-	-	-	-
Ibuprofeno	-75.9212	-	-76.7656	-79.093	-67.574	-	-	-	-	-	-
Dexametasona	-	-31.8993	-80.2091	-87.6381	-64.4649	-	-	-	-	-	-
Miconazol	-	-	-	-	-	-93.1578	-106.07	-116.708	-	-	-
Clorexidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-141.841	-134.694	-104.318

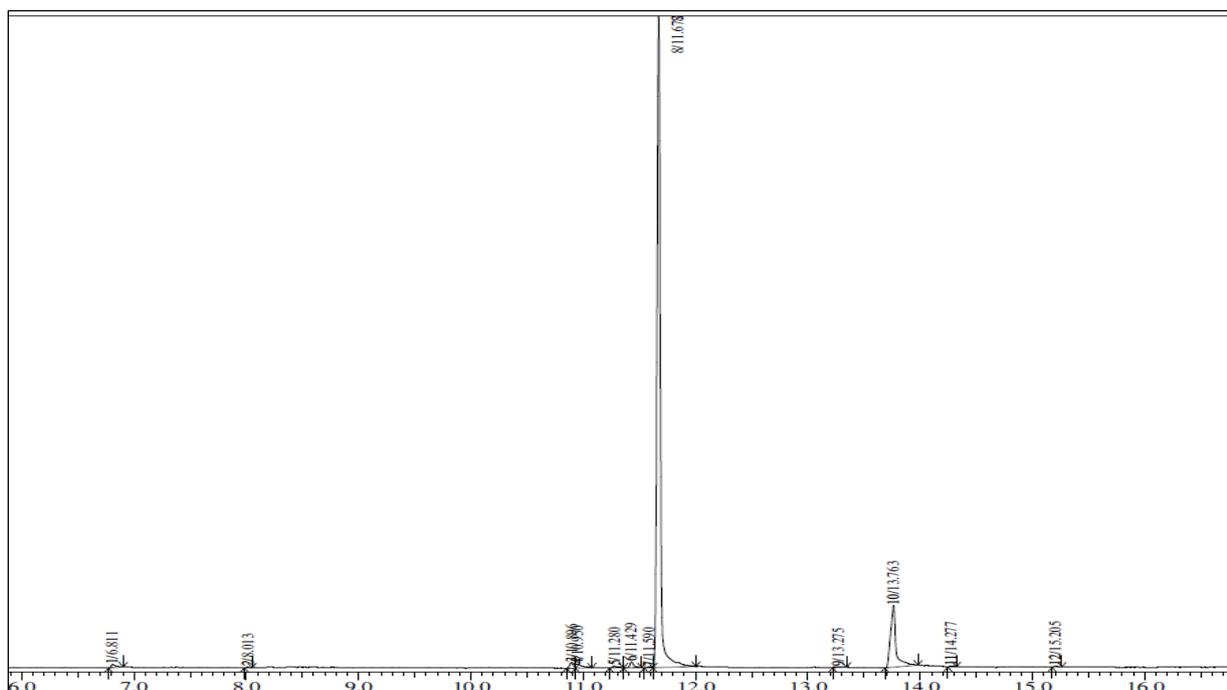
Fonte: Autor, 2023.

5.2. Caracterização dos óleos por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A CG-EM foi usada para tipificação dos compostos presentes no óleo do CNM e do α -toc. O CNM já foi tipificado em outros trabalhos, porém é de suma importância realizar essas análises, principalmente em óleos vegetais, já que os produtos naturais apresentam grande variabilidade composicional.

A **Figura 3** apresenta o cromatograma total após análises do CNM por CG-EM, revelando a presença de dois picos principais.

Figura 8. Cromatograma do CNM por CG-EM



Fonte: Autor, 2023.

O pico 1 foi o que apresentou menor tempo de retenção (11.678 min), sendo identificado como cinamaldeído pela biblioteca de lipídios (**Tabela 7**). O pico 2 foi identificado como ácido cinâmico pela biblioteca de lipídios (**Tabela 7**) e apresentou maior tempo de retenção (13.763 min). O principal constituinte do óleo foi o CNM (área de 82.61%).

Tabela 7. Composição do óleo de CNM obtido por CG-EM

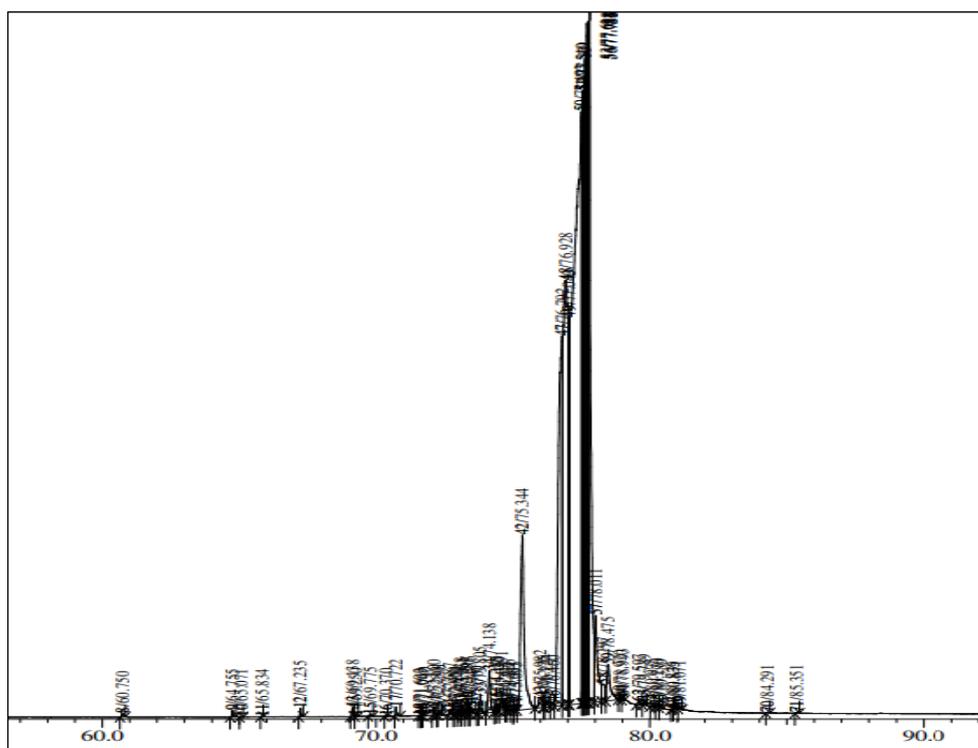
Componente	Tempo de exposição (min)	Área(%)
Benzaldeído	6.811	0.59
Ethilenodiamina	10.896	0.99
Cinamaldeído	10.950	0.90
o-Methoxibenzaldeído	11.280	0.38
p-Propilbenzaldeído	11.429	0.90
Cinamaldeído	11.672	82.61
Ácido cinâmico	13.763	12.69
Etil cinnamate, (Z)	14.277	0.12
Ácido cinâmico, trimethylsilyl ester	15.205	0.16

Fonte: Autor, 2023;

O óleo de α -toc apresentou mais picos com tempos de retenção variados identificados também com diferentes tipos de constituintes que estão ilustrados na **Figura 9** e descritos na **Tabela 8**, onde, pode-se observar que o acetato de α -tocoferol (41,01%) foi o constituinte mais abundante do óleo do α -toc.

A **Figura 4** apresenta o cromatograma total após análises do α -toc por CG-EM.

Figura 9. Cromatograma do α -toc por CG-EM



Fonte: Autor, 2023.

Tabela 8. Composição do óleo de α -toc obtido por CG-EM.

Componente	Tempo de exposição (min)	Área(%)
Dodecametilciclohexasiloxane	17.963	0.03
Tetradecametilciclohexasiloxane	27.858	0.09
Hexadecametilciclohexasiloxane	37.479	0.07
1-Nonanol, 4,8-dimetil	41.250	0.01
Octadecametilciclohexasiloxane	46.038	0.07
Eicosametilciclohexasiloxane	53.729	0.05
Isobenzofuranona	77.493	32.41
Acetato de α -Tocoferol	79.789	41.01

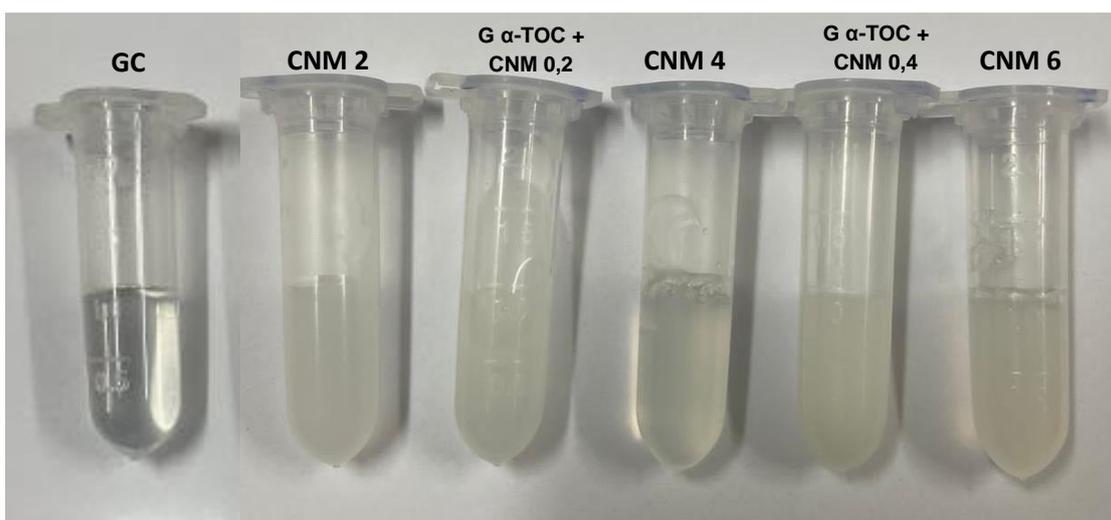
Fonte: Autor, 2023.

5.3. NANOCÁPSULAS

5.3.1 Desenvolvimento

O desenvolvimento das nanocápsulas de α -toc e CNM seguiu a metodologia termossensível do P407. A encapsulação por meio dos ciclos alternados de agitação e refrigeração proporcionou dispersões de nanocápsulas sem uma fase de α -toc e CNM não encapsulados visível (**Figura 5**).

Figura 10. Aspecto macroscópico das dispersões de nanocápsulas.



Fonte: Autor, 2023.

5.3.2. Caracterização

5.3.2.1. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas

As dispersões foram submetidas ao método do espalhamento de luz dinâmico (DLS) para determinação do tamanho das partículas e índice de polidispersão. Para o potencial zeta, o mesmo foi avaliado através da mobilidade eletroforética associada à equação de Henry. Os resultados estão listados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Resultado de análise no DLS dos grupos testados em relação ao D, PDI e PZ.

Grupos	D (d.nm)	PDI	PZ
GC	1997±14.96	1±0.9	+11.1±4.21
G α-TOC	184.1±93,37	0.228±0.2	-3.76±2.34
G α-TOC + CNM 0,2	195.7±116.4	0.210±0.2	+0.566±3.23
G CNM 0,2	1173±7,05	0.764±1	+0.853±4.24
G α-TOC + CNM 0,4	135.7±99.37	0.215±0.5	+1.32±3.92
G CNM 0,4	620.1±103.7	0.542±0.8	+1.94±4.56

Fonte: Autor, 2023.

D: Diâmetro médio das partículas; **PDI:** Índice de Poldispersão; **PZ:** Potencial Zeta.

GC: Dispersão Controle; **G α-TOC:** Dispersão apenas com α-toc na concentração de 5 mg/ml; **G α-TOC + CNM 0,2:** Dispersão com α-toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G CNM 0,2:** Dispersão com CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G α-TOC + CNM 0,4:** Dispersão com α-toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,4 mg/ml; **G CNM 0,4:** Dispersão com CNM na concentração de 0,4 mg/ml.

Percebe-se que a adição do α-toc nas soluções corroborou com a diminuição do tamanho das partículas e na diminuição do índice de polidispersão. Houve também uma diminuição no tamanho das partículas nos grupos com uma maior quantidade de CNM, porém, essa maior quantidade parece ter influenciado em um maior índice de polidispersão nos grupos com o CNM em conjunto com o α-toc (G α-TOC + CNM 0,2 e G α-TOC + CNM 0,4) e um menor nos grupos sem a adição da α-toc (G CNM 0,2 e G CNM 0,4).

Em relação ao potencial zeta, nos grupos com CNM e α -toc houve a neutralização do caráter iônico das nanocápsulas, o que pode prover a mucoadesão em cavidade oral, porém, a mudança nesse potencial, observada quando comparado o grupo GC com os demais, pode indicar a não encapsulação parcial dos ativos.

