



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

IRISVALDO LIMA GUEDES

**NANOCARREADOR LIPÍDICO CONTENDO EUGENOL PARA A HIGIENE DE
PRÓTESES DENTÁRIAS E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CONTRA BIOFILMES
DE *CANDIDAS***

Teresina

2024

IRISVALDO LIMA GUEDES

NANOCARREADOR LIPÍDICO CONTENDO EUGENOL PARA A HIGIENE DE PRÓTESES DENTÁRIAS E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CONTRA BIOFILMES DE *CANDIDAS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia-PPGO da Universidade Federal do Piauí- UFPI, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Ciências Odontológicas

Linha de Pesquisa: Biociências e Materiais Odontológicos

Orientador(a): Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho

Coorientador (a): Prof. Dr. Gláuber Campos Vale

Teresina

2024

IRISVALDO LIMA GUEDES

NANOCARREADOR LIPÍDICO CONTENDO EUGENOL PARA A HIGIENE DE PRÓTESES DENTÁRIAS E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CONTRA BIOFILMES DE CANDIDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia-PPGO da Universidade Federal do Piauí- UFPI, na área de Ciências Odontológicas, e linha de pesquisa Biociências e Materiais Odontológicos, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador (a): Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho

Coorientador (a): Prof. Dr. Gláuber Campos Vale

Aprovado em (dia) de (mês) de (ano)

COMISSÃO EXAMINADORA

Nome

Orientador(a): Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho

Nome

Examinador(a) interno: Prof. Dr. Patrick Veras Quelemes

Nome

Examinador (a) externo: Profa. Dra. Ana Amélia Moreira Lira

DEDICATÓRIA

..... aos meus pais, que foram o alicerce para a construção dos meus sonhos, me dando muita força e carinho.

----- aos meus irmãos pelo apoio de sempre que me fizeram seguir em frente.

**A dedicação especial vai para minha avó maria que partiu para bem longe de mim!
“Vó, consegui obrigado pelas suas orações diárias e por todo o amor que a senhonhra me deu.... Te amo pra sempre”**

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, fonte de toda sabedoria e inspiração, agradeço pela força e guia durante a jornada do mestrado.

À minha amada família, meu porto seguro e base inabalável:

Pai Valmir, mãe Irene, irmãos Valderlane, Rinária e Valeram: por acreditarem em mim e me incentivarem desde o início, com amor incondicional e apoio constante.

À minha segunda família, que surgiu como um raio de sol em minha vida:

Professora Regilda, senhor Marcos, João Marcos e Rodrigo: por me acolherem de braços abertos, me guiarem com sabedoria e tornarem esses anos inesquecíveis. Minha eterna gratidão por tudo que fizeram por mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO):

Professores e amigos de turma: por cada aprendizado compartilhado, pela oportunidade de conhecer pessoas incríveis e construir laços de amizade.

Ao LADERMO, minha casa durante esses dois anos:

Matheus, Ana Márcia, Vitória, André, Gesley, Gláucia, Ivana, Camila, Leandro, Meiryellen, Diego, Rose e Laércio: por cada aprendizado, palavra amiga e colaboração essencial para o meu desenvolvimento.

Ao Professor André: meu orientador, mentor e amigo, por sua inesgotável fonte de conhecimento, confiança e ensinamentos que me marcarão para sempre. Sou eternamente grato por sua presença em minha vida.

A todas as parceiras que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho:

Departamento de Graduação de Farmácia, NANOSFAR, LIMAV, Departamento Parasitologia e Microbiologia, Núcleo de Pesquisa de Pós-Graduação da UFDPAR, Laboratório de Física e Laboratório de Química (LAGO), pelo apoio fundamental e expertise que tornaram este projeto possível.

Ao Professor Gláuber: meu coorientador, por suas valiosas contribuições, ensinamentos e por me guiar com sabedoria e dedicação.

A todos os meus amigos e demais familiares: pelo apoio incondicional, incentivo e por acreditarem em meus sonhos.

RESUMO

Introdução: O eugenol apresenta eficácia comprovada contra biofilmes de *candidas* que tem alta prevalência em usuários de próteses dentárias. No entanto, é volátil, tem pouca solubilidade em água e tóxico em doses maiores. A sua encapsulação em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) pode ser viável para o desenvolvimento de novos sanitizantes para a higiene das peças protéticas, já que esse sistema (CLNs) protege o fármaco de degradação, melhora a sua solubilidade, modula sua liberação e, portanto, pode manter sua atividade mesmo em doses menores. **Objetivo:** Desenvolver uma dispersão sanitizante, para a higiene de próteses dentárias, através de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) contendo eugenol e avaliar sua eficácia contra biofilmes de *Candidas*. **Metodologia:** A formulação foi preparada pelo método de ultra-sonicação e caracterizada quanto ao tamanho de partícula (TP), índice de polidispersidade (IPD), potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulamento (EE), morfologia em microscópio de força atômica (MFA). Adicionalmente, a cinética de liberação foi realizada a partir da utilização de células de Franz. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo e Atividade antifúngica foi avaliada a partir da aplicação de quatro grupos de tratamento (formulação nanoestruturada contendo eugenol (FNE), Eugenol livre (EL), solução salina (SS) e formulação sem o fármaco (FNB)), por oito horas, em biofilmes de *candidas albicans* e *glabata* aderidos em trinta e dois Corpos de prova de resina acrílica de polimetilmetacrilato (PMMA). **Resultados:** As nanopartículas da FNE apresentaram tamanho por DLS de $199,5 \pm 2,55$, alta homogeneidade ($0,07 \pm 0,02$) e EE ($83,07 \pm 0,23$), PZ negativo ($-25,86 \pm 0,65$) e forma esférica. Além disso, obteve liberação controlada (44,21%) por 24 horas. As CIMs do EL, para as *candidas albicans* e *glabata*, foram de até 10 ($64 \mu\text{g/mL}$) e 8 ($128 \mu\text{g/mL}$) vezes (respectivamente) maiores do que as CIMs da FNE ($6 \mu\text{g/mL}$ e $16 \mu\text{g/mL}$). Os biofilmes formados por esses microorganismos, ambos tiveram uma redução significativa após a imersão em FNE quando comparada aos demais grupos testados (EL, FNB e SS ($P < 0,0001$)). **Conclusão:** A FNE obteve atividade fungicida contra as cepas isoladas e reduziu significativamente os biofilmes de *candidas* e, portanto, apresenta um desempenho promissor para a sanitização de próteses dentárias e perspectiva de aplicação futura no mercado odontológico.

Palavras-chave: Eugenol. Nanotecnologia. Biofilmes. *Candida*. Resinas acrílicas.

ABSTRACT

Introduction: Eugenol has proven efficacy against candidiasis biofilms, which are highly prevalent in denture wearers. However, it is volatile, has little solubility in water and is toxic in larger doses. Its encapsulation in nanostructured lipid carriers (CLNs) may be viable for the development of new sanitizers for the hygiene of prosthetic parts, since this system (CLNs) protects the handling drug, improves its solubility, controls its release and, therefore, you can maintain your activity even in smaller doses.

Objective: To develop a sanitizing dispersion for the hygiene of dental prostheses, using nanostructured lipid carriers (CLNs) containing eugenol and evaluate its effectiveness against *Candida* biofilms.

Methodology: The formulation was prepared by the ultrasonication method and specifications regarding particle size (TP), polydispersity index (IPD), zeta potential (PZ), encapsulation efficiency (EE), morphology and atomic force specificity (MFA). In addition to the release kinetics in Franz cells. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method and antifungal activity was evaluated from the application of four treatment groups (nanostructured formulation containing eugenol (FNE), free eugenol (EL), saline solution (SS) and formulation without the drug (FNB)), for eight hours, on biofilms of *Candida albicans* and *C. glabrata* adhered to thirty-two test specimens of polymethyl methacrylate (PMMA) acrylic resin.

Results: FNE nanoparticles showed size by DLS of 199.5 ± 2.55 , high homogeneity (0.07 ± 0.02) and EE (83.07 ± 0.23), negative PZ (-25.86 ± 0.65) and spherical shape. Furthermore, it achieved controlled release (44.21%) for 24 hours. The EL MICs for *Candida albicans* and *C. glabrata* were up to 10 ($64 \mu\text{g/mL}$) and 8 ($128 \mu\text{g/mL}$) times (respectively) higher than the FNE MICs ($6 \mu\text{g/mL}$ and $16 \mu\text{g/mL}$). *Candida* biofilms both had a significant reduction after experimentation in FN when compared to the other groups tested (EL, FNB and SS ($P < 0.0001$)).

Conclusion: FNE obtained fungicidal activity against the isolated strains and significantly prevented candidiasis biofilms and, therefore, presents a promising performance for the cleaning of dental prostheses and prospects for future application in the dental market.

Keywords: Eugenol. Nanotechnology. Biological plate. *Candida*. Acrylic resin.

LISTA DE FIGURAS

Figura I- Obtenção das formulações nanoestruturadas:**Erro! Indicador não definido.**

Figura II - Imagens de MFA.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura III - Imagens da FNE. À direita, imagem de amplitude (10 x 10 µm) e, no detalhe à esquerda, imagem de fase (6 x 6 µm). Escala = 2 µm.**50Erro! Indicador não definido.**

Figura IV- Gráfico de tamanho das nanopartículas a partir da análise de MFA. . **Erro! Indicador não definido.**

Figura V- Gráfico em FT-IR:**Erro! Indicador não definido.**

Figura VI - Seletividade da validação do método analítico:**Erro! Indicador não definido.**

Figura VII - - Estabilidade do TP, IPD, PZ e EE por 90 dias em temperaturas de 5 °C e 28 °C:**Erro! Indicador não definido.**

Figura VIII - Perfil de liberação in vitro do eugenol encapsulado em CLN e livre:**Erro! Indicador não definido.**

Figura IX- Atividade das soluções testes sobre biofilmes de *C. albicans* e *C. glabata*:**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Concentrações (%) dos componentes da formulação de escolha:	39.
Tabela II - Notas para a presença das alterações na membrana de acordo com o tempo de exposição do produto:	Erro! Indicador não definido.
Tabela II - Classificação do grau de irritabilidade:	Erro! Indicador não definido.
Tabela IV - Divisão dos corpos de prova para a aplicação dos grupos de tratamento.....	46.
Tabela V - Caracterização físico-química das formulações (FNE e FNB)	48.
Tabela VI - Parâmetros Obtidos na Primeira Derivada Espectral na Validação do Método Analítico para Quantificação do eugenol:	53
Tabela VII - Valores de pH da FNE por triplicata:	53.
Tabela VIII - Valores dos parâmetros matemáticos para cada modelo avaliado: Erro!	
Indicador não definido.	
Tabela IX - Efeito inibitório das Formulações nanoestruturadas (FNE e FNB) e do eugenol contra cepas de candidas:	57.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS, E SÍMBOLOS

CLN-Carreadore lipídico nanoestruturado

TP- Tamanho de partícula

IPD- Índice de polidispersidade

PZ- Potencial zeta

EE- Eficiência de encapsulamento

CMI- Concentração inibitória mínima

PMMA- Polimetilmetacrilato

FNE- Formulação nanoestruturada contendo eugenol

MS- Ministério da Saúde

AN- América do Norte

CHC-Candidíase hiperplásica crônica

CO- Candidíase oral

ESP- Estomatite protética

PDR- Prótese dentária removível

UFC- Unidades formadoras de colônias

OR- Razão de chances

RR- Razão de risco

EC- Estabilidade de cor

RS- Rugosidade superficial

RF- Resistência à flexão

PA- Peróxido alcalino

AD- Água destilada

CT- Correia tabs

SC- Saquinho de chá

CHX- Digluconato de clorexidina

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

EPC- Cristais Efferdent Power Clean

RC- Ricinus communis

RI- Resistência ao impacto

PMMA- Polimetilmetacrilatos

GC- Gluconato de clorexidina

EUG- Eugenol

CIM- Concentração inibitória mínima

SLN- Nanopartículas lipídicas sólidas

HS- Hipoclorito de sódio

RAT- Resina acrílica termopolimerizável

FNE- Nanoestruturada contendo eugenol

FNB- Formulação nanoestruturada branca

DLS- Determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz

DLS- Espalhamento dinâmico de luz

EL- Eugenol livre

ET- Eugenol total

MFA- Microscópio de força atômica

DP- Desvio padrão

CIA- Critério de Akaike

CSM- Critério de seleção do modelo

CFM- Concentração fungicida mínima

BHI- Brain Heart Infusion

DO- Densidade óptica

LD- Limite de detecção

LQ- Limite de quantificação

SC- Superfície da pele

H- Hidrogênio

λ - 291,4 nm

nm- nanômetros

μ - micro

SUMÁRIO

1. Resumo	05
2. Revisão de literatura	13
3. Desenvolvimento	37
3.1. Resumo do artigo	37
3.2. Introdução	38
3.3. Material e métodos	39
3.4. Resultados	49
3.5. Discussão	60
3.6. Conclusões	66
3.7. Agradecimentos	66
3.8. Referências bibliográficas	67

1. REVISÃO DE LITERATURA

Foi realizada uma busca de artigos científicos nas bases de dados PUBMED, WEB OS SCIENSE E SCOPUS utilizando como descritores “Eugenol”, “Nanostructured lipid carriers”, “Lipid nanoparticles”, “Candida”, “Denture Cleansers” e “Acrylic resins”. Foram utilizados operadores booleanos “AND” e “OR”. As combinações aplicadas foram: **"nanostructured lipid carriers" OR "lipid nanoparticles" AND eugenol; "nanostructured lipid carriers" OR "lipid nanoparticles" AND “denture cleansers”; candidas AND eugenol; "Denture Cleansers" AND candidas AND "acrylic resins"; "nanostructured lipid carriers" OR "lipid nanoparticles" AND “denture cleansers”; “nanostructured lipid carriers” AND eugenol; “denture cleansers" AND "acrylic resins".**

Foram incluídos trabalhos publicados no idioma inglês e disponíveis na íntegra e publicados nos últimos 20 anos (2004 a 2024). Foram localizados 479 artigos, dos quais após a leitura dos títulos e resumos foram excluídos 452 (433 não relacionados à temática e 19 duplicados). No total, 27 artigos foram selecionados para a revisão. Os estudos estão descritos em ordem cronológica para cada subtópico abordado, de acordo com as normas do programa de pós-graduação em odontologia da UFPI.

