

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE FORMULAÇÕES BUCAIS CONTENDO
QUERCETINA PARA PROFILAXIA DA DOENÇA
PERIODONTAL CANINA**

Taynara Monsores e Silva

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES
BUCAIS CONTENDO QUERCETINA PARA PROFILAXIA DA
DOENÇA PERIODONTAL CANINA**

TAYNARA MONSORES E SILVA

Sob Orientação da Professora
Yara Peluso Cid

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências, no Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Setembro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586d Silva, Taynara Monsores e, 1996-
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES
BUCAIS CONTENDO QUERCETINA PARA PROFILAXIA DA DOENÇA
PERIODONTAL CANINA / Taynara Monsores e Silva. -
Seropédica, 2023.
101 f.: il.

Orientadora: Yara Peluso Cid.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias, 2023.

1. Doença Periodontal Canina. 2. Flavonóides. 3.
Desenvolvimento de Formulação. 4. Farmacotécnica. 5.
Quercetina. I. Cid, Yara Peluso, 1982-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias III.
Titulo.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 3882/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.064287/2023-23

Seropédica-RJ, 22 de setembro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TAYNARA MONSORES E SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/09/2023

(Assinado digitalmente em 22/09/2023 16:09)
SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO
COORDENADOR
CORIN (12.28.01.49)
Matricula: ###224#6

(Assinado digitalmente em 22/09/2023 20:26)
YARA PELUSO CID
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matricula: ###004#7

(Assinado digitalmente em 25/09/2023 17:09)
MARIA BERNADETE RIEMMA PIERRE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.428-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3882, ano: 2023, tipo: ATA, data de emissão: 22/09/2023 e o código de verificação: 9fd7bd8e16

DEDICATÓRIA

À quem sempre estendeu os braços ao me ver chegar,
e nunca deixou de se preocupar nas horas em que eu precisava voltar.
À Marcio Goulart (*in memoriam*). Se eu pudesse te tirava do céu.

Te amo pra sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Júlio Cesar e Maria Rita, por terem me apoiado, incentivado e terem acreditado na minha capacidade quando nem eu acreditava mais. Obrigada por lutarem para que eu tivesse tudo que vocês não puderam ter. Sem vocês eu não sou metade! Aos meus avós, tios e primos que orgulhosamente falam sobre mim e anseiam os dias em que podemos estar juntos.

Agradeço imensamente à Ariane, minha companheira e melhor amiga. Não consigo imaginar como seria a vida sem você. Obrigada por embarcar nos meus sonhos e comemorar minhas conquistas como se fossem suas. Você é o meu ponto de equilíbrio!

Aos meus amigos, Liniquer Sant'Anna, Miriam Euzébio, Thaís Santos e Tamires Andrade, que acompanham minha rotina de longe. É maravilhoso vê-los se orgulhando das minhas realizações, obrigada por compreenderem os momentos em que me fiz ausente.

Agradecimento mais que especial aos professores do Colégio Estadual Maria Zulmira Torres. Minhas conquistas são fruto da dedicação de cada um de vocês. Obrigada por nunca terem desistido do ensino público.

Ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), que me acolheu em 2019 e desde então me tem aberto portas. Agradeço a cada colaborador, que tornou a rotina um refúgio para os dias de exaustão.

Agradeço muito a minha orientadora pelo apoio, orientação, carinho e paciência durante o percurso. Cada desafio proposto me tornou mais confiante e admirada quanto ao que fazemos. Profª Yara Cid, a admiro muito!

À Viviane Magalhães por ter moldado meu modo de trabalho durante a iniciação científica, sua contribuição foi essencial para que eu me tornasse a profissional que sou hoje.

À Paloma Mathias e Thais Paes. Ter a amizade de vocês no ambiente de trabalho, me proporcionou uma caminhada mais tranquila. Obrigada pela troca de conhecimento, descontração e por terem me estimulado a todo momento. A presença de vocês irradia a farmaco e nossa sintonia clareia a minha vida.

Agradecimento mais que especial à toda a equipe da farmacometria: Alice Ortega, Camyla Nunes, Giovanna do Valle, Ingrid Lins, Karen Kuhfuss, Matheus Eduardo, Mathias Pittizer, Melina Alves e Pedro Reculiano pela colaboração durante todo o processo de experimentação e escrita. Obrigada pelo encorajamento, apoio e comemorações acerca de qualquer mínimo resultado. Sou feliz por compartilhar o dia a dia com vocês.

Aos médicos veterinários, Anna Julia Bessa, Fernando Miranda e Isabelle Vilela, pela colaboração e espírito de equipe, fazer parte de uma equipe multidisciplinar ao lado de vocês é sinônimo de sorte. Obrigada pelas discussões sobre esse tema que tanto me encantou.

Aos professores Douglas Chaves e Shana de Mattos, que me receberam de braços abertos em seus laboratórios para que esse projeto pudesse ser concluído. Às suas alunas, Bianca Augusto, Mayara Gomes e Carol Araújo, que auxiliaram incansavelmente durante esse tempo. Obrigada por vibrarem comigo a cada resultado alcançado. À professora Renata Fonseca, pela paciência, carinho e disposição, sua colaboração foi muito importante.

Por fim, à todos que torceram pela finalização dessa etapa que tanto idealizei em minha vida.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

RESUMO

A doença periodontal (DP) advém da formação de biofilme bacteriano na superfície dos dentes e em seus tecidos adjacentes. É caracterizada como a condição oral mais prevalente em humanos e animais, estando presente em cerca de 70% dos cães adultos. Na medicina veterinária, sua profilaxia e tratamento é dificultado, uma vez que estabelecer uma rotina de higienização não é simples e a permanência das formulações convencionais na cavidade oral é prejudicada pela ação salivar e da atividade mecânica da boca. Assim, inovação nesse campo é essencial, principalmente diante da resistência bacteriana que pode estar envolvida nos diferentes estágios da doença. Nesse contexto, a utilização de produtos advindo de fontes naturais se torna uma alternativa aos produtos convencionais. Como é o caso dos flavonoides, que se destacam devido às suas propriedades antimicrobianas, além de possuírem ação regeneradoras dos tecidos moles e duros, os mesmos que compõem a mucosa oral. Entre seus derivados há a quercetina (QRC) e a rutina (RTN), que já possuem relatos evidenciando sua atividade antimicrobiana frente a cepas sensíveis e resistentes. Deste modo, este estudo buscou-se a obtenção das concentrações inibitória e bacteriostática mínimas destes dois flavonóides frente a nove cepas, sensíveis e resistentes, de importância para a DP. Os ensaios demonstraram que as concentrações efetivas de QRC eram menores, sendo esta selecionada como molécula ativa para os ensaios de desenvolvimento farmacêutico. Foram desenvolvidos: um hidrogel (HG) e um filme à base de carboximetil celulose sódica (CMC-Na) e um HG à base de quitosano (QTS). Como resultado, as formulações mantiveram pH na faixa de 6,5 a 7,5, assegurando a segurança durante a aplicação, salvo o HG de QTS que apresentou um pH ligeiramente abaixo do ideal. O teor dos ativos no HG de CMC-Na, HG de QTS e no filme à base de CMC-Na, foram de 98,2%, 95,0% e 97%, respectivamente. As formulações demonstraram tempos de residência prolongados, estando acima de 5h. Quanto à liberação *in vitro*, o HG de CMC-Na apresentou cinética de ordem zero e taxa de liberação de 32,1% em 24 h, enquanto o HG de QTS e o filme polimérico (FP), exibiram cinética de pseudoprimeira ordem com taxas de liberação de 18,6% e 26% em 24 h, respectivamente. Análises morfológicas do FP à base de CMC-Na revelaram poros nas formulações contendo QRC e maior compactação no filme placebo. As análises estruturais demonstraram que a presença de QRC não altera a estrutura dos componentes presentes no filme, apenas reflete em um estiramento C=C mais intenso. A associação de todos os resultados indicou que as formulações desenvolvidas apresentam potencial inovador para prevenir e tratar a DP canina.

Palavras-chave: Doença periodontal canina. Quercetina. Desenvolvimento farmacêutico.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) arises from the formation of bacterial biofilm on the surface of teeth and their adjacent tissues. It is characterized as the most prevalent oral condition in humans and animals, being present in approximately 70% of adult dogs. In veterinary medicine, its prevention and treatment are complicated since establishing a hygiene routine is not straightforward, and the persistence of conventional formulations in the oral cavity is hindered by the action of saliva and the mechanical activity of the mouth. Therefore, innovation in this field is essential, especially in the face of bacterial resistance that may be involved in different stages of the disease. In this context, the use of products derived from natural sources becomes an alternative to conventional products, such as flavonoids, which stand out due to their antimicrobial properties and their regenerative action on both soft and hard tissues, which make up the oral mucosa. Among its derivatives are quercetin (QRC) and rutin (RTN), which have already been reported to have antimicrobial activity against sensitive and resistant strains. Thus, this study aimed to obtain the minimum inhibitory and bacteriostatic concentrations of these two flavonoids against nine strains, both sensitive and resistant, of importance for PD. The assays showed that the effective concentrations of QRC were lower, and it was selected as the active molecule for pharmaceutical development assays. Hydrogels (HG) and sodium carboxymethyl cellulose-based films (CMC-Na) and a chitosan (QTS) based HG were developed. As a result, the formulations maintained a pH in the range of 6.5 to 7.5, ensuring safety during application, except for the QTS-based HG, which had a slightly lower pH. The active ingredient content in CMC-Na-based HG, QTS-based HG, and CMC-Na-based film was 98.2%, 95.0%, and 97%, respectively. The formulations demonstrated extended residence times, exceeding 5 hours. As for *in vitro* release, the CMC-Na-based HG showed zero-order kinetics and a release rate of 32.1% in 24 hours, while the QTS-based HG and the polymeric film (FP) exhibited pseudofirst-order kinetics with release rates of 18.6% and 26% in 24 hours, respectively. Morphological analyses of the CMC-Na-based FP revealed pores in the formulations containing QRC and greater compactness in the placebo film. Structural analyses showed that the presence of QRC does not alter the structure of the components present in the film, only resulting in a more intense C=C stretching. The combination of all results indicated that the developed formulations have innovative potential for preventing and treating canine PD.

Keywords: Canine periodontal disease. Quercetin. Pharmaceutical development.

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

%: Porcentagem
°C: Graus Celsius
µg: micrograma
µL: Microlitro
µm: Micrmetro
BHI: Brain Heart Infusion Broth
CBM: concentração Bactericda Mínima
CIM: concentração inibitória mínima
CMC-Na: carboximetilcelulose sódica
DMSO: dimetilsulfóxido
DP: doença periodontal
EVA: Etileno de Vinila
FP: Filme polimérico
HG: Hidrogéis/Hidrogel
IFTR: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
MeOH: lcool metlico
mg: miligrama
MH: Mueller Hinton
Min: minutos
mL: mililitro
PPG: propilenoglicol
QRC: quercetina
RTN: rutina
SDS: dodecil sulfato de sódio
T_r: Tempo de retenção

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Anatomia do dente incisivo lateral canino.....	3
Figura 2 . Componentes superiores da anatomia bucal canina.....	4
Figura 3 . Síntese dos flavonóides.....	8
Figura 4 . Estrutura molecular da quercetina.....	9
Figura 5 . Estrutura molecular da rutina.....	10
Figura 6 . Estrutura molecular da carboximetilcelulose.....	13
Figura 7 . Estrutura molecular do quitosano.....	13
Figura 8 . Organização polimérica após o processo de reticulação.....	14
Figura 9 . Esquema de preparo do ensaio de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima.....	20
Figura 10 . Esquema utilizado no ensaio de determinação de concentração bactericida mínima..	21
Figura 11 . Procedimento adotado para obtenção do hidrogel de carboximetilcelulose sódica contendo quercetina.....	23
Figura 12 . Procedimento utilizado para obtenção do hidrogel de quitosano contendo quercetina.	23
Figura 13 . Procedimento utilizado para obtenção de filme polimérico à base de carboximetilcelulose-sódica contendo quercetina.....	25
Figura 14 . Mucosa bucal canina utilizada para o ensaio <i>ex vivo</i> de tempo de residência.....	32
Figura 15 . Formulações contendo quercetina aderidas ao aparato para início do ensaio de tempo de residência.....	33
Figura 16 . Tubos controle e com a formulação expostos ao ensaio de efetividade antimicrobiana.	34
Figura 17 . Esquema utilizado para análise da efetividade bactericida da formulação no ensaio de semeadura em placa.....	34
Figura 18 . Teste de difusão em disco solubilizado com diferentes diluentes.....	35
Figura 19 . Placas do ensaio de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima.....	36
Figura 20 . Ensaio de semeadura em placa para obtenção da concentração inibitória mínima de quercetina frente as diferentes cepas.....	37
Figura 21 . Ensaio de semeadura em placa para obtenção da concentração inibitória mínima de rutina frente as diferentes cepas.....	38
Figura 22 . Espectro de varredura por UV comparativo entre quercetina e os placebos das formulações em saliva artificial e em metanol.....	39
Figura 23 . Curva padrão de quercetina.....	40
Figura 24 . Hidrogéis obtidos.....	41
Figura 25 . Representação gráfica da influência do tempo sobre o pH dos HG à base de carboximetilcelulose e quitosano incorporados com quercetina.....	42
Figura 26 . Perfil de espalhabilidade comparativo entre o placebo do hidrogel de carboximetilcelulose sódica e o hidrogel incorporado com quercetina.....	42
Figura 27 . Perfil de espalhabilidade comparativo entre o placebo do hidrogel de quitosano e o hidrogel incorporado com quercetina.....	43
Figura 28 . Perfil de espalhabilidade comparativo entre os hidrogéis de carboximetilcelulose sódica e quitosano incorporados com QRC.....	43
Figura 29 . Hidrogéis incorporados com quercetina após centrifugação de 3800 rpm por 5 horas.	44
Figura 30 . Variação do pH do hidrogéis incorporados com quercetina durante os ciclos de congelamento e aquecimento.....	46
Figura 31 . Perfil de espalhabilidade do hidrogel à base de carboximetilcelulose sódica com quercetina durante três ciclos de 24h de aquecimento.....	47
Figura 32 . Perfil de espalhabilidade do hidrogel à base de carboximetilcelulose sódica incorporado com quercetina durante três ciclos de 24h de congelamento.....	47
Figura 33 . Perfil de espalhabilidade do hidrogel à base de quitosano incorporado com quercetina durante três ciclos de 24h de aquecimento.....	48
Figura 34 . Perfil de espalhabilidade do hidrogel à base de quitosano incorporado com quercetina durante três ciclos de 24h de congelamento.....	49
Figura 35 . Filme polimérico à base de carboximetilcelulose sódica selecionado.....	51

Figura 36 . Filme submerso em saliva artificial para ensaio de grau de intumescimento.	51
Figura 37 . Filme polimérico à base de carboximetilcelulose sódica após ser submetido ao ensaio de resistência a dobra.	52
Figura 38 . Análise morfológica obtida através de microscopia eletrônica de varredura dos filmes à base de caboximetilcelulose sódica.....	53
Figura 39 . Sobreposição dos espectros de FTIR obtidas através de análise estrutural utilizando metodologia de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do filme incorporado com quercetina e seu placebo.	54
Figura 40 . Liberação <i>in vitro</i> comparativa entre filme polimérico de carboximetilcelulose sódica, hidrogel de carboximetilcelulose sódica e hidrogel de quitosano.	57
Figura 41 . Aparato antes e após do ensaio de tempo de residência.	59
Figura 42 . Tubos após 24h do ensaio de efetividade antimicrobiana das formulações.....	60
Figura 43 . Placa resultante do ensaio de efetividade bactericida do hidrogel à base de carboximetilcelulose sódica contendo quercetina frente a cepa sensível de <i>E. coli</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 . Características físico-químicas da quercetina	9
Tabela 2 . Características físico-químicas da rutina	10
Tabela 3 . Microorganismos sensíveis e resistentes utilizados.	17
Tabela 4 . Solventes utilizados no ensaio de difusão em disco	18
Tabela 5 . Concentrações de quercetina e rutina utilizadas no ensaio de difusão em disco	18
Tabela 6 . Concentrações de quercetina e rutina utilizadas no ensaio de microdiluição em caldo	19
Tabela 7 . Componentes utilizados para o desenvolvimento de hidrogéis à base de carboximetilcelulose-sódica e quitosano contendo quercetina.	22
Tabela 8 . Componentes utilizados para o desenvolvimento do filme polimérico à base de carboximetilcelulose sódica contendo quercetina.	24
Tabela 9 . Constituintes empregados no preparo da saliva artificial.	28
Tabela 10 . Concentração inibitória mínima e concentração bacteriostática mínima de quercetina e rutina obtidas através dos ensaios de microdiluição em caldo e semeadura em placa, respectivamente.	37
Tabela 11 . Características observadas nos hidrogéis à base de carboximetilcelulose sódica e à base de quitosano após o preparo.	41
Tabela 12 . Características dos hidrogéis antes e após 72h de exposição ao ciclo de congelamento e aquecimento.	45
Tabela 13 . Espalhabilidade dos hidrogéis contendo quercetina antes e após 72h de exposição ao ciclo de congelamento e aquecimento.	49
Tabela 14 . Teor da quercetina nos hidrogéis à base de carboximetilcelulose sódica e quitosano nas diferentes condições de solubilização.	50
Tabela 15 . Grau de intumescimento dos filmes poliméricos a base de carboximetil celulose sódica contendo quercetina em saliva artificial pH 8.	52
Tabela 16 . Comprimentos de onda e grupos funcionais em comum entre o placebo e o filme incorporado com quercetina obtidas através de análise estrutural utilizando metodologia de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.	54
Tabela 17 . Teor do filme polimérico sob as diferentes condições de solubilização.	55
Tabela 18 . Influência de diferentes concentrações do surfactante na solubilidade da quercetina em saliva artificial.	56
Tabela 19 . Determinação do fluxo (J) e cinética de liberação ($n=3$) das formulações poliméricas contendo quercetina.	58
Tabela 20 . Nível de turvação do caldo após 24h do inóculo em contato com as formulações desenvolvidas.	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Anatomia Dentária Canina	3
2.2. Etiologia da Doença Periodontal	3
2.3. Bactérias Associadas a Doença Periodontal	6
2.4. Produtos à base de Compostos Naturais Isolados	7
2.5. Tratamento da Doença Periodontal e o Mercado Veterinário	10
2.6. Desenvolvimento Farmacêutico de Formulações Bucais	11
2.7. Polímeros Utilizados na Elaboração de Formulações Bucais para a Saúde Oral	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Materiais	16
3.1.1. Matérias primas e reagentes utilizados	16
3.1.2. Equipamentos utilizados	16
3.1.3. Microrganismos	177
3.1.4. Bochecha canina	17
3.2. Métodos	17
3.2.1. Ensaios de avaliação antimicrobiana	17
3.2.1.1. Difusão em disco	18
3.2.1.2. Determinação da concentração inibitória mínima	18
3.2.1.3. Determinação da concentração bactericida mínima	20
3.3. Método Analítico para Análise de Quercetina	21
3.3.1. Seletividade	21
3.3.2. Linearidade	21
3.4. Desenvolvimento das Formulações	22
3.4.1. Hidrogéis	22
3.4.2. Filme polimérico a base de carboximetilcelulose sódica	24
3.5. Caracterização das Formulações	25
3.5.1. Hidrogéis de carboximetilcelulose sódica e de quitosano	25
3.5.1.1. Aspecto	25
3.5.1.2. Odor	26
3.5.1.3. Determinação de pH	26
3.5.1.4. Espalhabilidade	26
3.5.1.5. Ensaios de estabilidade preliminar	27
3.5.1.6. Determinação de teor de quercetina nos hidrogéis	27
3.5.1.7. Análise Estatística	27
3.5.2. Filme polimérico de carboximetilcelulose sódica	27
3.5.2.1. Uniformidade de peso	27
3.5.2.2. Determinação do pH superficial	27
3.5.2.3. Capacidade de intumescimento	28
3.5.2.4. Resistência a dobra	29
3.5.2.5. Análise morfológica	29
3.5.2.6. Análise estrutural	29
3.5.2.7. Determinação de teor de quercetina no filme polimérico a base de carboximetilcelulose sódica	29
3.6. Ensaios de Liberação <i>in vitro</i>	30
3.6.1. Ensaio de solubilidade	30
3.6.2. Liberação <i>in vitro</i> das formulações desenvolvidas	300
3.6.3. Cinética de liberação	31

3.7. Tempo de Residência <i>ex vivo</i>	31
3.7.1. Dessecação da mucosa.....	32
3.7.2. Preparo do aparato para teste.....	32
3.7.3. Execução do ensaio.....	32
3.8. Atividade Antimicrobiana das Formulações	33
3.8.1. Atividade inibitória.....	33
3.8.2. Atividade bactericida.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Ensaio de avaliação antimicrobiana.....	35
4.1.1. Ensaio de difusão em disco.....	35
4.1.2. Ensaio para determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas.....	35
4.2. Método Analítico para Análise de Quercetina.....	38
4.2.1. Seletividade.....	38
4.2.2. Linearidade.....	39
4.3. Caracterização Físico-Química das Formulações Obtidas.....	40
4.3.1. Hidrogéis.....	40
4.3.1.1. pH.....	41
4.3.1.2. Espalhabilidade.....	42
4.3.1.3. Ensaio de estabilidade preliminar.....	44
4.3.2. Filmes poliméricos.....	49
4.3.2.1. Grau de intumescimento.....	50
4.3.2.2. pH de superfície.....	51
4.3.2.3. Resistência a dobra.....	52
4.3.2.4. Caracterização morfológica.....	52
4.3.2.5. Análise estrutural.....	52
4.3.2.6. Determinação de teor de quercetina.....	53
4.4. Liberação <i>in vitro</i>	54
4.4.1. Estudo de solubilidade.....	55
4.4.2. Liberação <i>in vitro</i>	55
4.4.3. Cinética de liberação.....	56
4.5. Tempo de Residência <i>ex vivo</i>	57
4.6. Atividade Antimicrobiana das Formulações.....	58
4.6.1. Efetividade inibitória.....	59
4.6.2. Efetividade bactericida.....	61
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	844

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma condição oral prevalente tanto em seres humanos quanto em animais. Essa enfermidade advém da formação de biofilme bacteriano na superfície dos dentes, resultando em inflamação gengival, perda óssea e, em casos mais avançados, em perda dentária. Em cães, a condição afeta aproximadamente 70% dos animais adultos, destacando sua relevância clínica e a necessidade de abordagens inovadoras para prevenção e tratamento.

A busca por alternativas terapêuticas sustentáveis tem levado à exploração de compostos naturais. Neste contexto, os flavonoides, substâncias encontradas em diversas plantas, ganham destaque devido às suas propriedades medicinais. A quercetina e a rutina, por exemplo, são amplamente presentes em alimentos de origem vegetal, e tem se mostrado promissoras devido às suas atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias. A utilização de compostos naturais, como estes flavonóides, apresenta-se como uma alternativa para a inovação frente ao tratamento e profilaxia da doença periodontal canina.

Além da via de administração oral ser a mais usual, a cavidade bucal demonstra alta capacidade de retenção, tornando-se uma opção vantajosa para a aplicação local de medicamentos, o que proporciona uma redução significativa em efeitos colaterais sistêmicos. Considerando os desafios associados à implementação de uma higiene rotineira canina - bem como as dificuldades decorrentes da remoção pela saliva e atividade mecânica da boca - a busca por uma formulação que mantenha um contato prolongado com a área afetada se mostra crucial.

Diante das necessidades e demandas do desenvolvimento de formulações farmacêuticas orais que requerem interação prolongada, os excipientes poliméricos como quitosano e a carboximetilcelulose sódica, sobressaem-se devido à suas capacidades de mucoadesão. Este atributo, quando aplicado ao contexto da doença periodontal em animais, revela um potencial significativo, visto a minimização da necessidade de reaplicações, culminando na melhoria da saúde bucal, e conseqüentemente, contribuindo para o bem-estar geral.

Neste estudo estima-se as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas de dois flavonoides, a quercetina e a rutina. Posteriormente, seleciona-se quercetina para o desenvolvimento de formulações, uma vez as cepas bacterianas testadas foram mais suscetíveis a ela. As formulações obtidas foram submetidas à ensaios de caracterização físico-química, avaliação do tempo de residência *ex vivo*, perfil e cinética de liberação *in vitro* e eficácia antibacteriana.

Foram obtidas três formulações distintas: um hidrogel e um filme polimérico à base de carboximetil celulose sódica, e um hidrogel à base de quitosano.

A obtenção dos hidrogéis ocorreu através da hidratação do polímero escolhido, enquanto a produção do filme ocorre por meio da técnica de *solvent casting*. Neste processo, a solução contendo o polímero é transformada em um hidrogel e então depositada em uma superfície plana, permitindo que o solvente evapore sob controle de temperatura. Após a solubilização e integração de todos os componentes, o princípio ativo é incorporado às formulações resultantes.

A caracterização dos hidrogéis envolve a realização de ensaios físico-químicos abrangendo aspecto, potencial de hidrogênio (pH), espalhabilidade, análise de teor e estabilidade preliminar mediante centrifugação, exposição à radiação luminosa, ciclos de congelamento e aquecimento. Enquanto, a caracterização do filme polimérico inclui avaliações de uniformidade de peso, espessura, grau de intumescimento, pH superficial, resistência à dobra, análise de teor do ativo incorporado, além de ensaios morfológicos e estruturais.

O trabalho aborda a doença periodontal em cães, com ênfase na suscetibilidade

bacteriana em relação aos flavonoides. Além disso, são apresentadas análises detalhadas das características específicas de cada formulação, bem como as influências que elas sofrem durante a exposição a diferentes condições.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A procura pela cura e tratamento de enfermidades sempre esteve presente nas mais diversas civilizações. No Antigo Egito, o interesse em busca de tratamentos dentários foi demonstrado não apenas pelas pinturas rupestres, mas confirmado pelo documento médico mais antigo do mundo, o Papiro Ebers, elaborado há mais de 1550 a.C. (DA SILVA, 2009; DE ALMEIDA, 2020). Porém foi por volta de 600 a.C. que o assunto foi associado pela primeira vez a medicina veterinária, no livro Zuo Zhuan (o livros dos animais) (LLORENS *et al.*, 1998).

3.1. Anatomia Dentária Canina

É na mandíbula e no maxilar, mais precisamente nos alvéolos dentários, que os dentes estão localizados. Sua anatomia esta dividida em três estruturas: raiz, periodonto e coroa (Figura 1). A coroa é composta por esmalte, dentina e polpa, ela é a porção exposta do dente, enquanto a raiz é a porção que se insere no alvéolo dentário, composta por nervos e vasos. Entre as duas estruturas está o periodonto, que é o conjunto estrutural composto por gengiva, que possui a função de proteger o dente, cimento, ligamento periodontal e osso alveolar que oferecem suporte ao mesmo (ROZA, 2004). A arcada dentária permanente de um cão possui doze incisivos, quatro caninos, dezesseis pré-molares e dez molares (ROZA, 2004; SAIDLA, 2014; SIMÕES, 2016).

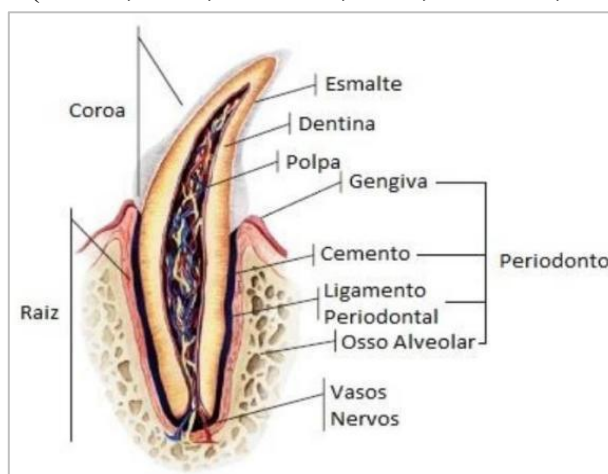


Figura 1. Anatomia do dente incisivo lateral canino. (Fonte: MADEIRA, 2017)

Além de estar diretamente relacionado ao bem estar, o cuidado oral impede não somente doenças na boca, mas também desordens em outros sistemas além do trato gastrointestinal (SHARMA *et al.*, 2011).

3.2. Etiologia da Doença Periodontal

A doença periodontal (DP) é o resultado da resposta inflamatória que afeta o periodonto. Ela é causada pela formação de placa bacteriana (biofilme dental) sob a superfície oral, dentes e tecidos moles adjacentes (GORREL, 2010; CARDOSO, 2012; HA, 2013). Esse biofilme é composto por matriz bacteriana predominantemente gram-positiva e aeróbia associada a acúmulo de resíduos alimentares, substâncias orgânicas e inorgânicas e pode atingir as três estruturas do periodonto. (ROZA, 2004; ADEPU *et al.*, 2018).

O acúmulo de biofilme na superfície do dente, posteriormente, se mineraliza formando

o cálculo dentário, sendo então um dos muitos fatores que levam a perpetuação da doença, pois se tornam um ambiente de proteção para as bactérias que colonizam aquela superfície, provocando assim, inflamação gengival, destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar, o que leva à perda dental (ROZA, 2004; BAIA *et al.*, 2017; GORREL, 2010; SIMÕES, 2016; NIEMIEC, 2008).

A DP é separada em duas condições: gengivite e periodontite (HARVEY, 2019; NIEMIEC, 2012). A gengivite (Quadro 1, estágio DP1) é um processo inflamatório que afeta apenas o tecido mole (gengiva), não estando associada à perda óssea. A gengivite é reversível caso o biofilme seja removido. Na periodontite (Quadro 1, estágios DP2, DP3 e DP4), os tecidos que sustentam o dente ficam inflamados, resultando em perda de inserção devido à destruição do ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. A periodontite é irreversível, mas geralmente controlável (WALLIS *et al.*, 2020).

A língua dos cães é curta e larga, limitando sua capacidade de alcançar os dentes pré-molares e molares (Figura 2), sendo estes mais propensos a desenvolver a doença (HOLMSTROM *et al.*, 2013; HARVEY *et al.*, 2019; GIOSO *et al.*, 2007; DUPONT *et al.*, 2016).

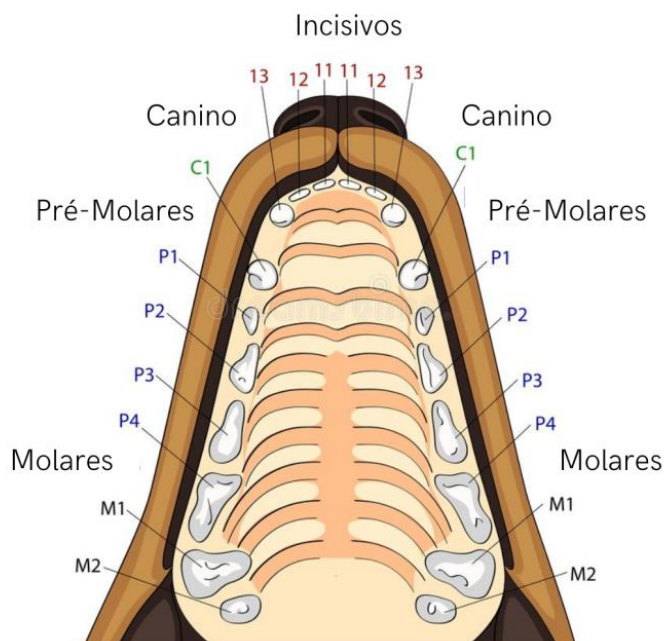
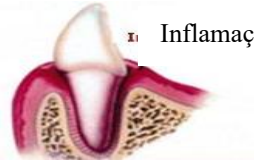
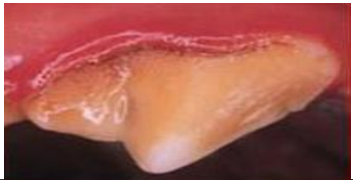
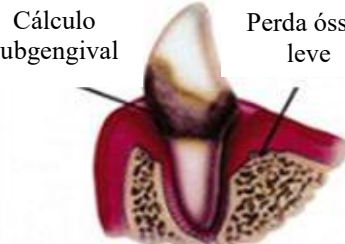

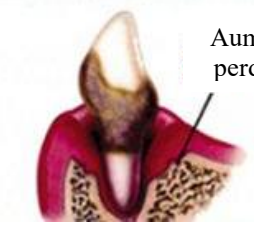





Figura 2. Componentes superiores da anatomia bucal canina. (Fonte: Adaptado de DREAMSTIME, 2021)

E segundo a American Veterinary Dental College (AVDC, 2021), o grau de gravidade da DP está relacionado a diversos fatores, como a proporção de perda óssea, recessão gengival e sangramentos, o que torna importante a avaliação geral da boca (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação da gravidade da doença periodontal em cães quanto aos seus quatro estágios de desenvolvimento.

Estágio	Definição	Ilustração	
Estágio 1 (DP1)	Gengivite apenas sem perda de inserção; a altura e a arquitetura da margem alveolar são normais. Não há periodontite.	 <p>Inflamação</p>	
Estágio 2 (DP2)	Periodontite precoce; menos de 25% de perda de inserção.	 <p>Cálculo subgengival</p> <p>Perda óssea leve</p>	
Estágio 3 (DP3)	Periodontite moderada; 25-50% de perda de inserção.	 <p>Aumento da perda óssea</p>	
Estágio 4 (DP4)	Periodontite avançada; mais de 50% da perda de inserção.	 <p>Perda de inserção avançada</p>	

Fonte: Adaptado de AVDC, 2021 e Janssen Veterinary Clinic, 2021

Os estudos de prevalência de DP em cães mostram que mais de 70% dos cães adultos dispõem do problema (MILKEN *et al.*, 2003; VENTURINI *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2015), sendo assim uma adversidade a ser combatida, visto que pode conduzir a quadros agudos ou crônicos de cáries e inflamação gengival.

