

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA EM  
NANOCOMPÓSITO DE MAGNETITA E QUITOSANA”**

Ana Paula Pais Mendes\*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM QUÍMICA, área de concentração: FÍSICO-QUÍMICA.

**Orientador: Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo**

\* bolsista CNPq

**São Carlos - SP**

**2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ana Paula Pais Mendes, realizada em 03/04/2019:

---

Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo  
UFSCar

---

Profa. Dra. Flérica Adad Ricci Donato  
UNIARA

---

Profa. Dra. Thayse Yumi Hosida  
FOA/UNESP

***“If you can dream it, you can do it.”***

Walt Disney

## DEDICATÓRIA

Dedico, em primeiro lugar, aos meus pais, Julio e Cristina, que são a minha base, minha fonte de força e inspiração. Por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todos os sonhos e em todas as decisões que já tomei. Obrigada por abdicarem tanto em suas próprias vidas por mim. Ainda tenho tanto para retribuir!

À minha família, sempre presente, unida e cheia de amor. Em especial à minha prima Márcia, minha primeira melhor amiga e a irmã que nunca tive.

Aos amigos do grupo de pesquisa, Chico, Andressa, Renata, Lucas, Pati, Sara e Gorup, obrigada por terem me recebido tão bem e por terem me ensinado tanto, vocês são pessoas e profissionais fantásticos, uma fonte de inspiração. Desejo todo o sucesso do mundo para vocês! Em especial, Chico, serei eternamente grata pela sua amizade e por tudo que fez por mim.

Aos amigos do projeto social mais incrível de São Carlos, Operação Natal. Obrigada pela amizade, pelos momentos de aprendizado e crescimento, pelos momentos de felicidade e, principalmente, por me mostrarem que muitos corações bons ainda existem espalhados por aí, prontos para fazerem a diferença no mundo. Em especial, à Keké, obrigada por ser a melhor dupla, uma amiga querida e por quebrar tantos galhos!

À Cris, minha amiga de tantos anos, obrigada pelos conselhos, ombro amigo e tantas lembranças boas. Torço tanto por você!

À Isa, mesmo distante tão presente. Obrigada pelos anos de amizade e por dividir tantos momentos bons comigo!

*Dedico a todos que sempre estiveram ao meu  
lado e me apoiaram incondicionalmente.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Emerson por toda a força, conselhos, conversas e aprendizados desde a graduação.

Ao LIEC (Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica) pela infraestrutura disponibilizada.

Ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ/UFSCar) pela oportunidade de cursar meu Mestrado.

Ao Departamento de Química (DQ/UFSCar)

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudos.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos 2015/13958-3 e 2013/07296-2.

Ao CEPID/CDMF (Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais).

À UFSCar (Universidade Federal de São Carlos) que, desde a graduação, me permitiu realizar tantos sonhos!

A todos que, de alguma forma, me ajudaram a chegar até aqui.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – Descrição do Mecanismo em função do expoente .....	25
TABELA 2.2 - Valores de concentração inibitória mínima para as nanopartículas de óxido de ferro, quitosana, clorexidina e do nanosistema para cada cepa <sup>34</sup> . .....	31
TABELA 4.1 - Fórmula química, fabricante e grau de pureza dos reagentes utilizados.....	34
TABELA 4.2 - Marca e modelo dos equipamentos utilizados.....	35
TABELA 4.3 - Identificação e concentração dos Nanocompósitos. ....	36
TABELA 5.1 - Porcentagens de absorção de clorexidina pelo nanocompósito. ....	48

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Representação tridimensional da estrutura da magnetita. (NADOLL, 2014).....	14
FIGURA 2.2 - Representação da estrutura da quitina e da quitosana. Reação e desacetilação. Adaptada de RODRIGUES, 2016 <sup>17</sup> .....	17
FIGURA 2.3 - Representação das curvas de formas farmacêuticas de liberação de medicamento <sup>18</sup> .....	19
FIGURA 2.4 - Estrutura do fármaco clorexidina.....	29
FIGURA 5.1 - Padrões de DRX obtidos para as nanopartículas de óxido de ferro puras (IONPs), para o nanocompósito (IONPs-CS) e para o nanocompósito com clorexidina (IONPs-CS-CLX).....	40
FIGURA 5. 2- Espectros de IV obtidos para obtidos para as nanopartículas de óxido de ferro puras (IONPs), para o nanocompósito (IONPs-CS) e para o nanocompósito com clorexidina (IONPs-CS-CLX).....	41
FIGURA 5.3 - Imagem obtida através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da magnetita pura (IONPs). ....	42
FIGURA 5.4 - Imagem obtida através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) do nanocompósito puro (IONPs-CS) nas proporções 1:1 (Magnetita:Quitosana) e 1:10.....	43
FIGURA 5.5 - Imagem obtida através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) do nanocompósito com clorexidina (IONPs-CS-CLX). Imagem obtida por Espectroscopia de Raios-X por dispersão em energia (EDX), com mapeamento de átomos de cloro. ....	43

FIGURA 5.6 - Gráfico com a variação do tamanho das partículas de acordo com o aumento da proporção magnetita:quitosana obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). .....	44
FIGURA 5.7 - Curvas de degradação obtidas por Análise Terogravimétrica (TGA) para as nanopartículas de óxido de ferro puras (IONPs), para o nanocompósito (IONPs-CS) e para o nanocompósito com clorexidina (IONPs-CS-CLX). .....	45
FIGURA 5.8 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio obtido para a quitosana. ....	47
FIGURA 5.9 - Estrutura da molécula de quitosana <sup>17</sup> . ....	47
FIGURA 5.10 – Perfil de liberação da clorexidina a 25°C, 37°C, 43°C e 50°C. ....	49
FIGURA 5.11 – Curva de calibração de clorexidina. ....	50
FIGURA 5.12 – Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo tempo a 25°C.....	51
FIGURA 5.13 - Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo tempo a 37°C.....	52
FIGURA 5.14 - Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo tempo a 43°C.....	52
FIGURA 5.15 - Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo tempo a 50°C.....	53
FIGURA 5.16 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco não liberado acumulado pelo tempo a 25°C..	54
FIGURA 5.17 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco não liberado acumulado pelo tempo a 37°C..	55

FIGURA 5.18 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco não liberado acumulado pelo tempo a 43°C..	56
FIGURA 5.19 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco não liberado acumulado pelo tempo a 50°C..	56
FIGURA 5.20 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pela raíz quadrada do tempo a 25°C.....	57
FIGURA 5.21 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pela raíz quadrada do tempo a 37°C.....	58
FIGURA 5.22 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pela raíz quadrada do tempo a 43°C.....	59
FIGURA 5.23 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pela raíz quadrada do tempo a 50°C.....	60
FIGURA 5.24 - Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado para os valores de logaritmo da porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo logaritmo do tempo a 25°C.....	61
FIGURA 5.25 - Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado para os valores de logaritmo da porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo logaritmo do tempo a 37°C.....	62
FIGURA 5.26 - Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado para os valores de logaritmo da porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo logaritmo do tempo a 43°C.....	63

FIGURA 5.27 - Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado para os valores de logaritmo da porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo logaritmo do tempo a 50°C.....	64
FIGURA 5.28 - Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado acima de 60%.....	66
FIGURA 5.29 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado acima de 60%.....	67
FIGURA 5. 30 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado acima de 60%.....	68

## RESUMO

### CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA EM NANOCOMPÓSITO DE MAGNETITA E QUITOSANA

Os nanocompósitos são empregados em diversas áreas do conhecimento e uma delas é a nanomedicina. Eles são utilizados como carreadores de medicamentos devido à sua biocompatibilidade e atividade biológica, com possível atividade antimicrobiana. Este estudo teve como objetivo avaliar efeito da inserção de nanopartículas magnéticas em uma matriz polimérica de quitosana como carreador de CLX e avaliar o perfil de liberação do fármaco. A solução de quitosana foi preparada pela solubilização da mesma (1,4 mg/mL) em ácido acético 2% sob agitação magnética constante a temperatura ambiente por 24 horas. A suspensão coloidal de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (1,4 mg/mL) foi cedida pela empresa *nChem*, São Carlos, SP. Os nanocompósitos foram preparados em um processo de simples mistura. O fármaco Clorexidina (500  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionado aos nanocompósitos, sob agitação magnética constante a temperatura ambiente por 1 hora. Obteve-se os nanocompósitos como esperado e de forma reprodutível. Comprovou-se o recobrimento das nanopartículas de magnetita pela quitosana e também a incorporação homogênea do fármaco na matriz polimérica. Analisou-se os dados obtidos nos testes de liberação do fármaco em 4 temperaturas diferentes e concluiu-se que o sistema magnetita-quitosana libera a clorexidina durante as 2 primeiras horas, até atingir 60% de liberação, pelo método descrito por Krosmeier-Peppas. Depois das 2 horas de liberação, outro modelo passa a descrever a liberação, o modelo de Higuchi.

## ABSTRACT

### RELEASE KINETICS OF CHLORHEXIDINE IN MAGNETITE AND CHITOSAN NANOCOMPOSITE

Nanocomposites are used in several fields of knowledge, including nanomedicine. They are used as drug carriers because of their biocompatibility and biological activity, with possible antimicrobial activity. This study aimed to evaluate the effect of magnetic nanoparticle insertion on a chitosan polymer matrix as carriers of antimicrobial antibiotics. The chitosan suspension was prepared by solubilizing it in 2% acetic acid under constant magnetic stirring at room temperature for 24 hours. The colloidal suspension of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) was supplied by the company nChem, São Carlos (Brazil). The nanocomposites were prepared in a simple mixing process. Chlorhexidine was added to the nanocomposites under constant magnetic stirring at room temperature. The nanocomposites were obtained as expected and reproducibly. The magnetite nanoparticles were recovered by chitosan and the homogeneous incorporation of the drug into the polymer matrix. The data obtained in the drug release tests were analyzed at four different temperatures and it was concluded that the magnetite-chitosan system releases chlorhexidine during the first 2 hours until reaching 60% release by the method described by Krosmeier-Peppas. After the 2 hours of release, another model goes on to describe the release, the Higuchi model.

# SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1 - Nanotecnologia.....	12
2.2 - Nanopartículas Magnéticas.....	12
2.3 - Óxido de Ferro e Magnetita ( $Fe_3O_4$ ) .....	14
2.4 - Nanocompósitos.....	15
2.5 - Quitosana.....	15
2.6 - Veículos de Entrega de Medicamentos ( <i>Drug Delivery</i> ).....	18
2.7 - Modelos Matemáticos de Liberação de Fármacos.....	21
2.7.1 - Modelo de ordem zero.....	21
2.7.2 - Modelo de Primeira Ordem .....	22
2.7.3 - Modelo Higuchi.....	22
2.7.4 - Modelo Korsmeyer-Peppas.....	24
2.8 - Sistema Magnetita-Quitosana .....	25
2.9 - Biofilmes Orais .....	26
2.9.1 - Microorganismos patogênicos formadores de biofilme e doenças relacionadas..	27
2.9.1.1 - <i>Streptococcus mutans</i> e cárie dentária .....	27
2.9.1.2 - <i>Candida albicans</i> e infecções .....	28
2.10 - CLOREXIDINA.....	29
2.11 - ENSAIO BIOLÓGICO .....	31
<b>3 - OBJETIVOS</b> .....	33
<b>4 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	34
4.1 - Reagentes e Equipamentos .....	34
4.2 - Síntese dos Nanocompósitos com e sem Clorexidina .....	35
4.3 - Testes de Liberação .....	36

<b>4.4 - Caracterização dos Reagentes e dos Nanocompósitos .....</b>	<b>37</b>
4.4.1 - Análise Termogravimétrica (TG).....	37
4.4.2 - Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	38
4.4.3 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	38
4.4.4 - Difração de raios X (DRX) .....	38
4.4.5 - Espectroscopia de UV-Vis .....	38
4.4.6 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Átomos de Hidrogênio (RMN- <sup>1</sup> H) .....	39
4.4.7 - Espectroscopia de FT-IR.....	39
<b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
5.1 - Difração de Raios X (DRX).....	40
5.2 - Espectroscopia no IV .....	41
5.3 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Espectroscopia de Raios X por dispersão de energia (EDX) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) .....	42
5.4 - Análise Termogravimétrica (TGA).....	45
5.5 - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio <sup>1</sup> H-RMN.....	46
5.6 - Testes de Liberação (Espectroscopia no UV-VIS).....	48
5.6.1 - Modelo de Ordem Zero.....	51
5.6.2 - Modelo de Primeira Ordem .....	54
5.6.3 - Modelo Higuchi.....	57
5.6.4 - Modelo Korsmeyer-Peppas.....	60
<b>6 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

A *nanotecnologia* se refere ao desenvolvimento científico e tecnológico de materiais que apresentem propriedades intermediárias entre as escalas microscópica (atômica) e macroscópica, o que geralmente ocorre em materiais com dimensões nanométricas<sup>1,2</sup>. Os nanomateriais são comercialmente empregados em diversas áreas, como catalisadores, dispositivos de comunicação, tintas especiais, sensores e em mecânica fina. Existem diversas aplicações na área de saúde, com destaque para aquela que envolvem nanopartículas para o transporte e liberação controlada de medicamentos (*drug delivery*).

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com estrutura magnética são obtidas com elevado controle de tamanho e forma empregando diversos métodos de síntese. São geralmente biocompatíveis e sua toxicidade, metabolismo e farmacocinética são bastante conhecidos<sup>3</sup>. As suas propriedades superficiais podem ser controladas ou modificadas revestindo-as com diferentes moléculas, as quais podem estar ancoradas por meio de ligações covalentes ou por interações de Van der Waals. Estas modificações na superfície das nanopartículas permitem um amplo uso em medicina clínica. Por exemplo, com o revestimento apropriado, essas nanopartículas magnéticas se tornam hidrofílicas e podem ser dispersas em água ou em algum fluido biológico, como saliva ou sangue. A presença de nanopartículas magnéticas em sistemas de transporte de medicamentos permite que sejam conseguidas doses bastante altas de modo pouco invasivo em pequenas regiões do corpo de um paciente por meio da aplicação de um campo magnético externo. Geralmente, estas aplicações requerem nanopartículas superparamagnéticas que sejam menores que 20 nm e que apresentem uma estreita distribuição do tamanho das partículas, de modo que as suas propriedades físicas e químicas sejam uniformes<sup>4</sup>. Dentre os materiais utilizados para revestimento de nanopartículas magnéticas, destaca-se a quitosana.

A quitosana é um biopolímero derivada da quitina que apresenta propriedades policatiônicas e quelantes devido à presença de muitos grupos funcionais amino e hidroxila ativos ao longo da cadeia polimérica. A presença de cargas positivas na cadeia da quitosana permite que ela interaja fortemente com outros polímeros e moléculas aniônicas. A quitosana também apresenta uma série de atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana, além de estimular ou inibir a

atividade de vários tipos de células humanas. Por essas razões, a quitosana é amplamente utilizada em medicina, no setor alimentício, na produção de produtos farmacêuticos, nutrição e agricultura <sup>5</sup>.

A incorporação de nanopartículas na matriz da quitosana para formar novos materiais nanocompositos, são muito empregados como veículos para o transporte e liberação controlada de medicamentos em situações bastante específicas, como no tratamento de câncer ou para o combate a infecções bacterianas e fúngicas.

Os sistemas de transporte e liberação de medicamentos preparados com quitosana e magnetita exibem propriedades superiores àquelas exibidas pela quitosana pura. O revestimento de quitosana consegue carregar uma grande quantidade de fármacos no sistema e exibe um perfil de liberação lenta. A presença de nanopartículas no sistema impõe uma passagem seletiva do medicamento para o local alvo através de estímulos ou por um mecanismo de reconhecimento específico. Os estímulos externos, como por exemplo variação de pH e temperatura ou aplicação de um campo eletromagnético, afetam a resposta dos nanocarreadores alterando suas propriedades fisiológicas, levando à liberação de uma concentração específica de agente bioativo na área ou órgão afetado. Por meio deste processo, a eficácia do fármaco pode aumentar, assim como a especificidade, e leva a uma menor toxicidade sistêmica <sup>6</sup>.

Vários medicamentos são empregados no combate às doenças orais, especialmente a clorexidina. Em odontologia, é utilizada como inibidor enzimático, agente antibacteriano e agente antifúngico. Sua ação antibacteriana é devida ao rompimento da membrana celular bacteriana, aumentando a permeabilidade e resultando em lise celular <sup>7</sup>.

Neste estudo foram sintetizados e caracterizados materiais nanocompósitos com possível propriedade antifúngica e antibacteriana, os quais foram obtidos a partir da incorporação de quitosana em nanopartículas magnéticas com a posterior adição da clorexidina.

## **2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 - Nanotecnologia**

Nanotecnologia pode ser definida, segundo OMAR (2012), como “um termo que se refere a desenvolvimentos tecnológicos na escala nanométrica”. Pode-se dizer que a nanotecnologia é engenharia em escala supramolecular, uma vez que as moléculas e estruturas que operam dentro das células de organismos vivos estão na mesma escala <sup>1</sup>.

O campo da nanotecnologia abrange diversas áreas, incluindo polímeros, biomateriais, nanopartículas para entrega de medicamento, nanofibras, misturas de polímeros, nanocompósitos, entre outros <sup>8</sup>.

Existem diversas definições para o termo “nanopartícula”. Alguns pesquisadores consideram que uma nanopartícula seria qualquer sistema coloidal de 1 a 1000 nm de diâmetro. Porém, a melhor maneira de descrevê-las e diferenciá-las de outros sistemas é considerar que sistemas nanoestruturados apresentam propriedades físico-químicas diferentes daquelas apresentadas em sistemas macroestruturados. Essas propriedades podem ser explicadas pela maior área superficial das partículas de menor dimensão.

### **2.2 - Nanopartículas Magnéticas**

Recentemente, nanopartículas se transformaram em uma área de interesse para diversos campos de estudo. Novas rotas de síntese têm sido propostas para a obtenção de sistemas nanoestruturados cada vez mais complexos e com propriedades de ampla aplicabilidade em diferentes áreas. O que governa as propriedades físico-químicas das nanopartículas, sua estabilidade coloidal e seu comportamento biológico são as condições de síntese e funcionalização da sua superfície <sup>3,9</sup>.

Algumas nanopartículas exibem propriedades físico-químicas e características de superfície adequadas para as aplicações na medicina e farmácia, como veículo de entrega de medicamento, hipertermia, imagem de ressonância magnética, engenharia tecidual e reparação, biossensores, separações bioquímicas

e bioanálises<sup>9</sup>. Contudo, é necessário um revestimento da superfície a fim de garantir biocompatibilidade da nanopartícula e também seu direcionamento específico para o alvo biológico.

A biocompatibilidade de uma nanopartícula magnética utilizada como veículo de entrega de fármacos está relacionado com a resposta que ela provoca no sistema imunológico após a sua administração, com a sua toxicidade intrínseca e também com os metabolitos gerados durante a sua biodegradação. Os fármacos, quando associados a um veículo, podem exibir um perfil de toxicidade diferente daquele que seria obtido isoladamente devido à alteração da biodistribuição nas células ou tecidos e alteração na sua metabolização<sup>9</sup>.

Do ponto de vista toxicológico, os materiais administrados como veículos de entrega e seus produtos de degradação devem ser eliminados do organismo o mais rápido possível após a completa liberação do medicamento. A toxicidade de das nanopartículas magnéticas depende de diversos fatores, como a sua composição química, solubilidade, reatividade de superfície, a dose administrada, a rota de administração, farmacocinética, biodistribuição e biodegradabilidade<sup>9</sup>.

Quando são devidamente recobertas, as nanopartículas são capazes de dispersar-se em meio aquoso. Por sua vez, quando em suspensão, podem interagir com um campo magnético externo e posicionar-se em uma área específica, facilitando a obtenção de imagens por ressonância magnética para diagnósticos médicos e também utilizado em terapia de câncer de campo magnético alternado. Para que sejam utilizadas na medicina, as nanopartículas precisam ser menores que 20 nm e a distribuição média do tamanho das nanopartículas deve ser uma faixa estreita, dessa forma as partículas têm propriedades químicas e físicas uniformes<sup>4</sup>.

Entretanto, a produção de partículas de magnetita com o tamanho desejado e distribuição de tamanho de partícula aceitável sem a agregação de partículas ainda é um desafio tecnológico<sup>4</sup>. Diversos revestimentos foram empregados para a estabilização coloidal das nanopartículas magnéticas, como por exemplo o dextrano, diversos lipídeos, polietilenoglicol e polivinil álcool, resultando em sistemas coloidais com diferentes características em função tanto do agente de recobrimento quanto das características encontradas durante a síntese<sup>3</sup>.

## 2.3 - Óxido de Ferro e Magnetita ( $Fe_3O_4$ )

O ferro é um dos elementos mais abundantes na Terra, compondo 35 % da massa total do planeta. A maior parte está presente na forma de óxidos, com diferentes estruturas cristalinas, cada uma exibindo propriedades magnéticas, elétricas, físico-químicas e morfológicas diferenciadas, o que tornou os óxidos de ferro uma importante classe de materiais tecnológicos <sup>10</sup>.

O ferro também é bastante abundante em organismos vivos e sua presença é essencial em diversos processos biológicos, como por exemplo no transporte de oxigênio pela hemoglobina e na respiração celular. Dessa forma, nanopartículas de óxido de ferro são conhecidas por serem biologicamente toleráveis<sup>3</sup>.