Candida:

Poulain *et al.* (2013) revisaram sobre os conceitos modernos de *Candida* e apresentaram algumas características específicas: são micro-organismos que se tornam patogênicos a partir do comprometimento imunológico do hospedeiro e por isso são considerados patógenos oportunistas. A infecção e colonização desse fungo acontece quando conseguem ultrapassar as barreiras do tecido epitelial, pH extremos e a produção de muco dos hospedeiros, além da imunidade inata e adquirida.

Modrzewska e Kurnatowski (2013) relatam sobre a estrutura molecular do gênero *Candida*, seus principais fatores de virulência e biofilme: apresenta a parede celular de quitina e a membrana citoplasmática fosfolipídica e ergosterol. Quando se encontram em temperatura ideal na presença de nutrientes específicos, crescem de maneira exponencial por blastoconídios. Entre os principais fatores de virulência estão: ormação de hifas e pseudohifas, capacidade de troca fenotípica, aderência às células epiteliais e endoteliais, formação de biofilme, secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases, lipases) e tropismos. O processo de formação do biofilme e

sua estrutura depende do tipo de fungo envolvido, da composição química, da superfície estrutural e do grau de hidrofobicidade do material ao qual adere. Os fungos mais predominantes na formação de biofilme do gênero *Candida*, além de *Candida albicans* (*C. albicans*), são *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) e *Candida krusei* (*C. krusei*).

Epidemiologia do gênero *candida*:

Pfaller *et al.* (2019) avaliaram a atividade de um fármaco contra 20.788 isolados de *Candida* (37 espécies). Foram coletados em 135 centros médicos em 39 países entre 1997 e 2016 no mundo inteiro. Os isolados foram testados usando métodos de referência e pontos de interrupção clínicos publicados nos documentos de padrões clínicos e laboratoriais do instituto. Entre todos os isolados de *Candida* 46,9% (7179) eram *C. albicans*, seguindo de 18,7% (2860) da *C. glabrata*, 15,9% (2436) da *C. parapsilosis*, 9,3% (1418) da *C. tropicalis* e 2,8% (421) da *C. krusei*. Embora a *C. albicans* tenha sido a espécie predominante em todos os anos, houve uma diminuição da sua frequência com o passar do tempo (57,4% em 1997–2001 para 46,4% em 2015–2016). A *C. glabrata*, além de ser a espécie não-*albicans* mais comum, mostrou um aumento constante de 16,0% em 1997–2001 para 19,6% em 2015–2016. Já a *C. parapsilosis* se concentrou na terceira posição (aumentou em frequência de 12,3% no período de 1997–2001 para 17,8% em 2009–2011). A *C. albicans* foi a mais prevalente em todas as regiões do mundo avaliadas com percentual maior na Europa (52,5%) e menor na América do Norte (AN) (Estados Unidos e Canadá; 42,7%), enquanto *C. glabrata* foi mais comum em AN (24,3%) e menos comum na América Latina (AL) (7,1%). A *C. tropicalis* obteve maior frequência de Candidíase na região da AL (17,0%).

Segundo o Ministério da Saúde (MS) 2023, no Brasil existem aproximadamente 200 espécies de *candida*. Dentre as mais prevalentes, que apresentam um maior interesse clínico, são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Candida guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *Candida lusitanae* (*C. Lusitanae*) e a *Candida auris* (*C. auris*). Cada uma dessas espécies apresenta características individuais em relação à suscetibilidade aos antifúngicos, fatores de virulência sobre o hospedeiro, distribuição entre países em uma mesma região ou cidade. A *C. albicans*, é a mais predominante mundialmente e pode ser responsável por 44-70% dos casos, dependendo da região estudada.

Candidas x usuários de próteses dentárias x estomatite protética e candidíase bucal:

López *et al.* (2012) avaliaram a prevalência de Candidíase hiperplásica crônica (CHC) na mucosa oral de indivíduos atendidos no Serviço de Medicina Oral, durante os últimos 5 anos e investigaram a associação da CHC com alterações displásicas na mucosa oral. O estudo retrospectivo teve uma amostra de 2785 pacientes. O estudo incluiu todos os casos de candidíase diagnosticados. No total, 123 (4,41%) pacientes apresentavam candidíase em suas diferentes formas clínicas e destes 19 (15,41%) manifestaram CHC. Doze dos 19 pacientes usavam próteses dentárias. Houve uma evolução estatística significativa entre CHC e *C.albicans* ($P < 0,05$).

Bianchi *et al.* (2016) avaliaram a associação entre candidíase oral (CO) em idosos usuários e não usuários de próteses e seus fatores predisponentes. O estudo transversal, com coleta salivar, obteve uma amostra de 48 pacientes que usavam prótese e 43 pacientes (grupo controle) que não usavam. Cerca de 83,3% dos usuários de próteses obtiveram isolados de *Candida spp.* Houve uma associação significativa entre o isolamento de leveduras e prótese dentária nos dois grupos ($p < 0,05$, OR = 4,3). A *C. albicans* foi a mais prevalente (37 isolados), sendo 23 (62,2%) no grupo prótese total e 14 (37,8%) (grupo controle). Os pacientes que apresentavam candidíase oral, 83,3% eram do grupo que usava prótese dentária, enquanto apenas 16,7% pertenciam ao grupo controle.

Čanković *et al.* (2017) determinaram a prevalência e os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da estomatite protética (ESP) em usuários de próteses dentárias removíveis (PDRs) superiores. Este estudo clínico prospectivo incluiu todos os pacientes portadores de PDRs atendidos em um departamento de medicina oral. A amostra foi composta por 159 pacientes (132 mulheres e 27 homens). Amostras de swab foram retiradas da língua e da mucosa palatina para exame microbiológico. A prevalência da ESP foi avaliada em 26,5%. Quando comparado o grupo da ESP com os demais grupos, houve uma significância maior sobre o uso noturno ($p = 0,000$) e idade média das próteses ($p = 0,022$). Em relação ao achado micológico positivo, apresentou-se diferença de significância limítrofe entre os grupos avaliados ($p = 0,053$). O uso contínuo (durante a noite) de PDRs é considerado o

principal fator de risco para a ESP, seguindo da idade da prótese e à infecção oral por *Candida*.

Mousa *et al.* (2020) avaliaram a relação do desenvolvimento da ESP associado à prótese dentária e verificaram as espécies de leveduras comumente isoladas de usuários de próteses dentárias removíveis. A amostra foi composta por 64 pacientes que receberam novas próteses totais convencionais. A colonização de espécies de *Candida* foi avaliada e as espécies foram identificadas por meio do Componentes de laboratório VITEK 2. No início do estudo a *C. albicans*, seguindo da *Candida glabrata* (*C. Glabrata*) foram as mais predominantes. Houve um aumento significativo ($P < 0,05$) do dia da inserção até o primeiro mês. A ESP pode se desenvolver mais rápido do que se pensava antes, e a maioria comumente esteve associada a espécies mistas de *Candida*.

Manikandan *et al.* (2022) compararam indivíduos usuários de próteses totais e não-usuários em relação à *Candida* que foram diagnosticados com ESP. O estudo transversal obteve uma amostra de 60 indivíduos divididos em dois grupos (usuários (A) e não usuários (B) de próteses. Foram coletadas amostras de saliva cultivada em CHROMagar. O valor médio das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Candida* em relação ao Grupo A é *C. albicans* $0,36 \pm 2,008$, *Candida krusei* (*C. Krusei*) ($0,27 \pm 1,061$) e Grupo B: *C. albicans* ($0,73 \pm 2,196$) e (*C. krusei* $0,36 \pm 1,084$). Houve uma relação significativa entre usuários de próteses dentárias e crescimento intenso de *C. Albicans* ($P < 0,054$) e *C. krusei* ($P < 0,036$) em cultura de saliva. Os usuários de próteses dentárias com *Candida* oral apresentaram maior prevalência de ESP.

Singh *et al.* (2023) apresentaram uma avaliação abrangente da prevalência de ESP e sua relação com *C. albicans* numa população indiana através de uma revisão sistemática e metanálise. A partir de uma busca criteriosa em bases de dados (de acordo com o PRISMA) sem limitações de prazo de publicação, quatro estudos que abrangiam 415 participantes foram incluídos. Houve uma associação significativa entre ESP e colonização por *C.albicans*. A razão de chances (OR) geral e a razão de risco (RR) para a prevalência de *C. albicans* em pacientes com ESP foram de 0,75 (IC 95% 0,56 a 0,99) e 0,83 (IC 95% 0,70 a 1,00), respectivamente.

Higienizadores químicos convencionais e seus impactos negativos nas próteses dentárias Removíveis (PDRs):

Paranhos *et al.* (2013) analisaram a estabilidade de cor (EC), rugosidade superficial (RS) e resistência à flexão (RF) de corpos de prova de resina acrílica após imersão em peróxido alcalino (PA) e hipoclorito de sódio 0,5% (NaOCl). No total, 140 corpos de prova, em forma de disco (60) e retângulo (80), foram preparados com resina acrílica termopolimerizável (Lucitone 550) e distribuídos em 4 grupos (n=20): G1: sem imersão, G2: 8h de imersão em água destilada (AD); G3: 8h em PA; G4: 8h em NaOCl 0,5%. Não houve alteração significativa dos grupos em relação à resistência à flexão ($P \geq 0,05$). O PA causou alteração de cor significativamente maior ($P < 0,05$). O NaOCl 0,5% aumentou a rugosidade da superfície (média 0,195 μm). Concluiu-se que PA e NaOCl não alteraram a resistência à flexão da resina acrílica. No entanto, alterações de cor foram perceptíveis em ambas as soluções.

Haghi *et al.* (2015) avaliaram a EC e RS de duas resinas acrílicas comuns em diferentes soluções de limpeza. No total, 112 blocos de resina acrílica Meliodent e Acropars (56 blocos cada) foram divididos em sete grupos de diferentes tratamentos: NaOCl a 1% por 10 minutos ao dia (um mês), NaOCl a 1% por 8h por dia (uma semana), solução de Correga tabs (CT) por 8h por dia (um mês), saquinho de chá (SC) por 2h por dia (um mês), SC por 2h por dia e depois 10 min em 1 % NaOCl (um mês), SC por 2h, depois 8h na solução CT por dia (um mês) (TC) e, finalmente, AD por um mês como grupo controle. Após o tratamento das amostras, foram medidas a EC e a RS das amostras. O grupo SC por 2h exibiu uma mudança na EC significativa ($P < 0,05$). O NaOCl 1% em 8h causou alteração de EC significativa ($P < 0,05$) no grupo Acropars em comparação ao grupo Meliodent. A maior rugosidade foi apresentada no grupo SC por 2h mais 8h em CT ($1,27 \pm 0,54$).

Peracini *et al.* (2017) avaliaram a eficácia de dois produtos (NaOCl e PA) contra biofilmes de *Candida spp* em estruturas de PDRs. Os pacientes (n=32) foram instruídos a escovar suas próteses três vezes ao dia e mergulhá-las (≥ 8 h) durante à noite. Foram divididos em três grupos: controle - água (A), PA e NaOCl a 0,5% (SH). Cada solução foi usada por três períodos alternados de sete dias. Após a incubação as colônias foram contadas e os valores de taxas de unidades formadoras de *candida* por mL (UFC/ml) foram calculados. Houve uma redução na contagem de *C. albicans*. A imersão em AP [5,73 (5,45-5,91)] causou uma mudança de cor maior quando comparado com à imersão em NaOCl [3,70 (3,51-3,98)]. Concluíram que ambas as

soluções testadas apresentaram ação antimicrobiana contra *C. albicans*, mas devem ser usadas com cautela como uma solução de imersão durante à noite.

Procópio *et al.* (2018) analisaram os efeitos antimicrobianos e citotóxicos de uma resina acrílica para PDRs após ciclos de imersão diária durante a noite em NaClO 1% e digluconato de clorexidina (CHX) 2%, simulando os períodos de nove meses ou 1,5 ano. O método de microdiluição em caldo (*C. albicans* ou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)) foi usado para realizar o teste microbiológico e ensaio MTT para o teste citotóxicos. O efeito antimicrobiano foi visto em ambos os períodos de imersão para CHX 2% ($P < 0,05$). Já o NaClO a 1% não obteve efeito positivo ($P \geq 0,05$). No entanto, os resíduos de CHX a 2% foram gravemente citotóxicos em fibroblastos gengivais humanos em comparação com aqueles de NaClO a 1% e resina acrílica, que foram levemente citotóxicos. Mesmo em baixas concentrações, os resíduos químicos de CHX impregnados na prótese podem resultar em algum grau de toxicidade para a mucosa o após uso diário prolongado.

Ozyilmaz *et al.* (2019) avaliaram o efeito de diferentes limpadores de PDRs na RS e dureza de diferentes materiais acrílicos (polietercetona, poliamida moldada por termoinjeção e polimetilmetacrilato). Corpos de prova (150) em forma de disco foram fabricados, e divididos em cinco subgrupos ($n=10$) de acordo com os procedimentos de imersão. Foram submetidos à imersão diária com quatro limpadores (Corega, Protefix, Curaprox e Perlodent) por 8 h por dia durante 140 dias. RS e dureza das superfícies foram determinadas após a medição no início e após a aplicação de soluções químicas. As alterações topográficas foram avaliadas com microscopia eletrônica de varredura (MEV). A RS das próteses de polietercetona, polimetilmetacrilato e poliamida foi aumentou significativamente pelas soluções químicas ($P < 0,05$). Comparados com o Curaprox, os comprimidos efervescentes alteraram significativamente a dureza da superfície e RS da poliamida.