3.3. Bactérias Associadas a Doença Periodontal

As bactérias são organismos unicelulares microscópicos que estão presentes em uma variedade de ambientes, incluindo o trato oral tanto de humanos quanto de animais. No caso dos cães, a mucosa oral é um ecossistema complexo que abriga diversos microorganismos que interagem entre si. Essa interação desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase oral e na prevenção de doenças orais. No entanto, em determinadas circunstâncias, essas bactérias podem se tornar oportunistas e causar doenças (CURTIS *et al.*, 2020; MARSH *et al.*, 1994).

Ainda hoje, a determinação da predominância de cepas bacterianas na mucosa oral canina apresenta um desafio. A dificuldade de estabelecer uma padronização linear em relação à prevalência dessas cepas pode ser influenciada por características genéticas do animal, hábitos alimentares e de vida, presença de outros animais no mesmo ambiente e até mesmo pela proximidade com seres humanos (ELLIOT *et al.*, 2005; DI BELLO *et al.*, 2014).

A mucosa oral canina possui bactérias em sua microbiota natural, sejam elas prevalentes na saliva saudável como *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Granulicatella* e *Bacteroides heparinolyticus*, como aquelas presentes na placa como *Porphyromonas*, *Actinomyces*, *Pasteurella dagmatis*, *Neisseria*, *Pseudomonas sp.*, *Porphyromonas cangingivalis* e *Desulfomicrobium orale* (ELLIOT *et al.*, 2005; RIGGIO *et al.*, 2011). No entanto, quando ocorre um desequilíbrio na comunidade microbiana, como consequência de um acúmulo excessivo de placa bacteriana, pode ocorrer a disbiose, que é caracterizada por um aumento de bactérias patogênicas e uma diminuição de bactérias, gram-negativas bem como gram-positivas, benéficas (GASNER *et al.*, 2022; KAČÍROVÁ *et al.*, 2019). A presença de placa bacteriana nos dentes e mucosa oral de cães é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças orais, como gengivite e periodontite (HOLÁNKOVÁ *et al.*, 2020). Embora a DP seja normalmente associada a bactérias anaeróbicas, algumas bactérias aeróbicas também podem estar envolvidas no seu desenvolvimento e progressão. Entre essas bactérias, destacam-se *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*) (RUPARELIA *et al.*, 2013; ARWEILER *et al.*, 2016).

S. aureus é uma bactéria gram-positiva frequentemente encontrada na pele e nas mucosas de animais. Neste contexto, é capaz de produzir enzimas e toxinas que podem causar danos ao tecido periodontal, levando ao desenvolvimento de inflamação de cães com DP (AWOYOMI *et al.*, 2014).

E. coli é uma bactéria gram-negativa que faz parte da microbiota intestinal dos animais. Embora menos comum do que outras bactérias na DP, sua presença em bolsas periodontais pode produzir fatores de virulência que contribuem para a inflamação e degradação do tecido periodontal. (RUPARELIA *et al.*, 2013).

S. Pseudintermedius é uma bactéria gram-positiva comumente encontrada na pele e nas mucosas dos cães, sendo uma das principais causas de infecções bacterianas na pele e tecidos moles dos animais. Seu depósito na cavidade oral pode causar efeitos similares a *E. coli* e *S. aureus* (ARWEILER *et al.*, 2016).

Determinadas bactérias podem apresentar resistência a vários tipos de

antibióticos comumente utilizados na prática clínica (CUNHA *et al.*, 2022; LERNER *et al.*, 2019). A resistência antimicrobiana pode ser descrita como a capacidade de um microorganismo em resistir a ação de antimicrobianos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICA DE SAÚDE, 2023). O nível de resistência de uma cepa mutante pode variar amplamente dependendo do mecanismo de resistência, resultando em sua evolução, seja por disseminação entre cepas semelhantes ou distintas. (HUGHES, 2017; OLIVEIRA, 2017).

A limitação desta eficácia torna o tratamento mais desafiador e prolongado. Além disso, o uso indiscriminado e inadequado de antibióticos pode contribuir para o desenvolvimento e disseminação de resistência bacteriana, agravando ainda mais o problema (ARWEILER *et al.*, 2016). Em decorrência a isto, os benefícios gerados pela era dos antibióticos estimularam o surgimento de modificações genéticas que contribuíram para burlar o mecanismo de ação dos fármacos (LIMA, 2017). Assim sendo, a ampliação de cepas resistentes resulta em prejuízos a saúde pública, uma vez que conduz a quadros infecciosos que originam um tratamento dificultado (HUGHES, 2017).

3.4. Produtos à base de Compostos Naturais Isolados

Os medicamentos fitoterápicos são apenas aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. Assim, todo e qualquer medicamento que inclua em sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, e ainda as associações dessas com extratos vegetais, não podem ser igualmente denominados (ANVISA, 2023).

Os produtos que empregam componentes naturais isolados são aqueles que fazem uso de substâncias derivadas de fontes vegetais de maneira isolada, deste modo, visa a potencialização de sua atividade a partir da utilização de produtos majoritários de extratos de plantas, como os alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos. Estes compostos são substâncias que possuem um ou mais substituintes hidroxílicos com um anel aromático, incluindo seus grupos funcionais. Eles são considerados antioxidantes primários nas plantas, em consideração que há uma relação direta entre o conteúdo total de fenólicos e as propriedades antioxidantes de uma determinada espécie de vegetal. (SHYLAJA *et al.*, 2004).

Sua síntese tem início com o ácido chiquímico, que é responsável por produzir a fenilalanina, a qual atua como o precursor inicial para a formação desses compostos. A fenilalanina passa por um processo de desaminação, mediado pela enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL), resultando na formação do ácido cinâmico. Em etapas subsequentes da via biossintética, o ácido cinâmico é convertido em ácido p-cumárico, por meio da ação da enzima 4-hidroxilase cinamato. A partir desse ponto, ocorre a adição da CoA, catalisada pela enzima p-cumarato/CoA liase, o que origina a p-cumaroil-CoA. A p-cumaroil-CoA, ao reagir com três moléculas de malonil-CoA, conduz à formação da calcona, uma reação que é catalisada pela enzima calcona sintetase. Por fim, a ciclização do anel da calcona é realizada pela ação da enzima calcona isomerase, resultando na formação da flavanona, que apresenta o núcleo básico compartilhado por todos os flavonoides (Figura 3) (FORMICA & REGELSON, 1995; ANDERSEN & MARKHAM, 2006; DIXON & PASINETTI, 2010). Em seguida, outras enzimas específicas convertem a espinha dorsal em diferentes classes de flavonoides, como flavonas, flavonóis, flavononas, antocianinas e outros. A

regulação desta biossíntese é influenciada por fatores ambientais, como luz e estresse, bem como fatores genéticos. (WINKEL, 2001).

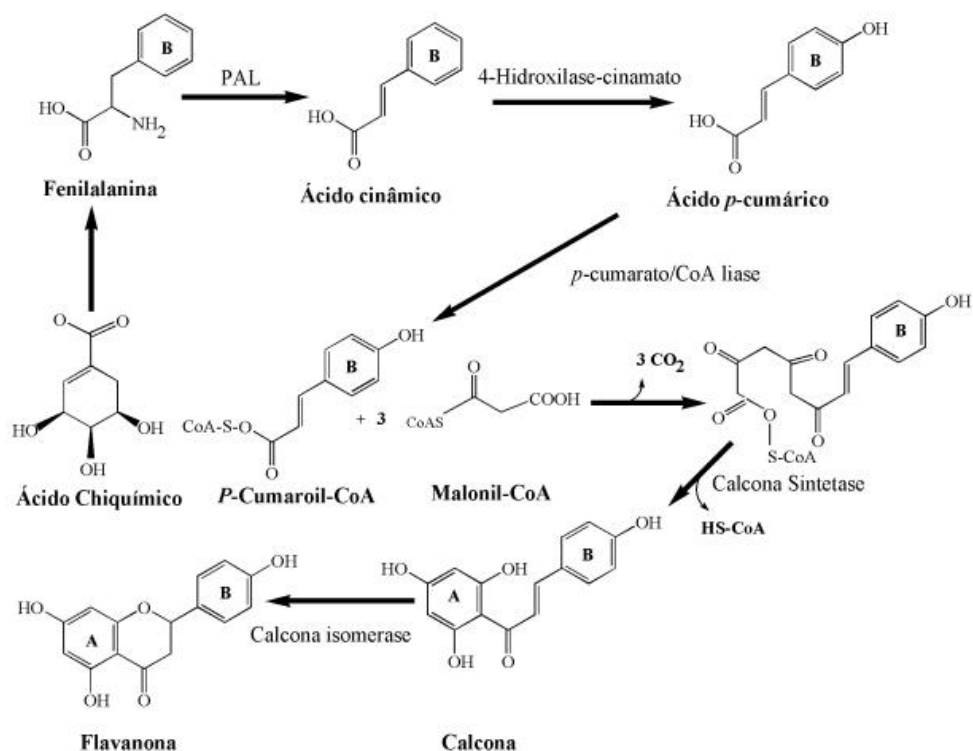


Figura 3. Síntese dos flavonóides (Fonte: ANDERSEN & MARKHAM, 2006)

Além de suas propriedades antioxidantes (SHYLAJA *et al.*, 2004), os flavonóides e seus derivados proporcionam ação antimicrobiana, exibindo também atividade regenerativa dos tecidos moles e duros, os mesmos que constituem a mucosa oral (FARHADI *et al.*, 2018; XIE *et al.* 2015; EVERETTE *et al.*, 2010). Neste sentido, destacam-se a quercetina (QRC) e a rutina (RTN).

A 3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona, mais conhecida com QRC, se apresenta como um pó cristalino de coloração amarela-esverdeada, sendo pouco solúvel em água (tabela 1) e apresentando solubilidade em solventes orgânicos, como etanol e acetona.

Tabela 1. Características físico-químicas da quercetina

Propriedade físico-química	Valor	Referências
pKa 1, temperatura 25°C	7,88	Xie, Y. <i>et al.</i> , 2019
pKa 2, temperatura 25°C	9,83	Liu, Y. <i>et al.</i> , 2014
Solubilidade em água, 25°C	16 mg/L	Chen, L. <i>et al.</i> , 2018
Log P (coeficiente de partição octanol/água)	2,31	Liu, Y. <i>et al.</i> , 2013
Massa molar	302,24 g/mol	
Ponto de ebulição	666,1°C	National Center for Biotechnology Information, 2023
Ponto de fusão	313 - 315°C	
Densidade	1,459 g/cm ³	

É considerada um polifenol natural pertencente ao grupo das flavonas. Possui estrutura molecular caracterizada pela presença de 5 grupos hidroxila nas posições 3, 3', 4', 5 e 7 (BUKHARI, 2009), como demonstrado pela figura 4.

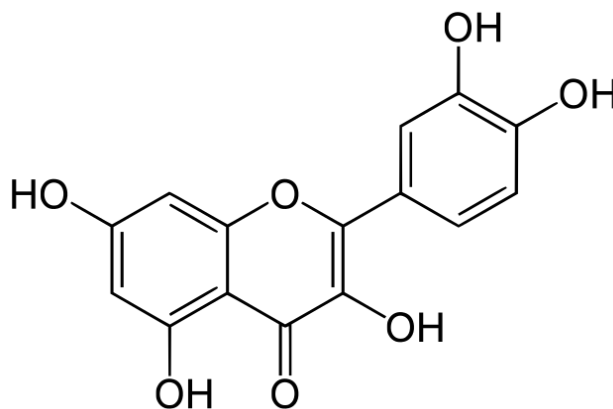


Figura 4. Estrutura molecular da quercetina.

Suas atividades farmacológicas já foram evidenciadas, como atividade antioxidante e anti-inflamatória (ABARIKWU *et al.*, 2012; BOOTS *et al.*, 2008; HWANG *et al.*, 2009) e antimicrobiana frente a cepas bacterianas sensíveis e resistentes (PAL *et al.*, 2019; ANGELLOTTI *et al.*, 2020; AMIN *et al.* 2015; WOËNICKA *et al.*, 2013).

A 3, 30, 40, 5, 7-pentahidroxi-flavona-3-ramnoglicosídeo, popularmente denominada RTN (Figura 5) é um componente nutricional vital dos alimentos (HARBORNE, 1986).

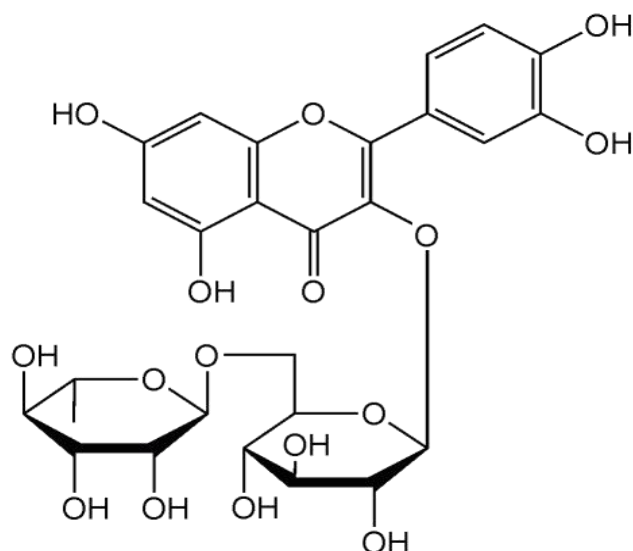


Figura 5. Estrutura molecular da rutina.

Se destacando por suas atividades terapêuticas antioxidantes, citoprotetoras, vasoprotetoras, anticancerígenas, neuroprotetoras e antimicrobianas (GUL *et al.*, 2018; CUSHNIE *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2008; YOU *et al.*, 1999; YU *et al.*, 2015; NEGAHDARI *et al.*, 2020; AMIN *et al.*, 2015). Seu aspecto visual se caracteriza por um pó cristalino de coloração amarela-clara, e apresenta baixa solubilidade em água, sendo mais solúvel em solventes orgânicos como metanol e etanol (tabela 2).

Tabela 2. Características físico-químicas da rutina

Propriedade Físico-Química	Valor	Referências
pKa	7,7	PubChem, 2023
Ponto de ebulição	825,91 °C	DrugBank, 2023
Solubilidade em água	85 mg/L a 20°C	
Log P (octanol/água)	1,42	
Massa molar	338,27 g/mol	PubChem, 2023
Ponto de fusão	176-182 °C	
Ponto de ebulição	825,91 °C	
Densidade	1,57 g/cm ³ a 20°C	

3.5. Tratamento da Doença Periodontal e o Mercado Veterinário

O objetivo na prevenção e no tratamento da DP é manter a gengiva clinicamente saudável, evitando o acúmulo de placa na superfície do dente e, conseqüentemente, prevenindo a inflamação. Uma vez formado, o cálculo só pode ser removido através da realização de uma limpeza dentária profissional sob anestesia. No entanto, cerca de alguns minutos a horas após a limpeza completa dos dentes, uma camada de glicoproteínas salivares começa a se formar na superfície do dente que é

subseqüentemente colonizada por bactérias para formar a placa dentária, ou seja, é preciso manutenção da saúde bucal do animal após a limpeza dentária através de estratégias de prevenção da formação do biofilme (WALLIS *et al.*, 2020).

A chave para uma boa saúde bucal é através de cuidados domiciliares regulares e acompanhamento veterinário. Apesar de ser a doença oral mais comum que afeta humanos e animais (LOESCHE *et al.* 2001), o tratamento para o animal é prejudicado pelas formulações disponíveis no mercado, devido sua ineficiência adesão (ESCUADERO-CASTANO *et. al.*, 2008).

Seu tratamento envolve ações profiláticas como limpeza mecânica da placa bacteriana, polimento dental e limpeza com soluções antimicrobianas, de forma que a deposição de biofilme seja evitada (FERNANDES *et. al.*, 2018; GIOSO *et al.*, 2004).

No mercado atual, existem formas farmacêuticas diversas que prometem reduzir a incidência do problema, seja a redução da microbiota bacteriana ou na própria formação do biofilme, são elas: creme dental (C.E.T Virbac®), gel dental (Orozyme® InoVet, PerioVet® Vetnil), espuma bucal (Ibasa®), solução oral (Ibasa®, Care Dental Splash®, Aquadent Virbac®), spray bucal (Periovet®, Pet Clean®, Pro Canine®), lenço bucal (Ibasa®), pasta (Defengy OC®), palitos (Organnact Cães Fitodent®), comprimido palatáveis (Cooldent Virbac®) e pó (Plaque Off ProDen®).

A necessidade de inovação em serviços e produtos veterinários tem se tornado uma realidade (ABINPET, 2023). Com o passar dos anos, os animais assumiram muito mais do que a posição de pet, se tornando também um membro da família. Com a evolução dessas relações, há cada vez mais preocupação em garantir o bem-estar dos mesmos, buscando produtos que causem menos desconforto, muita das vezes optando por formulações naturais (SINDAN, 2023).

3.6. Desenvolvimento Farmacêutico de Formulações Bucais

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas é um processo que envolve a seleção de componentes ativos e excipientes adequados, além de escolhas de técnicas de fabricação e testes para garantir que sua aplicabilidade seja de qualidade, possuindo segurança e eficácia do produto final (ZHAO *et al.*, 2019).

Neste contexto, a inovação de formulações bucais é extremamente relevante devido à alta capacidade de retenção na cavidade oral (ZHANG *et al.*, 2002). Além disso, a administração local de medicamentos apresenta uma vantagem significativa na redução de efeitos colaterais sistêmicos, já que a concentração do fármaco é mantida no local de ação, reduzindo a exposição dos demais órgãos e tecidos aos componentes do medicamento. Essa estratégia permite um tratamento mais direcionado e eficaz, minimizando os possíveis riscos associados ao uso de medicamentos sistêmicos (PEREIRA *et al.*, 2020).

Apesar de apresentar benefícios, a elaboração de formulações destinadas à cavidade oral enfrenta desafios decorrentes das próprias condições bucais, os quais frequentemente comprometem o sucesso do tratamento. Esses desafios estão associados à influência da saliva e às atividades mecânicas, que prontamente removem o medicamento aplicado à superfície bucal (ESCUADERO-CASTAÑO *et al.*, 2008; FERRARINI *et al.*, 2007).

Durante o delineamento, a escolha de excipientes deve ser cuidadosamente avaliada, levando em consideração as características físico-químicas e farmacológicas do ingrediente ativo, além de considerações de compatibilidade e estabilidade (CHAUDHARI *et al.*, 2019). Além disso, a seleção de excipientes também pode

influenciar a absorção, a permeabilidade e a solubilidade do fármaco (EL-MALAH *et al.*, 2018; KALASZ *et al.*, 2006; PATIL, 2010; HASSAN *et al.*, 2010). E especificamente, no contexto de formulações bucais, é crucial que o excipiente apresente propriedades adesivas, a fim de promover a retenção no local de aplicação, potencializando assim a eficácia do tratamento (FERRARINI *et al.*, 2007)

A solubilidade se refere à capacidade de uma substância se dissolver em um solvente, sendo um fator crítico para a absorção de medicamentos e sua eficácia terapêutica (LEUNER *et al.*, 2018). Do mesmo modo, a solubilidade pode influenciar a estabilidade do medicamento, uma vez que substâncias insolúveis podem precipitar e formar depósitos no sistema de administração (PAUDWAL *et al.*, 2019).

Já a permeabilidade se refere à capacidade de uma substância atravessar uma barreira biológica, podendo ser influenciada por diversos fatores, incluindo tamanho molecular, polaridade, carga elétrica e a presença de grupos funcionais específicos (PATEL *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2019). Além disso, a permeabilidade também pode ser influenciada pela presença de excipientes na formulação (DA SILVA *et al.*, 2021).

Uma estratégia que pode ser empregada no desenvolvimento de formulações, é a adição de excipientes solubilizantes para aumentar a solubilidade de um ativo, enquanto o uso de técnicas de modificação de superfície pode melhorar a permeabilidade (PATEL *et al.*, 2015). Além disso, a seleção cuidadosa de excipientes e técnicas de formulação também podem influenciar a estabilidade e biodisponibilidade do medicamento (PAUDWAL *et al.*, 2019).

3.7. Polímeros Utilizados na Elaboração de Formulações Buciais para a Saúde Oral

Os polímeros são compostos por moléculas longas e ramificadas, formadas pela repetição de unidades estruturais chamadas monômeros. Sendo estes, unidos por meio de ligações covalentes, formando cadeias poliméricas que podem ter diferentes configurações e propriedades (CARRAHER *et al.*, 2017). Possuindo diversas aplicações na área farmacêutica, seja na fabricação de embalagens, auxiliando na solubilidade e biodisponibilidade dos medicamentos, como no prolongamento do tempo de liberação de fármacos (LIECHTY *et al.*, 2010). Como exemplo destes produtos temos a carboximetil celulose sódica (CMC- Na), Polialcoolvinílico (PVA), Quitosano (QTS) e o Polietilenoglicol (PEG).

A CMC-Na é um polímero derivado da celulose amplamente utilizado na indústria farmacêutica como excipiente, agente de suspensão, espessante, estabilizador e agente de liberação controlada de medicamentos (Figura 6). Sua utilização vai de formulações orais como cápsulas, à tópicas, como géis e cremes (ROWE *et al.*, 2009).

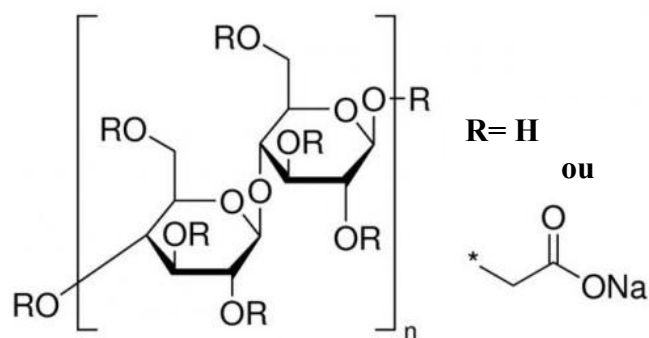


Figura 6. Estrutura molecular da carboximetilcelulose.

O polímero demonstra alta viscosidade em soluções aquosas devido à sua capacidade de reter água, formando uma camada gelatinosa. Essa característica torna a CMC-Na um material interessante para o desenvolvimento de hidrogéis e filmes poliméricos. A obtenção destes produtos depende não apenas da concentração da CMC-Na, mas também de seu peso molecular, podendo ser obtido através de diferentes técnicas, como congelamento e descongelamento, irradiação por feixe de elétron e pelo método de fundição de solvente (SUPPIAH *et al.*, 2019). O polímero oferece um sistema de liberação interessante para os produtos, podendo ser utilizado para promover a liberação lenta e controlada de fármacos, visando produzir efeitos terapêuticos graduais e prolongados (TOLEDO *et al.*, 2019; GUGLIELMI, 2008).

O QTS é um polímero natural derivado da quitina, seu uso na indústria farmacêutica está envolvido com desenvolvimento de hidrogéis, microesferas e nanopartículas (Figura 7). Possui propriedades antibacterianas e pode ser utilizada como um agente de liberação controlada de fármacos (BHATTARAI *et al.*, 2010).

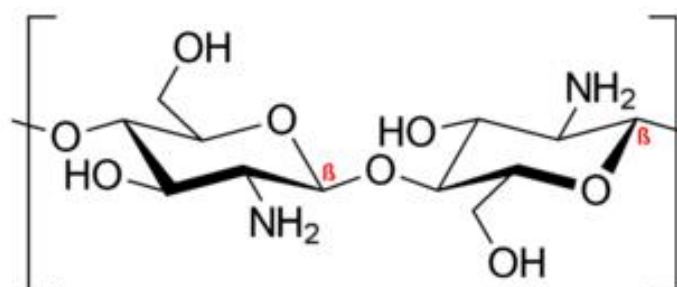


Figura 7. Estrutura molecular do quitosano.

Dentre suas características notáveis, destaca-se a capacidade de formar hidrogéis em soluções ácidas, o que o torna especialmente apropriado para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos. A formação de hidrogéis ocorre por meio da solubilização do polímero em soluções ácidas, que permitem a incorporação de princípios ativos de medicamentos no interior da estrutura polimérica, possibilitando a liberação gradual dos fármacos ao longo do tempo, melhorando a eficiência terapêutica e minimizando efeitos colaterais indesejados (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2009). Outro aspecto importante do QTS é sua atividade antimicrobiana (RAAFAT *et al.*, 2008; KONG *et al.*, 2010), que em combinação com a capacidade de formar hidrogéis, faz dele uma opção duplamente

promissora para o desenvolvimento de sistemas de liberação de medicamentos voltados ao tratamento da DP.

O PEG é um polímero solúvel em água que é utilizado como um excipiente para melhorar a solubilidade e estabilidade de medicamentos. Também é usado em formulações de liberação controlada de medicamentos, como hidrogéis e lipossomas (HUANG *et al.*, 2003)

O PVA é um polímero solúvel em água e que tem sido utilizado na indústria farmacêutica como excipiente em diversas formulações. Podendo ser usado como agente espessante em formulações líquidas, e como agente de revestimento em comprimidos e cápsulas, ajudando a proteger o medicamento da umidade e melhorando a estabilidade do produto (MUPPALANENI *et al.*, 2013; NAGARKAR *et al.*, 1995).

Existem processos que alteram as propriedades dos materiais poliméricos de modo que estes se adequem a sua aplicação e liberação do ativo (PARL *et al.*, 2012; WEISS *et al.*, 1995). Sua utilização pode ser realizada em combinação com outros da mesma classe, sendo a mistura polimérica uma alternativa barata e de relevância para ajuste de propriedades físicas de uma formulação (SANTOS, 2006; CANEVAROLO, 2002).

Entre os processos de modificação há o “crosslinking”, que é uma técnica utilizada para melhorar as propriedades mecânicas e térmicas de materiais poliméricos, tornando-os mais resistentes e duráveis (KUTZ *et al.*, 2011). A técnica consiste na formação de ligações covalentes (Figura 8) entre as cadeias poliméricas, denominada de reticulação, o que aumenta sua estabilidade e rigidez, sendo possível ser realizada a partir de radiação ionizante, radiação UV, tratamento térmico, entre outros (PAPPAS *et al.*, 2019). Este processo pode ocorrer através da submissão do material polimérico a radiação ionizante, agentes de reticulação química ou tratamento térmico (SUPPIAH *et al.*, 2019; CHMIELEWSKI *et al.*, 2005; MARK *et al.*, 2007).

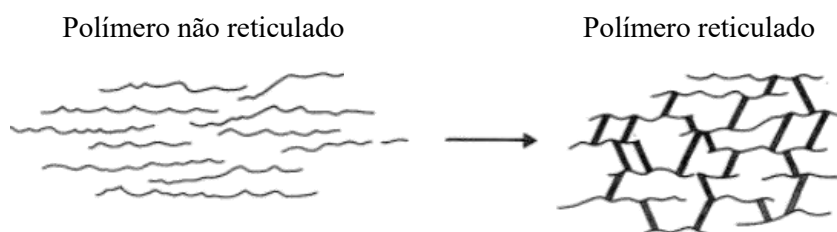


Figura 8. Organização polimérica após o processo de reticulação. (Adaptado de ROBERT, 2023.)

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar formulações poliméricas sob a forma de gel e filme à base de QRC e de RTN com características adequadas para aplicação bucal em cães no tratamento e profilaxia da doença periodontal. Dentre os objetivos específicos estão (a) a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) de QRC e RTN frente a cepas bacterianas sensíveis e resistentes a fim de estimar as concentrações a serem incorporadas nas formulações; (b) selecionar um dos ativos para o desenvolvimento farmacotécnico; (c) desenvolver formulações sob a forma de hidrogéis à base de CMC-Na e QTS e filme polimérico (FP) à base de CMC-Na; (d) caracterização dos hidrogéis através de ensaios físico-químicos de aspecto, potencial de hidrogênio (pH), espalhabilidade, teor e ensaios de estabilidade preliminar de centrifugação, exposição a radiação luminosa e ciclo de congelamento e aquecimento;

(e) caracterização do filme polimérico através dos ensaios de uniformidade de peso, espessura, grau de intumescimento, pH superficial, resistência a dobra, teor, espectroscopia de infravermelho (FTIR) e ensaios morfológicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (f) Além dos ensaios de caracterização, analisar a aderência das formulações através do ensaio de tempo de residência; (g) avaliar o perfil de liberação através de ensaios de liberação *in vitro*, e determinar suas respectivas cinéticas de liberação; e (h) avaliar a efetividade antibacteriana de cada formulação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Matérias primas e reagentes utilizados

- Ácido acético glacial, Synth, lote: 207526;
- Ágar Mueller Hinton, FirstLab, lote: 21370101;
- Álcool Metílico, BioGrade, lote: 220006430;
- Brain Heart Infusion Broth, KASVI, lote: 211022;
- Carboximetilcelulose sódica, 90,000 Mw, Sigma Aldrich, lote: MKBQ6723V;
- Carboximetilcelulose sódica, Alta viscosidade, Proquímios, lote: 15/0471;
- Chitosan, Sigma Aldrich, lote: STBF3507V;
- Cloreto de Cálcio, Synth, lote: 197642;
- Cloreto de Magnésio, próquímios, lote: 19/0141;
- Cloreto de Potássio, próquímios, lote: 21/0082;
- Cloreto de sódio, Anidrol, lote: 58.81001;
- Dodecil sulfato de sódio, Synth, lote: 202673;
- Fosfato de Sódio Monobásico, Sigma Alderich, lote: DCBC2256;
- Manitol, Vetec, lote: 1009079;
- Metilparabeno, Synth, lote: 217678;
- Metilparabeno, Synth, lote: 217678;
- Poli álcool vinílico, 85,000-124,000 Mw, Sigma Aldrich, MKCK4857;
- Propilenoglicol, Synth, lote 198262.3.1.4;
- Propilparabeno, Vetec, lote: 1108888;
- QRC Hidratada, Sigma Aldrich, lote: WXBD7412V;
- RTN Hidratada, Sigma Aldrich, lote: BCCD4344;
- Soro Fisiológico 0,9%, Equiplex, lote: 2214216.

4.1.2. Equipamentos utilizados

- Ultrassom, Ultronique, Q 3.0/40;
- Autoclave Vertical, phoenix, AV-18
- Balança analítica, Tecnal, modelo 210;
- Centrífuga Cientec, CT-6000R;
- Eléctrodo de vidro Analyser, modelo: K38-1486;
- Eléctrodo para semissólidos Analyser, modelo 209E;
- Espectrofotômetro, Shimadzu UV 1800;
- Espectrômetro de infravermelho, ERTEX 70;
- Estufa de circulação e renovação de ar, Solab, SL-102/1152;
- Estufa Solidsteel, SSD-85L;
- Geladeira, Electrolux, DC51;
- Incubadora Shaker Digital Cienlab, modelo CE-720;
- Leitor de microplacas Elisa, KASLIAKI, 282021006;
- Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo TM3030 Plus, Hitachi; SCD 005;
- Sputter BAL-TEC;
- Pipeta automática 10000µL, 5000µL, 1000µL, 200µL 100µL e 100µL;
- Placa de agitação e aquecimento, Warmnest, 78HW-1;
- Placa de Petri de vidro;
- Potenciômetro, Even, PHS3E;
- Termômetro, Incoterm, 002/15;
- Ultrapurificador de água acoplado a osmose reversa, Gehaka, OS 10 LZ.3.1.5

- Vórtex Go Mixer MX-5.

4.1.3. Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão de referência e cepas provenientes da bacterioteca do LaBac (Laboratório de Bacteriologia) do Instituto de Veterinária da UFRRJ. Para todos os ensaios, preparo dos inóculos foi realizado a partir da incubação das culturas descritas na tabela 3 por 24 horas em ágar Mueller Hinton a 37°C e ajustados à escala 0,5 de McFarland (CLSI, 2020).

Tabela 3. Microorganismos sensíveis e resistentes utilizados.

Microorganismos	Código	Perfil de Resistência	Cepa Padrão de Referência
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	Sensível	Sim
<i>E. coli (EBSL)</i>	CMY-2	Resistente à betalactâmicos	Não
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	Sensível	Sim
<i>S. aureus (MRSA)</i>	ATCC 43300	Resistente à Oxacilina/Meticilina	Sim
<i>S. pseudointermedius</i>	SP8	Sensível	Não
<i>S. pseudointermedius</i>	SP2	Resistente a Meticilina	Não
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	ATCC 200	Sensível	Sim
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	ATCC 111	Resistente a imipenem e meropenem	Sim
<i>Streptococcus</i>	-	Sensível	Não

4.1.4. Bochecha canina

O tecido bucal empregado neste estudo foi proveniente de um cão adulto da raça Beagle que foi a óbito. Sua aquisição foi autorizada pelo diretor responsável do biotério do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV). A documentação referente à utilização do material biológico, está disposta nos anexos A, B e C.

4.2. Métodos

4.2.1. Ensaios de avaliação antimicrobiana

A avaliação antimicrobiana foi realizada através de ensaios de difusão em disco, microdiluição em caldo e de semeadura em placa, permitindo a estimativa da suscetibilidade das cepas descritas em 3.1.3., frente a QRC e RTN, avaliando se a atividade era de natureza inibitória ou bactericida.

