



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

ANDRESSA ISIS DE SOUSA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM
DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO PARA USO
ODONTOLÓGICO**

Macapá

2023

ANDRESSA ISIS DE SOUSA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM
DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO PARA USO
ODONTOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
do Amapá, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira
de Sousa

Macapá

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP)Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior – CRB-2 /
1451

S586 Silva, Andressa Isis de Sousa da.

Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de zeína carregadas com Digluconato de Clorexidina e Ácido Elágico para uso odontológico /Andressa Isis de Sousa da Silva. - Macapá, 2023.

1 recurso eletrônico. 62 folhas.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Curso de Farmácia, Macapá, 2023.

Orientador: Francisco Fábio Oliveira de Sousa.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Ácido Elágico. 2. Clorexidina. 3. Antimicrobiano. I. Sousa, Francisco Fábio Oliveira de, orientador. II. Universidade Federal do Amapá . III. Título.

CDD 23. ed. – 615

SILVA, Andressa Isis de Sousa da. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de zeína carregadas com Digluconato de Clorexidina e Ácido Elágico para uso odontológico.** Orientador: Francisco Fábio Oliveira de Sousa . 2023. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Coordenação do Curso de Farmácia. Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2023.

ANDRESSA ISIS DE SOUSA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM
DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO PARA USO
ODONTOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
do Amapá, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Data de Aprovação: 19 / 04 / 2023

Orientador: Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa - UNIFAP



Documento assinado digitalmente
WALTER DE SOUZA TAVARES
Data: 08/05/2023 22:45:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Avaliador: Prof. Dr. Walter de Souza Tavares – UNIFAP



Documento assinado digitalmente
LILIAN GRACE DA SILVA SOLON
Data: 08/05/2023 22:28:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Avaliadora: Profa. Dra. Lílian Grace da Silva Sólón – UNIFAP

Dedico aos meus pais, àqueles que sempre me apoiaram e confiaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sônia Santos de Sousa e Antônio Paulino da Silva, por todo amor e incentivo prestados a mim ao longo de toda minha vida, por não medirem esforços para que eu cumprisse meus objetivos e principalmente pela assistência nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Francisco Fábio Oliveira de Sousa pelos aprendizados repassados e confiança depositada para a execução das atividades científicas bem como pelo exemplo de profissional e comprometimento em ensinar com qualidade.

Aos colegas de laboratório, Walter de Souza Tavares e Everton Pantoja Vale, pela paciência em compartilhar seus conhecimentos além do auxílio e disponibilidade prestados para a execução de métodos e técnicas essenciais na realização deste estudo. Ao Fernando Rodrigues dos Santos, por sua disponibilidade e proatividade em ajudar e assistir quando preciso.

A Thayná Oliveira Corrêa, por seu companheirismo e amizade na jornada científica bem como pelo compartilhamento de tantos momentos e experiências de vida. Ao Taian Sarraf Santana e Gustavo Ferreira Serra pela ajuda e auxílio na execução de algumas atividades.

Ao Laboratório Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC) da Universidade Federal do Ceará pela disponibilização do equipamento zetasizer.

Ao Anderson Christian Campelo Marinho, pelas palavras de incentivo, encorajamento, amor e companheirismo prestados, sendo seu apoio essencial nesta jornada.

Às minhas primas, Kaline Sousa Castro e Iranilde Sousa Castro e aos meus tios Raimundo Verissimo dos Santos e Cleciane Pinho da Silva por me motivarem a continuar forte e não desanimar diante das adversidades.

Às minhas amigas, Jeanina Vega, Ariel Marques, Géssica Guilherme, Larissa Coutinho e Mayara Valentine, pelo ombro amigo e companheirismo.

À Universidade Federal do Amapá, ao Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia (LCQBM), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelas oportunidades e incentivo a pesquisa científica a qual contribui grandemente na minha construção profissional e pessoal.

RESUMO

O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo agentes antimicrobianos para tratamento *in situ* apresenta-se como uma estratégia promissora na prevenção e tratamento de infecções orais. O uso sistêmico de antibióticos apresenta limitações, pois além de limitar a distribuição aos tecidos lesionados, ocasiona reações adversas, podendo ainda contribuir na aquisição de resistência aos microrganismos. Diante disso, este estudo objetivou co-encapsular digluconato de clorexidina (CHX) e ácido elágico (EA) em nanopartículas de zeína com vista a potencializar a atividade antimicrobiana destes agentes frente a microrganismos característicos de infecções orais. As nanopartículas, de cada fármaco individualmente e em associação, foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, e em seguida caracterizadas quanto ao seu tamanho (nm), índice de polidispersão (pDI) e potencial zeta (mV) sendo submetidas a um estudo de estabilidade com exposição a diferentes condições de armazenamento (4°C, 25°C e 40°C) de modo a averiguar o seu comportamento ao longo do tempo. Foram determinadas a concentração inibitória mínima e bactericida mínima frente à *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, seguidas pela avaliação do efeito sinérgico, sinérgico entre a CHX em solução e EA em solução e nanoencapsulado. Por último, foi avaliada a atividade antibiofilme das nanopartículas desenvolvidas frente a *S. aureus* e *S. mutans*. Após 180 dias de análise, dentre as nanopartículas co-encapsuladas somente as NChxEa_{0,25%} manteve-se estável e também desempenhou a ação antimicrobiana mais eficaz frente as cepas selecionadas mantendo as CIMs e CBMs entre 12,2 µg/ml, 24,4 e 48,8 µg/ml. A combinação de CHX e EA resultou em efeito aditivo, enquanto que a co-encapsulação destes ativos, pese as limitações observadas, demonstrou ser uma estratégia eficaz para melhorar o efeito antibacteriano frente à *P. aeruginosa* e *S. aureus* por meio do teste *cross-board check*. As nanopartículas co-encapsuladas demonstraram efeito antibiofilme frente *S. aureus*, no entanto o EA nanoencapsulado apresentou o maior efeito, reduzindo a viabilidade em 49%. Frente ao biofilme de *S. mutans*, as NEaChx_{0,25%} mostrou-se como a formulação mais favorável na redução da viabilidade bacteriana em 22,6 %. As nanopartículas carregadas com CHX e posteriormente com EA demonstraram estabilidade adequada após 6 meses, e seriam, portanto, candidatas ao seu uso como agente antimicrobiano para uso odontológico, associando os efeitos antimicrobianos de ambos os ativos aos demais efeitos benéficos providos pelo ácido elágico.

Palavras-chave: Ácido elágico. Clorexidina. Nanopartículas. Antibiofilme. Antimicrobiano. Odontologia.

ABSTRACT

The development of polymeric nanoparticles containing antimicrobial agents for in situ treatment is a promising strategy for the prevention and treatment of oral infections. The systemic use of antibiotics has limitations, as in addition to limiting distribution to injured tissues, it causes adverse reactions and may also contribute to the acquisition of resistance to microorganisms. Therefore, this study aimed to co-encapsulate chlorhexidine digluconate (CHX) and ellagic acid (EA) in zein nanoparticles in order to enhance the antimicrobial activity of these agents against microorganisms characteristic of oral infections. The nanoparticles, of each drug individually and in association, were prepared by the nanoprecipitation method, and then characterized as to their size (nm), polydispersion index (pDI) and zeta potential (mV) being subjected to a stability study with exposure to different storage conditions (4°C, 25°C and 40°C) in order to verify its behavior over time. The minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration against *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* were determined, followed by the evaluation of the synergistic effect between CHX in solution and EA in solution and nanoencapsulated. Finally, the antibiofilm activity of the developed nanoparticles against *S. aureus* and *S. mutans* was evaluated. After 180 days of analysis, among the co-encapsulated nanoparticles, only NChxEa 0.25% remained stable and also performed the most effective antimicrobial action against the selected strains, maintaining MICs and MBCs between 12.2 µg/ml, 24, 4 and 48.8 µg/ml. The combination of CHX and EA resulted in an additive effect, while the co-encapsulation of these actives, despite the observed limitations, proved to be an effective strategy to improve the antibacterial effect against *P. aeruginosa* and *S. aureus* through the cross-test. boardcheck. The co-encapsulated nanoparticles showed an antibiofilm effect against *S. aureus*, however the nanoencapsulated EA showed the greatest effect, reducing viability by 49%. Faced with the *S. mutans* biofilm, NEaChx 0.25% proved to be the most favorable formulation in reducing bacterial viability by 22.6%. Candidates for its use as an antimicrobial agent for dental use, associating the antimicrobial effects of both actives with the other beneficial effects provided by ellagic acid.

Keywords: Ellagic acid. Chlorhexidine. Nanoparticles. Antibiofilm. Antimicrobial. Dentistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação dos efeitos da ação de <i>Streptococcus mutans</i> na estrutura dentária pertencente à cavidade oral.....	20
Figura 2-	Estrutura química da zeína.....	23
Figura 3-	Estrutura química do digluconato de clorexidina.....	25
Figura 4-	Estrutura química do ácido elágico.....	27
Figura 5-	Imagem 3D de simulação de docking molecular enfatizando a ligação não covalente de zeína com EA.....	29
Figura 6-	Procedimento de preparo de nanopartículas de zeína, carregadas com ácido elágico e/ou digluconato de clorexidina.....	31
Figura 7-	Procedimento de preparo das nanopartículas co-encapsuladas com CHX e EA em diferentes concentrações para avaliação por fluorimetria	33
Figura 8-	Procedimento da avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de zeína carregadas com CHX e/ou AE frente a cepas causadoras de infecções orais.....	35
Figura 9-	Procedimento de avaliação de efeito sinérgico entre o digluconato de clorexidina e solução e nanopartículas de ácido elágico frente a cepas envolvidas em infecções orais.....	37
Figura 10-	Procedimento da avaliação da atividade antibiofilme pelo método do cristal violeta a 0,1%.....	38
Figura 11-	Representação macroscópica de nanopartículas de zeína carregadas com digluconato de clorexidina e/ou ácido elágico submetidas a diferentes condições de armazenamento: a) $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, b) $(4\pm 2^{\circ}\text{C})$ e c) $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ após 90 dias de análise.....	42
Figura 12-	Espectros de fluorescência e comprimento de onda de nanopartículas de zeína, digluconato de clorexidina a 0,5% e ácido elágico a 288 $\mu\text{g/ml}$	45
Figura 13-	Espectros de fluorescência e comprimento de onda de nanopartículas de zeína, digluconato de clorexidina a 0,5% e ácido elágico a	

	288 µg/ml.....	46
Figura 14-	Espectros de fluorescência e comprimento de onda de nanopartículas de zeína, nanopartícula de ácido elágico e nanopartícula de zeína carregada com ácido elágico com incorporação de clorexidina a 0,5%	47
Figura 15-	Viabilidade dos biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6539P), pós serem tratados com as formulações desenvolvidas.....	52
Figura 16-	Viabilidade dos biofilmes de <i>Streptococcus mutans</i> UA159 (ATCC 700610), após serem tratados com as formulações desenvolvidas.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Avaliação da estabilidade de fármacos encapsulados em nanopartículas de zeína.....	23
Quadro 2-	Estudos realizados sobre incorporação de digluconato de clorexidina em materiais e formulações direcionadas a cavidade oral.....	25
Quadro 3-	Estudos de avaliação da estabilidade do diacetado de clorexidina e digluconato de clorexidina.....	26
Quadro 4-	Alguns efeitos promissores do ácido elágico para diferentes finalidades.....	28

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1-	Características das nanopartículas de zeína contendo ácido elágico e digluconato de clorexidina em tempo zero (t_0), após 90 dias (t_{90}) e após (t_{180}) de armazenamento à temperatura ambiente.....	41
Tabela 2-	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de nanopartículas de zeína contendo ácido elágico e digluconato de clorexidina frente microrganismos característicos de infecções da cavidade oral.....	48
Tabela 3-	Concentração inibitória mínima de digluconato de clorexidina (CHX) e ácido elágico (EA) em solução e nanopartículas, assim como o índice de concentração inibitória fracionária (FIC) da sua combinação frente às cepas envolvidas em infecções da cavidade oral.....	51

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Abs	Absorvância
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CHX	Digluconato de Clorexidina
CHXEA 1	Nanopartículas de zeína carregada com CHX a 0,0125% com incorporação posterior de ácido elágico a 288 µg/ml
CHXEA2	Nanopartículas de zeína carregada com CHX a 0,025% com incorporação posterior de ácido elágico a 288 µg/ml
CHXEA3	Nanopartículas de zeína carregada com CHX a 0,125% com incorporação posterior de ácido elágico a 288 µg/ml
CHXEA4	Nanopartículas de zeína carregada com CHX a 0,0625 % com incorporação posterior de ácido elágico a 288 µg/ml
CHXEA5	Nanopartículas de zeína carregada com CHX a 0,175% com incorporação posterior de ácido elágico a 288 µg/ml
CHXEA6	Nanopartículas de zeína carregada com CHX a 0,25% com incorporação posterior de ácido elágico a 288 µg/ml
CIM	Concentração Inibitória Mínima
EA	Ácido elágico
EGCG	Epigallocatequina-galato
FIC	Índice Fracionário de Concentração Inibitória
ICH	Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano
IND	Indometacina
MH	Mueller-Hinton
Nb	Nanopartícula branca, somente zeína
NCCLS	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
NChx 0,125%	Nanopartículas de zeína carregada com digluconato de clorexidina

	a 0,125%
NChx 0,25%	Nanopartículas de zeína carregada com digluconato clorexidina a 0,25%
NChxEa 0,125%	Nanopartículas de zeína carregada com CHX a 0,125% com incorporação posterior de EA a 144 µg/ml
NEaChx 0,125%	Nanopartículas de zeína carregada com EA a 1 mg/ml com incorporação posterior de CHX a 0,125%
NEaChx 0,25%	Nanopartículas de zeína carregada com EA a 1 mg/ml com incorporação posterior de CHX a 0,25%
NChxEa 0,25%	Nanopartículas de zeína carregada com CHX a 0,25% com incorporação posterior de EA a 1 mg/ml
NEA	Nanopartículas de zeína carregada com EA a 144 µg/ml
NEACHX1	Nanopartículas de zeína carregada com EA a 32 µg/ml com incorporação posterior de CHX a 0,5%
NEACHX2	Nanopartículas de zeína carregada com EA a 64 µg/ml com incorporação posterior de CHX a 0,5%
NEACHX3	Nanopartículas de zeína carregada com EA a 72 µg/ml com incorporação posterior de CHX a 0,5%
NEACHX4	Nanopartículas de zeína carregada com EA a 96 µg/ml com incorporação posterior de CHX a 0,5%
NEACHX5	Nanopartículas de zeína carregada com EA a 120 µg/ml com incorporação posterior de CHX a 0,5%
NEACHX6	Nanopartículas de zeína carregada com EA a 144 µg/ml com incorporação posterior de CHX a 0,5%
PdI	Índice de polidispersão
ppt	Precipitação
SEA	Solução de ácido elágico a 144 µg/ml
t₍₀₎	Tempo zero
t₍₉₀₎	Tempo após 90 dias
t₍₁₈₀₎	Tempo após 180 dias
TSB	Caldo Tripton Soja

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1	A MICROBIOTA ORAL.....	20
3.2	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS À BASE DE ZEÍNA.....	22
3.3	DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	24
3.4	ÁCIDO ELÁGICO.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	MATERIAIS.....	30
4.2	PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS.....	30
4.3	CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS.....	31
4.4	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO COM ZEÍNA POR FLUORESCENCIA.....	32
4.4.1	PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS.....	32
4.4.2	AVALIAÇÃO POR FLUORÍMETRIA.....	33
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	34
4.5.1	PREPARO DE INÓCULO.....	34
4.5.2	DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	34
4.6	AVALIAÇÃO DE EFEITO SINÉRGICO ENTRE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO.....	35
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME.....	37
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5	RESULTADOS	E
	DISCUSSÃO.....	40
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS.....	40
5.2	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE DIGLUCONATO DE	

	CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO COM ZEÍNA POR FLUORESCENCIA.....	44
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	47
5.4	AVALIAÇÃO DE EFEITO SINÉRGICO ENTRE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO.....	49
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME.....	52
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A proliferação dos microrganismos muitas vezes, apresenta difícil controle, ocasionando diferentes tipos de agravos na cavidade oral, tais como a cárie, doença periodontal e infecção pulpar. Neste microambiente a sua manifestação é fortemente influenciada por hábitos de higiene irregulares, alimentação rica em açúcares e também por fatores imunológicos. Além disso, certos microrganismos proliferam-se rapidamente em superfícies formando biofilmes os quais dificultam a sua eliminação. Em virtude disso, é crescente a busca por novas estratégias terapêuticas antimicrobianas. Os agentes antissépticos são por sua vez, essenciais para impedir o início e progressão das infecções.