Os colóides de ferrita, magnetita ( $Fe_3O_4$ ) e magemita ( $\gamma-Fe_2O_3$ ), são as estruturas cristalinas de nanopartículas magnéticas mais comuns <sup>9</sup>. A magnetita é um mineral ferrimagnético e tem fórmula molecular  $Fe_3O_4$ , pertence ao grupo espacial  $Fd3m$  e tem estrutura cristalina cúbica de espinel invertido com estequiometria  $AB_2O_4$ , onde A representa um cátion bivalente, nesse caso  $Fe^{2+}$ , e B representa um cátion trivalente, nesse caso  $Fe^{3+}$ . Ou seja,  $Fe^{3+}[Fe^{2+}Fe^{3+}]O_4$ . Os íons  $O^{2-}$  estão coordenados à íons  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  nos interstícios octaédricos e à íons  $Fe^{3+}$  em interstícios tetraédricos. Os íons  $Fe^{3+}$  estão distribuídos igualmente entre as posições octaédrica e tetraédrica, dessa forma, não apresentam momento magnético resultante. Enquanto que os íons  $Fe^{2+}$  estão apenas em interstícios octaédricos, dessa forma, são responsáveis pelo comportamento magnético do material <sup>10,11</sup>.

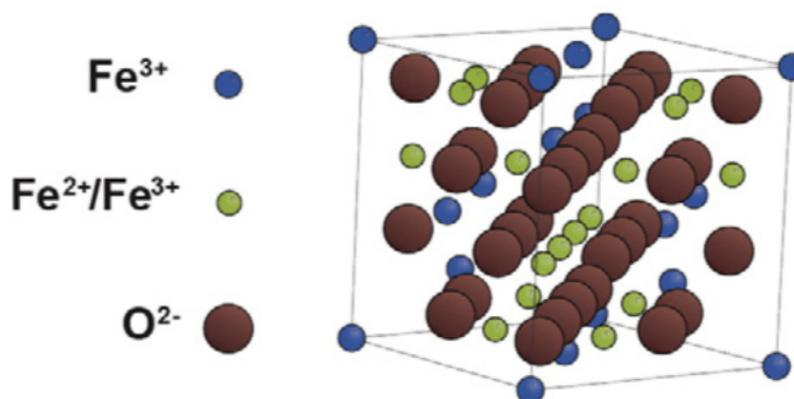


FIGURA 2.1 - Representação tridimensional da estrutura da magnetita. (NADOLL, 2014)

Os elétrons podem saltar entre os íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  nos interstícios octaédricos a temperatura ambiente, tornando a magnetita uma importante classe de materiais semi-metálicos <sup>4</sup>.

## 2.4 - Nanocompósitos

Os nanocompósitos são uma classe de materiais híbridos, no qual um ou mais componentes têm dimensões nanométricas. Um dos componentes é a matriz polimérica onde as partículas estão dispersas. Esses componentes podem ser tanto de natureza orgânica quanto inorgânica. As propriedades dos nanocompositos são muitas vezes superiores às dos materiais puros ao inserir, como por exemplo a sua resistência mecânica, estabilidade térmica e propriedades ópticas, magnéticas e elétricas <sup>12</sup>.

As propriedades dos nanocompósitos estão relacionadas à enorme área de superfície das nanopartículas inseridas nos polímeros e à sua reatividade química, o que auxilia a dispersão das partículas no polímero. Muitas das propriedades do nanocomposito em relação ao polímero puro estão relacionadas com as interações químicas entre as partículas e o polímero. Alterações nas interações pode influenciar a dinâmica molecular do polímero, resultando em alterações em suas propriedades físicas e em seu comportamento térmico ou mecânico <sup>12</sup>.

Dentro da área dos nanocompósitos, existem diversas subáreas, como por exemplo propriedades de barreira, catálise, resistência a chamas, propriedades eletrônicas e ópticas, aplicação em cosméticos e propriedades bactericidas <sup>8</sup>.

## 2.5 - Quitosana

Um *biomaterial* é qualquer material sintético ou natural que possa ser utilizado para tratar ou substituir algum tecido vivo órgão ou função do organismo <sup>13</sup>. Neste contexto, a quitosana é um biomaterial derivado da quitina <sup>14</sup>.

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. É encontrado tanto no reino animal quanto vegetal, constituindo a maior

parte dos exoesqueletos de crustáceos, insetos e parede celular de fungos. Ela também é considerada como um recurso natural renovável, biodegradável e de baixo custo, uma vez que as carapaças dos crustáceos são resíduos produzidos em grandes quantidades e apenas uma parte tem sido como insumo pela indústria de transformação. Devido ao grande volume produzido, a quitina é considerada muitas vezes como um problema ambiental, o que tem incentivado a busca por novas aplicações que possam reduzir o impacto ambiental nas regiões onde o excesso de quitina é normalmente descartado. A quitina foi isolada pela primeira vez em 1811 a partir de um fungo e isolada a partir do exoesqueleto de um besouro em 1923, quando passou a ser chamada de “quitina”. Por ser insolúvel na maioria dos solventes, a quitina não foi utilizada por muitos anos. Atualmente, a quitina e seus derivados se tornaram polímeros de grande interesse em diversas áreas de estudo <sup>14,15</sup>.

A quitina é um polissacarídeo linear, onde as unidades de *N*-acetil-2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose estão ligadas através de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Porém, dependendo de onde a quitina é extraída, uma pequena parcela das unidades de repetição estarão desacetiladas <sup>15,16</sup>.

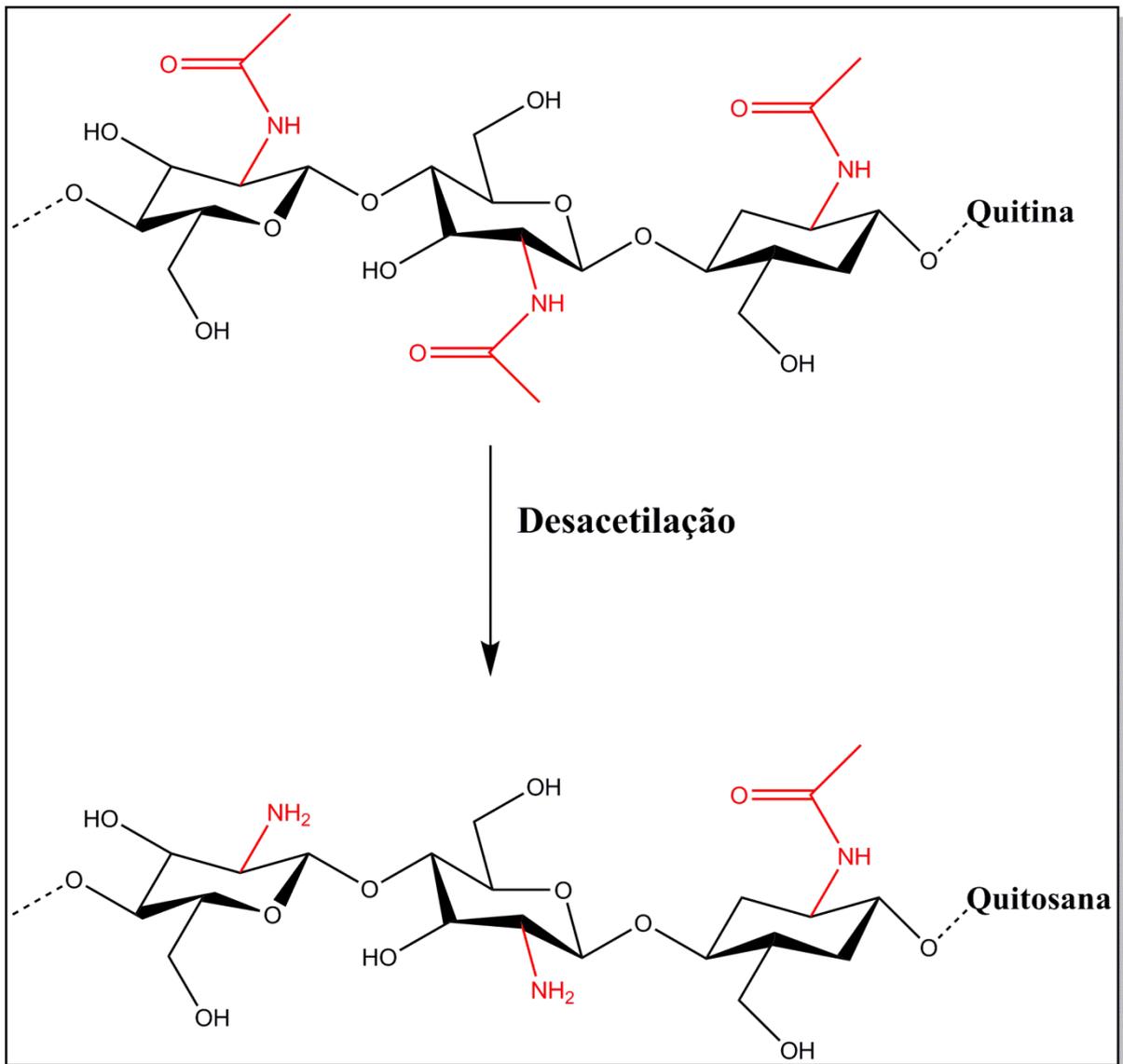


FIGURA 2.2 - Representação da estrutura da quitina e da quitosana. Reação e desacetilação. Adaptada de RODRIGUES, 2016 <sup>17</sup>.

Após diversas etapas de desacetilação da quitina, obtêm-se a quitosana, um polissacarídeo linear composto por duas unidades de repetição, o 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranoose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose, os quais são ligados por uma ligação  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Pode-se observar, na figura 2, representações da quitina totalmente acetilada e da quitina parcialmente desacetilada. É praticamente impossível desacetilar a quitina por completo, dessa forma, a quitosana é uma família de quitinas com diferentes graus de desacetilação, sempre com baixo grau de acetilação <sup>15</sup>.

A quitosana e a quitina se diferenciam pela quantidade relativa de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose. Esse parâmetro é denominado grau

de acetilação (GA), um parâmetro que expressa a quantidade média de unidades acetiladas ao longo das cadeias do biopolímero. O GA influencia as interações intermoleculares e intramoleculares do polímero, resultando em diferentes cristalinidade, propriedades mecânicas, capacidade de absorção de água, tensão superficial, entre outros <sup>15</sup>.

As aminas primárias presentes nos anéis da quitosana são responsáveis por propriedades que a torna atrativa, como por exemplo natureza catiônica, liberação controlada de fármacos e propriedade antimicrobiana. Os grupamentos amino são um sítio ativo para uma variedade de outros grupamentos interagirem, alterando as propriedades do polímero de acordo com o pH do meio. Em valores baixos de pH, ocorre a protonação dos grupos amino, fazendo com que a quitosana esteja na forma policatiônica, o que aumenta sua solubilidade <sup>6,16</sup>.

Dependendo da fonte de onde a quitosana é extraída e do método de preparação, sua massa molar pode variar de 300 a mais de 1000 g/mol, com graus de desacetilação de 30 a 95%.

A quitosana tem diversas aplicações, sendo geralmente utilizada na medicina por ser derivada de fontes naturais renováveis não-toxicas, o que a torna compatível e efetiva para ser empregada como biomaterial. Além disso, tem atividade antimicrobiana, é biocompatível e biodegradável. A quitosana também apresenta propriedades relacionadas com a mucoadesão, e tem sido muito usada como veículo de entrega de fármacos de maneira controlada. A propriedade responsável pela adesão, faz com que o polímero adira na superfície tanto de tecidos moles quanto tecidos duros, tendo diversas aplicações, entre elas em ortopedia, odontologia e oftalmologia <sup>6</sup>.

## **2.6 - Veículos de Entrega de Medicamentos (*Drug Delivery*)**

A eficácia dos medicamentos administrados via oral depende do modo como ocorre a sua liberação no organismo, como são os processos no trato gastrointestinal, do processo de dissolução e solubilização do fármaco e também da sua permeabilidade frente às membranas biológicas. Para que seja absorvido e consiga atingir a corrente sanguínea em níveis plasmáticos necessários, o fármaco deve estar disponível em quantidades adequadas. Dessa forma, alterações no perfil de liberação

do medicamento pode alterar as quantidades e proporções disponíveis <sup>18</sup>. Além disso, a entrega de medicamentos depende da natureza do composto ativo e pode ser liberado em membranas celulares, no citoplasma ou então no núcleo das células <sup>19</sup>.

Existem diversas condições de administração de fármacos, como é possível observar na Fig.2.3.

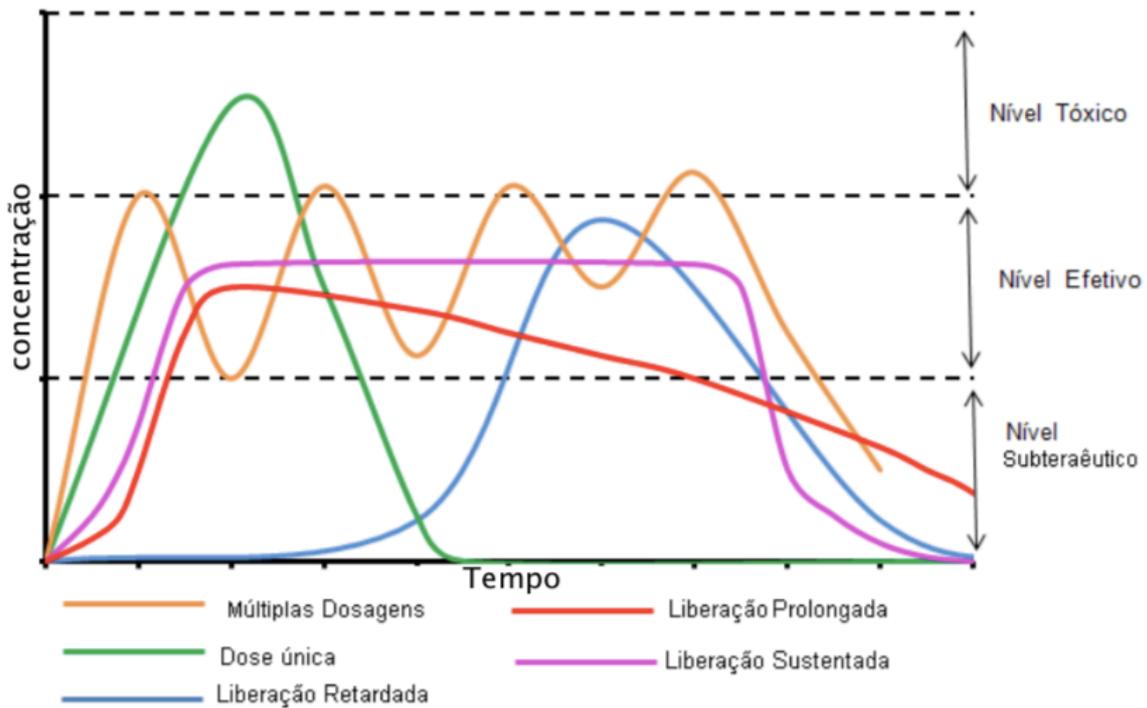


FIGURA 2.3 - Representação das curvas de formas farmacêuticas de liberação de medicamento <sup>18</sup>.

Alguns fármacos necessitam apenas de uma dose diária para manter os níveis plasmáticos adequados para obter o efeito terapêutico necessário. Estes são chamados de medicamentos de ação prolongada, ou dose única, como é possível observar na curva verde um único pico plasmático. Sua liberação ocorre de forma imediata no organismo para que seja absorvido no organismo o mais rápido possível. Já a curva laranja indica fármacos que necessitam ser administrado em diversas dosagens para que atinja tanto o efeito terapêutico quanto os níveis plasmáticos. A administração de uma nova dose sempre ocorre quando a concentração do fármaco atinge o nível mais baixo da faixa requerida no plasma sanguíneo <sup>18</sup>.

A forma farmacêutica de liberação retardada está caracterizada pela curva azul. Esse tipo de medicamento é desenvolvido para que a liberação ocorra em um intervalo de tempo posterior à administração do fármaco, a liberação pode ser determinada pela influência das condições do meio ou pelo tempo. Alguns fármacos apresentam certas adversidades e requerem que sejam liberados com atraso, como por exemplo os fármacos gastrorresistentes, que são destruídos pela acidez do suco gástrico, ou dos medicamentos que irritam a mucosa estomacal. Em todos os casos, estes medicamentos administrados oralmente devem ser liberados apenas quando chegarem ao intestino <sup>18</sup>.

As curvas vermelha e a cor-de-rosa apresentam formas farmacêuticas de liberação prolongada. A primeira, mostra o comportamento da administração em duas doses. A primeira dose tem uma concentração alta de ativo, o que faz com que inicialmente uma quantidade suficiente seja liberada, resultando em um efeito farmacológico. A segunda dosagem libera o fármaco de forma gradual não constante, com o intuito de prolongar o efeito farmacológico desejado. A segunda curva cor-de-rosa exibe a liberação do medicamento de forma sustentada, sendo capaz de manter constante a concentração de fármaco por um longo período de tempo. Este mecanismo leva primeiro liberar o fármaco atingindo o efeito farmacológico e, em seguida, sustenta o efeito através de liberação gradual e constante <sup>18</sup>.

A liberação controlada e sustentada de fármacos se tornou um tópico de pesquisa promissor. Pesquisadores estão desenvolvendo novos sistemas de entrega de medicamentos que possam fornecer uma concentração de fármaco apropriada para atender a concentração terapêutica desejada. A liberação não controlada de fármacos pode resultar em alta concentração da droga no organismo e, conseqüentemente, alta toxicidade. Após a metabolização ou excreção de parte da concentração de fármaco administrada, a concentração resultante se torna insuficiente para o organismo, podendo levar a problemas graves de saúde. Isso ocorre devido às características do fármaco e sua rota de administração. Algumas drogas têm um tempo de meia-vida curto, pois são consumidas rapidamente pelo organismo, resultando em baixo nível de concentração no plasma. Dessa forma, é necessário a administração de mais fármaco para manter o nível do plasma constante. Ou seja, a concentração administrada é ainda maior, resultando em mais desconforto para os pacientes <sup>20</sup>.

## 2.7 - Modelos Matemáticos de Liberação de Fármacos

A liberação do fármaco é uma propriedade importante de um sistema terapêutico, sendo um pré-requisito para a absorção do princípio ativo e contribui para a taxa e a disponibilidade de fármaco para o organismo. Os padrões de liberação compreendem as cinéticas de ordem zero e de primeira ordem. Além disso, existem formas farmacêuticas que fornecem uma dose rápida inicial, seguida de liberação do componente sustentado com cinética de ordem zero ou de primeira ordem.

Modelos matemáticos são ferramentas importantes para descrever processos de *drug delivery*. Eles permitem que se meça alguns parâmetros físicos, como por exemplo o coeficiente de difusão do fármaco, e descreve modelos de liberação. Além disso, é possível prever, teoricamente, alguns parâmetros para que o perfil de liberação esperado seja atingido, como por exemplo, a quantidade e o tipo de fármaco, necessidade de polímeros ou outros compostos, tamanho e formato dos sistemas.

Os modelos matemáticos mais usados para descrever os sistemas de liberação de fármaco são: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas.

### 2.7.1 - Modelo de ordem zero

De acordo com os princípios da farmacocinética, a liberação de fármacos a partir do veículo de entrega pode ser representada pela seguinte equação:

$$C_t = C_0 + K_0t$$

onde  $C_t$  é a quantidade de fármaco liberado durante o período de tempo  $t$ ,  $C_0$  é a concentração inicial de fármaco no tempo  $t = 0$  e  $K_0$  é a constante de velocidade de dissolução (ordem zero).

A cinética de ordem zero define o processo de liberação constante de fármaco a partir de um sistema de *drug delivery*. Assim, o nível de droga no sangue permanece constante durante a liberação.

Para estudar este modelo, é necessário a construção de um gráfico de concentração, como a porcentagem acumulada de droga liberada, pelo tempo de liberação. O gráfico gerado é uma linha reta e o valor do coeficiente angular corresponde a constante  $K_0$ . O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) indica se a liberação segue ou não a cinética de ordem zero.

Este tipo de liberação é observado em sistemas de liberação prolongada.

### 2.7.2 - Modelo de Primeira Ordem

A liberação de fármaco regida pelo modelo cinético de primeira ordem pode ser representada pela seguinte equação:

$$\log C = \log C_0 - \frac{K_1 t}{2,303}$$

onde  $K_1$  é a constante de velocidade de primeira ordem expressa em frequência (inverso da unidade de tempo),  $C_0$  é a concentração inicial de fármaco e  $C$  é a porcentagem de fármaco restante no tempo  $t$ . A equação corresponde à uma função linear. O gráfico resultante tem como coeficiente angular  $K_1/2,303$  e o coeficiente linear  $\log C_0$ . A construção do gráfico do logaritmo da porcentagem de concentração resultante de fármaco por tempo correlaciona o coeficiente angular com a constante de velocidade de segunda ordem e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) indica se a liberação obedece ou não o modelo.

Um processo é definido como de primeira ordem pois a constante de velocidade é proporcional à concentração de fármaco sendo liberado, ou seja, quanto maior a concentração, mais rápida é a liberação. Esse modelo é utilizado para descrever absorção e eliminação de diversos fármacos.

### 2.7.3 - Modelo Higuchi

O processo de liberação de fármacos envolve tanto o processo de difusão quanto o de dissolução. A equação de Higuchi leva em consideração esses

dois fenômenos e, atualmente, é amplamente utilizada e a equação mais conhecida na área de liberação controlada de fármacos.

A equação é descrita a seguir:

$$Q = A \sqrt{D (2C_0 - C_s) C_s t}$$

onde  $Q$  é a quantidade acumulada de fármaco liberado no período de tempo  $t$  por unidade de área,  $C_0$  é a concentração inicial de fármaco,  $C_s$  é a solubilidade do fármaco na matriz e  $D$  é o coeficiente de difusão da molécula na matriz. Essa relação é válida até que todo o fármaco seja liberado.