4.2.1.1. Difusão em disco

Devido à natureza hidrofóbica das moléculas QRC e RNT, procedeu-se à avaliação de vários solventes durante a execução do ensaio de difusão em disco. Essa abordagem visava assegurar a obtenção de uma solubilização completa das substâncias em estudo, além de investigar se os solventes eram inertes, a fim de evitar possíveis interferências nos resultados obtidos. A relação dos solventes empregados encontra-se delineada na tabela 4.

Tabela 4. Solventes utilizados no ensaio de difusão em disco

Solvente	Proporção (%)
DMSO	100
ACETONA	100
DMSO: PBS	90:10
H ₂ O: MeOH	90:10
PBS: MeOH	60:40
PBS: MeOH	50:50

DMSO: dimetilsulfóxido; PBS: tampão fosfato pH 8; H₂O: água; MeOH: metanol

Os procedimentos experimentais compreenderam a utilização de discos de papel filtro de dimensões 0,38 cm² impregnados com 6µL de cada solvente. Os discos foram dispostos sobre placas contendo Ágar Mueller-Hinton (MH), nas quais haviam sido inoculadas as cepas previamente mencionadas em 3.1.3. Para o controle positivo foi utilizado o antibiótico imipenem. Em seguida, as placas foram submetidas a incubação de 24 horas a temperatura de 37°C, utilizando estufa Solidsteel. O experimento foi conduzido em duplicata, garantindo a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Após a seleção do solvente foi realizado o preparo das soluções de QRC e de RTN para serem testadas frente a *S. aureus* sensível. A faixa de concentração utilizada (tabela 5) foi baseada nos trabalhos de Gutiérrez-Venegas *et al.*, (2019), COSTA *et al.*, (2018), WOËNICKA *et al.*, (2013) e AMIN *et al.*, (2015). O teste foi realizado em duplicata.

Tabela 5. Concentrações de quercetina e rutina utilizadas no ensaio de difusão em disco

Flavonóide	Concentrações (µg/mL)										
QRC	500	400	300	200	100	200	150	100	75	50	
RTN	2000	1750	1500	1000	750	500	400	300	200	100	

3.2.1.2. Determinação da concentração inibitória mínima

A sensibilidade das nove cepas bacterianas foi avaliada através da técnica de

microdiluição em caldo frente a doze concentrações de QRC e RTN como demonstrado pela tabela 6. O ensaio foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo.

As soluções testadas foram preparadas a partir da pesagem dos flavonóides e sua solubilização em DMSO (dimetilsulfóxido), para a solubilização completa foi necessário que após seu preparo, as soluções fossem submetidas a banho ultrassônico por 10 minutos.

Tabela 6. Concentrações de quercetina e rutina utilizadas no ensaio de microdiluição em caldo

Flavonóide	Concentrações (µg/mL)											
QRC	500	250	187,5	100	62,5	50	31,25	30	20	15	10	5
RTN	3750	2500	1250	500	350	200	150	100	75	50	25	12,5

QRC: quercetina; RTN: rutina

As análises foram realizadas em duplicata em placa de 96 poços, sendo então utilizado 50 µL de solução preparada, 50 µL do inóculo e 100 µL de caldo MH. Para o poço de controle positivo, foi utilizado 50 µL de inóculo, 150 µL de MH e o disco contendo imipenem. Já para o controle negativo, utilizou-se 150 µL de MH e 50 µL de inóculo bacteriano.

A avaliação dos resultados ocorreu subsequentemente ao período de incubação das placas em estufa a 37°C, ao longo de 24 horas. As linhagens bacterianas que não requeriam um ambiente anaeróbico foram colocadas diretamente nas prateleiras da estufa. Por outro lado, a cepa de *Streptococcus* (organismo anaeróbico) foi pré-colocada em uma jarra própria para cultivo anaeróbico antes de ser transferida para a estufa. Ainda nesta placa, DMSO e as soluções contendo QRC foram adicionados em poços contendo caldo MH sem inóculo, para serem utilizados como branco. Inicialmente a análise foi realizada de forma visual observando turvação do meio. Para confirmação dos resultados, utilizou-se o leitor de microplacas com comprimento de onda (λ) de 490 nm, visto que a coloração amarela dos flavonoides pode influenciar na análise visual da turbidez. O esquema utilizado para o ensaio está disposto na figura 9.

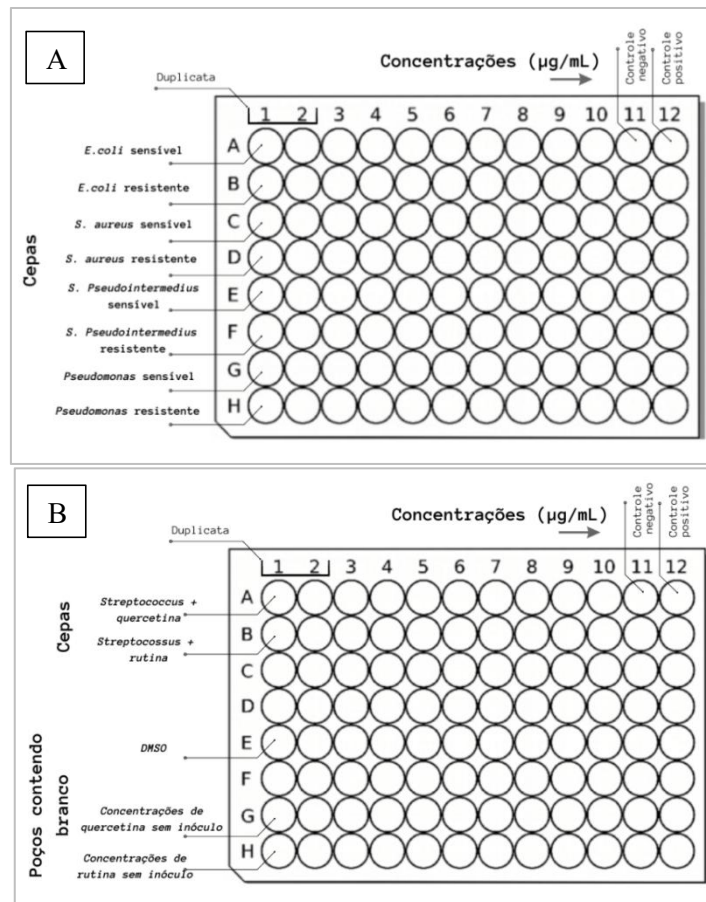


Figura 9. Esquema de preparo do ensaio de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima. (A) Cepas não anaeróbias (B) Cepa anaeróbia e brancos. (Fonte: Arquivo pessoal)

3.2.1.3. Determinação da concentração bactericida mínima

Após a finalização do ensaio de CIM, a placa de 96 poços destinada a essa fase foi direcionada para a realização do ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Nesse procedimento, um poço de cada concentração anteriormente testada, foi empregado para realizar a semeadura bacteriana, com swab estéril, nas placas de petri contendo meio MH. Após a conclusão dessa etapa, as placas foram dispostas em uma estufa à temperatura de 37°C por 24 horas (Figura 10). O objetivo deste experimento foi avaliar a sensibilidade bactericida das cepas bacterianas frente à concentrações de QRC e RTN. A avaliação do ensaio se deu pela identificação da presença ou ausência de colônias visíveis nas placas de petri de vidro.

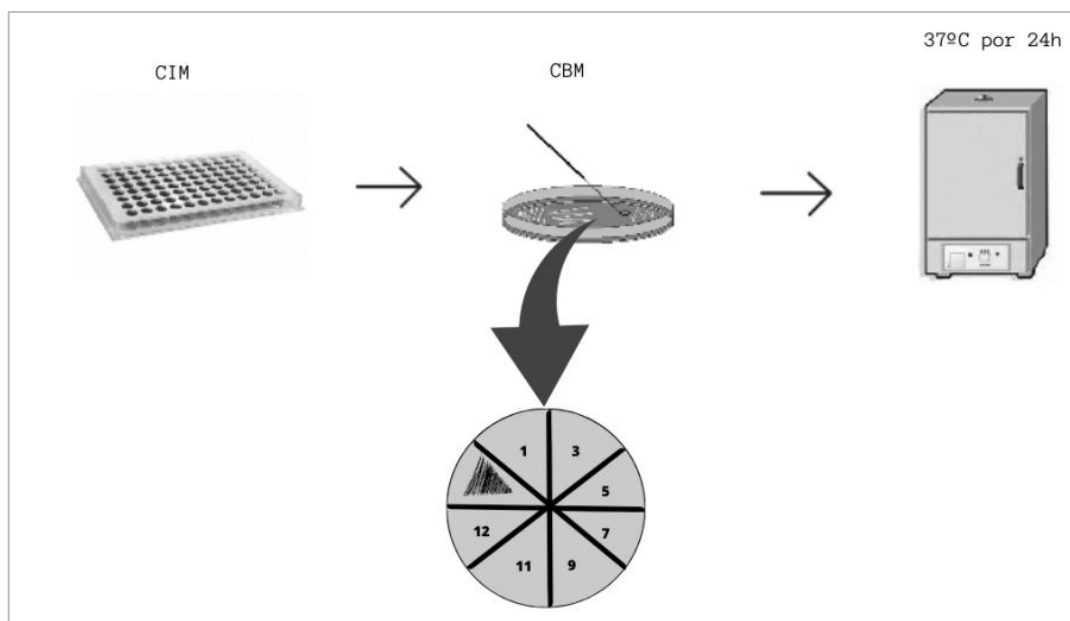


Figura 10. Esquema utilizado no ensaio de determinação de concentração bactericida mínima (Fonte: arquivo pessoal)

4.3. Método Analítico para Análise de Quercetina

Os ensaios microbiológicos demonstraram que a QRC apresentava resultados mais promissores. Portanto, um método analítico utilizando espectrofotometria-UV foi aplicado para os ensaios de determinação do teor e da liberação *in vitro* das formulações. A avaliação da linearidade e seletividade do método analítico foi realizada preliminarmente.

3.3.1. Seletividade

Com o objetivo de assegurar a ausência de interferência dos componentes presentes nas formulações nos meios que seriam utilizados nas análises de teor e liberação *in vitro*, foram obtidos os espectros de varredura da QRC e das formulações placebo em MeOH, bem como em saliva artificial, sendo estes os brancos de sua respectiva análise. O procedimento da análise espectral foi realizada na faixa de 200 a 400 nm.

3.3.2. Linearidade

Uma curva analítica com concentrações na faixa de 5 µg/mL a 50 µg/mL foi preparada utilizando QRC solubilizada em MeOH. Para sua análise foi utilizada a técnica de espectrofotometria UV com leitura em 368 nm, onde utilizou-se MeOH como branco. Os valores de absorbância foram empregados a equação da regressão linear aplicada a lei de Lambert-Beer, como indicado abaixo:

$$y = a \cdot x + b$$

Onde, y é a absorvância medida experimentalmente, a é o coeficiente angular da reta, x é a concentração da substância e b é o coeficiente linear da reta

3.4. Desenvolvimento das Formulações

3.4.1. Hidrogéis

Foram preparados dois hidrogéis, um utilizando como base o polímero CMC-Na e outro à base de QTS, como demonstrado na tabela 7. O preparo de CMC-Na foi baseado nos componentes existentes no filme desenvolvido por PEREIRA (2020), enquanto o gel de QTS foi baseado no trabalho de ALVES *et al.*, (2020).

Tabela 7. Componentes utilizados para o desenvolvimento de hidrogéis à base de carboximetilcelulose-sódica e quitosano contendo quercetina.

Componentes	CMC-Na	QTS	Função Farmacêutica
	Proporção (%)		
CMC-Na de alta viscosidade hidratada com água miliQ pH \approx 7	2	-	Polímero formador de gel
QTS hidratado com ácido acético 1%	-	3	
PPG	20	-	Agente plastificante
DMSO	20	10	Co-solvente
QRC	0,5	0,5	Princípio Ativo
Água MiliQ qsp	5 g	-	Veículo
Ácido Acético 1% qsp	-	5 g	Veículo

CMC-Na: Carboximetilcelulose sódica; PPG: Propilenoglicol; DMSO: Dimetilsulfóxido;

QTS: Quitosano; QRC: Quercetina

A técnica para obtenção do HG está prevista na Farmacopéia Brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012), que refere-se a hidratação do polímero seguida da incorporação do ativo. A técnica foi realizada como demonstrado pelas figuras 11 e 12, respectivamente para o HG de CMC-Na e QTS.

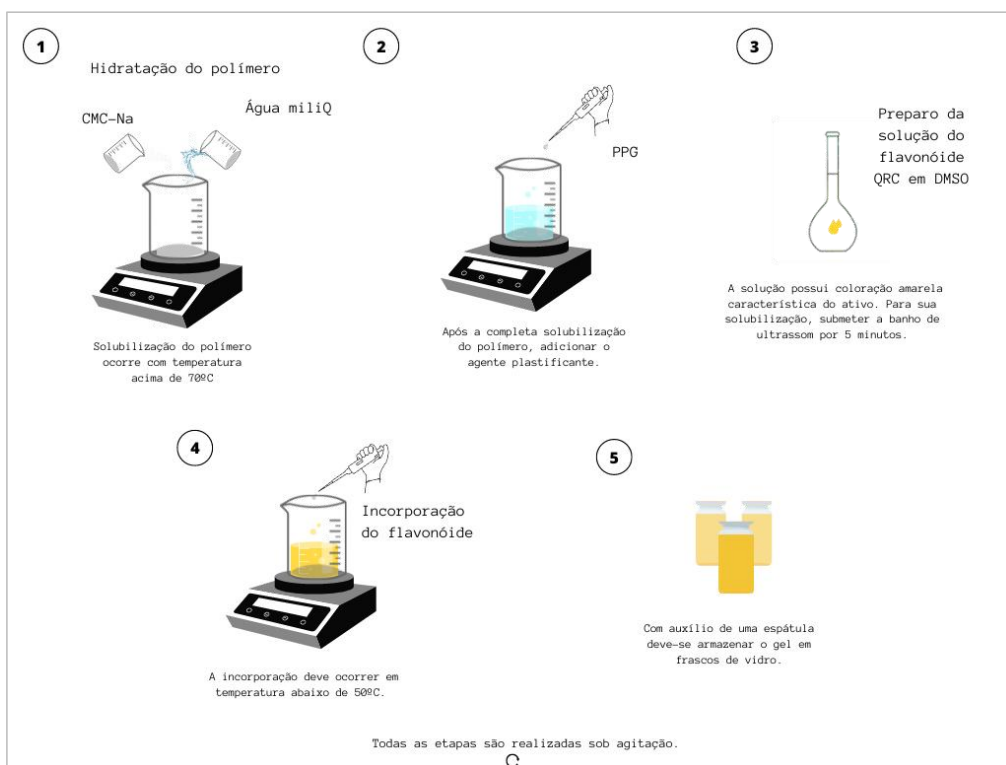


Figura 11. Procedimento adotado para obtenção do hidrogel de carboximetilcelulose sódica contendo quercetina. (Fonte: arquivo pessoal)

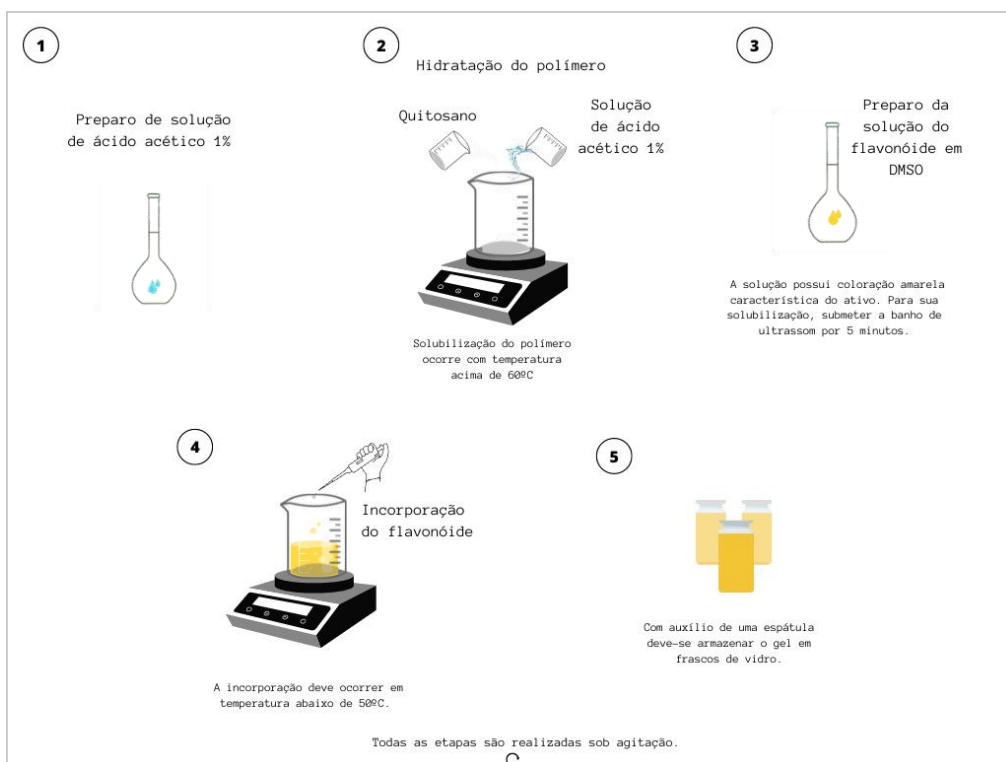


Figura 12. Procedimento utilizado para obtenção do hidrogel de quitosano contendo quercetina. (Fonte: arquivo pessoal)

3.4.2. Filme polimérico a base de carboximetilcelulose sódica

A obtenção do filme polimérico foi baseada da metodologia descrita por PEREIRA (2020), com modificações pautadas em FERREIRA (2010). Buscou-se utilizar a menor concentração efetiva dos componentes, de modo que a função farmacêutica fosse preservada. Foram utilizados polímeros, plastificantes e conservantes em diferentes proporções. A concentração de QRC foi estabelecida com base na relação entre a concentração obtida no ensaio de CIM e a quantidade necessária para garantir sua eficácia durante aplicação bucal (tabela 8).

Tabela 8. Componentes utilizados para o desenvolvimento do filme polimérico à base de carboximetilcelulose sódica contendo quercetina.

Componentes	Proporção (%)				Função Farmacêutica
	F1	F2	F3	F4	
PVA	0,6	0,6	0,6	0,6	Agente reticulante
CMC-Na (90.000 Mw)	4	4	4	4	Polímero formador de filme
Solução de parabenos	5	5	20	20	Solução conservante
PPG	5	5	5	5	Agente plastificante
DMSO	-	10	5	10	Co-solvente
Quercetina	1	1	1	1	Ativo
Água MiliQ qsp		100 mL			Veículo

CMC-Na: Carboximetilcelulose sódica; PPG: Propilenoglicol; DMSO: Dimetilsulfóxido

A técnica para obtenção foi a de *Solvente Casting*, onde os polímeros (CMC-Na e PVA) foram dissolvidos em água com auxílio de calor e agitação magnética, formando deste modo, um hidrogel (HG). Além dos polímeros fundidos adicionou-se excipientes farmacotécnicos, como a solução conservante de parabenos, preparada de acordo com o formulário da farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2012), e o propilenoglicol que exerce função de plastificante (EKPA; ALOZIE; UWAH, 2019). Em seguida foi realizada a etapa de incorporação do flavonoide e co-solvente, o DMSO. O HG formado foi submetido a secagem em placas de vidro (90 mm de diâmetro) cobertas com papel alumínio, em estufa de circulação de ar à 60 °C por 24 horas (Figura 13)

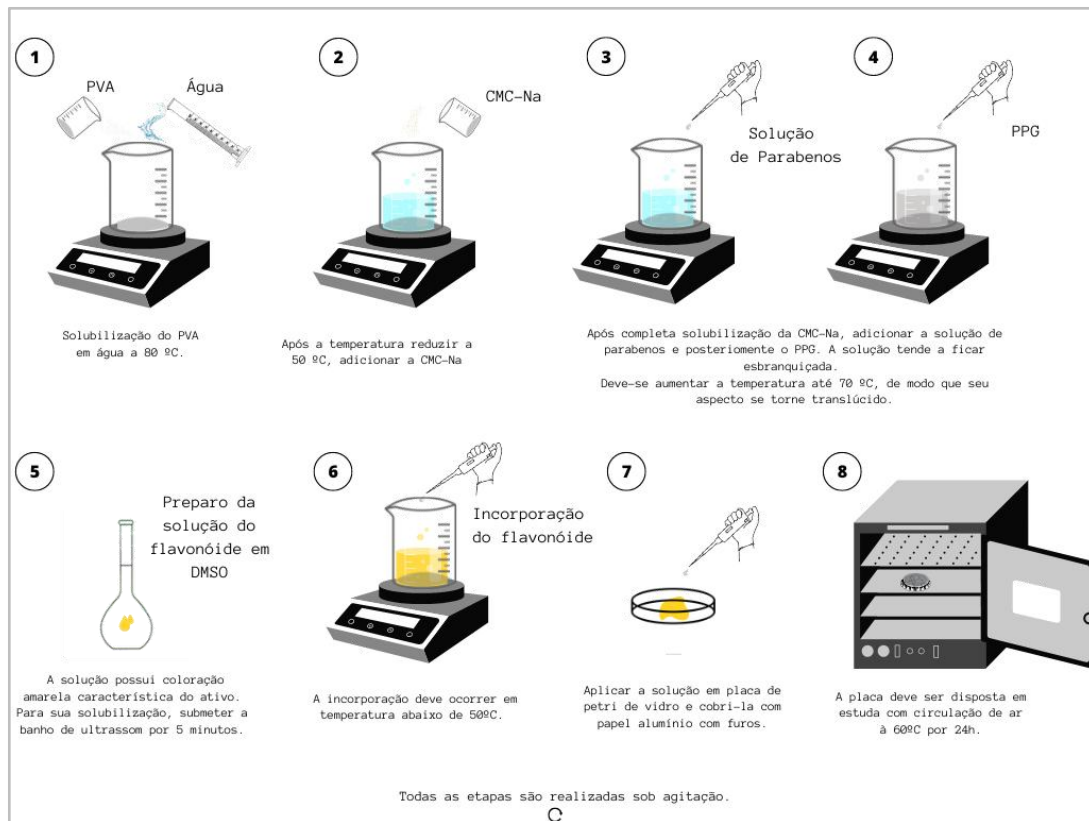


Figura 13. Procedimento utilizado para obtenção de filme polimérico à base de carboximetilcelulose-sódica contendo quercetina. (Fonte: Arquivo pessoal)

3.5. Caracterização das Formulações

Para caracterização das formulações foram necessários ensaios específicos para cada forma de apresentação farmacêutica. Para os hidrogéis (HG), foram realizados os ensaios de aspecto, odor, pH, espalhabilidade e ensaios de estabilidade preliminar de centrifugação, exposição à radiação luminosa, ciclo de aquecimento e congelamento e determinação de teor. Enquanto para o filme foram feitas análises de uniformidade de peso, aspecto, espessura, pH superficial, capacidade de intumescimento, resistência a dobra, ensaio morfológico e estrutural, e determinação de teor.

3.5.1. Hidrogéis de carboximetilcelulose sódica e de quitosano

3.5.1.1. Aspecto

Após seu preparo, a amostra foi analisada comparativamente ao seu placebo. Determinadas características macroscópicas foram classificadas como sinais de instabilidade, sendo elas a presença de separação de fases e de precipitados.

3.5.1.2. Odor

O odor foi analisado comparativamente ao placebo, diretamente através do olfato. Assim, os dois foram comparados e classificados como: sem alteração, levemente alterado, moderadamente alterado, intensamente alterado, para mais ou

para menos.

3.5.1.3. Determinação de pH

O pH da formulação foi medido em triplicata determinado utilizando um eletrodo específico para amostras semi-sólidas. Com o objetivo de monitorar possíveis alterações no pH ao longo do tempo, o ensaio foi conduzido durante um período contínuo de quinze dias. Posteriormente, foram realizadas medições semanais até atingir um mês de avaliação. Após esse período, as medições passaram a ser executadas quinzenalmente por mais um mês. Após completar um total de três meses, uma última medição foi realizada, permitindo a observação abrangente das variações no pH ao longo do período de estudo, conforme delineado por Gioso *et al.*, (2007). Durante todo o tempo de análise, a formulação testada foi mantida em geladeira ($5 \pm 2,2$ °C)

3.5.1.4. Espalhabilidade

Para a realização do teste, cerca de 1g dos HG, placebo e incorporado, foram utilizados para o ensaio. As amostras mantidas previamente em temperatura ambiente, foram dispostas no centro de uma superfície plana de vidro e a cada 3 minutos, foram adicionados pesos de, em média, 250g, 500g, 750g, 1000g, 1250g, 1500g sobre a amostra. O diâmetro de espalhamento foi medido em milímetros, após cada adição de peso. A medição foi realizada em triplicata com auxílio de uma régua, que foi alinhada com a borda externa do gel.

3.5.1.5. Ensaios de estabilidade preliminar

Centrifugação

O teste visou provocar estresse na amostra, promovendo aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como: precipitação, separação de fases e formação de sedimento compacto (AULTON, 2001). Para isto, uma alíquota da 1g da amostra do HG foi colocada em um micro tubo e submetido a rotação, em centrífuga, à 3000 rotação por minuto (rpm) por 30 minutos. Posteriormente, a amostra que não apresentou separação de fases, foi submetida à 3800 rpm por 5 horas.

Exposição à radiação luminosa

Em frasco de vidro transparente e em frasco de vidro âmbar, cerca de 2g de amostra foram submetidas a condições de incidência luminosa constante e direta por quinze dias. Diariamente foi observada a ocorrência de separação de fases e alteração da coloração, que indicariam a instabilidade da formulação frente a esta condição. As alterações foram classificadas como levemente alterada, moderadamente alterada ou intensamente alterada, para mais ou para menos.

Ciclo congelamento e Aquecimento

Amostras dos HG de CMC-Na e de QTS (n=3) foram submetidas a três ciclos de congelamento e três de aquecimento por 24h, totalizando três dias de ensaio. A

exposição a temperaturas extremas, buscou observar a influência que as temperaturas de 45 °C e -20 °C sobre as amostras. Durante este ensaio foi avaliado o aspecto, odor, pH e a espalhabilidade, como demonstrado em 3.5.1.1; 3.5.1.2; 3.5.1.3. e 3.5.1.4. As amostras foram comparadas as características do HG pré-exposto.

3.5.1.6. Determinação de teor de quercetina nos hidrogéis

Para determinação da QRC, utilizou-se o método espectrofotométrico descrito em 3.3. O teor foi avaliado em quatro solventes distintos: saliva artificial pH 8, metanol, metanol: saliva (95:10) e metanol: saliva (75:25). Para tal, cerca de 0,2g dos HG de CMC-Na e QTS contendo 0,5 % de QRC foram pesados. Em seguida, cada amostra (n=3) foi solubilizada em seu respectivo solvente, exposta a agitação intensa em vórtex por 1 minuto e, em seguida, em banho de ultrassom por 30 minutos.

Após completa desintegração da matriz polimérica, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro-UV em 368 nm, e posteriormente, partir da lei de Lambert-Beer, foi possível estabelecer a concentração presente. A seleção do método de recuperação mais adequado baseou-se nas diretrizes estabelecidas na RDC 166 de 2017. De acordo com essa regulamentação, a faixa recomendada para o teor situa-se entre 80% e 120%.

3.5.1.7. Análise Estatística

Foram realizadas análises estatísticas dos resultados provenientes dos ensaios de pH dos HG, como estresse térmico e estabilidade ao longo do tempo, assim como para o ensaio de espalhabilidade. Em ambos os casos, amostras pré-expostas foram avaliadas comparativamente à amostras após exposição. A análise estatística foi realizada através do teste One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey) pelo software Biostat LE® com intervalo de confiança de 95%.

3.5.2. Filme polimérico a base carboximetilcelulose sódica

Os ensaios preliminares de caracterização contaram com a análise visual, a qual buscou-se identificar a presença ou ausência de cristais, a coloração do filme, se há turbidez, além de medir sua espessura com auxílio de um paquímetro.

3.5.2.1. Uniformidade de peso

Os dados do ensaio de uniformidade de peso foram determinados pelo corte do filme em tamanhos iguais de 1cm² para pesagem em balança analítica. Seu objetivo foi determinar a massa presente nas diferentes frações, calculando o desvio padrão entre elas para identificar se haveria padronização do peso, logo, da dose em cada porção (ANROOP *et al.*, 2013). As análises foram feitas em triplicata.

3.5.2.2. Determinação do pH superficial

Para a realização desta análise, o filme em estudo foi imerso em água (pH= 7), sendo mantido nessa condição por um período de 2 horas, à temperatura ambiente, conforme descrito por BOTTENBERG *et al.*(1991). Posteriormente, o pH da solução resultante foi mensurado em triplicata, utilizando um medidor de pH equipado com um eletrodo especialmente projetado para avaliação de líquidos.

3.5.2.3. Capacidade de intumescimento

O intumescimento visou a identificação a absorção de água da formulação. Esse ensaio prevê a capacidade de mucoadesão do filme, além de auxiliar na liberação do fármaco que ocorre essencialmente por dois mecanismos, difusão e erosão (ANROOP *et al.*, 2013). O ensaio foi realizado através da submersão do filme em saliva artificial por 5 minutos.

A composição da saliva artificial foi adaptada de CID (2009). e está apresentada na Tabela 9. Seu preparo envolveu agitação contínua e temperatura constante de 40 °C até que todos os componentes tenham se solubilizado completamente. Seu pH foi corrigido com trietilamina até alcançar pH de valor 8, pH médio da boca do cão de acordo com GIOSO (2007) E PAIVA (2007).

Tabela 9. Constituintes empregados no preparo da saliva artificial.

Constituintes	Proporção (%)
Cmc-Na (90,000 Mw)	0,83
Metil Parabeno	0,100
Manitol	2,500
Fosfato de Sódio Monobásico	0,025
Cloreto de Sódio	0,069
Cloreto de Cálcio	0,012
Cloreto de magnésio	0,004
Cloreto de potássio	0,100
Água destilada - qsp	100 mL

Cmc-Na: Carboximetilcelulose sódica; qsp: quantidade suficiente para

Em seguida, foi calculada a porcentagem de umidade absorvida a partir da variação de peso (ΔP) da formulação em T0 e T5, conforme indicado na equação abaixo:

$$\text{Grau de intumescimento} = \frac{(\Delta P)}{T_0} \times 100\%$$

$$\text{Sendo } \Delta P = P_{T5} - P_{T0}$$

Onde P_{T5} representa a massa da amostra no tempo de 5 minutos, e P_{T0} a massa inicial da amostra antes da absorção de umidade. (RISBUD, 2000). A análise foi realizada em triplicata.

3.5.2.4. Resistência a dobra

A flexibilidade dos adesivos bucais é uma característica física que facilita a sua aplicação na cavidade oral. O ensaio para avaliá-la é realizada quantitativamente. Foram realizadas repetidas dobragens do filme (n=3) em um ângulo de 180°, no mesmo plano, até que ocorreu a sua quebra ou até que seja dobrado 300 vezes sem quebrar. O valor obtido a partir do número de dobragens sem quebra é utilizado para determinar sua resistência à dobra (NAFEE *et al.*, 2003).

3.5.2.5. Análise morfológica

A metodologia utilizada para a avaliação da morfologia das amostras consistiu na utilização do microscópio eletrônico de varredura modelo Tm3030Plus Hitachi. O equipamento foi operado sob alto vácuo a uma tensão de aceleração de 15kV.

Uma amostra do filme polimérico incorporado com QRC e de seu placebo foram previamente revestidas com prata para melhorar a condutividade elétrica e a qualidade das imagens obtidas. Esse revestimento foi realizado utilizando o equipamento SCD 005 Sputter BAL-TEC, localizado no CETEM/UFRJ.

3.5.2.6. Análise estrutural

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica experimental de extrema importância na caracterização de polímeros, permitindo a identificação precisa de suas estruturas moleculares e dos grupos funcionais presentes em suas composições. Neste estudo específico, foram examinados os espectros de filmes poliméricos que continham o composto de interesse, QRC, em comparação com os espectros do placebo. Essas análises foram conduzidas na faixa de frequência de 400 a 4000 cm⁻¹, em temperatura ambiente e com uma resolução de 300x, empregando o modo de Reflectância Total Atenuada (ATR). O equipamento utilizado para a realização dessas análises foi o VERTEX 70, localizado no Laboratório de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.5.2.7. Determinação de teor de quercetina no filme polimérico a base de carboximetil celulose sódica

O teor de QRC no FP foi avaliado em quatro solventes distintos: saliva artificial pH 8, MeOH, MeOH: saliva (95:10) e MeOH: saliva (75:25).

Para isto, cortou-se 1cm² de um FP de CMC-Na contendo 1% de QRC. Cada amostra foi solubilizada em seu respectivo solvente e exposta a agitação intensa em vórtex por 1 minuto. Em seguida, a solução foi submetida a banho-maria com água aquecida à 40°C por 10 minutos. E posteriormente em banho de ultrassom por 30 minutos.

Após completa desintegração da matriz polimérica, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro-UV em 368 nm e as concentrações foram calculadas com base na lei de Lambert-Beer. A seleção do método de recuperação mais adequado baseou-se nas diretrizes estabelecidas na RDC 166 de 2017, a faixa recomendada para o teor de recuperação situa-se entre 80% e 120%.

3.6. Ensaio de Liberação *in vitro*

3.6.1. Ensaio de solubilidade

Pela QRC apresentar comportamento praticamente hidrofóbico, sua solubilidade foi avaliada em meios com e sem tensoativo. O estudo de solubilidade foi realizado seguindo os parâmetros recomendados pela Nota Técnica 003/2013 da ANVISA.