A resistência é considerada um dos maiores problemas de saúde pública e ocorre pelo uso indiscriminado de antibióticos, os quais são fundamentais para o tratamento de infecções locais e sistêmicas graves. O uso de moléculas com diferentes mecanismos de ação é uma das estratégias apontadas como mais eficazes para fazer frente à resistência adquirida pelos microrganismos.

O digluconato de clorexidina (CHX), considerado padrão-ouro por possuir amplo espectro de ação, sendo bacteriostático ou bactericida, a depender da dose utilizada, tem sido objeto de estudos que visam otimizar o seu uso a partir da sua incorporação em formulações, minimizando os seus efeitos adversos bastante frequentes, tais como: manchas em restaurações, alterações no paladar, formação de cálculo supragengival, enfraquecimento ósseo (em usos prolongados), dentre outros.

O ácido elágico (EA), composto fenólico pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis, tem sido apontado como um bioativo com grande potencial farmacológico, exibindo além da atividade antimicrobiana, propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-enzimáticas, e regeneradoras.

Por sua vez, o uso da nanotecnologia permite superar as limitações das formas farmacêuticas convencionais, favorecendo assim uma maior adesão dos pacientes a partir do uso *in loco*. Desta forma, a co-encapsulação destes dois princípios ativos seria uma estratégia promissora no combate a proliferação desregulada de microrganismos presentes na cavidade oral. Como polímero carreador foi utilizado a zeína, proteína extraída das sementes do milho, que demonstra características funcionais bastante favoráveis ao uso em sistemas de liberação.

Nesse sentido, o presente trabalho se propôs a co-encapsular CHX e EA em nanopartículas de zeína com vista a potencializar a atividade antimicrobiana destes agentes frente a microrganismos causadores de infecções na cavidade oral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Co-encapsular digluconato de clorexidina e ácido elágico em nanopartículas de zeína e avaliar o seu potencial antimicrobiano e antibiofilme.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito sinérgico do digluconato de clorexidina e ácido elágico frente a cepas representativas das infecções orais;
- b) Desenvolver nanopartículas de zeína carregadas com digluconato de clorexidina e ácido elágico;
- c) Caracterizar e avaliar a estabilidade das nanopartículas desenvolvidas;
- d) Avaliar a sua atividade bactericida frente a bactérias representativas das infecções orais;
- e) Avaliar a atividade antibiofilme das nanopartículas desenvolvidas frente à *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A MICROBIOTA ORAL

A cavidade oral é definida como um ambiente dinâmico, pois sofre constantes alterações em seu meio, as quais afetam componentes importantes de seu funcionamento como: pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e presença de oxigênio (LEMOS et al., 2005). Além disso, é composta por uma diversidade de microrganismos, sendo estes bactérias, fungos, vírus e protozoários, os quais frequentemente atuam de forma benéfica prevenindo a ocorrência de estados patogênicos. Contudo, alguns se comportam como patógeno-opportunistas, gerando doenças em determinadas condições (GERMANO et al., 2018).

Quando isto ocorre, há a multiplicação e organização destes microrganismos através da formação de biofilmes (MARCENES et al., 2013). Com efeito, disso, doenças como a cárie ocorrem de maneira frequente. A sua ocorrência está associada a um desequilíbrio bacteriano do biofilme oral, fortemente influenciado pela atuação de bactérias como *Streptococcus mutans*, conforme ilustrado na Figura 1 (BOWEN, 2018; MOSADDAD et al., 2019).

Figura 1- Representação dos efeitos lesivos do *Streptococcus mutans* na estrutura dentária.



Fonte: Autoria própria (2023).

Ademais, a *S. mutans* apresenta caráter acidogênico, uma vez que, produz ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico e propanoico, os quais ocasionam a dissolução de estruturas minerais, promovendo além do desgaste e fragilidade, uma maior susceptibilidade a

infecções nas superfícies dentárias (TAKAHASHI; NYVAD, 2011). Ainda, prolifera-se rapidamente por meio de processos fermentativos, sintetizando glucanos e formando biofilmes.

Outras cepas gram-positivas como *Enterococcus faecalis* (MICHELOTTO; ANDRADE; JUNIOR; SYDNEY, 2008) e *Staphylococcus aureus* tem se tornado resistentes aos antimicrobianos convencionais o que torna difícil a erradicação de seus efeitos sobre as áreas afetadas. A primeira é frequentemente encontrada em tratamentos endodônticos mal sucedidos. Enquanto que a segunda, tem sido associada com infecções da mucosa oral, alveolares, e com periodontite (RAMS et al., 1990; KIM E LEE , 2015; GARCÍA et al., 2021).

Enquanto, bactérias gram-negativas como a *Pseudomonas aeruginosa* também são investigadas, dado a resistência e também a capacidade de produzir biofilme sobre áreas lesionadas de feridas, úlceras e queimaduras (KLAUSEN et al., 2003; NEVES et al., 2011).

Embora as infecções bacterianas sejam mais frequentes na cavidade oral, as infecções fúngicas também podem ser observadas. A *Candida albicans*, por exemplo, é uma levedura comensal, que também demonstra comportamento patógeno-oportunista perante um desequilíbrio imunológico, contribuindo igualmente para a formação de biofilmes uma vez que possui facilidade em se aderir a superfícies (SILVIA et al., 2012).

É importante ressaltar que as infecções orais associadas a formação de biofilmes são difíceis de tratar devido o comportamento adaptável das cepas frente aos tratamentos (QUAVE et al., 2012).

Outro aspecto relevante, é a simbiose e adaptação apresentada por/entre diferentes microrganismos. Lamont et al., (2018) e Campelo, (2020) relataram ação sinérgica na cavidade oral entre *S. mutans* e *Candida albicans*, as quais atuam promovendo a colonização da superfície dos dentes por meio de interações mediadas por substâncias poliméricas extracelulares como carboidratos e proteínas. Ainda que a *S. aureus* seja uma cepa comensal da microbiota oral, associada a um periodonto saudável (COLOMBO et al., 2015) alguns estudos indicam um alto nível de expressão de genes de virulência e multirresistência em cepas isoladas de lesões periodontais, que poderiam contribuir para a transferência horizontal para outras bactérias presentes na cavidade oral, dificultando o seu controle (GARCÍA et al., 2021). O uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento periodontal tem sido apontado como uma das causas para o aumento de *Staphylococcus* spp. na cavidade oral e a sua resistência aos antibióticos, tendo como resultado a ocorrência de periodontite persistente (RAMS et al., 1990; KIM E LEE , 2015; GARCÍA et al., 2021).

Diante do exposto, sugere-se que a adequada atuação das terapias utilizadas frente às infecções orais está diretamente relacionada à liberação em níveis terapêuticos ao longo do tempo (FEATHERSTONE, 2006; MARSH; HEAD; DEVINE, 2015) e principalmente em transpassar os desafios associados à maioria dos agentes antimicrobianos, como uso sistêmico, baixa eficácia frente a microrganismos resistentes, controle dos biofilmes bacterianos, falta de seletividade e também a sua degradação antes mesmo de exercerem seu efeito farmacológico (STINE; BOISEN, 2021).

Portanto, é essencial que sejam desenvolvidas novos tratamentos mais potentes e efetivos, visto que os microrganismos envolvidos, quando em desequilíbrio, podem evoluir severamente resultando na perda de elementos dentários, inflamações locais e até mesmo infecções sistêmicas, que podem pôr em risco a vida dos pacientes (MARCENES et al., 2013).

3.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS À BASE DE ZEÍNA

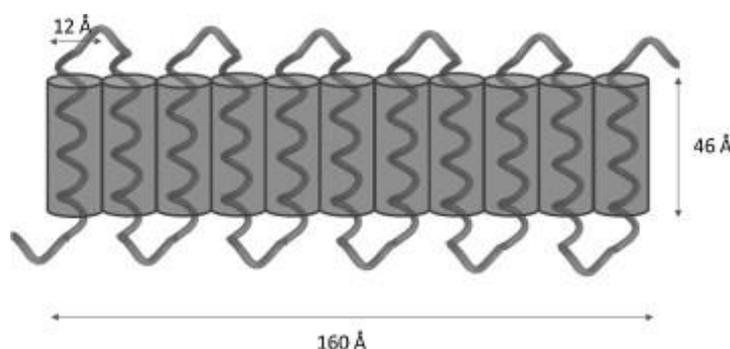
As nanopartículas poliméricas são carregadas por fármacos e/ou por outras moléculas ativas que são liberados a partir de mecanismos como: desorção, difusão, desintegração e dissolução da matriz polimérica que os comporta. A referida matriz possui relação direta com a liberação controlada dos ativos incorporados (MORAES, 2009).

Estes sistemas são apontados como uma nova estratégia para o tratamento e prevenção de infecções orais, posto que possuem uma área grande de superfície e alta densidade de carga, permitindo sua interação com a superfície carregada negativamente das células bacterianas em maior extensão, resultando no aumento da atividade antimicrobiana (CAO et al., 2018). A associação de ativos com polímeros tem demonstrado ainda a potencialização das suas propriedades antimicrobianas (SAAFAN, 2018; ARAUJO et al., 2021; TAVARES et al., 2021).

O carregamento de fármacos em sistemas poliméricos possibilita o controle na dosagem, permitido à administração *in situ*, melhorando desta forma o seu aproveitamento pela maior estabilidade em fluidos biológicos. Esta aproximação pode aumentar a estabilidade, possibilitar o armazenamento à temperatura ambiente, aumentando o tempo de prateleira de produtos farmacêuticos. (BEDARD et al., 2010; MARCHESSAULT, 2005, ABRIATA, 2018).

A zeína é um subproduto do milho, biodegradável, ambientalmente correto, não tóxico e biocompatível. Apresenta-se como uma proteína do grupo das prolaminas, que contém regiões hidrofílicas e hidrofóbicas em sua superfície (Figura 2). Este biomaterial pode ser formulado sob a forma de nanopartículas coloidais esféricas, contribuindo para a liberação controlada e direcionada de diversos princípios ativos, aumentando ainda a sua potência (PASCOLI et al., 2018).

Figura 2- Estrutura química da Zeína



Fonte: Tavares (2018).

Recentemente, foram observadas associações positivas de zeína com outras moléculas terapêuticas como a tetraciclina (SOUSA et al., 2021), ácido anacárdico (ARAÚJO et al., 2021), ácido elágico (TAVARES et al., 2021) e EGCG (VALE et al., 2022). No Quadro 1 estão descritas algumas moléculas cuja estabilidade foi melhorada a partir da encapsulação em nanopartículas de zeína.

Quadro 1- Avaliação da estabilidade de fármacos encapsulados em nanopartículas de zeína.

Estabilidade da zeína em nanopartículas		
Fármaco incorporado	Resultados alcançados	Referência
Curcumina	As nanopartículas permaneceram estáveis por 90 dias no escuro.	Gomez et al., (2012)
5-fluoracil, timol e carvacrol	Formulações mantidas a 20°C apresentaram precipitação e agregação após 2-6 meses de armazenamento. Enquanto as mantidas a 6°C permaneceram estáveis durante todo tempo de estudo.	Da Rosa et al., (2015)
Indometacina e tetraciclina	A encapsulação de IND e TCL em nanopartículas de zeína aumentou o tamanho de partícula em relação às nanopartículas brancas, com tamanhos de 380,0; 501,5 e 288,0 nm, respectivamente. Os complexos	Sousa et al., (2013)

	obtidos apresentaram tamanho uniforme, com pdI entre (0,027 a 0,070) e potencial zeta positivo para agregados de zeína e IND/zeína com parâmetros menores para TCL/zeína.	
Ácido anacárdico (AA)	Desempenho satisfatório da encapsulação de AA em nanopartículas de zeína. Confirmou-se estabilidade após 90 dias para as nanopartículas e o seu tamanho manteve-se abaixo de 400nm.	Araujo et al., (2021)
Ácido elágico	A nanoencapsulação de EA em nanopartículas de zeína foi realizada com sucesso. Obteveram-se nanopartículas esféricas de superfície lisa, com tamanho abaixo de 370 nm, potencial zeta positivo e monodispersas.	Tavares et al., (2021)
Epigallocatequina-3-galato (EGCG)	A encapsulação de EGCG em nanopartículas de zeína apresentou nanopartículas estáveis a 25°C e a 4°C por 365 dias.	VALE et al., (2022)

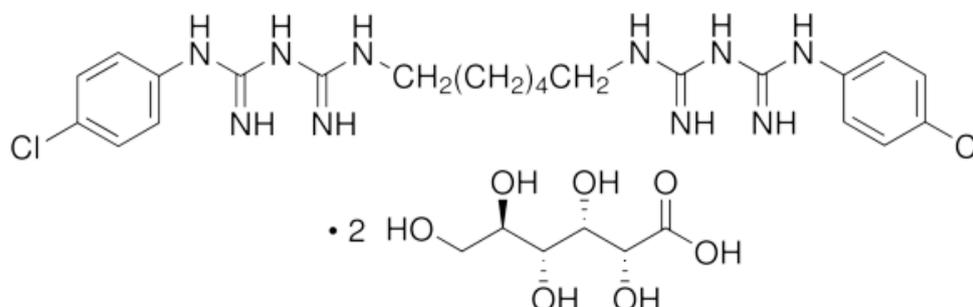
Fonte: Autoria própria (2023).

Em síntese, o uso de nanopartículas de zeína representa diversas vantagens na administração de fármacos, garantindo a sua liberação inicial, seguida pela manutenção de doses eficazes (BRUCK, 1983). Sendo este aspecto, extremamente válido ante os aspectos físicos e fisiológicos presentes na cavidade oral, os quais precisam de adaptações estratégicas de modo a oferecer menos incômodo aos pacientes, aumentando sua adesão ao tratamento, associados ainda à manutenção da estabilidade e eficácia dos fármacos encapsulados.

3.3 DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

O CHX atua contra bactérias, fungos, leveduras e vírus lipofílicos, consagrando-se como um dos agentes antissépticos mais potentes, com ação bacteriostática em concentrações baixas e bactericida em concentrações elevadas (BASRANI; LEMONIE, 2004). A sua atividade antimicrobiana baseia-se na interação entre a carga positiva da molécula e os grupos fosfato de carga negativa presentes na parede celular bacteriana, permitindo que a molécula de CHX penetre na bactéria com efeitos tóxicos (GOMES et al., 2013).

A sua estrutura química é composta por dois anéis clorofenólicos e dois grupos bis-biguanida, ligados simetricamente por cadeias hexametilénicas (Figura 3). A bis-biguanida é uma base forte, carregada positivamente, praticamente insolúvel em água. Por efeito, seu uso é predominantemente sob a forma de digluconato, devido apresentar maior hidrosolubilidade (BASRAN; LEMONIE, 2004).

Figura 3 - Estrutura química do digluconato de clorexidina

Fonte: Autoria Própria (2023).

A aplicação do CHX na cavidade oral relaciona-se principalmente a limpeza de campos operatórios, descontaminação de canais radiculares, prevenção e inibição na formação de placas e gengivite (GARNER; BARBOUR, 2015). A disponibilização comercial do CHX ocorre somente sob a forma de solução ou gel; tornando um desafio a sua veiculação em materiais dentários. A sua incorporação em materiais, como polímeros experimentais (PALLAN et al., 2012) e em formulações antimicrobianas para aplicação na cavidade oral, tem sido alvo de diferentes estudos (Quadro 2).

Quadro 2- Estudos realizados sobre incorporação de digluconato de clorexidina em materiais e formulações direcionadas a cavidade oral.