Para descrever um sistema onde a concentração de fármaco na matriz é menor que a sua solubilidade e a liberação ocorre através de um sistema poroso, Higuchi descreveu outra equação:

$$Q = A \sqrt{\left(\frac{D\delta}{\tau}\right) (2C - \delta C_s) C_s t}$$

Onde  $D$  é o coeficiente de difusão da molécula no solvente,  $\delta$  é a porosidade da matriz,  $\tau$  é a “tortuosidade” da matriz, ou seja, é definido como as dimensões do raio e ramificações dos poros e canais da matriz.

Simplificando, temos:

$$Q = K_H \sqrt{t}$$

onde  $K_H$  é a constante de dissolução de Higuchi.

Para estudar este modelo, é necessário a construção de um gráfico de porcentagem acumulada de fármaco liberado por raiz quadrada do tempo. Obtendo-se então um gráfico linear, tendo um coeficiente angular igual a  $K_H$ . Se o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) for maior em relação aos outros modelos cinéticos, pode-se inferir que o principal mecanismo de liberação é controlado por difusão.

O modelo de Higuchi permitiu o desenvolvimento de diversos outros modelos matemáticos importantes para classificar os possíveis perfis de liberação de fármacos.

#### 2.7.4 - Modelo Korsmeyer-Peppas

Uma vez que foi confirmado que o mecanismo principal de liberação é controlado por difusão (Modelo de Higuchi), deve-se determinar qual é o tipo de difusão que o fármaco obedece.

A equação empírica que possibilita o entendimento dos mecanismos de dissolução a partir da matriz. Os autores descreveram uma equação simples para um sistema polimérico de *drug release*:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{kp} t^n$$

onde  $\frac{M_t}{M_\infty}$  é a fração da quantidade de fármaco liberado no intervalo de tempo  $t$ .

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \log(K_{kp}) + n \log t$$

onde  $M_t$  é a quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ,  $M_\infty$  é a quantidade de fármaco liberada após  $t = \infty$ ,  $n$  é o expoente difusional (ou expoente de liberação),  $K_{kp}$  é a constante de velocidade de liberação de Korsmeyer.

Para estudar o modelo de liberação proposto, é necessária a construção de um gráfico do logaritmo da porcentagem de liberação acumulada de fármaco ( $\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right)$ ) pelo logaritmo do tempo ( $\log(t)$ )

Os valores do expoente difusional ( $n$ ) são utilizados para caracterizar diferentes mecanismos de liberação. Como é possível observar na tabela a seguir:

TABELA 2.1 – Descrição do Mecanismo em função do expoente

Expoente Difusional ( $n$ )	Mecanismo de transporte
$n = 0,5$	Modelo de Fick (ou Fickiano) (Caso I)
$n = 1,0$	Modelo não-Fickiano (Caso II)
$0,5 < n < 1,0$	Modelo não-Fickiano (Caso Anômalo)
$N < 0,5$	Comportamento pseudo Fickiano
$n > 1,0$	Modelo não-Fickiano (Super Caso II)

No modelo de Fick (Caso I, com  $n = 0,5$ ) a liberação é governada por difusão. A taxa de transporte pelo solvente ou a difusão é muito maior que o processo de relaxação das cadeias poliméricas. Quando  $n = 1$ , tem-se o modelo não-Fickiano (Caso II), no qual a cinética de liberação é de ordem zero. A liberação é governada pelo mecanismo de inchamento ou relaxação das cadeias poliméricas. Quando os valores de  $n$  estão na faixa de 0,5 a 1,0, tem-se o caso de transporte anômalo. O mecanismo que descreve a liberação é governado pela difusão e inchamento do polímero. O rearranjo das cadeias poliméricas ocorre de forma lenta e o processo de difusão ocorre simultaneamente, causando efeitos anômalos dependentes do tempo. Por fim, tem-se o caso onde os valores de  $n > 1,0$ . Durante o processo de sorção, ocorrem os fenômenos de tensão e quebra das cadeias poliméricas. Ou seja, o núcleo acaba se rompendo e ocorre a liberação.

Para determinar o expoente  $n$ , é recomendado o uso dos dados experimentais de até 60% de liberação acumulada ( $\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) < 0,60$ ).

## 2.8 - Sistema Magnetita-Quitossana

Nanocarreadores de fármacos são utilizados para contornar efeitos colaterais, como problemas hepáticos, neurológicos, hematológicos ou nefrológicos, associados com a administração de antibióticos. Estudos mostram que o uso de nanocompósitos com matriz de quitossana representam uma solução de baixo custo para reduzir a toxicidade de alguns antibióticos durante o tratamento. Além disso, a quitossana pode ser utilizada para limitar a difusão dos antibióticos pelo corpo <sup>19</sup>.

Os nanocarreadores de fármacos precisam apresentar uma alteração em suas propriedades físico-químicas sob exposição à estímulos externos, como por exemplo variação de pH, sistemas enzimáticos, campos eletromagnéticos, variação de temperatura, ultrassom, entre outros. Essas variações nas propriedades desencadeiam seletivamente a liberação específica do fármaco no tecido ou no órgão desejado. Conseqüentemente, a eficácia terapêutica é aumentada e, simultaneamente, minimizando a distribuição não-específica da droga em órgãos não desejados, levando à uma toxicidade sistêmica baixa <sup>21</sup>.

Na área de *drug delivery* direcionado, nanopartículas magnéticas são injetadas por via intravenosa. O mecanismo de ação apresenta 3 passos. Primeiro, as partículas são guiadas magneticamente até o tecido alvo. Em seguida, as nanopartículas são imobilizadas no tecido enquanto o fármaco é liberado, utilizando um campo eletromagnético externo. Por fim, as nanopartículas são excretadas do organismo. O transporte das nanopartículas por via intravenosa é favorecido nos vasos sanguíneos pelas forças hidrodinâmicas do fluxo sanguíneo. Logo após a injeção, ocorre uma atração imediata entre as nanopartículas magnéticas e algumas proteínas presentes no plasma, as opsoninas, moléculas que atuam no processo de fagocitose <sup>9</sup>.

Partículas de óxido de ferro foram escolhidas como núcleo do nanocompósito devido a sua baixa toxicidade, sua biodegradabilidade e sua propriedade magnética. A propriedade magnética além de ser a força que transporta o nanocompósito e o fármaco, também auxilia na parte experimental do estudo e preparação do material. A quitosana, por sua vez, foi utilizada para formar uma capa sobre as nanopartículas devido à sua biocompatibilidade, susceptibilidade a lisozima *in vivo*, ou seja, sua biodegradabilidade, e seu caráter não-tóxico <sup>21</sup>.

## **2.9 - Biofilmes Orais**

Os biofilmes orais são aglomerados densos e altamente hidratados formados por comunidades de microrganismos sobre diversas superfícies da cavidade oral. São comunidades microbianas fortemente aderidas a superfície sólida e estão embebidos por uma matriz extracelular formando uma estrutura altamente organizada que causa doenças. São caracterizados pela sua composição, tanto de espécies presentes nas comunidades quanto em qual superfície estão localizadas <sup>22,23</sup>.

As células bacterianas presentes nas comunidades secretam substâncias poliméricas extracelulares que as mantêm unidas em agregados celulares. Em alguns casos, os grupamentos de células são separados por canais, através dos quais fluidos podem se mover. À medida que as células bacterianas se adaptam ao crescimento nas comunidades, elas expressam características fenotípicas que são frequentemente distintas daquelas que são expressas durante o crescimento isolado. As características se manifestam de várias maneiras, dependendo da espécie bacteriana. Por exemplo, o crescimento de biofilme de bactérias patogênicas muitas vezes resulta em infecções que aumentam a tolerância a antimicrobianos e a resposta imune do hospedeiro <sup>23</sup>.

Biofilmes formados em substratos iguais em diferentes locais, como por exemplo placas em diferentes dentes, apresentam composições bacterianas também diferentes, mas geralmente apresentam espécies em comum, aquelas que são mais frequentemente encontradas na superfície de esmalte. Pode-se inferir que a organização espacial das espécies dentro de cada comunidade é única, a organização é alterada ao longo do biofilme e as espécies mais frequentemente encontradas fazem uma grande contribuição para cada comunidade <sup>22</sup>.

Biofilmes formados em superfícies duras, como os dentes, geralmente têm várias camadas de células bacterianas espessas e, se não forem alteradas, podem apresentar centenas de micrômetros de espessura. Em contraste, a colonização bacteriana de tecidos moles, como o tecido gengival, frequentemente apresenta uma monocamada. As células epiteliais estão constantemente sendo descamadas e reconstituídas pelo hospedeiro <sup>22</sup>.

## **2.9.1 - Microorganismos patogênicos formadores de biofilme e doenças relacionadas**

### **2.9.1.1 - *Streptococcus mutans* e cárie dentária**

O primeiro passo na formação de biofilmes é a aderência da bactéria formando uma película na superfície do esmalte dental, composta majoritariamente por proteínas salivares e enzimas bacterianas. *Streptococcus* é o gênero principal encontrado em películas salivares e o *Streptococcus mutans* é o agente bacteriano

causador primário de cáries dentárias, é uma bactéria Gram-positiva que habita a cavidade bucal humana <sup>24-26</sup>.

A cavidade oral é um ambiente complexo com diferentes superfícies, com um fluxo salivar constante e com frequente exposição a materiais de ambientes externos, principalmente na forma de alimentos. Na cavidade oral e na presença de sacarose, *S. mutans* sintetiza ácidos e glucanos aderentes, o que permite às bactérias descalcificar, desmineralizar e aderir na superfície do dente, acumulando células na região, formando as placas ou biofilmes. Dessa forma, os microrganismos presentes na cavidade oral interagem com as superfícies, formando as placas dentais, as quais iniciam as cáries. A taxa do fluxo de saliva, a capacidade tamponante da boca e a dieta contendo carboidratos fermentáveis, torna um ambiente propício para o desenvolvimento desses microrganismos <sup>25,27</sup>.

A microbiota comensal é importante para prevenir a colonização por bactérias nocivas à saúde. As bactérias que compõem o biofilme reagem às mudanças no ambiente e essas mudanças podem levar a um desequilíbrio na composição do biofilme, alterando a atividade metabólica geral do biofilme e, conseqüentemente, pode levar à doenças. As cáries dentárias afetam cerca de 60 % a 90 % das crianças e pessoas que são susceptíveis à essas condições durante suas vidas <sup>25</sup>.

A relação entre *S. mutans* e cáries dentárias foi totalmente descoberta na década de 60 e desde então diversos estudos confirmaram essa relação, do *S. mutans* com o apodrecimento dos dentes, lesões cariosas e também indicam a predominância da bactéria em regiões infectadas que futuramente tornaram-se cariogênicas <sup>26</sup>.

### **2.9.1.2 - *Candida albicans* e infecções**

A levedura patogênica *Candida* é a espécie de fungo predominante na cavidade oral humana e cresce em diversas condições ambientais. Sua conversão de comensalismo para parasitismo e seu crescimento exuberante é geralmente associado com alterações ambientais na cavidade oral, como por exemplo próteses com má higiene ou xerostomia, fatores sistêmicos como diabetes mellitus tipo 2 e imunodeficiência ou deficiências nutricionais <sup>28,29</sup>.

*Candida albicans* e outros fungos do gênero são encontradas na cavidade oral de adultos e crianças. Esses fungos recobrem os dentes, a língua, as bochechas, mucosas palatais, materiais de restauração e próteses, além de ser encontradas em cáries e em rachaduras de gengivas infeccionadas <sup>28</sup>.

Em pessoas saudáveis, *Candida* raramente causa doenças. Porém, quando ela penetra no epitélio e invade os tecidos do hospedeiro, pode resultar em infecções sistêmicas e septicemia (segundo o dicionário Aurélio online: “infecção generalizada causada pela presença, na corrente sanguínea, de microrganismos tóxicos ou causadores de doenças”). A *C. albicans* causa infecções devido às suas propriedades de virulência ou características patogênicas. Esse tipo de infecção é dificilmente curado administrando drogas antifúngicas e, dessa forma, apresenta altas taxas de mortalidade, cerca de 40 % <sup>28,29</sup>.

## 2.10 - Clorexidina

A clorexidina (CLX) tem fórmula molecular  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$  com massa molar de 505,4 g/mol. Sua estrutura é simétrica, composta por dois anéis clorofenólicos ligados a um grupamento biguanida cada que estão conectados por uma cadeia central de hexametileno (Figura 2.4) <sup>30</sup>.

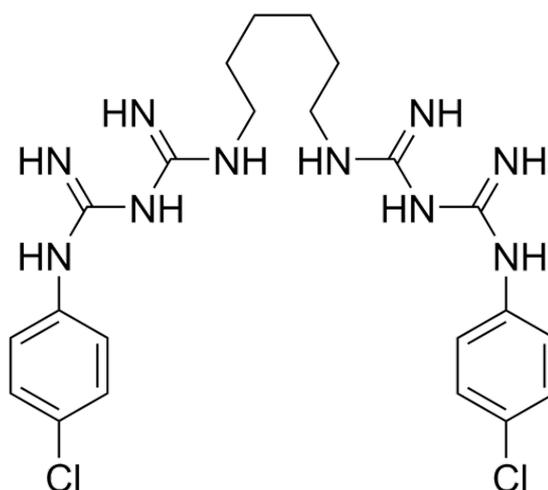


FIGURA 2.4 - Estrutura do fármaco clorexidina.

Esse fármaco foi desenvolvido na década de 40 na Inglaterra pela *Imperial Chemical Industries Co. Ltd.* Foi amplamente usado durante a década de 50

como antisséptico geral e a partir de 1957, passou a ser usada como antisséptico para pele. Desde então, sendo então amplamente usada e pode ser considerada como uma molécula de referência para o desenvolvimento de novos medicamentos <sup>7</sup>.

A CLX foi o primeiro antisséptico aceito internacionalmente para a limpeza da pele pois apresenta uma alta atividade antibacteriana e baixos níveis de toxicidade. Seu uso difundiu-se devido às suas boas propriedades antimicrobianas, sendo utilizada na época na área de urologia, ginecologia e oftalmologia <sup>31</sup>.

Na odontologia, é um dos antissépticos bucais disponíveis mais usados, sendo responsável pelo controle das placas bacterianas e prevenção de cáries, nos casos de gengivite, em procedimentos cirúrgicos, no tratamento de estomatite aftosa e endodôntico, e em diversas outras áreas <sup>31</sup>. Sua utilização iniciou-se em 1969 com Schroeder com os estudos sobre inibição de crescimento de biofilmes e placas, e, alguns anos depois, Loe e Schiott fizeram um estudo definitivo para inibição de formação de cáries através da inibição da formação de placas dentais. Atualmente existem diversos estudos sobre a CLX tanto na odontologia como em outros ramos na área da saúde, o que comprova que o fármaco continua sendo vastamente utilizado.

Uma característica da CLX que chama a atenção é a sua substantividade, que indica qual é a tendência da molécula em ligar-se à determinada superfície oral. No caso da clorexidina, ela apresenta tendência a ligar-se à dentina, o que faz com que as moléculas do fármaco ao entrarem em contato com a cavidade oral interajam com a dentina. Depois de ligar-se à dentina, a CLX é liberada lentamente e é retida por um tempo maior na cavidade oral, prolongando a sua ação antimicrobiana <sup>32</sup> podendo ser bacteriostática (inibe o crescimento das bactérias) ou bactericida (mata as bactérias), dependendo da dose administrada. Em baixas concentrações, apresenta efeito bacteriostático e, em altas concentrações, efeito bactericida <sup>32</sup>. Ela atua sobre uma variedade de microrganismos como as bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos, leveduras e alguns vírus <sup>7</sup>.

O mecanismo de ação antimicrobiano da clorexidina ocorre por sua interação química com a membrana celular das bactérias. A membrana celular é negativamente carregada, sendo composta por sulfatos e fosfatos. Como a CLX apresenta carga positiva, ela é atraída eletrostaticamente pela superfície celular, resultando em uma adsorção específica e forte devido aos grupamentos fosfato. Isso

faz com que a integridade da membrana celular da bactéria seja alterada, fazendo com que a CLX seja atraída para a membrana celular interna. Esta atração pela membrana faz com que a concentração local de CLX aumente ao ponto de danificar a membrana. A CLX liga-se aos fosfolipídios na membrana interna, permitindo o vazamento de compostos de baixo peso molecular de dentro da célula, como íons potássio. Ocorre a coagulação e precipitação do citoplasma pela formação de complexos de fosfato, complexos os quais incluem adenosina trifosfato e ácidos nucleicos. Por fim, chega em um estado bactericida irreversível <sup>7</sup>.

Além de apresentar propriedades antimicrobianas, outra vantagem do uso da CLX é a relativa ausência de citotoxicidade (relativamente não tóxico aos tecidos vitais) e apresenta biocompatibilidade aceitável, quando utilizada em concentrações clínicas (2%) <sup>33</sup>.

## 2.11 - Ensaio Biológico

A ação antimicrobiana dos nanocompósitos de magnetita e quitosana para o transporte e liberação de clorexidina foram testados frente às cepas de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* <sup>34</sup>.

O teste foi feito avaliando a concentração inibitória mínima (MIC) para determinar qual a concentração mínima de clorexidina necessária para inibir o crescimento das células após 48 horas <sup>34</sup>. A Tabela 2.2 mostra os valores de MIC para as duas espécies analisadas obtidas por Vieira et al. <sup>34</sup> empregando o mesmo sistema de quitosana/magnetita/clorexidina.

TABELA 2.2 - Valores de concentração inibitória mínima para as nanopartículas de óxido de ferro (IONP), quitosana (CS), clorexidina (CLX) e do nanossistema para cada cepa <sup>34</sup>.

<b>Espécies</b>	<b>IONPs</b> (MIC µg/mL)	<b>CS</b> (MIC µg/mL)	<b>CLX</b> (MIC µg/mL)	<b>IONPs-CS- CLX</b> (MIC µg/mL)
<b><i>S. mutans</i></b>	> 140	> 140	0,78 – 1,56	0,78
<b><i>C. albicans</i></b>	> 140	> 140	6,25 – 12,5	3,125 – 6,25

Observa-se que os valores da concentração inibitória mínima do sistema de nanopartículas e a quitosana sem clorexidina não foram capazes de inibir o crescimento celular das duas espécies analisada na maior concentração estudada (140 µg/mL). Por outro lado, o nanocomposito com clorexidina mostrou valores de MIC menores que da clorexidina pura. Esses resultados revelam que não houve interação sinérgica entre os compostos presentes no nanossistema frente aos microrganismos testados, mas uma tendência de melhora da ação da clorexidina quando ligada as nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana <sup>34</sup>.

Concluiu-se então que o nanossistema é tão efetivo quanto, ou ainda melhor, que o fármaco puro dependendo do microrganismo em questão.

### 3 - OBJETIVOS

A hipótese que sustenta o projeto é que o uso combinado de quitosana e nanopartículas magnéticas recobertas com polietilenoglicol permitirá a incorporação de medicamentos para uma liberação controlada e melhorará a sua atuação.

Dessa forma, os objetivos do projeto foram:

- Chegar a um protocolo de síntese que permitisse a síntese de nanopartículas de magnéticas de óxido de ferro com a superfície recoberta com uma camada de quitosana e a incorporação de clorexidina nesse sistema;
- Avaliar o efeito da inserção de nanopartículas magnéticas em uma matriz de quitosana, através de caracterizações estruturais, visando a formação de um novo material para ser empregado como carreador de antibiótico de ação odontológica. Espera-se que a modificação contribuísse para uma melhor ação do medicamento sobre diversos microorganismos normalmente presentes na cavidade bucal, e que resulte em benefícios para a saúde bucal;
- Controlar e avaliar a cinética de liberação de fármacos em ambientes biológicos a partir das características estruturais e morfológicas das nanopartículas modificadas.

## 4 - Procedimento Experimental

### 4.1 - Reagentes e Equipamentos

Os reagentes utilizados para a síntese dos nanocompósitos com e sem incorporação de fármaco estão listados na TABELA 4.1 e os equipamentos utilizados nas caracterizações estão listados na TABELA 4.2.

TABELA 4.1 - Fórmula química, fabricante e grau de pureza dos reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula Química	Fabricante e Grau de Pureza
Ácido Acético	CH <sub>3</sub> COOH	Synth 95%
Ácido Clorídrico	HCl	Sigma-Aldrich 37%
Cloreto de Potássio	KCl	Vetec P.A.
Cloreto de Sódio	NaCl	Synth 99,3%
Clorexidina	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>10</sub>	Sigma-Aldrich >99,5%
Fosfato Dissódico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Synth 98,0%
Fosfato Monopotássico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	99,0%
Óxido de Ferro (Magnetita)	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	nChemi
Quitosana	-	Sigma-Aldrich

TABELA 4.2 - Marca e modelo dos equipamentos utilizados.

<b>Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Analizador Termogravimétrico	NETSCH	TG 209 F1
Difratômetro de Raios X	Shimadzu	XRD 6000
DLS	Malvern	ZS-90
Espectrofotômetro de UV-Vis	Jasco	V-660
Espectrômetro de Infravermelho	Brucker	EQUINOX 55
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear	Brucker	Avace III
Microscópio Eletrônico de Transmissão em Alta Resolução	FEI TECNAI	F20

## 4.2 - Síntese dos Nanocompósitos com e sem Clorexidina

Uma solução homogênea de quitosana 1,4 mg/mL foi preparada de acordo com o método descrito por LEMMA et al. (2016)<sup>35</sup> com modificações. A quitosana foi solubilizada em ácido acético 2% sob agitação mecânica com barras magnética constante durante 24 horas a temperatura ambiente. A suspensão coloidal de nanopartículas de óxido de ferro comercial ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  - magnetita) 2,0 mg/mL foi cedida pela empresa *nChemi*, de São Carlos, São Paulo, Brasil. Diluiu-se a suspensão até que se obteve uma solução 1,4 mg/mL. O nanocompósito foi preparado por um processo de simples mistura entre 2,5 mL da solução de quitosana e 2,5 mL da suspensão de magnetita. A Tabela 4.3 resume a composição dos sistemas analisados.