A metodologia de shake-flask, que tem como objetivo determinar a solubilidade do fármaco no meio de dissolução. Esta determinação seleciona o meio de dissolução ideal para os ensaios de liberação *in vitro*, a fim de garantir a condição *sink*, ou seja, que o volume de meio utilizado seja três vezes maior do que o necessário para que se obtenha uma solução saturada do ingrediente ativo.

A solubilidade da QRC foi investigada em saliva artificial com pH 8,00, de modo que mimetizasse o pH da cavidade bucal de cães. O ensaio foi realizado em duas condições: na ausência e na presença de diferentes concentrações (1,0%, 2,5% e 5,0%) de dodecil sulfato de sódio. Para condução do experimento, cerca de 30mg de flavonóide foram dispostos em erlenmeyers contendo 100 mL de meio. As vidrarias foram vedadas com tampa e uma camada de papel alumínio foi aplicada em sua superfície. O objetivo foi reduzir a evaporação e evitar a exposição direta à luz, garantindo a preservação do volume original do meio e a integridade do analito. A análise foi realizada em triplicata em espectrofotômetro UV a 368 nm, e utilizou-se como branco o meio respectivo de cada amostra.

3.6.2. Liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas

Para a condução do ensaio utilizando os HG de CMC-Na e QTS, uma quantidade correspondente a 0,5 g foi utilizada. No contexto do teste envolvendo o FP, utilizou-se uma porção com área total de 1,0 cm².

As formulações (n=3) foram dispostas em um Erlenmeyer contendo 125 mL da solução receptora (125 mL de saliva artificial com um pH ajustado para 8 contendo 5 % de dodecilsulfato de sódio (SDS) para garantir a condição *sink*, conforme preconizado por GIOSO *et al.*(2007) e PAIVA *et al.* (2007).

As vidrarias contendo as amostras foram vedadas com tampa e sua superfície coberta com papel alumínio. Essas medidas foram adotadas para minimizar a evaporação e prevenir a exposição direta à luz, preservando tanto o volume inicial da saliva quanto a integridade do analito.

Subsequentemente, os frascos foram submetidos a uma agitação constante com velocidade de 120 rpm, como delineado anteriormente por FERREIRA (2018), e mantidas sob temperatura controlada de 38,3 °C, em conformidade com as diretrizes estabelecidas por SMALL ANIMAL CLINICAL TECHNIQUES. Essas condições experimentais foram mantidas por meio de uma incubadora do tipo shaker.

Durante o experimento, alíquotas de 5 mL das amostras foram coletadas em intervalos de tempo predefinidos: 5, 10, 15, 30 e 45 min, e 1, 2, 4, 6, 10 e 24 horas. A cada coleta, houve a reposição do mesmo volume de meio. A quantificação das amostras foi executada em triplicata, tendo como branco a solução receptora, onde utilizou-se um espectrofotômetro-UV com comprimento de onda a 368 nm.

A quantidade de QRC liberada nos diferentes tempos foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$Q_{\text{real}} = (C_{\text{mensurada}, t} \times V_r) + V_a \times \sum_{n=1}^{n-1} C_a$$

Onde:

Q = quantidade permeada acumulada;

Q_{real} = o valor real no tempo t;

C_{mensurada t} = concentração mensurada da coleta no tempo t,

V_r = volume da solução receptora,

C_a = concentração da amostra removida,

V_a = volume da amostra removida.

A quantidade de QRC liberada foi expressa em porcentagem (% ±DP) dos x experimentos (n=3) para cada grupo e os resultados foram plotados em função do tempo (minutos).

3.6.3. Cinética de liberação

Foi realizada a determinação da cinética de liberação através da análise de regressão linear dos dados de liberação para três modelos diferentes:

- Modelo de Ordem Zero: A quantidade liberada (em µg/mL) foi plotada em função do tempo (em minutos) (em µg/mL)
- Modelo de Higuchi (Pseudo primeira ordem): A quantidade liberada foi plotada (em µg/mL) em função da raiz quadrada do tempo (em minutos)
- Modelo de Primeira Ordem: O logaritmo da quantidade liberada (em µg/mL) foi plotado em função do tempo (em minutos).

Para cada modelo, foi obtido o coeficiente linear (r) da reta de regressão, representando a correlação entre as variáveis e indicando a o quão bem os dados se ajustam ao modelo.

A cinética de liberação foi determinada escolhendo o modelo que apresentou o maior valor do coeficiente de correlação linear (R²), o que indica que esse modelo melhor se ajusta aos dados experimentais. O fluxo de liberação (µg/min) (J) foi calculado em triplicata (n=3) e expresso como a média ± desvio padrão para aumentar a precisão dos resultados. Esse valor representa a taxa de liberação da substância ao longo do tempo. O modelo que apresentou valor de correlação linear mais próximo de 1 foi escolhido como o modelo cinético dominante do estudo, ou seja, aquele que melhor descreveu o processo de liberação para cada formulação testada. O valor de fluxo corresponde à inclinação (a) da equação de regressão linear obtida para cada modelo cinético aplicado.

3.7. Tempo de Residência *ex vivo*

Para determinar a aderência das formulações desenvolvidas, a técnica utilizada foi a de tempo de residência. O método é caracterizado pela medição do tempo que a formulação se mantém aderida a uma superfície de vidro ao invés de medir a força necessária para conduzir seu desprendimento (ANROOP *et al.*, 2013). Para a execução do teste, uma modificação da metodologia foi realizada, sendo esta, a

utilização da mucosa bucal canina (ABRUZZO *et al.*, 2020).

3.7.1. Dessecação da mucosa

Iniciou-se a lavagem da bochecha canina com solução fisiológica 0,9%, em seguida foi realizada a separação de camadas teciduais com auxílio de tesouras, pinças e bisturis (Figura 14). Após a retirada dos tecidos musculares adjacentes, o material foi novamente lavado com solução fisiológica 0,9% e armazenado em freezer a -20 °C até o momento da realização do ensaio propriamente dito.

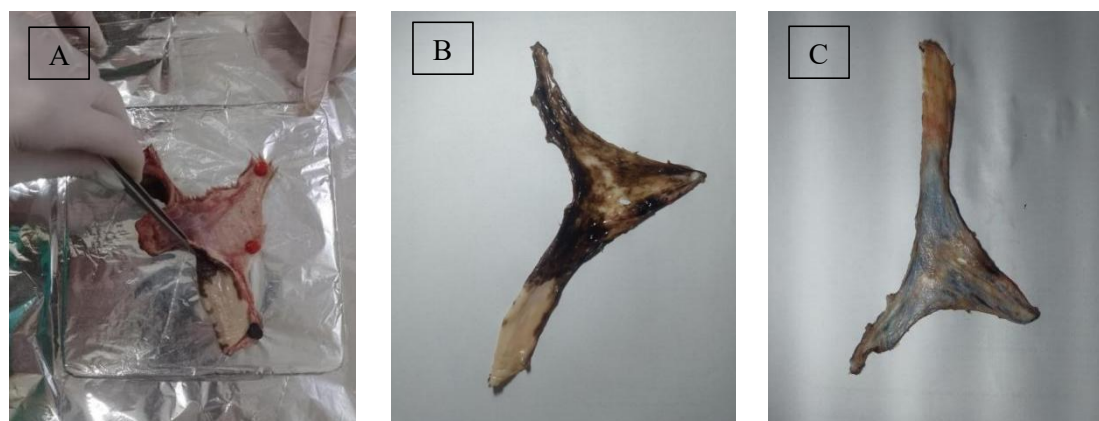


Figura 14. Mucosa bucal canina utilizada para o ensaio *ex vivo* de tempo de residência. (A) Bochecha retirada do cão para a dessecação da mucosa. (B) Mucosa dessecada - parte externa. (C) Mucosa dessecada - parte interna.

3.7.2. Preparo do aparato para teste

Recortou-se uma folha de acetato de vinila (EVA) no tamanho de 4,0cm x 2,5cm, e nele a mucosa foi costurada usando fio de nylon 2,0. A passagem da agulha e do fio foi realizada no sentido do EVA para a mucosa, criando uma sutura firme para segurar a amostra no lugar. Em seguida, o EVA com a mucosa costurada foi colado na lateral do béquer com cola da marca Tekbond.

3.7.3. Execução do ensaio

Após a montagem do aparato, a mucosa bucal foi previamente umedecida com saliva artificial e as formulações (n=3) contendo QRC foram afixadas sobre ela. No caso do filme polimérico, uma área de 2,25 cm² foi empregada, enquanto os HG, aproximadamente 0,2 g de material foi distribuído sobre a mucosa.

Subsequentemente, a porção interna do béquer, composta pelo conjunto EVA, mucosa e gel, foi imersa em 100 mL de saliva artificial, recriando assim as condições do ambiente bucal (Figura 15). O procedimento foi conduzido por um período de 24 horas, mantendo uma temperatura de 38,3 °C e uma taxa de agitação de 120 rpm, com a finalidade de simular as condições fisiológicas do cão.

O intervalo de tempo durante o qual as formulações permaneceram aderidas à mucosa foi registrado a partir do início da agitação até o ponto em que quaisquer indícios de desprendimento, deslocamento ou desintegração das formulações fossem observados. O ensaio foi repetido em duas ocasiões e os resultados foram obtidos em triplicata.

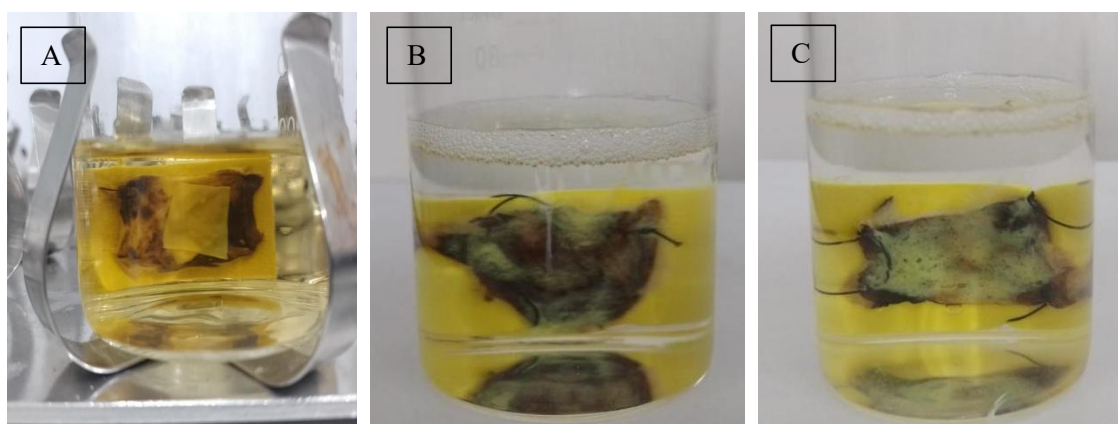


Figura 15. Formulações contendo quercetina aderidas ao aparato para início do ensaio de tempo de residência. (A) Filme polimérico (B) Hidrogel à base de carboximetilcelulose (C) Hidrogel à base de quitosano.

3.8. Atividade Antimicrobiana das Formulações

O objetivo do experimento foi avaliar qualitativamente a eficácia das formulações, de modo que a segurança e efetividade das formulações desenvolvidas fossem garantidas. Para isto, foram realizados ensaios microdiluição em caldo e de semeadura em placa, para determinar as atividades inibitória e bactericida das formulações frente às bactérias-alvo descritas no tópico 3.1.3. Os ensaios utilizados foram uma adaptação do método descrito por Ahuja, (2003).

3.8.1. Atividade inibitória

Para avaliação da capacidade inibitória das formulações foi utilizada a metodologia de macrodiluição em caldo. Quanto ao seu desenvolvimento, foi necessário a utilização de um tubo contendo 5 mL de uma solução de 500 μ L de inóculo bacteriano e 4,5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI), onde posteriormente adicionou-se a formulação. Além desta, foram preparados controles positivos e negativos, contendo meio BHI e Imipenem, e BHI associado ao inóculo bacteriano, respectivamente (Figura 16). As soluções foram incubadas a 37 ° C por 24 h. Para as formulações foram utilizados cerca de 0,2g dos HG e 1cm² do filme. Posteriormente, o crescimento bacteriano foi analisado visualmente através da turbidez.

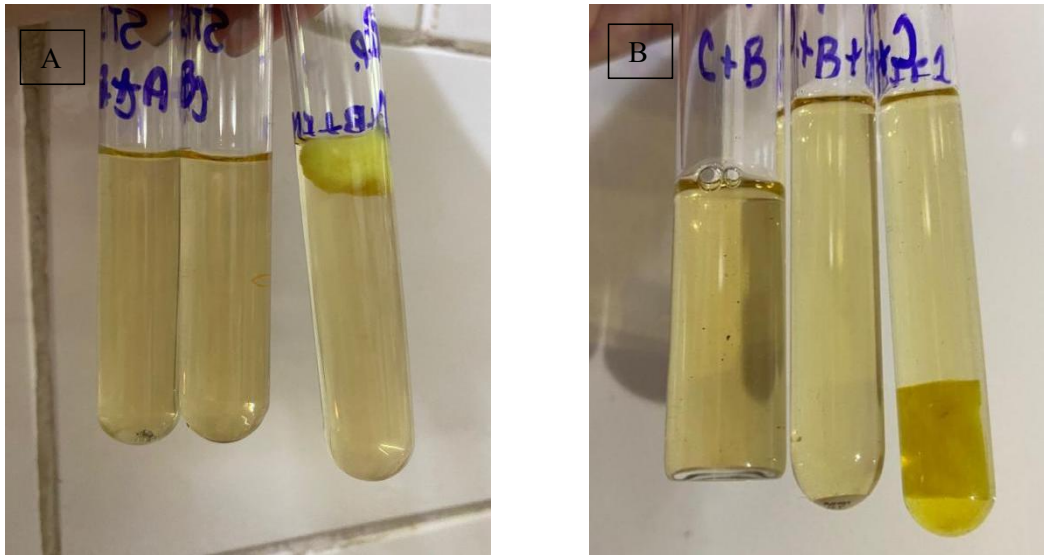


Figura 16. Tubos controle e com a formulação expostos ao ensaio de efetividade antimicrobiana. (A) Hidrogel (B) Filme polimérico.

3.8.2. Atividade bactericida

Para avaliação do efeito bactericida das formulações, foi realizada uma avaliação do crescimento bacteriano através do método de semeadura em placa. Para isto, foram realizados esfregaços em placas de petri de vidro contendo meio de cultura BHI, a partir das soluções dos tubos descritos em 3.8.1. As placas foram identificadas de acordo com o esquema da figura 17, e posteriormente incubadas em estufa por 24h à 37° C, permitindo a observação do crescimento bacteriano através da formação de colônias visíveis.

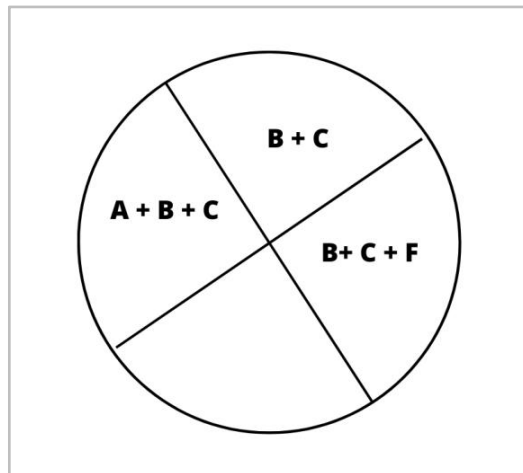


Figura 17. Esquema utilizado para análise da efetividade bactericida da formulação no ensaio de semeadura em placa. (A: Antibiótico, B: Bactéria, C: Caldo, F: Formulação.)

5. RESULTADOS

4.1. Ensaios de avaliação antimicrobiana

4.2.1. Ensaio de difusão em disco

Os resultados do screening microbiológico, demonstram que os solventes testados não inibiam o crescimento bacteriano (Figura 18). Sendo assim, o DMSO foi escolhido para solubilização dos flavonóides nos ensaios seguintes. O DMSO já foi citado em outros trabalhos e possui, em média, solubilidade 220 mg/mL para QRC e 50 mg/mL para RTN (LI *et al.*, 2019; PARK *et al.*, 2019), o que nos permitiria a utilização de soluções mais concentradas, caso fosse necessário.

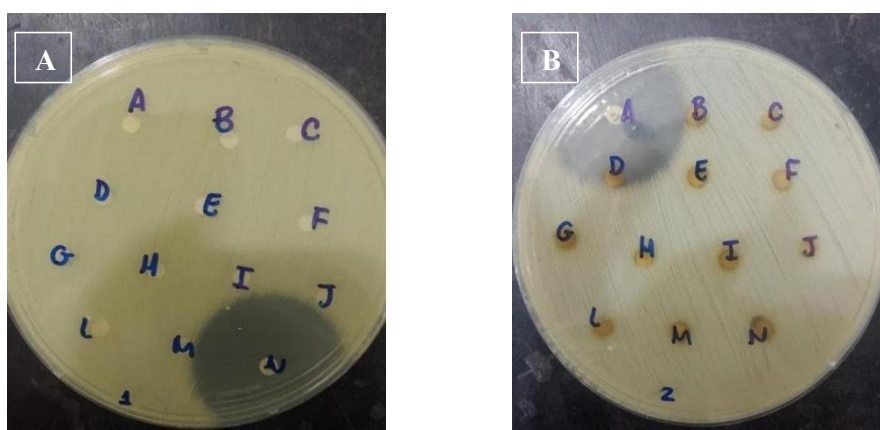


Figura 18. Teste de difusão em disco solubilizado com diferentes diluentes. (A) discos impregnados com QRC (B) discos impregnados com RTN.

O ensaio de difusão em disco não demonstrou nenhuma inibição do crescimento das cepas, nos fazendo seguir para o ensaio de CIM para confirmação ou contestação deste resultado.

4.2.2. Ensaios para determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas

Os resultados do ensaio de CIM indicaram a ausência de turbidez a partir da concentração mais baixa de QRC e RTN para todas as cepas avaliadas. Adicionalmente, por meio da utilização de espectroscopia-UV, foi possível notar uma semelhança na absorvidade entre os poços de teste e os poços de controle (brancos), o que confirmou a inexistência de crescimento bacteriano (Figura 19).

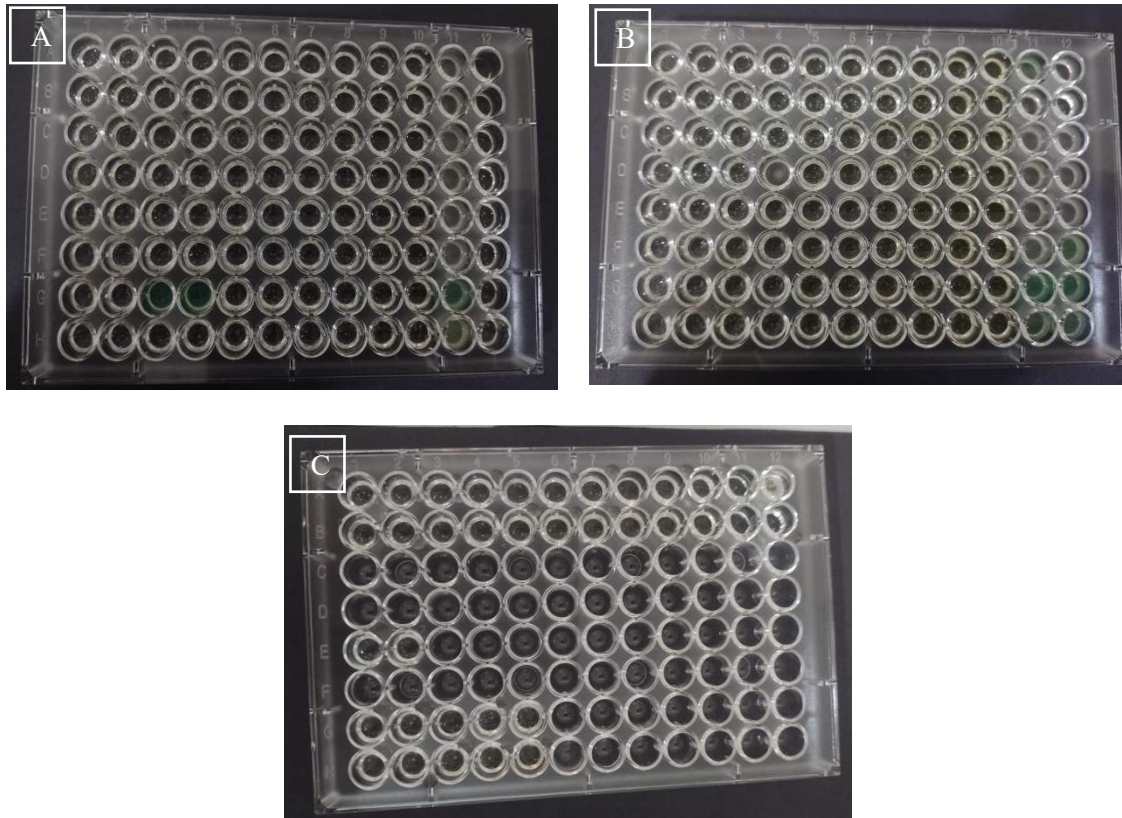


Figura 19. Placas do ensaio de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima. **(A)** Teste realizado com quercetina nas concentrações na faixa de 5 a 30 $\mu\text{g/mL}$. **(B)** Teste realizado com rutina nas concentrações na faixa de 12,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. **(C)** Teste realizado em anaerobiose com quercetina e rutina nas concentrações na faixa de 5 a 30 $\mu\text{g/mL}$ e 12,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A CIM se revelou uniforme para todas as cepas examinadas, atingindo valores de até 5 $\mu\text{g/mL}$ para a QRC e até 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para a RTN. Enquanto no ensaio de CBM, observa-se diferenças significativas quanto a concentração bacteriostática destes flavonoides para as diferentes cepas. Tabela10, Figuras 20 e 21.

No que diz respeito aos resultados das CBM para QRC, todas as cepas indicaram que uma concentração superior a 187,5 $\mu\text{g/mL}$ seria necessária para alcançar um efeito bactericida, com exceção das cepas sensíveis de *E. coli* e *S. aureus*, para as quais os valores foram de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já em relação à RTN, os valores de CBM excederam 500 $\mu\text{g/mL}$ para todas as variantes, exceto para as cepas sensíveis de *E. coli* e *S. aureus*, onde as concentrações foram de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabela 10. Concentração inibitória mínima e concentração bacteriostática mínima de quercetina e rutina obtidas através dos ensaios de microdiluição em caldo e semeadura em placa, respectivamente.

Código	Cepa	QRC		RTN	
		CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
25922	<i>E.coli sensível</i>	≤ 5	≤ 5	≤ 12,5	≤ 12,5
CMY	<i>E. coli resistente</i>	≤ 5	> 187,5	≤ 12,5	> 500
25923	<i>S. aureus sensível</i>	≤ 5	30	≤ 12,5	50
43300	<i>S. aureus resistente</i>	≤ 5	> 187,5	≤ 12,5	> 500
SP8	<i>S. Pseudointermedius sensível</i>	≤ 5	> 187,5	≤ 12,5	100
SP2	<i>S. Pseudointermedius resistente</i>	≤ 5	> 187,5	≤ 12,5	> 500
200	<i>Pseudomonas sensível</i>	≤ 5	> 187,5	≤ 12,5	> 500
111	<i>Pseudomonas resistente</i>	≤ 5	> 187,5	≤ 12,5	> 500
	<i>Streptococcus</i>	≤ 5	> 187,5	≤ 12,5	> 500

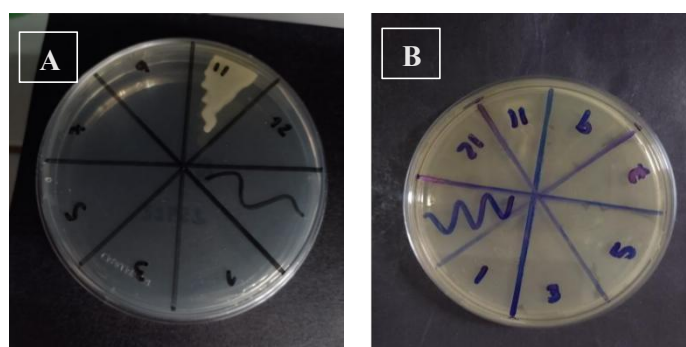


Figura 20. Ensaio de semeadura em placa para obtenção da concentração inibitória mínima de quercetina frente as diferentes cepas. **(A)** *E. coli* sensível nas concentrações de 5 a 30 µg/mL; **(B)** *S. aureus* sensível nas concentrações de 5 a 30 µg/mL.

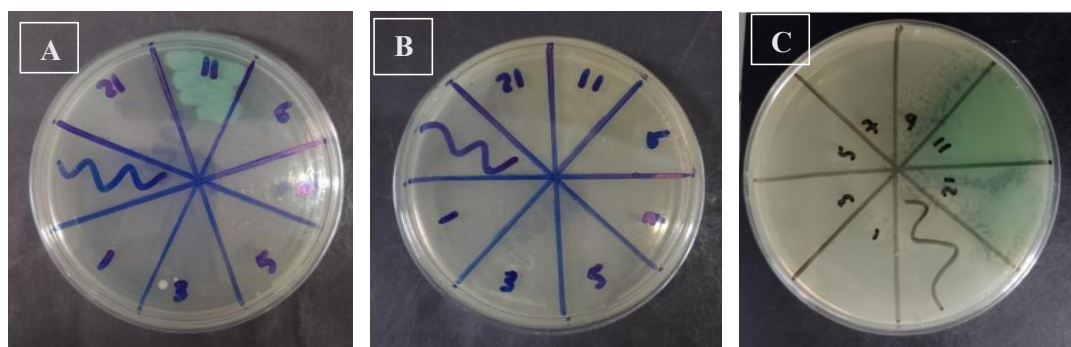


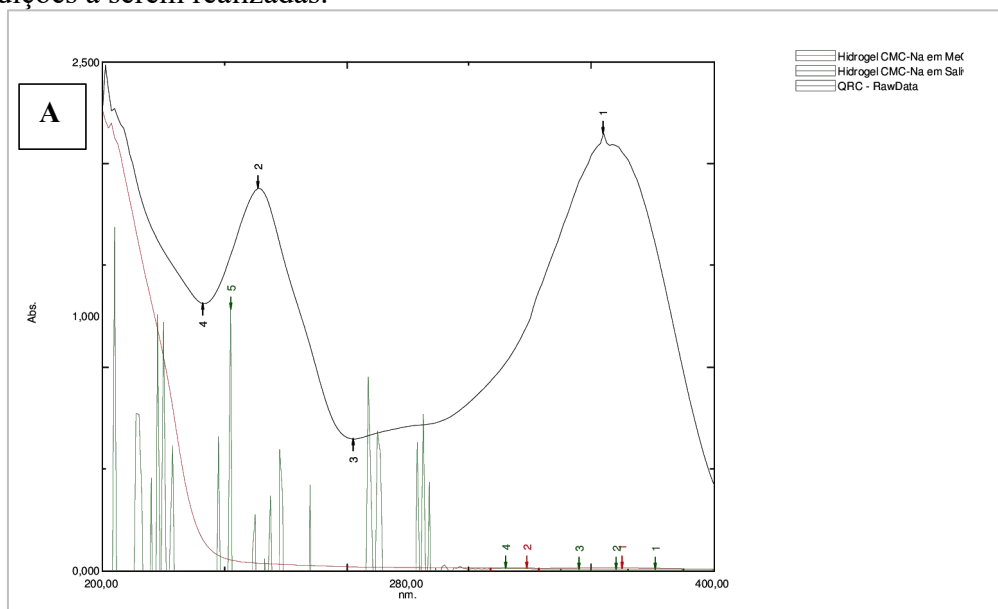
Figura 21. Ensaio de semeadura em placa para obtenção da concentração inibitória mínima de rutina frente as diferentes cepas. **(A)** *E. coli* sensível nas concentrações de 12,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$; **(B)** *S. aureus* sensível nas concentrações de 12,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$; **(C)** *S. pseudintermedius* sensível nas concentrações de 500 a 5000 $\mu\text{g/mL}$;

4.3. Método Analítico para Análise de Quercetina

4.2.1. Seletividade

A avaliação da análise espectral por espectrofotômetro-UV, revelou a presença de interferências na região próxima a 256 nm, onde ocorre o primeiro pico de absorção de QRC. No entanto, não foram observadas interferências nem sobreposições entre a QRC e os placebos quando solubilizados em saliva e metanol à 368nm, que corresponde ao pico máximo de absorção da molécula. Dessa forma, o menor λ foi descartado para os procedimentos subsequentes. (Figura 22).

Esses resultados evidenciam de forma inequívoca a ausência de interações ou influências entre o ingrediente ativo e os meios que serão utilizados nos ensaios para determinação de teor e o ensaio de liberação *in vitro*, garantindo a confiabilidade das medições a serem realizadas.



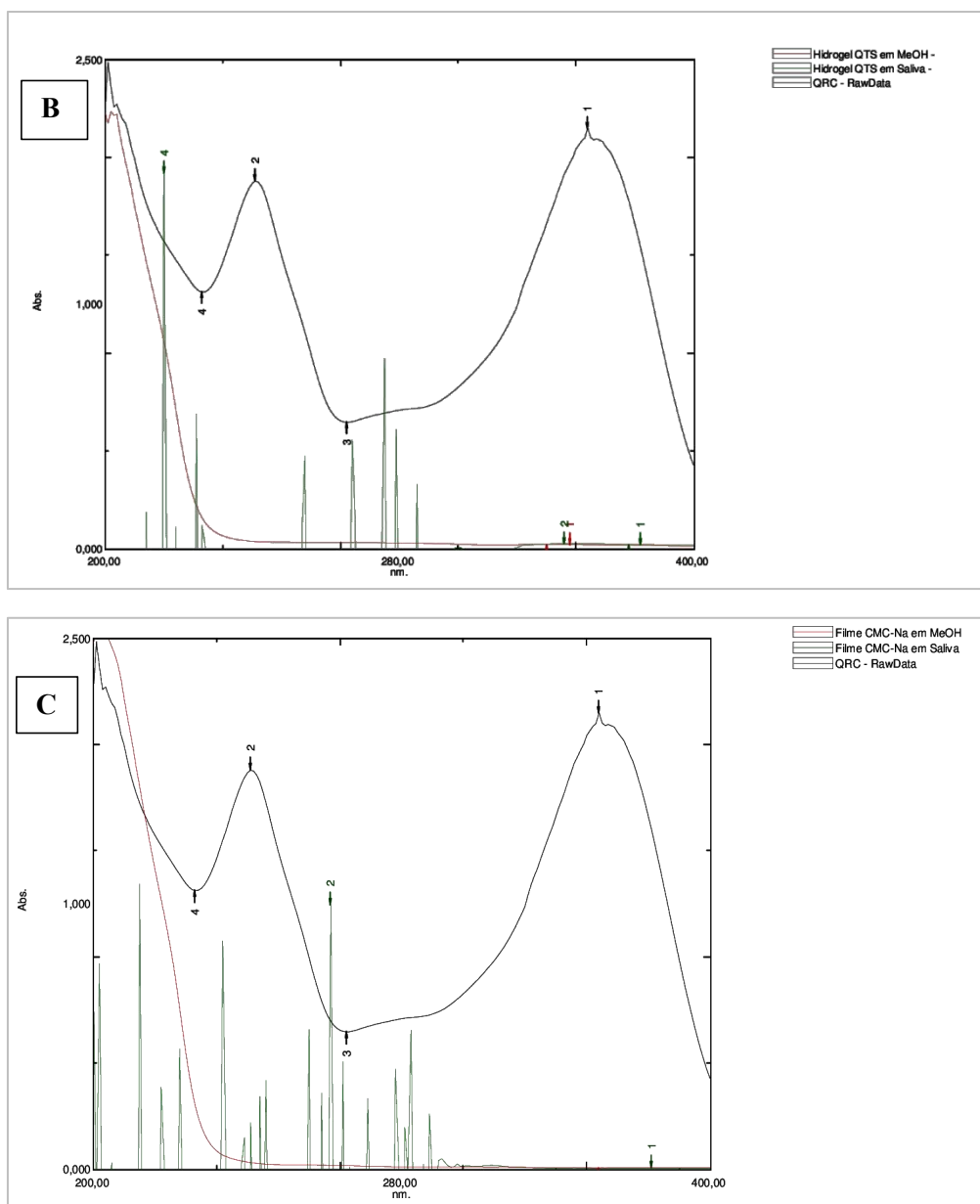


Figura 22. Espectro de varredura por UV comparativo entre quercetina e os placebos das formulações em saliva artificial e em metanol. **(A)** Hidrogel de CMC-Na **(B)** Hidrogel de QTS **(C)** Filme polimérico

4.2.2. Linearidade

A curva padrão da QRC demonstrada na figura 23, mostrou resultados que estão de acordo com as especificações estabelecidas na RDC 166 de 2017. A resolução define os critérios e parâmetros que devem ser considerados durante a validação de métodos analíticos, com o objetivo de garantir a qualidade, a segurança e a eficácia de medicamentos.