Rocha *et al.* (2021) analisaram a atividade antibiofilme de soluções de higiene de próteses totais e seus efeitos nas propriedades físicas e mecânicas de resina acrílica. Metodologia: A atividade antibiofilme em resina acrílica foi feita a partir da contaminação das amostras com *C. albicans*, *C. glabrata* e *Streptococcus mutans* (*S. Mutans*). Após o crescimento do biofilme, os espécimes foram distribuídos para as soluções de higiene: AD (Controle); 0,2% de NaOCl; Cristais Efferdent Power Clean (EPC) e 6,25% Ricinus communis (RC). A viabilidade dos microrganismos foi avaliada

por contagens em placas de ágar. As propriedades físicas e mecânicas da resina acrílica foram avaliadas após simular um período de 5 anos de imersão diária. As mudanças avaliadas foram RS, EC, microdureza, RF, resistência ao impacto (RI), sorção e solubilidade. O NaOCl eliminou todos os microrganismos enquanto o EPC e RC apresentaram ação moderada contra *S. mutans* ($p=0,001$) e *C.glabrata* ($p<0,001$), respectivamente. O RC obteve os maiores valores de alteração de EC ($p=0,030$), dureza ($p<0,001$), RS ($p=0,006$) e RF ($p<0,001$). EPC promoveu maiores mudanças na superfície. A imersão em NaOCl não alterou a superfície da resina acrílica. Todos os limpadores reduziram a resistência ao impacto ($p<0,05$). O NaOCl foi o que apresentou maior atividade antibiofilme.

Alfouzan *et al.* (2021) verificaram a EC de materiais à base de resina acrílica após exposição a agentes mecânicos (escovação) e produtos químicos para limpeza de PDRs. Dois polimetilmetacrilatos (PMMA) (curado por calor e CAD/CAM pré-polimerizado) e um material de base para próteses de resina à base de dimetacrilato de uretano foram utilizados para a confecção dos corpos de prova. Os limpadores químicos foram corega, 5,25%, NaOCl e 0,2% de gluconato de clorexidina (GC) em ciclagem térmica para simular um ano de uso normal da PDR. A diferença de cor foi calculada usando luz UV visível de bancada espectrofotômetro. As alterações nos valores de EC de todos os materiais testados estavam acima da faixa clinicamente aceitável, independentemente do tipo de limpador de prótese aplicado.

Alkaltham *et al.* (2023) investigaram a alteração das propriedades de RF e dureza das resinas impressas em 3D usadas para fabricação de bases de próteses após a imersão por 180 dias em AD, comprimido efervescente e NaOCl. A RF e módulo de elasticidade foram investigados por meio do teste de flexão em três pontos e teste de dureza Vickers antes da imersão. A RF de todos os materiais diminuiu após a imersão em solução ($p < 0,001$). O comprimido efervescente e a imersão em NaOCl reduziram a RF ($p < 0,001$), com os menores valores registrados com a imersão em NaOCl. O módulo de elasticidade não diferiu significativamente entre a linha de base e após a imersão em DW ($p > 0,05$), mas diminuiu significativamente após a imersão comprimido efervescente e imersão em NaOCl ($p < 0,001$). A dureza diminuiu significativamente após imersão em todas as soluções ($p < 0,001$). A imersão do material polimerizado termicamente e impresso em 3D resinas no DW e soluções desinfetantes diminuíram as propriedades de RF e dureza.

Eugenol (EUG):

Ulanowska *et al.* (2021) apresentaram uma revisão sobre as características do EUG de pesquisas recentes de artigos no PubMed. O EUG (C₁₀H₁₂O₂, fenilpropanóide) é um composto aromático reconhecido por sua versatilidade e é frequentemente encontrada em uma variedade de óleos essenciais de diversas espécies de plantas (Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae e Myristicaceae). É o principal constituinte do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*). (Daniel *et al.*, 2009; Pramod *et al.*, 2010; Khalil *et al.*, 2017; Mohammadi *et al.*, 2017;). É um líquido amarelo claro, oleoso e aroma característico. Tem média solubilidade em água e alta solubilidade em solventes orgânicos. Apresenta baixa estabilidade termodinâmica e é sensível à oxidação e a diversos produtos químicos. Apesar de muitas propriedades importantes como atividades antimicrobianas, o EUG pode causar irritabilidade, dermatite alérgica de contato, gengivite alérgica de contato ou síndrome de queimação na boca (Navarro *et al.*, 2019).

Nisar *et al.* (2021) apresentaram uma revisão sobre o EUG e suas propriedades benéficas para a saúde humana. Baseado nos estudos encontrados, esta revisão concluiu que o EUG possui várias propriedades farmacológicas como, atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas, neuroprotetoras, antidiabéticas e antitumorais que o tornam eficaz para o tratamento e prevenção de uma série de doenças.

EUG como agente antifúngico promissor:

He *et al.* (2007) investigaram os efeitos do EUG em biofilmes pré-formados, células aderentes na formação de biofilme e morfogênese celular de *C. albicans*. A dispersão do EUG foi feita em RPMI-1640 em diluições com concentração inicial de 4.000 mg/L. A formação dos biofilmes de *C. albicans* foram apresentados em 48 horas a 37 °C nas superfícies de placas de microtitulação. Para avaliar o efeito do ativo foi usado o kit de ensaio de toxicologia *in vitro*. O seu uso foi estimado em 0, 1, 2 e 4 h em diferentes concentrações (20, 200 e 2.000 mg/L). O efeito do ativo, na morfogênese de células de *C. albicans*, foi observado através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Houve uma redução >80% da atividade metabólica de células sésseis com uso do EUG na concentração de 2.000 mg/L. Concluíram que o

EUG possui eficácia contra biofilme de *C. albicans* pré-formados, reduzindo o crescimento das células testadas.

Khan *et al.* (2012) avaliaram quatro fitocompostos (cinamaldeído, citral, EUG e geraniol) quanto à suas atividades inibitórias, *in vitro*, contra biofilmes pré-formados de *C. albicans*, isoladamente ou em combinação, com fluconazol e anfotericina B (anf B). A MEV determinou o efeito inibitório dos compostos de teste em biofilmes. Intervalos de tempo (0, 2, 4, 8, 12, 24 e 48h) foram estabelecidos para medir a inibição dos biofilmes pré-formados. Houve uma inibição total de biofilme com o uso do EUG em ambas as cepas teste. Entre todas as combinações testadas com o fluconazol e anf B, o EUG apresentou a maior sinergia contra a *C. albicans*.

Jafri *et al.* (2018) verificaram a eficácia do EUG na inibição de biofilmes simples e mistos de *C. albicans*. No total, 11 cepas (CAJ 1 A CAJ 11) resistentes a quatro agentes antifúngicos (fluconazol, anf B, cetoconazol e itraconazol) foram utilizadas no estudo. A formação dos biofilmes, foi realizada pela adição de 0,1 ml de suspensão em 0,1 mL da amostra de *C. Albicans*. A MEV foi empregada pra observar a presença e ausência do EUG. Houve uma redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$) no log 10 UFC/mL de 6,3 para 4,8 a 200 mg/mL de eugenol. A MEV mostrou ruptura da membrana celular e da estrutura da matriz em biofilmes simples e mistos. Em conclusão, determinaram que o EUG apresentou eficácia contra biofilmes simples e mistos formados por cepas de *C. albicans* em múltiplos modo de ação.

Khan *et al.* (2019) investigaram a capacidade do EUG combinado com anf B para aumentar os efeitos antifúngicos e reduzir sua toxicidade. As substâncias foram testadas contra diferentes cepas de *C. albicans* com aplicação do método de microdiluição. A concentração inibitória mínima (CIM) do do EUG, individualmente, foi de 625 mg/mL, já em combinação com anf B (0,05 mg/mL), houve uma redução de 75% nos valores de CIM do EUG (156 mg/ml). A combinação (EUG e Anf B) mostrou declínio precoce no padrão de crescimento de *C. Albicans* em comparação com os ativos sozinhos. Concluíram que combinação das substâncias inibe o crescimento e apoptose de *C. albicans*, podendo atuar juntos contra o patógeno em doses menos tóxicas.

Saracino *et al.* (2022) testaram, *in vitro*, a atividade antifúngica e o eventual efeito sinérgico de cinco componentes puros de óleos essenciais: cinamaldeído, γ -pineno, limoneno, eucaliptol e EUG. Os testes foram realizados em 18 cepas de

Candida (15 *C. albicans*, 2 *C. glabrata* e 1 *C. lusitaniae*) de culturas de cepas clínicas. O método de difusão em disco, foi utilizado para avaliar a atividade antifúngica dos componentes. Cinamaldeído e o EUG tiveram os melhores resultados inibitórios em todas as cepas e apresentando um efeito altamente aditivo (FICI 0,625). A CIM do EUG foi de 455,42 mg/L. O isolado provocou a redução completa de células fúngicas viáveis em 1 h. Concluiu-se que o EUG apresentou alta atividade antifúngica contra *Candida spp. in vitro*, em termos de propriedades fungistáticas e fungicidas.

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs):

Elmowafy *et al.* (2021) realizaram uma revisão geral sobre o sistema CLNs e apresentaram seus componentes e a arte atual do seu desenvolvimento. CLNs são sistemas binários contidos de lipídios sólidos e líquidos que permite a retenção de ativos lipofílicos, protegendo-os da degradação e melhorando sua estabilidade e controle da liberação. (Radtke, Souto e Müller 2007). São compostos por fases lipídicas, fase aquosa e surfactante(s). No entanto, a seleção dos componentes e das suas proporções pode influenciar particularmente o comportamento final da formulação desenvolvida. (Haus 2007; Souto e Muller 2010). As principais características que o sistema deve apresentar: os lipídios devem ser reconhecidos como Seguros (GRAS), ter estrutura físico-química controlada, os ativos devem ser solúveis sobre os lipídios e no final a formulação deve ser homogênea com fase única (Doktorovová *et al.* 2010).

Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo EUG:

Garg e Singhy (2011) investigaram, *in vivo*, a ação antifúngica de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) em ratos imunossuprimidos com candidíase oral. A caracterização foi feita (TP), (IP), (PZ), eficiência de encapsulamento (EE), liberação *in vitro* e atividade antifúngica *in vivo*. A CIM do EUG, contra *C. albicans*, foi de 50 g/mL. As SLN, obtidas a partir de lipídio único, apresentaram maior espectro (332 nanômetros (nm)) quando comparados aos de lipídios binários (87,7 nm). O PZ foi encontrado na faixa de -18 a -20 mV. A EE foi de 98,46%. A solução padrão de EUG (2 mg/mL) mostrou mais de 80% de liberação do fármaco em 30 minutos. Após o uso do ativo encapsulado, a taxa de liberação diminuiu em quase 65%, sendo

liberado em 12h. As nanopartículas lipídicas aumentaram, significativamente, a eficácia terapêutica do EUG.

Shajari et al. (2022) preparam alguns CLNs ecologicamente corretos com EUG encapsulado para atividade antimicrobiana, antibacteriano em águas residuais hospitalares. A formulação foi preparada por homogeneização a quente em alta velocidade. A caracterização foi determinada por diferentes técnicas, como microscopia eletrônica de transmissão, infravermelho com transformada de Fourier e calorimetria dinâmica de varredura. o método de UFC foi aplicado para avaliar a capacidade dos CLNs com EUG de inibir a taxa de crescimento bacteriano. O tamanho médio e o PZ foram $78,12 \pm 6,1$ nm e $-29,43 \pm 2,21$ mV, respectivamente. O maior efeito inibitório da em meios de cultura foi observado em cepas padrão e selvagem de *Staphylococcus aureus* (43,42% e 26,41%, respectivamente) com concentração de 0,125 μ M.

Quadro 1 – Principais descrições dos artigos selecionados:

Autor e ano de publicação	Tipo de estudo	Metodologia	Principais resultados
Candidas			
Poulain et al.(2013)	Revisão de literatura	Resumo dos conceitos modernos da patogênese da Candida.	<i>Candidas</i> são micro organismos que se tornam patogênicos a partir do comprometimento imunológico do hospedeiro e por isso são considerados patógenos oportunistas.

Modrzewska e Kurnatowski (2013)	Revisão de literatura	Uma atualização das características de patogenicidade sobre: formação de hifas e/ou pseudohifas, troca fenotípica, reações trópicas e produção de biofilme de <i>cândidas</i> .	O processo de formação do biofilme e sua estrutura depende do tipo de fungo envolvido, da composição química, da superfície estrutural e do grau de hidrofobicidade do material ao qual adere.
Epidemiologia do gênero <i>Candida</i>			
Pfaller <i>et al.</i> (2019)	Estudo transversal	A identificação das espécies foi realizada usando métodos fenotípicos (1997–2001), genotípicos e proteômicos (2006–2001). 2016). Todos os isolados foram testados de acordo com os documentos do Clinical and Laboratory Standards Institute.	Entre todos os isolados de <i>Candida</i> 46,9% (7179) eram <i>C. albicans</i> , seguindo de 18,7% (2860) da <i>C. glabrata</i> , 15,9% (2436) da <i>C. parapsilosis</i> , 9,3% (1418) da <i>C. tropicalis</i> e 2,8% (421) da <i>C. krusei</i> .
<i>Candidas</i> x usuários de próteses dentárias x estomatite protética e candidíase bucal			
López <i>et al.</i> (2012)	Estudo transversal	Foi realizado estudo retrospectivo de pacientes (2785) atendidos no Serviço de Medicina Oral. O estudo incluiu todos os casos de candidíase diagnosticados e confirmados por estudos micológicos e histopatológicos.	No total, 123 (4,41%) pacientes apresentavam candidíase em suas diferentes formas clínicas e destes 19 (15,41%) manifestaram CHC. Doze dos 19 pacientes usavam próteses dentárias.