Incorporação de Clorexidina em materiais e formulações para aplicação na cavidade oral		
Material/ Formulação	Resultado alcançado	Referência
CHX incorporado em cimento ionômero de vidro convencional (CVC)	Ação antimicrobiana frente <i>Lactobacillus casei</i> , <i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> . Não houve comprometimento das propriedades físicas do CVC.	Sanders et al., (2002)
CHX encapsulada em (PEG- b -PLA) com dispersão em matriz de hidrogel composta por 1% de hidroxietilcelulose	Melhora da ação antimicrobiana frente <i>E. faecalis</i> para aplicação intracanal.	Haseeb et al., (2016)
Nanopartículas mesoporosas de silicato de cálcio carregadas com CHX	Melhora da ação antimicrobiana frente <i>E. faecalis</i>	Fan et al., (2016)
Micropartículas de (PLGA) carregadas com CHX	Inibição de <i>S. mutans</i> e liberação controlada por até 120 dias.	Sousa et al., (2021)

Fonte: Autoria própria (2023).

Embora, o seu uso como enxaguante bucal seja considerado seguro e recomendado (BELOW et al., 2017) é preciso cuidados em casos de exposição contínua à altas concentrações. Uma vez que a sua degradação pode levar a formação de p-cloroanilina produto com caráter nefrotóxico e hepatotóxico (LEIKIN; PALOUCZEK, 2007).

Por conseguinte, é importante trabalhar a estabilidade e a liberação do CHX com o objetivo de reduzir as doses ou o tempo de contato com o paciente para evitar os seus efeitos deletérios e/ou de seus produtos de degradação (SALVADOR, 2017). No Quadro 3 são descritos alguns estudos que verificaram a estabilidade de algumas apresentações comerciais de clorexidina.

Quadro 3- Estudos de avaliação da estabilidade do diacetado de clorexidina e digluconato de clorexidina.

Avaliação da estabilidade de Clorexidina		
Formulação	Resultado alcançado	Referência
Micropartículas de Poli (ácido láctico-co-glicólico) carregadas com soluções diacetado de clorexidina e CHX	Micropartículas de CHX são mais sensíveis ao calor em relação ao diacetado, apresentando diminuição de concentração de CHX durante 60 dias.	Nojosa (2012)
Micropartículas de Poli (ácido láctico-co-glicólico) carregadas com soluções diacetado de clorexidina e CHX	Diminuição da concentração de diacetado em todas formulações testadas com destaque as expostas a 37°C. Enquanto as compostas por CHX mantiveram-se estáveis em todas as concentrações testadas (2 ,4, 5 e 20 µg/ml) a 25°C e 37°C durante 66 dias.	Morais (2015)

CHX (Digluconato de clorexidina)

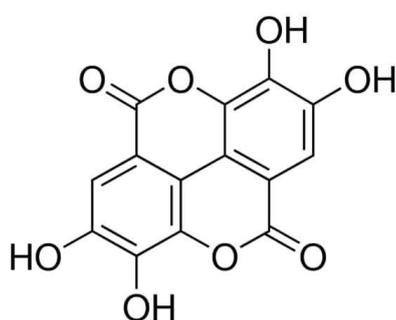
Fonte: Autoria própria (2023).

Os estudos listados dão ênfase às formas de incorporar, avaliar e melhorar a estabilidade do CHX, além disso, demonstram a relevância deste trabalho, pois seus resultados apontam para novas alternativas de veiculação deste fármaco, haja vista a urgência crescente de formulações mais eficazes frente aos microrganismos presentes em infecções odontológicas, uma vez que os antimicrobianos convencionais possuem certas limitações, como a baixa concentração atingida nos tecidos e o maior risco de efeitos adversos (SOUSA et al., 2021). As aplicações diferenciadas, além da incorporação em materiais e a sua associação com outros ativos, a exemplo do EA, podem auxiliar no controle da formação e crescimento de biofilmes e impedir a progressão de doenças que possam comprometer ainda mais a saúde dos pacientes atuando de forma mais estratégica no estabelecimento do equilíbrio da microbiota oral.

3.4 ÁCIDO ELÁGICO

O EA é um polifenol encontrado em frutas como morango, romã, framboesa, amora e em plantas como o chá verde e na casca de eucalipto (SHAKERI et al., 2018). A sua estrutura química consiste de 4 grupos hidroxila e de alguns anéis lactona que representam a sua porção hidrofílica (Figura 4).

Figura 4- Estrutura química do Ácido elágico



Fonte: Autoria Própria (2023).

Este bioativo possui atividade anticancerígena, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana (GALANO; MARQUEZ; GONZÁLEZ, 2014). Acredita-se que a sua ação antimicrobiana pode estar relacionada à capacidade de inativar adesinas microbianas, enzimas e proteínas de transporte do envelope celular (HASLAM, 1996). Outrossim, dispõe de hidrofobicidade parcial que o permite ser ativo na interface da bactéria, e possivelmente ser incorporado em sua membrana, resultando em ruptura ou desestabilização desta. Este mecanismo de ação é especialmente necessário para inibir bactérias Gram negativas como *P. aeruginosa* uma vez que a camada externa de lipopolissacarídeos destas é altamente hidrofóbica (QUAVE et al., 2012).

Embora seja considerado um potente candidato a medicamento devido a sua baixa toxicidade e aos múltiplos modos de ação (WANG, 2011; YUN, 2010), este bioativo apresenta algumas limitações como baixa solubilidade (KANG et al., 2006).

A associação do EA a outros fármacos e polímeros é investigada como alternativa de aproveitamento de suas atividades biológicas e correção das suas limitações (Quadro 4).

Quadro 4- Alguns efeitos promissores do ácido elágico para diferentes finalidades.

Associação de Ácido Elágico			
Formulação	Atividade Avaliada	Resultado	Referência
1.Solubilização de zeína a 2,5 µg/ml em EA a 144 µg/ml	Antimicrobiana	a) EA isolado: obteve CIM igual a 0,104 e 0,208 µg/ml frente <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> , respectivamente. b) EA+ zeína: CIM em 0.125 e 0,104 µg/ml frente <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> , respectivamente. c) EA + quitosana: CIM em 0,083 e 0,0625 µg/ml frente <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> , respectivamente d) EA + zeína + quitosana: CIM em 0.104 e 0.166 µg/ml frente a <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .	Tavares et al.,(2018)
Avaliação do extrato hidroetanólico de <i>Punica granatum L</i> (romã) rico em EA.	Citogenética e toxicológica	Observou-se efeito anti-genotóxico de 90,6%. Destacando EA como alternativa na prevenção de danos aos DNA.	VALE et al., (2020)
Nanopartículas de zeína carregadas com EA (144 µg/ml)	Antibiofilme	Redução de viabilidade bacteriana em aproximadamente 30% nos biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> e 60% de <i>S. aureus</i> . Associação sinérgica entre zeína e EA para ação antimicrobiana.	Tavares et al., (2021)
Avaliação do extrato de <i>Punica granatum L</i> (romã) rico em EA	Antibacteriana e cicatrizante	Inibição de resistência de <i>S. aureus</i> a meticilina, ação sinérgica de extrato com meticilina, ação cicatrizante em úlceras na língua de camundongos.	Dahash et al., (2021)

AE: Ácido elágico; CIM: Concentração Inibitória Mínima.

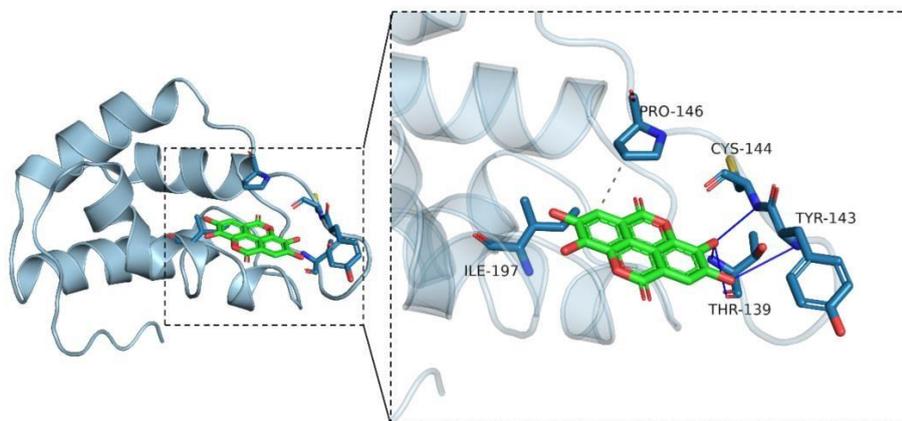
Fonte: A autoria própria (2023).

Diante do exposto, o EA é apontado como uma alternativa clínica adequada para prevenir o descontrole microbiano e a formação de biofilmes bacterianos de forma a reduzir a viabilidade de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (TAVARES et al., 2018; 2021).

Proteínas como a zeína e polifenóis como o EA são dois componentes essenciais para a formação de sistemas complexos, pois as suas interações são frequentes durante sua produção e armazenamento. Além disso, os polifenóis possuem boa afinidade de ligação às proteínas, uma vez que alteram suas estruturas e propriedades funcionais, influenciando

fortemente no aperfeiçoamento de suas atividades (PALIWAL; PALAKURTHI, 2014). A Figura 5 mostra a simulação computacional da ligação do EA com a zeína.

Figura 5 - Imagem 3D de simulação de docking molecular enfatizando a ligação não covalente de zeína com EA.



nota: o cartoon azul claro representa a zeína; o bastão verde o ácido elágico; a linha azul representa a ligação de hidrogênio; a linha tracejada cinza representa o efeito hidrofóbico gerado pela associação de EA-zeína.

Fonte: Zhao (2022).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

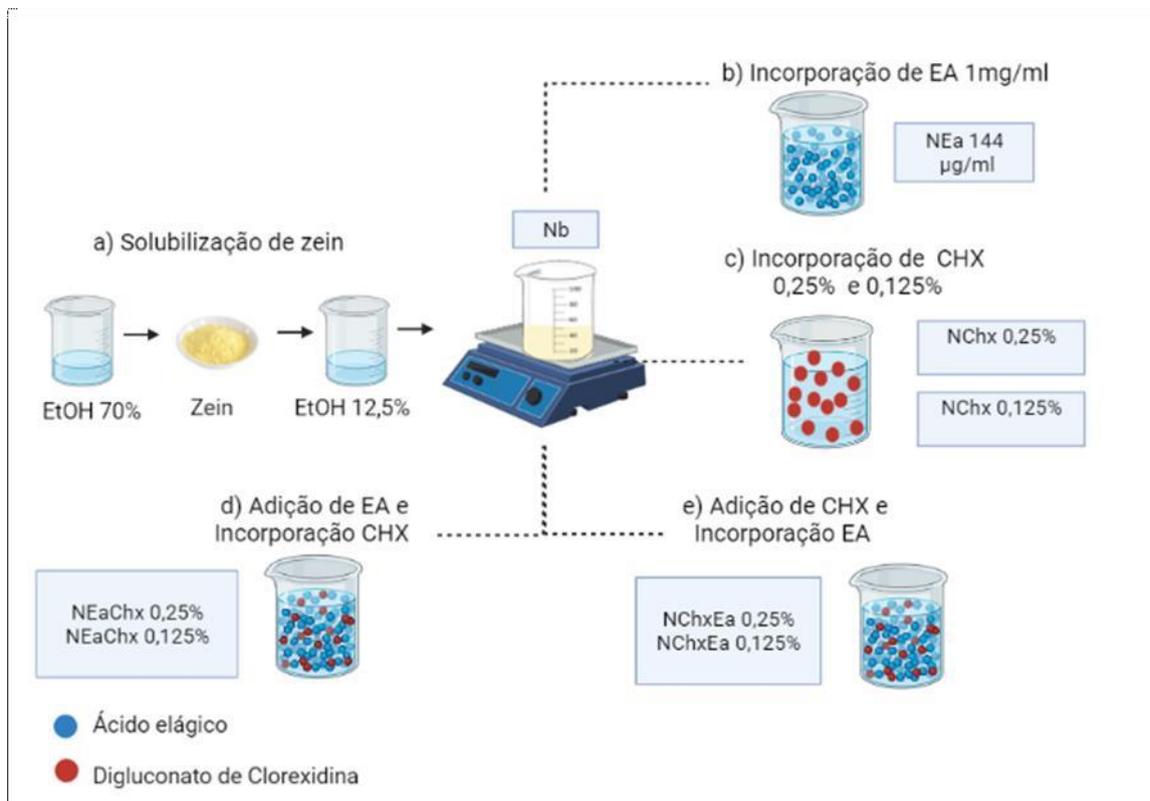
4.1 MATERIAL

Para o preparo de nanopartículas foram utilizados zeína e ácido elágico (EA) adquiridos da empresa Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA) e digluconato de clorexidina (CHX) do laboratório Guinama (Valencia, Espanha). Foram utilizados ainda caldo Brain Heart-Infusion (BHI), Ágar Muller Hinton (MH) e caldo soja Trypticaseína (TSB) adquiridos da empresa Kasvi® (Campinas, Brasil). Os demais reagentes, de grau analítico, foram utilizados conforme recebidos, seguindo as orientações dos fabricantes.

4.2 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de zeína carregadas com CHX e AE foram preparadas a partir do método de nanoprecipitação, descrito por TAVARES et al., 2021. Inicialmente, dissolveu-se a zeína em etanol a 70 % (v/v). Em seguida, adicionou-se etanol a 12,5 % (v/v) e por fim, incorporou-se o EA a 1 mg/ml previamente solubilizado em metanol P.A., homogeneizando-o cuidadosamente sob agitação contínua, no intuito de se obter o sistema coloidal. De modo semelhante, o CHX foi incorporado diretamente a partir da solução a 2% para alcançar as concentrações de 0,25 e 0,125% (p/v). As nanopartículas brancas (Nb), desprovidas de fármaco, também foram preparadas de modo semelhante. As formulações preparadas foram denominadas conforme ordem de incorporação, descritas a seguir: NChxEa_{0,25%} ou _{0,125%} (nanopartículas de zeína carregadas com CHX a 0,25% ou 0,125% com posterior incorporação de EA a 144 µg/ml), NEaChx_{0,25%} ou _{0,125%} (nanopartículas de zeína carregadas com ácido elágico a 144 µg/ml com incorporação posterior de CHX a 0,25% ou 0,125%). A Figura 6 descreve sobre o procedimento de preparo das nanopartículas citadas acima. Para fins de comparação, soluções de CHX a 0,25% e 0,125% e soluções de EA a 144 µg/ml foram preparadas no mesmo veículo e nas mesmas condições das nanopartículas.

Figura 6- Procedimento de preparo de nanopartículas de zeína, carregadas com ácido elágico e/ou digluconato de clorexidina.



Nb (nanopartículas de zeína); NEa (nanopartículas de ácido elágico a 144 µg/ml); NChx 0,25% e 0,125% (nanopartícula de zeína carregada com CHX a 0,25% ou 0,125%); NEaChx 0,25% e/ou 0,125% (nanopartículas de zeína carregada com EA a 1mg/ml com incorporação de CHX a 0,25% e/ou 0,125%); NChxEa 0,25% e 0,125% (nanopartículas de zeína carregada com CHX a 0,25% ou 0,125% com incorporação de EA a 144 µg/ml).

Fonte: Autoria própria (2023).

O método de nanoprecipitação utilizado neste estudo tem como vantagem ser rápido, fácil e reprodutível. Favorecendo a obtenção de nanopartículas esféricas de distribuição homogênea, além de não necessitar de fontes de energia externa. (RODRIGUES et al., 2004).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram caracterizadas em termos de tamanho (nm), índice de polidispersão (pdl) e potencial zeta (mV) (Zetasizer® Nano-ZS, Malvern Instruments).

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica se mantém íntegra, dentro dos limites estabelecidos para o período de estocagem e uso, de forma a manter as mesmas condições e características de sua fabricação (SILVA et al., 2009).

Desta forma, as nanopartículas foram submetidas a um estudo de estabilidade acelerado conforme a normativa do ICH (1996;2003) sendo expostas a diferentes condições de armazenamento como temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), refrigeração ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) e ao calor ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) de modo a averiguar o seu comportamento, sendo avaliados estes parâmetros ao longo do tempo: tempo zero (t_0) e 90 dias (t_{90}). Este tipo de estudo é projetado para aumentar a velocidade de degradação química e/ou alterações físicas no produto farmacêutico pela utilização de condições drásticas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e estimar o prazo de validade sob condições normais de armazenamento (ANVISA, 2020).