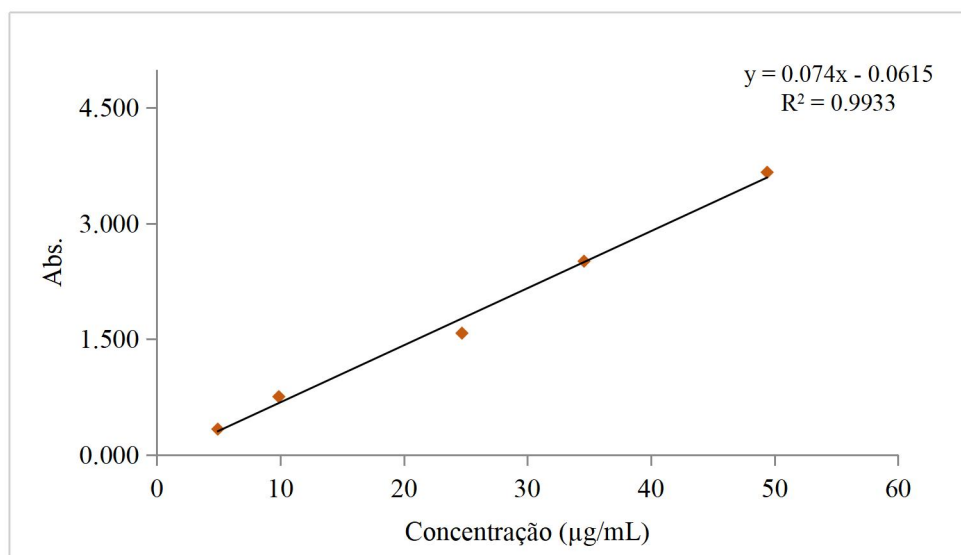


Figura 23. Curva padrão de quercetina.

O coeficiente de determinação linear (R^2) está próximo 1.0, indicando um ajuste dos dados à curva. Essa precisão do ajuste é um indicativo de que a equação escolhida é capaz de descrever adequadamente a relação entre a concentração do analito e a resposta analítica. Isto demonstra que a curva padrão possui linearidade preditiva satisfatória, podendo ser utilizada nos ensaios de determinação de teor e liberação *in vitro*.

4.3. Caracterização Físico-Química das Formulações Obtidas

4.3.1. Hidrogéis

Foram obtidas duas formulações utilizando a metodologia descrita em 3.4.1. Um HG à base de CMC-Na e outro à base de QTS. Após o preparo, os HG apresentaram resultados satisfatórios em relação ao aspecto visual, uma vez que não apresentaram separação de fases ou precipitados. Os HG contendo QRC apresentaram coloração amarela característica do flavonóide, enquanto os placebos se mostraram translúcidos, sendo observado aspecto mais turvo no HG de CMC-Na quando comparado ao de QTS (Figura 24).

O odor dos HG de CMC-Na se assemelhavam com plástico, enquanto do HG de QTS, era característico de ácido acético. E foi observado redução do pH das formulações após a incorporação da QRC, como demonstra a tabela 11.

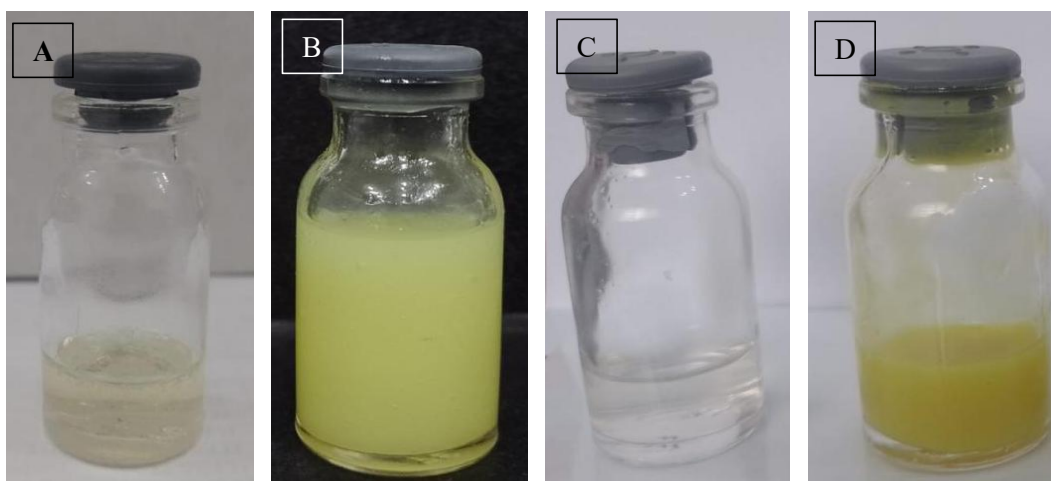


Figura 24. Hidrogéis obtidos. **(A)** Placebo do hidrogel de carboximetilcelulose sódica. **(B)** Hidrogel de carboximetilcelulose sódica incorporado com quercetina. **(C)** Placebo do hidrogel de quitosano. **(D)** Hidrogel de quitosano incorporado com quercetina.

Tabela 11. Características observadas nos hidrogéis à base de carboximetilcelulose sódica e à base de quitosano após o preparo.

Amostra	Aspecto visual	Odor	pH
Hidrogel Placebo CMC-Na	Translúcido, levemente turvo	Odor plástico	7,4 ± 0,19
Hidrogel CMC-Na + QRC	Amarelo turvo (claro)	Odor moderadamente alterado, menos intenso que o placebo	6,7 ± 0,33
Hidrogel Placebo QTS	Translúcido	Odor leve de ácido acético	6,4 ± 0,22
Hidrogel QTS + QRC	Amarelo turvo (intenso)	Odor mais intenso do que o placebo	5,7 ± 0,18

CMC-Na: carboximetilcelulose sódica; QRC: quercetina, QTS: quitosano.

4.3.1.1. pH

Após a formulação dos HG, monitorou-se seu pH por um período de 3 meses, em intervalos distintos. Ao analisar os resultados, através da análise estatística, observa-se que os valores de pH dos dois HG's possuem diferença significativa (*p < 0,05) quando comparado ao valor de pH após o preparo, em dias variados. Entretanto, observou-se que o HG à base de CMC-Na manteve-se na faixa de pH de 6,71 (± 0,33) a 6,99 (± 0,03), ao longo de todo o período de análise, indicando estar dentro da faixa segura. Por outro lado, o HG de QTS apresentou uma variação de pH de 5,75 (± 0,18) a 4,24 (± 0,035), estando abaixo da faixa de segurança. A figura 25 ilustra a influência do tempo sobre o pH das formulações.

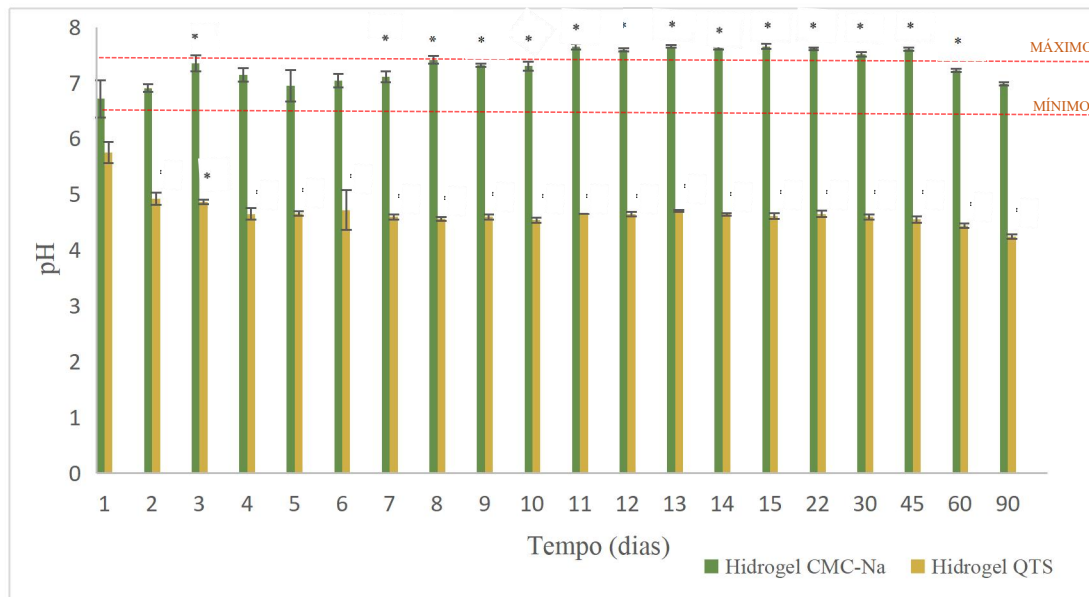


Figura 25. Representação gráfica da influência do tempo sobre o pH dos HG à base de carboximetilcelulose e quitosano incorporados com quercetina. (* $p < 0,05$).

4.3.1.2. Espalhabilidade

O ensaio de espalhabilidade é uma técnica utilizada para medir a capacidade de um produto se espalhar de maneira uniforme em uma superfície. Essa análise envolveu o uso progressivo de pesos, o que nos permitiu avaliar como a adição do ativo influenciava a capacidade de espalhamento em comparação com seu placebo (Figuras 26 e 27). Além disso, essa abordagem permitiu fazer uma comparação direta entre HG de matriz polimérica distintas, porém incorporados com QRC (Figura 28).

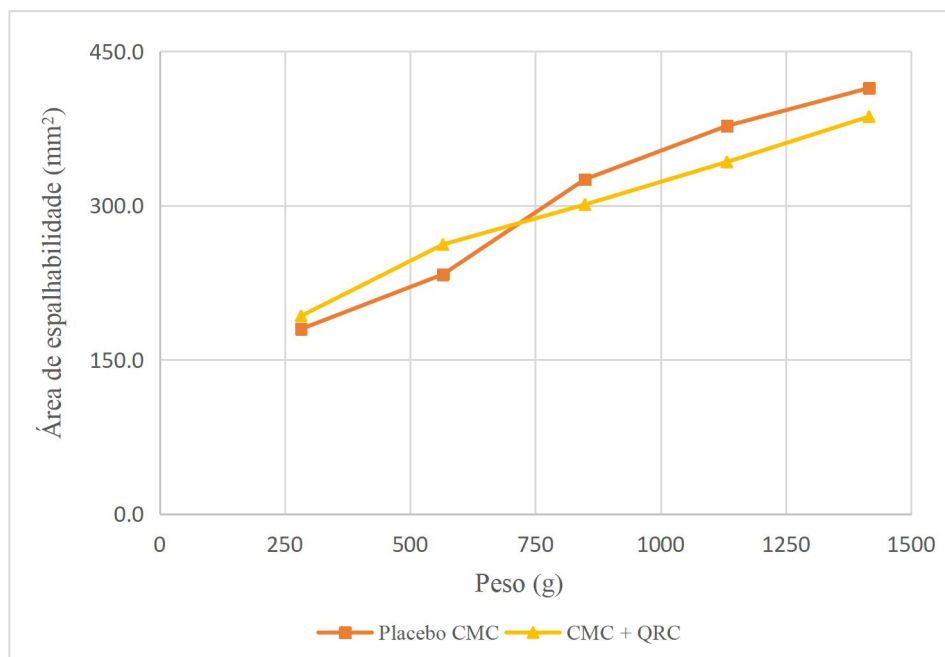


Figura 26. Perfil de espalhabilidade comparativo entre o placebo do hidrogel de carboximetil celulose sódica e o hidrogel incorporado com quercetina.

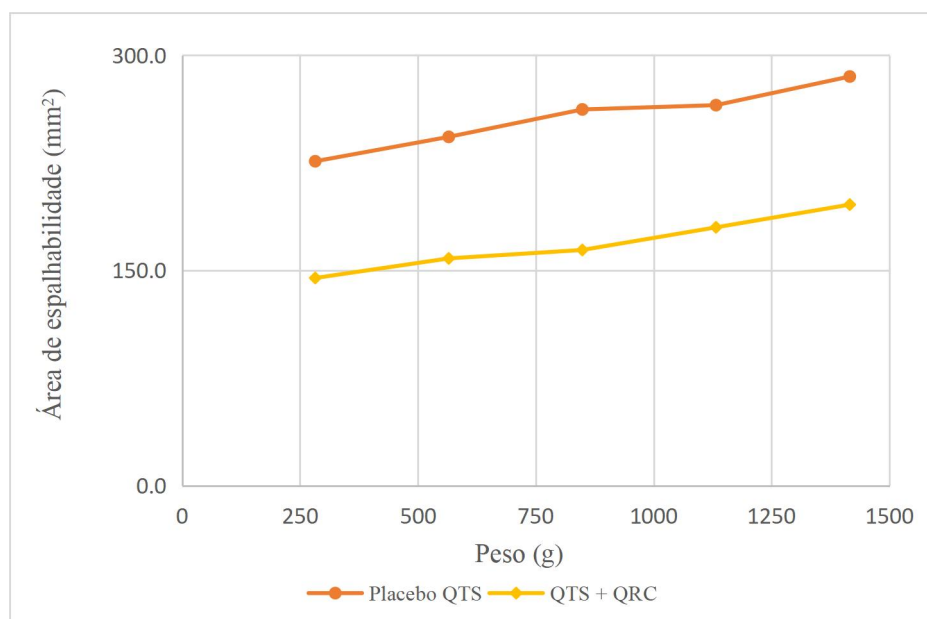


Figura 27. Perfil de espalhabilidade comparativo entre o placebo do hidrogel de quitosano e o hidrogel incorporado com quercetina

Através dos gráficos apresentados, é visível que a inclusão de QRC na formulação, seja ela à base de CMC-Na ou QTS, resulta em uma redução na capacidade de espalhamento. No entanto, uma distinção notável é observada nos HG de CMC-Na: tanto o placebo quanto a formulação incorporada começam com a mesma extensão de espalhamento. Contudo, à medida que uma pressão é aplicada, o HG placebo demonstra um aumento maior na área de espalhamento em comparação com o HG que contém a incorporação de QRC.

Em relação aos HG de QTS, é evidente que, desde o início da análise, o placebo exibe uma área de espalhamento maior do que o HG incorporado com QRC.

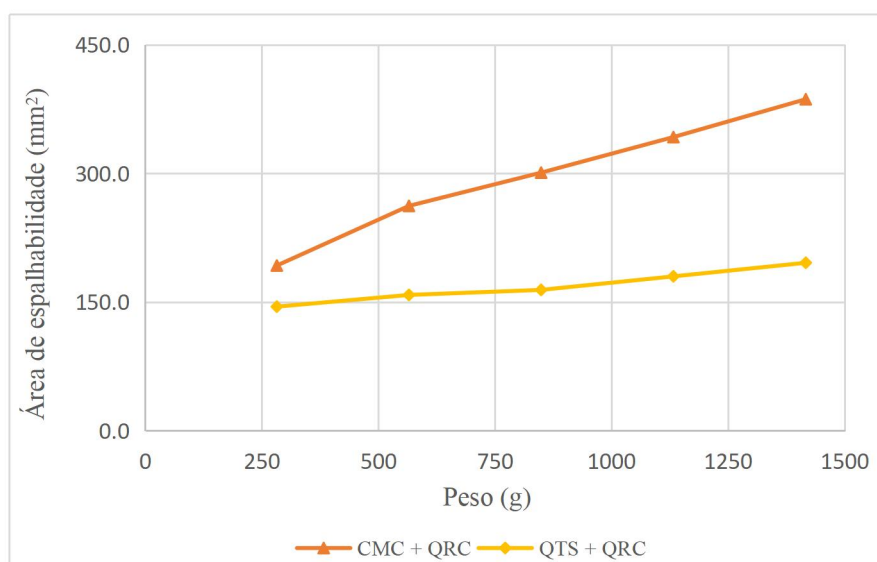


Figura 28. Perfil de espalhabilidade comparativo entre os hidrogéis de carboximetilcelulose sódica e quitosano incorporados com QRC

Ao se realizar a comparação apenas entre os HG incorporados com QRC, é perceptível uma diferença entre eles. O HG com base de CMC-Na apresenta uma

maior espalhabilidade quando comparado ao HG de QTS.

4.3.1.3. Ensaio de estabilidade preliminar

Centrifugação

Quando expostos a 30 minutos de centrifugação a 3000 rpm, não houve separação de fases ou alteração visual nos HGs. Além disso, mantiveram-se estáveis após serem expostos a 5 horas de centrifugação a 3800 rpm (Figura 29).

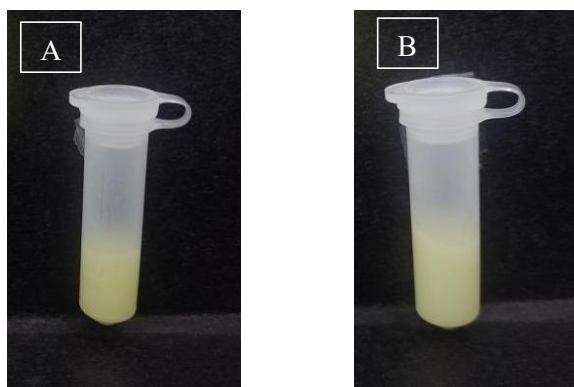


Figura 29. Hidrogéis incorporados com quercetina após centrifugação de 3800 rpm por 5 horas. **(A)** com base de carboximetilcelulose sódica. **(B)** com base de quitosano.

Exposição a radiação luminosa

O ensaio demonstrou que nos primeiros dias, o gel de CMC-Na não apresentou separação de fases, precipitação e nenhuma alteração em seu odor em ambos os frascos. Após o quinto dia, foi possível observar que o odor sofreu leve modificação no frasco translúcido, não sendo observado alterações no placebo, seja no frasco âmbar ou transparente.

Quanto ao gel de QTS, pode-se observar a partir do segundo dia modificações em sua coloração, se tornando mais escuro e seu odor se mostrou moderadamente modificado no frasco transparente, e ao longo dos dias, pode-se observar também precipitação. Tanto quanto no frasco transparente quanto no âmbar, houve alteração contínua do odor. O placebo não sofreu alterações. Os resultados sugerem que a embalagem de armazenamento influencia na estabilidade da amostra, sendo adequado que os HGs não sejam expostos a radiação luminosa.

Ciclo de Congelamento e Aquecimento

Avaliação de colorimétrica e de aspecto

A coloração dos HG de CMC-Na expostos a uma temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, exibiram uma tonalidade levemente mais escura em comparação ao HG pré exposto, enquanto o HG submetido à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ não apresentou alteração em sua coloração.

Já no que diz respeito à separação de fases e precipitação, não foram identificadas mudanças significativas na aparência dos HG de CMC-Na nos dois ambientes durante todo o período de estudo. No entanto, quando exposto a ambas as temperaturas extremas, o HG de QTS apresentou pequenos sinais de precipitação no

último dia do ciclo.

Por outro lado, a formulação à base de QTS exposta à temperatura elevada mostrou um escurecimento gradual, culminando com uma cor moderadamente mais escura no último dia do ciclo, e quando mantidos no freezer mantiveram-se levemente modificados após o segundo dia do ciclo até a finalização do ensaio.

Em relação ao odor, todos os HG, independentemente das condições de exposição, apresentaram alteração, com odor menos intenso do que o HG pré-exposto. A Tabela 12 apresenta as características dos HG antes e após serem submetidos a um ciclo de congelamento e aquecimento de 72 horas.

Tabela 12. Características dos hidrogéis antes e após 72h de exposição ao ciclo de congelamento e aquecimento.

	Hidrogel CMC-Na Pré-exposto	Após 3º ciclo aquecimento (72h)	Após 3º ciclo congelamento (72h)	Hidrogel QTS Pré-exposto	Após 3º ciclo aquecimento (72h)	Após 3º ciclo congelamento (72h)
Cor	Amarelo musgo	+1	0	Amarelo musgo	+2	+1
Aspecto	Sem precipitação / separação de fases	0	0	Sem precipitação / separação de fases	P	P
Odor	Plástico	-1	-1	Característico de ácido acético	-1	-1

0: Sem modificações; +1: Levemente mais intenso; +2: Moderadamente mais intenso; -1 Levemente menos intenso; P: precipitação.

Avaliação do pH

Os HG demonstraram variação significativa do pH após o ciclo de congelamento e aquecimento. É possível observar que o comportamento dos HG de CMC-Na ao fim dos ciclos de congelamento e aquecimento, apresentam pH mais elevado comparado ao dia de sua pré exposição, enquanto os HG de QTS demonstram uma redução do seu valor, independente da condição de temperatura em que foi exposto.

Observou-se que o HG de CMC-Na pré exposto obteve pH de $6,71 \pm 0,33$. Após 72h em ciclos de aquecimento o pH passou a $7,15 \pm 0,07$ e quando exposto a extrema temperatura de congelamento apresentou pH na faixa de $7,51 \pm 0,03$.

Já o HG com base de QTS em sua pré-exposição apresentou pH de $5,75 \pm 0,18$, após exposição de 72h à temperatura extrema de congelamento o pH se mostrou em torno de $4,94 \pm 0,10$, enquanto após exposição ao aquecimento $4,63 \pm 0,017$. As variações estão ilustradas na figura 30.

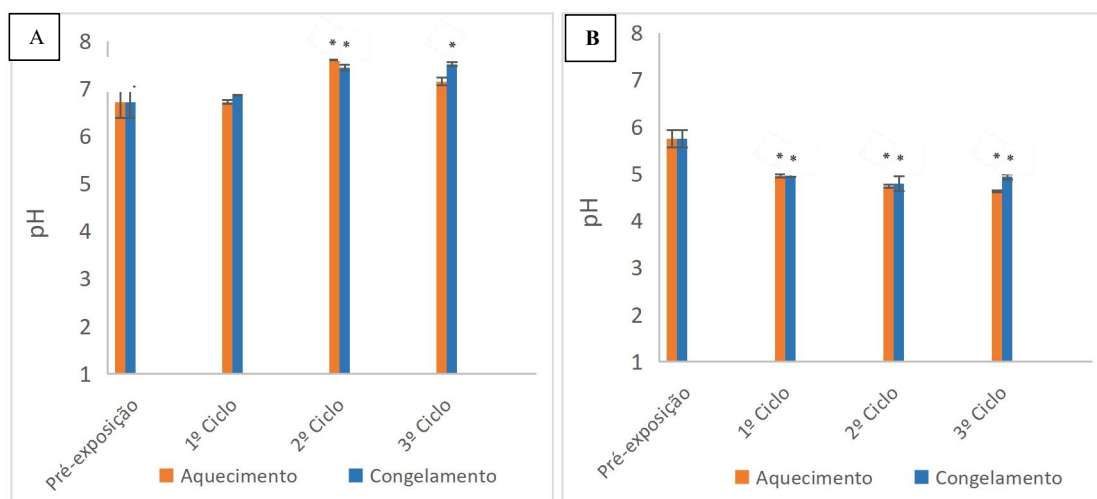


Figura 30. Variação do pH do hidrogéis incorporados com quercetina durante os ciclos de congelamento e aquecimento. **(A)** base de carboximetilcelulose sódica. **(B)** base de quitosano. (* $p < 0,05$).

A análise estatística utilizando o teste One-way ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, revelou que somente três condições não apresentaram diferença significativa em relação ao pH do HG pré-exposto. Essas condições são o tempo de 24 hs e 72 hs de exposição do HG de CMC-Na ao aquecimento e o tempo de 24 hs de sua exposição ao congelamento. O HG de QTS apresentou diferença significativa durante todo o ciclo.

Avaliação da Espalhabilidade

Ao investigar o comportamento da espalhabilidade de géis de CMC-Na quando expostos a altas e baixas temperaturas, os resultados revelaram que, independentemente da temperatura de exposição, os HG apresentaram comportamento semelhante em relação à espalhabilidade.

A primeira análise foi realizada antes de qualquer exposição, servindo como referência para os resultados subsequentes. Nas primeiras 24 horas de exposição tanto em alta quanto em baixa temperatura, observou-se aumento na espalhabilidade dos HG de CMC em comparação com a análise inicial.

Após 72h, os HG apresentaram comportamento semelhante ao tempo inicial. Quando a amostra foi exposta a ciclos de aquecimento, e um peso médio de cerca de 500g foi aplicado sobre ela, sua espalhabilidade se mantém relativamente consistente, com pouca variação. Isso ocorre mesmo após ter passado pelo estresse térmico. No entanto, a partir de um peso de 750g, é observada uma variação mais significativa na espalhabilidade. Já no caso do congelamento, nota-se que o espalhamento da amostra quando sofre uma pressão de 250g sobre ela, é similar no tempo pré exposição e após 72h, sofrendo maior influência após dispor de 500g sobre ela (Figuras 31 e 32).

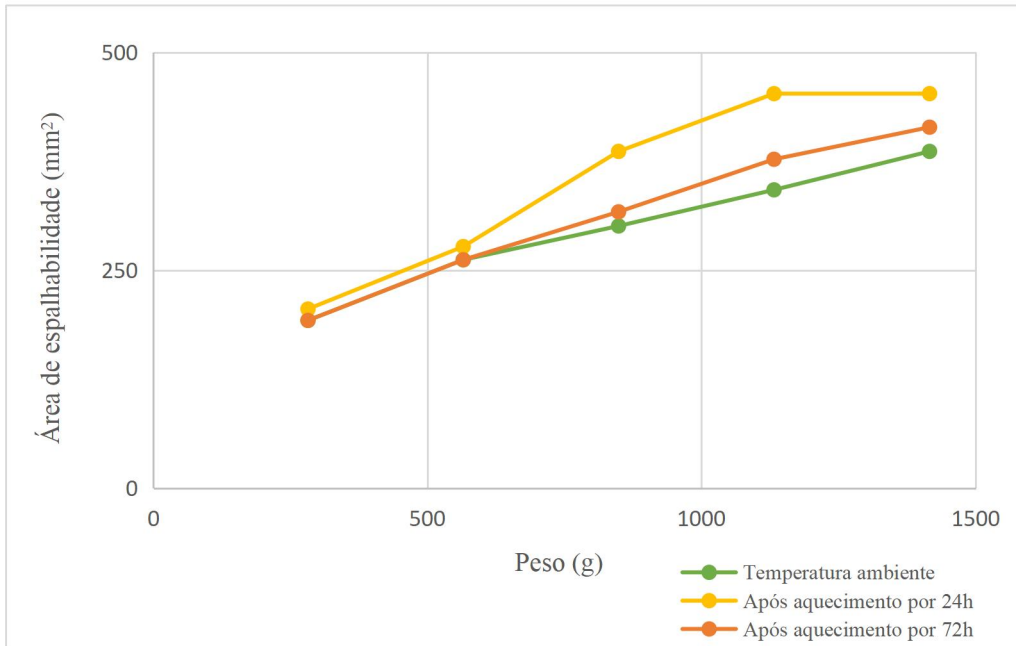


Figura 31. Perfil de espalhabilidade do hidrogel à base de carboximetilcelulose sódica com quercetina durante três ciclos de 24h de aquecimento.

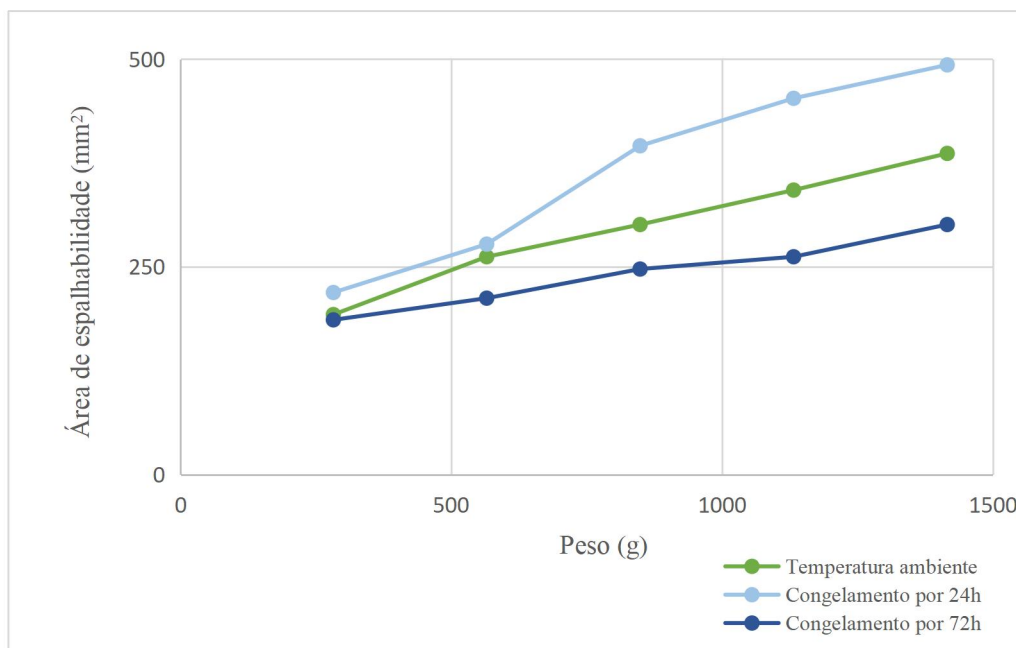


Figura 32. Perfil de espalhabilidade do hidrogel à base de carboximetilcelulose sódica incorporado com quercetina durante três ciclos de 24h de congelamento.

No primeiro ciclo de exposição à alta temperatura (Figura 33), notou-se um aumento na espalhabilidade do HG de QTS quando comparado à temperatura ambiente. Esse aumento indica que a alta temperatura tem um efeito positivo na capacidade de espalhamento da formulação.

Após 72h exposição à alta temperatura, notou-se um aumento adicional da espalhabilidade em comparação com a temperatura ambiente. Essa observação indica que, com a continuidade das exposições à alta temperatura, ocorre um aumento progressivo na capacidade de espalhamento. Nota-se, que quando um peso médio de

cerca de 250g é aplicado sobre a amostra no tempo pré exposição e após 72h de exposição, que a espalhabilidade se mantém relativamente similar. No entanto, a partir de um peso de 500g, é observada uma variação na espalhabilidade.

Esses dados indicam que há perda de características de flexibilidade e resistência após a exposição, podendo ser parcialmente recuperada em função do tempo.

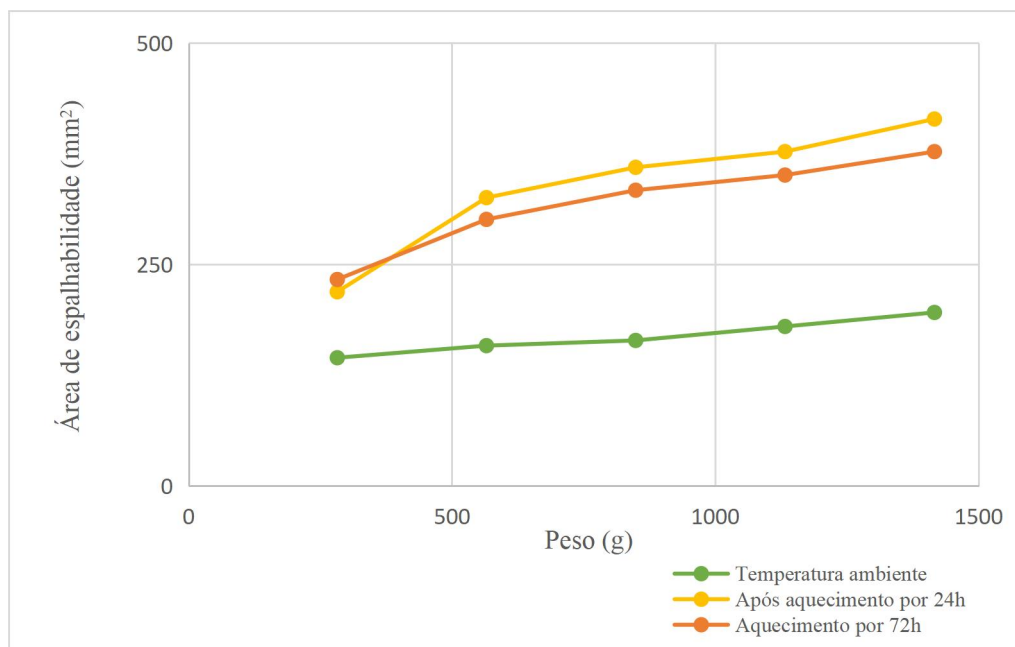


Figura 33. Perfil de espalhabilidade do hidrogel à base de quitosano incorporado com quercetina durante três ciclos de 24h de aquecimento.

Já no primeiro ciclo de exposição à baixa temperatura (Figura 34), notou-se um aumento na espalhabilidade do HG de QTS em comparação à temperatura ambiente. Esse aumento indica que a baixa temperatura tem um efeito positivo na capacidade de espalhamento da amostra.

Após 72h de exposição à baixa temperatura, observou-se um aumento na espalhabilidade em comparação com a temperatura ambiente. Além disso, notou-se que a espalhabilidade ficou similar àquela observada após 24h. Indicando que, com a continuidade das exposições à baixa temperatura, ocorre uma mudança progressiva na capacidade de espalhamento do HG de QTS, retornando a um perfil similar após 24h de exposição.

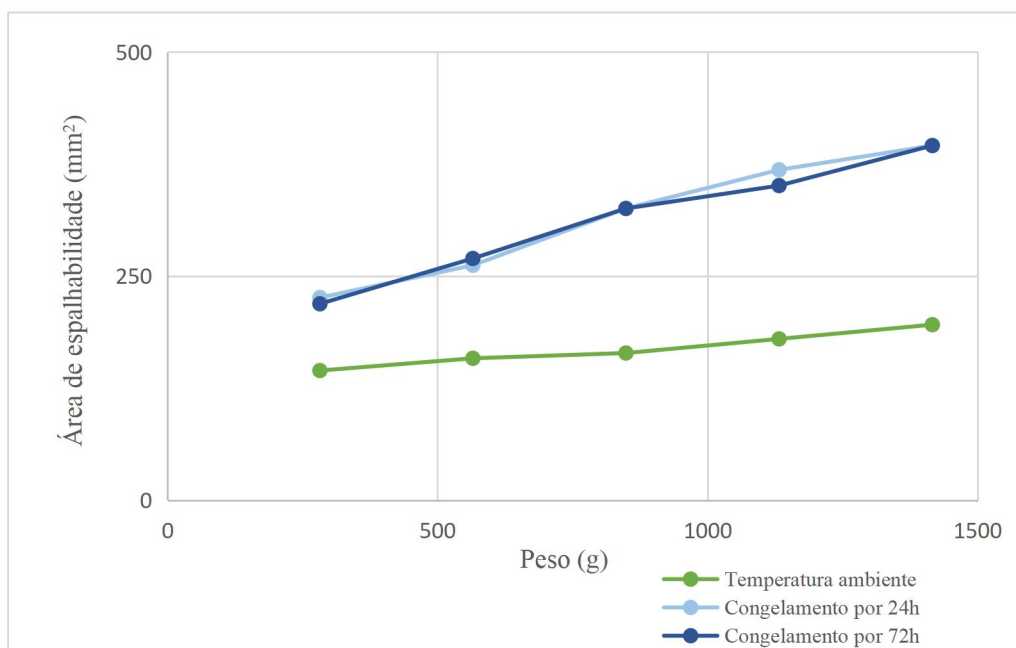


Figura 34. Perfil de espalhabilidade do hidrogel à base de quitosano incorporado com quercetina durante três ciclos de 24h de congelamento.