Bianchi <i>et al.</i> (2016)	Estudo transversal	A população do estudo foi composta por 91 pacientes idosos (acima de 60 anos) Foi realizada a coleta de saliva de 48 pacientes que usavam prótese e 43 pacientes (grupo controle) que não usavam.	Houve uma associação significativa entre o isolamento de leveduras e prótese dentária nos dois grupos ($p < 0,05$, OR = 4,3). A <i>C. albicans</i> foi a mais prevalente (37 isolados), sendo 23 (62,2%) no grupo prótese total.
Čanković <i>et al.</i> (2017)	Estudo clínico prospectivo	A amostra foi composta por 159 pacientes (132 mulheres e 27 homens). Amostras de swab foram retiradas da língua e da mucosa palatina para exame microbiológico.	A prevalência da estomatite protética ESP foi avaliada em 26,5%. O uso contínuo (durante a noite) de PDRs é considerado o principal fator de risco para a ESP, seguindo da idade da prótese e à infecção oral por <i>Candida</i> .
Mousa <i>et al.</i> (2020)	Série de casos	A amostra foi composta por 64 pacientes que receberam novas próteses totais convencionais. A colonização de espécies de <i>Candida</i> foi avaliada.	A ESP pode se desenvolver mais rápido do que se pensava antes, e a maioria comumente esteve associada a espécies mistas de <i>Candida</i> .
Manikandan <i>et al.</i> (2022)	Estudo transversal	A amostra foi composta por 60 indivíduos divididos em dois grupos (usuários (A) e não usuários (B) de próteses). Foram coletadas amostras de saliva cultivada em CHROMagar.	Houve uma relação significativa entre usuários de próteses dentárias e crescimento intenso de <i>C. Albicans</i> ($P < 0,054$) e <i>C. krusei</i> ($P < 0,036$) em cultura de saliva. Os usuários de próteses dentárias com <i>Candida</i> oral apresentaram maior prevalência de ESP.

Singh <i>et al.</i> (2023)	Revisão sistemática e metanálise	A partir de uma busca criteriosa em bases de dados (de acordo com o PRISMA) sem limitações de prazo de publicação, quatro estudos que abrangiam 415 participantes foram incluídos.	Houve uma associação significativa entre ESP e colonização por <i>C.albicans</i> . A razão de chances (OR) geral e a razão de risco (RR) para a prevalência de <i>C. albicans</i> em pacientes com ESP foram de 0,75 (IC 95% 0,56 a 0,99) e 0,83 (IC 95% 0,70 a 1,00), respectivamente.
Higienizadores químicos convencionais e seus impactos negativos nas próteses dentárias Removíveis (PDRs):			
Paranhos <i>et al.</i> (2013)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	Foram confeccionados 60 corpos de prova, em forma de disco, com resina acrílica termopolimerizada (Lucitone 550) e distribuídos em 4 grupos. As propriedades foram avaliadas no início e após a imersão de PA e NaOCl 0,5%.	O PA causou alteração de cor significativamente maior (P<0,05). O NaOCl 0,5% aumentou a rugosidade da superfície (média 0,195 µm).
Haghi <i>et al.</i> (2015)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	No total, 112 blocos de resina acrílica Meliodent e Acropars (56 blocos cada) foram divididos em sete grupos de diferentes tratamentos.	O grupo SC por 2 h exibiu uma mudança na EC significativa (P<0,05). O NaOCl 1% em 8 h causou alteração de EC significativa (P<0,05) no grupo Acropars em comparação ao grupo Meliodent. A maior rugosidade foi apresentada no grupo SC por 2 h mais 8 h em CT (1,27±0,54).

Peracini <i>et al.</i> (2017)	Estudo clínico	32 usuários de PDRs escovaram suas próteses três vezes ao dia e a mergulharam em três soluções (≥ 8 horas) em: controle - água; AP; ou NaClO,5%.	Ambas as soluções testadas apresentaram ação antimicrobiana contra <i>Candida spp.</i> No entanto, podem danificar as bases da prótese a longo prazo. Cerca de 24,7% das cepas, eram resistentes a pelo menos um dos antifúngicos testados.
Procópio <i>et al.</i> (2018)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	O método de microdiluição em caldo (<i>C. albicans</i> ou <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)) foi usado para realizar o teste microbiológico e ensaio MTT para o teste citotóxicos.	O efeito antimicrobiano foi visto em ambos os períodos de imersão para CHX 2% ($P < 0,05$). Já o NaClO a 1% não obteve efeito positivo ($P \geq 0,05$). Os resíduos de CHX a 2% foram gravemente citotóxicos em fibroblastos gengivais humanos.
Ozyilmaz <i>et al.</i> (2019)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	Corpos de prova (150) foram fabricados, e divididos em cinco subgrupos ($n=10$) de acordo com os procedimentos de imersão. Foram submetidos à imersão diária com quatro limpadores (Corega, Protefix, Curaprox e Perlodent) por 8 h em 140 dias.	A RS das próteses de polietercetona, polimetilmetacrilato e poliamida aumentou significativamente pelas soluções químicas ($P < 0,05$).

Rocha <i>et al.</i> (2021)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	As amostras de resina acrílica foram contaminadas com <i>C. albicans</i> . Após o crescimento do biofilme, os espécimes foram expostos às soluções desinfetantes.	A imersão em NaOCl não alterou a superfície da resina acrílica. Todos os limpadores reduziram a resistência ao impacto ($p < 0,05$). O NaOCl foi o que apresentou maior atividade antibiofilme.
Alfouzan <i>et al.</i> (2021)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	Dois polimetilmetacrilato (PMMA) (curado por calor e CAD/CAM pré-polimerizado) foram utilizados para a confecção dos corpos de prova. Os limpadores químicos foram corega, 5,25% , NaOCl 1% e 0,2% de gluconato de clorexidina (GC).	As alterações nos valores de EC de todos os materiais testados estavam acima da faixa clinicamente aceitável, independentemente do tipo de limpador de prótese aplicado.
Alkaltham <i>et al.</i> (2023)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	Alteração das propriedades de RF e dureza das resinas impressas em 3D usadas para fabricação de bases de próteses foram avaliadas após a imersão por 180 dias em AD, comprimido efervescente e NaOCl.	A RF de todos os materiais diminuiu após a imersão em solução ($p < 0,001$). O comprimido efervescente e a imersão em NaOCl reduziram a RF ($p < 0,001$), com o menores valores registrados com a imersão em NaOCl. A dureza diminuiu significativamente após imersão em todas as soluções testes ($p < 0,001$).
Eugenol (EUG)			

Ulanowska <i>et al.</i> (2021)	Revisão de literatura	Esta revisão é baseada em características do eugenol de pesquisas recentes de artigos no PubMed.	Apresenta baixa estabilidade termodinâmica e é sensível à oxidação e a diversos produtos químicos.
Nisar <i>et al.</i> (2021)	Revisão da literatura	Resumo das características farmacológicas do EUG e seus potenciais benefícios à saúde de acordo com artigos recentes.	o EUG possui várias propriedades farmacológicas como, atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas, neuroprotetoras, antidiabéticas e antitumorais que o tornam eficaz para o tratamento e prevenção de uma série de doenças.
EUG como agente antifúngico promissor:			
He <i>et al.</i> (2007)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	A dispersão do EUG foi feita em RPMI-1640 em diluições com concentração inicial de 4.000 mg/L. A formação dos biofilmes de <i>C. albicans</i> foram apresentados em 48 horas (h) a 37 °C nas superfícies de placas de microtitulação.	Houve uma redução >80% da atividade metabólica de células sésseis com uso do EUG na concentração de 2.000 mg/L.

Khan <i>et al.</i> (2012)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	A MEV determinou o efeito inibitório dos compostos de teste em biofilmes. Intervalos de tempo (0, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 h) foram estabelecidos para medir a inibição dos biofilmes pré-formados.	Houve uma inibição total de biofilme com o uso do EUG em ambas as cepas teste. Entre todas as combinações testadas com o fluconazol e anf B, o EUG apresentou a maior sinergia contra a <i>C. albicans</i> .
Jafri <i>et al.</i> (2018)	Estudo laboratorial <i>In vitro</i>	A formação do biofilme foi determinado em lamelas de vidro usando 0,1% de cristal violeta e visualizados em microscópio de luz. Biofilmes simples e mistos, na presença e ausência de eugenol foi analisada por MEV.	O eugenol foi eficaz contra biofilmes simples e mistos formados por as cepas resistentes às drogas de dois patógenos orais, <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> , através de múltiplos modo de ação.
Khan <i>et al.</i> (2019)	Estudo laboratorial <i>In vitro</i>	A atividade antifúngica foi avaliada com base nas diretrizes do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) com pequenas modificações em isolados clínicos de <i>C. albicans</i> . A interação sinérgica de eugenol e Anf B foi avaliada, através de experimentos em tabuleiro de xadrez.	O eugenol é capaz de atuar sinergicamente com Amp B em doses menos tóxicas, contra a <i>C. albicans</i> bloqueando o canal de Ca ²⁺ .

Saracino <i>et al.</i> (2022)	Estudo laboratorial <i>In vitro</i>	O método de difusão em disco, foi aplicado para avaliar a atividade fungistática. O método checkerboard foi escolhido para avaliar um possível efeito sinérgico desses compostos quando misturados.	Cinamaldeído e eugenol apresentaram alta atividade antimicótica contra <i>Candida spp. in vitro</i> , em termos de propriedades fungistáticas e fungicidas.
Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs):			
Elmowafy <i>et al.</i> (2021)	Revisão de literatura	visão geral sobre a situação atual da arte dos CLNs para futuras pesquisas clínicas através da exposição de suas aplicações.	CLNs são nanocarreadores binários formados pela presença de lipídios sólidos e lipídeos líquidos em uma única mistura que permitem a encapsulação de isolados lipofílicos, protegendo-os da degradação e melhorando sua estabilidade e controle de liberação.
Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo EUG:			
Garg e Sing (2011)	Estudo <i>In vivo</i>	A atividade antifúngica <i>in vivo</i> de nanopartículas lipídicas carregadas de eugenol foi avaliada usando um modelo de candidíase oral em ratos imunossuprimidos.	As nanopartículas lipídicas aumentaram, significativamente, a eficácia terapêutica do EUG.
Shajari <i>et al.</i> (2022)	Estudo laboratorial <i>in vitro</i>	O método de UFC foi aplicado para avaliar a capacidade dos CLNs com EUG de inibir a taxa de crescimento bacteriano.	O maior efeito inibitório da em meios de cultura foi observado em cepas padrão e selvagem de <i>Staphylococcus aureus</i> (43,42% e 26,41%, respectivamente) com

			concentração de 0,125 μM.
--	--	--	------------------------------

Fonte: Autoria própria.

Referência bibliográficas:

1. Alfouzan AF, Alnouwaisar AN, Alazzam NF, Al-Otaibi HN, Labban N, Alswaidan MH, et al. Power brushing and chemical denture cleansers induced color changes of pre-polymerized CAD/CAM denture acrylic resins. *Mater Res Express*. 2021 Aug 1;8(8).
2. Alkaltham NS, Aldhafiri RA, Al-Thobity AM, Alramadan H, Aljubran H, Ateeq IS, et al. Effect of Denture Disinfectants on the Mechanical Performance of 3D-Printed Denture Base Materials. *Polymers (Basel)*. 2023 Mar 1;15(5).
3. Bianchi CMP de C, Bianchi HA, Tadano T, Depaula CR, Hoffmann-Santos HD, Leite DP, et al. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;58.
4. Daniel, A.N.; Sartoretto, S.M.; Schmidt, G.; Caparroz-Assef, S.M.; Bersani-Amado, C.A.; Cuman, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2009, 19, 212–217.
5. Doktorovová S, Araújo J, Garcia ML, Rakovský E, Souto EB. Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC). *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Feb 1;75(2):538-42. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.033. Epub 2009 Oct 8.
6. Čanković M, Bokor-Bratić M, Marinoski J, Stojanović D. Prevalencija i mogući prediktori nastanka protetskog stomatitisa kod pacijenata starijih od 60 godina. *Vojnosanit Pregl*. 2017 Apr 1;74(4):311–6.
7. Elmowafy M, Al-Sanea MM. Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies. Vol. 29, *Saudi Pharmaceutical Journal*. Elsevier B.V.; 2021. p. 999–1012.
8. Garg A, Singh S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011 Oct 15;87(2):280–8.