4.4 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO POR FLUORESCÊNCIA ENTRE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO COM ZEÍNA

4.4.1 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

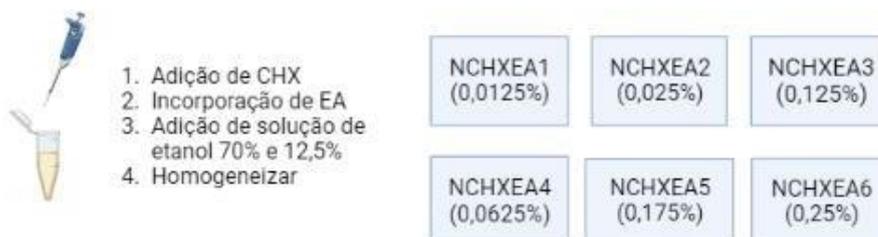
Para avaliar a interação entre CHX e EA por fluorescência foi necessário o desenvolvimento de formulações pelo método de nanoprecipitação com variação de concentração dos princípios ativos de modo a se apreciar o efeito sobre a interação com a zeína (Figura 7).

Primeiro, foram preparadas as nanopartículas de ambos os fármacos com concentrações fixas: NCHX a 0,5% e NEA a 288 $\mu\text{g/ml}$, em sequência a partir destas derivaram-se as demais com a incorporação do outro ativo. Quando incorporada inicialmente a CHX teve sua concentração variada nas formulações na medida em que o EA manteve-se incorporado fixamente a 288 $\mu\text{g/ml}$ em todas as formulações, sendo denominadas da seguinte forma: NCHXEA1 (nanopartícula de CHX a 0,0125%); NCHXEA2 (nanopartícula de CHX a 0,025%); NCHXEA3 (nanopartícula de CHX a 0,125%); NCHXEA4 (nanopartícula de CHX a 0,0625%); NCHXEA5 (nanopartícula de CHX a 0,175%); NCHXEA6 (nanopartícula de CHX a 0,25%).

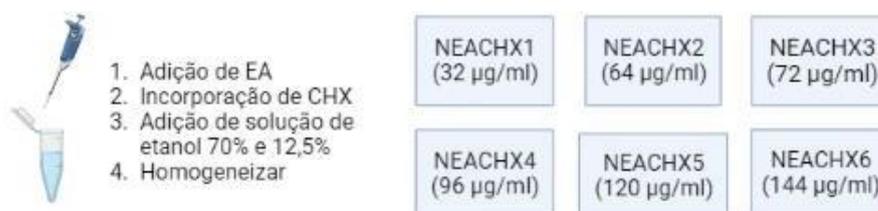
Para as formulações em que o EA foi incorporado primeiro, também se realizou a análise da variação de sua concentração partindo de 288 $\mu\text{g/ml}$ considerando-se que a CHX manteve-se fixa a 0,5% em todas as formulações (Figura 8), denominadas como: NEACHX1 (nanopartícula de EA a 32 $\mu\text{g/ml}$); NEACHX2 (nanopartícula de EA a 64 $\mu\text{g/ml}$); NEACHX3 (nanopartícula de EA a 72 $\mu\text{g/ml}$); NEACHX4 (nanopartícula de EA a 96 $\mu\text{g/ml}$); NEACHX5 (nanopartícula de EA a 120 $\mu\text{g/ml}$); NEACHX6 (nanopartícula de EA a 144 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 7- Procedimento de preparo das nanopartículas co-encapsuladas com CHX e EA em diferentes concentrações para avaliação por fluorimetria.

a) Nanopartículas de CHX a partir de 0,5% com incorporação fixa de EA a 288 µg/ml



b) Nanopartículas de EA a partir de 288 µg/ml com incorporação fixa de CHX a 0,5%



Fonte: Autoria Própria (2023).

4.4.2 ANÁLISE POR FLUORÍMETRIA

A avaliação da fluorescência em estado estacionário das formulações desenvolvidas no item 4.4.1 foi realizada no Espectrofotômetro F-7000 FL (Hitachi, Japão) a 25°C. As nanopartículas foram respectivamente depositadas em uma célula de quartzo de 10 mm x 10 mm x 45 mm. À medida que os espectros de fluorescência de nanopartículas de zeína com ausência de fármacos (NB), bem como as nanopartículas fixas de EA (NEA a 288 µg/ml) e de CHX (NCHX a 0,5%) e as nanopartículas com incorporação dos dois ativos foram medidas em um comprimento de onda de excitação de $\lambda = 278$ nm, registrados na faixa de 285–450 nm. As faixas de excitação e emissão foram ajustadas para 5 nm. Por fim os espectros de fluorescência foram plotados usando OriginPro 8.0 (OriginLab, EUA, 2002).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para avaliar o potencial antimicrobiano das formulações desenvolvidas, foram utilizadas as cepas padrão (*American Type Culture Collection - ATCC*) – *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC 700610), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC6539P), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231), as quais foram mantidas e cultivadas segundo as suas condições específicas.

4.5.1 PREPARO DO INÓCULO

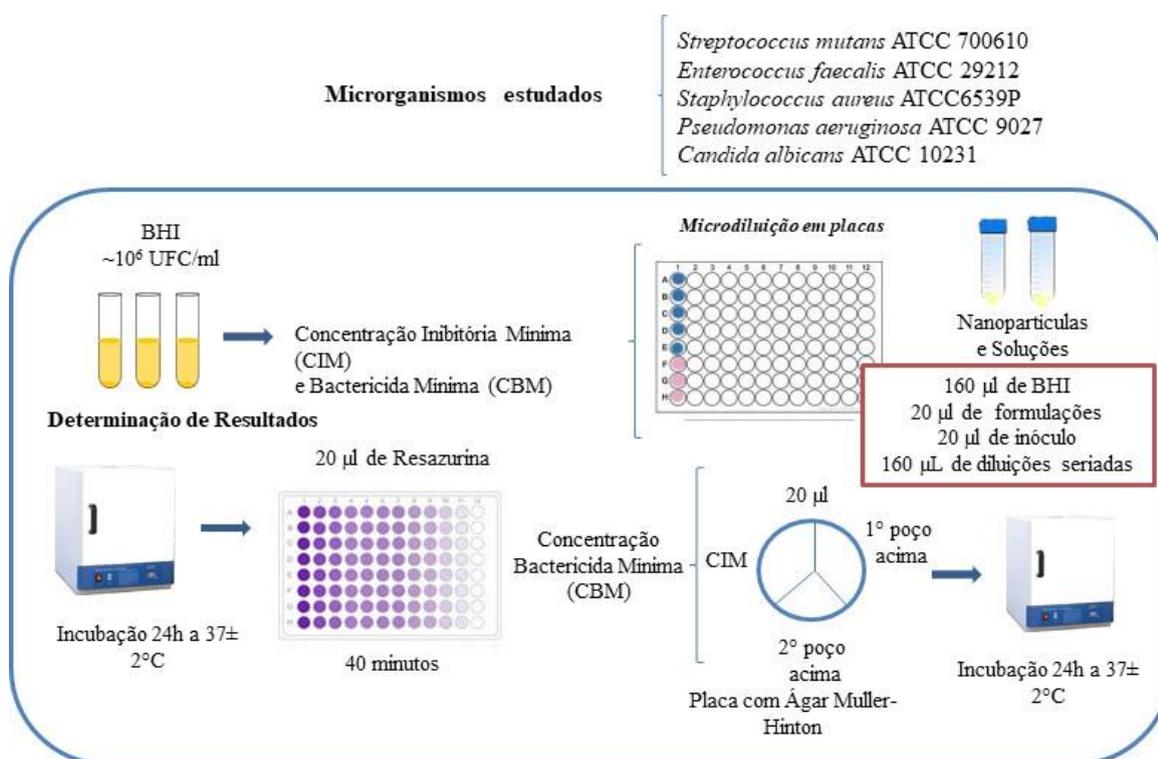
Para preparar o inóculo, foram retiradas de três a quatro colônias de cepas isoladas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) (KASVI®), sendo diluídos em caldo BHI estéril (Acumedia®) até atingir a turbidez correspondente a 0,5 da escala de Mac Farland, contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ e 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC)/ml, para bactérias e levedura, respectivamente (NCCLS, 2018). As mesmas foram diluídas antes do início dos experimentos, resultando numa concentração final em cada poço de $\sim 10^6$ UFC/ml.

4.5.2 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Foi utilizada a técnica de microdiluição em placas para se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) (NCCLS, 2018). A atividade antibacteriana das nanopartículas foi comparada a solução dos fármacos preparada no mesmo veículo utilizado. Para a determinação da CIM, foram efetuadas diluições seriadas de cada formulação em caldo BHI estéril, sendo adicionados 160 μ L de cada diluição em poços de placas de cultivo celular estéril de 96 poços contendo 160 μ L de caldo BHI estéril e 20 μ L do inóculo previamente preparado. O resultado do teste foi determinado através da observação de turvação nos poços após 24 horas de incubação a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. A CIM é definida como a menor concentração de cada formulação capaz de inibir completamente o crescimento aparente dos microrganismos. Para determinar o CBM, alíquotas de 20 μ L, obtidas a partir do poço correspondente a CIM e dos 2 poços não turvos imediatamente anteriores foram semeadas superficialmente em placas de ágar MH estéril, as quais em seguida foram incubadas durante 24 h a 37°C . A CBM é definida como a concentração mínima do agente testado capaz de matar a maioria ($\geq 99.9\%$) dos microrganismos viáveis após incubação,

detectada a partir do não crescimento bacteriano na superfície do ágar. Seis réplicas foram realizadas para cada formulação (Figura 8).

Figura 8- Procedimento da avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de zeína carregadas com CHX e/ou AE frente a cepas causadoras de infecções orais.



Fonte: Autoria própria (2023).

4.6 AVALIAÇÃO DE EFEITO SINÉRGICO ENTRE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO

Para avaliação de efeito sinérgico entre CHX e AE frente às cepas bacterianas citadas no item 4.4 utilizou-se o método *cross-board check* que permite avaliar a combinação de agentes farmacológicos, observando-se os seguintes efeitos: sinergismo - indica que a combinação dos compostos aumenta a atividade inibitória (diminuição de CIM) de um ou de ambos os compostos quando comparados ao seu efeito isolado (sozinhos); efeito aditivo/indiferente - ocorre quando a combinação não apresenta aumento considerável na atividade inibitória; e antagonismo - quando a combinação de compostos apresenta-se desfavorável, diminuindo a atividade dos compostos quando em associação (LORIAN, 2005).

Neste estudo, as nanopartículas e soluções de AE a 144 µg/ml foram combinadas ao CHX (concentração inicial de 75 µg/ml), a partir de diluição seriada em microplaca de 96 poços, de modo a se avaliar o ponto de inibição da combinação destes com menor concentração (CIM). Para finalizar, foram adicionados em cada poço 20 µL de cada um dos inóculos contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC/ml previamente preparados em caldo BHI, conforme descrito no item 4.5.1.

Após a incubação da microplaca em estufa a 37°C durante 24h, foram adicionados 10 µL de solução resazurina a 0,1% em todos os poços, incubando novamente a microplaca em estufa a 37°C durante 40 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura das microplacas para análise de resultados a partir da mudança de coloração promovida pela resazurina (Figura 9) O efeito sinérgico é determinado através do cálculo do índice de concentração inibitória fracionária (FIC), conforme equação a seguir:

$$FIC = \frac{A}{MIC A} + \frac{B}{MIC B} = FIC A + FIC B$$

Onde:

A e B: representam a MIC da combinação em um único poço;

MIC A e MIC B: representam a MIC individual de cada fármaco;

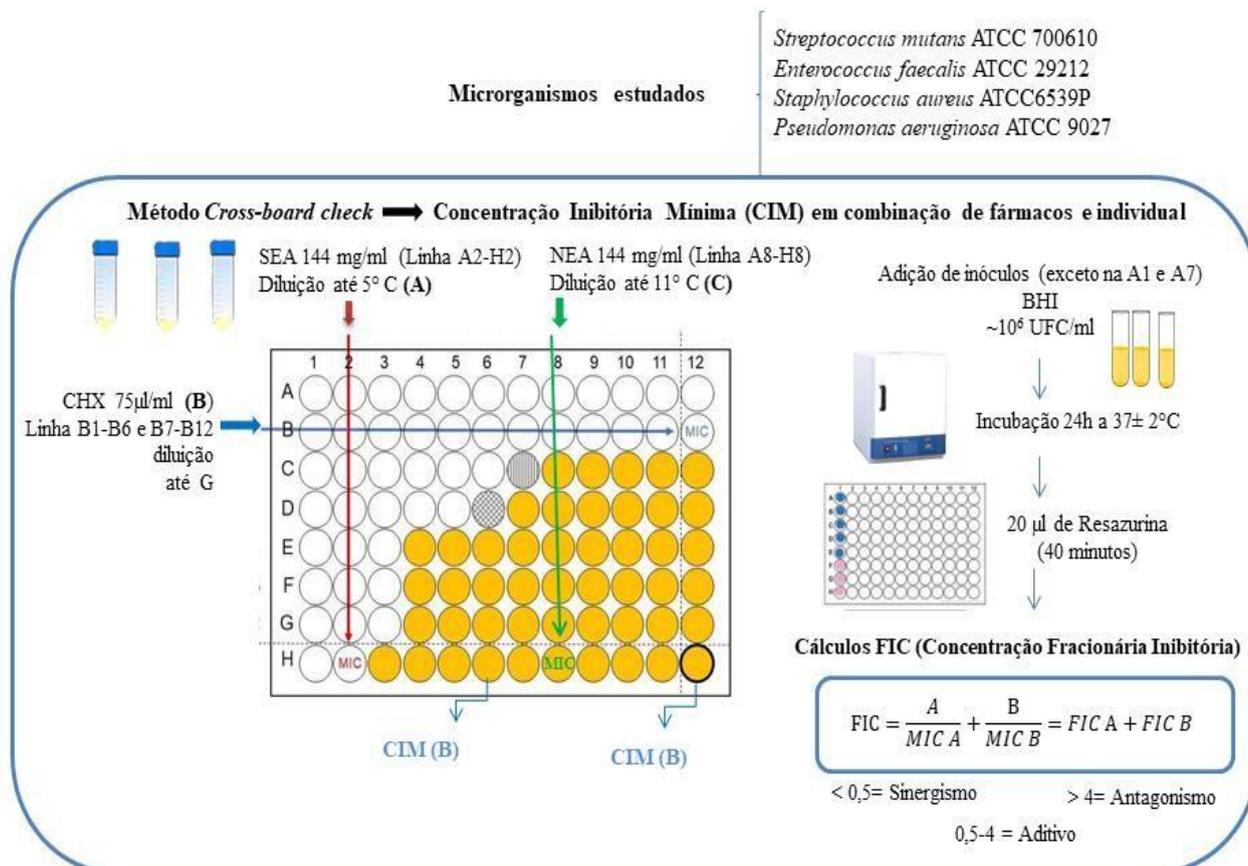
FIC: categoriza interação entre produtos testados

FIC < 0,5 caracteriza um efeito sinérgico;

FIC > 4, indica antagonismo;

Se $0.5 \leq FIC \leq 4$, corresponde a um efeito aditivo/indiferente.

Figura 9- Procedimento de avaliação de efeito sinérgico entre o digluconato de clorexidina e solução e nanopartículas de ácido elágico frente a cepas envolvidas em infecções orais.



Fonte: Adaptado de (LORIAN, 2005).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

A avaliação da atividade das nanopartículas e solução contendo clorexidina e ácido elágico frente aos biofilmes de *S. aureus* e *S. mutans* foi determinada pelo método do cristal violeta, conforme previamente descrito (STEPANOVIC et al., 2004).