TABELA 4.3 - Identificação e concentração dos Nanocompósitos.

Magnetita (mg/mL)	Quitosana (mg/mL)	Identificação (razão Magnetita:Quitosana)
1,4	1,4	1:1
1,4	4,2	1:3
1,4	7,0	1:5
1,4	9,8	1:7
1,4	14	1:10
1,4	21	1:15
1,4	28	1:20

Variou-se a concentração da quitosana para avaliar a variação do tamanho do nanocompósito em função desse parâmetro.

Preparou-se também o nanocompósito inserindo clorexidina na matriz polimérica de quitosana (no Nanocompósito 1:1). Para isso, adicionou-se 2,5 mg de clorexidina em 2,5 mL da solução de quitosana e deixou-se sob agitação magnética durante 30 minutos a temperatura constante. Em seguida, adicionou-se a essa solução 2,5 mL da suspensão de magnetita, obtendo-se um nanossistema com 500µg/mL de fármaco.

Este projeto de pesquisa é uma parceria com o grupo do Prof. Douglas R. Monteiro. Antes da análise físico-química presente neste projeto, foram feitos os ensaios biológicos e avaliação da eficácia do material frente à diversos microorganismos pelo grupo do prof. Douglas. Neste momento, optou-se por utilizar o nanocompósito de composição 1:1 de magnetita:quitosana e a concentração 500µg/mL de clorexidina e, para dar continuidade no trabalho, optou-se por manter as concentrações nas avaliações físico-químicas.<sup>34</sup>

### 4.3 - Testes de Liberação

Preparou-se uma solução tampão de fosfato salino (PBS), adicionando 8 g de NaCl, 200 mg de KCl, 1,76 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 240 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 800 mL de água destilada. A mistura foi agitada manualmente por 5 minutos após cada adição.

Ajustou-se o pH a 7,4 com HCl e, em seguida, adicionou-se água destilada até completar 1 L.

Separou-se o nanocompósito com clorexidina do sobrenadante com o auxílio de um ímã. Manteve-se o ímã em contato com o fundo do tubo de polipropileno com tampa até que todas as partículas magnéticas decantassem. Em seguida, mantendo o contato do ímã com o tubo, entornou-se o sobrenadante em outro tubo, armazenando-o para análise. Iniciou-se então o teste de liberação. Deixou-se um volume de PBS em banho térmico na temperatura na qual o teste de liberação estava sendo conduzido. Adicionou-se PBS ao nanocompósito até completar 5 mL, colocou-se o sistema no aquecimento e deixou-se até completar 15 minutos. Retirou-se a primeira alíquota com auxílio do ímã, da mesma maneira que se retirou o primeiro sobrenadante. Em seguida, adicionou-se PBS até completar 5 mL e novamente o sistema foi colocado sob aquecimento. Repetiu-se o procedimento, retirando alíquotas em 0,25, 0,50, 0,75, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 48, 72 e 96 horas <sup>21</sup>. O teste foi conduzido nas temperaturas 25°C, 37°C, 43°C e 50°C, todos em triplicata. As amostras de sobrenadantes retiradas foram analisadas por espectroscopia de UV-Vis.

#### **4.4 - Caracterização dos Reagentes e dos Nanocompósitos**

As amostras obtidas foram caracterizadas por: Análise Termogravimétrica, Espalhamento Dinâmico de Luz, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Difração de raios X e Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta e visível (UV-Vis).

##### **4.4.1 - Análise Termogravimétrica (TG)**

O comportamento térmico das amostras foi estudado utilizando um equipamento da marca NETZSCH modelo TG 209 F1 com razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> com vazão de 20 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura empregada variou de 25 à 800°C em suporte de alumina usando ± 10 mg das amostras.

#### **4.4.2 - Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)**

O espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês, dynamic light scattering) foi utilizada para a determinação do tamanho hidrodinâmico das partículas coloidais. As medidas de DLS foram realizadas em temperatura ambiente (25°C) usando um Zetasizer Nano ZS-90 da Malvern Instruments.

#### **4.4.3 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As imagens de microscopia de transmissão das nanopartículas de magnetita foram realizadas em um microscópio TECNAI F20, operando a 200 kV. As amostras foram depositadas em uma grade de cobre coberta com uma fina camada de carbono amorfo.

#### **4.4.4 - Difração de raios X (DRX)**

A DRX foi utilizada para a caracterização da estrutura cristalina e para estimativa do tamanho médio das partículas de magnetita. Os difratogramas foram obtidos de amostras na forma de pó. Utilizou-se o equipamento Shimadzu modelo XRD 6000, com fonte de radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ), voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA. As medidas foram feitas em varredura contínua no intervalo de  $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$ , a uma velocidade de varredura de  $0,2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ . A identificação estrutural das amostras analisadas foi feita comparando os difratogramas obtidos com padrões disponíveis em bancos de dados "Joint Committee on Powder Diffraction Standards – Powder Diffraction File (JCPDS - PDF).

#### **4.4.5 - Espectroscopia de UV-Vis**

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível das suspensões coloidais de magnetita e quitosana foram obtidos em um espectrofotômetro de duplo feixe (Jasco V-660) na região de 300 nm a 800 nm

utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico e água como líquido padrão.

#### **4.4.6 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Átomos de Hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H)**

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III operando em um campo magnético Oxford de 9,4 Tesla, que tem relacionada uma frequência de 400 MHz para o núcleo de hidrogênio-1. As análises em solução foram realizadas com o uso de uma sonda sintonizável para uma ampla faixa de frequência (40 – 160 MHz) utilizando tubos de 10 mm de diâmetro.

#### **4.4.7 - Espectroscopia de FT-IR**

Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 400. As amostras foram dispersas em KBr e prensadas na forma de pastilhas. Os espectros foram registrados no intervalo de 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> correspondendo à região do infravermelho médio. Esta técnica foi utilizada para a identificação dos grupos funcionais presente nas amostras de óxido de ferro magnético e óxido de ferro magnético – quitosana e óxido de ferro magnético – quitosana – clorexidina.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Difração de Raios X (DRX)

Os padrões de DRX para as nanopartículas puras de magnetita (IONPs) e dos nanocompósitos de quitosana e magnetita puros (IONPs-CS) e com clorexidina (IONPs-CS-CLX) estão representados na figura 5.1:

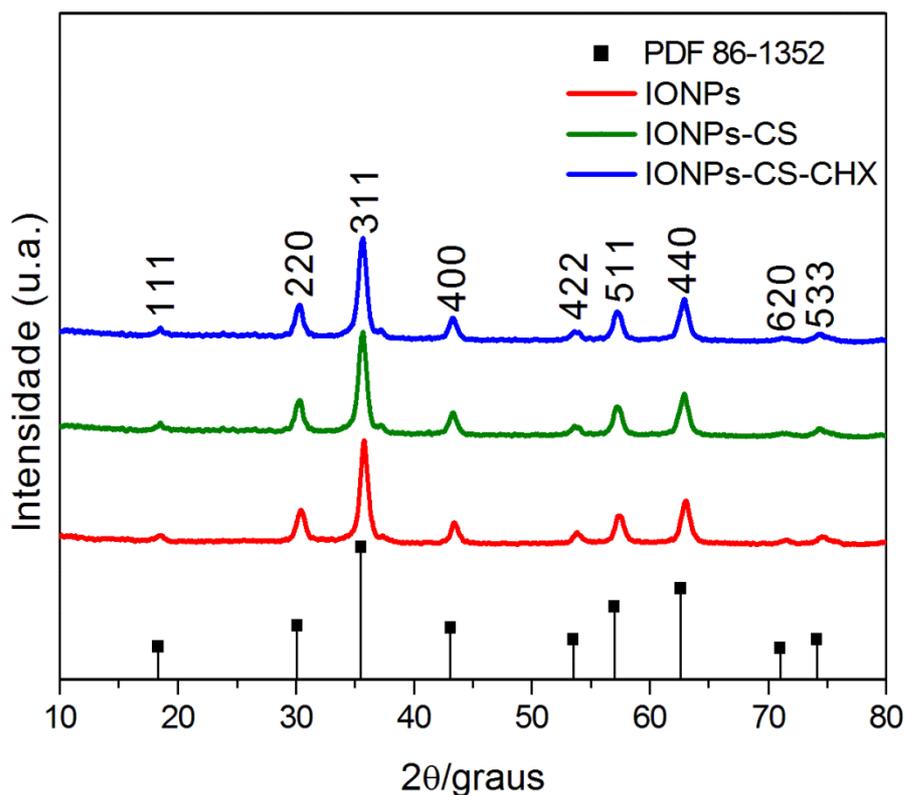


FIGURA 5.1 - Padrões de DRX obtidos para as nanopartículas de óxido de ferro puras (IONPs), para o nanocompósito (IONPs-CS) e para o nanocompósito com clorexidina (IONPs-CS-CLX).

Todos os compostos apresentam os picos típicos de um sistema cúbico de face centrada (PDF nº 86-1362) com planos cristalográficos representados pelos índices (1 1 1), (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), (4 4 0), (6 2 0) e (5 3 3), característicos da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) com estrutura espinel. Os difratogramas obtidos para o material com quitosana e com quitosana e clorexidina se mostraram idênticos aos difratogramas da magnetita pura, isso mostra que a adição dos compostos não

resultou em alterações nas propriedades estruturais cristalinas das nanopartículas nem induziu qualquer tipo de cristalização da quitosana<sup>34</sup>.

## 5.2 - Espectroscopia no IV

A figura 5.2 apresenta os espectros na região do infravermelho obtidos para a magnetita pura (IONPs) e para os nanocompósitos puros (IONPs-CS) e com clorexidiana (IONPs-CS-CLX).

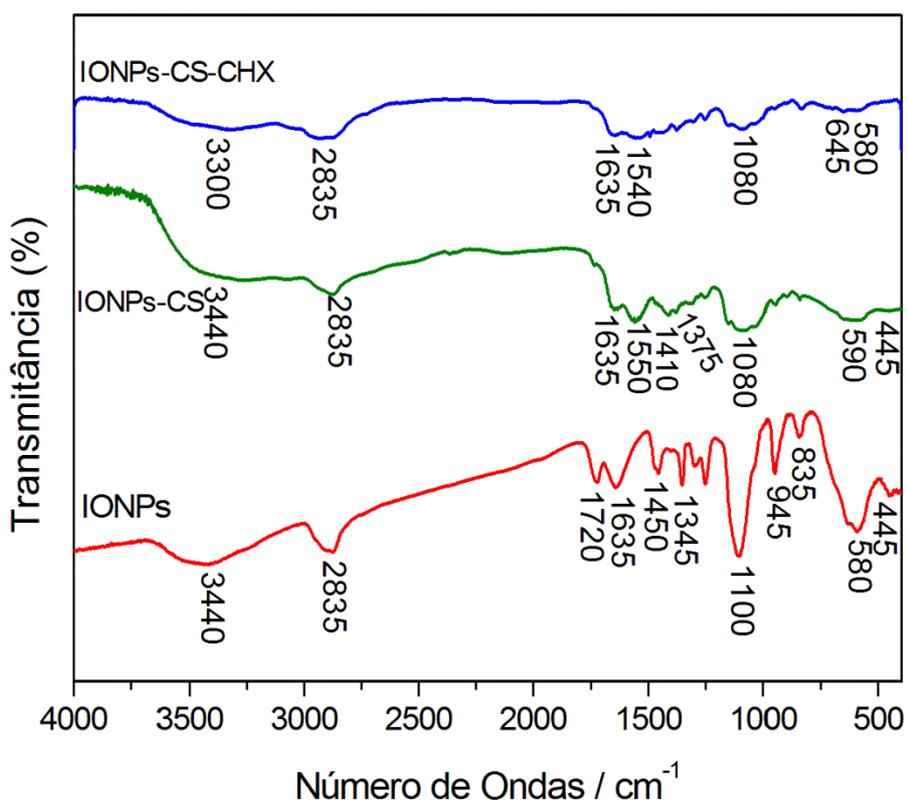


FIGURA 5. 2- Espectros de IV obtidos para as nanopartículas de óxido de ferro puras (IONPs), para o nanocompósito (IONPs-CS) e para o nanocompósito com clorexidina (IONPs-CS-CLX).

Observa-se dois picos de absorção em aproximadamente  $3440\text{ cm}^{-1}$  e em  $1635\text{ cm}^{-1}$  no espectro de IONPs, os quais podem ser atribuídos, respectivamente, às vibrações de estiramento e de deformação H-O-H. Enquanto que o sinal observado em aproximadamente  $580\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento Fe-O, característico da magnetita. No segundo espectro, IONPs-CS, é possível observar picos relativos à quitosana e inferir que as nanopartículas estão efetivamente recobertas pelo polímero.

A banda em  $3440\text{ cm}^{-1}$  pode ser associada com os estiramentos N-H e O-H da quitosana. Os picos relacionados ao estiramento C-H do anel presente na estrutura da quitosana são observados nas regiões de  $2865\text{ cm}^{-1}$  e  $1410\text{ cm}^{-1}$ , possivelmente representando vibrações simétricas e assimétricas. Os picos próximos a  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1055\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídos às vibrações de estiramento do grupo amida (C=O) e da ligação glicosídica (-C-O-C-), respectivamente. No terceiro espectro do IONPS-CS-CLX, é possível notar que as principais bandas de absorção foram mantidas após a incorporação do fármaco. Os sinais em torno de  $3300\text{ cm}^{-1}$ ,  $1550\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080\text{ cm}^{-1}$  e  $835\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídos, respectivamente, às vibrações dos grupos funcionais iminas (N-H), amidas (N-H), Cl- e CH- ligados à grupos funcionais aromáticos, o que confirma a presença de clorexidina no nanosistema.<sup>34</sup>

### **5.3 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Espectroscopia de Raios X por dispersão de energia (EDX) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)**

A morfologia e o tamanho das partículas foram avaliados por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e pelos dados obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS):

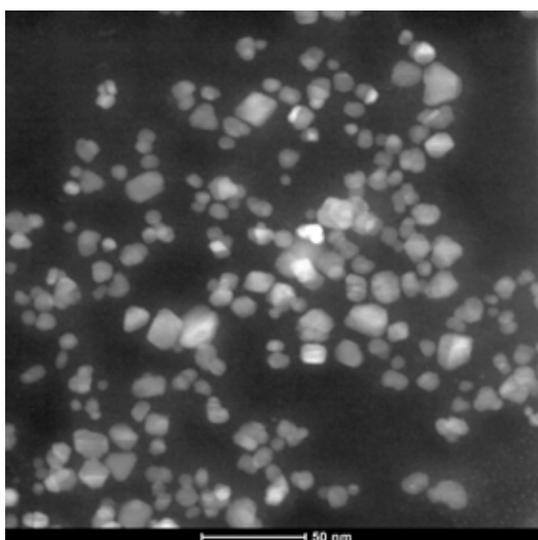


FIGURA 5.3 - Imagem obtida através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da magnetita pura (IONPs).

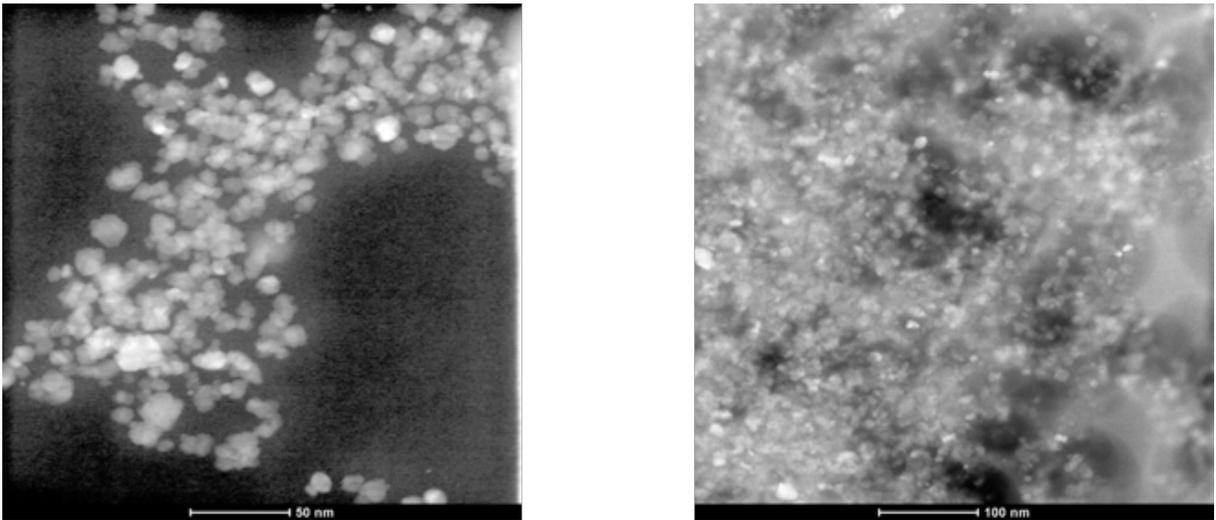


FIGURA 5.4 - Imagem obtida através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) do nanocompósito puro (IONPs-CS) nas proporções 1:1 (Magnetita:Quitossana) e 1:10.

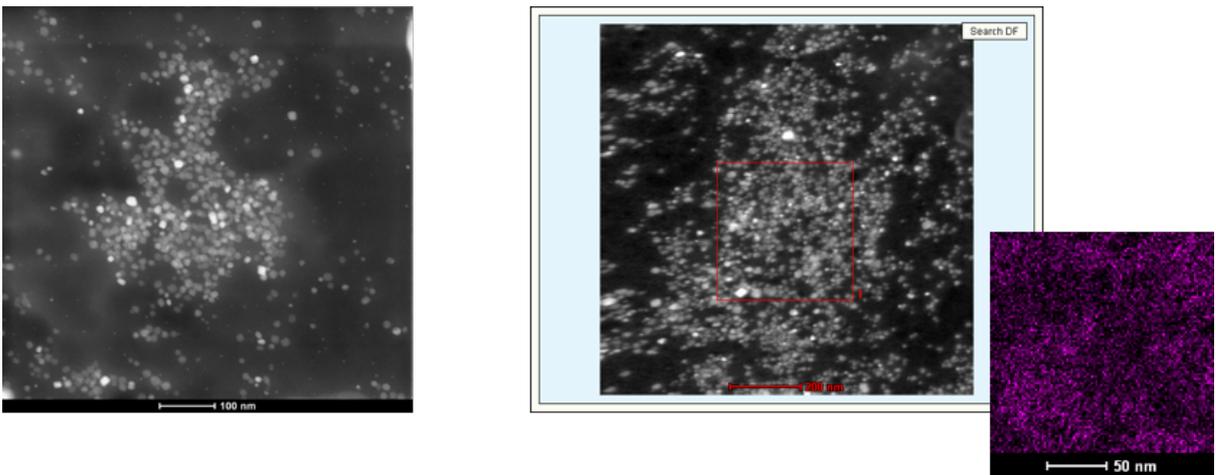


FIGURA 5.5 - Imagem obtida através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) do nanocompósito com clorexidina (IONPs-CS-CLX). Imagem obtida por Espectroscopia de Raios-X por dispersão em energia (EDX), com mapeamento de átomos de cloro.

Observa-se, pelas imagens de TEM (Fig.5.3) que as partículas de óxido de ferro apresentam morfologia esférica com tamanho médio de 11 nm. Também é possível observar nas imagens da Figura 5.4 que a magnetita mantém seu formato esférico na presença da quitossana. O tamanho médio das partículas do nanocomposito (quitossana+magnetita) determinado através da técnica de

espalhamento dinâmico de luz. Para os nanocompósitos IONPs-CS obteve-se os resultados apresentados no gráfico abaixo:

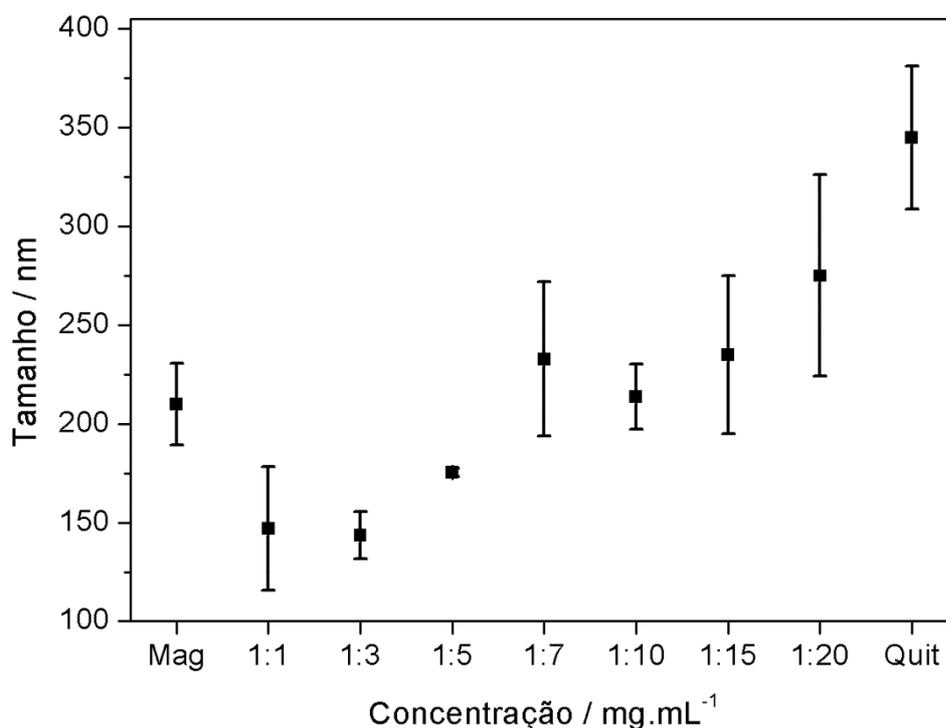


FIGURA 5.6 - Gráfico com a variação do tamanho das partículas de acordo com o aumento da proporção magnetita:quitosana obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

É possível observar na Fig.5.6 que as maiores partículas dos nanocompósitos são aquelas com maior quantidade de quitosana em sua composição. O diâmetro hidrodinâmico das amostras de nanocomposito é relativamente estável até frações de 10% em massa de nanopartículas de magnetita em quitosana. A partir desta composição, as partículas aumentam de tamanho linearmente com o aumento da fração de quitosana, o que sugere que a magnetita foi de fato recoberta pela quitosana.