5.3.2.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

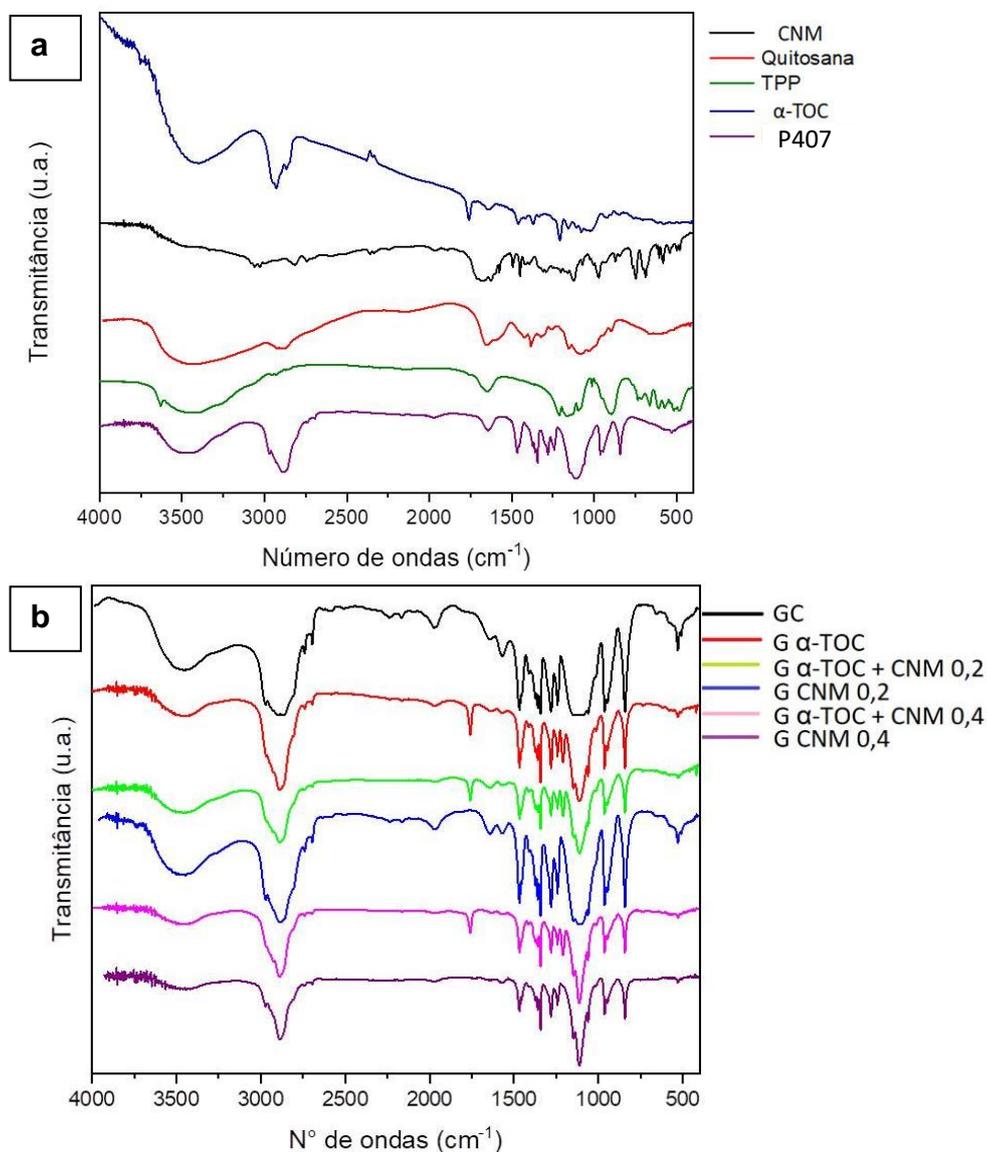
A **Figura 11 (a)** mostra os espectros de FTIR dos componentes das formulações (tripolifosfato de sódio [TPP], P407, Quitosana, CNM e α -toc) e a **Figura 11 (b)** os espectros das formulações (GC, G α -TOC, G α -TOC + CNM 0,2, G CNM 0,2, G α -TOC + CNM 0,4 e G CNM 0,4). Em relação ao P407, observou-se bandas em aproximadamente 2800 cm^{-1} referente aos radicais metila dos grupos PPO. Em aproximadamente 3400 cm^{-1} ligados aos radicais O-H dos grupos PEG e em aproximadamente 1100 cm^{-1} das ligações éter C-O-C (12) comum a todas as formulações.

O espectro do α -toc demonstrou bandas características em torno de 1376 cm^{-1} (flexão metil simétrica), 1459 cm^{-1} (torção do anel benzênico) (84), 1750 cm^{-1} (estiramento de C=O) (85), 2857 cm^{-1} e 2928 cm^{-1} (vibração de estiramento assimétrica e simétrica do CH_2) (84,85). Apenas a banda de 1750 cm^{-1} foi observada nos espectros dos grupos CNM2, CNM3 e CNM5. O desaparecimento das bandas de absorção de α -toc em 1376 cm^{-1} , 1459 cm^{-1} , 2857 cm^{-1} e 2928 cm^{-1} indicam o encapsulamento de α -TOC. Para o CNM, observou-se bandas em 1677 cm^{-1} (vibração de alongamento de C=O), 1630 cm^{-1} (vibração de alongamento de C=C), 2816 cm^{-1} e 2742 cm^{-1} (vibração de alongamento CH do grupo aldeído), 3059 cm^{-1} (vibração de alongamento CH de anel de benzeno), 1125 cm^{-1} (vibração de flexão CH do anel de benzeno) e 1450 cm^{-1} (grupo fenil) (86,87). Para todos os grupos, as bandas relacionadas ao CNM não apareceram nos espectros da **Figura 11 (b)**, sugerindo que as superfícies dessas partículas foram revestidas apenas por quitosana/TPP.

Nos espectros de todos os grupos, as bandas coincidiram com os espectros dos polímeros P407, QT e TPP em diferentes intensidades. Observou-se que não houve formação de novas bandas nos espectros de FTIR das

formulações. Assim, podemos concluir que não houve interação química entre os fármacos ativos (CNM e α -toc) e os componentes da formulação (P407, Quitosana e TPP).

Figura 11. a. Espectros de FTIR dos componentes das formulações (TPP, P407, Quitosana, Cinamaldeído e α -toc); b. Espectros das formulações (GC, G α -TOC, G α -TOC + CNM 0,2, G CNM 0,2, G α -TOC + CNM 0,4 e G CNM 0,4).



Fonte: Autor, 2023

GC: Dispersão Controle; **G α -TOC:** Dispersão apenas com α -toc na concentração de 5 mg/ml; **G α -TOC + CNM 0,2:** Dispersão com α -toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G CNM 0,2:** Dispersão com CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G α -TOC + CNM 0,4:**

Dispersão com α -toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,4 mg/ml; **G CNM 0,4**: Dispersão com CNM na concentração de 0,4 mg/ml.

5.3.2.3. Avaliação das propriedades de transição sol-gel

A temperatura e o tempo de gelificação das dispersões foram mostradas na **Tabela 10**. As mesmas apresentaram resultados para a transição de fase em temperaturas entre 20°C e 30°C.

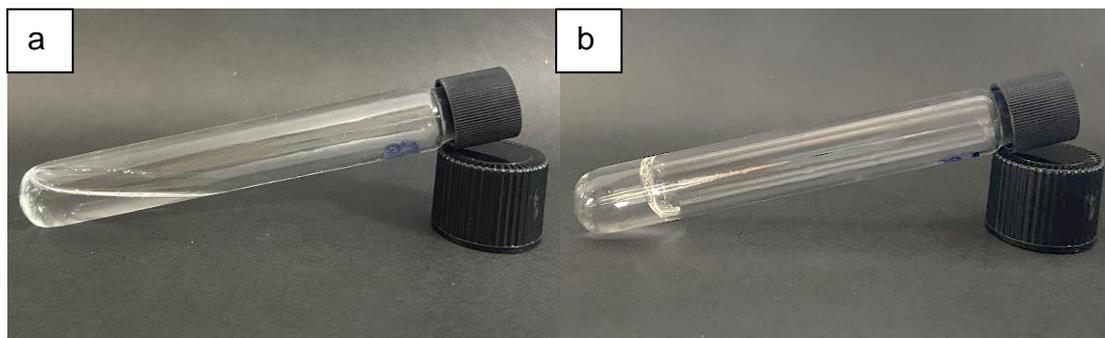
Tabela 10. Temperatura e tempo de gelificação das dispersões.

Grupos	Temperatura (Tsol-gel) (°C)	Tempo (Tsol-gel) 37°C (média [s] \pm desvio padrão)
GC	28 \pm 1	46.4 \pm 6.5
G α-TOC	30 \pm 1	47.2 \pm 2.2
G α-TOC+CNM 0,2	24 \pm 1	33 \pm 3.0
G CNM 0,2	22 \pm 1	29.6 \pm 7.8
G α-TOC+CNM 0,4	20 \pm 1	24.2 \pm 0.2
G CNM 0,4	20 \pm 1	15.9 \pm 2.5

Fonte: Autor, 2023

GC: Dispersão Controle; **G α -TOC**: Dispersão apenas com α -toc na concentração de 5 mg/ml; **G α -TOC + CNM 0,2**: Dispersão com α -toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G CNM 0,2**: Dispersão com CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G α -TOC + CNM 0,4**: Dispersão com α -toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,4 mg/ml; **G CNM 0,4**: Dispersão com CNM na concentração de 0,4 mg/ml.

Figura 12. a. dispersão em fase de solução; b. dispersão após gelificação.



Fonte: Autor, 2023

Neste estudo foi utilizada uma solução de 20% em peso de p407, com isso, os géis termossensíveis com os ativos apresentaram a transição sol-gel relativamente distante a temperatura corporal e permaneceram em forma de solução quando armazenados à temperatura ambiente pelo tempo que variou entre 15.9 a 47.27 s. Pode-se observar que tanto a temperatura quanto o tempo para a transição sol-gel, diminuíram com o aumento da concentração do CNM. Em estudos preliminares foi observado que em concentrações inferiores de P407 (15 e 18%), as soluções não apresentaram gelificação em temperatura corporal.

5.3.2.4. Estudo de estabilidade

Esse teste foi realizado objetivando a detecção de fatores como a instabilidade das dispersões.

Após o teste não foram vistas diferenças no aspecto inicial dos géis avaliados. Os mesmos se apresentaram estáveis quando submetidos à situação de estresse, portanto, se configuraram como adequados.

Após 7 e 15 dias, nas seguintes condições de armazenamento: temperatura ambiente (T.A) (25 ± 2 °C), geladeira (5 ± 2 °C) e estufa (45 ± 2 °C), as dispersões foram avaliadas novamente quanto ao pH, cor, separação de fases e odor. Os valores de pH estão expressos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Avaliação do pH inicial e após 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente, geladeira e estufa.

Grupos	pH inicial	pH após 7 dias			pH após 15 dias			pH após 30 dias		
		T.A pH (%)	Estufa pH (%)	Geladeira pH (%)	T.A pH (%)	Estufa pH (%)	Geladeira pH (%)	T.A pH (%)	Estufa pH (%)	Geladeira pH (%)
GC	5.8	5.78/0.3	5.77/0.4	5.79/0.1	6.04/-4.1	5.85/-0.8	5.86/-0.7	5.68/2	5.94/2.4	5.85/0.8
G α-TOC	5.97	5.9/1.25	5.88/1.5	5.88/1.5	6.33/-6	5.88/1,5	5.95/0.3	6.39/-7	6.07/-1.6	5.96/0.1
G α-TOC + CNM 0,2	5.89	5.8/1.5	5.82/1.2	5.8/1.5	5.85/0.7	5.84/0.8	5.9/-0.16	6.01/-2	5.93/-0.1	5.86/0.5
G CNM 0,2	5.84	5.75/1.9	5.76/1.7	5.72/2.3	5.82/0.3	5.76/1.4	5.83/0.2	5.91/1.1	5.87/-0.5	5.79/1.1
G α-TOC + CNM 0,4	6.04	5.88/2.6	5.92/1.9	5.95/1.5	5.9/2.3	5.91/2.1	5.99/0.8	6.05/-0,1	6.02/0.35	5.97/1.1
G CNM 0,4	6	5.95/0.8	5.98/0.3	5.94/0.9	5.98/0.3	5.96/0.7	6.14/-2.3	6.11/-1.8	5.87/2.1	5.99/0.1

Fonte: Autor, 2023.

T.A. Temperatura Ambiente. *% de diferença ao pH inicial

GC: Dispersão Controle; **G α-TOC:** Dispersão apenas com α-toc na concentração de 5 mg/ml; **G α-TOC + CNM 0,2:** Dispersão com α-toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G CNM 0,2:** Dispersão com CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G α-TOC + CNM 0,4:** Dispersão com α-toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,4 mg/ml; **G CNM 0,4:** Dispersão com CNM na concentração de 0,4 mg/ml.

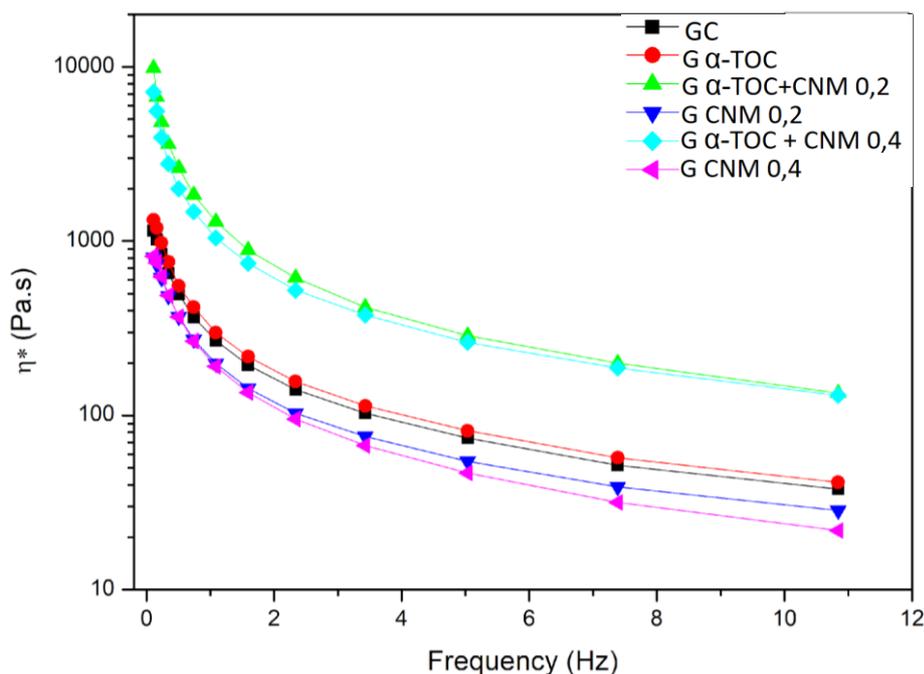
Vê-se que as alterações nos valores de pH das formulações no período de 15 dias foram menores que 10% em todas as formas de armazenamento, assim como exigido no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) [86].