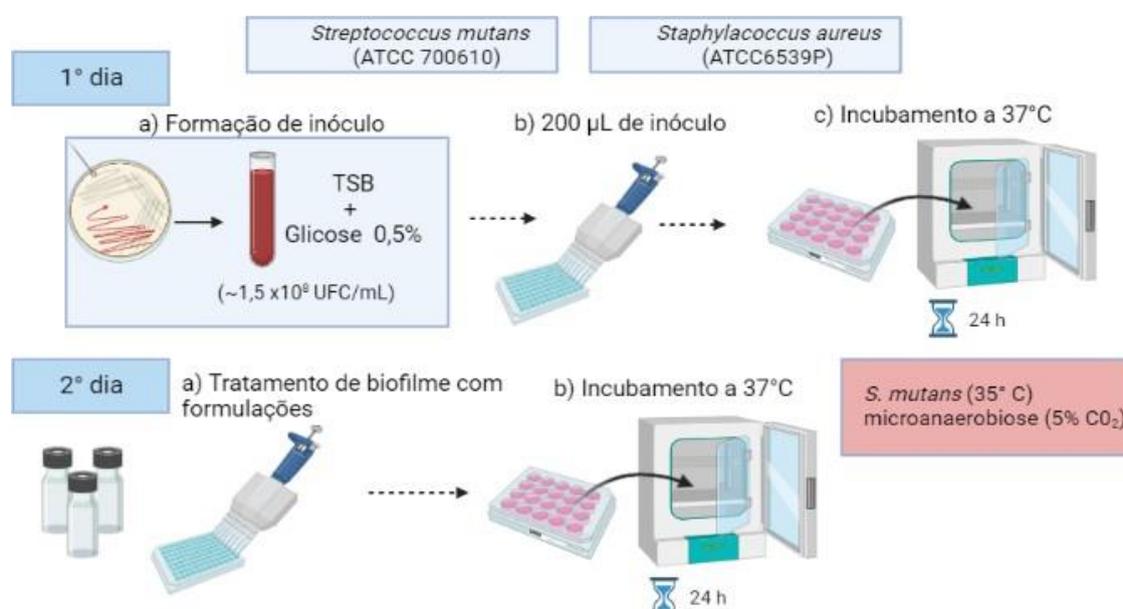
Os biofilmes foram formados em microplacas de 96 poços, utilizando o inóculo ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) preparado em meio TSB suplementado com glicose a 0,5%. Foram depositados 200 μ L do inóculo em cada poço, sendo as placas incubadas a 37°C, em condição de microanaerobiose (5% CO₂) para o *S. mutans* e aerobiose para as demais cepas, durante 24h. Após este período, os biofilmes foram lavados com solução fisiológica estéril para remover as bactérias não aderentes, tratados com as nanopartículas e as suas respectivas soluções e controles (positivo – CHX a 2% p/v e negativo – solução salina estéril), sendo

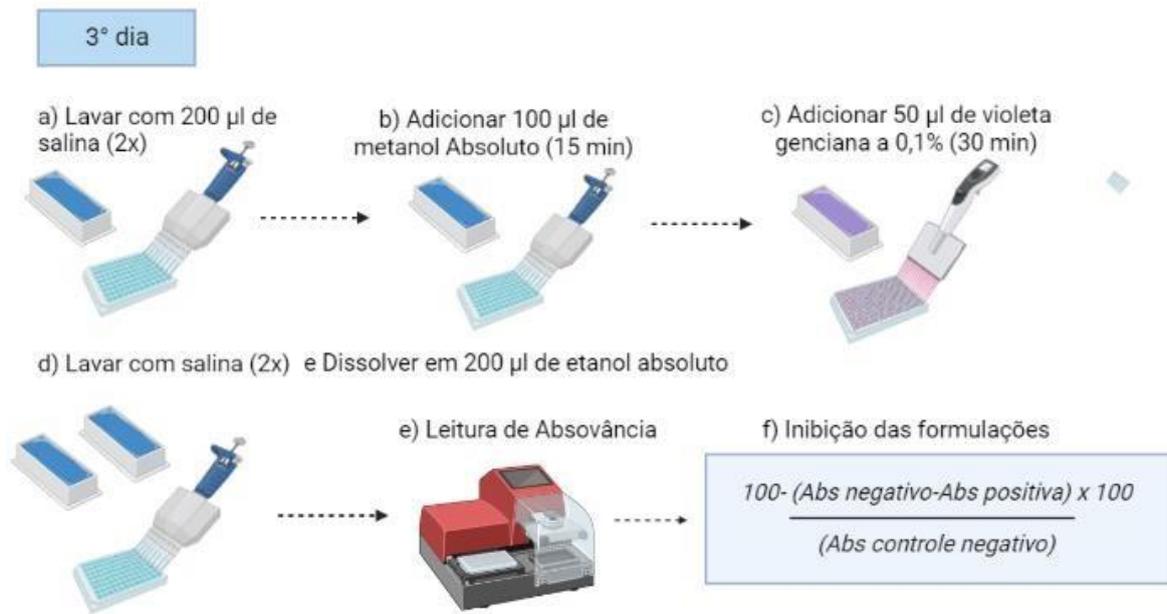
incubados novamente durante 24h. Em seguida, os tratamentos foram removidos e o biofilme formado cuidadosamente lavado com solução salina estéril. Em seguida, foram fixados com 100 µl de metanol absoluto e corados com cristal violeta (0.1% p/v). Após 30 minutos, o excesso de cristal violeta foi removido através de lavagem com solução salina estéril e o biofilme remanescente dissolvido em etanol absoluto, sendo imediatamente submetido à determinação da absorvância em leitora de microplacas DR-200BS-NM-BI (Kasuaki).

Para se determinar a biomassa remanescente, a absorvância dos poços contendo apenas meio de cultura (sem inóculo) foi utilizada para restar o efeito do meio em todos os poços com inóculo, enquanto que os biofilmes não tratados (controle negativo) foram utilizados como crescimento máximo (100%) e a sua média utilizada para determinar por comparação proporcional à inibição dos tratamentos testados (Figura 10). A inibição (%) foi determinada a partir da seguinte equação:

$$100 - \frac{(Abs \text{ controle negativo} - Abs \text{ amostra})}{(Abs \text{ controle negativo})} \times 100$$

Figura 10- Procedimento da avaliação da atividade antibiofilme pelo método do cristal violeta.





Fonte: Autoria Própria (2023).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos ensaios foram expressos como média \pm desvio padrão. Estes foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para efeito de comparação entre os pares, assumindo um nível de significância mínimo de $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft®).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

Foram obtidas nanopartículas de zeína carregadas com CHX e AE individualmente e co-encapsulados. As suas principais características iniciais (t_0), após 90 dias (t_{90}) e após 180 dias (t_{180}) de armazenamento à temperatura ambiente, encontram-se listadas na Tabela 1.

As Nb permaneceram estáveis em todos os tempos analisados (t_0 , t_{90} e t_{180}). Inicialmente as NChx_{0,25%} e NChxEa_{0,125%} apresentaram tamanho entre 300 a 485nm, enquanto as NEa, NChx_{0,125%} e NEaChx_{0,125%} apresentaram tamanho médio entre 500 e 573nm, contudo as NEaChx_{0,25%} e NChxEa_{0,25%} demonstraram tamanho acentuado de 700 a 863nm. Entretanto, após 90 dias as NChxEa_{0,125%}, NEaChx_{0,25%} e NEaChx_{0,125%} foram removidas do estudo devido formação de precipitados com difícil redispersão. Já as NChx_{0,25%}, NChx_{0,125%}, NChxEa_{0,25%} e Nb permaneceram no estudo, porém a maioria destas apresentaram um aumento de tamanho considerável. Para finalizar, após 180 dias as NEa, NChx_{0,125%}, NChxEa_{0,25%} e Nb mantiveram os mesmos tamanhos de sua análise após 90 dias, enquanto a NChx_{0,25%} foi removida do estudo.

Identificou-se inicialmente que a maioria das formulações desenvolvidas obteve valores de pdI inferiores a 0,3, indicando sistemas majoritariamente monodispersos (LI et al., 2017). No entanto, após 90 e 180 dias houve um aumento considerável deste parâmetro em relação ao tempo inicial, para as nanopartículas que permaneceram no estudo (NChx_{0,125%} e NChxEa_{0,25%}) com exceção da Nb que manteve seu pdI igual a 0,156 e 0,175, respectivamente.

O aumento do tamanho de partícula e pdI pode ser atribuído à ordem de incorporação dos ativos à formulação bem com condicionado a estabilidade do CHX e EA sob as condições de armazenamento aos quais foram submetidos. Outros parâmetros envolvidos na formação dos sistemas como a proporção e/ou adição da fase orgânica sob a fase aquosa, tempo de difusão entre os compostos e pelo método de adição podem igualmente ter influenciado nos resultados alcançados (YALLAPU et al., 2010).

Tabela 1- Características das nanopartículas de zeína contendo ácido elágico e digluconato de clorexidina em tempo zero (t_0), após 90 dias (t_{90}) e após 180 dias (t_{180}) de armazenamento à temperatura ambiente.

Formulação	AE	CHX	Zeína	Tamanho de partícula (nm)			PdI			Potencial Zeta (mV)		
				t_0	t_{90}	t_{180}	t_0	t_{90}	t_{180}	t_0	t_{90}	t_{180}
NEa	4,8	-	95,2	573,2±9,4	315,6±3,2	314,3±3,1	0,315	0,09	0,08	+28,3	+15,9	+14,9
NChx 0,25%	-	4,2	95,8	387,4±7,8	755,1,4±19,9	ppt	0,220	0,504	0,166	+23,9	+19,8	Ppt
NChx 0,125%	-	8,1	91,9	508,4± 7,8	2.108±133,9	2.112±228,2	0,288	0,493	0,632	+19,7	+15,0	+19,9
NChxEa 0,25%	4,8	4,2	91,0	862,2±17,0	922,1±64,2	1.018±84,5	0,330	0,518	0,480	+ 13,9	+ 16,6	+17,5
NChxEa 0,125%	4,8	8,1	87,1	484,2±4,5	Ppt	-	0,283	ppt	-	+ 22,2	ppt	-
NEaChx 0,25%	4,8	4,2	91,0	751,8±13,5	Ppt	-	0,375	ppt	-	+ 15,2	ppt	-
NEaChx 0,125%	4,8	8,1	87,1	513,5±34,3	Ppt	-	0,247	ppt	-	+20,6	ppt	-
Nb	-	-	100	328,3±7,8	325,0±3,1	330,4±1,7	0,153	0,156	0,175	+35,1	+26,4	+18,0

Ppt: formulação precipitada e com redispersão difícil, removida do estudo de estabilidade.

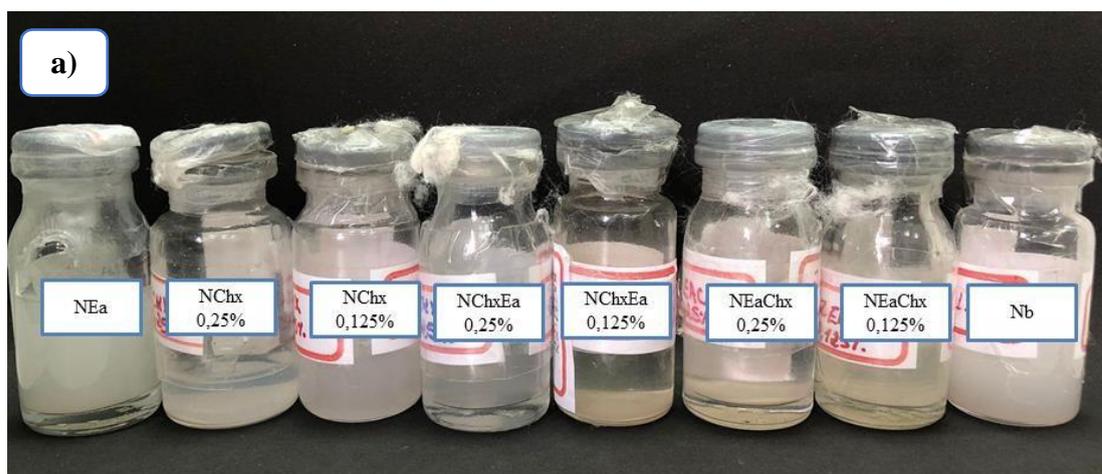
Fonte: Autoria Própria (2023).

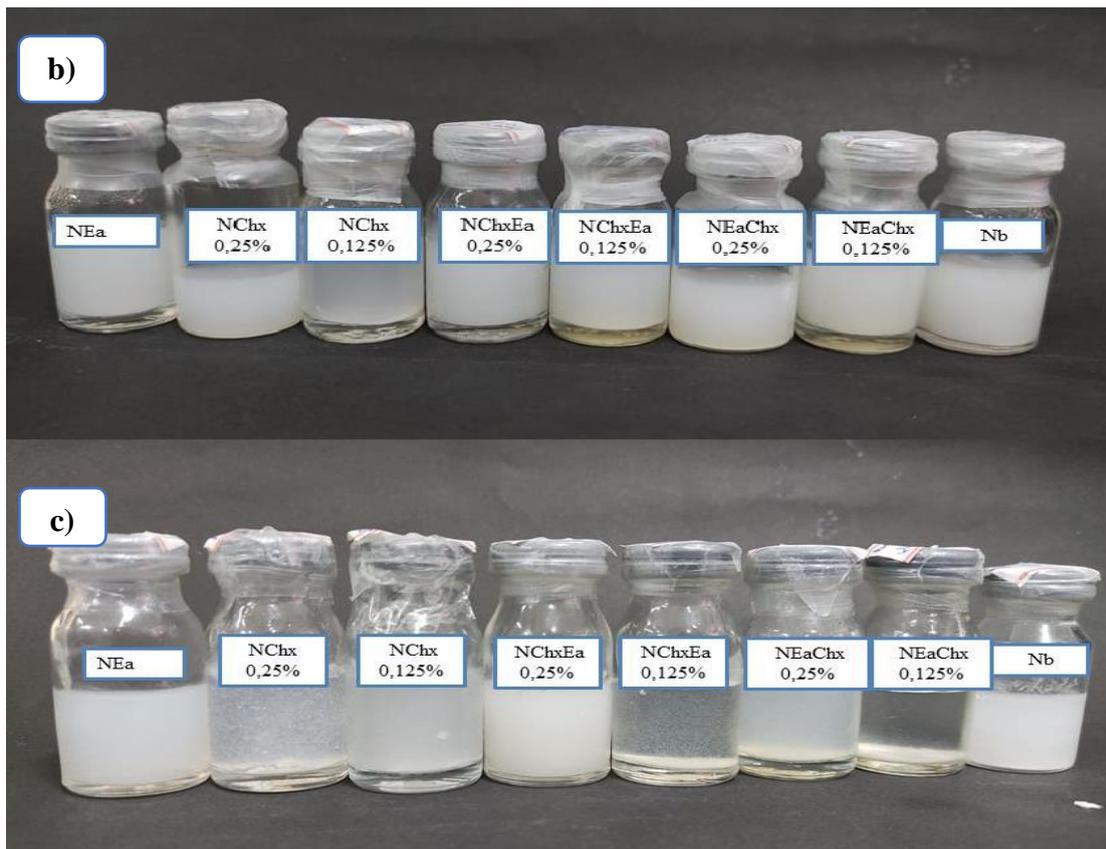
Dentre os sistemas contendo os dois ativos, a adição de CHX a 0,25%, seguida pela incorporação do EA (NChxEa 0,25%), demonstrou ser favorável à estabilização do sistema coloidal, sendo ainda a única que se manteve estável ao longo de 180 dias (Tabela 1).

O potencial zeta representa um fator repulsivo que condiciona a estabilidade dos sistemas coloidais. Dessa forma, quanto maior for o seu valor, maior será a estabilidade da formulação (ALAM et al., 2012). Neste estudo, inicialmente e após 90 e 180 dias a maioria das nanopartículas analisadas obtiveram resultados de potencial zeta dentro dos limites de estabilidade favoráveis ($>+ 15$ mV ou $> + 30$ mV), apontando uma boa dispersão a longo prazo, conferindo estabilidade e resistência a agregação, em conformidade com os resultados de TAVARES et al., (2021).

As características físico-químicas investigadas neste estudo (Tabela 1) são fundamentais para verificar o comportamento destes fármacos individualmente e em conjunto quando incorporados ao seu nanocarreador, o que conseqüentemente irá definir as formulações mais adequadas frente a perspectivas futuras (PAESE, 2008). Foi bastante frequente a quebra dos sistemas pela agregação das nanopartículas, o qual resultou também em alterações macroscópicas (Figura 11).

Figura 11- Representação macroscópica de nanopartículas de zeína carregadas com digluconato de clorexidina e/ou ácido elágico submetidas a diferentes condições de armazenamento: a) ($25\pm 2^\circ\text{C}$), b) ($4\pm 2^\circ\text{C}$) e c) ($40\pm 2^\circ\text{C}$) após 180 dias de análise.





Fonte: Autoria Própria (2023).

Em busca de melhorar o aproveitamento das propriedades proporcionadas pela zeína, alguns pesquisadores tem buscado promover a estabilização de princípios ativos a partir da nanoencapsulação.