A figura 5.5 mostra uma imagem de microscopia de IONPs-CS-CLX e a distribuição de cloro na amostra obtidas dos espectros de dispersão de raios X (EDX) indicada pela cor violeta. Os átomos de cloro foram mapeados pois é o único elemento que é encontrado apenas nas moléculas de CLX, assim podemos observar que as moléculas de CLX estão homogeneamente distribuídas pela matriz de quitosana.

## 5.4 - Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 5.7 mostra as curvas da análise termogravimétrica das amostras de IONPs, IONPs-CS e IONPs-CS-CLX:

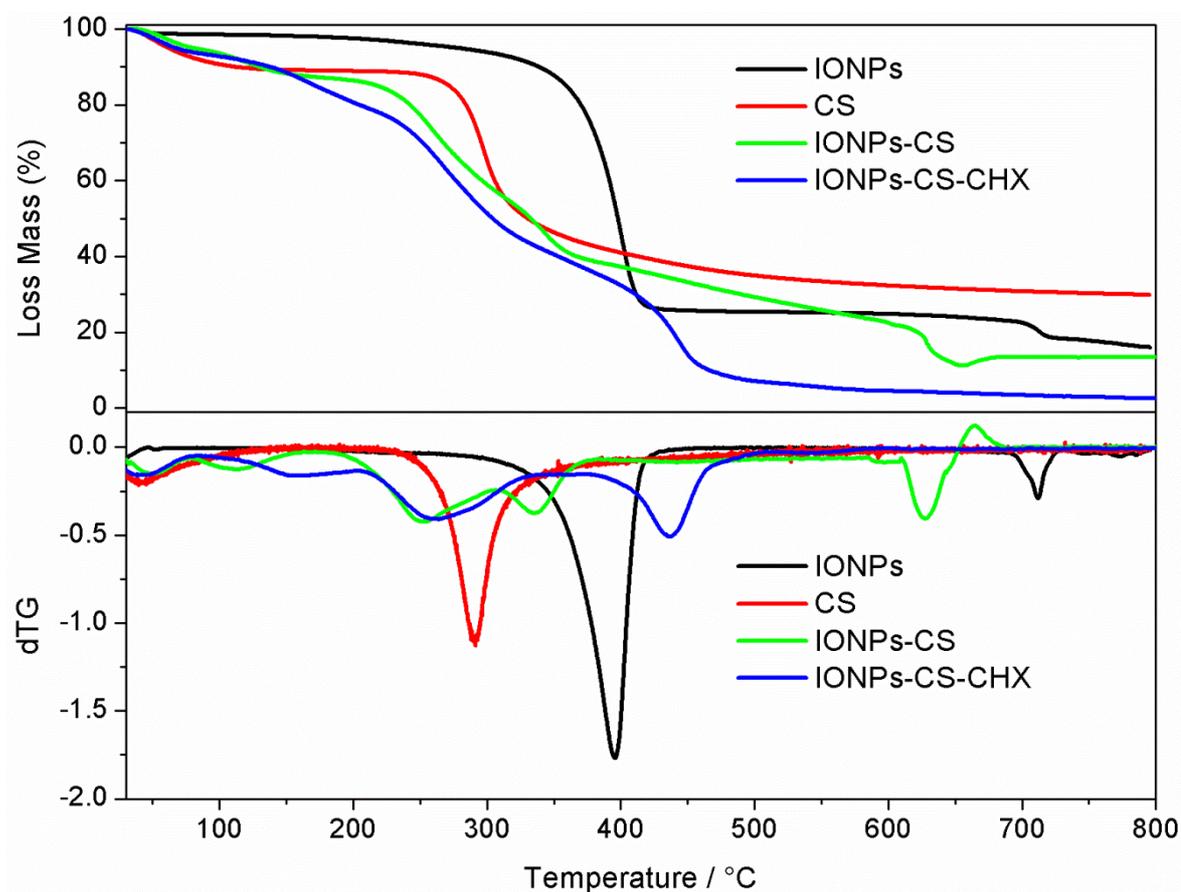


FIGURA 5.7 - Curvas de degradação obtidas por Análise Termogravimétrica (TGA) para as nanopartículas de óxido de ferro puras (IONPs), para o nanocompósito (IONPs-CS) e para o nanocompósito com clorexidina (IONPs-CS-CLX).

A análise termogravimétrica indicou uma perda de massa de aproximadamente 80 % para a amostra de IONPs na faixa de temperatura entre 25 e 400 °C. A degradação térmica ocorreu em duas etapas, a primeira foi associada a degradação da camada orgânica de polietileno presente na superfície das partículas de IONPs <sup>36</sup>. A segunda perda de massa ocorreu em torno de 700 °C e foi associada a transição de fase da maghemita (-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) para hematita (-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Pode-se observar na

curva termogravimétrica para IONPs-CS uma perda de massa total de cerca de 88%. Comparando a perda de massa da amostra de IONPs com a de IONPs-CS, sendo a da segunda maior que a da primeira, pode-se inferir que houve a ligação entre a quitosana e a magnetita. Para a amostra de IONPs-CS-CLX, a perda de massa observada abaixo de 200°C indica a perda de água que estava fisicamente adsorvida na superfície do material, enquanto que perdas de massa a cima dessa temperatura representa a degradação da quitosana e do fármaco. A perda de massa total da IONPs-CS-CLX foi maior que a observada para a amostra de IONPs-CS, o que indica que a adsorção do fármaco na superfície do nanocompósito ocorreu.

## **5.5 - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio <sup>1</sup>H-RMN**

As diversas aplicações da quitosana dependem do tipo de estrutura química do biopolímero e da existência de sítios ativos em seus grupos funcionais. Por essa razão, as quitosana são classificadas de acordo com o seu grau de acetilação (GA) que pode ser determinado por meio da espectroscopia magnética nuclear (<sup>1</sup>H-RMN). As amostras de quitosana pura foram dispersas D<sub>2</sub>O com HCl, na proporção D<sub>2</sub>O/HCl 100:1 v/v, obtendo-se uma dispersão de concentração 10 mg/mL. Essas misturas foram mantidas sob agitação a temperatura ambiente por 18 horas. A solubilização da quitosana é conseguida pela adição de algum ácido não oxidantes, como o ácido clorídrico<sup>37</sup>.

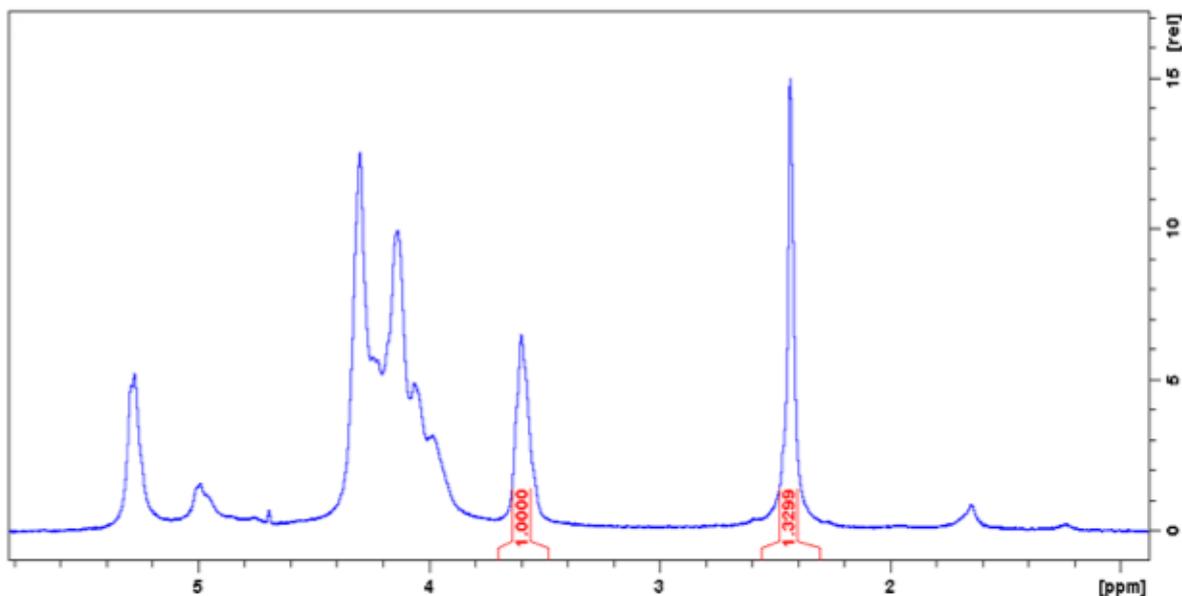


FIGURA 5.8 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio obtido para a quitosana.

A Fig.5.8 mostra o espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da quitosana usada para a preparação dos nanocompósitos. O grau de acetilação foi estimado a partir das áreas dos picos relativos aos prótons metílicos do grupo acetamido ( $\text{A}_{\text{CH}_3}$ ;  $\delta = 2,00$  ppm) e ao próton ligado ao carbono 2 do anel de glicosamina ( $\text{A}_{\text{H}_2}$ ;  $\delta = 3,12$  ppm).<sup>38</sup>

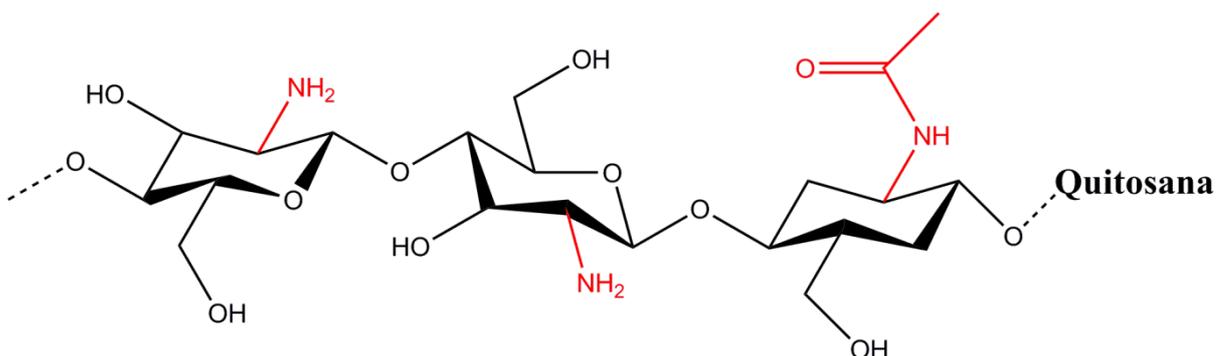


FIGURA 5.9 - Estrutura da molécula de quitosana <sup>17</sup>.

O espectro apresentou um deslocamento no sinal de cerca de 0,50 ppm em todo a região, o que foi associado a interferências na região que está sendo analisada que não foram corrigidas pela adição de HCl à solução. Dessa forma, tem-se que:

$$\% GA = \frac{A_{CH3}}{3A_{H2}} \cdot 100$$

$$\% GA = \frac{1,3299}{3,1,0000} \cdot 100$$

$$\% GA = 44,33$$

O grau de acetilação estimado foi de 44,33 %. Quando esse valor é menor que 50 %, o polímero é classificado como quitosana. Caso contrário, ainda seria classificado com quitina. De modo geral, quitosanas são solúveis em água em pH levemente ácido, o que pode ser conseguido adicionando uma pequena quantidade de ácido acético <sup>38</sup>.

## 5.6 - Testes de Liberação (Espectroscopia no UV-VIS)

A velocidade de liberação e incorporação da CLX nos nanocompósitos de quitosana e magnetita foi acompanhada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis e foi comparada ao sistema preparado com quitosana pura. Os nanocompósitos de quitosana/magnetita e a quitosana pura foi deixada em contato com uma solução de CLX em repouso por várias horas. Em seguida, as matrizes poliméricas foram removidas do sistema e a concentração de CLX remanescente foi determinada por espectroscopia de absorção na região do UV. A Tabela 5.1 mostra os resultados de incorporação da CLX pelo nanocomposito em diferentes temperaturas.

TABELA 5.1 - Porcentagens de absorção de clorexidina pelo nanocomposito.

Temperatura	Amostra (triplicata)			Média
	A	B	C	
25 °C	83,0%	84,0%	84,0%	83,6%
37 °C	87,0%	87,0%	84,0%	86,0%
43 °C	84,5%	84,0%	84,0%	84,2%
50 °C	86,0%	80,0%	85,0%	83,7%

Os resultados da Tabela 5.1 mostram a existência de um limite de saturação em torno de 84% de CLX que pode ser incorporada à quitosana com grau de acetilação de 44,33 %. Individualmente, a quantidade de CLX incorporada por cada amostra sugere que o sistema é bastante estável e reprodutivo, uma vez que a quantidade de fármaco absorvido por cada amostra foi praticamente a mesma.

As curvas da Fig.5.10 mostram a liberação de CLX em função do tempo em diferentes temperaturas. Acima de 40 °C, o sistema parece exibir o mesmo comportamento cinético para liberação da CLX, enquanto que para temperaturas menores que 40°C afeta fortemente a velocidade de liberação.. Chama a atenção a reprodutibilidade das curvas de liberação em 25 °C e 37 °C, que é o intervalo de temperatura de maior interesse biológico.

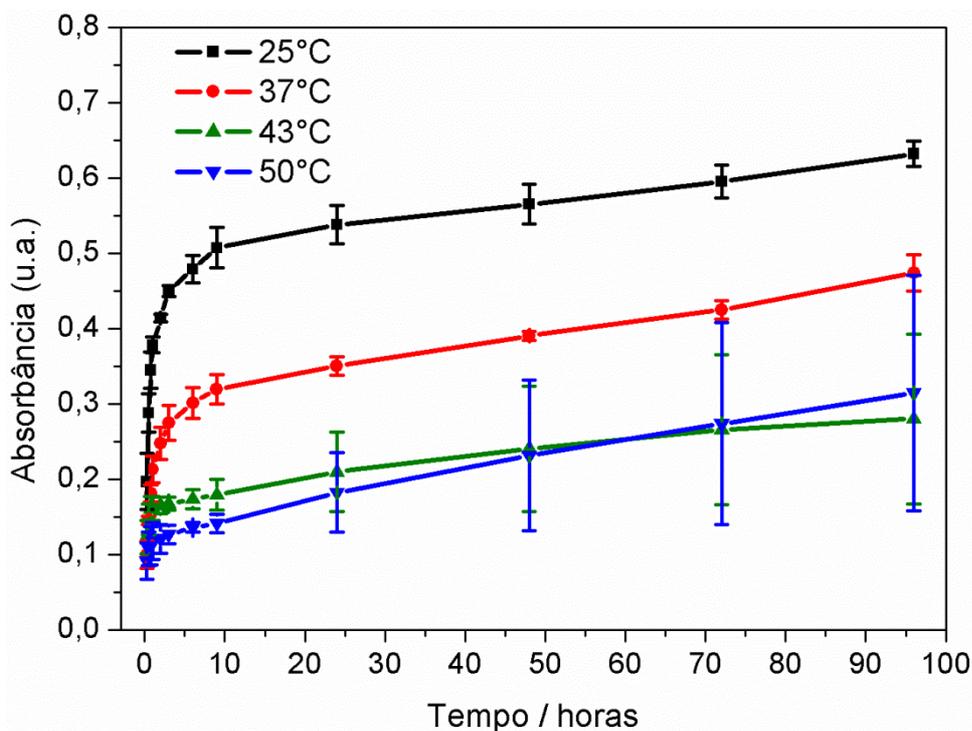


FIGURA 5.10 – Perfil de liberação da clorexidina a 25°C, 37°C, 43°C e 50°C.

A Fig.5.11 mostra a curva de calibração preparada com diferentes concentrações de clorexidina (10, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm) em função da absorbância da molécula.

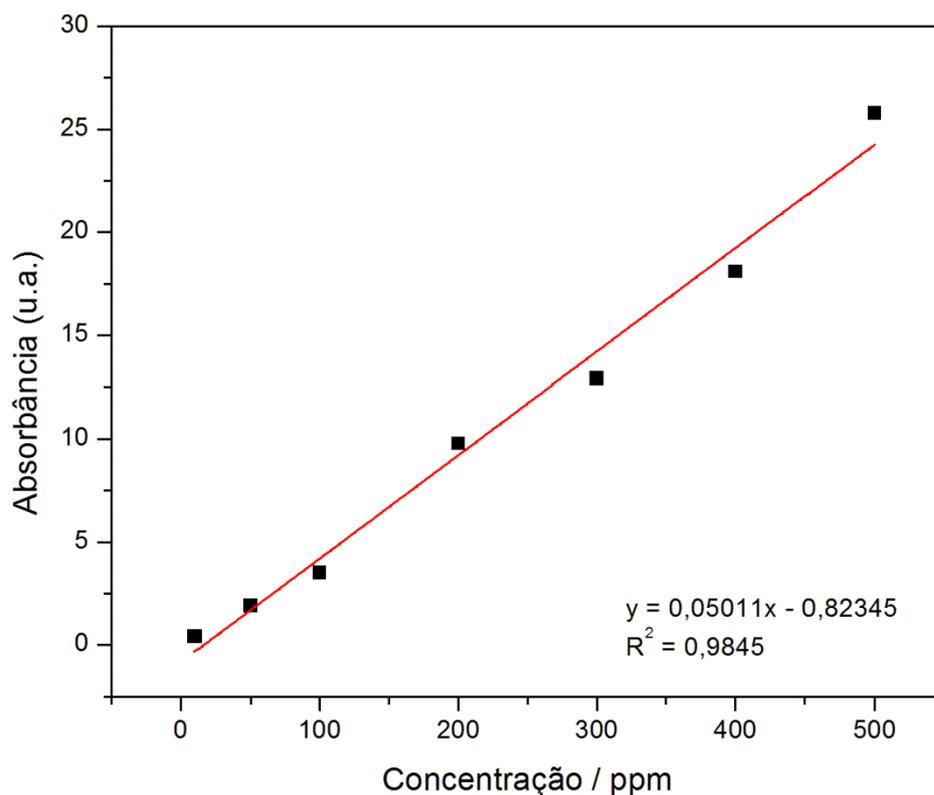


FIGURA 5.11 – Curva de calibração de clorexidina.

A partir da curva da curva da Fig.5.11, foi possível avaliar os resultados obtidos nos testes de liberação. Primeiro, determinou-se a porcentagem acumulativa de fármaco liberado durante os testes (Tabela 5.2).

TABELA 5.2 – Valores de porcentagem acumulativa de fármaco liberado.

Tempo (horas)	% Acumulativa de Fármaco Liberado			
	25°C	37°C	43°C	50°C
0,25	35,0	32,7	34,0	33,0
0,5	41,3	39,0	40,0	39,3
0,75	47,3	45,0	46,0	45,3
1	53,0	51,3	52,0	51,3
2	58,7	57,3	57,7	57,3
3	64,7	63,3	63,7	63,3
6	70,7	69,3	69,7	69,0
9	76,7	75,3	75,7	75,0
24	82,3	81,3	81,7	81,3
48	88,0	87,7	88,0	87,7
72	94,0	94,0	94,0	94,0
96	100,0	100,0	100,0	100,0

Com os valores da tabela, pode-se aplicar os modelos matemáticos descritos na revisão bibliográfica e identificar qual é o modelo que melhor descreve a liberação de clorexidina pelo nanocompósito.

### 5.6.1 - Modelo de Ordem Zero

Para estudar o modelo de Ordem Zero, foi necessário construir um gráfico de porcentagem acumulativa de fármaco liberado pelo tempo. Obteve-se então os seguintes gráficos para as 4 temperaturas analisadas neste trabalho:

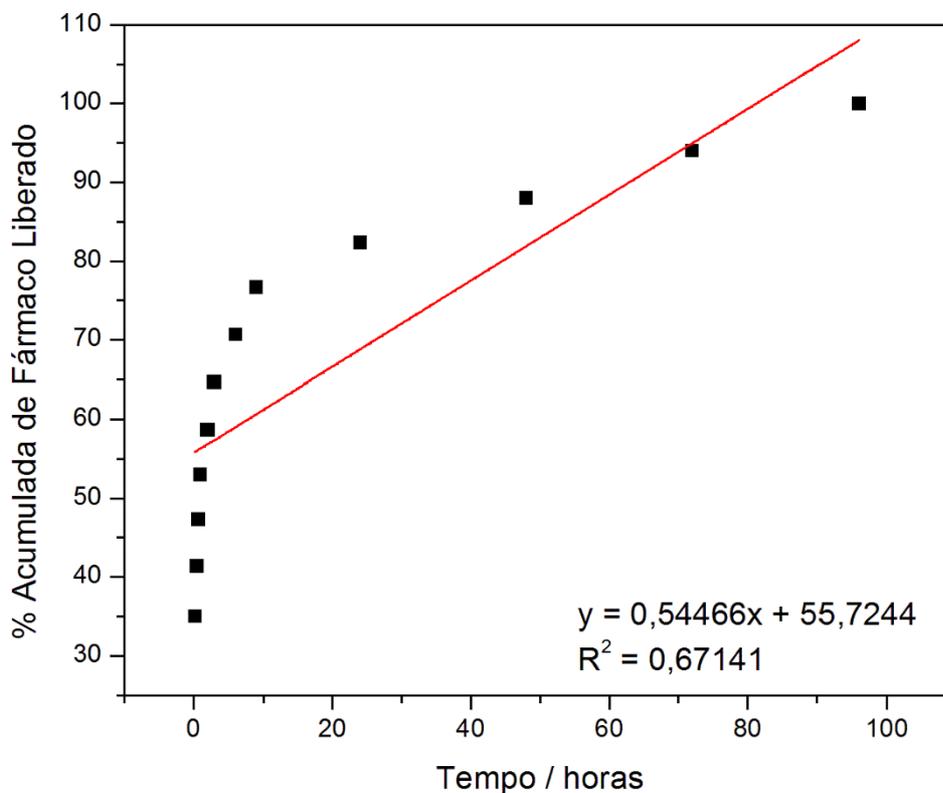


FIGURA 5.12 – Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo tempo a 25°C.