Os dados da espalhabilidade após exposição de 72h em congelamento e aquecimento, utilizando peso de 1500 g, estão disponíveis na tabela 13.

Tabela 13. Espalhabilidade dos hidrogéis contendo quercetina antes e após 72h de exposição ao ciclo de congelamento e aquecimento. (letras diferentes, $p < 0,05$)

	Média Espalhabilidade (mm ²) ± dp		
	Hidrogel Pré-exposto	Após 3º ciclo de aquecimento (72h)	Após 3º ciclo de congelamento (72h)
Hidrogel CMC-Na	386 ± 1 ^a	414 ± 2 ^b	300 ± 0 ^c
Hidrogel QTS	196 ± 0 ^d	377 ± 2 ^e	396 ± 3 ^f

4.3.1.4. Determinação de teor da quercetina nos hidrogéis

Após o ensaio, foi evidenciado que a solubilização concomitante da QRC e da matriz polimérica ocorre diferente em razão dos solventes utilizados, como demonstrado pela tabela 14.

Tabela 14. Teor da quercetina nos hidrogéis à base de carboximetilcelulose sódica e quitosano nas diferentes condições de solubilização.

Solubilização	Teor \pm dp	
	Hidrogel CMC-Na	HG QTS
Água	9,4 \pm 0,00	7,6 \pm 0,02
MeOH	98,2 \pm 0,00	74,9 \pm 0,06
MeOH: Água (90:10)	80,0 \pm 0,03	85,9 \pm 0,02
MeOH: Água (75:25)	79,5 \pm 0,00	95,0 \pm 0,03

CMC-Na: carboximetilcelulose sódica; QTS: quitosano; MeOH: Metanol

Para o HG de QTS, o melhor teor (95% \pm 0,00) foi alcançado quando o ensaio utilizou uma combinação de 75% de MeOH e 25% de água. Já para o HG de CMC-Na, apenas a utilização de MeOH foi suficiente para obter teor de 98,2% \pm 0,00, ambos estando dentro das especificações preconizadas pela RDC 166 de 2017.

4.3.2. Filmes poliméricos

A partir da técnica de *solvent casting*, foi possível a obtenção de filmes incorporados com QRC. Durante o desenvolvimento, observou-se que F1 apresentou precipitação quando QRC foi incorporada ao hidrogel base, demonstrando a necessidade de solubilizar o ativo antes da incorporação. Para isto, utilizou-se DMSO, uma vez que este solvente se mostrou inerte nos ensaios microbiológicos..

Assim, as formulações F2, F3 e F4 foram elaboradas utilizando proporções distintas dos reagentes, como demonstrado na tabela 8. Após o preparo, verificou-se que a formulação F3 exibiu extrema fragilidade, enquanto a F4 apresentou um aspecto excessivamente pegajoso. Em contraste, a formulação F2 demonstrou características intermediárias; não tão aderente quanto a F4 e nem tão frágil quanto a F3. Esses resultados sugeriram que F2 poderia oferecer resistência e propriedades adesivas para uma formulação de administração oral. Deste modo, F2 (Figura. 35) foi selecionado como objeto deste estudo.

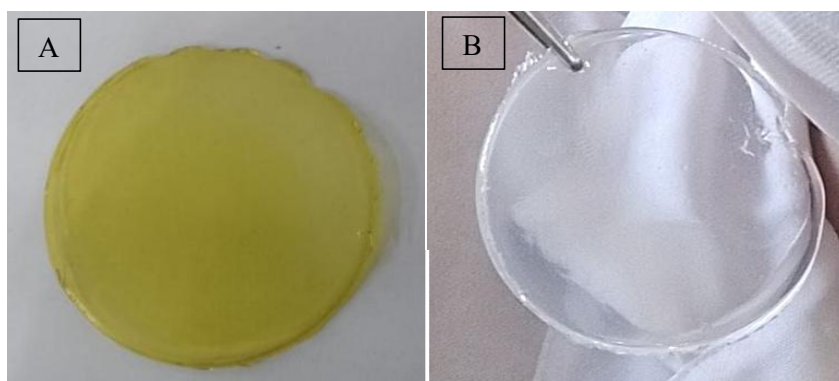


Figura 35. Filme polimérico à base de carboximetilcelulose sódica selecionado. **(A)** contendo quercetina. **(B)** placebo.

O filme incorporado apresentou características visuais de translucidez, com coloração amarela, e ausência de odor perceptível. Já o placebo se mostrou levemente opaco e sem odor. Pôde-se observar uma característica adesiva ainda na placa de petri, sendo necessária a utilização de uma espátula e uma pinça de alumínio para sua retirada.

Ao analisar o peso dos filmes incorporados com QRC, verificou-se um peso médio de $0,0360 \pm 0,0029$ g enquanto o placebo $0,0292 \pm 0,0011$ g. Quanto à espessura, os filmes placebo e incorporado com QRC apresentaram valores de $0,35 \pm 0,02$ mm e $0,30 \pm 0,1$ mm, respectivamente.

4.3.2.1. Grau de intumescimento

No ensaio de grau de intumescimento foi possível observar a absorção de água pelo filme em 5 minutos, como demonstrado pela figura 36. Após esse tempo, o filme adquiria forma de um HG que se rompia facilmente, levando a perdas significativas quando havia a retirada da saliva.

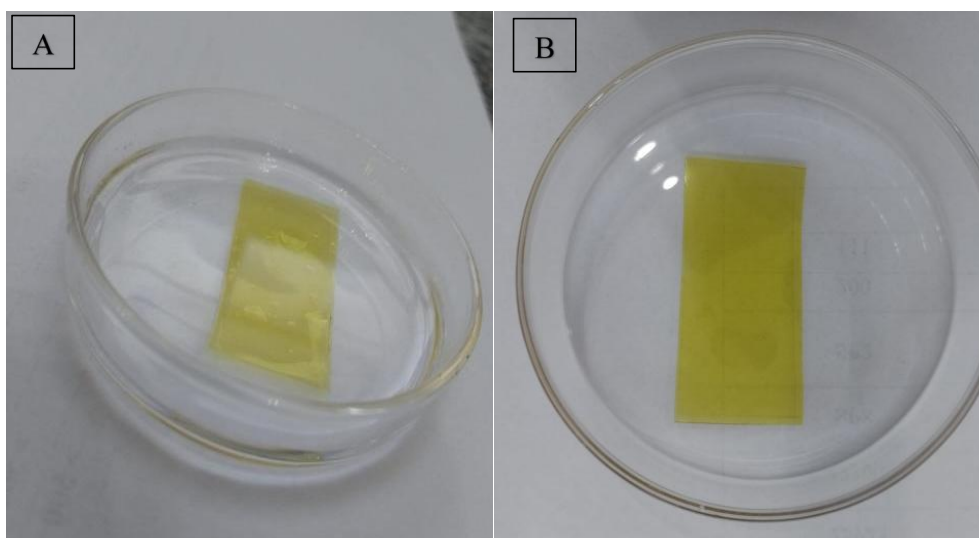


Figura 36. Filme submerso em saliva artificial para ensaio de grau de intumescimento. **(A)** visão lateral **(B)** visão superior.

A tabela 15 demonstra quantitativamente o grau de intumescimento das amostras, a partir da equação descrita no tópico 3.5.2.3.

Tabela 15. Grau de intumescimento dos filmes poliméricos a base de carboximetil celulose sódica contendo quercetina em saliva artificial pH 8.

	Placebo	QRC
Média (ΔP)	80,7	202,8
dp	6,9	19,18

ΔP : variação de peso; dp: desvio padrão

A análise do grau de intumescimento revelou que o placebo do filme polimérico apresentou um valor dentro da faixa de $80,7 \pm 6,9$. No entanto, quando o filme polimérico foi incorporado com QRC, esse valor aumentou significativamente para $202,8 \pm 19,18$. Esses resultados indicam que a adição de QRC na formulação resulta em um aumento de 2,5 vezes no grau de intumescimento da formulação.

4.3.2.2. pH de superfície

O pH de superfície da formulação com QRC foi de $6,5 \pm 0,3$, enquanto o pH do placebo se mostrou entre $6,9 \pm 0,2$. Esses resultados demonstram que neste sentido, o filme oferece segurança quanto a sua aplicação. Uma vez que seu pH está entre o limite de acidez e basicidade (6,5 a 7,5), não levando a ocorrência de lesões na mucosa oral.

4.3.2.3. Resistência a dobra

Após 300 dobragens consecutivas em 180° , o filme placebo se mostrou sem fissuras, apenas com marcas de dobra. Enquanto o filme incorporado com QRC obteve valor de resistência a dobra em 28 vezes (± 3), demonstrando que a incorporação do flavonóide no filme, diminui sua flexibilidade (Figura 37).

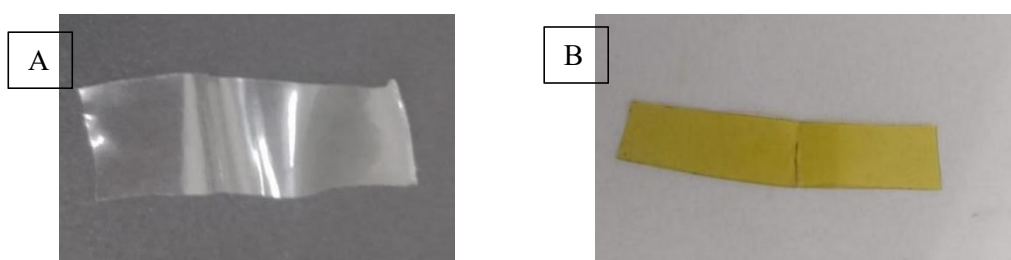


Figura 37. Filme polimérico à base de carboximetilcelulose sódica após ser submetido ao ensaio de resistência a dobra. (A) placebo (B) contendo quercetina.

4.3.2.4. Caracterização morfológica

Através da figura 38 obtida pelo Microscópio de Varredura (HITACHI, TM3030 Plus) foi possível observar que o filme polimérico incorporado (A) apresenta uma maior presença de poros em comparação ao filme placebo (B). Além disso, as

mesmas imagens evidenciam a presença de partículas de QRC agregadas à superfície do filme polimérico.

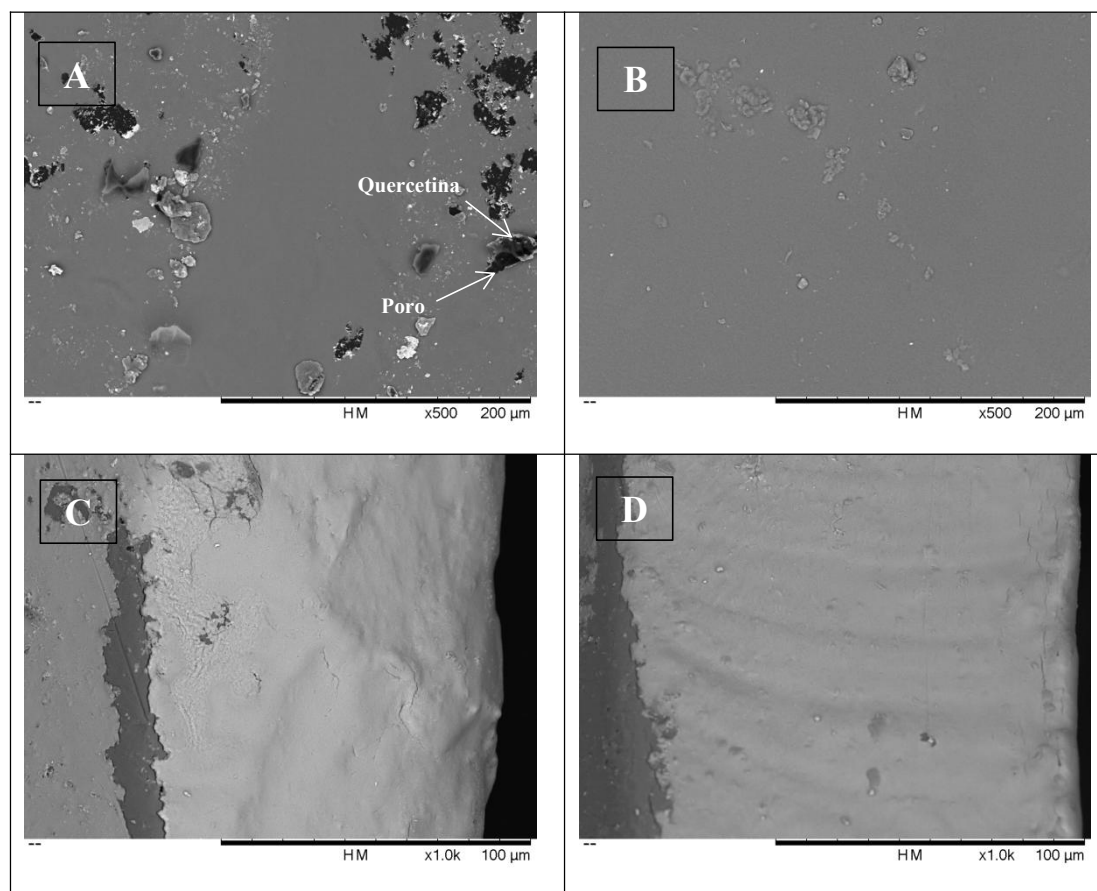


Figura 38. Análise morfológica obtida através de microscopia eletrônica de varredura dos filmes à base de caboximetilcelulose sódica. (A e C) Filme contendo quercetina (B e D) Placebo.

Já as figuras inferiores ilustram que o filme placebo (D) apresenta uma superfície mais compacta, enquanto o filme incorporado (C) possui uma textura distinta. Além disso, no filme incorporado, é possível observar a presença de pequenas partículas de QRC em sua superfície.

4.3.2.5. Análise estrutural

Ao observar o espectro de FTIR (Figura 39) é possível constatar a presença de sinais semelhantes no placebo quanto no filme com QRC. Não observa-se desaparecimento ou deslocamentos significativos de banda, apenas breves variações de intensidade. No entanto, nota-se um destaque particular no comprimento de onda de 1580 cm^{-1} , o que indica a ocorrência de um estiramento de C=C aromático. Esse comportamento mostra uma interação associada à presença da QRC no filme polimérico.

Outra observação relevante, é que a adição de QRC não fornece uma modificação estrutural no placebo, podendo ser confirmado também pela sobreposição dos espectros (Figura 39). Os comprimentos de onda em comum e seus respectivos grupos funcionais estão descritos na tabela 16.

Figura 39. Sobreposição dos espectros de FTIR obtidas através de análise estrutural utilizando metodologia de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do filme incorporado com quercetina e seu placebo.

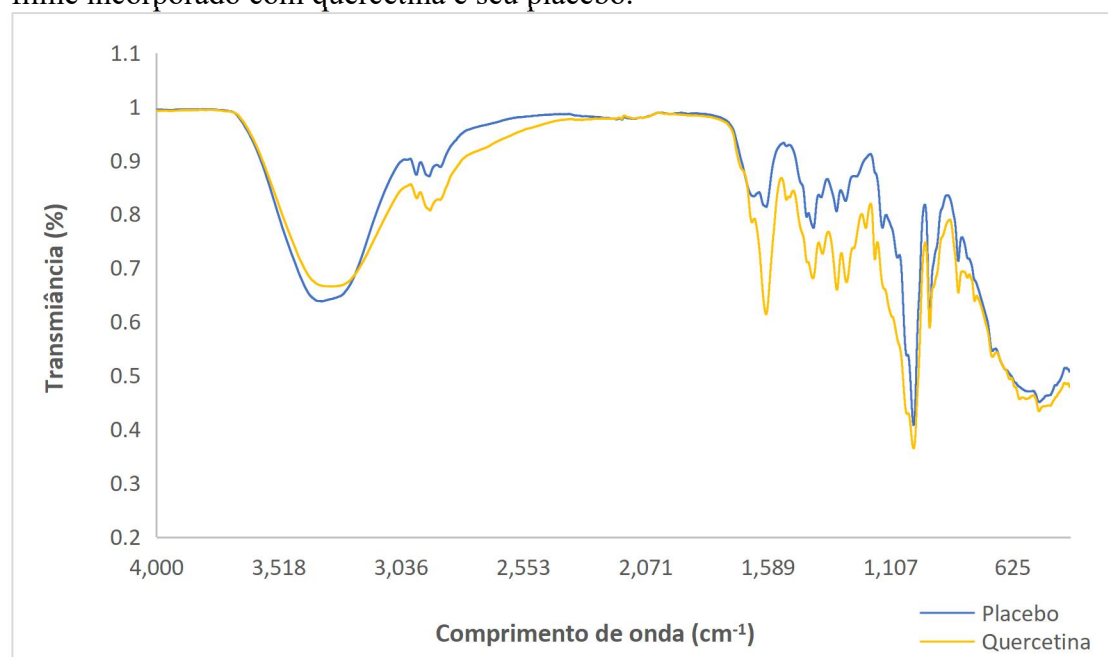


Tabela 16. Comprimentos de onda e grupos funcionais em comum entre o placebo e o filme incorporado com quercetina obtidas através de análise estrutural utilizando metodologia de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Referência
3600 à 3200	O-H	
3030	C-H de Aromáticos	
2900 à 2960	CH ₂ e CH ₃	
1675 à 1645	C=O	LOPES, W. <i>et al</i> 2004.
1470 à 1430	CH ₂	USP, 2023
1420	CH ₂ adjacente a carbonila	
1,060 à 1040	S=O	
625	Confirmação de Aromático	

4.3.2.6. Determinação de teor de quercetina

Após a avaliação da seletividade do método, como evidenciado em 3.3., examinou-se a solubilização concomitante da QRC e da matriz polimérica presente na formulação frente aos diferentes solventes, como demonstrado pela tabela 17.

Tabela 17. Teor do filme polimérico sob as diferentes condições de solubilização.

Solubilização	Média Teor	dp
Água	17,8	± 0,38
MeOH	71,6	± 0,16
MeOH: H ₂ O (90:10)	97,0	± 0,43
MeOH: H ₂ O (75:25)	77,6	± 0,04

MeOH: metanol; dp: desvio padrão; H₂O: água

Para o filme polimérico, o teor ideal, de acordo com as especificações da RDC 266 de 2017 (que determina que deve estar entre 90% e 110%) foi alcançado quando o ensaio utilizou uma combinação de 90% MeOH e 10% de água. Enquanto em outras condições, pode-se observar diferenças significativas quanto a recuperação do ativo.

4.4. Liberação *in vitro*

Os resultados da liberação *in vitro* fornecem informações sobre a capacidade da formulação de liberar substâncias ativas ao longo do tempo. Para a determinação das concentrações liberadas de quercetina, utilizou-se do método descrito em 3.3, que foi preliminarmente avaliado quanto a sua seletividade.

4.4.1. Estudo de solubilidade

Em uma análise preliminar, foi constatado que a QRC demonstra uma solubilização inadequada em saliva artificial, podendo ser justificada pela hidrofobicidade da molécula. Portanto, o ensaio de solubilidade foi utilizado para avaliar a influência de surfactante na solubilidade da QRC (tabela 18), e assim, verificar qual a composição da solução receptora que deveria ser utilizada para melhorar a solubilidade da QRC, uma molécula hidrofóbica, em um meio aquoso.

Tabela 18. Influência de diferentes concentrações do surfactante na solubilidade da quercetina em saliva artificial.

Meios	Média ($\mu\text{g/mL}$)	dp
Saliva	4,71	± 0
Saliva + SDS 1%	21,23	$\pm 0,09$
Saliva + SDS 2,5 %	41,97	$\pm 0,05$
Saliva +SDS 5%	73,22	$\pm 0,06$

SDS: dodecil sulfato de sódio; dp: desvio padrão

O ensaio demonstrou que a solubilização da QRC na saliva artificial, sofre modificações significativas de acordo com a concentração de SDS adicionada ao meio. Esse resultado sugere que para garantir a condição *sink* durante o ensaio de liberação, o meio a ser utilizado seja saliva artificial combinada com SDS 5%, que é capaz de solubilizar 73,22 $\mu\text{g/mL}$.

4.4.2. Liberação *in vitro*

A taxa de liberação *in vitro* de todas as formulações foram avaliadas por 24 hs. O HG de CMC-Na mostrou uma liberação intensa nos primeiros minutos do ensaio, alcançando uma taxa máxima de liberação (32,1%) em 60 minutos. Por outro lado, o HG com base de QTS apresentou uma liberação mais lenta e gradual do ativo, atingindo o platô (correspondente a 18,6% de liberação) após um período de 360 minutos. Já os resultados obtidos para o filme polimérico revelaram que em 240 minutos, ocorreu a liberação máxima de 26%, conforme apresentado na figura 40.

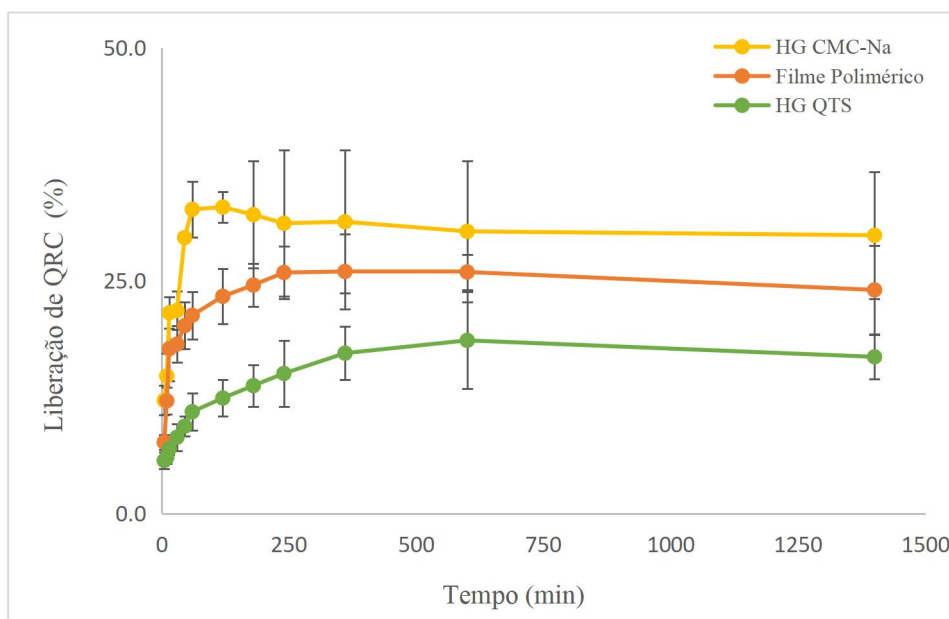


Figura 40. Liberação *in vitro* comparativa entre filme polimérico de carboximetilcelulose sódica, hidrogel de carboximetilcelulose sódica e hidrogel de quitosano.

4.4.3. Cinética de liberação

Os estudos de liberação *in vitro* tiveram como objetivo avaliar a liberação do ativo a partir das formulações desenvolvidas. Através do perfil obtido experimentalmente, foi possível determinar a cinética de liberação para cada formulação. Para essa análise, selecionou-se a porção mais linear de cada perfil de liberação e aplicou-se os três modelos cinéticos (conforme descritos na seção 3.6.3).

Após análise da cinética de liberação do ativo a partir do do HG de CMC-Na, foi caracterizada taxa de liberação constante e linear do fármaco, dependente do tempo. Sendo assim classificado como Ordem zero.

A cinética de ordem zero define o processo de liberação constante de um fármaco a partir de um sistema. Assim, a liberação é constante em relação ao tempo.

Ou seja, a quantidade de fármaco liberada em função do tempo é linear (permeação é maior com o tempo).

Enquanto a taxa de liberação do HG de QTS e do filme, indica que o processo de liberação seguiu um padrão de Pseudo primeira ordem. Isso implica que a taxa de liberação da QRC diminuiu gradualmente ao longo do tempo, seguindo uma tendência exponencial.

A relação entre fluxo e cinética de liberação das três formulações, estão ilustrados na tabela 19.

Tabela 19. Determinação do fluxo (J) e cinética de liberação ($n=3$) das formulações poliméricas contendo quercetina.

Formulação	Coefficiente linear (r)	Fluxo (J)	Modelo cinético
Hidrogel CMC-Na	0,9893	$0,1339 \pm 0,009$	Ordem Zero
Hidrogel QTS	0,9826	$0,2726 \pm 0,073$	Pseudo Primeira Ordem
Filme Polimérico	0,9502	$0,2965 \pm 0,034$	Pseudo Primeira Ordem

CMC-Na: carboximetilcelulose sódica; QTS: quitosano

4.5. Tempo de Residência *ex vivo*

Para determinar a adesão foi utilizada a metodologia de tempo de residência. Neste ensaio, os HG revelaram uma notável variabilidade em sua capacidade de retenção. Em ambos os HG, com base de CMC-Na ou QTS, observou-se a formação de uma película após o espalhamento do HG.

Especificamente, todos os HG contendo QTS demonstraram-se altamente aderentes, apresentando ao final da análise nenhum sinal de deslocamento, apenas de desintegração. Em contrapartida, constatou-se que 67% ($n=3$) dos HG de CMC-Na exibiram uma menor capacidade de aderência, apresentando descolamento parcial após um intervalo de tempo de aproximadamente 5 horas e 40 minutos.

Ao atingir o tempo de 20h de análise, foi observada turbidez intensa e moderada do meio, dos HG de CMC-Na e QTS, respectivamente, sendo um indicativo de liberação do ativo e desintegração da matriz polimérica. Entretanto, não foi possível observar a presença do HG de CMC-Na na superfície da mucosa, sugerindo sua total desagregação e desintegração. Enquanto 67% dos HG ($n=3$) de QTS se mostraram aderidos parcialmente até o fim do ensaio.

Quanto aos filmes, todas as amostras permaneceram aderidas a mucosa pelo tempo máximo de análise. Foi observado que 33,33% das amostras se mantiveram totalmente integras até o fim do ensaio, enquanto 67% sofreram pequena desagregação após as primeiras 5h de análise, entretanto a parte agregada se manteve íntegra até o término do ensaio. A figura 41 ilustra o estado anterior e posterior à realização do experimento.

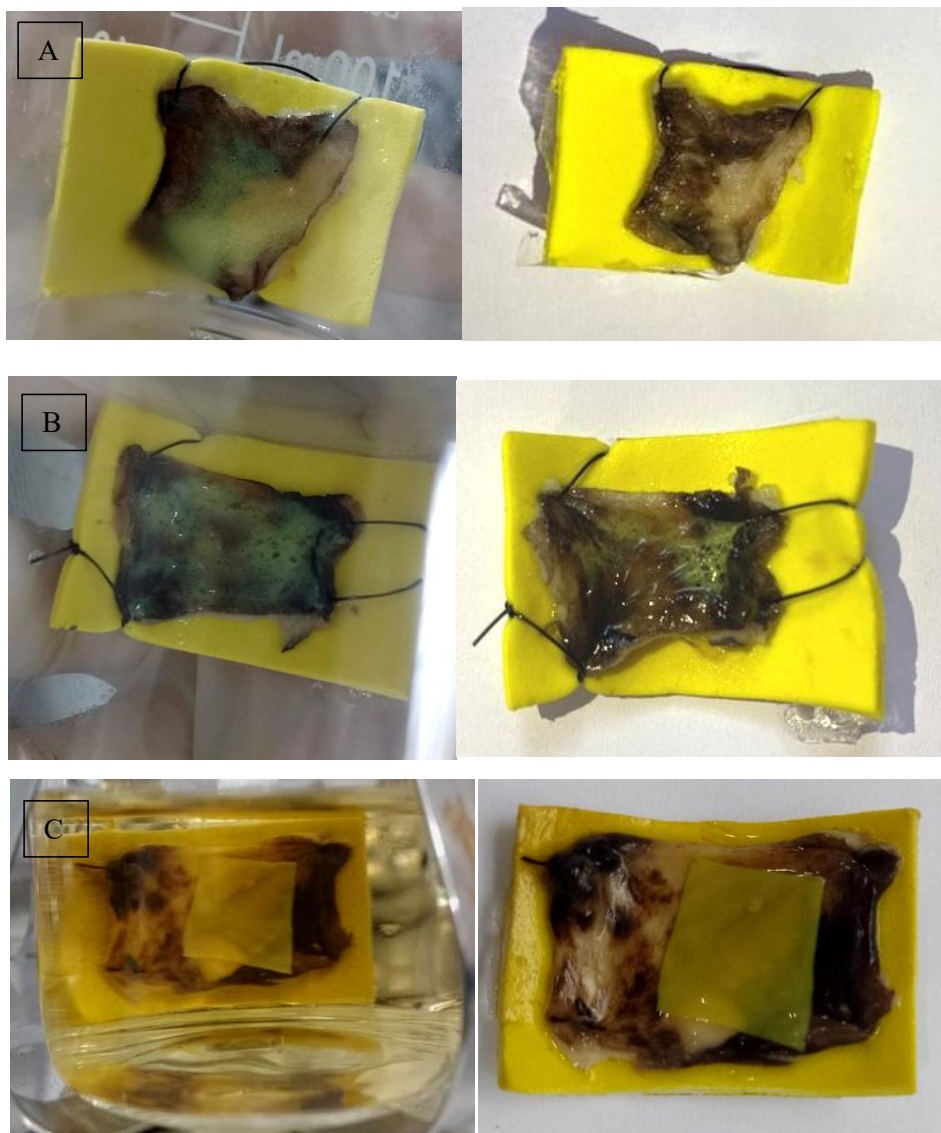


Figura 41. Aparato antes e após do ensaio de tempo de residência. **(A)** Hidrogel à base de carboximetilcelulose sódica contendo quercetina. **(B)** Hidrogel à base de quitosano contendo quercetina. **(C)** Filme polimérico à base de carboximetilcelulose sódica contendo quercetina.

4.6. Atividade Antimicrobiana das Formulações

4.6.1. Efetividade inibitória

Após o período de incubação de 24 horas a 37°C, os tubos contendo diferentes formulações foram submetidos à análise visual. Os controles negativo e positivo demonstraram os resultados esperados: o tubo de controle negativo, contendo apenas caldo e inóculo bacteriano, exibiu turbidez, indicando o crescimento bacteriano nesse meio, enquanto o tubo de controle positivo permaneceu límpido, sem sinais de presença bacteriana, o que comprova a ausência de contaminação.

Em relação aos tubos que receberam a adição do HG de CMC-Na, observou-se a ocorrência da desintegração da formulação (Figura. 42 - A), que decantou. Todos os tubos utilizados apresentaram turvação o que pode indicar tanto o crescimento bacteriano quanto a fragmentação do HG utilizado no experimento.

Já os géis de QTS aderiram à parte superior dos tubos (Figura. 42 - B), o que

pode estar relacionado a fatores como temperatura, pH do meio ou composição do gel. Enquanto os filmes utilizados no experimento permaneceram parcialmente intactos após 24 horas (Figura. 42 - C). Destaca-se que, para determinadas cepas bacterianas, a adição destas duas formulações resultou em turbidez menos acentuada, sugerindo-se uma possível inibição bacteriana parcial.

Os dados que relacionam a ocorrência de turvação nos tubos de ensaio, estão dispostos na tabela 20.

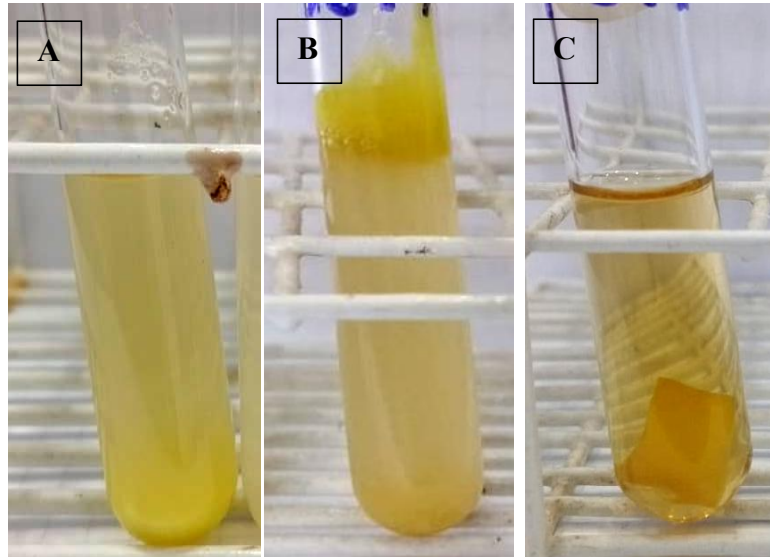


Figura 42. Tubos após 24h do ensaio de efetividade antimicrobiana das formulações. .
(A) Hidrogel à base de carboximetilcelulose sódica, (B) Hidrogel à base de quitosano
(C) Filme Polimérico

Tabela 20. Nível de turvação do caldo após 24h do inóculo em contato com as formulações desenvolvidas.