No que tange a co-encapsulação de CHX e EA, inicialmente em temperatura ambiente, pôde-se notar que todas as formulações se apresentaram homogêneas, enquanto após 180 dias as co-encapsuladas (NChxEa e NEaChx) mostraram-se frequente para a quebra de sistema por agregação, exceto as formulações isoladas (NEa, Nb, NChx 0,25% e 0,125%). Entretanto, após 180 dias na refrigeração a maioria das nanopartículas isoladas se manteve redispersível (NEa, Nb, NChx 0,25% e 0,125%) assim como as co-encapsuladas (NChxEa 0,25%). Por fim, quanto submetidas ao calor ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) formaram-se agregados de difícil redispersão em todas formulações (Figura 11).

Dentre os sistemas contendo CHX e AE, somente a formulação NChxEa 0,25% se manteve estável ao longo de 180 dias, mostrando-se portanto favorável para o uso destes dois ativos, com vistas a melhorar as atividades biológicas, antibacteriana e antibiofilme que serão abordadas a seguir.

5.2 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE ZEÍNA COM DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO POR FLUORESCENCIA

As nanopartículas foram desenvolvidas conforme descrito no item 4.4.1 deste trabalho, de modo a avaliar o efeito da incorporação de CHX e EA nas diferentes concentrações em relação às nanopartículas de zeína (NB) previamente observadas por TAVARES et al., (2021).

Por conseguinte, primeiramente examinaram-se as nanopartículas isoladas, ou seja, compostas somente por um fármaco ou biopolímero tais como: NB, NCHX e NEA (Figura 12). Após isso, foram testadas as formulações que partiram da concentração fixa de CHX a 0,5% tais como: CHXEA1 a 0,0125%, CHXEA2 a 0,025%, CHXEA3 a 0,125%, CHXEA4 a 0,0625%, CHXEA5 a 0,175% e CHXEA6 a 0,25% (Figura 13). Em seguida, verificaram-se as nanopartículas que derivaram da concentração fixa de EA a 288 µg/ml tais como: NEACHX1 a 32 µg/ml, NEACHX2 a 64 µg/ml, NEACHX3 a 72 µg/ml, NEACHX4 a 96 µg/ml, NECHX5 a 120 µg/ml e NECHX6 a 144 µg/ml (Figura 14).

Wang et al., (2019) enfatiza que as moléculas de zeína podem apresentar uma fluorescência intrínseca a partir de resíduos de triptofano presente no EA, tirosina e fenilalanina, esses aminoácidos ajudam a obter informações sobre a conformação da proteína.

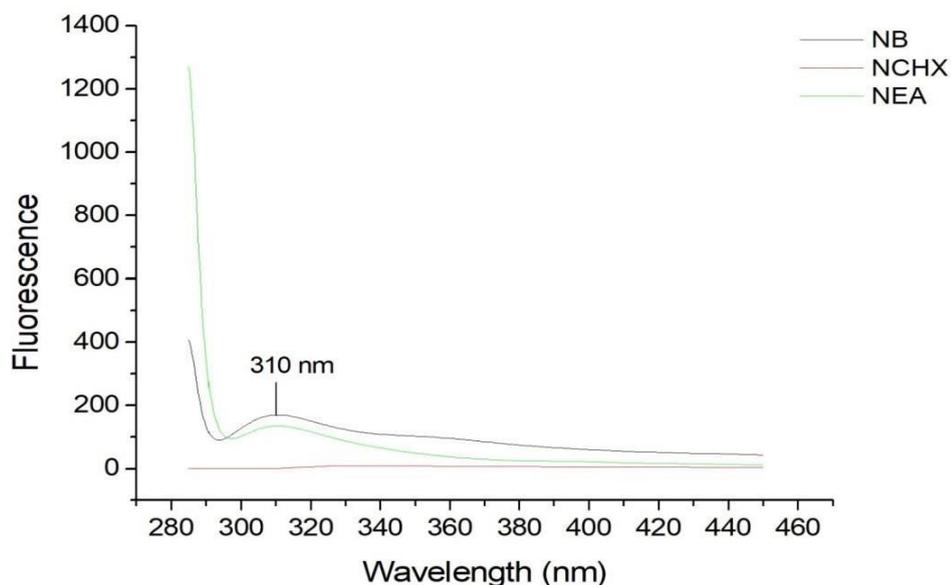
A intensidade de fluorescência da nanopartícula de zeína (NB) foi identificada no comprimento de onda de 310 nm (Figura 12) de acordo com o relatado por TAVARES et al., (2021), a medida que a nanopartícula de zeína carregada com CHX a 0,5% (NCHX) exibiu em 337 nm, sendo possível afirmar que o CHX suprimiu grande parte da intensidade da fluorescência em relação a NB, indicando interação entre os resíduos hidrofóbicos do CHX e da zeína (Figura 12). As nanopartícula de ácido elágico a 288 µg/ml (NEA) mostrou comprimento de onda na mesma faixa de NB (310 nm). Demonstrando a formação do complexo EA-zeína, através de aproximação hidrofóbica entre os resíduos aromáticos de zeína e do EA, constatado por TAVARES et al., (2021) (Figura 12).

Como resultado, haveria uma maior disponibilidade dos grupos (OH) desta molécula, o que pode explicar o potencial antimicrobiano aumentado do EA, quando encapsulado em nanopartículas de zeína que será abordado *a posteriori*.

Tavares et al., (2021) ressalta que ao ser adicionado às formulações, o EA causa uma diminuição do pico máximo de emissão de nanopartículas de zeína, o que pode indicar uma ligação hidrofóbica de EA com os grupos hidrofóbicos da zeína (incluindo os resíduos de

tirosina) resultando em um declínio de fluorescência como será visto na Figura 13 e Figura 14.

Figura 12- Espectros de fluorescência e comprimento de onda de nanopartículas de zeína, digluconato de clorexidina a 0,5% e ácido elágico a 288 µg/ml.

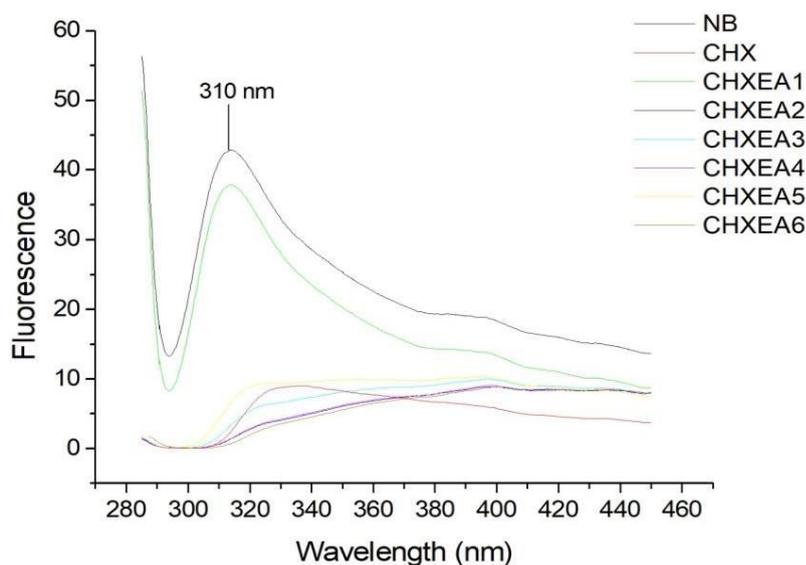


NB (nanopartículas brancas de zeína); NCHX 0,5% (nanopartículas de zeína carregada com digluconato de clorexidina a 0,5%) e NEA (nanopartícula de zeína carregada de ácido elágico a 288 µg/ml).

Fonte: Autoria própria (2013)

Percebe-se que a CHXEA1 a qual apresenta a menor concentração de CHX (0,0125%), manteve a intensidade de fluorescência da zeína (314 nm) bastante próximo ao da NB. Por outro lado, todas as demais composições apresentaram espectros aplanados, removendo, portanto a emissão por parte dos resíduos aromáticos da zeína. Como discutido anteriormente, essa interação pode ter ocorrido devido o EA estar em maior concentração que a CHX na formulação resultando na formação do complexo EA-zeína (Figura 5).

Figura 13- Espectros de fluorescência e comprimento de onda de nanopartículas de zeína carregadas com digluconato de clorexidina a partir de 0,5% com ácido elágico incorporado fixamente a 288 $\mu\text{g/ml}$.

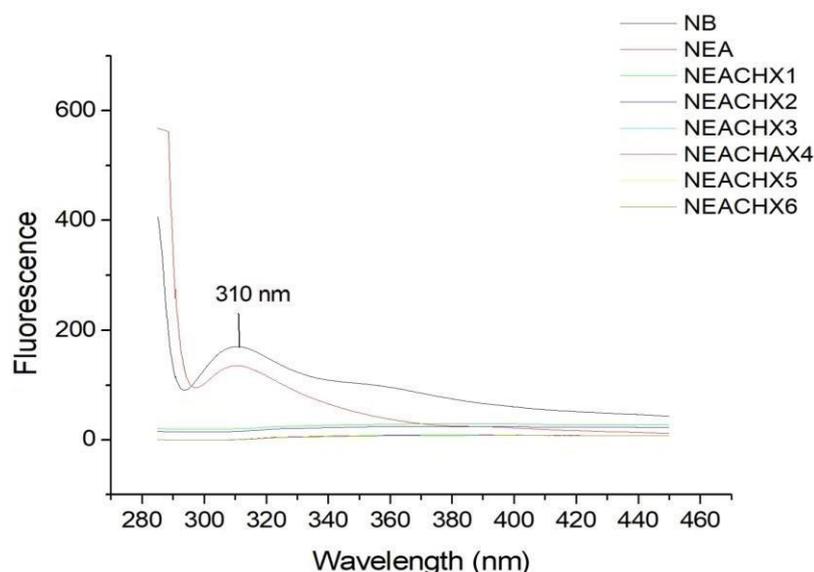


CHXEA1 (nanopartículas de zeína carregada com clorexidina a 0,0125% com ácido elágico incorporado 288 $\mu\text{g/ml}$); CHXEA2 (nanopartículas de zeína carregada com clorexidina a 0,025% com ácido elágico); CHXEA3 (nanopartículas de zeína carregada com clorexidina a 0,125% com ácido elágico); CHXEA4 (nanopartícula de zeína carregada com clorexidina a 0,0625% com ácido elágico); CHXEA 5 (nanopartículas de zeína carregada com clorexidina a 0,175% com ácido elágico); CHXEA 6 (nanopartículas de zeína carregada com clorexidina a 0,25% com ácido elágico).

Fonte: Autoria Própria (2023).

Conforme Sousa et al., (2012) a zeína apresenta grande afinidade pelas partes hidrofóbicas das moléculas, sobretudo os anéis aromáticos, presentes em polifenóis como o EA, corroborando os resultados encontrados neste estudo (Figura 14). Desta forma, a incorporação de CHX a esses sistemas pode ter influenciado para o aumento de supressão dos compostos EA e zeína, devido a uma ocupação de tais resíduos por parte do CHX.

Figura 14- Espectros de fluorescência e comprimento de onda de nanopartículas de zeína, nanopartícula de ácido elágico e nanopartícula de zeína carregada com ácido elágico com incorporação de clorexidina a 0,5%.



NEACHX 1(nanopartículas de ácido elágico a 32 $\mu\text{g/ml}$ com CHX incorporado a 0,5%); NEACHX 2 (nanopartículas de ácido elágico a 64 $\mu\text{g/ml}$ com CHX incorporado); NEACHX 3(nanopartículas de ácido elágico a 72 $\mu\text{g/ml}$ com CHX incorporado); NEACHX 4 (nanopartículas de ácido elágico a 96 $\mu\text{g/ml}$ com CHX incorporado); NEACHX 5 (nanopartículas de ácido elágico a 120 $\mu\text{g/ml}$ com CHX incorporado); NEACHX 6 (nanopartículas de ácido elágico a 144 $\mu\text{g/ml}$ com CHX incorporado).

Fonte: Autoria Própria (2023).

Dentre as interações presentes entre a associação de zeína e EA, as ligações de hidrogênio são as mais prováveis de acontecer sob condições moderadas. Tais interações ocorrem principalmente entre áreas hidrofóbicas de proteínas e anéis aromáticos de polifenóis, como citado anteriormente (ZEMBYLA et al., 2019; TAVARES et al., 2021). Além disso, o EA tem uma propriedade anfipática, possuindo forte afinidade com proteínas. Desta forma, pode se inserir com facilidade em sítios ativos da zeína, onde interage com muitos aminoácidos, ativando-os como Cys 144, Tyr 143, Thr 139, Pro 146 e Ile 197. Cys 144, Tyr 143 e Thr 139 formando ligações de hidrogênio com EA, enquanto Pro 146 e Ile 197 constituem uma espécie de bolsa hidrofóbica para envolver o EA (Figura 5).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na Tabela 2 estão listadas as CIMs e CBMs encontradas para as formulações testadas. O EA sob a forma de solução (SEA) e nanoencapsulada (NEA) apresentou os mesmos valores de CIM e de CBM iguais a 72 $\mu\text{g/ml}$ para todos os microrganismos ensaiados.

Tabela 2- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de nanopartículas de zeína contendo ácido elágico e digluconato de clorexidina frente microrganismos característicos de infecções da cavidade oral.

Formulação	<i>S. mutans</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. .albicans</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
SEA	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
SCHX 0,25%	48,8	48,8	390,6	390,6	24,4	24,4	12,2	12,2	48,8	48,8
NEA	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
NCHX 0,25%	12,2	12,2	12,2	12,2	195,3	195,3	97,6	97,6	97,6	48,8
NCHXEA 0,25%	24,4	24,4	24,4	24,4	24,4	24,4	48,8	48,8	12,2	12,2
NCHXEA 0,125%	48,8	48,8	390,6	390,6	24,4	24,4	97,6	97,6	97,6	195,3
NEACHX 0,25%	97,6	97,6	24,4	24,4	48,8	48,8	97,6	97,6	24,4	24,4
NEACHX 0,125%	97,6	97,6	781,2	781,2	390,6	390,6	97,6	97,6	24,4	24,4

SEA (solução de ácido elágico a 144 µg/ml); SCHX 0,25% (solução de digluconato de clorexidina a 0,25%); NEA (nanopartículas de EA a 144 µg/ml); NCHX 0,25% (nanopartículas de CHX a 0,25%); NCHXEA 0,25% (nanopartículas de CHX a 0,25% com EA incorporado a 1mg/ml); N CHXEA 0,125%(nanopartículas de CHX a 0,125% com EA incorporado); NEACHX a 0,25% (nanopartículas de EA a 1mg/ml com CHX incorporado a 0,25%); NEACHX 0,125% (nanopartículas de EA a 1mg/ml com CHX incorporado a 0,125%).

Fonte: Autoria Própria (2023).

Frente a *S. mutans* observou-se que a NCHX_{0,25%} (a formulação que se manteve mais estável ao longo do estudo) apresentou a menor CIM (12,2 µg/ml) em relação às outras formulações testadas, inclusive a CHX sob a forma de solução (SCHX_{0,25%}) com CIM e CBM igual a 48,8 µg/ml. Indicando possivelmente o aumento da ação antimicrobiana favorecida pelo encapsulamento do CHX no biopolímero zeína a qual proporcionou uma liberação mais sustentada deste fármaco no sistema, sendo, portanto mais eficiente frente a *S. mutans*. A NCHXEA_{0,25%} também se destacou em relação à SCHX_{0,25%} demonstrando CIM e CBM igual a 24,4 µg/ml, neste caso os dois ativos (CHX e EA) foram co-encapsulados, respectivamente ao sistema polimérico, diante do exposto pode-se verificar que isto também possibilitou impulsionar a atividade antibacteriana do CHX e do EA, uma vez que, quando isolados mostraram CIM e CBM superiores de 48,8 e 72 µg/ml, respectivamente. Por fim, as formulações co-encapsuladas em que o CHX foi incorporado por último (NEACHX_{0,25%} e _{0,125%}) exibiram as CIMs e CBMs mais elevadas iguais a 97,6 µg/ml.