Os géis também se apresentaram estáveis em todas as formas de armazenamento, não sendo observado separação de fases, mudanças no odor nem da coloração dos géis.

5.3.2.5. Ensaio reológico

A **Figura 13** apresentou o gráfico de viscosidade em função da frequência oscilatória dos géis poliméricos.

Figura 13: Viscosidade aparente em função da frequência oscilatória dos Nanossistemas de matriz polimérica.



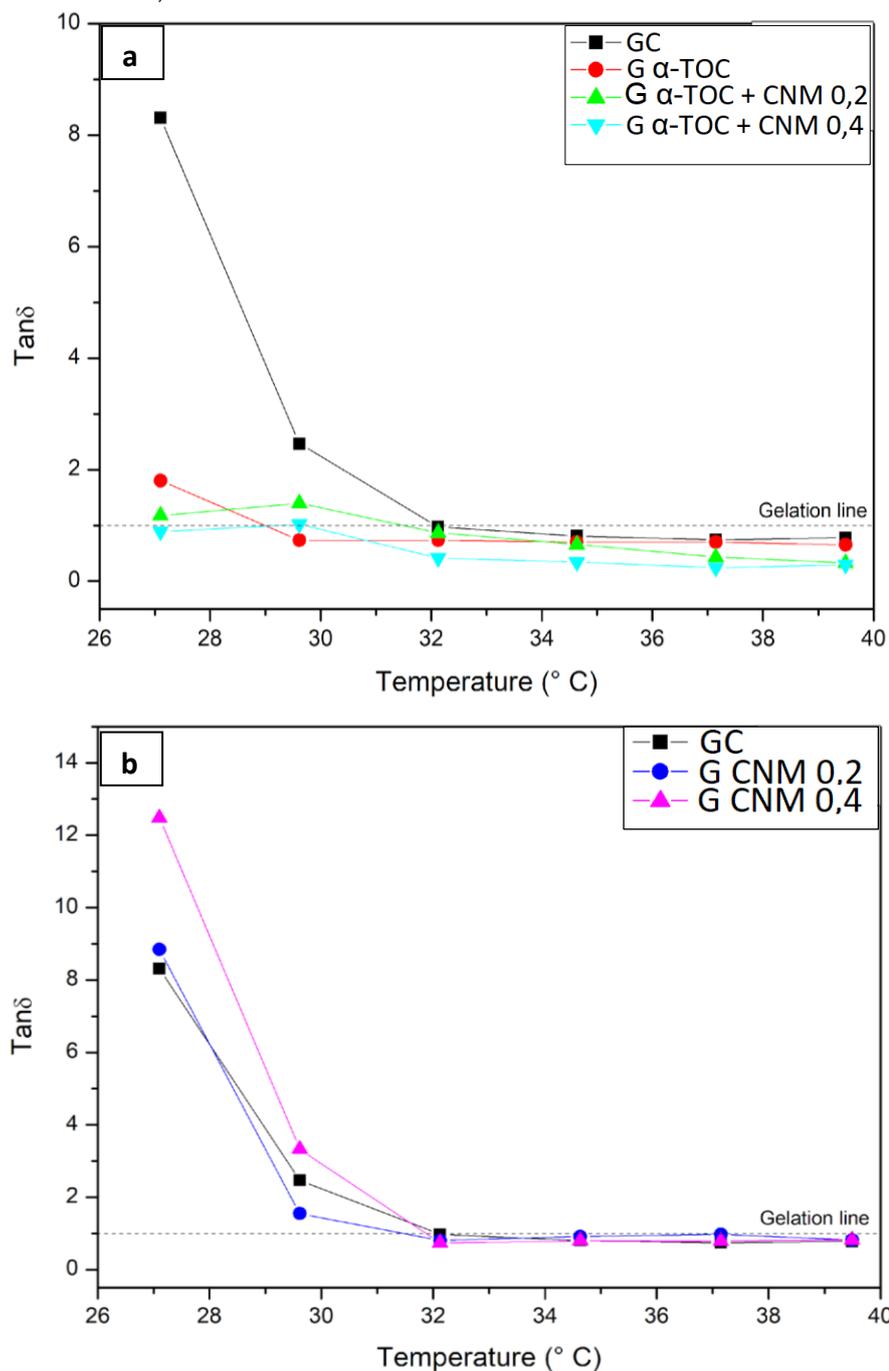
Fonte: Autor, 2023.

Com o gráfico foi identificado o comportamento pseudoplástico nas amostras, já que a viscosidade se mostra maior à baixas frequências e diminui bruscamente até atingir a estabilidade em frequências maiores.

Além disso, também foi possível notar que as amostras G α-TOC + CNM 0,2 e G α-TOC + CNM 0,4, únicas com ambas as substâncias (α-toc e CNM) na composição, possuem viscosidade superior as demais, o G α-TOC que possui apenas o α-TOC não apresentou mudanças significativas, enquanto as amostras com apenas o CNM, G CNM 0,2 e G CNM 0,4, se mostraram menos viscosas de acordo com a concentração da substância em cada uma.

Na **Figura 14** estão dispostos os gráficos referentes à tangente de perda ($\tan\delta$), relação entre os módulos de perda plástica e armazenamento elástico, em função da temperatura e à frequência constante.

Figura 14: Tangente de perda ($\tan\delta$) em função da temperatura. **a.** amostra controle e amostras com α -TOC e CNM; **b.** amostra controle e amostras com CNM.



Fonte: Autor, 2023

GC: Dispersão Controle; **G α -TOC:** Dispersão apenas com α -toc na concentração de 5 mg/ml; **G α -TOC + CNM 0,2:** Dispersão com α -toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G CNM 0,2:** Dispersão com CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G α -TOC + CNM 0,4:** Dispersão com α -toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,4 mg/ml; **G CNM 0,4:** Dispersão com CNM na concentração de 0,4 mg/ml.

De acordo com os gráficos a amostra controle (GC) apresenta alta $\tan\delta$ em temperatura ambiente e gelificação em torno de 32 °C, ou seja, o sistema passa de um estado líquido viscoso para gel de característica predominante elástica.

Os sistemas com apenas α -toc (G α -TOC) e α -toc e CNM (G α -TOC+CNM 02 e G α -TOC+CNM 0,4), **figura 14 (a)**, mostraram um $\tan\delta$ muito inferior em comparação às demais, mesmo a temperatura ambiente, e apresentam transição sol-gel em temperaturas menores que a amostra controle, entre 29 e 32 °C. Já as amostras com apenas CNM (G CNM 0,2 E G CNM 0,4), **Figura 14 (b)**, tiveram comportamento semelhante à amostra controle, com $\tan\delta$ alto em temperatura ambiente e gelificação em torno de 32 °C. Os resultados da tangente de perda corroboraram com a análise de viscosidade, visto que amostras com menores $\tan\delta$ (mais rígidas) apresentam também maiores valores de viscosidade, e amostras com maiores $\tan\delta$ são as mais fluidas.

5.3.2.6. Concentração inibitória mínima (CIM) das dispersões com nanocápsulas de CNM e α -toc e do CNM livre contra *C. albicans*, *S.aureus* e *E.coli*

Os resultados da CIM para as dispersões de nanocápsulas foram descritos na **Tabela 12**

Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das dispersões de nanocápsulas frente as cepas de *S.aureus*, *E.coli* e *C.albicans*.

Formulações	Cepas		
	<i>S.aureus</i> (µg/ml)	<i>E.coli</i> (µg/ml)	<i>C.albicans</i> (µg/ml)
GC	SI	SI	SI
G α-TOC	SI	SI	SI
G α-TOC+CNM 0,2	50	50	6,12
G CNM 0,2	50	50	6,12
G α-TOC+CNM 0,4	50	50	6,12
G CNM 0,4	50	50	6,12
CNM livre	781	781	39
α-TOC	SI (50mg/ml)	SI (50mg/ml)	SI (50mg/ml)
<u>Nistatina</u>	-	-	3
<u>Clorexidina</u>	0,05	0,1	-

Fonte: Autor, 2023.

SI: Sem inibição; **CNM livre:** cinamaldeído não encapsulado; **α-TOC:** α-tocoferol não encapsulado; **SI (50mg/ml):** sem inibição pelo α-tocoferol na maior concentração testada de 50 mg/ml.

GC: Dispersão Controle; **G α-TOC:** Dispersão apenas com α-toc na concentração de 5 mg/ml; **G α-TOC + CNM 0,2:** Dispersão com α-toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G CNM 0,2:** Dispersão com CNM na concentração de 0,2 mg/ml; **G α-TOC + CNM 0,4:** Dispersão com α-toc na concentração de 5 mg/ml e CNM na concentração de 0,4 mg/ml; **G CNM 0,4:** Dispersão com CNM na concentração de 0,4 mg/ml.

A atividade antimicrobiana das dispersões de nanocápsulas foi avaliada pelo método de microdiluição. As formulações GC e GC α-toc, compostas apenas com os polímeros, e os polímeros com o α-toc, respectivamente, não apresentaram atividade antimicrobiana. Os controles tiveram atividade como previsto. As dispersões de nanocápsulas inibiram o crescimento microbiano frente as cepas avaliadas a partir da concentração de 6,12 µg.mL.

5.4. CLN

5.4.1. Desenvolvimento

O desenvolvimento dos CLN seguiu a metodologia de emulsificação a quente seguido por sonicação ultrassônica em todas as etapas do estudo. A encapsulação dos lipídios através desse sistema proporcionou CLN com aspecto macroscópico ideal, como leitosas e homogêneas.

5.4.1.1. Estudos de pré-formulação do CLN

Em geral, os CLN apresentaram aspecto macroscópico ideal, como leitosas e homogêneas (**Figura 15**).

Figura 15. Aspecto macroscópico das formulações teste.



Fonte: Autor, 2023.

Os grupos foram submetidos à avaliação do espalhamento de luz dinâmico para determinação da distribuição e do tamanho das partículas. O PZ foi avaliado através da mobilidade eletroforética associada à equação de Henry. Os resultados foram descritos na **Tabela 13**.

Tabela 13. Resultado da análise do tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta.

Formulações	D (nm)	PDI	PZ
Formulação 1	202.7±52.3	0.184±0.1	-11.8±4.3
Formulação 2	224.2±43.2	0.14±0.1	-17.9±5
Formulação 3	265.6±90	0.29±0.05	-13.4±4.7
Formulação 4	238.4±34.2	0.094±0.03	-19.4±3.2
Formulação 5	441.5±67.3	0.484±0.05	-13.8±3.7
Formulação 6	1017±601.5	0.191±0.03	-6.2±4
Formulação 7	3257±33.27	0.367±0.1	+11.7±4.5
Formulação 8	247.2±95.90	0.191±0.01	-7.5±3.3

Fonte: Autor, 2023.

D: Diâmetro médio das partículas; **PDI:** Índice de Polidispersão; **PZ:** Potencial Zeta.

Com base nesses resultados, a quantidade de MCT pareceu contribuir com uma polidispersão menor e potencial zeta maior, que indicam uma maior homogeneidade e estabilidade das moléculas, porém, também demonstrou um pequeno aumento no tamanho das partículas, isso se compararmos o grupo 2 (300mg de MCT) com o grupo 1 (100 mg de MCT). Comparando o grupo 3 com o grupo 4, que além de diferirem na quantidade de MCT, também diferiram na quantidade do Precirol, pode-se observar que uma maior quantidade dos dois (Grupo 4/ 150 mg de precirol e 200 mg de MCT) corroborou com a diminuição do tamanho das partículas, do índice de polidispersão e aumento do potencial zeta. A maior quantidade de Tween observada no grupo 5 (50 mg) pareceu interferir negativamente no tamanho das partículas, na homogeneidade e no índice de polidispersão da formulação.

Em relação aos grupos com quitosana, pode-se perceber que a presença do Cremophor se fez essencial, visto que no grupo com sua ausência (grupo 7) as partículas ultrapassaram consideravelmente a escala nanométrica e obteve o maior PDI entre essas formulações, porém, o PZ foi positivo, reforçando o caráter catiônico da quitosana. Comparando os grupos 6 e 8, observa-se que uma maior quantidade de quitosana refletiu em uma solução com partículas menores, porém sem diferença no PDI e PZ aniônico, que pode indicar que a quitosana foi parcialmente encapsulada e não recobriu a superfície de todas as partículas.

5.4.1.2. Planejamento experimental do tipo box-behnken para otimização da produção de CLN

A otimização da produção de CLN foi realizada usando o planejamento experimental Box-Behnken objetivando a produção de sistemas com menor D possível, baixos PDIs e elevado PZ. Após as definições dos parâmetros: tempo de sonicação (2min), potência de sonicação (60hz), proporção e concentrações mínimas e máximas do Precirol®, concentrações mínimas e máximas do MCT e concentrações mínimas e máximas da quitosana, a otimização das formulações foi delineada pelo planejamento fatorial Box-Behnken através da superfície de resposta. Os CLN desenvolvidos para o delineamento também apresentaram aspecto macroscópico ideal, como leitosas e homogêneas (**Figura 16**).

O modelo de melhor ajuste gerado pelo programa, foi submetido para todas as variáveis dependentes, sendo assim, foi observado como melhor, o modelo quadrático com coeficiente de correlação quase igual a 1. O valor do coeficiente de correlação R^2 para o D foi de 0,98 e para o PZ de 0,99, indicando bom ajuste ao modelo em se tratando de ambas as variáveis dependentes. Equação polinomial quadrática foi gerada, representando as interações linear e quadrática para a resposta D e PZ, com base nos dados experimentais obtidos. A expressão matemática de equações polinomiais ou tem valor positivo, que indica que estes efeitos favorecem a resposta final, ou os valores são expressos em termo negativo na equação, que infere relação inversa do fator independente para a resposta final. A significância de cada coeficiente de regressão foi avaliada estatisticamente por análise de variância (ANOVA).

Os parâmetros finais que afetaram a natureza dos CLN mais relevantes foram a quitosana e o precirol. O desenho de Box-Behnken produziu 15 formulações diferentes, para as quais as respostas estão resumidas na **Tabela 14**.