9. Haghi HR, Asadzadeh N, Sahebalam R, Nakhaei M, Amir JZ. Effect of denture cleansers on color stability and surface roughness of denture base acrylic resin. *Indian J Dent Res.* 2015 Mar-Apr;26(2):163-6. doi: 10.4103/0970-9290.159149.
10. Hauss DJ. Oral lipid-based formulations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Jul 30;59(7):667-76. doi: 10.1016/j.addr.2007.05.006. Epub 2007 May 26. PMID: 17618704.
11. He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia.* 2007 Mar;163(3):137–43.
12. Jafri H, Khan MSA, Ahmad I. In vitro efficacy of eugenol in inhibiting single and mixed-biofilms of drug-resistant strains of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine.* 2018 Feb 15;54:206–13.
13. Khalil, A.A.; Rahman, U.; Khan, M.R.; Sahar, A.; Mehmood, T.; Khan, M. Essential oil eugenol: Sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. *RSC Adv.* 2017, 7, 32669–32681.
14. Khan MSA, Ahmad I. Antibiofilm activity of certain phytocompounds and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2012 Mar;67(3):618–21.
15. Khan SN, Khan S, Misba L, Sharief M, Hashmi A, Khan AU. Synergistic fungicidal activity with low doses of eugenol and amphotericin B against *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2019 Oct 20;518(3):459–64.
16. López C, Bulacio L, Espejo T, Paz M, Pairoba C, Escovich L. Prevalence of chronic hyperplastic candidiasis. Its association to risk factors in an Oral Medicine Service in Rosario, Argentina. *J Mycol Med.* 2012 Mar;22(1):35–41.
17. Manikandan S, Vinesh E, Selvi Dt, Kannan Rk, Jayakumar A, Dinakaran J. Prevalence of *Candida* among denture wearers and nondenture wearers. *J Pharm Bioallied Sci.* 2022;14(5):702.
18. Modrzewska B, Kurnatowski P. Características patogênicas selecionadas de fungos do gênero *Candida*. *Ana Parasitol.* 2013; 59(2):57-66.
19. Mohammadi Nejad, S.; Özgüne, H.; Başaran, N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turk. J. Pharm. Sci.* 2017, 14, 201–206.
20. Mousa MA, Lynch E, Kielbassa AM. Denture-related stomatitis in new complete denture wearers and its association with *Candida* species colonization: a prospective

case-series. *Quintessence Int.* 2020;51(7):554-565. doi: 10.3290/j.qi.a44630. Erratum in: *Quintessence Int.* 2020;51(8):687.

21. Müller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Jul 10;59(6):522-30. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.012. Epub 2007 May 17. PMID: 17602783.
22. Nisar MF, Khadim M, Rafiq M, Chen J, Yang Y, Wan CC. Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review. Vol. 2021, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Hindawi Limited; 2021.
23. Navarro Triviño, F.J.; Barrales, C.; Ruiz-Villaverde, R. Eugenol allergy mimicking aphthous oral recurrent and burning mouth syndrome. *Contact Dermat.* 2019, 2019, 1–2.
24. Ozyilmaz OY, Akin C. Effect of cleansers on denture base resins' structural properties. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2019 Jan 1;17(1).
25. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. *Open Forum Infect Dis.* 2019 Mar 15;6:S79–94.
26. Paranhos H de FO, Peracini A, Pisani MX, Oliveira V de C, souza RF de, Silva-Lovato CH. Color stability, surface roughness and flexural strength of an acrylic resin submitted to simulated overnight immersion in denture cleansers. *Brazilian Dental Journal.* 2013 Mar;24(2):152–6.
27. Peracini A, Machado Andrade I, Oliveira VC, Macedo AP, Silva-Lovato CH, Oliveira Pagnano V, Watanabe E, Oliveira Paranhos HF. *Sou J Dent.* 2017 Abr; 30(2):101-108.
28. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. Vol. 41, *Critical Reviews in Microbiology.* Informa Healthcare; 2015. p. 208–17.
29. Procópio ALF, da Silva RA, Maciel JG, Sugio CYC, Soares S, Urban VM, et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of denture base acrylic resin impregnated with cleaning agents after long-term immersion. *Toxicology in Vitro.* 2018 Oct 1;52:8–13.
30. Pramod K, Ansari SH, Ali J. Eugenol: A Natural Compound with Versatile Pharmacological Actions. *Natural Product Communications.* 2010;5(12). doi:10.1177/1934578X1000501236

31. Radtke, Magdalene, Souto, Eliana B, Müller, R.H., 2005. Nanostructured lipid carriers: a novel generation of solid lipid drug carriers. *Pharm. Technol. Eur.* 17 (4), 45–50.
32. Rocha WRV da, Nunes LE, Neves MLR, Ximenes ECP de A, Albuquerque MCP de A. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. *Research, Society and Development.* 2021 Apr 17;10(4):e43910414283.
33. Saracino IM, Foschi C, Pavoni M, Spigarelli R, Valerii MC, Spisni E. Antifungal Activity of Natural Compounds vs. *Candida* spp.: A Mixture of Cinnamaldehyde and Eugenol Shows Promising In Vitro Results. *Antibiotics.* 2022 Jan 1;11(1).
34. Shajari M, Ahmadi N, Zamani M, Rost, K, Shapouri R. Hospital wastewater treatment using eco-friendly eugenol nanostructured lipid carriers: Formulation, optimization and in vitro study for antibacterial and antioxidant properties. *Environmental Water Res.* July 2022; 94(7):e10751.
35. Singh HP, Bansal P, SH T. Denture Stomatitis and *Candida albicans* in the Indian Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cureus.* 2023 Sep 14.
36. Souto, Eliana B., Müller, Rainer H., 2010. Lipid Nanoparticles: effect on bioavailability and pharmacokinetic changes. In: *Drug Delivery.* Springer, pp. 115–41.
37. Ulanowska M, Olas B. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI; 2021.

2. DESENVOLVIMENTO

Nanocarreador lipídico contendo eugenol para a higiene de próteses dentárias e avaliação da eficácia contra biofilmes de *Candidas*

Irisvaldo Lima Guedes^{1*} Matheus Oliveira do Nascimento¹ Leandro de Sousa Dias¹
Humberto Medeiros Barreto¹ Gláuber Campos Vale¹ André Luis Menezes
Carvalho¹

¹Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil

Resumo

Introdução: O eugenol apresenta eficácia comprovada, *in vitro*, contra biofilmes de *Candidas* que tem alta prevalência em usuários de próteses dentárias. No entanto, é volátil, tem pouca solubilidade em água e toxicidade em doses maiores. A sua encapsulação em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) pode ser viável para o desenvolvimento de novos sanitizantes para a higiene de peças protéticas, já que esse sistema (CLNs) protege o fármaco de degradação, melhora a sua solubilidade, modula sua liberação e, portanto, pode manter sua atividade mesmo em doses menores. **Objetivo:** Desenvolver uma dispersão sanitizante, para a higiene de próteses dentárias, através de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) contendo eugenol e avaliar sua eficácia contra biofilmes de *Candidas albicans* e *glabata* aderidos em corpos de prova de resina acrílica termopolimerizada. **Metodologia:** A formulação foi preparada pelo método de ultra-sonicação e caracterizada quanto ao tamanho de partícula (TP), índice de polidispersidade (IPD), potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulamento (EE), morfologia em microscópio de força atômica (MFA). Adicionalmente, a cinética de liberação foi realizada com o uso de células de Franz. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo e Atividade antifúngica foi avaliada a partir da aplicação de quatro grupos de tratamento (formulação nanoestruturada contendo eugenol (FNE), Eugenol livre (EL), solução salina (SS) e formulação sem o fármaco (FNB)), por oito horas, em biofilmes de *Candidas albicans* e *glabata* aderidos em trinta e dois Corpos de prova de resina acrílica de polimetilmetacrilato (PMMA). **Resultados:** As nanopartículas da FNE apresentaram tamanho por DLS de $199,5 \pm 2,55$ nanômetros (nm), alta homogeneidade ($0,07 \pm 0,02$) e EE ($83,07 \pm 0,23$), PZ negativo ($-25,86 \pm 0,65$) e forma esférica. Além disso, obteve liberação controlada (44,21%) por 24 horas. As CIMs do EL, para as *Candidas albicans* e *glabata*, foram de até 10 ($64 \mu\text{g/mL}$) e 8 ($128 \mu\text{g/mL}$) vezes (respectivamente) maiores do que as CIMs da FNE ($6 \mu\text{g/mL}$ e $16 \mu\text{g/mL}$). Os biofilmes desses microorganismos, ambos tiveram uma redução significativa após a imersão em FNE quando comparada aos demais grupos testados (EL, FNB e SS ($P < 0,0001$)). **Conclusão:** A FNE obteve atividade fungicida contra as cepas isoladas e reduziu significativamente os biofilmes de *Candidas* e, portanto, apresenta um desempenho promissor para a sanitização de próteses dentárias e perspectiva de aplicação futura no mercado odontológico.

Palavras-chave: Eugenol. Nanotecnologia. Biofilmes. *Candida*. Resinas acrílicas.

1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Candidas* são responsáveis por grande parte das infecções fúngicas em humanos [1]. As mais prevalentes e patogênicas são *Candida albicans* (*C.albicans*) e *Candida glabrata* (*C. glabrata*), que pode desencadear infecções que comprometem a saúde dos indivíduos [2, 3]. O patógeno impacta negativamente nos usuários de próteses dentárias removíveis (PDR), pois apresenta facilidade de aderência à superfície acrílica. Além disso, o fungo apresenta características polimórficas, as quais contribuem para surgimento de processos inflamatórios na cavidade oral, como candidíase oral e estomatite protética [4, 5, 6].

A higienização de peças protéticas é importante para a prevenção de doenças fúngicas orais. O método químico-mecânico é o mais recomendado para limpeza e desinfecção de próteses [7]. As substâncias químicas mais utilizadas são: Hipoclorito de sódio (HS), digluconato de clorexidina (CHX) e peróxidos alcalinos (PA). No entanto, o uso continuado das substâncias, podem danificar as estruturas das próteses, alterar suas propriedades químicas e físicas além de ter custo elevado [8, 9, 10, 1, 11].

Nesse contexto, a busca de novos e eficazes produtos naturais, que apresentem atividade antibiofilme de *candidas*, estão sendo cada vez mais promissores [12]. Existe uma eficácia comprovada do eugenol, o principal componente fenólico do óleo essencial de cravo (70-90%), contra cepas de *candidas*. No entanto, é volátil e tóxico em doses mais elevadas [13, 14].

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) fazem parte de um sistema farmacêutico binário e tecnológico contituidos de lipídios sólidos e líquidos que permite a retenção de ativos lipofílicos, protegendo-os da degradação e melhorando sua biodisponibilidade devido a sua capacidade de modulação da liberação [15, 16]. Com a utilização desse sistema isolados como o eugenol tornam-se ainda mais promissores para o desenvolvimento de produtos como sanitizantes antifúngicos [17].

Ainda não foi desenvolvido nenhum nanocarreador lipídico com eugenol encapsulado como alternativa viável para a higienização de PDRs. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma dispersão de carreador lipídico

nanoestruturado contendo eugenol, caracterizá-la e avaliar sua atividade contra biofilmes de *candidas* aderidos em um material acrílico de PDRs.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Produtos e substâncias

Eugenol (*Biodinâmica, Ipirorã, Brasil*) Cera de carnaúba (*Lote: 0210701/2022*) Ácido oléico (*Synth, diadema, Brasil*) Poloxamer 407® (*ChemSpecs, São Paulo, Brasil*) Álcool metílico (*Synth, Diadema, São Paulo, Brasil*), Álcool etílico (*Êxodo científica, Piracicaba, Brasil*). Resina acrílica termopolimerizável (*Vipicril Plus incolor, Florianópolis, Brasil*), Agar Sabouraud Dextrose/Cloranfenicol (*Becton Dickinson, East Rutherford, Estados Unidos*), extrato de levedura (*Isofar, Duque de caxias, Brasil*), Dextrose Anidra (*Dinâmica, Idaiatuba, Brasil*) peptona (*Becton Dickinson, East Rutherford, Estados Unidos*), Cloreto de Sódio (*Vetec, Duque de Caxias, Brasil*) Brain Heart Infusion (*Kasvi, são José dos pinhais, Brasil*).

2.2 Desenho experimental:

Trata-se de um estudo laboratorial *in vitro* que foi aplicado um sistema nanotecnológico por meio de CLNs carregados de eugenol. A formulação foi desenvolvida, caracterizada e testada para avaliar o seu potencial efeito antifúngico em biofilmes de duas *candidas* (*C. albicans* e *C. glabrata*) aderidos em superfícies de corpos de prova de uma resina acrílica termopolimerizável (RAT)

A amostra foi composta por 16 corpos de prova para cada tipo de *candida* testada (32 no total). Estes foram polidos e esterelizados antes do experimento. A quantidade de corpos de prova utilizados no estudo foi determinado a partir de um estudo piloto. O N igual ou superior a três foi possível observar um bom grau de reprodutibilidade.

2.3 Obtenção da formulação nanoestruturada contendo eugenol (FNE) e da formulação nanoestruturada branca (FNB)

Foi utilizado o método de ultra-sonicação de homogeneização de alto cisalhamento [18]. A formulação foi composta por um lipídio sólido (cera de carnaúba), lipídio líquido (ácido oléico), tensoativo (Poloxamer 407 em 5%) e o ativo (eugenol 99,8 %). Todos os componentes, exceto o eugenol, foram aquecidos em 95 °C (10 °C

a cima do ponto de fusão do lipídio sólido (85 °C) [18]. Em seguida, foram inseridos em um único becker de 25 mL e a homogeneização foi feita com o sonificador de ponteira macro ultrassônica (Eco-sonics, Indaiatuba, Brasil) ajustado em potência de 70% por 10 minutos. O eugenol foi inserido ainda na fase oleosa. A FNB foi preparada seguindo os mesmos parâmetros da FNE, mas sem a presença do eugenol.

A formulação de escolha (Tabela I) foi determinada a partir de experimentos prévios a partir da obtenção do melhor Perfil de caracterização.

Tabela I - Concentrações (%) dos componentes da formulação de escolha:

Componentes	FNE (%)	FNB (%)
Cera de carnaúba	7	7
Ácido oleico	3	3
Poloxamer 5%	89,7	90
Eugenol	0,3	-

Fonte: autoria própria

2.4 Caracterização da FNE

2.4.1 *Tamanho da partícula (TP), índice de polidispersidade (IPD) e Potencial zeta (PZ)*

O TP e o IPD foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e o PZ pelo espalhamento de luz eletroforética. As análises foram feitas pelo uso do Zetasizer NanoZS90 (Malvern Panalytic cal, Gondomar, Portugal) em um ângulo fixo de 90° e comprimento de onda de 600 nanômetros.