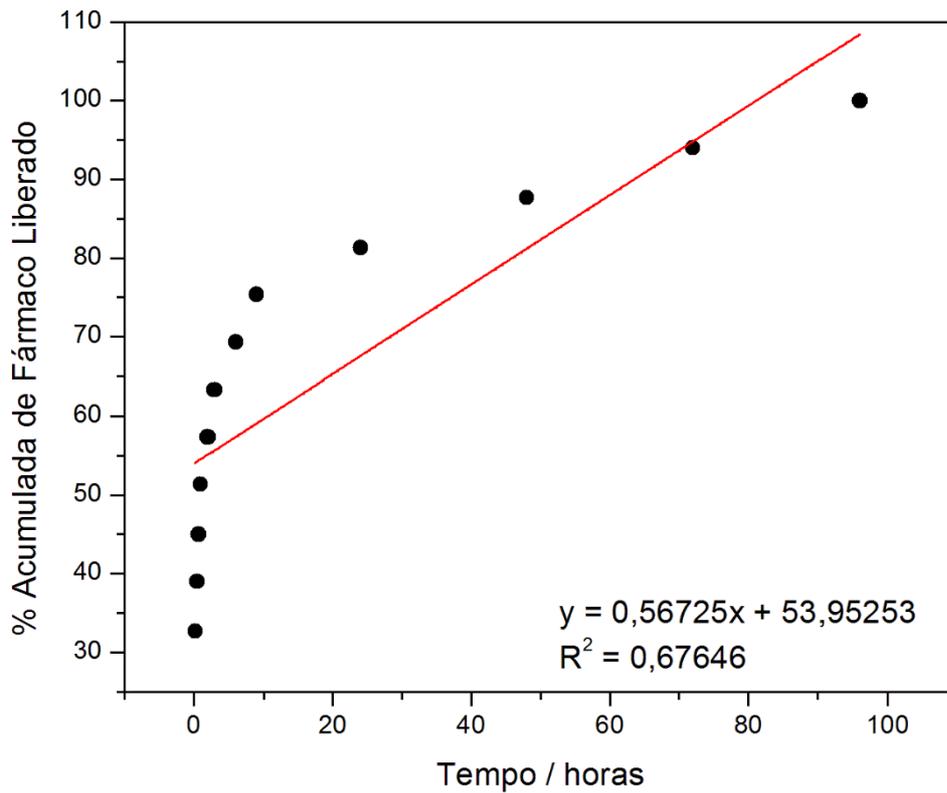


FIGURA 5.13 - Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo tempo a 37°C.

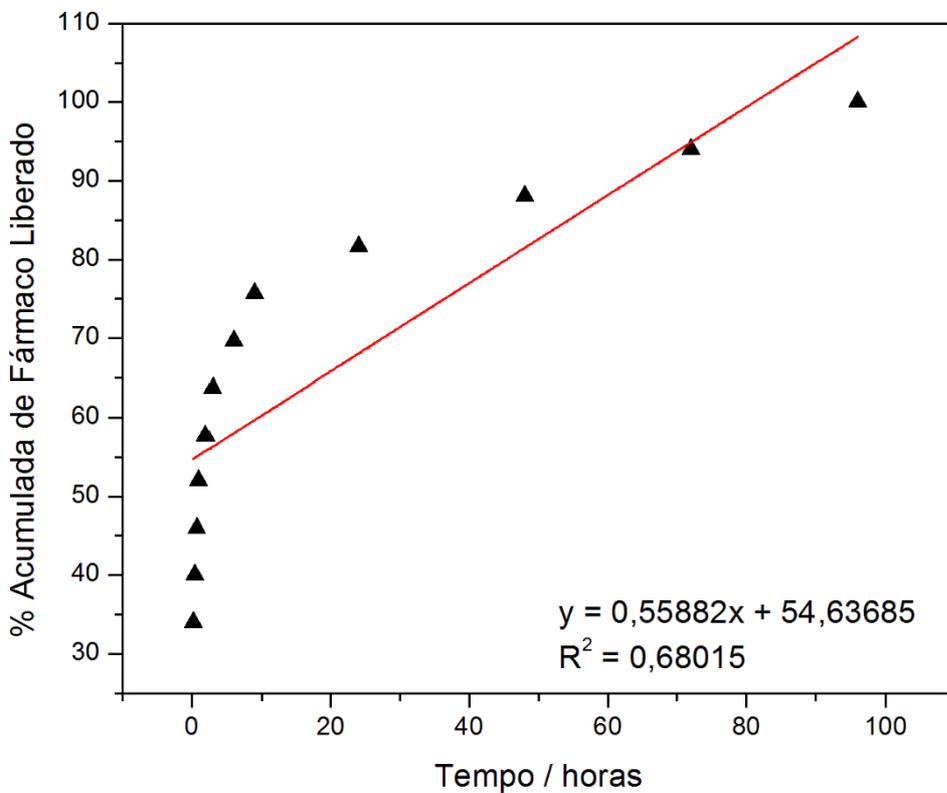


FIGURA 5.14 - Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo tempo a 43°C.

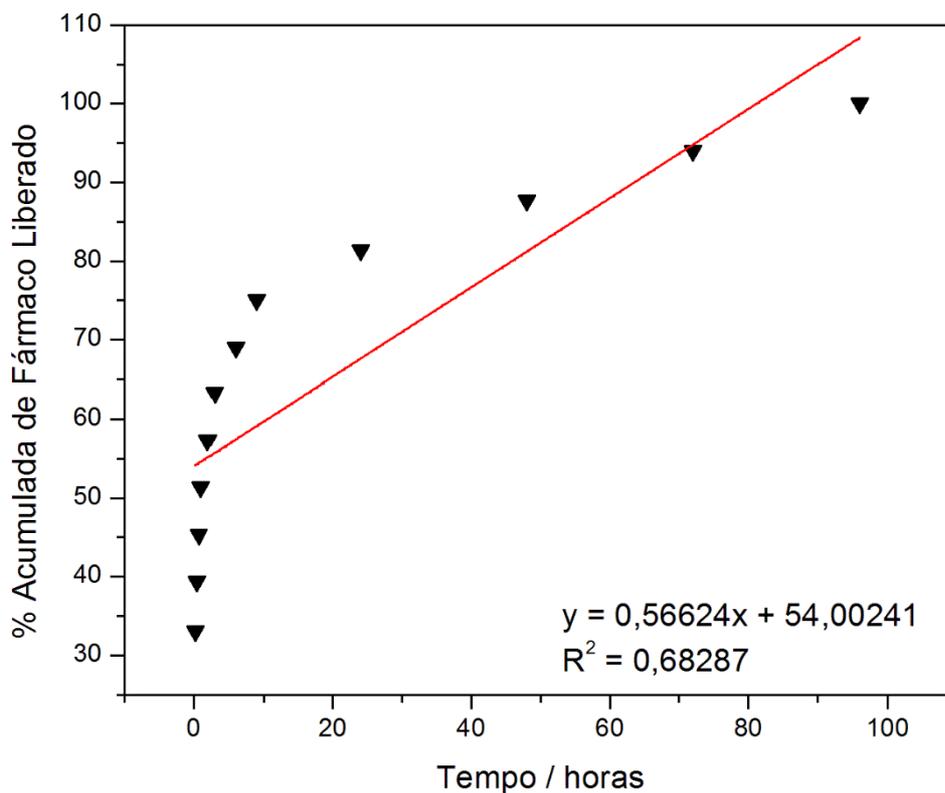


FIGURA 5.15 - Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo tempo a 50°C.

O modelo descreve o perfil de liberação caso o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) tenha o valor próximo de 1.

TABELA 5.3 – Valores do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para o modelo de Ordem Zero.

Coeficiente de Correlação ( $R^2$ )			
25°C	37°C	43°C	50°C
0,67141	0,67646	0,68015	0,68287

Pode-se observar que os valores estão muito distantes da curva então o coeficiente apresentou um valor baixo. Dessa forma, o modelo de liberação de ordem zero foi descartado.

### 5.6.2 - Modelo de Primeira Ordem

Para estudar o modelo de Primeira Ordem, é necessário construir um gráfico de porcentagem acumulativa de fármaco não-liberado pelo tempo. Obteve-se então as curvas mostradas nas figuras 5.16 até 5.19 obtidas nas 4 temperaturas analisadas.

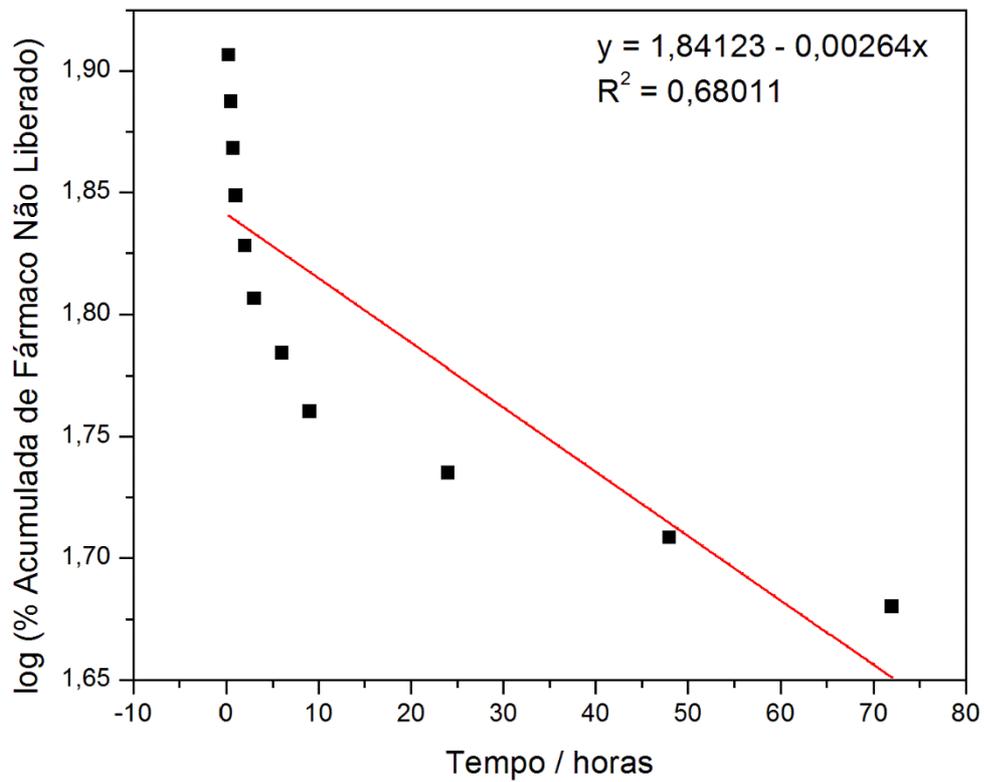


FIGURA 5.16 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco não liberado acumulado pelo tempo a 25°C.

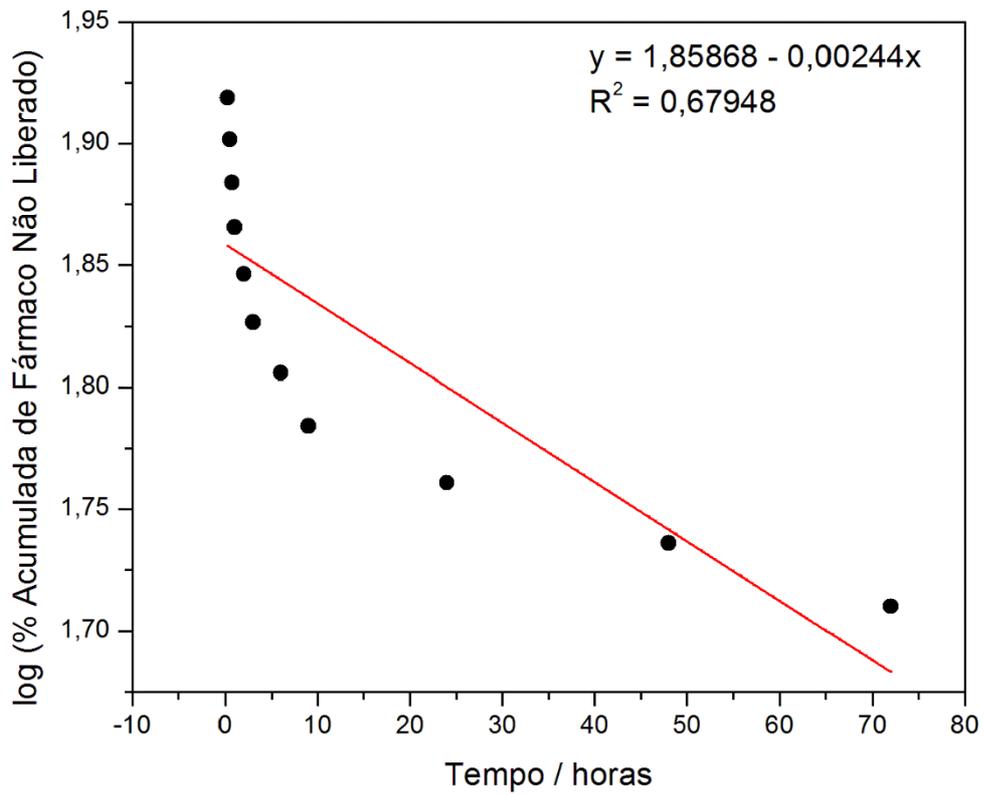


FIGURA 5.17 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco não liberado acumulado pelo tempo a  $37^\circ\text{C}$ .

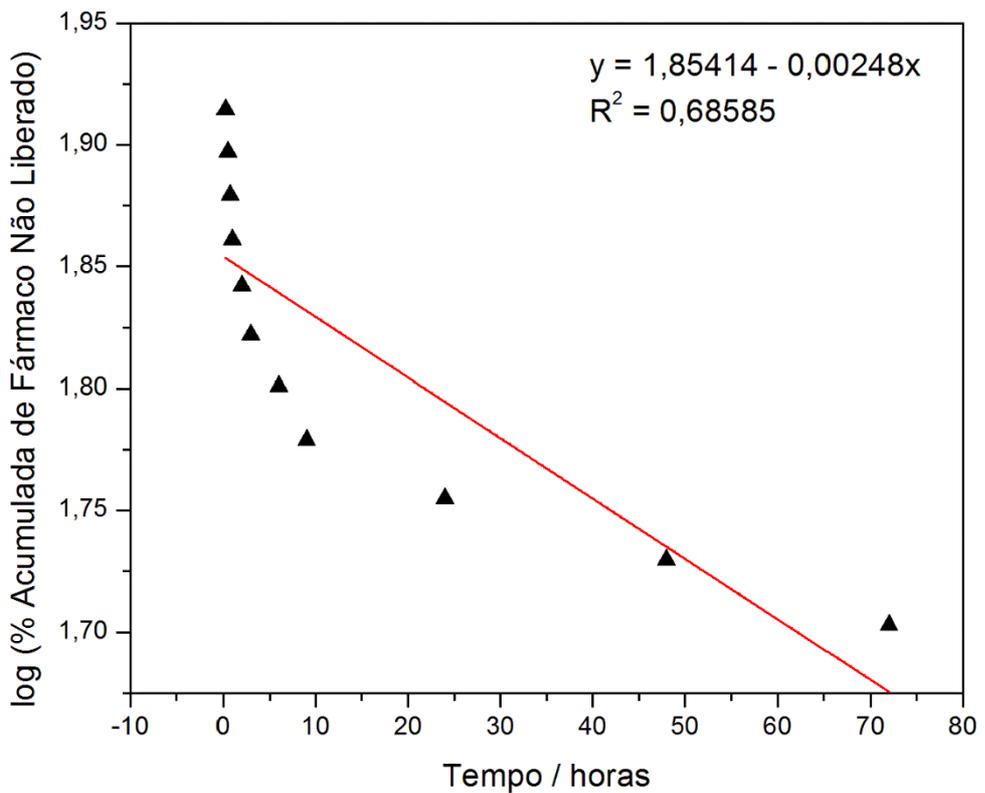


FIGURA 5.18 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco não liberado acumulado pelo tempo a 43°C.

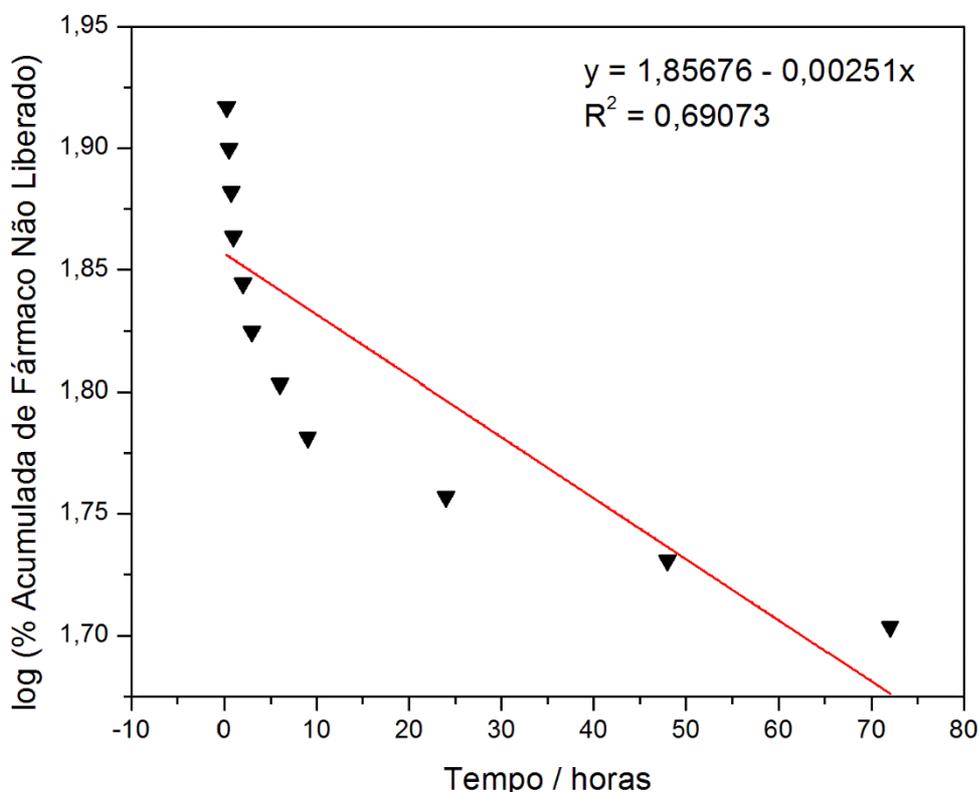


FIGURA 5.19 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco não liberado acumulado pelo tempo a 50°C.

O modelo descreve o perfil de liberação caso o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) tenha o valor próximo de 1.

TABELA 5.4 - Valores do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para o modelo de Primeira Ordem.

Coeficiente de Correlação ( $R^2$ )			
25°C	37°C	43°C	50°C
0,68011	0,67948	0,68585	0,69073

Pode-se observar que os valores estão muito distantes da curva então o coeficiente apresentou um valor baixo. Dessa forma, o perfil de liberação não é descrito pelo modelo de Primeira Ordem.

### 5.6.3 - Modelo Higuchi

Para estudar o modelo descrito por Higuchi, foi necessário construir um gráfico de porcentagem acumulativa de fármaco liberado pela raiz quadrada do tempo. Obteve-se então as curvas mostradas nas Figuras 5.20 até 5.23.

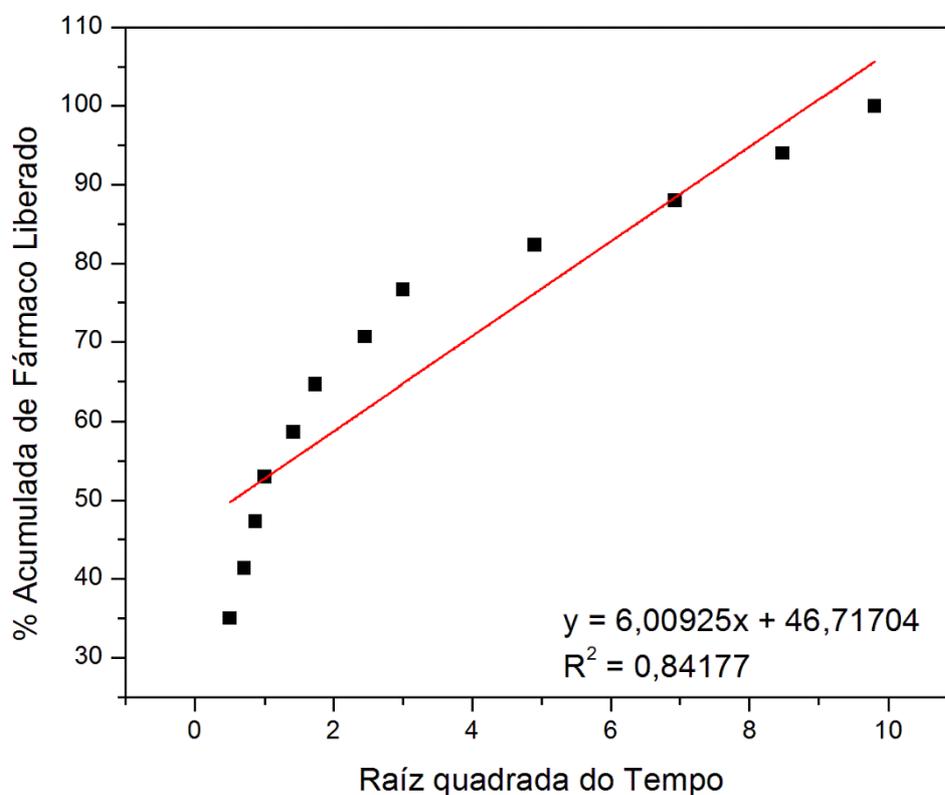


FIGURA 5.20 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pela raiz quadrada do tempo a 25°C.