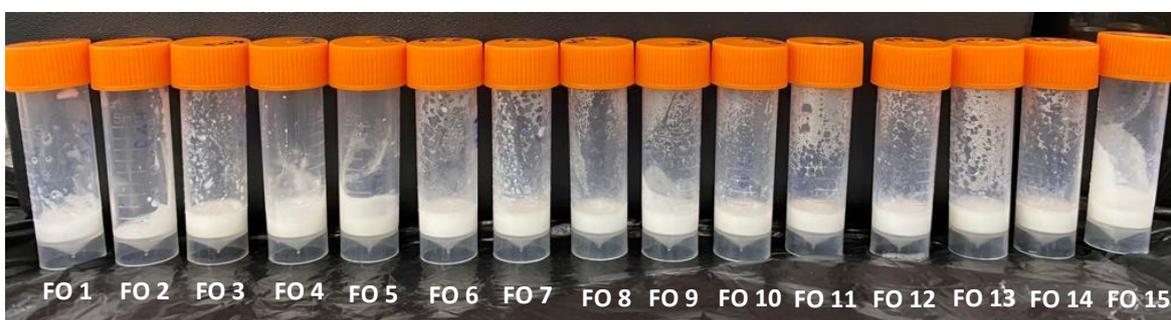
Tabela 14. Respostas observadas no delineamento Box-Behnken para desenvolvimento e otimização das formulações de CLN.

Formulações	Variáveis independentes			Variáveis dependentes		
	Precirol (mg/ml)	MCT (mg/ml)	Quitosana (mg/ml)	D	PDI	PZ
FO1	50	50	50	2945±109	0.337±0.07	+38.8±0.9
FO2	100	100	50	1180±96	0.494±0.09	+37.5±0.4
FO3	50	150	50	577±16	0.373±0.01	+39.3±1.3
FO4	100	150	75	4474±411	0.586±0.01	+38.5±0.8
FO5	100	50	75	4101±525	0.323±0.02	+47±1.4
FO6	100	150	25	824±12	0.338±0.02	+40.1±0.2
FO7	100	100	50	1166±54	0.561±0.18	+37.3±0.8
FO8	50	100	25	281±3	0.238±0.01	+40.5±1.3
FO9	150	100	25	1008±12	0.566±0.09	+38±0.5
FO10	50	100	75	1147±8	0.550±0.04	+39.4±1.6
FO11	150	150	50	920±34	0.663±0.01	+41.3±0.7
FO12	100	50	25	865±14	0.282±0.01	+38.4±0.4
FO13	150	50	50	2854±159	0.324±0.01	+40.3±1.2
FO14	100	100	50	1158±45	0.466±0.03	+37.6±1.8
FO15	150	100	75	2764±356	0.531±0.03	+42±1.3

Fonte: Autor, 2023.

D: Diâmetro médio das partículas; PDI: Índice de Polidispersão; PZ: Potencial Zeta.

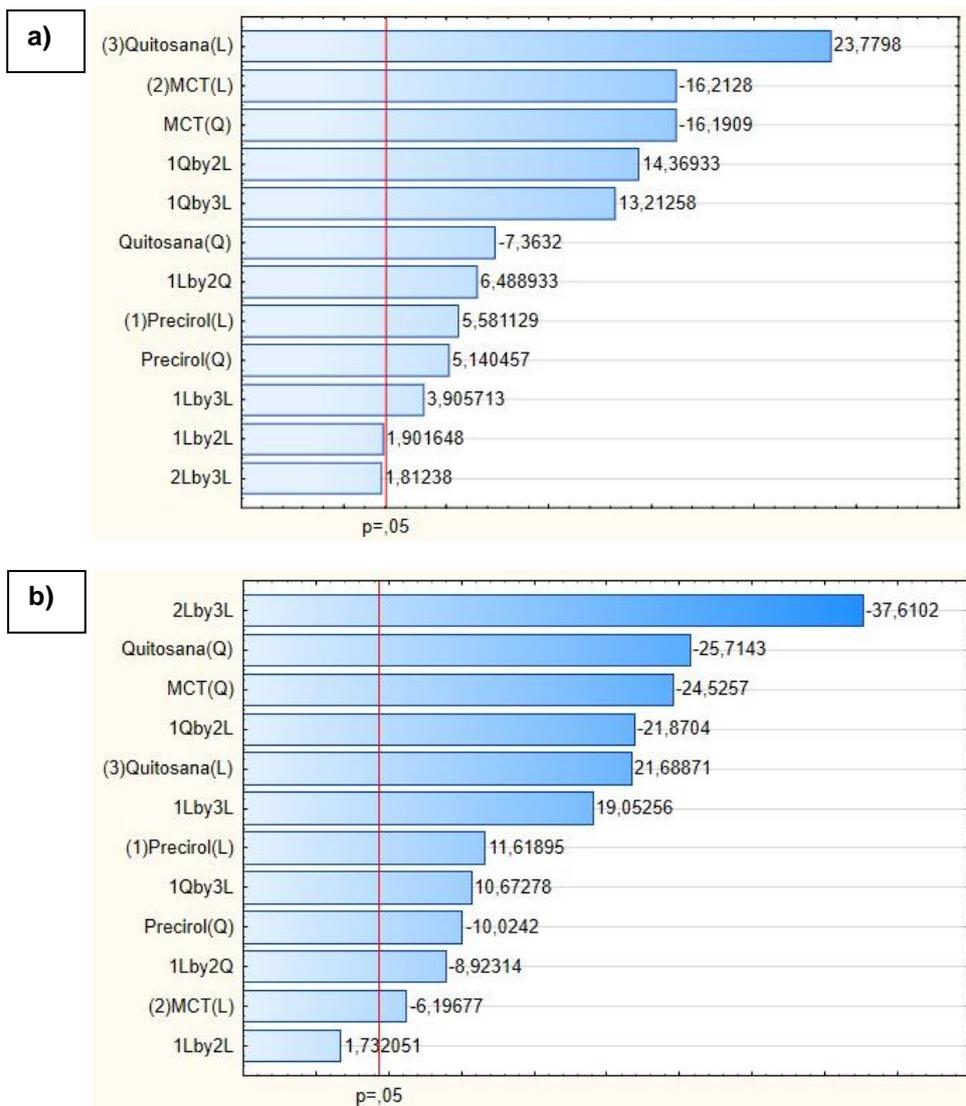
Figura 16. Aspecto macroscópico das formulações para o delineamento box-benhken.



Fonte: Autor, 2023.

Os efeitos das interações individuais dos fatores para as respostas D e PZ também foram analisados por gráficos de Pareto, como complemento desta análise, com o qual é possível medir quantitativa e qualitativamente as contribuições de cada fator para as respostas estudadas (**Figura 17**).

Figura 17. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas: **a)** tamanho (D); **b)** Potencial Zeta (PZ), para o delineamento experimental Box-Behnken de CLN.



Fonte: Autor, 2023.

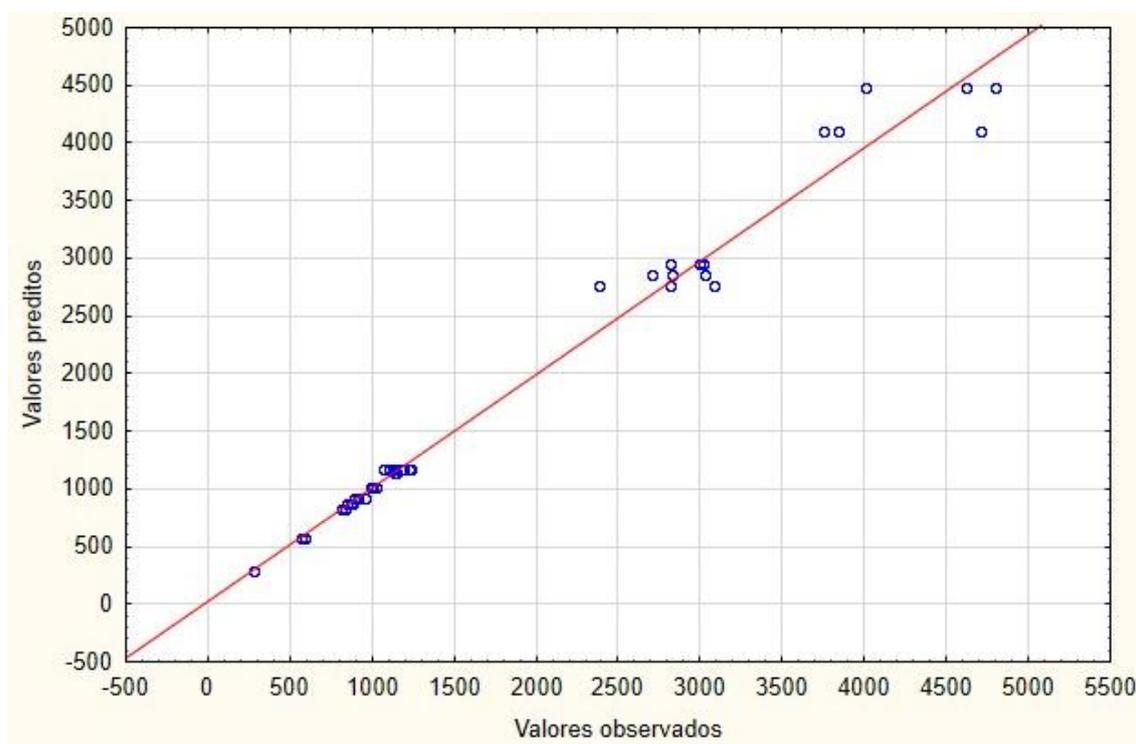
Nota: O comprimento de cada barra é proporcional ao valor absoluto do coeficiente de regressão associado ou efeito estimado. Os efeitos de todos os parâmetros foram padronizados (cada efeito foi dividido pelo seu erro padrão). A sequência na qual as barras são exibidas corresponde à ordem de importância do efeito. Quando a linha vertical cruza uma barra de efeito no gráfico, indica que este efeito é estatisticamente significativo com 95% de confiabilidade ($p = 0,05$).

O comprimento de cada barra no gráfico diz respeito ao efeito das variáveis independentes e suas interações na resposta. As últimas barras restantes dentro

da linha de referência, que correspondem a $p \leq 0,05$, representam os fatores menos contribuintes que não são significativos para a resposta final.

A análise do tamanho das partículas, através do gráfico de Pareto (**Figura 17a**) demonstra que a concentração individual da quitosana e do precirol são os fatores que mais afetam essa resposta, aumentando o D das partículas. O D das partículas parece ser negativamente influenciado pelas concentrações de MCT, o que significa que um aumento na concentração desse lipídio líquido leva a uma diminuição no D das partículas.

Figura 18. Gráfico de correlação linear entre os valores observados e previstos, correspondentes a resposta: tamanho.

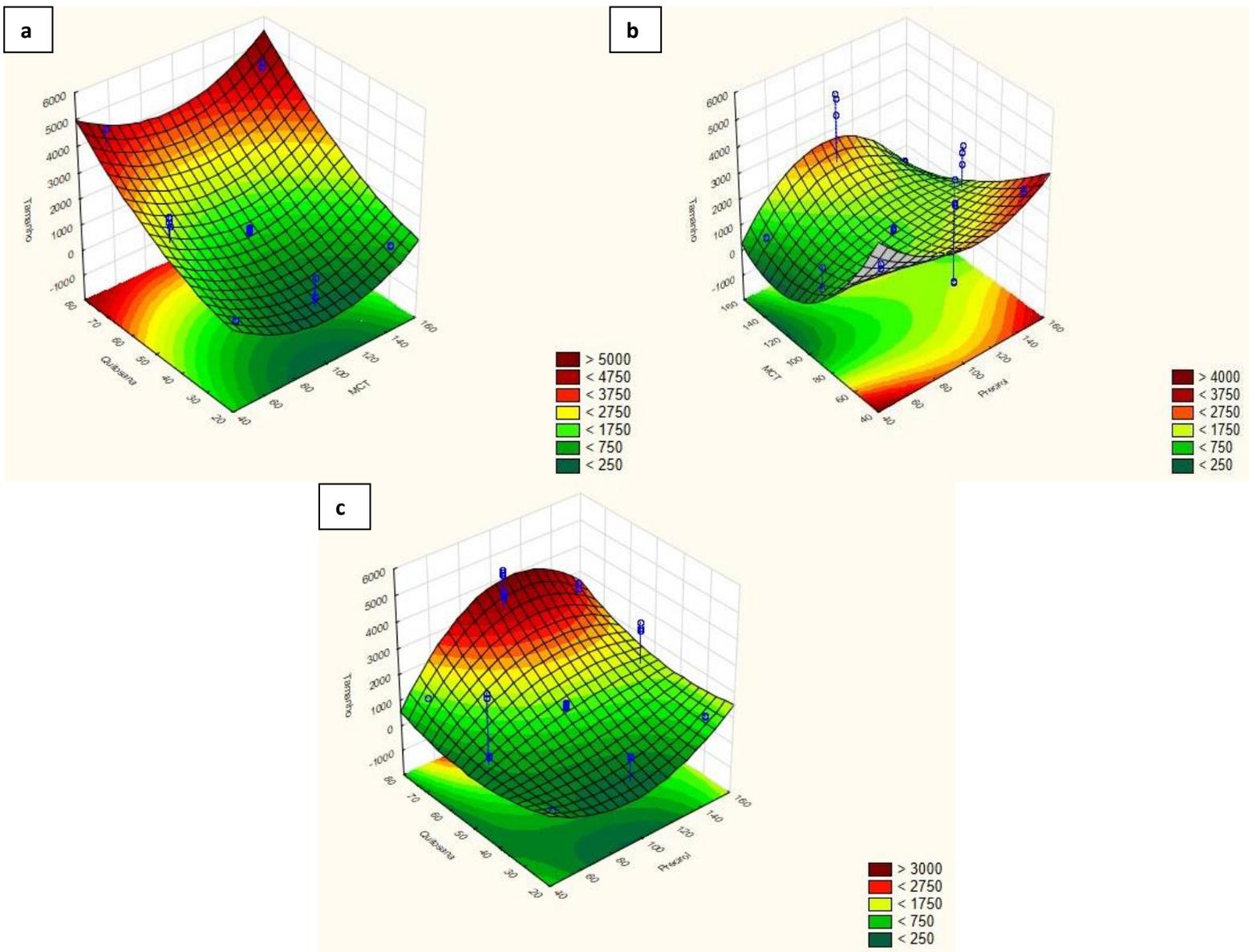


Fonte: Autor, 2023.