As amostras foram diluídas na proporção de 1:500. Em seguida, 3 mL da diluição foram inseridos em uma cubeta de 3 mL que foi acoplada no equipamento. Em ambas caracterizações, as medidas foram realizadas em triplicata.

2.4.2 *Eficiência de encapsulamento (EE) do eugenol*

Para determinar a EE do fármaco foi empregado o método utilizado por Vijayakumar, 2016 [19] e Lopes, 2017 [20]. Para verificar quantidade de Eugenol livre (EL) na formulação foi feita uma diluição prévia de 1:1 (750 µL da formulação para 750 µL de água destilada) sobre um filtro de ultracentrifugação (Millipore, Darmstadt, Alemanha) acoplado em tubo falcon de 15 mL. Após uma centrifugação de 20 minutos em potência de 5.000 rpm, 100 µL do filtrado foi diluído em 4 mL de CH₃OH. Em seguida, foi realizada a quantificação do EL em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, Kyoto, Japão) em comprimento de 291,4 nm.

O eugenol total (ET) foi quantificado a partir duas diluições prévias da formulação para alcançar o ponto médio da curva de calibração (30 µg/mL). Portanto, 340 µL foram diluídos em balão de 5 mL em CH₃OH (primeira diluição). A amostra foi submetida a banho ultrassônico (Unique, Idaiatuba, Brasil) por 10 minutos. No final, a amostra foi lavada para uma centrifugação em 3.000 rotação por minuto (rpm) por 10 minutos. O teor (ET) foi determinado pela leitura da segunda diluição em espectrofotômetro UV-VIS. A análise foi realizada em triplicata. A quantidade do ativo encapsulado foi obtida a partir da seguinte fórmula padrão [21]:

$$EE = \frac{ET - EL}{ET} \times 100$$

EE: Eficiência de encapsulação

ET: Eugenol total

EL: Eugenol livre

2.4.3 Avaliação da morfologia por microscópio de força atômica (MFA)

As amostras com (FNE) e sem eugenol (FNB) foram preparadas depositando um volume de 20 µL da nanoformulação diluída de 1:100 (em água ultrapura) na superfície de mica previamente clivada em temperatura ambiente. Após o tempo de secagem (24 horas), a amostra foi lavada três vezes com água destilada e, finalmente seca para análise em MFA, modelo TT-AFM (Workshop, Estados Unidos) em modo vibratório (“*Tapping mode*”), com sondas de silício (TAP300-G, Ted Pella) e frequência de ressonância de, aproximadamente, 240 kHz. As imagens (512 × 512 pixels) foram analisadas usando o software Gwyddion 2.60 e o tamanho médio das nanopartículas foi expresso como a média ± desvio padrão (DP).

2.4.4 Espectroscopia infravermelha transformada de fourier (FTIR-ATR)

A espectroscopia na região do infravermelho foi usada para avaliar a interação do isolado (eugenol) com a matriz do CLN. A análise dos espectros (triplícatas) das amostras, obtidos por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR), foram realizados com o espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., USA) com um acessório de ATR (cristal de diamante, reflexão única, placa superior e braço de pressão) usando o software Agilent MicroLab. O modo de medição foi em transmistância, no infravermelho médio (4000 – 650 cm^{-1}). O número de varreduras foi de 64, com resolução de 2 cm^{-1} . O modo de medição foi em transmistância, no infravermelho médio (4000 – 650 cm^{-1}). O número de varreduras foi de 64, com resolução de 2 cm^{-1} . Foram avaliados todos os componentes de maneira isolada, a FNE e FNB.

2.4.5 *Determinação do pH*

O pH da FNE foi mensurado por potenciometria com uso do peagâmetro (Simpla, Belo horizonte, Brasil). Foram utilizadas duas soluções tampão de referência para a calibração do equipamento (pH 4 e 7). Em seguida, 10 mL da dispersão foram colocados em becker de 25 mL. A medição foi feita imergindo-se o eletrodo diretamente na amostra. A análise foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em média e \pm DP.

2.5 Validação de método analítico para Quantificação do eugenol por espectroscopia UV-VIS

Um método analítico de quantificação das concentrações de eugenol em CLN foi desenvolvido e validado seguindo os parâmetros (seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e efeito matriz) descritos para a validação de métodos analíticos para fármacos e medicamentos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária [22].

A quantificação do eugenol, foi realizada partir da dissolução de 0,025 g do fármaco em 25 mL de álcool metílico (CH_3OH), formando assim uma solução de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Todas as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis UV 1800.

As amostras foram lidas em comprimentos de onda variando de 200 a 400 nm, usando o CH_3OH como solvente. As varreduras foram registradas em 281,4 nm (λ). Para a curva de calibração, Preparou-se diversas soluções de eugenol (15 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 35 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$).

2.6 Estabilidade termodinâmica

As amostras (FNE e FB) foram preparadas e colocadas em frascos de vidro com tampa vedada. Em seguida, foram armazenadas à temperaturas ambiente, $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e baixa, $5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa BOD e geladeira, respectivamente, por três meses. Para determinar a estabilidade das formulações os parâmetros de TP, IPD, PZ e EE foram analisadas em tempos de zero, 45 e 90 dias [23]. Os resultados foram expressos como média e \pm DP.

2.7 Cinética de liberação *in vitro*

2.7.1 Modelo do experimento

A liberação de eugenol encapsulado na FNE foi investigada através do método convencional por uso de células de difusão tipo Franz, com eficácia área de difusão de $1,15 \text{ cm}^2$ e duração de 24 horas.

2.7.2 Preparo do meio receptor e determinação da curva de calibração

Solução tampão fosfato e álcool etílico (proporção de 8:2 em 500 mL (pH 7,4)) foram utilizados para o preparo do meio de receptor [24]. Uma solução foi preparada na concentração de $1000 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Em seguida, cinco concentrações de eugenol ($15 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $20 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $25 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $30 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $35 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e $40 \text{ } \mu\text{g/mL}$) foram analisadas quanto o nível de absorbância do eugenol por espectroscopia UV-VIS no comprimento de $291,4 \text{ nm}$. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

2.7.3 Execução da cinética de liberação

A membrana de diálise (Spectra/Por®Membrana de Diálise, MWCO 3500, Spectrum Laboratories Inc., EUA) foi utilizada para separar o compartimento doador do compartimento receptor e foram equilibradas, no meio receptor, por 24 horas antes do experimento.

Foram preparados dois grupos: soluções teste (FNE (0,5 g)) e solução de eugenol livre (0,5 g). No total, seis células de Franz foram preparadas contendo 14 mL do meio receptor para a análise em triplicata. As soluções foram inseridas nos seus respectivos compartimentos doadores. A temperatura do meio de liberação foi controlada a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em banho maria e a velocidade de agitação magnética (SPLabor, São Paulo, Brasil) foi de 300 rpm.

Em tempos de 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6h, 8 h, 10 h, e 24 h foram coletados 3 mL do meio de liberação de cada célula. As amostras foram inseridas em tubos de ensaios e o meio receptor fresco foi reabastecido. O conteúdo do eugenol liberado foi quantificado a partir da leitura das amostras no espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda de 291,4 nm por primeira derivada. O experimento foi realizado em triplicata.

Os dados de liberação *in vitro* foram ajustados a diferentes modelos matemáticos, como ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. Para isso, foi utilizado o software DDSolver, que fornece uma série de critérios estatísticos para avaliar a qualidade do ajuste aos modelos, como o coeficiente de determinação (R²), o critério de Akaike (CIA) e o critério de seleção do modelo (CSM).

2.8 Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM)

Para o teste de irritabilidade foi seguido os parâmetros estabelecidos por Journal Officiel de la Replublique française (1996) [25], com modificação dos ovos embrionários. Os ovos recém fertilizados de galinha canela preta foram adquiridos de uma fazenda local (Teresina-Piauí, Brasil), com peso de 50–60g. Foram incubados em incubadora com temperatura de 35 °C ± 0,5 °C e umidade relativa de 60% por 10 dias. A casca foi removida ao redor da câmara de ar evidenciando uma membrana externa. Esta foi removida expondo a membrana cório-alantoide. As substâncias testes (controle positivo (hidróxido de sódio 0,1 mol (NaOH), controle negativo (solução salina 0,9% (SS)) e a FNE foram aplicadas sobre o vasculado. Foi observado em 20 segundos, 2 e 5 minutos, a presença ou não de hemorragia, congestão e/ou coagulação/opacidade. O teste foi feito em quadruplicata.

A análise da presença ou ausência das alterações foi feita visualmente pelo pesquisador. Aplicou-se uma nota, para cada ovo avaliado, de acordo com o tempo de exposição das substâncias testadas sobre o vasculado (tabela II) [26]. A média das notas da quadruplicata foi atribuída ao grau de irritabilidade do produto em pele/mucosa seguindo os valores padrões estabelecidos pela Journal Officiel de la Replublique française (1996) [25] (Tabela III).

Tabela II - Notas para a presença das alterações na membrana de acordo com o tempo de exposição do produto:

Fenômenos	≤ 20 Segundos	20 segundos < t ≤ 2 minutos	2 minutos < t ≤ 5 minutos
Congestão	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: *Journal Officiel de la Replublique française (1996).*

Tabela III - Classificação do grau de irritabilidade:

Gradação das lesões	Classificação
0,0 a 0,9	Não irritante
1,0 a 4,9	Irritante leve
5,0 a 8,9	Irritante moderado
9,0 a 21	Irritante Severo

Fonte: *Journal Officiel de la Replublique française (1996).*

2.9 Atividade antifúngica da FNE

2.9.1 Cepas isoladas de candidas

2.9.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Os micro-organismos utilizados fazem parte do acervo microbiológico do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Universidade Federal do Piauí, onde são mantidos em meio de cultura sólido Agar Sabouraud Dextrose/Cloranfenicol Neogen a 8 °C. As linhagens padrões *C. albicans* ATCC 10231 e *C. glabrata* ATCC 2001 foram utilizadas para avaliação de atividade antimicrobiana intrínseca das substâncias testes. Todos os micro-organismos, 24 horas antes dos experimentos, foram semeados e incubados em estufa a 37 °C em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) a 3%, cada cultura microbiana foi diluída em solução salina (0,85%) com densidade óptica ajustada equivalente a 0,5 na escala Mac Farland utilizando espectrofotômetro K37-VIS Kasvi.

A atividade antimicrobiana intrínseca foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com Leal, 2019 [27]. Foram acrescentados em tubos Eppendorf® 100 µL de inóculo fúngico suspenso em solução salina e 900 µL de meio de cultura BHI (10%). Em seguida, 100 µL dessas soluções foram transferidas para os poços em uma placa de 96 poços, seguidas pela adição de 100 µL da solução dos compostos testes em concentrações que variaram de 512 a 0,5 µg/mL (1:1) por diluição seriada. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As CIMs foram definidas como a menor concentração, variando de 512 µg/mL a 0,5 µg/mL, capaz de inibir o crescimento microbiano. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, os resultados dos ensaios foram expressos em média geométrica.

A determinação da CFM foi realizada de acordo com Leal, 2019 [27], com adaptações. Alíquotas de 5 µL das diluições testadas por microdiluição foram inoculadas no meio Agar Sabouraud Dextrose/Cloranfenicol, seguido de incubação a 37°C por 24 h. Após este período as placas foram examinadas para verificação de presença ou ausência de crescimento microbiano. A CFM foi definida como a menor concentração da substância teste na qual não é observado crescimento microbiano. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, os resultados dos ensaios foram expressos em média geométrica.

2.9.2 *Biofilmes pré-formados de candidas*

2.9.2.1 *Confecção e randomização dos corpos de prova*

Inicialmente, foi confeccionado um modelo base com resina acrílicas autopolimerizável. os corpos de prova foram confeccionado com 2 mm de espessura e 12 mm de diâmetro em formato circular com o uso de uma resina acrílica termopolimerizável de polimetilmetacrilato (PMMA). O acabamento foi feito em politriz com adaptação de discos de lixa abrasivos (Sait, Guarulhos, Brasil)(numeração de 600 e 1200). O polimento foi realizado com o uso de polidores de acrílico (pontas abrasivas marron, verde e amarela (Exa-Technique, São Paulo, Brasil)).

A randomização simples foi utilizada para alocar os corpos de prova seus respectivos grupos preestabelecidos. os corpos de prova foram inseridos em poços de placas de acrílico pré-enumeradas na sequência de 01 a 32. Em seguida, um gerador de números aleatórios online (appsorteos) foi usado para dividir aleatoriamente o número total dos discos em 4 grupos.

2.9.2.2 Determinação dos grupos de tratamento

Foram empregados quatro grupos de comparação para a avaliação da atividade antibiofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* em 32 corpos de prova. A divisão das amostras, quanto à aplicação dos grupos de tratamento, está descrita na Tabela IV.

Tabela IV - Divisão dos corpos de prova para a aplicação dos grupos de tratamento:

Tratamentos	Grupos	Quantidade de corpos de prova	
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
Intervenção	FNE	04	04
Intervenção sem o Ativo	FNB	04	04
Controle Positivo	EL 0,3%	04	04
Controle negativo	Solução salina 0,9% (SS)	04	04
Total	4	32	

Fonte: Autoria própria.

2.9.2.3 Metodologia da formação do biofilme e aplicação dos tratamentos

2.9.2.3.1 Cepas e condições de crescimento

Foram empregadas linhagens padrão de *C. albicans* ATCC 10231 e *C. glabrata* ATCC 2001. Para a reativação e manutenção das cepas foram utilizados o Ágar Sabouraud Dextrose – ASD com Cloranfenicol (Difco Laboratories). Para crescimento do biofilme foi utilizado 30 mL de caldo Yeast Peptone Dextrose (“YPD”; extrato de levedura 10g/L; dextrose 20g/L; peptona 20 g/L). Todos os meios foram preparados seguindo as descrições dos fabricantes.