Frente a *E. faecalis* as formulações que apresentaram a menor CIM e CBM foram: NCHX_{0,25%} a 12,2 µg/ml, seguidas das NCHXEA_{0,25%} e NEACHX_{0,25%} iguais a 24,4 µg/ml. Percebe-se que os valores de inibição da maioria das nanopartículas mantiveram-se semelhantes ao discutido anteriormente para *S. mutans*, havendo apenas um aumento significativo na CIM e CBM da SCHX_{0,25%} igual a 390,6 µg/ml e a demonstração de inibição da NEACHX_{0,25%} a qual ainda não havia apresentado CIM inferior. Enquanto as CIMs e CBMs de NCHXEA_{0,125%} e NEACHX_{0,125%}, foram iguais a 390,6 µg/ml e 781,2 µg/ml, respectivamente. Mostrando que o CHX na concentração de 0,25% apresenta maior inibição frente esta cepa do que a 0,125%.

Frente *S. aureus*, a SCHX_{0,25%} e as formulações NCHXEA_{0,25%} e NCHXEA_{0,125%} demonstraram as menores CIMs e CBMs igual a 24,4 µg/ml. Contra este microrganismo, o comportamento da solução de CHX a 0,25% foi divergente em relação aos discutidos anteriormente, pois neste, seu valor de CIM foi igual ao obtido pelas formas nanoencapsuladas dos ativos. Isto pode ser atribuído ao amplo espectro do CHX, o qual se faz presente seja na sua forma livre ou nanoencapsulado. Enquanto as NCHX_{0,25%} e NEACHX_{0,125%} obtiveram CIMs e CBMs iguais a 195,3 µg/ml e 390,6 µg/ml, respectivamente.

Frente *P. aeruginosa*, a formulação nanoencapsulada NCHXEA_{0,25%} apresentou aumento de CIM e CBM de 24,4 µg/ml para as cepas apresentadas anteriormente (*S. mutans*, *E. faecalis* e *S. aureus*) a 48,8 µg/ml contra a cepa em questão (*P. aeruginosa*), contudo, permaneceu com notável ação inibitória em relação às demais formulações ensaiadas que apresentaram CIMs e CBMs em 97,6 µg/ml. Enquanto a SCHX_{0,25%} desempenhou a sua

menor CIM e CBM durante todo o estudo igual a 12,2 µg/ml. As NCHXEA_{0,125%}, NEACHX_{0,25%} e NEACHX_{0,125%} demonstraram CIMs e CBMs iguais a 97,6 µg/ml.

Frente a *C. albicans* ambas as formulações contendo EA e CHX co-encapsulados NEACHX_{0,125%} e NEACHX_{0,25%} apresentaram CIM (24,4 µg/ml). Por outro lado, as formulações cuja incorporação do EA foi posterior a CHX (NCHXEA_{0,125%} e NCHXEA_{0,25%}) apresentaram CIM de 97,6 e 12,2 µg/ml, respectivamente, o que poderia indicar que ao ligar-se primeiro a zeína, haveria o impedimento em parte ou totalmente do acoplamento do EA, reduzindo portanto a sua capacidade microbicida

Em síntese, as formulações isoladas de EA, as SEA e NEA obtiveram CIMs e CBMs conforme o esperado (72 µg/ml) em conformidade com o estudo de Tavares et al., (2021) frente as cepas selecionadas, apontando que tanto a sua forma livre quanto a sua forma nanoencapsulada apresentaram o mesmo potencial inibitório. Já a SCHX 0,25%, apresentou CIMs e CBMs com considerável ação inibitória frente à maioria das bactérias (*S. mutans* em 48,8 µg/ml; *S. aureus* em 24,4 µg/ml, *P. aeruginosa* em 12,2 µg/ml e *C. albicans* em 48,8 µg/ml) ocorrendo apenas o valor de 390,6 µg/m contra *E. faecalis*. Em relação às nanopartículas co-encapsuladas a NCHXEA_{0,25%}, consagrou-se como a formulação mais efetiva mantendo sempre seu poder inibitório inferior as demais co-encapsulas entre 12,2 µg/ml, 24,4 e 48,8 µg/ml, destacando-se ao longo deste estudo como o produto mais estável e com potencial antimicrobiano mais eficaz em relação às formulações desenvolvidas.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO ENTRE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E ÁCIDO ELÁGICO

Conforme discutido durante o estudo, é indispensável o uso do CHX na prevenção e tratamento de infecções, apesar de serem relatadas inúmeras restrições que dificultam a ampliação do seu uso e a obtenção de melhores resultados clínicos. Por conseguinte, o uso associado de fármacos tende a reduzir as doses utilizadas a partir de uma resposta mais robusta, contemplando efeitos terapêuticos coadjuvantes.

Deste modo, os fitofármacos apresentam-se com uma das alternativas mais viáveis para serem associados a agente antissépticos, uma vez que dispõem de estruturas diversas, as quais poderiam atuar por diferentes mecanismos farmacológicos contra à resistência desenvolvida pelos microrganismos.

Logo, o método *cross-board check* adotado nesta pesquisa, permitiu a combinação de agentes farmacológicos oferecendo mais vantagens em relação às monoterapias, notando-se a melhora de atividades biológicas como a antibacteriana, a qual se faz presente em CHX e EA.

Já foi reportado na literatura que algumas cepas bacterianas de *P. aeruginosa* e *S. aureus* já teriam desenvolvido sensibilidade reduzida ao CHX, aumentando assim o risco de infecções mais severas, ou ainda transmitindo os seus mecanismos de resistência a espécies comensais menos virulentas (STEGER; KOSENKO, 2022).

Na Tabela 3 encontram-se listadas a CIM individual do CHX e AE e da sua combinação, seguida do valor de FIC obtido.

Neste estudo, o CHX individualmente apresentou CIM entre 1,17 e 4,7 µg/ml, sendo bastante potente contra todas as cepas estudadas (Tabela 3).

As NEA demonstraram CIM de 144 µg/ml frente *P. aeruginosa* e CIM de 72 µg/ml frente à *E. faecalis* e *S. aureus*. Shakeri, Zirak e Sahebka (2018) obtiveram uma CIM para o EA frente *S. aureus* de 630 µg/ml e para *E. faecalis* >1000 µg/ml, o que possibilita juntamente com Tavares et al., (2021) que identificou a CIM de nanopartículas de zeína carregadas com EA frente *S. aureus* (72 µg/ml) e *P. aeruginosa* (144 µg/ml), aferir um aumento e melhora das atividades antimicrobianas do EA quando co-encapsulado na matriz polimérica composta por zeína potencializando o seu efeito em comparação ao EA em solução (SEA).

Portanto, notou-se uma melhor atividade dos fitofármacos nanoencapsulados em combinação com o CHX, sendo observado efeitos aditivos desta associação, tanto pelo aumento na sua potência, como pela melhoria da sua estabilidade e proteção frente à degradação. Dessa forma para o melhor aproveitamento destas moléculas, a nanoencapsulação apresenta-se como estratégia favorável, podendo ser obtidas de maneira simples, acessível, que agrega um grande valor a este fitofármaco.

Tabela 3- Concentração inibitória mínima de digluconato de clorexidina (CHX) e da solução (SAE) e nanopartículas de ácido elágico (NEA) e índice de concentração inibitória fracionária (FIC) da sua combinação frente a cepas bacterianas comumente envolvidas em infecções da cavidade oral.

MICROORGANISMOS	CIM INDIVIDUAL (µg/ml)			CIM DA COMBINAÇÃO (µg/ml)		RESULTADO FIC ENTRE COMBINAÇÃO DE CHX E AE FRENTE CEPAS		
	CHX	SEA	NEA	SEA	NEA	SEA	NEA	
<i>Streptococcus mutans</i>	1,17	72	144	1,17	1,17	3	3	Aditivo
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,3	144	72	37,5	37,5	3	3	Aditivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,17	144	72	4,5	1,17	4	2	Aditivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,7	144	72	37,5	18,8	3	3	Aditivo

Aditivo (FIC= 0.5 a 4) Antagonismo (FIC≥ 4) Sinergismo (FIC≤ 0.5)
 SEA (solução de ácido elágico a 144 µg/ml); NEA (nanopartícula de ácido elágico a 144 µg/ml)
 Fonte: Aatoria Própria (2023).

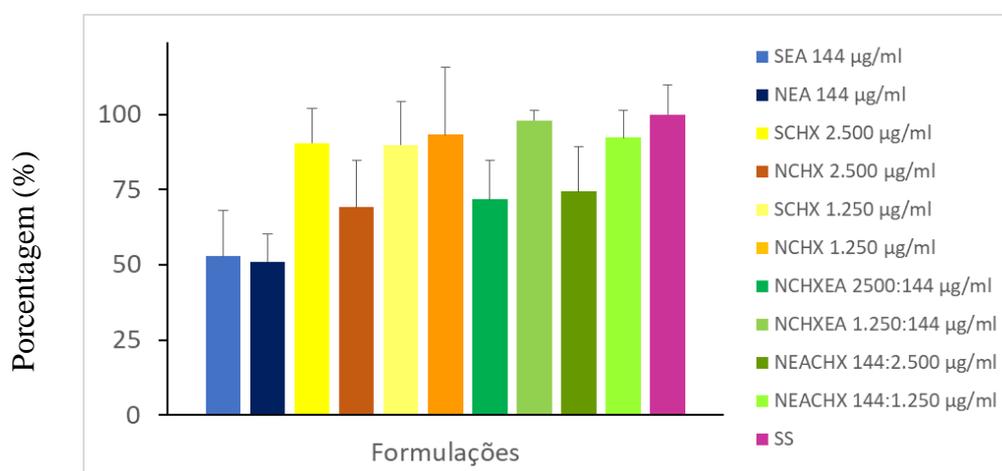
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Dentre as formulações desenvolvidas, tanto o EA em sua forma de solução (SEA) como nanoencapsulado (NEA) apresentaram o maior efeito frente ao biofilme de *S. aureus*, reduzindo a sua viabilidade para aproximadamente 47% e 49%, respectivamente.

Por outro lado, pese a que tenham apresentado um efeito limitado, as nanopartículas de CHX apresentaram um desempenho melhor do que as soluções, com redução de aproximadamente 8-10% para as soluções e entre 8 e 31% para as nanopartículas NChx_{0,125%} e NChx_{0,25%}, respectivamente. Para as formulações em que houve associação de EA e CHX foi notado uma perda considerável da atividade antibiofilme, quando comparadas a solução (SEA) e nanopartículas de EA (NEA). Os valores de redução na viabilidade das referidas formulações foram os seguintes: NChxEA_{0,125%} (1,9%), NChxEA_{0,25%} (28,3%), NEAChx_{0,125%} (7,6%), NEAChx_{0,25%} (25,7%) (Figura 15).

A atividade antibacteriana do EA está relacionada aos grupos fenólicos presentes em sua estrutura. O mecanismo antibacteriano contra o *S. aureus* ocorre pelo acoplamento nas proteínas de revestimento bacteriano causando sua lise (TAVARES et al., 2021). Desta forma, a co-encapsulação não potencializou o efeito antibiofilme do EA. Contudo, este fitofármaco poderia apontar propriedades farmacológicas interessantes e portanto, a sua associação ainda poderia ser válida para outras aplicações, nas que os seus múltiplos efeitos farmacológicos sejam benéficos.

Figura 15- Viabilidade dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* (ATCC6539P), após tratamento com as formulações desenvolvidas.



(SEA) Solução de EA a 144 µl/ml; (NEA) nanopartícula de EA a 144 µl/ml; (SCHX) solução de CHX nas concentrações de 0,25 e 0,125%, (NCHX) nanopartículas de CHX nas concentrações de 0,25 e 0,125%; (NCHXEa) nanopartícula de CHX a 0,25% com incorporação de EA a 144 µl/ml; (NCHXEa) nanopartícula de CHX a 0,125% com incorporação de EA a 144 µl/ml; (NEACHX) nanopartícula de EA a 144 µl/ml com incorporação de CHX a 0,25 e 0,125%.

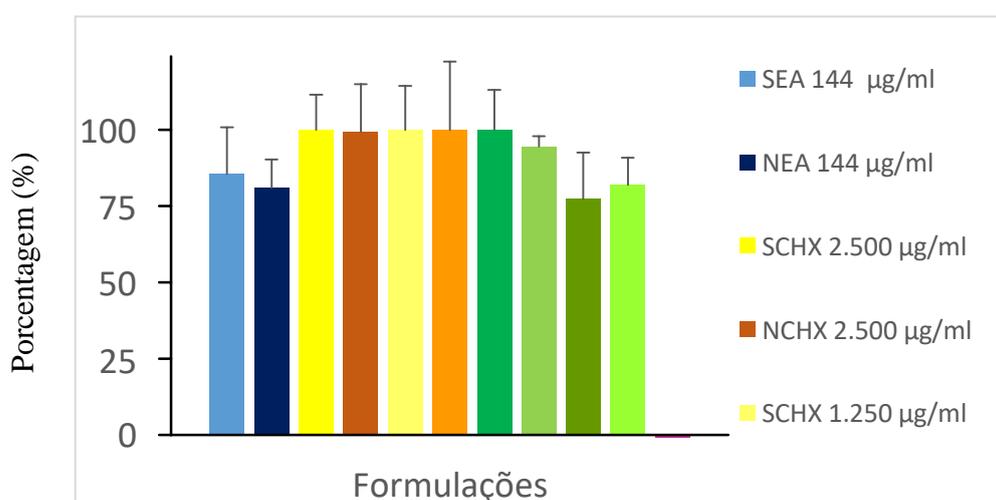
Fonte: Autoria própria (2023)

Na avaliação das formulações frente o biofilme de *S. mutans*, o EA continuou desempenhando sua ação com êxito. Principalmente na sua forma nanoencapsulada (NEA) apresentando o segundo melhor efeito de redução em 19 % da viabilidade bacteriana. Enquanto a solução de EA (SEA) diminuiu em cerca de 14,5%. As SChx 0,25% , SChx 0,125% e NChx 0,125% não apresentaram nenhum efeito sob o biofilme formado. Somente as nanopartículas de NChx 0,25% demonstraram uma pequena atividade de 0,6%.

Dentre as nanopartículas co-encapsuladas, a NEaChx 0,25% mostrou-se como a mais eficiente deste estudo frente a *S. mutans* reduzindo a viabilidade em 22,6%, seguida pela outra formulação em que o EA foi incorporado primeiramente como NEaChx 0,125% com redução em torno de 18%. Reafirmando que o EA liga-se a zeína formando o complexo EA-zeína como mostrado na Figura 5.

Enquanto, as nanopartículas com incorporação inicial de CHX tais como: NChxEa 0,25% a qual não apresentou efeito sobre o biofilme formado e NChxEa 0,125%, reduzindo em aproximadamente 5,5% deste (Figura 16).

Figura 16- Viabilidade dos biofilmes de *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC 700610), após serem tratados com as formulações desenvolvidas.



(SEA) Solução de EA a 144 µl/ml; (NEA) nanopartículas de EA a 144 µl/ml; (SCHX) solução de CHX nas concentrações de 0,25 e 0,125%, (NCHX) nanopartículas de CHX nas concentrações de 0,25 e 0,125%; (NCHXEA) nanopartículas de CHX a 0,25% com incorporação de EA a 144 µl/ml; (NCHXEA) nanopartículas de CHX a 0,125% com incorporação de EA a 144 µl/ml; (NEACHX) nanopartículas de EA a 144 µl/ml com incorporação de CHX a 0,25 e 0,125%.

Fonte: Autoria própria (2023).