Microorganismos	Hidrogel CMC-Na	Hidrogel QTS	Filme Polimérico
<i>E. coli sensível</i>	Presente	Pouco presente	Presente
<i>E. coli resistente</i>	Presente	Pouco presente	Presente
<i>S. Aureus sensível</i>	Presente	Pouco presente	Pouco presente
<i>S. aureus resistente</i>	Presente	Presente	Presente
<i>S. Pseudointermedius sensível</i>	Presente	Presente	Presente
<i>S. Pseudointermedius resistente</i>	Presente	Presente	Presente
<i>Pseudomonas Aeruginosa sensível</i>	Presente	Presente	Presente
<i>Pseudomonas Aeruginosa resistente</i>	Presente	Presente	Presente
<i>Streptococcus</i>	Presente	Presente	Presente

CMC-Na: carboximetilcelulose sódica; QTS: quitosano.

4.6.2. Efetividade bactericida

A análise realizada revelou que apenas a cepa sensível de *E. coli* demonstrou suscetibilidade a este ensaio, notavelmente em resposta ao uso exclusivo do HG composto por CMC-Na, conforme pode ser observado na Figura 43.



Figura 43. Placa resultante do ensaio de efetividade bactericida do hidrogel à base de carboximetilcelulose sódica contendo quercetina frente a cepa sensível de *E. coli*.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de formulações bucais destinadas ao tratamento e profilaxia da DP é um ramo sólido na odontologia humana, como demonstrado pelos trabalhos de Asati (2019), Tarawneh (2021) e Saha (2013), que devolveram filmes à base de CMC-Na e obtiveram resultados promissores para o enfrentamento da doença. Devido às diferenças fisiológicas e anatômicas entre humanos e animais, bem como às diferenças na microbiota oral e na sensibilidade a determinados ingredientes, o desenvolvimento de formulações caninas se torna um desafio, estando ainda distante de se tornar comum tanto para humanos.

O trabalho de Sekkat (2018) avaliou o uso de um filme polimérico contendo metronidazol para o tratamento da DP em cães. Os resultados do estudo indicaram que o filme polimérico foi eficaz na redução da inflamação e do sangramento gengival, demonstrando ser uma alternativa para amenizar o desconforto causado pela doença, porém não traz dados de atividade antibacteriana. Enquanto Garanayak, (2019) avaliou a eficácia da limpeza bucal e da aplicação de clorexidine na redução da atividade bacteriana em cães portadores de DP.

Segundo Amin (2015) e Shafiei (2016) o estudo dos constituintes predominantes de um extrato vegetal, seja isoladamente ou em combinação, pode oferecer vantagens medicinais significativas. Entre os compostos com potencial terapêutico, destacam-se os flavonoides, como luteolina, rutina e quercetina, que têm demonstrado eficácia na inibição do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas de diversos gêneros, incluindo notavelmente *S. aureus* e *E. coli*, como apresentado por Gutiérrez-Venegas (2019). Pesquisas anteriores, conduzidas por Amin (2015), também revelaram resultados promissores ao avaliar a atividade inibitória combinada dos flavonoides morina, rutina e quercetina contra *S. aureus* resistente à meticilina. Além disso, esses compostos demonstraram efeitos aditivos quando associados a antibióticos comerciais já existentes.

No ramo odontológico, a utilização de produtos à base de produtos naturais tem apresentado destaque. Pereira (2020) trabalhou no desenvolvimento de filme bucal contendo extrato aquoso das folhas de *Psidium Guajava* para DP canina, enquanto Bhutkar (2014) isolou a QRC do extrato metanólico da mesma planta para o desenvolvimento de um patch bucal.

De maneira similar, Yang (2017) desenvolveu de uma formulação contendo QRC para redução da inflamação após o procedimento de restauração. Os resultados de Gupta (2019) corroboram com o contexto do estudo, uma vez que seu trabalho conclui a atividade da QRC na redução da inflamação e da degradação óssea associada à DP em cães.

Sabendo-se das propriedades antibacterianas dos flavonoides, foi necessário estimar as concentrações efetivas de QRC e RTN, para que posteriormente, a mesma fosse incorporada à formulação. A ausência de resultados no ensaio de difusão em disco, refletiu na lipossolubilidade dos flavonoides, que por apresentarem característica hidrofóbica, não difundiam ao longo da placa a qual continha meio MH. Por estarem solubilizados em um diluente o qual possui mais afinidade, QRC e RTN se mantiveram no disco, resultando em um falso positivo fundamentado ao coeficiente de partição dos mesmos. Os ensaios de CIM corroboram com esta teoria, uma vez que há contradição de seus resultados, dado que este ensaio se baseia em diluição por poço e não em difusão pautada em afinidade química.

Ao contrário dos resultados observados neste trabalho durante o curso do ensaio de difusão em disco, que não demonstraram inibição bacteriana nas placas, as

investigações conduzidas por Gutiérrez-Venegas (2019) apresentaram resultados divergentes dos tratados. Neste estudo, o autor realizou o mesmo teste e registrou atividade de QRC e RTN frente *E. coli* e *S. aureus*.

No entanto, vale ressaltar que pesquisadores como Amin (2015) e Woënicka (2013) conduziram ensaios de microdiluição em caldo, como o realizado neste experimento para obtenção da CIM. Os resultados obtidos por este estudo através da técnica anteriormente descrita, se mostraram menores do que os presentes na literatura. Para QRC obteve-se concentração $\leq 5\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas testadas, enquanto a atividade inibitória da RTN foi observada na concentração $\leq 12,5\ \mu\text{g/mL}$ para as mesmas. Os resultados de CBM mostraram-se variáveis quanto a variante testada, porém, para todas as cepas, as concentrações de QRC se mostraram menores quando comparadas às de RTN. Em corroboração, o estudo de Amin (2015), baseou-se em testar QRC e RTN frente a MRSA, obtendo-se atividade inibitória de QRC à $75\ \mu\text{g/ml}$, enquanto RTN não foi capaz de levar a inibição da cepa. Woënicka (2013) por sua vez, obteve-se CIM de QRC $62,5\ \mu\text{g/mL}$ para cepas, sensíveis e resistentes, de *E. coli* e *S. aureus*.

Após análise dos resultados de CIM e CBM, verificou-se que a QRC apresentou resultados mais promissores em comparação à RTN. Isso se deve ao fato de que a atividade inibitória e bactericida da QRC se manifestou em concentrações significativamente menores quando comparada às de RTN, principalmente para *E. coli* e *S.aureus*. Esse resultado, indica que a QRC possui um potencial maior para combater bactérias patogênicas em concentrações mais baixas, o que pode ter implicações positivas tanto em termos de custos de produção de formulações quanto na redução do risco de desenvolvimento de resistência bacteriana. Com base nesses resultados, o emprego da QRC como a substância principal para o desenvolvimento das formulações foi priorizado, visando maximizar sua eficácia e minimizar potenciais problemas econômicos e de resistência.

Em sua obra publicada em 2011, Da-Fonseca foca na significância de alcançar concentrações inibitórias e bactericidas baixas, particularmente em relação a *S. aureus* e *E. coli*. Isso se justifica pelo potencial de agravamento da inflamação e do dano tecidual na cavidade oral de cães, ocasionado pela presença dessas cepas bacterianas.

Indo de encontro com este raciocínio, há o estudo de Sturgeon (2013), onde demonstra-se que a DP canina está associada a mudanças significativas na microbiota oral e que as bactérias presentes nas placas dentárias dos cães com DP tinham uma atividade metabólica mais elevada em comparação com as bactérias presentes nas placas dentárias de cães saudáveis, demonstrando que o combate a DP é de extrema relevância.

Considerando as situações pré-citadas, foram desenvolvidas três formulações utilizando polímeros mucoadesivos: dois HG e um filme de contendo 0,5% e 1% de QRC, respectivamente. Essa utilização foi pautada na necessidade de aumentar a permanência da formulação na boca, visto que neste cenário a rotina de higienização é dificultada. E comumente, as formulações sofrem ação da saliva e da atividade mecânica, que a removem facilmente como já descrito anteriormente por Escudero-castaño (2008) e Ferrarini (2007).

Os HG contendo QRC foram desenvolvidos pensando na aplicabilidade da forma de apresentação farmacêutica, assim os polímeros CMC-Na e QTS, que possuem propriedades mucoadesivas, foram empregados para obtenção das formulações.

A revisão sistemática realizada por Javanbakht (2019) traz um enfoque sobre como os sistemas de liberação controlada baseados em CMC-Na oferecem vantagem

de aderência às superfícies mucosas, incluindo ainda uma abordagem pautada em sua biocompatibilidade, que reflete na segurança de administração.

Apesar dos excipientes e suas concentrações serem seguras, de acordo com Ferreira (2013), determinadas características da formulação possuem relevância quanto a sua aplicabilidade, sendo o pH uma destas. Inicialmente, observa-se que após a incorporação da QRC, o pH dos dois HG diminuem. O HG de CMC-Na de $7,4 \pm 0,19$ para $6,7 \pm 0,33$, e o HG de QTS de $6,4 \pm 0,22$ para $5,7 \pm 0,18$. Segundo Anroop (2013) uma formulação para aplicação oral deve se apresentar próximo a neutralidade, deste modo, buscou-se trabalhar em uma faixa estreita, que variou entre 6,5 e 7,5. Durante três meses analisou-se este parâmetro. O HG à base de CMC-Na manteve-se nesta faixa durante todo o tempo. Enquanto, o HG de QTS, que já apresentava uma faixa levemente abaixo do ideal, houve alteração moderada. Essa condição implica que seu uso, em razão do tempo, torna-se potencialmente inadequado, visto que decaimento substancial, podendo ocasionar lesões na mucosa oral. Assim, o HG de CMC-Na se torna mais seguro para utilização.

O ensaio de espalhabilidade após a exposição dos HG ao estresse térmico evidenciou que a exposição das formulações à elevação da temperatura resulta em uma perda parcial das propriedades intrínsecas de resistência e flexibilidade dos HG. O autor Seki (2014) elucidou, por meio de análises térmicas, a presença de três estágios distintos de degradação nos HG à base de CMC-Na. O primeiro desses estágios, situado na faixa de temperaturas entre 25°C e 100°C, foi atribuído à evasão de água da matriz polimérica. Este fenômeno, caracterizado como desidratação, representa o primeiro passo no processo de sua degradação térmica. Da mesma forma, em uma pesquisa conduzida por Breda (2017), a análise térmica dos HG de QTS, revelou uma faixa inicial de degradação situada entre 30°C e 100°C. Sendo também correlacionada com o processo de desidratação.

A alteração da pigmentação das formulações que continham QRC evidenciou um processo de instabilidade da molécula quando exposta à luz. Corroborando com os resultados de Dall'Acqua (2012), que investigou a influência da luz na molécula e chegou à conclusão de que os grupos hidroxila localizados nas posições 3, 3' e 4' estão envolvidos não apenas na atividade antioxidante da quercetina, mas também em sua suscetibilidade à degradação pela luz. Portanto, nesse contexto, é essencial que as formulações desenvolvidas sejam protegidas da radiação luminosa e que seu armazenamento seja realizado em frascos que impeçam a incidência direta de luz. Sendo crucial para evitar a alteração da estrutura molecular da quercetina, preservando assim sua integridade.

A caracterização físico-química do filme polimérico obtido, demonstra que seu pH esteve em $6,9 \pm 0,2$, sendo observado uma redução do pH da formulação quando a QRC foi incorporada, passando a $6,5 \pm 0,3$. Porém, ambos se mantiveram na faixa de pH próximo ao neutro, de modo que, segundo Anroop (2013) não ocasione lesões durante sua aplicação.

O grau de intumescimento é reflexo da retenção de água, e está diretamente relacionado a sua capacidade de mucoadesão, bem como a liberação do ativo. O placebo do filme polimérico desenvolvido neste estudo, foi capaz de obter $80,7\% \pm 6,9$ em 5 minutos, tempo máximo que foi possível retirá-lo da saliva artificial sem que ocorresse sua desintegração. Nesse caso, o valor é considerado pouco representativo e inadequado para garantir uma boa adesão e liberação, uma vez que, de acordo com Anroop (2013), o valor ideal deve ser maior que 100%. No entanto, após a incorporação da QRC, o grau de intumescimento obteve um valor de $202,8\% \pm 19,18$, estando dentro do recomendado.

Os filmes desenvolvidos nesta pesquisa, foram submetidos ao ensaio de resistência a dobra, onde se apresentaram intactos até a quantidade de dobras atingir 28 ± 3 . O artigo de Bhutkar (2014) concentrou-se na aquisição de filmes mucoadesivos de QRC utilizando hidroxipropilmetil celulose, e quando seus filmes foram submetidos ao mesmo ensaio, demonstraram capacidade de resistência de 300x sem sinal de rompimento, exibindo uma maior resistência do que os filmes desenvolvidos neste estudo.

O ensaio morfológico, utilizando a metodologia de MEV, realizado neste projeto evidenciou que o filme incorporado com QRC apresentou maior quantidade de poros quando comparado filme controle, além de ser menos compacto. A quantidade de poros observada, corrobora com os resultados de grau de intumescimento obtidos anteriormente, uma vez que os poros funcionam como canais para entrada de água. A discussões de Eulálio (2016) estão em consonância com estes achados, apesar de trabalhar com uma membrana de quitosano, quando esta foi incorporada com QRC foi possível notar maior quantidade de estruturas porosas. Adicionalmente, a composição polimérica do filme contém CMC-Na, que conforme indicado por Lopes (2005), reflete em uma propensão à absorção de água, ou seja, elevando-se o grau de intumescimento. Estes dados corroboram com Lyra (2007), que discute que a importância da absorção de água para a mucoadesão e para liberação do ativo.

Aouada (2008) observou que aumentando a quantidade de seu polímero (poliacrilamida) para liberação de cátions, houve decréscimo no tamanho e na quantidade dos poros de seu HG, levando a uma diminuição na capacidade de absorver água. Bhutkar (2014), em sua pesquisa notou uma tendência oposta. Ele produziu quatro filmes usando hidroxipropilmetil celulose com a adição de carbopol em uma concentração constante de QRC. Os resultados revelaram que à medida que a concentração do polímero era aumentada, o grau de expansão da formulação também aumentava. Esses achados, demonstram que a capacidade de absorver água está relacionada às características intrínsecas do polímero, e não restrita a fatores como a proporção utilizada.

No presente trabalho, a análise estrutural demonstrou similaridade entre o filme placebo e o filme incorporado com QRC, sendo a única diferença entre eles um estiramento de maior intensidade C=C no filme contendo o flavonoide. Segundo Canevarolo (2002), esse tipo de combinação química representa uma ligação estável, sendo esta uma característica interessante ao ponto de vista químico, uma vez que para rompê-la, necessita-se uma energia intermediária. A presença desta ligação quando se avalia FTIR da QRC também é identificada no trabalho de Colombari (2021), que a caracteriza como um alongamento de seus anéis.

Em relação a taxa máxima de liberação *in vitro* durante 24h, o HG de CMC-Na atingiu 32,1% de liberação em 1h. Em contraste, o HG à base de quitosano teve uma liberação de 18,6% após 6 h. Enquanto o filme polimérico, a liberação máxima de 26% ocorreu dentro de 4h. Em comparação, o trabalho de Bhutkar (2014) alcançou concentração máxima de liberação (92,09%) de QRC em 7h30 minutos em um filme contendo uma mistura polimérica de hidroxipropilmetil celulose e carbopol. Enquanto Jangde (2018) elaborou um sistema de liberação lipossomal de carbopol e gelatina contendo QRC para a cicatrização de feridas. Neste estudo foi observado que a liberação *in vitro* da formulação refletiu em uma liberação de 68,31% em 24h de QRC, demonstrando uma liberação mais lenta do ativo, indo de encontro com os achados quanto a liberação da molécula para todas as formulações deste trabalho.

De maneira conjunta, o estudo sistemático de Bernkop-Schnürch, (2012)

discute sobre os sistemas de liberação de medicamentos baseados em QTS, que assim como CMC-Na oferece benefícios, como: redução da frequência de administração do medicamento, menor toxicidade sistêmica e aumento da adesão ao tratamento. Uma das principais vantagens do quitosano é sua capacidade de sofrer degradação gradual em locais específicos do corpo, liberando progressivamente o ativo ao longo do tempo. O autor disserta sobre possibilidade de modificação em sua superfície para promover a adesão seletiva às células-alvo, aumentando a eficácia do tratamento.

Um estudo adicional que fortalece os resultados obtidos com os HG contendo QTS é o trabalho realizado por Cid (2011). Nesse estudo, um HG de QTS a uma concentração de 3% foi elaborado, incorporando celecoxibe. Similarmente ao HG, a formulação desenvolvida por sua equipe exibiu um padrão de liberação que segue uma cinética de pseudoprimeira ordem, em consonância com o desenvolvido nesta pesquisa. É importante salientar que ambos os princípios ativos demonstram uma natureza lipofílica, o que pode influenciar a dinâmica de liberação quando imersos em meio aquoso.

Ainda referente a liberação *in vitro*, observa-se a diferença entre as concentrações liberadas durante o ensaio. O HG de QTS demonstra uma liberação mais lenta, enquanto o HG de CMC-Na reflete numa liberação acentuada. O filme, por sua vez, demonstra características interessantes para liberação controlada, sugerindo ser pela formação de ligações cruzadas entre os polímeros durante a etapa de secagem, como discutido anteriormente por Taresco (2018).

A mucoadesão é crucial para aumentar o tempo de ação da formulação na boca, uma das formas para sua avaliação é através do ensaio de tempo de residência. As formulações obtidas no estudo atual, atingiram tempo de residência iguais ou superiores às descritas na literatura.

Observou-se que após 5h 40 minutos houve descolamento parcial do HG de CMC-Na da mucosa. Enquanto 67 % do HG de QTS se mostraram aderidos parcialmente até 24h, e 33% do filme polimérico se mostraram aderidos totalmente até o fim do ensaio. O estudo de Attia (2010) desenvolveu géis com diferentes bases poliméricas incorporados com diclofenaco sódico, ofloxacina e/ou sua combinação para o tratamento da mucosite oral. Uma de suas formulações utilizou-se CMC-Na na mesma proporção (2%) utilizada no presente trabalho. Para este, o autor relata tempo de 5h30 min à 6h para perda da adesividade. Cabe ressaltar que o método utilizado se mostrou idêntico, porém a realização dos ensaios de Attia (2010) ocorreu em uma placa de vidro e não utilizando material biológico. A permanência de fármacos na mucosa oral pode proporcionar benefícios terapêuticos relevantes, tais como melhorias na eficácia e prolongamento do efeito do medicamento, redução da necessidade de administração frequente e diminuição da dose requerida, como já foi descrito por Anroop (2013).

Quanto aos filmes poliméricos, um filme utilizando hidroxipropilmetil celulose, um polímero também derivado da celulose como o CMC-Na, foi desenvolvido por Abruzzo (2020). Neste caso, ele possuía apenas uma face da formulação carregada com o ativo, obteve tempos de residência de 20h e 24h, quando a face carregada estava voltada para o meio que mimetizava a cavidade oral e voltado para mucosa, respectivamente. Já filme descrito por Lala (2011) utilizando etilcelulose foi capaz de ficar aderido na mucosa em uma faixa de 2,8h à 6,55h. Os filmes de Bhutkar (2014) elaborados com hidroxipropilmetil celulose e carbopol e incorporados com QRC, possuíam tempo máximo de residência, em mucosa animal, de 7h, seguido de 6h55min para as formulações que possuíam maior concentração polimérica em sua composição.

Neste contexto, observa-se que o polímero influencia no tempo de residência, uma vez que HG de QTS e o filme elaborado com CMC-Na de baixa viscosidade são capazes de fornecer uma maior aderência em comparação com o HG de CMC-Na de alta viscosidade. Diversos autores abordaram as distintas propriedades dos excipientes em suas pesquisas. Ramos (2013) e Lopes (2005) discutiram como a capacidade de absorção de água de um HG pode ser atribuída às características da matriz polimérica, especialmente quando o polímero utilizado é hidrofílico. Isso se torna relevante em ambientes úmidos, como a mucosa bucal, onde a matriz polimérica tem a capacidade de absorver água, aumentando assim seu volume e resultando em um HG mais inchado. De maneira complementar, Neves (2011) e Abruzzo (2020) mencionam que a aderência pode envolver mecanismos de interação molecular ou eletrostática com os componentes da superfície da própria mucosa.

Quanto a análise da efetividade antimicrobiana, a metodologia de diluição em caldo com as formulações não possibilitou a obtenção, com clareza, dos resultados referentes ao seu potencial inibitório. A presença de turbidez resultante da desintegração da matriz dificultou a avaliação visual, como também, impediu uma análise precisa da inibição do crescimento bacteriano via espectofotometria-UV.

As investigações de Ahuja (2003) avaliaram de forma comparativa a exposição de um filme polimérico a diferentes condições, sendo estas diluições em caldo e ágar (sólido) contendo os microrganismos associados à periodontite. Os resultados obtidos demonstraram que a diluição em caldo produziu resultados semelhantes à diluição em ágar, mas em um período de tempo mais curto. Essa descoberta indicou que o método de diluição em caldo se apresenta como uma abordagem interessante para análises microbiológicas, oferecendo resultados confiáveis e reduzindo o tempo necessário para a avaliação do efeito antimicrobiano do filme polimérico.

Apesar das dificuldades encontradas na análise dos resultados obtidos no ensaio de atividade inibitória neste trabalho, observa-se que apenas o HG de CMC-Na apresentou atividade bactericida frente a cepa de *E. coli* sensível, tal observação pode ser elucidada pelo fato de que esta cepa específica evidencia uma sensibilidade superior em comparação com as outras variantes testadas, como foi previamente demonstrado pelos resultados obtidos no ensaio de CBM. A partir deste raciocínio, é possível inferir que possa ter havido inibição das demais cepas bacterianas, embora sem necessariamente causar a morte dessas bactérias. No entanto, é evidente que uma metodologia mais apropriada se faz necessária para obter resultados mais conclusivos.

Dado este quadro, emergem-se projeções futuras. Colombari (2021), por exemplo, desenvolve e caracteriza filmes poliméricos contendo QRC e posteriormente, avalia a atividade antibacteriana da formulação frente a *S. aureus* em um teste adaptado de difusão em disco. Porém os filmes obtidos não apresentaram formação de halos de inibição para o microrganismo testado, mostrando também uma limitação da técnica. Em contrapartida, Ahuja (2003) avaliou o potencial do seu filme contendo amoxicilina e metronidazol frente *S. aureus* e *E. coli* com a mesma técnica, obtendo resultados de halo de inibição. Os achados indicam que apesar de limitada, a metodologia utilizada pode oferecer uma alternativa de teste para as formulações aqui obtidas.

Em suma, embora todas as formulações liberem concentrações de QRC acima da CIM e CBM nos primeiros 5 minutos do ensaio, apenas o HG de CMC-Na apresentou efetividade antimicrobiana, ocorrendo exclusivamente frente a cepa sensível de *E. coli*, variante esta que possui a menor CBM. As outras formulações não foram capazes de impedir o crescimento bacteriano de nenhuma variante. É

importante salientar, que o ensaio não dispôs das condições de pH, agitação e temperatura da liberação *in vitro*, sugerindo-se que a cinética de liberação anteriormente descrita e caracterizada por Dash (2010), Fu (2010) e Da-Costa (2002) tenha sido alterada, resultando em uma não liberação do ativo a tempo de impedir o crescimento dos microorganismos que dependiam de uma concentração maior do ativo para serem eliminados.

Quanto as perspectivas futuras estão sendo ponderadas: a realização de investigações relacionadas à viscosidade e à reologia dos HG, bem como as análises termogravimétricas do filme polimérico. De igual modo, a busca pela realização de um delineamento mais robusto quanto a análise antimicrobiana das formulações.

Posteriormente, considera-se a análise *in vivo*, uma vez que permitirá avaliar a comportamento dos HG e filme na cavidade oral canina. E adicionalmente, a efetividade das formulações sob a influência da ação da saliva, atividade mecânica da boca e a alimentação, onde se possa avaliar sua interferência no tempo de residência e na liberação.

A utilização das bases farmacotecnicamente desenvolvidas nesta dissertação, representam uma alternativa para o emprego de combinações de flavonoides e outros componentes advindos de fontes naturais, de modo a aumentar potencialmente a eficácia dos tratamentos. Buscando torná-los uma opção na busca por terapias mais eficazes e com menor propensão ao desenvolvimento de resistência bacteriana.

Em suma, com base nos ensaios microbiológicos deste estudo e nas formulações desenvolvidos a partir desta pesquisa, espera-se que essas descobertas possam contribuir significativamente para abordagens mais eficazes no controle da DP, assim como uma proposta frente a produtos sintéticos como forma de contribuir para o enfrentamento de infecções bacterianas em geral.

6. CONCLUSÕES

- A QRC e a RTN apresentaram atividade antimicrobiana frente a cepas bacterianas gram positivas e gram negativas, sensíveis e resistentes, de importância para doença periodontal canina.
- A QRC demonstrou maior potencial antibacteriano em relação a RTN, com menores valores de CIM e CBM.
- Foi possível desenvolver três formulações distintas contendo QRC. Estas englobaram dois HG, um à base de CMC-Na e outro à base de QTS, assim como um filme polimérico à base de CMC-Na.
- Os ensaios de caracterização demonstraram estabilidade das formulações e obtiveram características adequadas para administração.
- A avaliação *ex vivo* do tempo de residência evidenciou que todas as formulações apresentaram aderência prolongada à mucosa canina.
- Foram conduzidos ensaios para a determinação dos perfis de liberação *in vitro*, e com eles foram observadas variações da taxa e da cinética de liberação para cada formulação.
- Foi avaliada a atividade antibacteriana das formulações, de modo que a eficácia do HG de CMC-Na foi comprovada frente a *E.coli* sensível.
- Através de todos os resultados obtidos, foi possível concluir que a formulação mais promissora foi o HG de CMC-Na.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABINPET. **Associação Brasileira De Indústria Da Indústria Deprodutos Para Animais De Estimação**. Disponível em:< <http://abinpet.org.br/mercado/>> Acessado em: 06 de setembro de 2023.

ABRUZZO, A.; VITALI B.; LOMBARDI F.; GUERRINI L.; CINQUE B.; PAROLIN C.; BIGUCCI F.; CERCHIARA T.; ARBIZZANI C.; Gallucci c.; Luppi, b. Mucoadhesive Buccal Films for Local Delivery of Lactobacillus brevis. **Pharmaceutics**. Italy, v. 12, n. 3, p. 241, 2020.

ADEPU, R.; RAGHAVENDER, K.; KUMAR, V. ; RAMESH, N. A clinical study on the incidence of periodontal diseases in dogs and their surgical management. **The Pharma Innovation Journal**. Neva Deli, v. 7, n. 4, p. 290-292, abr. 2018.

AHUJA, A.; RAHMAN, S.; ALI, J.; CHAUDHRY, R. Effect of dental films containing amoxycillin and metronidazole on periodontal pathogens: microbiological response. **Pharmazie**. Nova Delhi, Índia, v. 58, n. 10, p. 716-720, 2003.

ALVES, M.; CHAVES, D.; BENEVENUTO, B.; FARIAS, B.; COELHO, S.; FERREIRA, T.; CID, Y. Chitosan gels for buccal delivery of Schinus molle L. essential oil in dogs: characterization and antimicrobial activity in vitro. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 92, 2020.

AMIN, M.; KHURRAM, M.; KHATTAK, B.; & KHAN, J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant Staphylococcus aureus. **BMC complementary and alternative medicine**. Pakistan, v. 15, p. 1-12, 2015.

ANDERSEN, Ø.; MARKHAM, K. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Taylor & Francis: Nova Yorque, p. 1239, 2006.

ANGELLOTTI, G.; MURGIA, D.; CAMPISI, G.; DE CARO, V. Quercetin-based nanocomposites as a tool to improve dental disease management. **Biomedicines**. Palermo, v. 8, n. 11, p. 504, 2020.

ANROOP, N.; KUMRIA, R.; HARSHA, S.; ATTIMARAD, M. AL-DHUBIAB, B., ALHAIDER, I. In vitro techniques to evaluate buccal films. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**. Arábia, 2013.

ANVISA. **Definição de Medicamentos Fitoterápicos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>. Acesso em: 13 abr. 2023.

ANVISA. **Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares**. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 20 jun. 2023.

AOUADA, F.; MOURA, M.; MENEZES, E.; NOGUEIRA, A.; MATTOSO, L. Síntese de hidrogéis e cinética de liberação de amônio e potássio. **Revista Brasileira**

de Ciência do Solo. São Paulo, v. 32, p. 1643-1649, 2008.

ARIKWU, S.; PANT, A.; FAROMBI, E. Dietary Antioxidant, Quercetin, Protects Sertoli Germ Cell Coculture from Atrazine Induced Oxidative Damage. **Journal of biochemical and molecular toxicology.** India, v. 26, n. 11, p. 477-485, 2012.

ARWEILER, N.; NETUSCHIL, L.; REICH, E. Antibacterial effect of an ultrasonic device on *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* in vitro. **Quintessence international.** Berlin, v. 47, n. 4, p. 323-330, 2016.

ASATI, S; JAIN, S.; CHOUBEY, A. Bioadhesive or mucoadhesive drug delivery system: a potential alternative to conventional therapy. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics.** Bhopal, v. 9, n. 4-A, p. 858-867, 2019.

AULTON, E. **Pharmaceutics: The Science of dosage form design.** 2.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 682, 2002.

AVANBAKHT S; SHAABANI A. Carboxymethyl cellulose-based oral delivery systems. **International journal of biological macromolecules.** Iran, v. 133, p. 21-29, 2019.

AVDC.**American Veterinary Dental College.**Disponível em: <<https://avdc.org/avdc-nomenclature/>>. Acesso em: 06 de junho de 2023.

AWOYOMI, O.; OJO, O. Antimicrobial resistance in aerobic bacteria isolated from oral cavities of hunting dogs in rural areas of Ogun State, Nigeria. **Sokoto Journal of Veterinary Sciences.** Nigéria, v. 12 n. 3, p. 47-51, 2014.

BAIA, J.; LEMOS, R.; MOREIRA, A.; GIOSO, M. Doença periodontal em cães: revisão de literatura. **Scientific Electronic Archives.** Mato Grosso, v. 10, n. 5, p. 150-162, 2017.

BERNKOP-SCHNÜRCH A, DÜNNHAUPT S. Chitosan-based drug delivery systems. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics.** Innsbruck, v. 81, n. 3, p. 463-469, 2012.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced drug delivery reviews.** Seattle, v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010.

BHUTKAR, K. G. Formulation and evaluation of mucoadhesive herbal buccal patch of *Psidium Guava* L. **Journal of Current Pharma Research,** Índia, v. 5, n. 1, p. 1372, 2014.

BOOTS, A.; HAENEN, G.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European journal of pharmacology.** Holanda, v. 585, n. 2-3, p. 325-337, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **NOTA TÉCNICA 003/2013.** Dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de

métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo, e dá outras providências. Disponível em: anvisa.gov.br. Acesso em: 24 de maio de 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC N.º. 166, de 03 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: anvisa.gov.br. Acesso em: 08 de julho de 2023.

BREDA, C.; Duarte, M.; Assis, O. Análises térmica e mecânica de filmes de quitosana com adições de extrato etanólico de pequi. **.IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**. São Paulo, 2017.

BUKHARI, B.; MEMON, S. MAHROOF-TAHIR, M. BHANGER, M. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Pakistan, v. 71, n. 5, p. 1901-1906, 2009.

CANEVAROLO, Sebastião V. **Ciência dos polímeros**, 3ª edição. Artliber editora: São Paulo, v. 24, p. 282, 2002.

CANINE AND FELINES DENTALS. **Janssen Veterinary Clinic**. Disponível em: <<https://pet.janssenvetclinic.com>> Acesso em: 17 de agosto de 2021.

CARDOSO, J. K. **Mensuração sérica de interleucina-1 β , interleucina 6, interleucina 10 e fator de necrose tumoral α em cães com doença periodontal crônica**. 2012. p. 118. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CHAUDHARI, S.; PATIL, P. Pharmaceutical excipients: a review. *Int J Adv Pharm Biol Chem*. Índia, v. 1, n. 1, p. 21-34, 2012.

CHEN, L.; LU, J.; ZHANG, G.; CHEN, Q.; LI, S.; ZHENG, J.; HUO, C.; WANG, F.; ZHANG, J. Enhancing the solubility, stability and bioactivity of quercetin by liquid antisolvent precipitation technique using polymer surfactant. **Journal of Molecular Liquids**. v 15 pag 247 - 257. Mar 2018.

CHMIELEWSKI, A. G., HAJI-SAEID, M., & AHMED, S. Progress in radiation processing of polymers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. Vienna, v. 236, n. 1-4, p. 44-54, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 30ª edição. Pensilvania, 2020.

COLOMBARI NETO, Jean et al. **Obtenção de filmes de pectina contendo quercetina para uso no tratamento de feridas cutâneas**. 2021. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2021.

COSTA-JÚNIOR, E.; BARBOSA-STANCIOLI, E.; MANSUR, A.;

VASCONCELOS, W; MANSUR, H. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. **Carbohydrate polymers**. Belo Horizonte, v. 76, n. 3, p. 472-481, 2009.

COSTA-JÚNIOR, S.; DE OLIVEIRA SANTOS, J.; DE ALMEIDA CAMPOS, L.; PEREIRA, M.; MAGALHÃES, N.;CAVALCANTI, I. Antibacterial and antibiofilm activities of quercetin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* with resistance profile. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**. Pernambuco, v. 3, n. 5, p. 266213, 2018.