Na **Figura 19** se comparou quantitativamente os valores experimentais resultantes das respostas com os valores previstos. As respostas apuradas foram geradas para 15 corridas, o modelo de melhor ajuste gerado pelo programa, para todas as variáveis dependentes, foi observado a partir do modelo quadrático coeficiente de correlação para tamanho da partícula de 0,98 com R^2 ajustado de 0,98, indicando bom ajuste ao modelo.

Gráficos tridimensionais de metodologia de superfície para a resposta tamanho de partícula (D) foram elaborados para identificar as condições ideais para cada variável dependente (**Figura 20**).

Figura 20. Gráficos de superfície de resposta 3D mostrando o efeito das variáveis independentes (quitosana, MCT e precirol) no tamanho (D) dos CLN. **a.** Relação quitosana/MCT; **b.** Relação MCT/precirol; **c.** Relação quitosana/precirol.



Fonte: Autor, 2023.

Sabe-se que essas parcelas estudam os efeitos de interação dos fatores nas respostas, bem como são úteis para estudar os efeitos de dois fatores na resposta de uma só vez. Como a resposta para o potencial zeta não apresentou relevância estatística, os gráficos de superfície de resposta para estes parâmetros não foram apresentados.

Pode-se perceber que a concentração de MCT apresentou efeito significativo, porém negativo sobre o desfecho, com isso observa-se que um aumento na concentração do mesmo resulta em um decréscimo nos valores do D das partículas, já em relação à quitosana, observa-se que a mesma tem efeito significativo e positivo sobre esse desfecho, indicando que a o aumento da concentração da mesma é proporcional ao aumento do D das partículas, logo, o gráfico de superfície com a relação quitosana/ MCT (**Figura 20 [a]**), nos indica que ao analisar essas variáveis em conjunto, a concentração ideal do MCT estaria entre 100-140 mg/ml, ou seja, entre os níveis central e máximo estabelecidos no delineamento box-behnken; já para a quitosana, foram indicados valores inferiores a 30 mg/ml, abaixo do nível mínimo estabelecido no estudo.

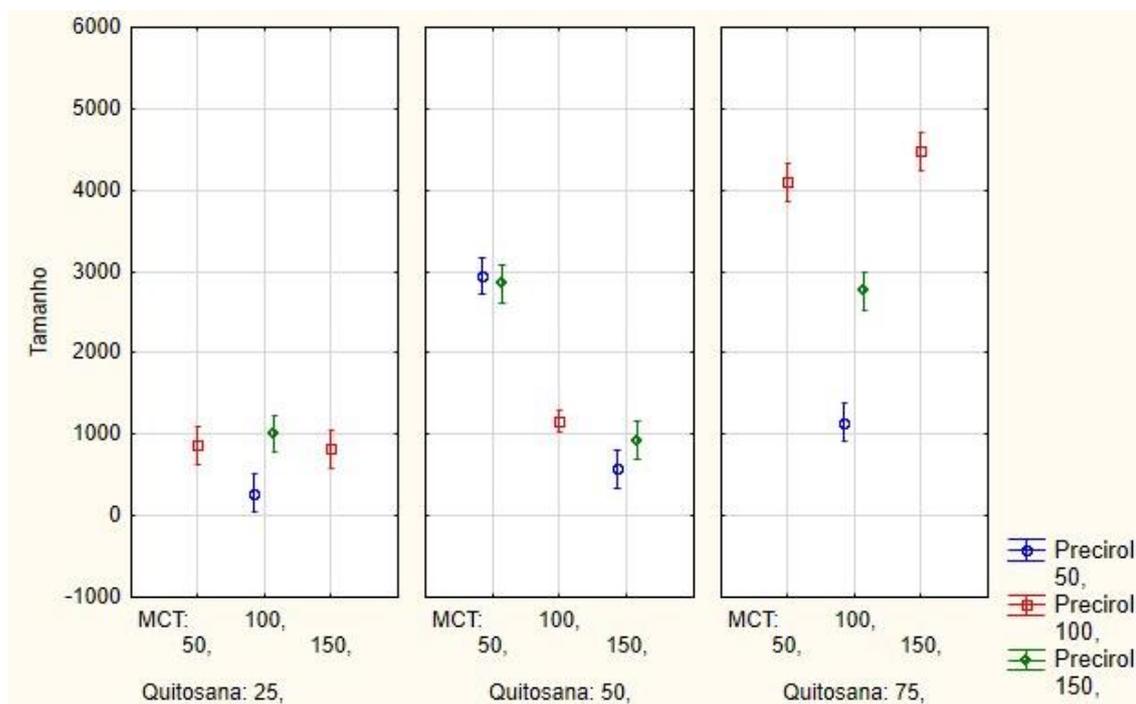
Na **Figura 20 (b)** viu-se a análise combinada das variáveis independentes MCT/preciról, indicando resultados semelhantes aos já descritos na relação quitosana/MCT para o MCT, com valores entre 100-140 mg/ml, entre os níveis central e máximo, além de mostrar que o aumento da concentração do preciról parece ser proporcional ao aumento do D das partículas, sendo assim, o gráfico de superfície (**Figura 20 [b]**) indicou valores inferiores a 60 mg/ml, entre os níveis mínimo e central do delineamento.

O gráfico de superfície para a relação quitosana/preciról (**Figura 20 [c]**) também corrobora com os valores indicados para a quitosana nas outras combinações, valores inferiores a 30 mg/ml, indicando que concentrações menores da mesma apresenta como consequência um decréscimo no D das partículas. Também aponta uma concentração para o preciról entre 80-100mg/ml, diferindo dos valores observados para essa variável nas outras combinações.

No gráfico de médias marginais e limites de confiança (**Figura 21**), pode-se visualizar a interação das três variáveis independentes e observar quais valores

de concentrações das mesmas constituem a formulação otimizada, que foram: 25 mg/ml de quitosana, 50 mg/ml de precirol e 100 mg/ml de MCT.

Figura 21. Gráfico de médias marginais e limites de confiança.

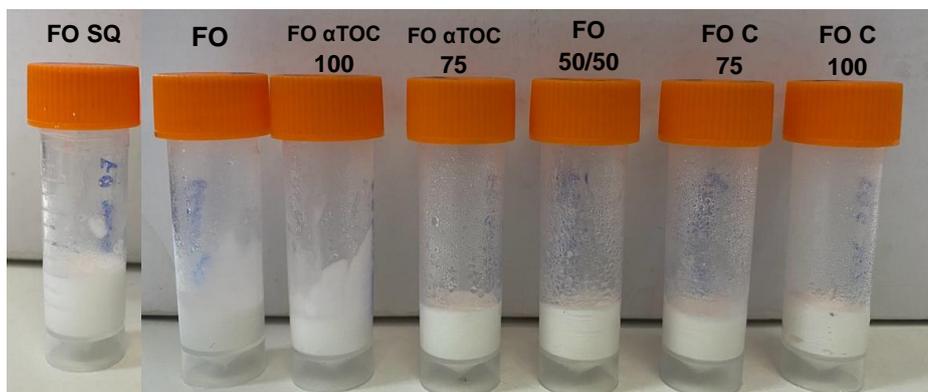


Fonte: Autor, 2023.

5.4.1.3. Desenvolvimento das formulações otimizadas de CLN com CNM e α -toc

As formulações otimizadas foram desenvolvidas seguindo a mesma metodologia supracitada nas outras etapas do estudo. As mesmas também demonstraram aspecto macroscópico como leitosas e homogêneas (**Figura 22**).

Figura 22. Aspecto macroscópico das formulações otimizadas.



Fonte: Autor, 2023.

FO SQ: Formulação controle sem o CNM, α -TOC e quitosana; **FO:** Formulação controle sem o CNM e α -TOC; **FO α TOC 100:** Formulação apenas com α -TOC na concentração de 100 mg/ml; **FO α -TOC 75:** Formulação com 75 mg/ml do α -TOC e 25 mg/ml do CNM; **FO 50/50:** Formulação com 50 mg/ml do CNM e 50 mg/ml do α -TOC; **FO C75:** Formulação com 75 mg/ml do CNM e 25 mg/ml do α -TOC; **FO C100:** Formulação apenas com CNM na concentração de 100 mg/ml.

5.4.2. Caracterização

5.4.2.1. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos CLN com CNM e α -toc

Ao observar os valores descritos na **Tabela 15**, percebeu-se que a adição da vitamina E nas formulações com CNM corroborou com a diminuição do tamanho das partículas e no aumento no índice de polidispersão. Já o CNM agiu de forma contrária, visto que com o aumento de sua concentração houve um aumento do tamanho das partículas e uma diminuição no índice de polidispersão. Já em relação ao potencial zeta, o CNM teve o aumento de sua concentração resultando em um acréscimo nos valores desse potencial. O α -toc pareceu agir de forma contrária.

Tabela 15. Resultado de análise no DLS das formulações otimizadas em relação ao tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta.

Grupos	D	PDI	PZ
FO	311.4 ± 2.3	0.264 ± 0.04	+41.2 ± 0.9
FO C 100	788.4 ± 18.5	0.187 ± 0.03	+42.2 ± 0.4
FO C 75	764.9 ± 16.4	0.219 ± 0.03	+40.7 ± 1
FO 50/50	523 ± 5.5	0.307 ± 0.01	+38.1 ± 1.3
FO αTOC 100	337.3 ± 1.6	0.286 ± 0.12	+40 ± 0.6
FO α-TOC 75	228.25 ± 0.1	0.250 ± 0.01	+32.7 ± 1.2
FO SQ	208.9 ± 3.2	0.166 ± 0.03	-12.3 ± 0.57

Fonte: Autor, 2023.

D: Diâmetro médio das partículas; **PDI:** Índice de Polidispersão; **PZ:** Potencial Zeta; **FO:** Formulação controle sem o CNM e α-TOC; **FO C 100:** Formulação apenas com CNM na concentração de 100 mg/ml; **FO C 75:** Formulação com 75 mg/ml do CNM e 25 mg/ml do α-TOC; **FO 50/50:** Formulação com 50 mg/ml do CNM e 50 mg/ml do α-TOC; **FO αTOC 100:** Formulação apenas com α-TOC na concentração de 100 mg/ml; **FO αTOC 75:** Formulação com 75 mg/ml do α-TOC e 25 mg/ml do CNM; **FO SQ:** Formulação controle sem o CNM, α-TOC e quitosana.

5.4.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos CLN com CNM e α-toc e do CNM livre contra *C. albicans*, *S.aureus* e *E.coli*

Os resultados da CIM para as formulações de CLN foram descritos na **Tabela 16.**

Tabela 16. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das as formulações de CLN frente as cepas de *S.aureus*, *E.coli* e *C.albicans*.

Formulações	Cepas		
	<i>S.aureus</i> (µg/ml)	<i>E.coli</i> (µg/ml)	<i>C.albicans</i> (µg/ml)
FO C 100	390 (CNM)	781 (CNM)	24 (CNM)
	97 (QT)	194 (QT)	6 (QT)
FO C 75	292 (CNM)	292 (CNM)	18 (CNM)
	90 (α-toc)	90 (α-toc)	6 (α-toc)
	97 (QT)	97 (QT)	6 (QT)
FO 50/50	194 (CNM)	194 (CNM)	12 (CNM)
	194 (α-toc)	194 (α-toc)	12 (α-toc)
	97 (QT)	97 (QT)	6 (QT)
FO αTOC 100	1030 (α-toc)	1030 (α-toc)	32 (α-toc)
	259 (QT)	259 (QT)	8 (QT)
FO αTOC 75	97 (α-toc)	194 (α-toc)	24 (α-toc)
	32 (CNM)	64 (CNM)	8 (CNM)
	32 (QT)	64 (QT)	8 (QT)
FO	520 (QT)	520 (QT)	64 (QT)
FO SQ	SI	SI	SI
CNM livre	781	781	39
α-TOC livre	SI (50mg/ml)	SI (50mg/ml)	SI (50mg/ml)
QT livre	260	2140	260
Clorexidina	0,05	0,1	-
Nistatina	-	-	3

Fonte: Autor, 2023.

SI: Sem inibição; **SI (50mg/ml):** sem inibição pelo α-tocoferol na maior concentração testada de 50 mg/ml; **QT:** Quitosana; **CNM:** cinamaldeído; **α-toc:** α-tocoferol; **CNM livre:** cinamaldeído não encapsulado; **α-TOC livre:** α-tocoferol não encapsulado; **QT livre:** quitosana não encapsulada; **FO:** Formulação controle sem o CNM e α-TOC; **FO C 100:** Formulação apenas com CNM na concentração de 100 mg/ml; **FO C 75:** Formulação com 75 mg/ml do CNM e 25 mg/ml do α-TOC; **FO 50/50:** Formulação com 50 mg/ml do CNM e 50 mg/ml do α-TOC; **FO αTOC 100:** Formulação apenas com α-TOC na concentração de 100 mg/ml; **FO αTOC 75:** Formulação com 75 mg/ml do α-TOC e 25 mg/ml do CNM; **FO SQ:** Formulação controle sem o CNM, α-TOC e quitosana.

A atividade antimicrobiana dos CLN foi avaliada pelo método de microdiluição. A formulação FO SQ (formulação sem os ativos e sem quitosana) não apresentou atividade antimicrobiana. A formulação FO (formulação sem os ativos e com quitosana) inibiu o crescimento das cepas avaliadas a partir da concentração de 64 µg/mL, demonstrando a atividade antimicrobiana da quitosana.