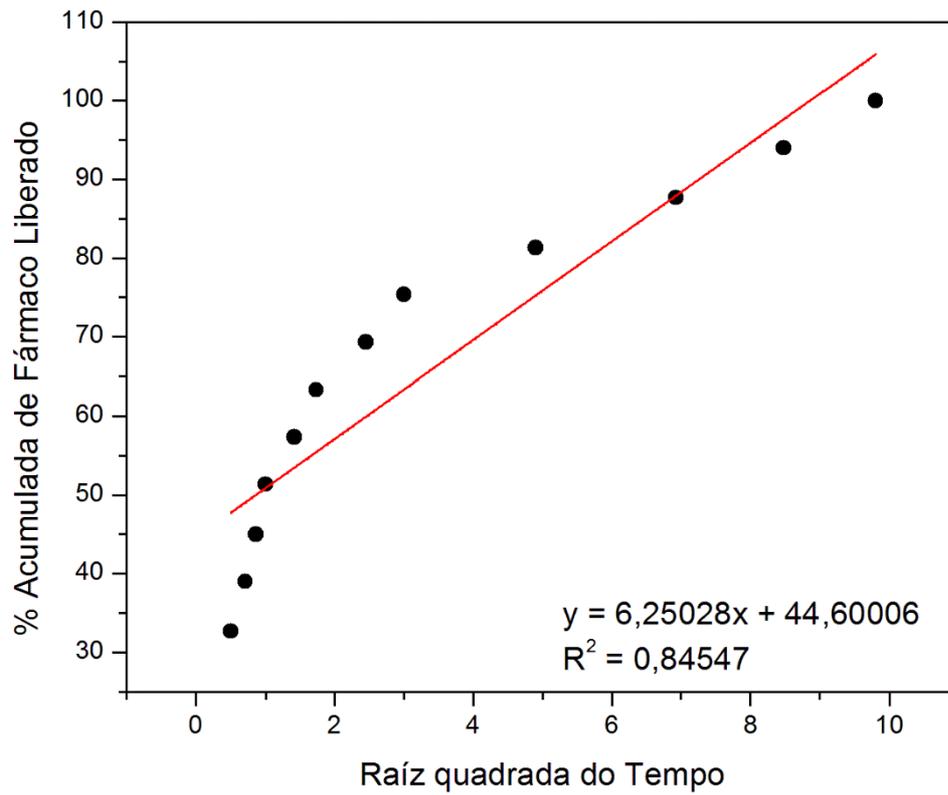


FIGURA 5.21 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pela raiz quadrada do tempo a 37°C.

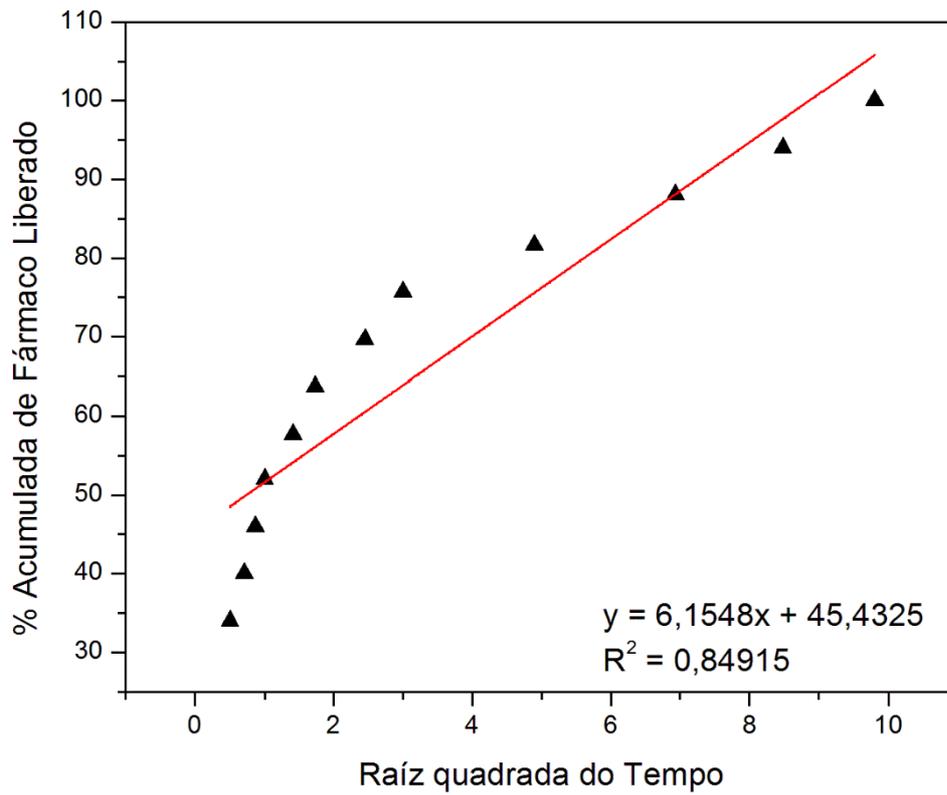


FIGURA 5.22 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pela raíz quadrada do tempo a 43°C

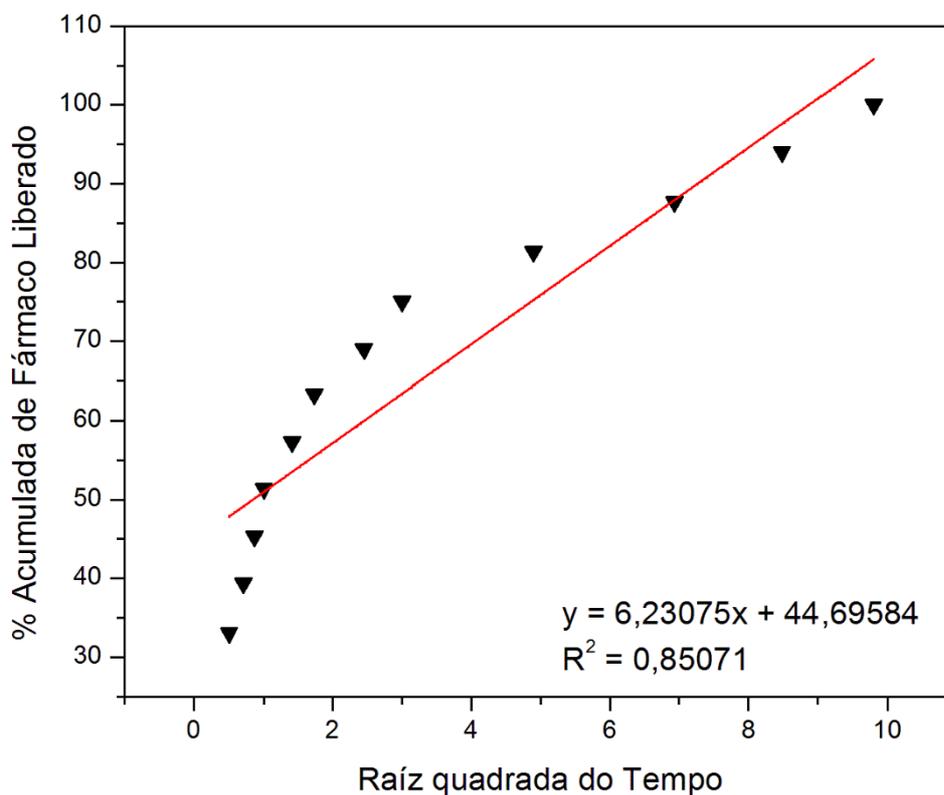


FIGURA 5.23 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado pela raiz quadrada do tempo a 50°C.

O modelo descreve o perfil de liberação caso o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) tenha o valor próximo de 1.

TABELA 5.5 - Valores do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para o modelo de Higuchi.

Coeficiente de Correlação ( $R^2$ )			
25°C	37°C	43°C	50°C
0,84177	0,84547	0,84915	0,85071

Pode-se observar que os valores estão muito distantes da curva então o coeficiente apresentou um valor baixo. Dessa forma, o perfil de liberação não é descrito pelo modelo de Higuchi.

#### 5.6.4 - Modelo Korsmeyer-Peppas

Para estudar o modelo proposto por Korsmeyer e Peppas, é necessário construir um gráfico de logaritmo da porcentagem acumulada de fármaco liberado pelo

logaritmo do tempo. Obteve-se então as curvas mostradas nas figuras 5.24 até 5.27. Cada figura mostra os dados coletados em diferentes temperaturas. É possível observar claramente que o modelo testado exibe uma excelente ajuste aos dados experimentais, mesmo para nas temperaturas mais altas onde o sistema mostrou maior dispersão de resultados de liberação.

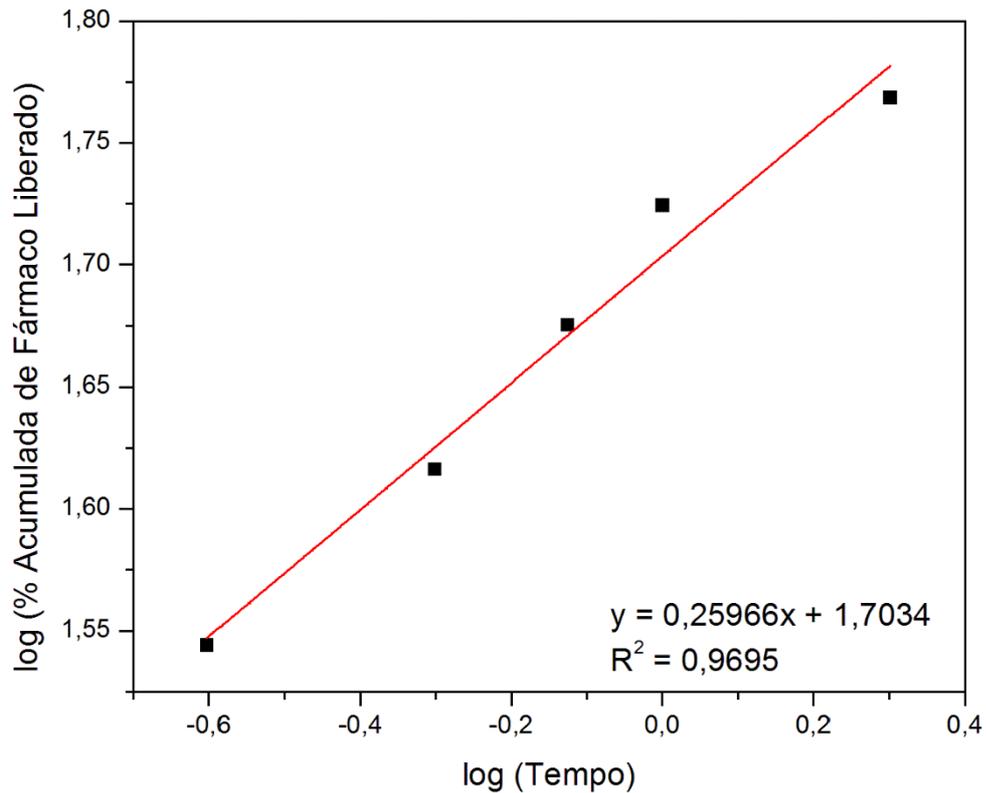


FIGURA 5.24 - Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado para os valores de logaritmo da porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo logaritmo do tempo a 25°C.

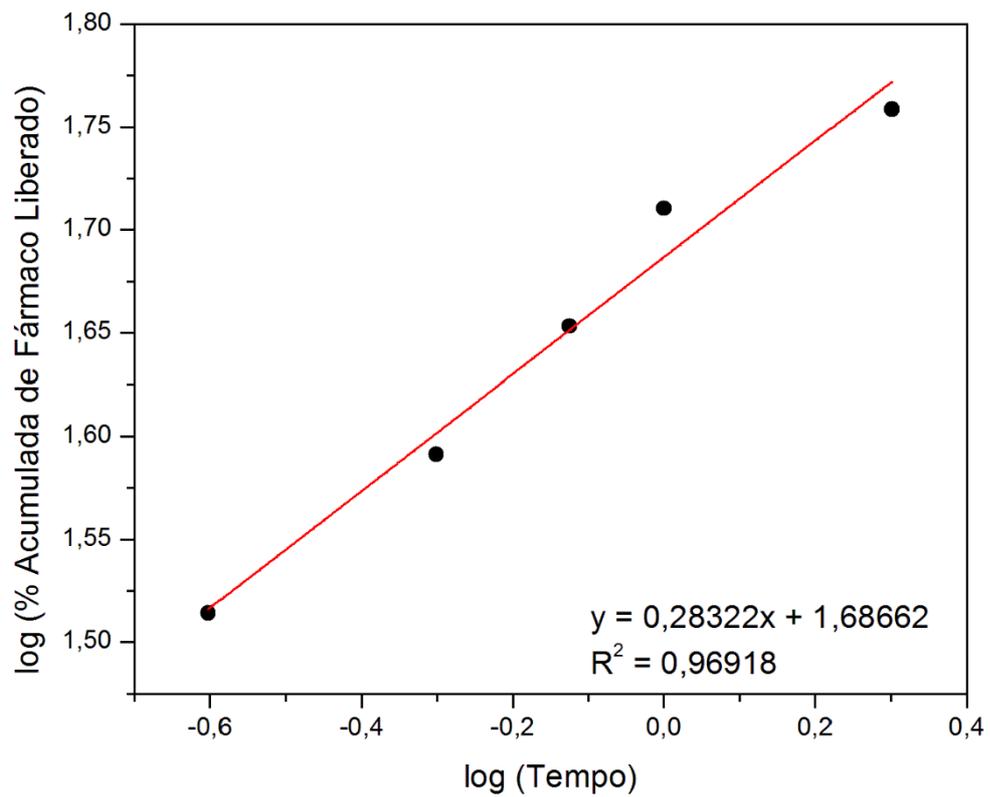


FIGURA 5.25 - Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado para os valores de logaritmo da porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo logaritmo do tempo a 37°C.

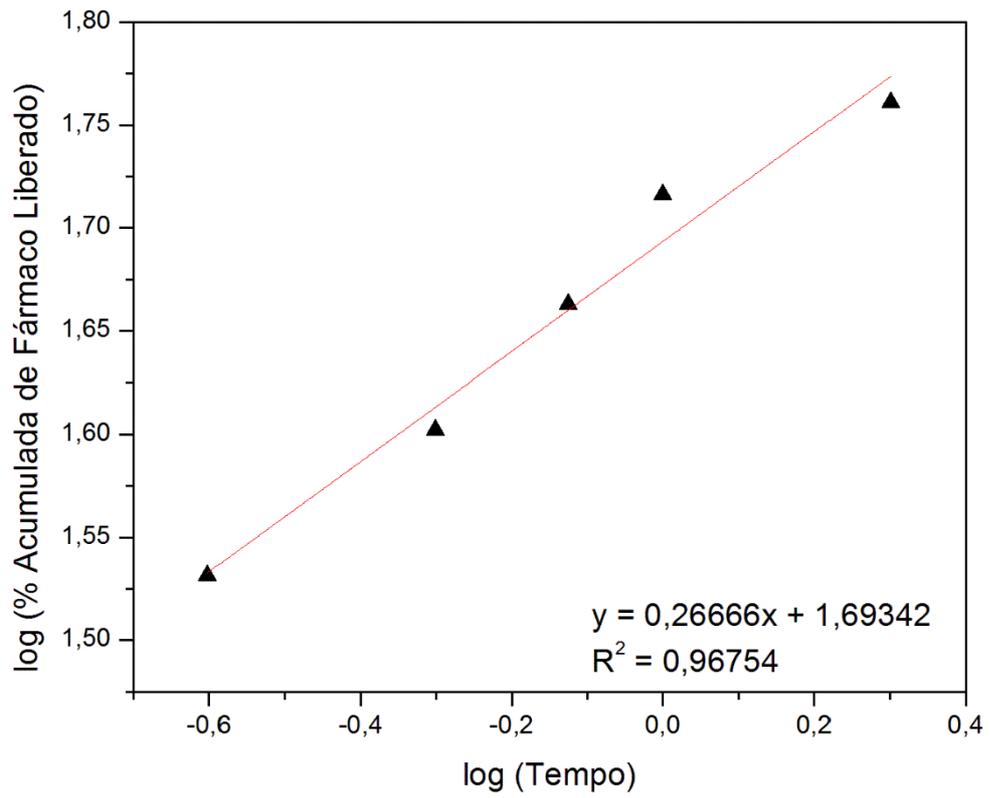


FIGURA 5.26 - Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado para os valores de logaritmo da porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo logaritmo do tempo a 43°C.

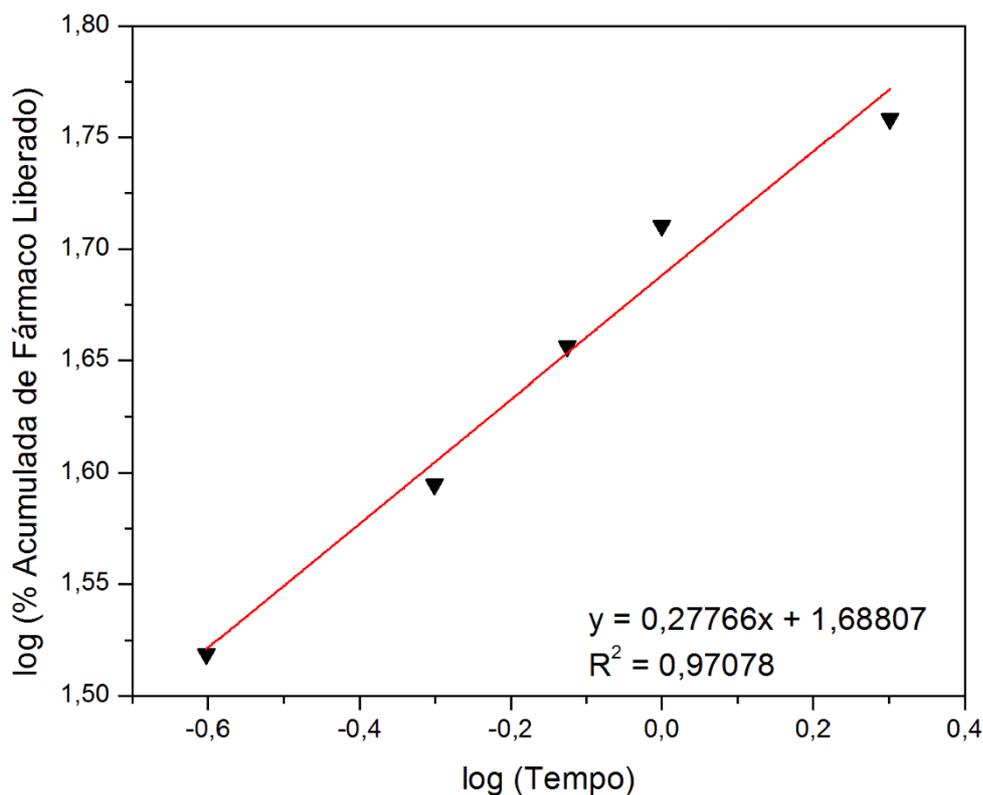


FIGURA 5.27 - Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado para os valores de logaritmo da porcentagem de fármaco liberado acumulado pelo logaritmo do tempo a 50°C.

Foi possível avaliar os dados de liberação até os valores acumulados de 60%. A incerteza experimental observada para os dados acima deste valor não permitiu que o modelo fosse testado. A Tabela 5.6 mostra os dados da regressão linear, nos quais o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) exibe valores muito próximos de 1, o que indica que o modelo de liberação de Korsmeyer-Peppas é o mais adequado para explicar o mecanismo de liberação da CLX pelo nanocomposito de quitosana-magnetita.

TABELA 5.6 - Valores do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para o modelo de Korsmeyer-Peppas.

Coeficiente de Correlação ( $R^2$ )			
25°C	37°C	43°C	50°C
0,9695	0,96918	0,96754	0,97078

Os dados da Tabela 5.6 mostram ser possível estimar o valor do expoente difusional ( $n$ ) com um alto grau de precisão e com isso classificar o tipo de liberação. Estes valores são apresentados na Tabela 5.7.

TABELA 5.7 - Valores de Expoente Difusional (ou Expoente de Liberação de Fármaco) ( $n$ ) obtido pelo coeficiente angular das equações descritas para cada temperatura.

<b>Expoente Difusional (<math>n</math>)</b>			
<b>25°C</b>	<b>37°C</b>	<b>43°C</b>	<b>50°C</b>
0,25966	0,28322	0,26666	0,27766

Como  $n < 0,5$ , o sistema apresenta comportamento pseudo-Fickiano. Nesse modelo, as curvas de sorção assemelham-se às curvas do modelo Fickiano, mas a aproximação ao equilíbrio final é muito lenta <sup>39</sup>.