2.9.2.3.2 Formação do biofilme propriamente dito

Para a formação do biofilme, células leveduriformes foram semeadas em ASD (Difco Laboratories) e inoculadas em tubos Falcon contendo 30 mL de caldo (YPD). Foram incubadas em uma temperatura de 37°C durante 18 horas em estufa BOD. Em

seguida, parte da suspensão foi inserida em outro tubo Falcon com meio YPD estéril para reajustar a concentração celular em 10^6 células/mL, de acordo com a densidade óptica (DO) de 2,0 na escala McFarland.

2.9.2.3.3 *Fase de adesão e aplicação dos tratamentos*

Na avaliação da fase de adesão, 0,5 mL da suspensão celular padronizada foi transferida para uma placa de 24 poços contendo um corpo de prova de resina acrílica no fundo de cada poço. A adesão inicial foi feita através da incubação da placa na estufa por 6 horas em uma temperatura de 37° C. Após esse período, a suspensão contaminada foi removida e nova alíquota de 0,5 mL do meio YPD foi adicionada para cada poço que permaneceu por mais 18 horas nas mesmas condições anteriores. Após esse período o meio foi novamente removido e acrescentado, em cada poço, 0,5 mL de cada um dos tratamentos. Em seguida, a placa foi incubada a 37° C por 8 horas.

2.9.2.3.4 *Atividade contra biofilmes de Candidas*

Para avaliar a atividade antifúngica dos tratamentos, os corpos de prova, após 24 horas de desenvolvimento do biofilme, foram transferidos para uma nova placa com poços contendo 0,5 mL de solução salina. O biofilme foi removido para a solução por meio de pipetagem rigorosa. Cerca de 500 μ L da suspensão obtida foi transferida para eppendorfs estéreis. A partir dessa suspensão, 100 μ L foram utilizados para fazer a diluição seriada (10^{-1} a 10^{-7}). Cada uma das diluições plaqueadas foi feita em ágar ASD em quadruplicata, as quais foram incubadas por 48 horas a 37° C para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

2.10 Análise estatística:

Os pressupostos de igualdade de variância e distribuição normal de erros foram verificados para todas as variáveis de respostas testadas. Os dados de UFC originais foram transformados em logaritmos na base 10. O software Graphpad prism 9,02 program (Graphpad, La Jolla, Ca, USA) foi usado para análise estatística. Foi feito o teste SHAPIRO-WIK pra avaliar a distribuição de normalidade dos dados. Por apresentar distribuição normal o teste ANOVA, seguindo do teste de Tukey foi aplicado para comparar as variáveis transformadas. O nível de significância foi de 5%.

3. RESULTADOS

3.1 Obtenção da FNE e FNB

As Dispersões de CLN apresentaram coloração branca, opacas e ausência de precipitado ou partícula aparente. A Figura I apresenta a obtenção das formulações nanoestruturadas (FNB e FNE) após o período de esfriamento.

Figura I: Obtenção das formulações nanoestruturadas:



Fonte: autoria própria

3.2 Caracterização da FNE

3.2.1 TP, IPD, PZ e EE

As nanopartículas da FNE e da FNB apresentaram tamanho nanométrico, alta homogeneidade e EE e PZ negativo (Tabela V). Não houveram alterações significativas dos parâmetros na presença do fármaco na formulação ($P > 0,05$).

Tabela V - Caracterização físico-química das formulações (FNE e FNB):

Parâmetros	FNE Média ± DP	FNB Média ± DP
TP (nm)	199,5 ± 2,55	198,16 ± 3,70
IPD	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,04
Pz (mV)	- 25,86 ± 0,65	-24,33 ± 0,23
EE (%)	83,07 ± 0,23	-

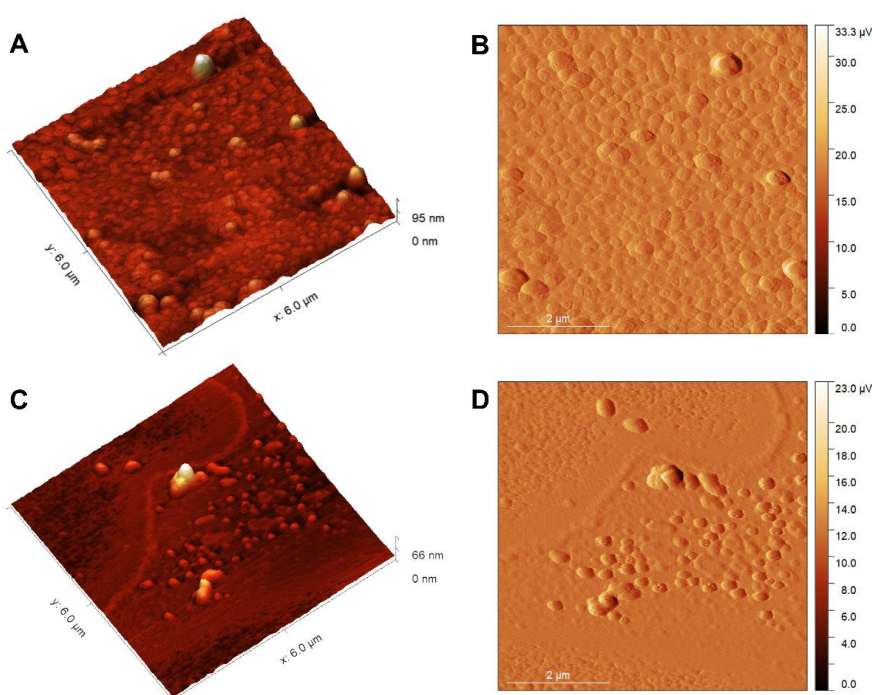
Fonte: autoria própria

Legenda: mV: milivolt

3.2.2 Determinação da Morfologia por MFA

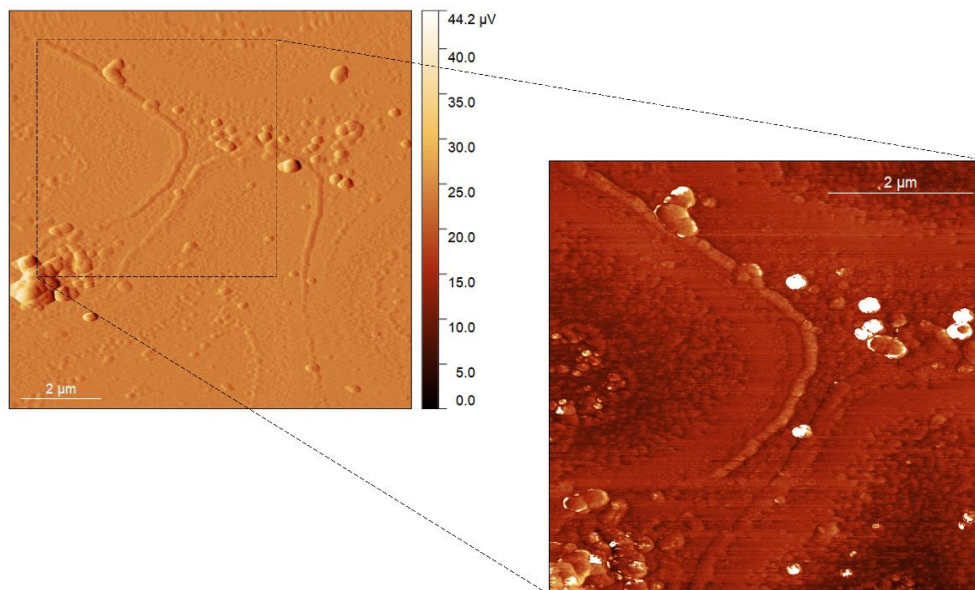
Na Figura II, pode-se observar nanopartículas por Microscopia de Força Atômica (MFA). As imagens revelam nanopartículas esféricas, nas duas amostras analisadas, de acordo com o perfil extraído. Na figura III, é possível observar a imagem de fase da FNE, demonstrando a presença de materiais diferentes, que representam, provavelmente, o eugenol e a matriz. A média de tamanho para a FNB foi igual a $21,04 \pm 7,92$ nm, para a FNE foi $13,91 \pm 2,79$ nm (Figura IV).

Figura II-Imagens de MFA.



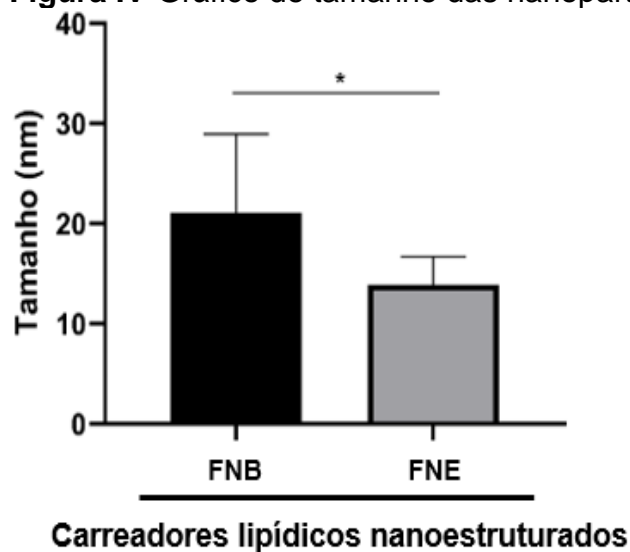
Legenda: μV- microvolt; Imagens de topografia em 3D (A e C) e imagens de amplitude em 2D (B e D). FNB (A e B); FNE (C e D). Escala = 2 μm (micrómetro).

Figura III-Imagens da FNE. À direita, imagem de amplitude (10 x 10 µm) e, no detalhe à esquerda, imagem de fase (6 x 6 µm). Escala = 2 µm.



Legenda: µV- microvolt

Figura IV-Gráfico de tamanho das nanopartículas a partir da análise de MFA.



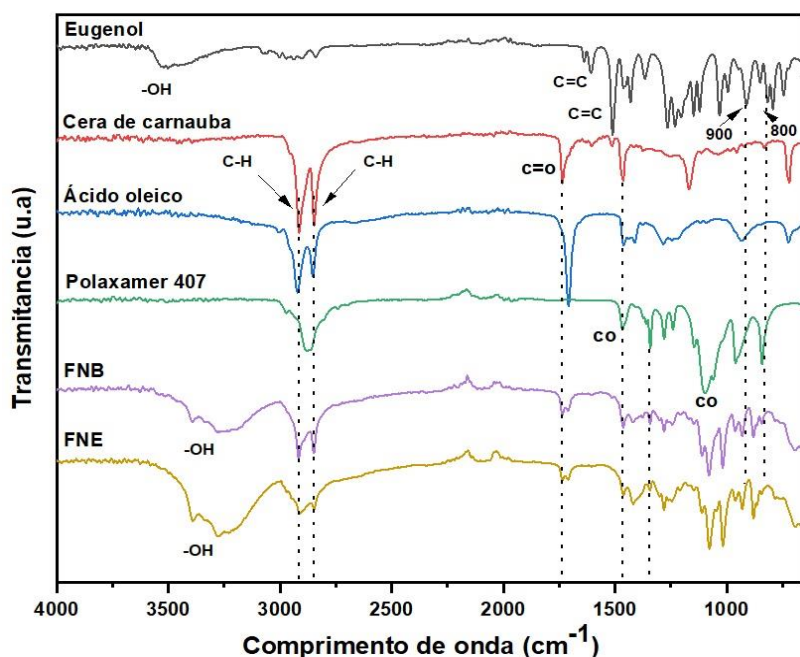
Legenda: * $p < 0,0001$ após teste de Mann-Whitney.

3.2.3 FTIR-ATR

A espectroscopia FT-IR mostra-se promissora em sua capacidade de detectar conformações das moléculas lipídicas em suas matrizes. Os espectros de FT-IR de eugenol, cera de carnaúba, ácido oleico, polaxamer 407, FNE e FNB são mostrados na Figura V. Os espectros de FT-IR (Figura V(eugenol, FNB e FNE) mostraram uma banda na região de $1464\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ que indicam pico médio relacionado a um

estiramento (C – H). Isso pode ser justificado pela separação da hidroxila (OH) da estrutura do lipídio líquido e a quebra do anel aromático (Carbonos livres) da molécula do eugenol proporcionando uma interação das substâncias. Uma banda em 2912 cm⁻¹ característico de um estiramento (C – H) com redução de dois picos a partir da presença do eugenol na FNE. Com a quebra do anel aromático presente na estrutura molecular do lipídio sólido pode haver a formação de CH₂ ((Figura V (f) no ponto 2912 cm⁻¹). O eugenol pode ter provocado a perda de hidrogênio (H) formando a redução do alongamento em questão. Na banda entre 1600 a 1470 representa regiões vibratórias oriundas do anel aromático presente na estrutura molecular do eugenol.

Figura V-Gráfico em FT-IR:



Legenda: OH: hidroxila oriunda de ácido carboxílico; C-H: estiramento formado por carbono e hidrogênio; C=O: éster carbonila; C=C: representação de um anel aromático formado por carbonos; CO: Monóxido de carbono.

3.2.4 Determinação do pH

Após a imersão do eletrodo na formulação teste (FNE) o pH obteve o valor em média e DP de 4,70 ± 0,01 semelhante ao pH normal da pele. Os valores da triplicata estão descritos na Tabela VI.