As formulações com os ativos inibiram o crescimento microbiano frente as cepas avaliadas a partir da concentração de 8 µg/mL para o CNM, 6 µg/mL para o α-toc e 8 µg/mL para a quitosana, com CIMs menores quando em conjunto se comparado as formulações com os ativos isolados.

5.4.2.3. Avaliação do efeito de associação do CNM, α-toc e quitosana

Tabela 17. Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) derivado das combinações: CNM + α-TOC; Quitosana + CNM e Quitosana + α-TOC.

Grupos	Substâncias	ICIF <i>S.aureus</i>	ICIF <i>E.coli</i>	ICIF <i>C.albicans</i>
FO C 75	CNM+ α-TOC	0.83 (indiferente)	0.46 (sinérgico)	0.93 (indiferente)
	QT+CNM	0.93 (indiferente)	0.56 (indiferente)	0.84 (indiferente)
	QT+ α-TOC	0.27 (sinérgico)	0.27 (sinérgico)	0.28(sinérgico)
FO 50/50	CNM+ α-TOC	0.68 (indiferente)	0.43 (sinérgico)	0.87 (indiferente)
	QT+CNM	0.68 (indiferente)	0.24 (sinérgico)	0.59 (indiferente)
	QT+ α-TOC	0.37 (sinérgico)	0.37 (sinérgico)	0.46 (sinérgico)
FO α-TOC 75	CNM+ α-TOC	0.17 (sinérgico)	0.27 (sinérgico)	1.1 (indiferente)
	QT+CNM	0.14 (sinérgico)	0.20 (sinérgico)	0.45 (sinérgico)
	QT+ α-TOC	0.15 (sinérgico)	0.31 (sinérgico)	0.87 (indiferente)

Nota: Sinergismo: ICIF ≤ 0,5; Indiferente: 0,5 < ICIF ≤ 4; Antagonismo: > 4.

ICIF: Índice da Concentração Inibitória Fracionada; **QT:** Quitosana; **CNM:** cinamaldeído; **α-TOC:** α-tocoferol; **FO C 100:** Formulação apenas com CNM na concentração de 100 mg/ml; **FO C 75:** Formulação com 75 mg/ml do CNM e 25 mg/ml do α-TOC; **FO 50/50:** Formulação com 50 mg/ml do CNM e 50 mg/ml do α-TOC; **FO αTOC 75:** Formulação com 75 mg/ml do α-TOC e 25 mg/ml do CNM.

As ICIF's variaram de 0.15 a 1.1 (**Tabela 17**). Observou-se que não houve antagonismo em nenhuma associação para nenhum dos grupos. Para *C. albicans*, a quitosana foi quem melhor demonstrou sinergismo com os outros compostos, principalmente com o α-toc. Para a *S. aureus*, essa melhor interação sinérgica da quitosana com α-toc foi observada em todos os grupos, além do sinergismo em todas as combinações do grupo FO α-TOC 75. Para *E. coli*, houve uma atividade sinérgica de todos os compostos em todos os grupos, com exceção

apenas da associação quitosana com CNM para o grupo FO C 100. O fato de na maioria dos casos o sinergismo ser observado em menores concentrações das substâncias avaliadas também é interessante, podendo expressar uma possível relação dose-dependente desses compostos, indicando que essa atividade sinérgica só é observada em concentrações mais baixas. Contudo, ensaio como o *checkboxboard* poderia indicar melhor a concentração limite para observação do sinergismo.

6. DISCUSSÃO

Na análise *in silico* com o *docking* molecular, vê-se que o mesmo se estabelece como uma ferramenta útil e importante no planejamento de novos recursos terapêuticos, provendo a investigação de interações moleculares entre ligante (fármacos) e proteína (receptor), permitindo uma avaliação em relação as propriedades físico-químicas e interações energéticas (88).

Para avaliação de vias inflamatórias, estudos com avaliação de potencial antioxidante, para afinidade com as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e com enzima COX-2 foram encontrados para o CNM, que também demonstraram bons resultados (89–91). A literatura também relata que o α -toc mostrou forte interação com 21 citocinas pró-inflamatórias, demonstrando maior afinidade com o TNF- α e as interleucinas 12 e 23 (IL-12 e IL-23), o que reforça seu potencial anti-inflamatório. Contudo, avaliação dessa natureza para outras vias como as utilizadas nesse estudo, não foram encontradas. Para análise de alvos bacterianos, estudos corroboram a atividade antibacteriana *in silico* do CNM contra *Staphylococcus aureus*(92) e com outras bactérias como *Streptococcus pyogenes* (93) e *Pseudomonas fluorescens* (94).

Encontra-se na literatura a afinidade do CNM por alvos de membrana para células fúngicas (45), por isso, no presente estudo, foram utilizados alvos específicos já descritos em estudos anteriores para caracterização *in silico* e avaliação de seu possível mecanismo de ação por meio dessa análise. Como em estudos anteriores, o CNM demonstrou maior afinidade pelo alvo 5TZI (14 α -desmetilase), que está presente na membrana plasmática de células fúngicas, tendo esse mecanismo de ação também já confirmado em estudos *in vitro* (45).

A CG-EM do CNM demonstrou compostos já tipificados na literatura(93). O CNM, como esperado, foi o principal constituinte do óleo analisado nesse estudo, correspondendo aos relatos sobre a composição química dos óleos essenciais da casca da canela(95), bem como, também foi observado a semelhança nos componentes menores, como os outros compostos aldeídos, o o-Methoxibenzaldeído, p-Propilbenzaldeído e benzaldeído (93,96). Já para o α -toc, em revisão de literatura, não foi encontrado estudos tipificando os compostos

encontrados nas próprias formulações dessa vitamina, geralmente é observada a presença do α -tocoferol, que foi o composto mais abundante no óleo do α -toc, na análise de óleos advindos de plantas e/ou alimentos(97–99).

Em relação as nanocápsulas, a metodologia empregada neste trabalho permitiu o desenvolvimento das mesmas com quitosana aderida à coroa hidrofílica de PEO e carregadas com α -tocoferol no núcleo hidrofóbico de PPO. A incorporação dos ativos foi realizada de forma semelhante a descrita por Coelho-junior et al. (2021)(12), onde o CNM e α -toc foi associado ao PPO do p407, permitindo a encapsulação a partir da incorporação da droga ao núcleo hidrofóbico.

A mucoadesividade de fármacos é fundamentada principalmente na atração eletrostática entre partículas de carga negativa do muco e carga positiva nas partículas (sendo essa carga quantificada por meio do potencial zeta) (20). Vários polímeros vêm sendo explorados para o encapsulamento do e CNM: PLGA (71,100), quitosana/zeína (70), propilenoglicol (101) e polissorbato (10). Em sua grande maioria, nesses estudos (à exceção daqueles onde a quitosana foi utilizada), o potencial zeta resultante foi aniônico (variação de -80mV a -2,8mV), o que pode tornar os sistemas poliméricos desenvolvidos incompatíveis com a mucoadesividade. Apesar do P407 expressar vantagens na formação de nanocápsulas de ativos hidrofóbicos, o seu caráter não-iônico não contribui para a mucoadesividade (12).

Para a obtenção de um potencial zeta positivo nas dispersões de nanocápsulas, o presente estudo incorporou a quitosana para reticulação das nanocápsulas, o que pode ser comprovado pelo potencial zeta neutro, embora o decréscimo desse potencial do grupo controle para o grupo com a incorporação com os ativos possam indicar a não encapsulação total desses fármacos ou a interação da quitosana com outras substâncias da formulação anulando parcialmente sua caticionidade, assim como observado no estudo de Le-Vinh et al. (2020) (102). Ainda assim, esses resultados corroboram os achados de Pepić et al. (2010) (103), que verificaram que o potencial zeta aumenta a caticionidade com a incorporação da quitosana.

Os resultados também evidenciaram que a adição do α -toc e uma maior quantidade do CNM nas nanocápsulas corroborou com a diminuição do tamanho das partículas, o que não é observado em estudos como o de Alexander *et al.*

(2012)(104) foi verificado que a adição de uma droga hidrofóbica gerou um aumento no tamanho das partículas.

No que diz respeito a temperatura e tempo para transição sol-gel, foi observado que com o aumento da concentração do ativo houve uma diminuição na temperatura e no tempo de transição, esses resultados são corroborados com os encontrados no estudo de Sguizzato et al. (2020) (105), que também encontraram essa proporção inversa nas variáveis: concentração do ativo e temperatura/tempo de transição sol gel.

Em geral, os géis para aplicação em mucosas, devem apresentar temperatura $T_{sol-gel}$ próximo a temperatura corporal ($37^{\circ}C$) em um tempo $T_{sol-gel}$ curto e permanecer em forma de solução quando armazenados à temperatura ambiente ($25^{\circ}C$) (77). No presente estudo, os géis apresentaram transição de fase em temperaturas entre $20^{\circ}C$ e $30^{\circ}C$ e permaneceram em forma de solução quando armazenados à temperatura ambiente pelo tempo que variou entre 15.9 a 47.27 s, esses resultados podem demonstrar que à temperatura ambiente algumas dispersões podem se transformar em gel, levando a dificuldades na fabricação, manipulação e administração, porém garante a transição fase sol-gel em temperatura corporal.

Observa-se também que as mudanças nos valores de pH das formulações no período de 7 e 15 dias foram menores que 2% em todas os meios de armazenagem. De acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária(106), variações de valores de pH acima de 10% são tidas como não-conformes, caracterizando falta de estabilidade no período de armazenamento ou tempo de prateleira. Portanto, as variações de pH observadas nas formulações, no período supracitado, englobam os valores preconizados como conformes.

Na reologia o comportamento pseudoplástico das amostras foi observado, onde a viscosidade se mostra maior à baixas frequências e diminui bruscamente até atingir a estabilidade em frequências maiores, o que em sistemas poliméricos pode ser explicado pela orientação dos emaranhados moleculares no sentido do esforço (107). Tal comportamento é benéfico para aplicações médicas, visto que o esforço exercido durante a administração clínica reduziria a viscosidade do gel facilitando seu espalhamento sobre a superfície desejada (108).

Os resultados também indicam que as substâncias em conjunto funcionam como empecilho ao movimento molecular, impedindo sua organização e dificultando o fluxo, enquanto o CNM sozinho diminui a viscosidade do sistema, possivelmente devido a expulsão do solvente da interface molecular polimérica para camadas mais externas, diminuindo o atrito com as placas e por conseguinte a viscosidade (109,110).

Viu-se ainda que o grupo sem os ativos incorporados (GC), apresenta alta T_g em temperatura ambiente e gelificação em torno de 32 °C, ou seja, o sistema passa de um estado líquido viscoso para gel de característica predominante elástica, o que está de acordo com o esperado da blenda poloxamer-quitosana, visto que o poloxamer é termossensível (apresenta transição sol-gel em resposta a temperatura) e a quitosana tende a diminuir a temperatura de gelificação do conjunto, que aconteceria à 37 °C (111).

Os ativos encapsulados pelas nanocápsulas demonstraram uma melhor atividade antimicrobiana quando comparado aos ativos não encapsulados, apresentando menores valores de CIM. Esse comportamento pode ser devido à liberação controlada dos fármacos proporcionado pela encapsulação dos mesmos, aumentando sua biodisponibilidade devido a formação de uma barreira funcional que protege os ativos de reações químicas e corroborando com a manutenção de suas características físico-químicas, permitindo um acréscimo na proporção dos compostos antimicrobianos de sua composição que poderiam ser perdidos com facilidade se não estivessem protegidos, isso devido a fatores como a sensibilidade à luz, oxidação ou hidrólise, além de demonstrar um aumento da penetrância de compostos ativos, bem como, direcionamento de fármacos na pele e mucosa ou mesmo em subestruturas, como células microbianas (64,69,112,113).

Em relação aos CLN, a metodologia proposta também permitiu o desenvolvimento desse nanossistema de forma otimizada, isso através do delineamento do tipo Box-Behnken.

Foi visto através do Box-Behnken que a quitosana e o precirol foram as variáveis independentes que mais influenciaram no desfecho do aumento do tamanho das partículas. Esse aumento devido a presença da quitosana pode ser em decorrência da mesma se tratar de um polímero de cadeias longas e de maior peso molecular, além disso, a mesma pode promover a formação de partículas

maiores e agregados a partir de interações com outras substâncias das soluções (9,114). No que diz respeito ao precirol, estudos relataram que o aumento na concentração do mesmo corroborou com tamanho de partículas maiores em CLN quando comparados ao seu uso nanopartículas lipídicas sólidas(115,116).

Em relação a presença da quitosana, a mesma alterou os valores do potencial zeta os tornando catiônicos, demonstrando que o processo de reticulação dos CLN foi satisfatório. A mudança no potencial zeta se dá em decorrência da natureza catiônica da quitosana. As características mucoadesivas da mesma se fundamentam na interação entre a carga positiva da quitosana, principalmente pela presença dos grupos aminas em sua estrutura química, e a negativa do ácido siálico da mucina, logo, como consequência, ocorre o aumento no tempo de permanência do fármaco na mucosa O resultado corrobora os achados de Xavier-Júnior et al. (2018) (117); Bonferoni *et al.* (2018) (118); Singh *et al.* (2017) (119) (+4,72 a +14,07mV) e Kesavan *et al.* (2013) (101) (+20,3 a +26,4mV) que apresentaram valores positivos devido a adição da quitosana.

Com o desenvolvimento dos CLN otimizados de α -toc e CNM, foi observado que o aumento da concentração do α -toc nos CLN otimizados corroborou com a diminuição do tamanho das partículas. Esse decréscimo no diâmetro das partículas pode ser em decorrência do que foi observado por Saez, Souza, Mansur (2018)(9) que realizaram uma revisão de literatura abrangente a cerca do encapsulamento do α -toc em nanopartículas lipídicas e indicaram sua excelente compatibilidade com diversos sistemas lipídicos, apresentando melhor compactação e conformação na matriz desses sistemas, corroborando com a diminuição do tamanho das partículas.