Desta forma, o EA nanoencapsulada (NEA) demonstrou ser mais efetivo contra o biofilme formado por *S. mutans* reduzindo em cerca de 19% a viabilidade bacteriana em relação a sua forma de solução (SEA). Além disso, a incorporação inicial deste biotivo a formulação co-encapsulada (NEaChx_{0,25%}) mostrou-se como a formulação mais favorável na redução da viabilidade bacteriana em 22,6%.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A co-encapsulação de CHX e EA em nanopartículas de zeína ao longo dos 6 meses de estudo resultou em partículas com tamanhos entre 862,2 a 1.018 nm, índice de polidispersão inferior a 0,3 e potencial zeta entre +13,9 mV a +17,5 mV, reafirmando as vantagens do emprego de zeína na composição de sistemas de liberação inovadores. Em relação às formulações isoladas, as nanopartículas brancas (isentas de fármaco) e NEa apresentaram o comportamento mais estável. Enquanto dentre as co-encapsuladas, a NChxEa_{0,25%} demonstrou ser favorável à estabilização do sistema coloidal, sendo ainda a única que se manteve estável ao longo de 180 dias. O ensaio de fluorimetria em estado estacionário identificou as eventuais interações químicas existentes entre os ativos, as quais podem comprometer a viabilidade da co-encapsulação destes, cabendo, portanto, um aprofundamento de seus efeitos. A incorporação de CHX a esses sistemas pode ter influenciado para o aumento de supressão dos compostos EA e zeína, devido a uma ocupação de tais resíduos por parte do CHX. Identificou-se também a formação do complexo EA-zeína o que pode ter ocorrido devido o EA estar em maior concentração em algumas formulações facilitando sua ligação a zeína, nas formulações co-encapsuladas. A NCHXEA_{0,25%}, consagrou-se como a formulação com potencial antimicrobiano eficaz frente a *S. mutan*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, mantendo sua CIM e CBM entre 12,2 µg/ml, 24,4 e 48,8 µg/ml. A nanoencapsulação do AE demonstrou consonância com outros estudos em relação a potencialização da sua atividade antibacteriana frente a *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Além disso, as NEa desempenham efeito aditivo quando combinadas ao CHX frente a *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans*, demonstrando assim a possibilidade de uso conjunto destes agentes terapêuticos. Frente ao biofilme formado por *S. aureus* foi notado que o co-encapsulamento de EA e CHX apresentou uma perda considerável da atividade antibiofilme, quando comparadas a solução (SEA) e nanopartículas de EA (NEA). Já frente *S. mutans*, a incorporação inicial de EA a formulação co-encapsulada (NEaChx_{0,25%}) mostrou-se como a formulação mais favorável na redução da viabilidade bacteriana em 22,6% sendo mais efetivo que EA nanoencapsulado com redução de 19%, apenas.

REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, A.; SOMAIDA, A.; AYOUB, A.; ALSHARIF, F.; PREIS, E.; WOJCIK, M.; BAKOWSKY, U. Surface-Adapted Zein Nanoparticles: Strategies and Applications. **Pharmaceutics**, v.13, p. 13-54, 2021.
- ABRIATA, Juliana Palma. Desenvolvimento e Caracterização de nanopartículas de policaprolactona contendo paclitaxel funcionalizadas com folato para a otimização da terapia do câncer do ovário. 2018. Tese (Doutorado em medicamentos e cosméticos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.
- ADDY, M.; PRAYITNO, S.; TAYLOR L.; CADOGAN, S. An in vitro study of the role of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. **Journal of Periodontal Research**, v. 14, n. 5 , p. 403-10, 1979.
- ALAM, S.; MUSTAFA, G.; KHAN, Z; ISLAM, F. BHATNAGAR, A.; AHMAD, F. Development and evaluation of thymoquinone-encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to-brain targeting: a pharmacoscintigraphic study. **International Journal Of Nanomedicine**, p. 5705, 2012.
- AL-OBAIDI, M.; AL-BAYATY, F.; AL BATRAN, R.; HASSANDARVISH, P.; ROUHOLLAHI, E. Protective effect of ellagic acid on healing alveolar bone after tooth extraction in rat – A histological and immunohistochemical study. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 9, p. 987-999, 2014.
- AMORIM, C G V e MAYER, Márcia Pintos Alves e AUN, Carlos Eduardo. Avaliação das concentrações inibitórias mínimas de digluconato de clorexidina e de paramonoclorofenol frente a alguns microorganismos, Comissão de Cultura e Extensão Universitária do ICB/USP, 2001.
- ARRUDA, J.; OLIVEIRA, C.; PAULA, C.; MOSQUEIRA, V.; MORENO, A.; MESQUITA, R. Nanotechnology in Dentistry .**Archives Of Health Investigation**, v. 6, n. 11, p. 545-550, 2017.
- BASRANI, B.; LEMONIE, C. Chlorhexidine Gluconate: Review Article. **Australian Endodontic Journal** , v. 3, n. 2, 2004.
- BEVILACQUA, I.; HABITANTE, S.; CRUZ, C. A clorexidina como alternativa no tratamento de infecções endodônticas: revisão da literatura. **Revista Biociências**, v. 10, p. 139-145, 2004.
- BIRK, S.; BOISEN, A.; NIELSEN, L.. Polymeric nano- and microparticulate drug delivery systems for treatment of biofilms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 174, p. 30-52, 2021.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. RDC Nº 318, DE 6 DE NOVEMBRO DE 2019. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 2020.

BUOMMINO, E.; SCOGNAMIGLIO, M.; DONNARUMMA, G.; FIORENTINO, A.; D'ABROSCA, B. Recent advances in natural product-based antibiofilm approaches to control infections. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.14, p. 116-982, 2014.

CAO W., ZHANG Y. Novel resin-based dental material with anti-biofilm activity and improved mechanical property by incorporating hydrophilic cationic copolymer functionalized nanodiamond. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, p.29-162, 2018.

CIANCIO, SG. Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. **Journal of Periodontology**, v. 1995, n. 8, p. 75-86, 2000.

DURIG, A.; KOUSKOUM, I.;VEJBORG, R.; KLEMM, P. Chemoinformatics-assisted development of new anti-biofilm compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 309-17, 2010.

FAN, W.; LI, Y.; SUN, Q. Nanopartículas mesoporosas de silicato de cálcio carregadas com clorexidina para propriedades anti- *Enterococcus faecalis* e mineralização. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, p. 72, 2016.

FEATHERSTONE, J. Delivery challenges for fluoride chlorhexidine and xylitol. **BCM Oral Health**, v.6 , n. S8, 2006.

FLOTRA, L.; GJERMO, P.; ROLLA, G.; WAERHAUG, J. Side effects of chlorhexidine mouth washes. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 79, n. 2, p. 119-25, 1971.

GALANO, A.; MARQUEZ, M.; FRANCISCO, P. Ellagic Acid: an unusually versatile protector against oxidative stress. **Chemical Research In Toxicology**, v. 27, n. 5, p. 904-918, 2014.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formulation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1428–1439, 2004.

GARCÍA, Alina; PANIAGUA-CONTRERAS, Gloria Luz; MONROY-PÉREZ, Eric; BUSTOS-MARTÍNEZ, Jaime; HAMDAN-PARTIDA, Aída; GARZÓN, Javier; ALANÍS, Jesica; QUEZADA, Rosalía; VACA-PANIAGUA, Felipe; VACA, Sergio. Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions. **Journal Of Microbiology, Immunology And Infection**, v. 54, n. 2, p. 267-275, 2021.

GARNER, S.; BARBOUR, M. Nanoparticles for controlled delivery and sustained release of chlorhexidine in the oral environment. **Oral Diseases**, v. 21, n. 5, p. 641-644, 2015.

GOPALAKRISHNAN, L.; RAMANA, L.N.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U.M. Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles as anti-hemorrhagic agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, n. 13, p. 215-221, 2014.

- H. ZHANG, W. ZHANG, Y. ZHOU, Y. JIANG, S. LI. nanopartículas de silício mesoporoso de dupla função aumentam a radiosensibilidade do VPA no glioblastoma, **Translational Oncology**, v.10 , p. 229-240, 2017.
- HASEEB, R.; MICHAEL, L.; MAX, S.; FRANCISCO, M.; GINA, Q.; KELLI, P. Synthesis and Characterization of New Nanoparticles Containing Chlorhexidine for Root Canal Disinfection. **Materials**, vol. 9, n. 6, p.452, 2016.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-15, 1996.
- HU, T. WANG, ML FERNANDEZ, Y. LUO, Desenvolvimento de nanopartículas de hol baixa zeína reticuladas com ácido tânico como potenciais veículos de entrega oral para curcumina, **Food Hydrocolloids**. v.61, p. 821-831, 2016.
- ICH Expert Working Group. ICH Guideline Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. In Proceedings of the International Conference on Harmonization, 2003.
- ICH Expert Working Group. ICH Guideline Q1C Stability Testing for New Dosage Forms. In Proceedings of the International Conference on Harmonization, 1996.
- J. LIANG, H. YAN, X. WANG, Y. ZHOU, X. GAO, P. PULIGUNLA, X. WAN, Encapsulação de galato de epi galocatequina em nanopartículas de zeína/quitosana para aplicações controladas em sistemas alimentares, **Food Chemistry**, v.231, p. 19–24, 2017.
- KANG, E.; KOWN, T.; OH, G. The flavonoid ellagic acid from a medicinal herb inhibits host immune tolerance induced by the hepatitis B virus-e antigen. **Antiviral Research**, v. 72, p.100-6, 2006.
- KIM GY, LEE CH. Antimicrobial susceptibility and pathogenic genes of Staphylococcus aureus isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. **J Periodontal Implant Sci**, v. 6,p. 223-8, 2015.
- KUETE, V.; WABO G.; NGAMENI, B. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of Irvingia gabonensis (Ixonanthaceae). **Journal Ethnopharmacol**, v, 114, p. 54-60, 2007.
- M.A. SALVADOR, C.P. SOUSA, S. MORAIS, P. LIMA-NETO, A.N. CORREIA, P, Evaluation of the chlorhexidine degradation mechanism through Density Functional Theory calculations. **Computational Biology and Chemistry**, v.71, p. 82-88, 2017.
- MARSH, P. D.; HEAD, D. A.; DEVINE, D. A. Ecological Approaches to Oral Biofilms: Control without killing. **Caries Research**, v.49, n.1, p.46-54, 2015.
- MICHELOTTO, A.; ANDRADE, B.; SILVA, J.; SYDNEY, G. Clorexidina na terapia endodôntica. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 5, n. 1, p. 78-88, 2008.
- Microbiol. Immunol.**v 5 ,p. 29–32, 1990.
- MORAES, Carolina Morales. Preparo caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais. 2009. 141 f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biologia, Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MORAIS, A. W. Propriedades físico-químicas e antibacterianas da incorporação polimérica de micropartículas poliméricas carregadas com clorexidina em cimento ionômero de vidro. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado)- Curso de Odontologia. Programa de pós-graduação em odontologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.

NAYEEM, N.; KARVEKAR, M. Antimicrobial and anti-oxidant properties of the isolated compounds from the methanolic extract from the leaves of *Tectona grandis*. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 2, n. 4, p. 163-165, 2011.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 7 ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

NOJOSA, Jaqueline de Santiago. Caracterização de selantes resinosos contendo micropartículas poliméricas carregadas com clorexidina. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Programa de pós-graduação. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

OKANO, M.; NOMURA, M.; HATA, S.; OKADA, N.; SATO, K.; KITANO, Y. Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. **Archives of Dermatological Research**, v. 125, n. 1, p. 50-2, 1989.

PALIWAL, R.; PALAKURTHI, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 108–122, 2014.

PALLAN, S.; ARAUJO, M.; CILLI, R.; PRAKKI, A. Mechanical properties and characteristics of developmental copolymers incorporating catechin or chlorhexidine. **Dental Materials**, v. 28, n. 6, p. 687-694, 2012.

PANTOJA, V. E.; MORAIS, S. E.; TAVARES, S. W.; SOUSA, F. F. Epigallocatechin-3-gallate loaded-zein nanoparticles: Characterization, stability and associated antioxidant, antityrosinase and sun protection properties. **Journal of Molecular Liquids**, v.358, p. 119-107, 2022.

PASCOLI M, L.; FRACETO, LF. Zein Nanoparticles and Strategies to Improve Colloidal Stability: A Mini-Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 25, p. 6-6, 2018.

QUAVE, C.; ESTÉVEZ, M.; COMPADRE, C. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. **PLOS One**, v. 7, p. 287-370, 2012.

RIBEIRO, J. S.; MÜNCHOW, E. A.; BORDINI, E. A.; FERREIRA, R. WELLINGTON, L.; BOTTINO, M. Antimicrobial Therapeutics in Regenerative Endodontics: a scoping review. **Journal Of Endodontics**, v. 46, n. 9, p. 115-127, 2020.

SAAFAN, Ali; ZAAZOU, Mohamed H.; SALLAM, Marwa K.; MOSALLAM, Osama; DANAF, Heba A. El. Assessment of Photodynamic Therapy and Nanoparticles Effects on Caries Models. **Open Access Macedonian Journal Of Medical Sciences**, , v. 6, n. 7, p. 1289-1295, 2018.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, N. 5, p. 726-737, 2003.

SHAKERI, A.; ZIRAK, M.; SAHEBKAR, A. Ellagic acid: a logical lead for drug development? **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 2, p. 106–122, 2018.

SHEN X.; SUN X.; XIE Q. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Food Control**, v.35, p.159-65, 2014.

SIMONE, G.; D'ADDEO, G. Sibutramine: balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk. **Nutrition, Metabolism And Cardiovascular Diseases**, v. 18, n. 5, p. 337-341, 2008.

SONG, W.; GE, S.. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1033, 2019.

SÓNIA SILVA, MELYSSA NEGRI, MARIANA HENRIQUES, ROSÁRIO OLIVEIRA, DAVID W. WILLIAMS, JOANA AZEREDO. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance, *FEMS. Microbiology Reviews*, v. 36, 2012, p. 288–305, 2012.

SOUSA, F.; LUZARDO-ALVAREZ, A.; PÉREZ- ESTÉVEZ, A.; SEOANE- PRADO, R.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Development of a novel AMX- loaded PLGA/zein microsphere for root canal disinfection. **Biomedical Materials**, v. 5, n. 5, p. 055-008, 2010.

TABARY, N.; CHAI, F.; BLANCHEMAIN, N.; NEUT, C.; PAUCHET, L.; BERTINI, S.; DELCOURT-DEBRUYNE, E.; HILDEBRAND, HF.; MARTEL, B. A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n.1, p.318-29, 2014.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **Journal of Dental Research**. v.90, p.294–303, 2011.

TAVARES, W. S., TAVARES-JÚNIOR, A. G., OTERO-ESPINAR, F. J., MARTÍN-PASTOR, M., SOUSA, F. Design of ellagic acid-loaded chitosan/zein films for wound bandaging. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, p. 101-903, 2020.

TAVARES, W. S.; MARTIN-PASTOR, M.; TAVARES-JÚNIOR, A. G.; SOUSA, F. F. O. Biopharmaceutical Activities Related to Ellagic Acid, Chitosan, and Zein and Their Improvement by Association. **Journal Of Food Science**, v. 83, n. 12, p. 2970-2975, 2018.

TAVARES, W.; PENA, G.; MARTIN-PASTOR, M.; SOUSA, F. Design and characterization of ellagic acid-loaded zein nanoparticles and their effect on the antioxidant and antibacterial activities. **Journal Of Molecular Liquids**, v. 341, p. 116- 915, 2021.

TURKUN, L.S.; TURKUN, M.; ERTUGRUL, F.; ATES, M.; BRUGGER, S. Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 20, n. 1, p. 29-44, 2008.

UCHIDA-FUKUHARA, Y.; EKUNI, D.; ISLAM, M.; KATAOKA, K.; TANIGUCHI-TABATA, A.; FUKUHARA, D.; TOYAMA, N.; KOBAYASHI, T.; FUJIMORI, K.; SAWADA, N. Caries Increment and Salivary Microbiome during University Life: a prospective cohort study. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 174, n. 10, p. 3713, 2020.

VIEIRA COLOMBO AP, MAGALHÃES CB, HARTENBACH FA, MARTINS DO SOUTO R, MACIEL DA SILVA-BOGHOSSIAN C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog.* V, 94, p.27-34,2016.

WANG, H.; BRUMAGHIM, J. Polyphenol compounds as antioxidants for disease prevention Polyphenol Compounds as Antioxidants for Disease Prevention: Reactive Oxygen Species Scavenging, Enzyme Regulation, and Metal Chelation Mechanisms in E. coli and Human Cells. **American Chemical Society**, cap. 5, p. 99-175, 2011.

YALLAP, M.; GUPTA, B.K.; JAGGI M, CHAUHAN,S.C.; Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, p. 9-29, 2010.

YUN, J. Possible anti-obesity therapeutics from nature—A review. **Phytochemistry**, v. 71 p. 1625-41, 2010.

ZEMBYLA, M.; MURRAY, B.S.; RADFORD, S.J.; SARKAR, A. Water-in-oil Pickering emulsions stabilized by an interfacial complex of water-insoluble polyphenol crystals and protein. **Journal of Colloid and Interface Science**,v. 548, p. 88–99, 2019.

ZHAO, S.; DENG, Y.; YAN, T.; YANG, X.; XU, W.; LIU, D.; WANG, W. Explore the Interaction between Ellagic Acid and Zein Using Multi-Spectroscopy Analysis and Molecular Docking. **Foods**, v. 11, p.27-64, 2022.