Alguns sistemas apresentam liberação descrita por dois métodos diferentes. Dessa forma, os valores acima de 60% de liberação também foram estudados, da mesma maneira que descrito anteriormente, aplicando os modelos matemáticos e avaliando os coeficientes de correlação. Obteve-se os seguintes resultados:

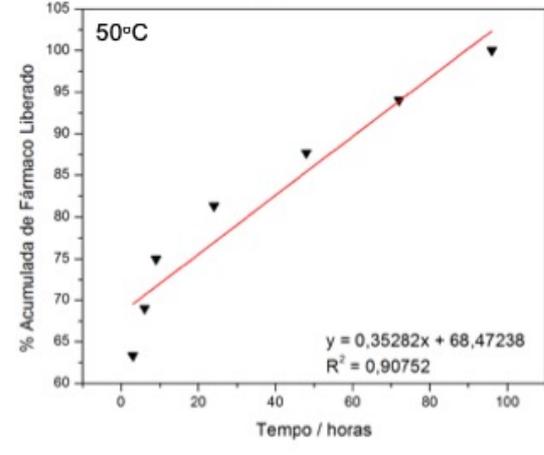
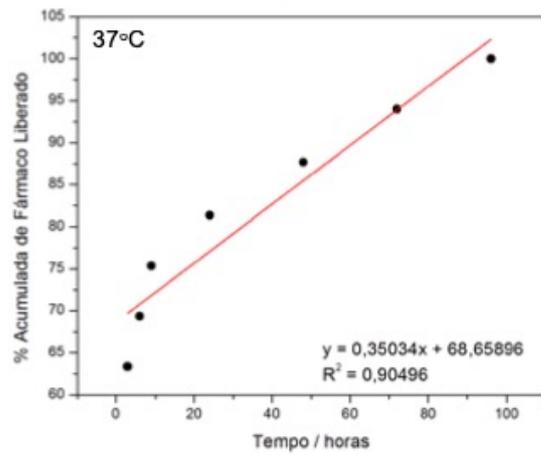
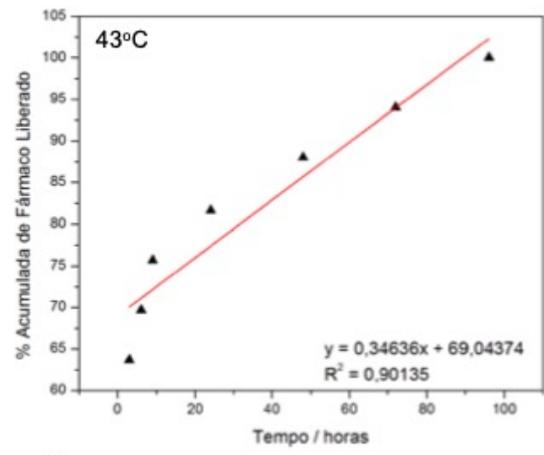
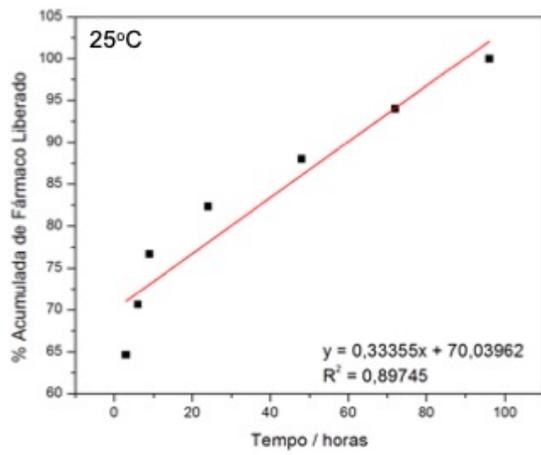


FIGURA 5.28 - Modelo de Ordem Zero aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado acima de 60%.

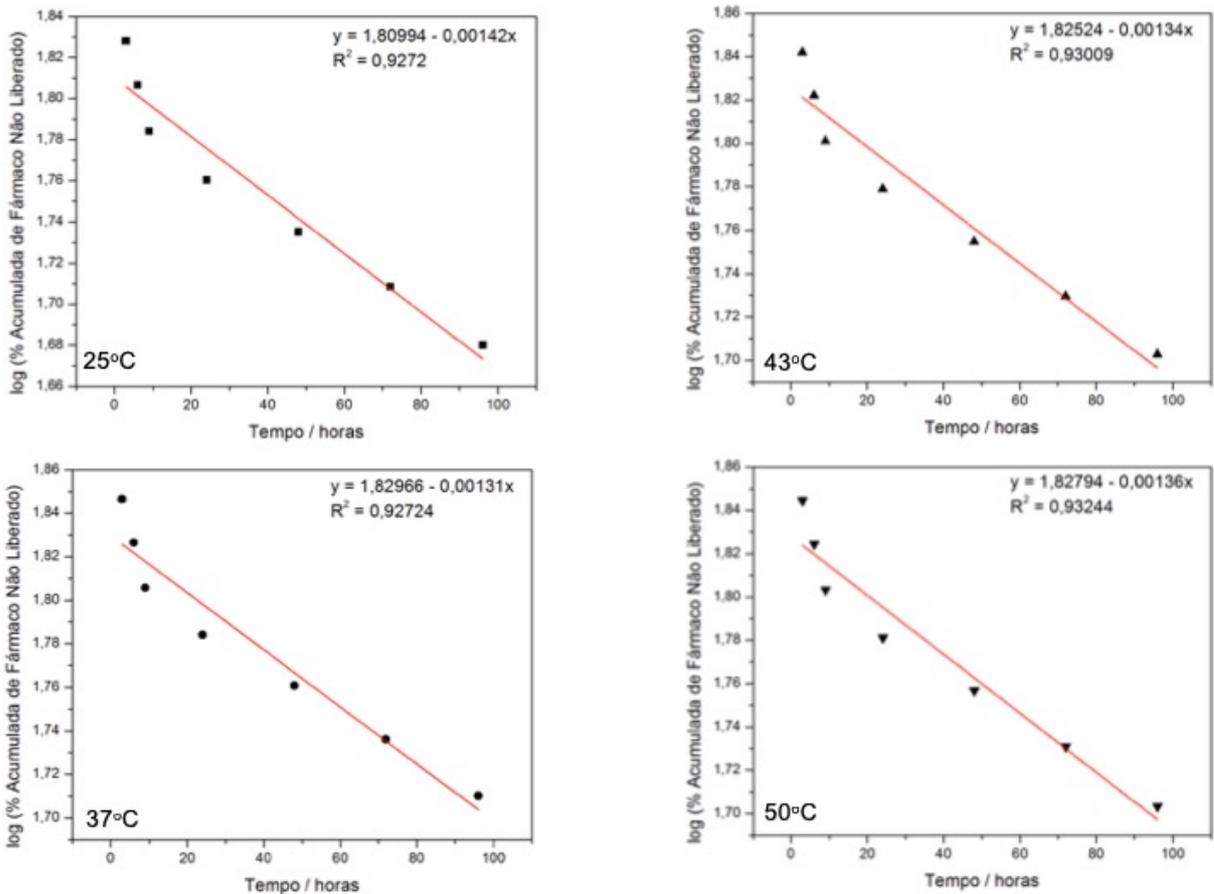


FIGURA 5.29 - Modelo de Primeira Ordem aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado acima de 60%.

Pode-se concluir então que o sistema magnetita-quitosana libera a clorexidina por dois mecanismos diferentes. O modelo de Krosmeier-Peppas descreve a liberação da clorexidina nas primeiras 2 horas (até atingir 60% de liberação). Durante as outras horas de teste o método que descreve o perfil de liberação é o de Higuchi, o qual descreve a liberação do fármaco, proporcional a raiz quadrada do tempo, a partir de uma matriz polimérica rígida de área e formato qualquer e que o mecanismo principal é controlado por difusão.

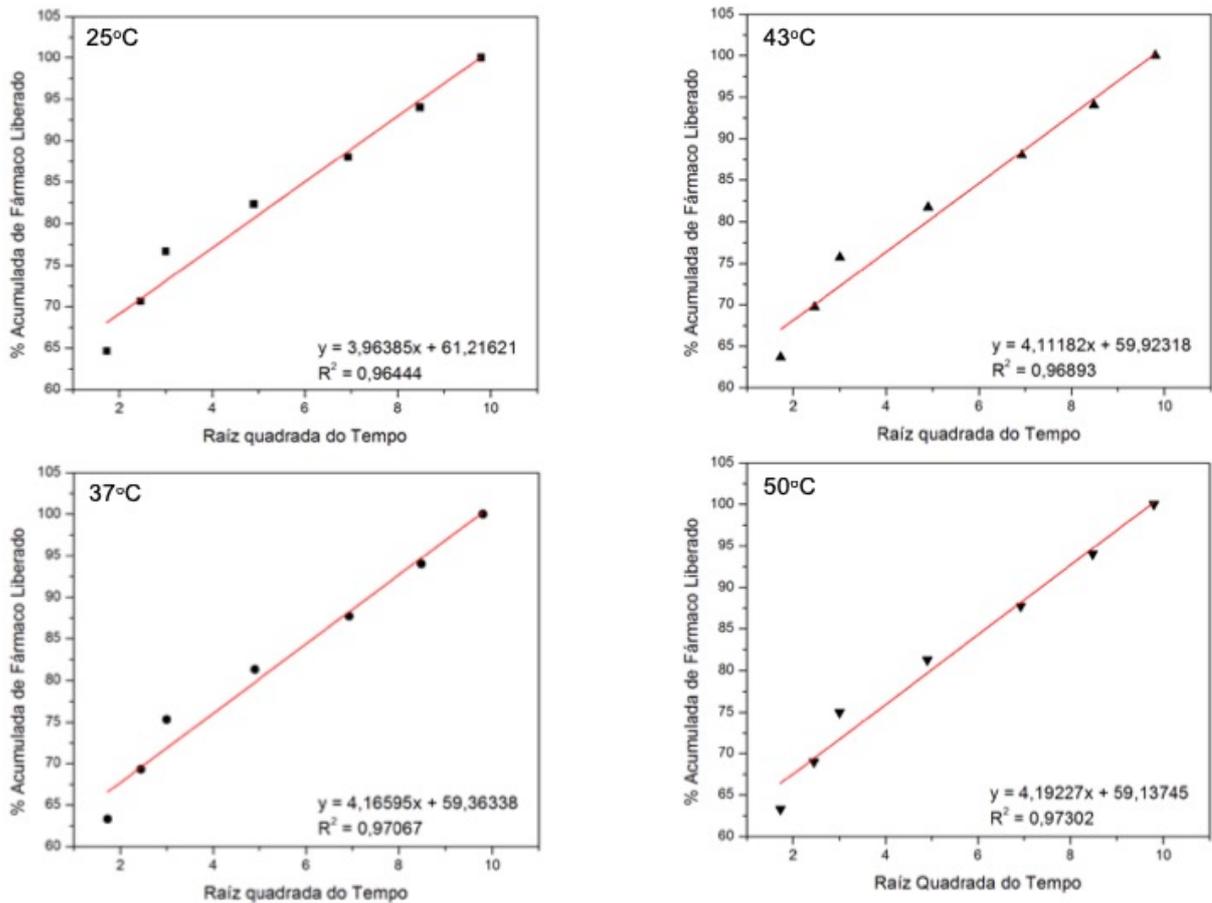


FIGURA 5. 30 - Modelo de Higuchi aplicado para os valores de porcentagem de fármaco liberado acumulado acima de 60%.

TABELA 5.8 - Valores do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para todos os modelos aplicados aos valores acima de 60% de liberação.

Método	Coeficiente de Correlação ( $R^2$ )			
	25°C	37°C	43°C	50°C
Ordem Zero	0,89745	0,90496	0,90135	0,90752
Primeira Ordem	0,9272	0,92724	0,93009	0,93244
Higuchi	0,96444	0,97067	0,96893	0,97302

## 6 - CONCLUSÃO

O procedimento de síntese adotado permitiu a síntese de nanocompósitos com elevado grau de reprodutibilidade. Por meio da variação da concentração de quitosana, foi possível obter sistemas de maiores dimensões. Foi possível confirmar o recobrimento das nanopartículas de magnetita pelo polímero e a formação dos nanocompósitos e, além disso, foi possível observar que não houve alteração estrutural da magnetita após o recobrimento e a inserção das moléculas de clorexidina no nanocompósito. Pode-se observar a incorporação homogênea do fármaco clorexidina por toda a matriz polimérica.

A partir do estudo de Vieira et. Al, 2018, pode-se comprovar a eficácia da ação antimicrobiana do sistema e como ele melhorou a ação do antibiótico, frente a duas cepas, a levedura *Candida albicans* e a bactéria *Streptococcus mutans*. Dependendo do microrganismo estudado, o nanocompósito se mostrou mais eficaz que a clorexidina pura.

Pode-se observar, através dos estudos cinéticos de liberação, o comportamento do sistema como veículo de entrega de medicamento. Para as quatro temperaturas avaliadas, 25°C, 37°C, 43°C e 50°C, foi possível observar a liberação do fármaco com perfis semelhantes. Aplicou-se os quatro métodos matemáticos mais comuns que descrevem os processos de liberação: o método de Ordem Zero, de Primeira Ordem, de Higuchi e de Krosmeier-Peppas. Concluiu-se que o sistema magnetita-quitosana libera a clorexidina durante as 2 primeiras horas, até atingir 60% de liberação, pelo método descrito por Krosmeier-Peppas. A liberação adota um mecanismo Pseudo-Fickiano onde as curvas de sorção assemelham-se às curvas do modelo Fickiano, mas a aproximação ao equilíbrio final é muito lenta. Depois das 2 horas de liberação (ou cerca de 60% de liberação), outro modelo passa a descrever a liberação, o modelo de Higuchi, pois o nanosistema passa a liberar o fármaco principalmente por difusão.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMAR, S. M. M. "Nanotechnology". The Egyptian Journal of Histology, **35**: 1, 2012.
2. WANG, A. Z.; LANGER, R. & FAROKHZAD, O. C. "Nanoparticle delivery of cancer drugs". Annu. Rev. Med., **63**: 185, 2012.
3. NIKITIN, A.; FEDOROVA, M.; NAUMENKO, V.; SHCHETININ, I.; ABAKUMOV, M.; EROFEEV, A.; GORELKIN, P.; MESHKOV, G.; BELOGLAZKINA, E.; IVANENKOV, Y.; KLYACHKO, N.; GOLOVIN, Y.; SAVCHENKO, A. & MAJOUGA, A. "Synthesis, characterization and MRI application of magnetite water-soluble cubic nanoparticles". J. Magn. Mag. Mater., **441**: 6, 2017.
4. SUN, S. & ZENG, H. "Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles". J. Am. Chem. Soc., **124**: 8204, 2002.
5. MORALES, M. A.; DE SOUZA RODRIGUES, E. C.; DE AMORIM, A. S. C. M.; SOARES, J. M. & GALEMBECK, F. "Size selected synthesis of magnetite nanoparticles in chitosan matrix". Appl. Surf. Sci., **275**: 71, 2013.
6. ALI, A. & AHMED, S. "A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery". Int. J. Biol. Macromol., **109**: 273, 2018.
7. BALAGOPAL, S. & ARJUNKUMAR, R. "Chlorhexidine: the gold standard antiplaque agent". J Pharm. Sci. & Res., **5** (12): 270, 2013.
8. PAUL, D. R. & ROBESON, L. M. "Polymer nanotechnology: nanocomposites". Polymer, **49**: 3187, 2008.
9. REDDY, L. H.; ARIAS, J. L.; NICOLAS, J. & COUVREUR, P. "Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications". Chem. Rev., **112**: 5818, 2012.
10. OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D. & PEREIRA, M. C. "Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão". Quim. Nova, **36** (1): 123, 2012.
11. NADOLL, P.; ANGERER, T.; MAUK, J. L.; FRENCH, D. & WALSHE, J. "The chemistry of hydrothermal magnetite: A review". Ore Geol. Rev., **61**: 1, 2014.
12. ESTEVES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A. & TRINDADE, T. "Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos". Quim. Nova, **27** (5): 798, 2005.
13. BHAT, S. & KUMAR, A. "Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare". Biomatter, **3** (3): e24717, 2013.
14. YOUNES, I. & RINAUDO, M. "Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications". Mar. Drugs, **13** (3): 1133, 2015.
15. BELGACEM, M. N. & GANDINI, A. Monomers, polymers and composites from renewable resources. ed. Amsterdam, Elsevier, 2008. 560 p.
16. AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N. & AMINABHAVI, T. M. "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery". J. Control. Release, **100**: 5, 2004.
17. M.A.V., R., Biomateriais de quitosana/gelatina com resina de jatobá: influência do grau de acetilação da quitosana e da inclusão da resina. São Carlos, Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2016. Mestrado, 87 p.
18. ALBANEZ, R., Recobrimento gastrorresistente de pellets de diclofenaco de sódio em leite fluidizado tipo Wurster. Campinas, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, 2012. Dissertação, 159 p.
19. DUCEPPE, N. & TABRIZIAN, M. "Advances in using chitosan-based nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* drug and gene delivery". Expert Opin. Drug Deliv., **7** (10): 1191, 2010.

20. SAFDAR, R.; OMAR, A. A.; ARUNAGIRI, A.; REGUPATHI, I. & THANABALAN, M. "Potential of Chitosan and its derivatives for controlled drug release applications – A review". *J. Drug Deliv. Sci. Tec.*, **49**: 642, 2019.
21. ARIAS, J. L.; REDDY, L. H. & COUVREUR, P. "Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/chitosan nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer". *J. Mater. Chem.*, **22**: 7622, 2012.
22. KOLENBRANDER, P. E. "Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems". *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**: 413, 2000.
23. STEWART, P. S. & FRANKLIN, M. J. "Physiological heterogeneity in biofilms". *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**: 199, 2008.
24. HE, J.; BAO, Y.; LI, J.; QIU, Z.; LIU, Y. & ZHANG, X. "Nanocomplexes of carboxymethyl chitosan/amorphous calcium phosphate reduce oral bacteria adherence and biofilm formation on human enamel surface". *J. Dent.*, **80**: 15, 2019.
25. SALLI, K. M.; FORSSTEN, S. D.; LAHTINEN, S. J. & OUWEHAND, A. C. "Influence of sucrose and xylitol on an early *Streptococcus mutans* biofilm in a dental simulator". *Arch. Oral Biol.*, **70**: 39, 2016.
26. KAUR, G.; RAJESH, S. & PRINCY, S. A. "Plausible Drug Targets in the *Streptococcus mutans* Quorum Sensing Pathways to Combat Dental Biofilms and Associated Risks". *Indian J. Microbiol.*, **55**: 349, 2015.
27. NOMURA, R.; YONEYAMA, R.; NAKA, S.; OTSUGU, M.; OGAYA, Y.; HATAKEYAMA, R.; MORITA, Y.; MARUO, J.; MATSUMOTO-NAKANO, M.; YAMADA, O. & NAKANO, K. "The in vivo Inhibition of Oral Biofilm Accumulation and *Streptococcus mutans* by Ceramic Water". *Caries Res.*, **51**: 58, 2017.
28. SANCHEZ-VARGAS, L. O.; ESTRADA-BARRAZA, D.; POZOS-GUILLEN, A. J. & RIVAS-CACERES, R. "Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species". *Arch. Oral Biol.*, **58** (10): 1318, 2013.
29. MOTHIBE, J. V. & PATEL, M. "Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses". *Microb. Pathog.*, **110**: 128, 2017.
30. RAZALI, M.; DIDASKALOU, C.; KIM, J. F.; BABAEI, M.; DRIOLI, E.; LEE, Y. M. & SZEKELY, G. "Exploring and Exploiting the Effect of Solvent Treatment in Membrane Separations". *ACS Appl. Mater. Inter.*, **9**: 11279, 2017.
31. ADDY, M. & MORAN, J. M. "Clinical indications for the use of chemical adjuncts - to plaque control: chlorhexidine formulations". *Periodontol.* 2000, **15**: 52, 1997.
32. AZEVEDO, K. R. V., Avaliação do efeito de diferentes cimentos obturadores endodônticos na substantividade da clorexidina. Rio de Janeiro, Departamento de Odontologia - Universidade Estácio de Sá, 2017. Dissertação, 63 p.
33. LI, Y.-C.; KUAN, Y.-H.; LEE, T.-H.; HUANG, F.-M. & CHANG, Y.-C. "Assessment of the cytotoxicity of chlorhexidine by employing an in vitro mammalian test system". *J. Dent. Sci.*, **9**: 130, 2014.
34. VIEIRA, A. P. M.; ARIAS, L. S.; SOUZA NETO, F. N.; KUBO, A. M.; LIMA, B. H. R.; CAMARGO, E. R.; PESSAN, J. P.; DELBEM, A. C. B. & MONTEIRO, D. R. "Antibiofilm effect of chlorhexidine-carrier nanosystem based on iron oxide magnetic nanoparticles and chitosan". *Colloids Surface B*, **174**: 224, 2018.
35. MENGISTU LEMMA, S.; BOSSARD, F. & RINAUDO, M. "Preparation of Pure and Stable Chitosan Nanofibers by Electrospinning in the Presence of Poly(ethylene oxide)". *Int. J. Mol. Sci.*, **17** 2016.
36. HAN, S.; KIM, C. & KWON, D. "Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol". *Polymer*, **38** (2): 317, 1997.
37. SIGNINI, R. & CAMPANA FILHO, S. P. "Purificação e caracterização de quitosana comercial". *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **Out/Dez**: 63, 1998.

38. RINAUDO, M.; MILAS, M. & DUNG, P. L. "Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion". *Int. J. Biol. Macromol.*, **15**: 281, 1993.
39. LI, N. N.; FU, C. P. & ZHANG, L. M. "Using casein and oxidized hyaluronic acid to form biocompatible composite hydrogels for controlled drug release". *Mater. Sci. Eng. C*, **36**: 287, 2014.