Já se tratando da concentração do CNM, o estudo de Alexander *et al.* (2012)(104), corrobora com os resultados encontrados nesse trabalho, visto que os autores verificaram que a adição de uma droga hidrofóbica gera um aumento no tamanho das partículas, assim como observado com a adição do CNM, onde aumento da sua concentração levou a um acréscimo no tamanho das partículas.

Os CLN otimizados de α -toc e CNM também apresentaram potencial zeta catiônico (+32.7 – +41.2), o que pode prover a mucoadesão desse sistema, visto que em estudos como o de Luo et al. (2011) (70), os autores reforçam a mucoadesividade devido a presença da carga superficial positiva das partículas que irão se atrair eletrostaticamente as moléculas de carga negativa de mucosas.

Os mesmos relataram que com a presença da quitosana reticulando seu nanossistema, o potencial zeta se tornou catiônico, apresentando mucoadesividade e capacidade de abertura transitória das junções intercelulares epiteliais em decorrência do potencial elétrico de superfície positivo de suas nanopartículas, o que também pode corroborar com o aumento na penetração das nanopartículas no tecido alvo.

Os ativos encapsulados nos CLN, assim como as nanocápsulas, apresentaram uma melhor atividade antimicrobiana quando comparados aos ativos não encapsulados. Um fato observado nesse sistema foi que o α -toc, a quitosana e o CNM demonstraram atividade antimicrobiana sinérgica. Em relação ao CNM, estudos como o de Gadkari et al. (2019) relatam seu sinergismo com a quitosana e a redução dos valores de CIM quando comparado aos dois ativos encapsulados isoladamente.

Já se tratando do α -toc, em estudos anteriores que objetivavam analisar a possibilidade do uso de vitaminas como alvos antifúngicos foi visto que o α -toc não poderia ser elencado como um, visto que o mesmo não é sintetizado por fungos, logo, a possibilidade de apresentar atividade antagônica a outros compostos antifúngicos seria baixa(120). Porém, em estudo realizado com composto que apresentava atividade antifúngica apenas na presença de estresse oxidativo, foi visto que o α -toc foi antagônico devido sua ação antioxidante, protegendo a função mitocondrial desse estresse, o que contraria os resultados observados no presente estudo, onde o α -toc aparentemente foi sinérgico a quitosana e ao CNM, talvez pelo fato do CNM apresentar seu mecanismo de ação em membrana celular, interferindo na síntese do ergosterol e a quitosana age prejudicando a integridade da arquitetura da superfície celular e a biossíntese de proteínas, mecanismos que independeriam do estresse oxidativo (45,121,122).

Já em relação a atividade antimicrobiana, foi visto no estudo de Ng et al. (2013) (123), que polímeros incorporados com α -toc aumentaram significativamente a atividade antimicrobiana de antibióticos comerciais contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, demonstrando também boa seletividade em relação a bactérias sobre células de mamíferos. Os autores também relatam que essa associação aumenta a permeabilidade da membrana celular bacteriana, bem como, produzem poros em sua estrutura, facilitando assim a penetração dos compostos antibióticos, resultando na morte das

bactérias em concentrações significativamente abaixo das concentrações bactericidas mínimas, tanto do α -toc quanto dos antibióticos. Logo, os autores relatam que essas combinações sinérgicas podem fornecer uma maneira promissora de combater a resistência a múltiplas drogas. Portanto, esses sistemas de encapsulação funcionalizados com α -toc em conjunto com compostos que também possuem atividade antimicrobiana bem estabelecida como o CNM (46) e quitosana (124), são agentes antimicrobianos potencialmente úteis contra infecções desafiadoras.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho observou que foi possível desenvolver as formulações combinadas de forma satisfatória para aplicação bucal. A análise *in silico* demonstrou uma predição de afinidade do CNM e α -toc para todos os alvos avaliados, aumentando a probabilidade de êxito nas atividades anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana. Desenvolveu-se dois novos métodos para o encapsulamento de CNM e α -toc, em nanocápsulas e em CLN. Ambos demonstraram partículas dentro da escala nanométrica e atividade antimicrobiana *in vitro*.

Com isso, vê-se que os sistemas apresentaram boas características, porém, os CLN tem seu uso visto como mais promissor em mucosa oral, em decorrência do alto valor catiônico e da melhor estabilidade do potencial zeta após a incorporação dos fármacos, além dos bons valores de CIMs e ao sinergismo dos compostos, assim como, pela maior facilidade de produção. Contudo, testes de citotoxicidade, avaliação da estabilidade dessas formulações em um veículo e sua aplicação em modelo *in vivo*, ainda precisam ser realizados para posterior aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

1. Lombardi A, Ouanounou A. Fungal infections in dentistry: Clinical presentations, diagnosis, and treatment alternatives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020;130(5):533–46.
2. Konkel JE, O’Boyle C, Krishnan S. Distal consequences of oral inflammation. *Front Immunol.* 2019;10:1403.
3. Zhu R, Liu H, Liu C, Wang L, Ma R, Chen B, et al. Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. *Pharmacol Res.* 2017;122:78–89.
4. da Nóbrega Alves D, Melo AKV, Alves AF, de Araújo MRC, da Silva Araújo R, de Castro RD. Safety and tolerability of cinnamaldehyde in orabase for oral candidiasis treatment: phase I clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2022;1–9.
5. Chung J-W, Kim J-J, Kim S-J. Antioxidative effects of cinnamomi cortex: A potential role of iNOS and COX-II. *Pharmacogn Mag.* 2011;7(28):314.
6. Mollazadeh H, Hosseinzadeh H. Cinnamon effects on metabolic syndrome: a review based on its mechanisms. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(12):1258.
7. Bakar A, Yao P-C, Ningrum V, Liu C-T, Lee S-C. Beneficial biological activities of *Cinnamomum osmophloeum* and its potential use in the alleviation of oral mucositis: A systematic review. *Biomedicines.* 2020;8(1):3.
8. Cuba L de F. Aplicação tópica de Aloe vera e vitamina E em úlceras induzidas na língua de ratas submetidas à radioterapia: avaliação clínica e histológica. 2015;
9. Saez V, Souza IDL, Mansur CRE. Lipid nanoparticles (SLN & NLC) for delivery of vitamin E: A comprehensive review. *Int J Cosmet Sci.* 2018;40(2):103–16.

10. Caddeo C, Manca ML, Peris JE, Usach I, Diez-Sales O, Matos M, et al. Tocopherol-loaded transfersomes: In vitro antioxidant activity and efficacy in skin regeneration. *Int J Pharm.* 2018;551(1–2):34–41.
11. Sigurdsson HH, Kirch J, Lehr C-M. Mucus as a barrier to lipophilic drugs. *Int J Pharm.* 2013;453(1):56–64.
12. de C Coelho Junior É, Maciel PP, de AF Muniz I, Silva HYR, de Sousa SA, Valença AMG, et al. Poloxamer 407/chitosan micelles can improve α -Tocopherol effect on oral keratinocytes proliferation. *J Mater Res.* 2021;36(7):1447–55.
13. Almeida M, Magalhães M, Veiga F, Figueiras A. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *J Polym Res.* 2018;25(1):1–14.
14. Ci L, Huang Z, Liu Y, Liu Z, Wei G, Lu W. Amino-functionalized poloxamer 407 with both mucoadhesive and thermosensitive properties: preparation, characterization and application in a vaginal drug delivery system. *Acta Pharm Sin B.* 2017;7(5):593–602.
15. Leyva-Gómez G, Santillan-Reyes E, Lima E, Madrid-Martínez A, Krötzsch E, Quintanar-Guerrero D, et al. A novel hydrogel of poloxamer 407 and chitosan obtained by gamma irradiation exhibits physicochemical properties for wound management. *Mater Sci Eng C.* 2017;74:36–46.
16. Vieira MV, Derner RB, Lemos-Senna E. Preparation and characterization of *Haematococcus pluvialis* carotenoid-loaded PLGA nanocapsules in a gel system with antioxidant properties for topical application. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021;61:102099.
17. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological

- preparations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54:S131–55.
18. Eid HM, Ali AA, Ali AMA, Eissa EM, Hassan RM, Abo El-Ela FI, et al. Potential use of tailored citicoline chitosan-coated liposomes for effective wound healing in diabetic rat model. *Int J Nanomedicine.* 2022;555–75.
 19. Chaudhari VS, Gawali B, Saha P, Naidu VGM, Murty US, Banerjee S. Quercetin and piperine enriched nanostructured lipid carriers (NLCs) to improve apoptosis in oral squamous cellular carcinoma (FaDu cells) with improved biodistribution profile. *Eur J Pharmacol.* 2021;909:174400.
 20. Mendes AA, Oliveira PC de, Castro HF de, Giordano R de LC. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quim Nova.* 2011;34:831–40.
 21. Wu Z, Tang S, Deng W, Luo J, Wang X. Antibacterial chitosan composite films with food-inspired carbon spheres immobilized AgNPs. *Food Chem.* 2021;363:130342.
 22. Teoh L, Stewart K, Marino R, McCullough M. Antibiotic resistance and relevance to general dental practice in Australia. *Aust Dent J.* 2018;63(4):414–21.
 23. Aidasani B, Solanki M, Khetarpal S. Antibiotics: their use and misuse in paediatric dentistry. A systematic review. *Eur J Paediatr Dent.* 2019;20(2):133–8.
 24. Hokken MWJ, Zwaan BJ, Melchers WJG, Verweij PE. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. *Fungal Genet Biol.* 2019;132:103254.
 25. Geddes-McAlister J, Shapiro RS. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1435(1):57–78.

26. Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, et al. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chin Med*. 2019;14(1):1–17.
27. Bendich A, Machlin LJ. Safety of oral intake of vitamin E. *Am J Clin Nutr*. 1988;48(3):612–9.
28. Lee GY, Han SN. The role of vitamin E in immunity. *Nutrients*. 2018;10(11):1614.
29. Dobrovolny J, Smrcka M, Bienertova-Vasku J. Therapeutic potential of vitamin E and its derivatives in traumatic brain injury-associated dementia. *Neurol Sci*. 2018;39(6):989–98.
30. Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gougerot-Pocidallo MA, Leger CL. alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem*. 1998 Dec;273(49):32801–5.
31. Tan PH, Sagoo P, Chan C, Yates JB, Campbell J, Beutelspacher SC, et al. Inhibition of NF- κ B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *J Immunol*. 2005;174(12):7633–44.
32. Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Nuclear factor- κ B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1511–20.
33. Ekstrand-Hammarström B, Österlund C, Lilliehöök B, Bucht A. Vitamin E down-modulates mitogen-activated protein kinases, nuclear factor- κ B and inflammatory responses in lung epithelial cells. *Clin Exp Immunol*.

2007;147(2):359–69.

34. Takano H, Momota Y, Kani K, Aota K, Yamamura Y, Yamanoi T, et al. γ -tocotrienol prevents 5-FU-induced reactive oxygen species production in human oral keratinocytes through the stabilization of 5-FU-induced activation of Nrf2. *Int J Oncol*. 2015;46(4):1453–60.
35. Wang R, Li S, Jia H, Si X, Lei Y, Lyu J, et al. Protective effects of cinnamaldehyde on the inflammatory response, oxidative stress, and apoptosis in liver of *Salmonella typhimurium*-challenged mice. *Molecules*. 2021;26(8):2309.
36. Wu J, Zhong W, Chen Z, Zhu B, Jiang Y, Wierzbicki PM. The protective impact of trans-cinnamaldehyde (TCA) against the IL-1b induced inflammation in in vitro osteoarthritis model by regulating PI3K/AKT pathways. *Folia Histochem Cytobiol*. 2020;58(4):264–71.
37. Kim ME, Na JY, Lee JS. Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2018;40(3):219–24.
38. Kim N-Y, Ahn S-G, Kim S-A. Cinnamaldehyde protects human dental pulp cells against oxidative stress through the Nrf2/HO-1-dependent antioxidant response. *Eur J Pharmacol*. 2017;815:73–9.
39. Yang G, Jin T, Yin S, Guo D, Zhang C, Xia X, et al. trans-Cinnamaldehyde mitigated intestinal inflammation induced by *Cronobacter sakazakii* in newborn mice. *Food Funct*. 2019;10(5):2986–96.
40. Ding Z, Liu J, Qian H, Wu L, Lv M. Cinnamaldehyde inhibits psoriasis-like inflammation by suppressing proliferation and inflammatory response of keratinocytes via inhibition of NF- κ B and JNK signaling pathways. *Mol Med Rep*. 2021;24(3):1–9.

41. Molania T, Malekzadeh Shafaroudi A, Saeedi M, Moosazadeh M, Valipour F, Rostamkalaei SS, et al. Evaluation of cinnamaldehyde mucoadhesive patches on minor recurrent aphthous stomatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *BMC Oral Health*. 2022;22(1):1–7.
42. Gunawardena D, Karunaweera N, Lee S, van Der Kooy F, Harman DG, Raju R, et al. Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts—identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. *Food Funct*. 2015;6(3):910–9.
43. Molania T, Moghadamnia AA, Pouramir M, Aghel S, Moslemi D, Ghassemi L, et al. The effect of Cinnamaldehyde on mucositis and salivary antioxidant capacity in gamma-irradiated rats (a preliminary study). *DARU J Pharm Sci*. 2012;20(1):1–5.
44. Shreaz S, Sheikh RA, Rimple B, Hashmi AA, Nikhat M, Khan LA. Anticandidal activity of cinnamaldehyde, its ligand and Ni (II) complex: Effect of increase in ring and side chain. *Microb Pathog*. 2010;49(3):75–82.
45. da Nóbrega Alves D, Monteiro AFM, Andrade PN, Lazarini JG, Abílio GMF, Guerra FQS, et al. Docking prediction, antifungal activity, anti-biofilm effects on *Candida* spp., and toxicity against human cells of cinnamaldehyde. *Molecules*. 2020;25(24):5969.
46. Doyle AA, Stephens JC. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*. 2019;139:104405.
47. Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*. 2015;54:111–9.
48. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 2013;6(12):1451–74.