CUNHA, E.; TAVARES, L.; OLIVEIRA, M. Revisiting Periodontal Disease in Dogs: How to Manage This New Old Problem? **Antibiotics**. Lisboa, v. 11 n. 12, p. 1729, 2022.

CURTIS, M.; DIAZ, P.; VAN DYKE, T. The role of the microbiota in periodontal disease. **Periodontology 2000**. London, v. 83, n. 1, p. 14-25, 2020.

CUSHNIE, T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26 n. 5, p. 343–356, 2005.

DA-COSTA, Paulo Jorge Cardoso. **Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Porto, v. 38, p. 141-153, 2002.

DA SILVA, M.; Costa, C; de Sá, F; de Oliveira Borges, L.; Sauáia, T. S. Por que devemos nos preocupar com a saúde bucal de crianças hospitalizadas? **Interagir: pensando a extensão**. Rio de Janeiro, n. 14, 2009.

DA-FONSECA, S.; GALERA, P.; BRITO, D.; PERECMANIS, S.; SILVA, A. ; CARDOSO, L. B.; PIMENTEL, C. Análise microbiológica da placa bacteriana da doença periodontal em cães e o efeito da antibioticoterapia sobre ela. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.41 n. 8, p. 1424-142, 2011.

DALL'ACQUA, S.; MIOLO, G.; INNOCENTI, G.; CAFFIERI, S. The Photodegradation of Quercetin: Relation to Oxidation. **Molecules**. Italy, v. 17, n. 8, p. 8898-8907, 2012.

DASH, S.; MURTHY, P.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Pol Pharm**. Assam v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.

DE ALMEIDA PERTILE, R. A história das técnicas médicas a partir de ilustrações em papiros do Egito antigo. **PosFAUUSP**. São Paulo, n. 10, p. 79-88, 2020.

DE SOUSA, A.; DA SILVA, D.; DE JESUS, L; DA CONCEIÇÃO LUIZ, L.; BATISTA, R. ; BELL, M. ;DOS ANJOS, V. A importância da escolha dos excipientes na manipulação de medicamentos The importance of the choice of excipients in drug manipulation. **Brazilian Journal of Health Review**. Juiz de Fora, v. 4, n. 4, p. 16659-16670, 2021.

DI BELLO, A.; BUONAVOGLIA, A.; FRANCHINI, D.; VALASTRO, C.; VENTRELLA, G.; GRECO, M. F.; CORRENTE, M. Periodontal disease associated with red complex bacteria in dogs. **Journal of Small Animal Practice**. v. 55, n. 3, p. 160-163, 2014.

DIXON, R.; PASINETTI, G. Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. **Plant Physiology**. Oklahoma, v. 154, p. 453–457 2010

DMITRIENKO, S.; KUDRINSKAYA, V. Métodos de extração, pré-concentração e determinação da quercetina. **Journal of Analytical Chemistry**. Moscow, Russia, v. 67, p. 299-311, Abr 2012.

DREAMSTIME. **Estrutura anatômica da maxila superior do cão: lugar e nome dos dentes**. 2021. Disponível em: <https://pt.dreamstime.com/estrutura-anatômica-da-maxila-superior-do-cão-lugar-e-nome-dos-dentes-image116866087>. Acesso em: 13 de abril de 2023.

DRUGBANK. **Rutin**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB04216>>. Acesso em 13 de abril de 2023.

DUPONT, G., De Brito Galvao, J. F., Villarreal, L. Y. B., Pires, M. F. A., & Glickman, L. T. Prevalence and Severity of Periodontal Disease in a Dogs Population in France. **Journal of Veterinary Dentistry**. Italy, v 33 n 2 , p. 90-97, 2016.

EL SALMAWI, K. Application of polyvinyl alcohol (PVA)/carboxymethyl cellulose (CMC) hydrogel produced by conventional crosslinking or by freezing and thawing. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**. Cairo, v. 44, n. 6, p. 619-624, 2007.

ELLIOTT, D.; WILSON, M.; BUCKLEY, C.; SPRATT, D. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **Journal of clinical microbiology**. London, v. 43, n. 11, p. 5470-5476, 2005.

EL-MALAH, Y. Excipientes farmacêuticos: seleção, caracterização e uso. **In Formulação Farmacêutica**. IntechOpen. 2018.

ESCUADERO-CASTANO, N.; PEREA-GARCIA, M.A.; BASCONES-MARTINEZ, A.. Chronic periodontitis review: Evolution and clinic application. **Avances en Periodoncia**. Madrid, v. 20, n. 1, p. 27-37. 2008.

EULÁLIO, ELIZA JULIANA DA COSTA. **Membranas de quitosana e quercetina para aplicação em ulcerações epiteliais: desenvolvimento e caracterização**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2016.

EVERETTE, J. ; BRYANT, Q.; GREEN, A. ; ABBEY, Y.; WANGILA, G.; WALKER, R.. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the FolinCiocalteou reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington,

v. 58, p. 8.139-8.144, 2010.

FARHADI, F.; KHAMENEH, B.; IRANSHAHI, M.; IRANSHAHI, M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. **Phytotherapy Research**. Iran, v 33, n. 1, p. 13-40, 2019.

FERNANDES, A.; BORGES, B.; REIS, C.; SEPÚLVEDA, R. V.; SOUSA, C. Prevalência da doença periodontal em cães e ciência dos proprietários a respeito da doença. **Ceres**. Viçosa, v. 59, n. 4, 2015.

FERRARINI, M.; BABY, A.; PINTO C. ; VELASCO, M. ; PINTO, T. ; KANEKO, T. M. Influência do Kollidon® 90F e do Polyox® WSR301NF na força de adesão de comprimidos bucais de clorexidina. **Latin American Journal of Pharmacy**. São Paulo, v. 26 n. 4 p. 541, 2007.

FERREIRA, ANDERSON DE OLIVEIRA. **Guia Prático da Farmácia Margistral**. 4. ed., São Paulo: Pharmabooks. 736 p, 2010.

FU, Y.; KAO, W. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert opinion on drug delivery**. Madison, v. 7, n. 4, p. 429-444, 2010.

GARANAYAK, N.; DAS, M.; PATRA, R.; BISWAL, S.; PANDA, S. Effect of age on dental plaque deposition and its control by ultrasonic scaling, dental hygiene chew, and chlorhexidine (0.2% w/v) in dogs. **Veterinary world**. v. 12 n. 11, 2019.

GASNER, N. ; SCHURE, R. **Periodontal disease**. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. Toronto. 2022.

GIOSO, M.; CARVALHO, V. G. Métodos Preventivos para a manutenção da boa saúde bucal em cães e gatos. **Clínica Veterinária**. São Paulo, v. 9, p. 68-76, 2004.

GIOSO, M. **Odontologia Veterinária: para o clínico de pequenos animais**, 2 ed. Minha: São Paulo, 145 p, 2007.

GORREL, C. **Odontología de pequeños animales**. 1.ed. Espanha: Elsevier, p.241, 2010.

GOVINDASAMY, K.; RAMLI, M.; PASBAKSH, P.; PUSHPAMALAR, V.; SALAMATINIA, B. Chitosan/cellulose/halloysite membranes produced using solvent casting method. **Polymers and Polymer Composites**. Malaysia, v. 23, n. 5, p. 325-332, 2015.

GUGLIELMI, D.; NEVES, W.; BUOSO, A. Caracterização da carboximetilcelulose comercial. **Cerâmica Industrial**. Criciúma, v. 13, n. 5, 2008.

GUL, A.; KUNWAR, B.; MAZHAR, M.; FAIZI, S.; AHMED, D.; SHAH, M. ;SIMJEE, S. U. Rutin and rutin-conjugated gold nanoparticles ameliorate collagen-induced arthritis in rats through inhibition of NF-κB and iNOS activation. **International Immunopharmacology**, v. 59 p.310–317, 2018.

GUPTA, R.; GUPTA, D.; LALL, R.; SRIVASTAVA, A.; SINHA, A. Nutraceuticals in Periodontal Health and Diseases in Dogs and Cats. *Nutraceuticals in Veterinary Medicine*, p. 447-466, 2019.

GUTIÉRREZ-VENEGAS, G.; GÓMEZ-MORA, J.; MERAZ-RODRÍGUEZ, M.; FLORES-SÁNCHEZ, M.; ORTIZ-MIRANDA, L. Effect of flavonoids on antimicrobial activity of microorganisms present in dental plaque. *Heliyon*. Ciudad de Mexico, v. 5, n. 12, 2019.

HA, J. **Prevalência de afecções orais e fatores de risco para a doença periodontal em cães**. 2013, p. 79 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista, Presente Prudente, 2013.

HARVEY, C. E.; EMILY, P.P. **Small Animal Dentistry** St Louis: Mosby Year Book. p.413. 1993.

HARVEY, C.; SERPELL, J. ; DARWENT, C. Dental pathology of domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) reflects selection for exaggerated craniofacial traits. **Scientific Reports**. v. 9 n. 1, p. 1-11. 2019.

HOLMSTROM, S. E., & FITCH, P. F. **Veterinary Dentistry: A Team Approach** 3rd Edition. St. Louis: Elsevier 464 p. 2013

HORN, D.; RIEGER, J. Organic nanoparticles in the aqueous phase-theory, experiment, and use. **Angew**. *Germânia* v. 40, n. 23, p. 4330-4361, Nov. 2001.

HUGHES, D.; DAN, A. Evolutionary trajectories to antibiotic resistance. **Annual review of microbiology**. Uppsala, v. 71, p. 579-596, July 2017.

HWANG, M.; SONG, N.; KANG, N.; LEE, K.; LEE, H. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is required for tumor necrosis factor- α -induced upregulation of matrix metalloproteinase-9: Its direct inhibition by quercetin. **The international journal of biochemistry & cell biology**. Seul, Coreia v. 41, n. 7, p. 1592-1600, 2009.

JAVANBAKHT, S.; SHAABANI, A. Carboxymethyl cellulose-based oral delivery systems. **International journal of biological macromolecules**. Iran, v. 133, p. 21-29, 2019.

KAČÍROVÁ, J.; MAĐAR, M., ŠTRKOLCOVÁ, G.; MAĐARI, A.; NEMCOVÁ, R. Dental biofilm as etiological agent of canine periodontal disease. **In Bacterial Biofilms**. IntechOpen.Slovakia, 2019.

KALASZ, H.; ANTAL, I. Drug excipients. **Current medicinal chemistry**. Budapeste, v. 13, n. 21, p. 2535-2563, 2006.

KNAUER, P., HAHN, T., KÖHLER, A., & STROHRIEGL, P. Initiator-free crosslinking of oxetane functionalized low bandgap polymers: an approach towards stabilized bulk heterojunction solar cells. **Journal of Materials Chemistry C**.

Germany, v. 4, n. 43, p. 10347-10357, 2016.

KONG, M.; CHEN, X.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International journal of food microbiology**. Shandong, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KURTIŞ, B.; ÜNSAL, B.; ÇETINER, D.; GÜLTEKIN, E.; ÖZCAN, G.; ÇELEBI, N.; OCAK, Ö. Effect of polylactide/glycolide (PLGA) membranes loaded with metronidazole on periodontal regeneration following guided tissue regeneration in dogs. **Journal of periodontology**. v. 73 n. 7, p. 694-700. 2002.

KUTZ, Myer. **Applied plastics engineering handbook: processing and materials**. Oxford: Elsevier, 623 p., 2011.

LALA, R.; THORAT, C.; GARGOTE, S.; AWARI, G. Preparation of buccoadhesive polymeric film of ketoprofen and its evaluation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Índia, v. 6, n. 6, 2011.

LERNER, U. H.; EBERSOLE, J. L.; OLSEN, I. Intracellular survival of oral bacteria in periodontal cells. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 221, 2019.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Germany, v. 50, n. 1, p. 47-60, 2000.

LI, X.; WU, Z.; FU, J.; ZHANG, L.; HAN, B. Determination and correlation of the solubilities of quercetin and rutin in various solvents. **Journal of Chemical & Engineering**. v. 64, n. 5, p. 2205-2210, 2019.

LIECHTY, W.; KRYSZCIO, D.; SLAUGHTER, B.; PEPPAS, N. Polymers for Drug Delivery Systems. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**. Austin, Texas., v. 1, p. 149-173, 2010.

LIMA, C.; BENJAMIM, S.; SANTOS, R. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte, Enferm**, São Paulo, p. 105-113, 2017.

LIU Y, AI L, JIANG X, LIU J, LI R, MA Y, OUYANG P. Exploration of intrinsic properties of quercetin by theoretical calculations. **Journal of Molecular Structure**. V. 1, n. 1043, p. 9-14, 2013.

LIU, Y.; AI, L. JIANG, X.; LIU, J., LI, R., MA, Y.; OUYANG, P. Theoretical analysis and experimental verification of the pKa values of quercetin. **Journal of Molecular Structure**. v 15 p 641-645, Oct 2014.

LLORENS, M. P.; LLORET, P. P.; SAN ROMÁN, F. Historia de la Odontología. In: **Atlas de odontología en pequeños animales**. Madrid: Grass Edicions. p. 9-16. 1998.

LOPES, Carla Martins; LOBO, José Manuel Sousa; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Porto, v. 41, p. 143-154, 2005.

LYRA, M.; SOBRINHO, J.; BRASILEIRO, M.; ROCA, M.; BARRAZA, J.; VIANA, O.; NETO, P. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. *Lat. Am. J. Pharm.* São Paulo, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MADEIRA, B. A. M. **Patologias orais: será que os tutores portugueses sabem o estado da saúde oral dos seus animais?** Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária). Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra, p. 43, 2017.

MANO, E.; MENDES, L. **Introdução a polímeros**, 2 ed. Blücher: São Paulo, 208 p 1999.

MARK, James E. **Physical properties of polymers handbook**. New York: springer, p. 723, 2007.

MARSH, P. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Advances in dental research**. England, v. 8, n. 2, p. 263-271, 1994.

MILKEN, V.; MARTINS F.; Silva, F. ; Rezende, R.; Lima, T. Prevalência de cálculo dental em cães no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Arq. ciênc. vet. zool.** Minas Gerais, p. 57-60, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **FARMACOPEIA BRASILEIRA** 2.ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p. 224, 2012.

MUPPALANENI, S.; OMIDIAN, H. **Polyvinyl alcohol in medicine and pharmacy: a perspective**. *J. Dev. Drugs. USA*, v. 2, n. 3, p. 1-5, 2013.

NAFEE, N.; BORAIE, M.; ISMAIL, F.; MORTADA, L. Design and characterization of mucoadhesive buccal patches containing cetylpyridinium chloride. **Acta pharmaceutica** (Zagreb, Croatia), v. 53, n. 3, p. 199-212, 2003.

NAGARKAR, R.; PATEL, J. Polyvinyl alcohol: A comprehensive study. **Acta Sci. Pharm. Sci**, v. 3, n. 4, p. 34-44, Philadelphia, 2019.

NEGAHDARI, R.; BOHLOULI, S.; SHARIFI, S.; MALEKI DIZAJ, S.; RAHBAR SAADAT, Y.; KHEZRI, K.; RAEESI, S. Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. *Phytotherapy Research*. Iran v. 35, n. 4, p. 1719-1738, 2021.

NEVES, J.; BAHIA, M.; AMIJI, M.; SARMENTO, B. Mucoadhesive nanomedicines: characterization and modulation of mucoadhesion at the nanoscale. **Expert Opin Drug Deliv**. Porto, Portugal, v. 8, n. 8, p. 1085-1104, 2011.

OLIVEIRA, A.; SILVA, R. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista eletrônica de enfermagem**. Minas Gerais, v. 10, n. 1, 2008.

ORGANIZAÇÃO PAN- AMERICA DE SAÚDE: **Resistência Antimicrobiana**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>>. Acesso em: 01, fevereiro de 2023.

OTSUKA, H.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, n. 3, p. 403-419, 2003.

PAL, A.; TRIPATHI, A. Quercetin inhibits carbapenemase and efflux pump activities among carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Apmis*. Índia, Pal, A., & Tripathi, A. (2020). Quercetin inhibits carbapenemase and efflux pump activities among carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Apmis**, 128(3), 251-259.

PARK, H.; HWANG, H.; KIM, S.; HAN, S. Protective effect of rutin against oxidative stress-induced cell damage in vitro and in vivo. **Archives of pharmacal research**, v. 40 n. 9, p. 1050-1062. 2017.

PATEL, H.; PATEL, R.; PATEL, M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **Int. J. PharmTech Res.** Índia, v. 1, n. 2, p. 299-303, 2009.

PATEL, P.; AHIR, K.; PATEL, V.; MANANI, L.; PATEL, C. Drug-Excipient compatibility studies: First step for dosage form development. **The Pharma Innovation**. Índia, v. 4, n. 5, p. 14, 2015.

PATIL, P. Pharmaceutical excipients: a review. *Int J Adv Pharm Biol Chem*. India, v. 1, n. 1, p. 21-34, 2012. E HASSAN, N.; Ahad, A.; Ali, M., ; Ali, J. Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**. Índia, v. 7, n. 1, p. 97-112, 2010.

PAUDWAL, G.; RAWAT, N.; GUPTA, R.; BALDI, A.; SINGH, G.; GUPTA, P. Recent advances in solid dispersion technology for efficient delivery of poorly water-soluble drugs. **Current pharmaceutical design**. Índia, v. 25, n. 13, p. 1524-1535, 2019.

PENMAN, S.; HARVEY, C. E. **Manual of Small dendistry**. Chetenhan: British Small animal Veterinary Association, 1993. p. 37.

PEREIRA, G. **Desenvolvimento de filme polimérico oral contendo extrato aquoso de Psidium guajava L. para tratamento da doença periodontal em cães**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020.

PUBCHEM. **Quercetin**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 13 de abril de 2023.

PUBCHEM. **Rutin**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 13 de abril de 2023.

RAAFAT, D.; VON BARGEN, K.; HAAS, A. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. **Applied and environmental microbiology**. Germany, v. 74, n. 12, p. 3764-3773, 2008.

RAMOS, G.; MORAIS, D. Revisão de literatura sobre excipientes em farmácia de

manipulação. **Foco**. São Paulo, v. 4, p. 11-26, 2013.

RIGGIO, M.; LENNON, A.; TAYLOR, D. ; BENNETT, D. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary microbiology**. UK, v. 150, n. 3-4, p. 394-400, 2011.

RISBUD, MAKARAND. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. **Journal of controlled release**. Índia, , v. 68, n. 1, p. 23-30, 2000.

ROBERT A. WEISS. Polymer modification is an important tool for tailoring the properties of polymers to meet specific application requirements. **Polymer Engineering and Science**. Connecticut, 1995.

ROBERT, J. ; CASERIO, M. **Basic principles of organic chemistry**. Disponível em: 29.3: Types of Polymers - Chemistry LibreTexts. Acesso em: 16/08/2023.

ROWE, C.; SHESKEY, P.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th Edition. Pharmaceutical Press: Inglaterra, p. 944, 2009.

ROZA, R. **Odontologia em pequenos animais**. 1. ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária LTDA. P. 361, 2004.

SAHA, S.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; DAOUD, J.; TABRIZIAN, M.; PRAKASH, S. Novel probiotic dissolvable carboxymethyl cellulose films as oral health biotherapeutics: in vitro preparation and characterization. **Expert opinion on drug delivery**. Canada, v. 10 n. 11, p. 1471-1482, 2013.

SAIDLA, E.; ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Odontologia: considerações genéticas, ambientais e outras. Tratado de medicina veterinária interna: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2014. v. 2. cap. 132. p. 1184, 2014.

SANTOS, R; Guimaraes, G.; Nobre, M.; Portela, A.. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista brasileira de plantas medicinais**. Paraíba, v. 13, p. 486-491, 2011.

SANTOS, T. **Preparação e caracterização de partículas de Eudragit® L100 contendo nifedipino e comparação de parâmetros cinéticos com cápsulas comerciais de nifedipino**. 2013. 84 p. dissertação (Pós-Graduação em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Juazeiro - BA, Juazeiro - BA, 2013.

SEKKAT, N.; VIANA, G. ; FURTADO, E.; HIDALGO, Á.; ALCALDE, Á. A Biodegradable Polymer Film Containing Metronidazole For Periodontal Treatment In Dogs: Efficacy And Safety. **Bmc Veterinary Research**.v. 14 n. 1, p. 299, 2018.

SEKI, Y.; ALTINISIK, A.; DEMIRCIOĞLU, B.; TETIK, C. Carboxymethylcellulose (CMC)-hydroxyethylcellulose (HEC) based hydrogels: synthesis and characterization. **Cellulose**, v. 21, p. 1689-1698, 2014.

SHAFIEI, Z.; RAHIM, Z.; PHILIP, K.; THURAIRAJAH, N. Antibacterial and anti-adherence effects of a plant extract mixture (PEM) and its individual constituent extracts (*Psidium* sp., *Mangifera* sp., and *Mentha* sp.) on single-and dual-species biofilms. **PeerJ**. V. 4, p. 2519, 2016

SHARMA, N.; SHAMSUDDIN, H. Association between respiratory disease in hospitalized patients and periodontal disease: A cross-sectional study. **Journal of periodontology**. Índia, v. 82, n. 8, p. 1155-1160, 2011.

SHYLAJA. M. ; PETER, K. **Handbook of herbs and spices**. v.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, p. 360, 2004.

SILVA, T.; BOLZAN, T.; ZANINI, M.; ALENCAR, T.; RODRIGUES, W; BASTOS, K.; SEVERI, J.; RESENDE, J.; VILLANOVA, J. Development and Evaluation of a Novel Oral Mucoadhesive Ointment Containing Pomegranate Peel Extract as an Adjuvant for Oral Hygiene of Dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**. Espírito Santo, Brasil, v. 37, n. 3, p. 133-140. 2020.

SIMÕES, G. J. M. **Avaliação dos níveis séricos de proteína c reativa em cães com doença periodontal**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2016.

SINDAN. **Sindicato Nacional para Saúde Animal**. Disponível em: <<https://sindan.org.br/>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.

STURGEON, A.; STULL, J.; COSTA, M. WEESE, J. Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene. **Veterinary microbiology**. Canada, v. 162, n. 2-4, p. 891-898, 2013.

SUPPIAH, K.; LENG, T.; HUSSEINSYAH, S.; RAHMAN, R.; KEAT, Y.; HENG, C. Thermal properties of carboxymethyl cellulose (CMC) filled halloysite nanotube (HNT) bio-nanocomposite films. **Materials Today: Proceedings**. Malaysia, v 16, p 1611-1616, 2019.

TARAWNEH, O.; HAMADNEH, I.; HUWAITAT, R.; AL-ASSI, A.; EL MADANI, A. Characterization of chlorhexidine-impregnated cellulose-based hydrogel films intended for the treatment of periodontitis. **BioMed Research International**. Jordania, 2021.

TARESCO, V.; Gaisford, S. **Controlled release from crosslinked polymeric networks. Expert opinion on drug delivery**. UK, v 15 n 7, p. 677-692. 2018.

TOLEDO, P.; Limeira, D.; Siqueira, N.; Petri, D. The preparation and physical properties of sodium carboxymethyl cellulose/poly(acrylic acid) interpenetrating polymeric network hydrogels. **Cellulose**. São Paulo, v. 26, p. 597-615, 2019.

USP. E-disciplinas. **Tabela de valores de absorção no infravermelho para compostos orgânicos**. Disponível em: <<https://edisciplinas.usp.br/>> Acesso em: 29

de Julho de 2023.

VENTURINI, M. ; FERRO, D. ; CORRÊA, H. L; GIOSO, M. Doenças da cavidade oral atendidas no Centro Odontológico Veterinário durante 44 meses-estudo retrospectivo. **Revista Nosso Clínico**. São Paulo, v. 10, p. 6-14, 2007.

WALLIS, C.; HOLCOMBE, L. A review of the frequency and impact of periodontal disease in dogs. **Journal of Small Animal Practice**. UK, v. 61, n. 9, p. 529-540, 2020.

WINKEL, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant physiology**. Virgínia, v. 126, n. 2, p. 485-493, 2001.

WOŹNICKA, E.; KUŹNIAR, A.; NOWAK, D.; NYKIEL, E.; KOPACZ, M.; GRUSZECKA, J.; GOLEC, K. Comparative study on the antibacterial activity of some flavonoids and their sulfonic derivatives. **Acta poloniae pharmaceutica**. Polónia v. 70, n. 3, p. 567-571, 2013.

XIE, Y.; GUO, Q.; WANG, R.; ZHANG, S.; XU, Y.; YU, X.; LIU, J.; TAN, H. Simultaneously enhancing of solubility and anti-tumor activity of quercetin by sulfonate substitution. **European journal of medicinal chemistry**. 2019.

XIE, Y.; YANG, W.; TANG, F.; CHEN, X.; REN, L. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current medicinal chemistry**, Canada v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

YANG, H.; LI, K.; YAN, H.; LIU, S.; WANG, Y.; HUANG, C. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive–dentin interfaces. **Scientific reports**; Wuhan, v.7 n. 1, p. 8189.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT-Food Science and Technology**. v. 41 n.6, p. 1060–1066, 2008.

YOU, K. M.; JONG, H.; KIM, H. Inhibition of cyclooxygenase/lipoxygenase from human platelets polyhydroxylated/methoxylated flavonoids isolated from medicinal plants. **Archives of Pharmacal Research**, v. 22 n.1, p.18–24.,1999.

YU, X.; LI, Y.; ZHANG, H.; SU, Y.; ZHOU, W.; ZHANG, Z.; LIU, R. Rutin inhibits amylin-induced neurocytotoxicity and oxidative stress. **Food & Function**. v. 6 n.10, p. 3296–3306, 2015.

ZENG, Y.; NIKITKOVA, A.; ABDELSALAM, H., LI, J.; XIAO, J. Activity of quercetin and kaempferol against *Streptococcus mutans* biofilm. **Archives of oral biology**. New York, v. 98, p. 9-16, 2019.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; STREISAND, J. Oral mucosal drug delivery: clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. **Clinical pharmacokinetics**. USA, v. 41, p. 661-680, 2002.

ZHAO, J.; YANG, J.; XIE, Y. Improvement strategies for the oral bioavailability of

poorly water-soluble flavonoids: An overview. **International journal of pharmaceuticals**. Shanghai, v. 570, p. 118642, 2019.

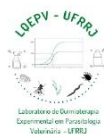
ANEXOS

Anexo A. Autorização para Utilização da Mucosa Canina

Anexo B. Certificado de Microchipagem do Animal

Anexo C. Relatório de Necrópsia do Animal

Anexo A. Autorização para Utilização da Mucosa Canina



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituto de Veterinária – Anexo I
Departamento de Parasitologia Animal
Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária



Seropédica, 04 de setembro de 2023

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que autorizei a discentes Taynara Monsores E Silva do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ utilizar no seu trabalho de conclusão do Mestrado a mucosa da cavidade bucal do cão de número microchip 595340 (certificado em anexo). Informo que o animal é pertencente ao plantel do Biotério do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Animal do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da UFRRJ. Este biotério está devidamente cadastrado no CUICA. Este animal foi eutanasiado (ponto final humanitário) em decorrência de evolução de um quadro clínico de encefalite necrosante crônica multifocal severa associado a nefrosclerose crônica e doença renal grau 4 (laudo em anexo). Não estava em experimentação.

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIO BARBOUR SCOTT
Data: 04/09/2023 16:28:39 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Fabio Barbour Scott
Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Anexo B. Certificado de Microchipagem do Animal

Por meio do presente

Eu, Médico Veterinário Fábio Barbour Scott
outorgo o

CERTIFICADO DE MICROCHIPAGEM

a J.F. R.R.S., proprietário do(a)
(raça) Beagle nome Jalileu,
identificado com o Microchip ISO FDX-B 134.2 KHz **AnimalITAG®**
n° 963 595340, no dia 11 de Março de 2012
na cidade de Senopécia.

Fábio Barbour Scott
Professor Adjunto
UNIFRAN - UNESP
Rua: 17,3660
Assinatura e Carimbo

KORTH
RFID

e-mail: animalltag@animalltag.com.br website: www.animalltag.com.br DDG: 0800 131 963

Anexo C. Relatório de Necropsia do Animal

	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE VETERINÁRIA DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA SETOR DE ANATOMIA PATOLÓGICA (SAP)
	(21) 2682-2805 http://institucional.ufrrj.br/sap/

Seropédica/RJ, 11 de maio de 2023

Resultado de Necropsia 39786

Identificação: Galileu Espécie: canina. Raça: Beagle. Sexo: macho. Idade: 10 anos.	Médica Veterinária: Isabelle Vilela Bonfim. CRMV: 18062 E-mail: isabelle_vilela@hotmail.com Telefone: (21) 97874-4321.
Data e hora da morte: 30/3/2023, 16:20 horas. Data da necropsia: 11/4/2023, 13 horas.	Tutor: Fábio Barbour Scott Procedência: LQEPV / UFRuralRJ Município: Seropédica, RJ.
Data de entrega do resultado: 11/5/2023	

HISTÓRICO CLÍNICO: O histórico foi fornecido pela médica veterinária solicitante: "Paciente estava em acompanhamento para doença renal crônica (DRC) há mais de anos. Em outubro de 2022 iniciou sintomatologia neurológica: reflexo de ameaça reduzido, sensibilidade nasal ausente no lado direito, bem como assimetria facial. No exame de reação postural, notou-se diminuição de propriocepção no lado esquerdo e propriocepção ausente em membro pélvico direito. Apesar dos sinais neurológicos, paciente apresentou-se em alerta e responsivo ao meio. Exames laboratoriais indicavam leucocitose com neutrofilia sem desvio à esquerda e anemia arregenerativa. Tratamento clínico foi realizado e, após 15 dias o paciente teve importante melhora, com remissão dos sinais descritos. Animal ficou em acompanhamento ao longo dos meses subsequentes. Contudo, no dia 16/3 apresentou episódios de convulsões, porém, estabilizou no mesmo dia após intervenção clínica. Exame de sangue indicavam anemia arregenerativa, além de creatinina 2.2 mg/dL. Nos primeiros dias após o ocorrido o animal foi apresentando melhora, porém, no dia 29/3 houve piora importante. Avaliação clínica indicou ausência de propriocepção nos membros pélvicos, propriocepção reduzida em membros torácicos, reflexo de dor superficial e profunda presente e mioclonia em região da face. Devido à idade avançada e a piora clínica observada, optou-se pela eutanásia do animal". Após eutanásia o cadáver foi congelado e, posteriormente encaminhado ao SAP/UFRuralRJ para necropsia.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA: Submetido à necropsia um canino, Beagle, macho, adulto, com comprimento do corpo de 42 centímetros (da articulação atlanto-occipital à base da cauda) e 39 centímetros de altura (da cartilagem da escápula à falange distal). Carcaça em estado de conservação regular. **Exame externo:** escore corporal 4 (escala 1 a 5) com adequado volume de massa muscular e marcada quantidade de gordura depositada na carcaça. **Exame interno:** **Cavidade abdominal:** rins: bilateral e difusamente firmes, com áreas multifocais deprimidas, bem delimitadas, firmes e brancas. A superfície capsular é difusamente irregular e, há áreas multifocais com aderência da capsula renal se ao parênquima adjacente. Ao corte, nota-se desde a cortical até a região medular, múltiplas áreas bem delimitadas, em cunha, firmes e brancas. **Demais órgãos sem alterações macroscópicas significativas.**

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA: Seções histológicas compostas por fragmentos de órgãos em estado de conservação regular. **Telencéfalo, hemisseção a nível de tálamo:** multifocalmente na substância cinzenta cortical há marcada perda da arquitetura da neuropila e acentuada quantidade de células com citoplasma eosinofílico claro abundante e frequentemente vacuolizado e com núcleos lateralizados hiperromáticos (células gitter), entremeados por severo aumento do espaço intersticial (edema). Frequentemente nota-se em meio à essas áreas moderada quantidade de hemácias extravasculares (hemorragia) e grande número de macrófagos com citoplasma abundante e repletos de pigmentos marrons e ligeiramente refringentes (hemossiderose). Observa-se marcada perda neuronal e das células da glia e, por vezes, há neurônios com citoplasmas hiperesinofílicos e retraídos e com núcleos fantasmas (necrose neuronal). **Rim:** multifocalmente, os túfos glomerulares são hiperceculares e há moderado espessamento da capsula de Bowman. Por vezes, alguns glomerúlos apresentam-se moderadamente retraídos e com aderência entre o epitélio visceral e o epitélio parietal da cápsula de Bowman (sinéquia), além de moderada proliferação de tecido conjuntivo fibroso (glomeruloesclerose). No espaço intertubular há áreas multifocais com acentuada proliferação de colágeno e tecido conjuntivo fibroso. Há grande número de artérias e arteríolas de pequeno calibre com lúmen reduzido de volume e com a túnica média severamente expandida por material marcadamente hialino (arteriosclerose hialina). **Não foram observadas alterações histológicas nas seções de pele, músculo esquelético, esôfago, traqueia, pulmão, intestinos, pâncreas, baço, fígado, linfonodo, e coração.**

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO: Telencéfalo, hemisseção a nível de tálamo: encefalite necrosante crônica multifocal severa. **Rim:** glomerulonefrite membranoproliferativa crônica multifocal a coalescente severa associada a fibroplasia intersticial (nefroesclerose crônica).



Prof. Daniel Guimarães Ubiali
 CRMV/RJ 13.721

Daniel Guimarães Ubiali
 CRMV/RJ 13.721
 Prof. Patologia Veterinária

Asheley Henrique Barbosa Pereira
 CRMV/RJ 16.899
 Doutorando em Patologia Veterinária