49. Friedman M. Chemistry, antimicrobial mechanisms, and antibiotic activities of cinnamaldehyde against pathogenic bacteria in animal feeds and human foods. *J Agric Food Chem.* 2017;65(48):10406–23.
50. Rao PV, Gan SH. Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2014;2014.
51. Ye H, Shen S, Xu J, Lin S, Yuan Y, Jones GS. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control.* 2013;34(2):619–23.
52. Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog.* 2018;120:198–203.
53. Silva LN, Zimmer KR, Macedo AJ, Trentin DS. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chem Rev.* 2016;116(16):9162–236.
54. Gupta M, Agrawal U, Vyas SP. Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases. *Expert Opin Drug Deliv.* 2012;9(7):783–804.
55. Murphy EC, Schaffter SW, Friedman AJ. Nanotechnology for psoriasis therapy. *Curr Dermatol Rep.* 2019;8(1):14–25.
56. Klaypradit W, Huang Y-W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT-Food Sci Technol.* 2008;41(6):1133–9.
57. Assis LM de, Zavareze E da R, Prentice-Hernández C, Souza-Soares LA de. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian J Food Technol.* 2012;15:99–109.
58. Miyata K, Christie RJ, Kataoka K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *React Funct Polym.* 2011;71(3):227–34.
59. Yokoyama M. Clinical applications of polymeric micelle carrier systems in

- chemotherapy and image diagnosis of solid tumors. *J Exp Clin Med*. 2011;3(4):151–8.
60. Bodratti A, Alexandridis P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *J Funct Biomater*. 2018 Jan;9(1):11.
 61. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*. 2006;23(12):2709–28.
 62. Beloqui A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Prát V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2016;12(1):143–61.
 63. Weber S, Zimmer A, Pardeike J. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;86(1):7–22.
 64. Müller RH, Petersen RD, Hommos A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(6):522–30.
 65. Elmowafy M, Al-Sanea MM. Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies. *Saudi Pharm J*. 2021;29(9):999–1012.
 66. López-García R, Ganem-Rondero A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): occlusive effect and penetration enhancement ability. *J Cosmet Dermatological Sci Appl*. 2015;5(02):62.
 67. Iqbal MA, Md S, Sahni JK, Baboota S, Dang S, Ali J. Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery. *J Drug Target*. 2012;20(10):813–30.

68. Pardeike J, Schwabe K, Müller RH. Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect. *Int J Pharm.* 2010;396(1–2):166–73.
69. Katopodi A, Detsi A. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2021;630:127529.
70. Luo Y, Zhang B, Whent M, Yu LL, Wang Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011;85(2):145–52.
71. Gomes C, Moreira RG, Castell-Perez E. Poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. *J Food Sci.* 2011;76(2):N16–24.
72. Gadkari RR, Suwalka S, Yogi MR, Ali W, Das A, Alagirusamy R. Green synthesis of chitosan-cinnamaldehyde cross-linked nanoparticles: Characterization and antibacterial activity. *Carbohydr Polym.* 2019;226:115298.
73. Liu Q, Cui H, Muhoza B, Duhoranimana E, Xia S, Hayat K, et al. Fabrication of low environment-sensitive nanoparticles for cinnamaldehyde encapsulation by heat-induced gelation method. *Food Hydrocoll.* 2020;105:105789.
74. Rivas da Silva AC, Lopes PM, Barros de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules.* 2012;17(6):6305–16.
75. Varenne F, Botton J, Merlet C, Hillaireau H, Legrand F-X, Barratt G, et al.

- Size of monodispersed nanomaterials evaluated by dynamic light scattering: Protocol validated for measurements of 60 and 203 nm diameter nanomaterials is now extended to 100 and 400 nm. *Int J Pharm.* 2016;515(1–2):245–53.
76. Varenne F, Botton J, Merlet C, Vachon J-J, Geiger S, Infante IC, et al. Standardization and validation of a protocol of zeta potential measurements by electrophoretic light scattering for nanomaterial characterization. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2015;486:218–31.
77. Sharma G, Kamboj S, Thakur K, Negi P, Raza K, Katare OP. Delivery of thermoresponsive-tailored mixed micellar nanogel of lidocaine and prilocaine with improved dermatokinetic profile and therapeutic efficacy in topical anaesthesia. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(3):790–802.
78. de Lima CSA, Varca JPRO, Alves VM, Nogueira KM, Cruz CPC, Rial-Hermida MI, et al. Mucoadhesive Polymers and Their Applications in Drug Delivery Systems for the Treatment of Bladder Cancer. *Gels.* 2022;8(9):587.
79. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2 ed. 2002.
80. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard. 5 ed. 2012.
81. Deswal DP, Chand U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. *Seed Sci Technol.* 1997;25(3):409–17.
82. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(1):1.
83. Shin S. Anti-Aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. *Arch Pharm Res.*

2003;26(5):389–93.

84. He J, Shi H, Huang S, Han L, Zhang W, Zhong Q. Core-shell nanoencapsulation of α -tocopherol by blending sodium oleate and rebaudioside A: Preparation, characterization, and antioxidant activity. *Molecules*. 2018;23(12):3183.
85. Cao C, Xu L, Xie P, Hu J, Qi J, Zhou Y, et al. The Characterization and Evaluation of the Synthesis of Large-ring Cyclodextrins (CD 9–CD 22) and α -tocopherol with Enhanced Thermal Stability. *RSC Adv*. 2020;10(11):6584–91.
86. Prathibha R, Bhanuprakash P, Jyothi NV V, Sivakumar K. Study of excess thermodynamic properties of binary systems containing cinnamaldehyde with alcohols supported by ATR-FTIR spectral studies. *Chem Data Collect*. 2019;19:100184.
87. Zhang Y, Tan Y, Reymick OO, Ouyang Q, Tao N. γ -Cyclodextrin-Encapsulated Cinnamaldehyde for Citrus Preservation and Its Potential Mechanisms against *Penicillium digitatum*. *J Fungi*. 2022;8(11):1199.
88. Medeiros Filho FC, dos Santos Nascimento K, Santos WO, Frazão NF. Estudo Da Inibição Da Acetilcolinesterase Por Docking Molecular: Aplicação No Tratamento Da Doença Do Alzheimer. *Educ Ciência E Saúde*. 2020;7(2):18.
89. Ormachea C, Ferretti CA. In Silico Evaluation of Antioxidant Properties of Cinnamaldehyde Phenylhydrazone. *Chem Proc*. 2021;8(1):10.
90. Patil VM, Anand P, Bhardwaj M, Masand N. Cinnamaldehyde Analogs: Docking Based Optimization, COX-2 Inhibitory In Vivo and In Vitro Studies. *Curr Drug Discov Technol*. 2020;17(2):154–65.
91. Mateen S, Rehman MT, Shahzad S, Naeem SS, Faizy AF, Khan AQ, et al.

- Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of cinnamaldehyde and eugenol on mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *Eur J Pharmacol.* 2019;852:14–24.
92. da Cunha Xavier J, de Freitas TS, da Silva PT, Coutinho HDM, Teixeira AMR, Rodrigues LG, et al. Antibacterial Activity Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and in Silico Evaluation of MepA Efflux Pump by Cinnamaldehyde Chalcone. 2021.
 93. Huang Z, Pang D, Liao S, Zou Y, Zhou P, Li E, et al. Synergistic effects of cinnamaldehyde and cinnamic acid in cinnamon essential oil against *S. pullorum*. *Ind Crops Prod.* 2021;162:113296.
 94. Beema Shafreen RM, Selvaraj C, Singh SK, Karutha Pandian S. In silico and in vitro studies of cinnamaldehyde and their derivatives against LuxS in *Streptococcus pyogenes*: effects on biofilm and virulence genes. *J Mol Recognit.* 2014;27(2):106–16.
 95. Wang R, Wang R, Yang B. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2009;10(2):289–92.
 96. Lee S-C, Xu W-X, Lin L-Y, Yang J-J, Liu C-T. Chemical composition and hypoglycemic and pancreas-protective effect of leaf essential oil from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum* Kanehira). *J Agric Food Chem.* 2013;61(20):4905–13.
 97. Ballesteros-Vivas D, Álvarez-Rivera G, Ibáñez E, Parada-Alfonso F, Cifuentes A. A multi-analytical platform based on pressurized-liquid extraction, in vitro assays and liquid chromatography/gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for food by-products valorisation. Part 2: Characterization of bioactive compound. *J Chromatogr A.* 2019;1584:144–54.

98. Dhiman A. Gas chromatography-mass spectroscopy analysis of bioactive compounds in the whole plant parts of ethanolic extract of *Asclepias Curassavica* L. *Int J Green Pharm.* 2018;12(02).
99. Lu D, Yang Y, Sun C, Wang S. Determination of tocopherols and tocotrienols in cereals and nuts by dispersive solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Methods.* 2019;11(42):5439–46.
100. Zigoneanu IG, Astete CE, Sabliov CM. Nanoparticles with entrapped α -tocopherol: synthesis, characterization, and controlled release. *Nanotechnology.* 2008;19(10):105606.
101. Kesavan K, Kant S, Singh PN, Pandit JK. Mucoadhesive chitosan-coated cationic microemulsion of dexamethasone for ocular delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Curr Eye Res.* 2013;38(3):342–52.
102. Le-Vinh B, Le N-MN, Nazir I, Matuszczak B, Bernkop-Schnürch A. Chitosan based micelle with zeta potential changing property for effective mucosal drug delivery. *Int J Biol Macromol.* 2019;133:647–55.
103. Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Pirkić B, Filipović-Grcčić J. A nonionic surfactant/chitosan micelle system in an innovative eye drop formulation. *J Pharm Sci.* 2010;99(10):4317–25.
104. Alexander S, Cosgrove T, Castle TC, Grillo I, Prescott SW. Effect of temperature, cosolvent, and added drug on pluronic–flurbiprofen micellization. *J Phys Chem B.* 2012;116(37):11545–51.
105. Sguizzato M, Valacchi G, Pecorelli A, Boldrini P, Simelière F, Huang N, et al. Gallic acid loaded poloxamer gel as new adjuvant strategy for melanoma: A preliminary study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2020;185:110613.
106. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de

Estabilidade de Produtos Cosméticos. 1° ed. Anvisa, editor. Brasília; 2004.

107. Shafiee A, Kehtari M, Zarei Z, Soleimani M, Varshochian R, Ahmadi A, et al. An in situ hydrogel-forming scaffold loaded by PLGA microspheres containing carbon nanotube as a suitable niche for neural differentiation. *Mater Sci Eng C*. 2021;120:111739.
108. Ferreira SB de S. A utilização das análises mecânicas e reológicas no desenvolvimento de sistemas bioadesivos termorresponsivos. Universidade Estadual de Maringá; 2015.
109. Cui H, Tang C, Wu S, McClements DJ, Liu S, Li B, et al. Fabrication of chitosan-cinnamaldehyde-glycerol monolaurate bigels with dual gelling effects and application as cream analogs. *Food Chem*. 2022;384:132589.
110. Liao Y, Sun Y, Wang Z, Zhong M, Li R, Yan S, et al. Structure, rheology, and functionality of emulsion-filled gels: Effect of various oil body concentrations and interfacial compositions. *Food Chem X*. 2022;16:100509.
111. Ur-Rehman T, Tavelin S, Gröbner G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *Int J Pharm*. 2011;409(1–2):19–29.
112. Esmaeili A, Asgari A. In vitro release and biological activities of *Carum copticum* essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2015;81:283–90.
113. Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, et al. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Compr Rev food Sci food Saf*. 2016;15(1):143–82.
114. Furtado GTF da S, Fideles TB, Cruz R de CAL, Souza JW de L, Rodriguez Barbero MA, Fook MVL. Chitosan/NaF particles prepared via ionotropic gelation: evaluation of particles size and morphology. *Mater Res*. 2018;21.

115. Fang Y-P, Lin Y-K, Su Y-H, Fang J-Y. Tryptanthrin-loaded nanoparticles for delivery into cultured human breast cancer cells, MCF7: the effects of solid lipid/liquid lipid ratios in the inner core. *Chem Pharm Bull.* 2011;59(2):266–71.
116. Pathak P, Nagarsenker M. Formulation and evaluation of lidocaine lipid nanosystems for dermal delivery. *Aaps Pharmscitech.* 2009;10(3):985–92.
117. Xavier-Junior FH, do Egito EST, do Vale Morais AR, do Nascimento Alencar E, Maciuk A, Vauthier C. Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly (isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating copaiba oil. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2018;536:251–8.
118. Bonferoni MC, Riva F, Invernizzi A, Delleria E, Sandri G, Rossi S, et al. Alpha tocopherol loaded chitosan oleate nanoemulsions for wound healing. Evaluation on cell lines and ex vivo human biopsies, and stabilization in spray dried Trojan microparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;123:31–41.
119. Singh PK, Pawar VK, Jaiswal AK, Singh Y, Srikanth CH, Chaurasia M, et al. Chitosan coated PluronicF127 micelles for effective delivery of Amphotericin B in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Biol Macromol.* 2017;105:1220–31.
120. Meir Z, Osherov N. Vitamin biosynthesis as an antifungal target. *J Fungi.* 2018;4(2):72.
121. Sun L, Ye X, Ding D, Liao K. Opposite effects of vitamin C and vitamin E on the antifungal activity of honokiol. 2019; 29(4): 538-547.
122. Meng D, Garba B, Ren Y, Yao M, Xia X, Li M, et al. Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action. *Int J Biol Macromol.* 2020;158:1063–70.

123. Ng VWL, Ke X, Lee ALZ, Hedrick JL, Yang YY. Synergistic co-delivery of membrane-disrupting polymers with commercial antibiotics against highly opportunistic bacteria. *Adv Mater.* 2013;25(46):6730–6.
124. Li J, Zhuang S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *Eur Polym J.* 2020;138:109984.