Tabela VI- Valores de pH da FNE por triplicata:

Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média e DP
-----------	-----------	-----------	------------

Valores mensurados	4,70	4,69	4,71	4,70 ± 0,01
--------------------	------	------	------	-------------

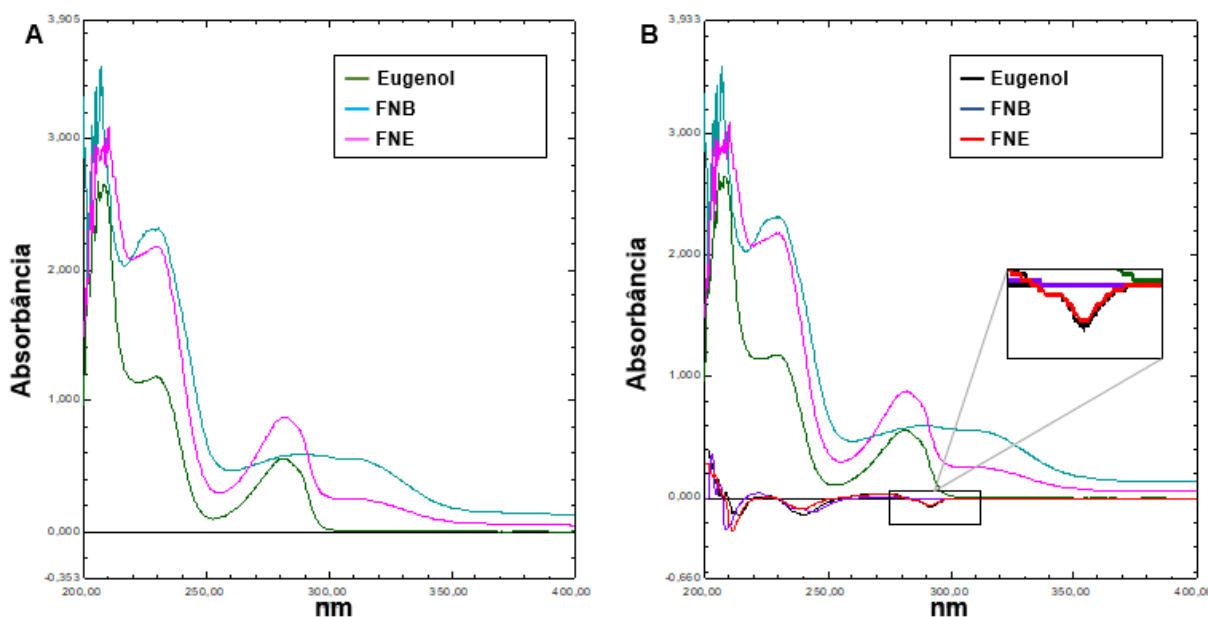
Fonte: autoria própria

3.3 Validação de método analítico para Quantificação do eugenol por espectroscopia UV-VIS

Foi observado que a maior absorbância de eugenol atingiu-se quando o feixe de luz se encontrava em 291,4 nm (λ) (Figura VI (A)). Uma possível interferência foi observada na leitura do eugenol, pois mostrou um pico na leitura semelhante ao da FNB (Figura VI (A)). Como observado na Figura VI (B), foi feita a derivação espectrofotométrica ($\Delta\lambda$, 1ª ordem), no intuito de eliminar os interferentes da formulação e melhorar as análises de quantificação. O método foi capaz de quantificar o fármaco sem interferência dos constituintes da formulação na faixa de UV $\lambda = 291,4$ nm.

A Tabela VII apresenta os resultados da validação do método analítico. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) apresentaram valores inferiores as de $3 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ o que comprova a sensibilidade do método em quantificar e detectar o eugenol sem alterar os fatores intrínsecos do equipamento. O método foi considerado robusto em relação ao uso de solventes de fabricantes distintos, sem diferenças significativas na preparação da amostra ($p > 0,05$) (Tabela VIII).

Figura VI - Seletividade da validação do método analítico:



Legenda: **A:** absorvância (nm) do eugenol e FNE (30 µg mL⁻¹) em ordem zero; **B:** absorvância (nm) do eugenol e FNE (30 µg mL⁻¹) em primeira ordem.

Tabela VII - Parâmetros Obtidos na Primeira Derivada Espectral na Validação do Método Analítico para Quantificação do eugenol:

Parâmetros		Resultados experimentais			CV (%)
Linearidade	λ (nm)	Equação da regressão linear	R	LD/LQ (µg x mL ⁻¹)	-
	291,4	$y = 0,0026x - 0,0113$	0,9964	0,5918 0,8967	-
Precisão		Concentração Média (µg/mL) ± DP			
Repetibilidade*		31,13 ± 0,46			1,49
Intermediária*	A1D1	31,13 ± 0,46			1,48
	A1D2	31,06 ± 0,56			1,83
	A2D1	30,81 ± 0,85			2,75
	A2D2	31,00 ± 0,90			2,92
Exatidão*		Concentração média (µg/mL) ± DP	Recuperação (%)		
		24 µg/mL	25,12 ± 0,034	104,91	3,95
		30 µg/mL	29,53 ± 0,053	97,40	3,59
		36 µg/mL	35,59 ± 0,134	98,06	0,72
Robustez*		Parâmetros	Concentração Média (µg/mL) ± DP		
Marca do solvente	A	30,80 ± 0,43			1,42
	B	29,77 ± 0,37			5,02
Velocidade de varredura	Lenta	30,16 ± 1,51			0,96
	Rápida	30,16 ± 0,37			1,25
Comprimentos de onda	291,4 nm	30,42 ± 0,21			0,72
	289,6 nm	30,97 ± 0,29			1,00
		Pontos da curva (µg/mL)	Concentração média (µg/mL) ± DP		

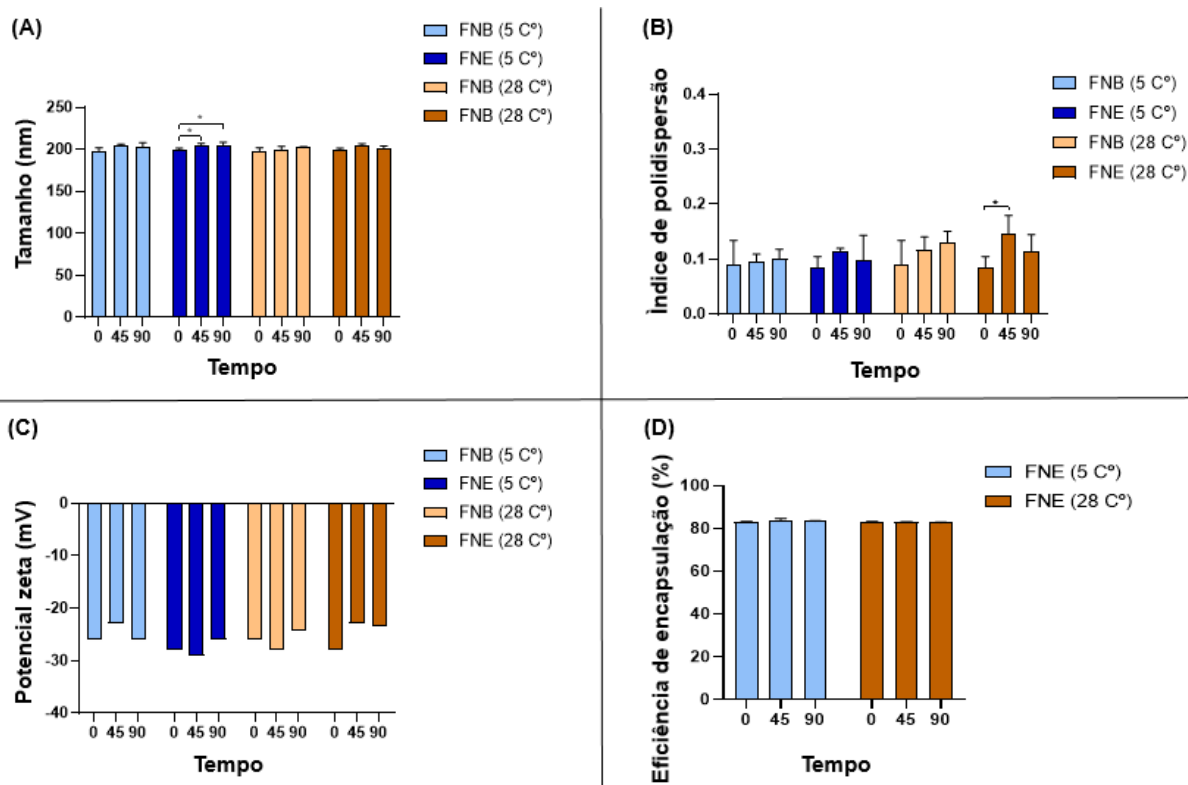
Efeito matriz*	15	6,32 ± 0
	20	-2.29 ± 2,64
	25	5,45 ± 1,81
	30	2,48 ± 0,86
	35	7,53 ± 2,61
	40	6,36 ± 1,61

Legenda: LD: limite de detecção, LQ: Limite de quantificação, DP: desvio padrão, R: Coeficiente e correlação, CV: Coeficiente de variação, A1D1: Analista 1 do dia 1, A1D2: Analista 1 do dia 2, A2D1: Analista 2 do dia 1, A2D2: Analista 2 do dia 2; * p > 0,05 – ANOVA, pós-teste de Tukey.

3.4 Estabilidade termodinâmica

A distribuição (média e DP) do TP, PZ, IPD e a EE, após armazenamento em 28 ± 2 °C por 90 dias da FNE foi de $202,22 \pm 1,35$ nm, $-24,33 \pm 0,23$ mV, $0,12 \pm 0,02$ e $82,65 \pm 0,28$ %, respectivamente. Já a FNE mantida em geladeira (-5 ± 2 °C) obteve os valores dos parâmetros em $203,53 \pm 4,50$ nm, $-25,83 \pm 0,65$ mV, $0,10 \pm 0,01$ e $83,34 \pm 0,26$ %. Não houve alteração significativa dos parâmetros ($P > 0,05$) com a mudança de temperatura quando comparado aos valores basais (Tempo zero) (Figuras VII (A, B, C e D)). O TP da FNE em -5 ± 2 °C aumentou significativamente ($P \leq 0,05$) do tempo zero para o de 45 e 90 dias (Figura VII (A)). O IPD da FNE mantida em 28 ± 2 °C apresentou aumento signific significativo ($P \leq 0,05$) em relação ao tempo zero para o de 45 dias (Figura VII (B)).

Figura VII - Estabilidade das formulações usando os parâmetros: TP, IPD, PZ e EE por 90 dias em temperaturas de 5 °C e 28 °C:

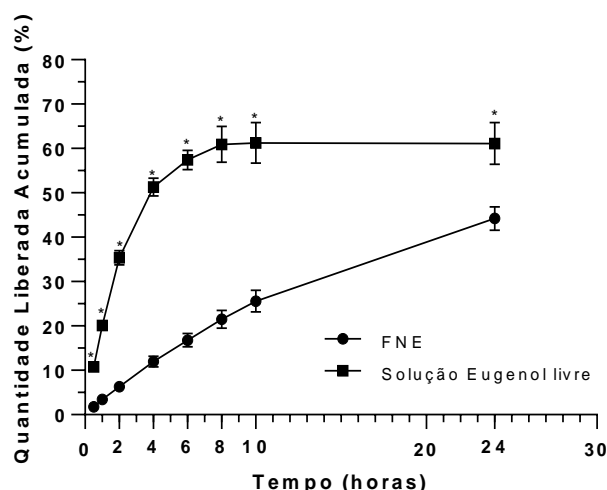


Legenda: (A): ANOVA, seguido de Tukey; *:P ≤ 0.05; (B): ANOVA, seguido de Tukey; *:P ≤ 0.05; (C): ANOVA, seguido de Tukey: p ≥ 0,05; (D): ANOVA, seguido de Tukey: p ≥ 0,05.

3.5 Cinética de liberação do eugenol *in vitro*

As quantidades liberadas acumuladas (24 horas) da FNE e da solução de eugenol livre foram de 44,21% e 61,11%, respectivamente (Tabela %). A FNE apresentou perfil de liberação controlada durante todo o perfil cinético. As concentrações liberadas de eugenol foram significativamente maiores (P<0,05) em todos os pontos de coleta da solução de eugenol livre quando comparadas as concentrações liberadas da FNE (Figura VIII).

Figura VIII-Perfil de liberação *in vitro* do eugenol encapsulado em CLN e livre:



Legenda: *P<0,05 após teste Anova two-way

Para a análise dos resultados da cinética de liberação *in vitro*, a média do R2 foi utilizado como decisão critério na escolha do melhor modelo. Os que mais se adequaram foram o Korsmeyer-Peppas, para a FNE (R2= 0,9989) e primeira ordem, para a solução de eugenol livre (R2= 0,9687). No modelo peppas da FNE, o expoente de liberação (n) foi de 0,6488 (Tabela VII).

Tabela VIII- Valores dos parâmetros matemáticos para cada modelo avaliado:

Soluções	Modelos	Parâmetros matemáticos (Média)				
		K	R2	CIA	CSM	Valor de N
FNE	Ordem zero	1,386	0,9969	3,2221	4,6017	-
	Primeira ordem	0,021	0,9985	0,2265	5,6002	-
	Korsmeyer-Peppas	5,72	0,9989	-0,7965	5,9412	0,6488
	Higuchi	8,530	0,9469	9,7046	2,4409	-
Eugenol livre	Ordem zero	2,399	0,9447	2,1795	3,1059	-
	Primeira ordem	0,055	0,9687	1,0650	3,4774	-
	Korsmeyer-Peppas	0,037	0,9629	1,4550	3,3474	0,2479
	Higuchi	23,08	0,5549	12,4837	0,1429	-

3.6 HET-CAM

A FNE não provocou nenhuma alteração (congestão, hemorragia e coágulo) no vasculhado dos quatro ovos testes. Apresentou-se como substância não irritável (score 0,0) para pele/mucosas pelo método HET-CAM (Quadro I).

Quadro I: Análise do grau de irritabilidade pelo método HET-CAM:

Soluções	Média e Classificação
Controle negativo (Solução salina)	0,0 Não Irritável
Controle positivo (Hidróxido de sódio)	12,0 Irritante Severo
Formulação teste (FNE)	0,0 Não Irritante

Fonte: autoria própria.

3.7 Análise microbiológica da CIM e da CFM

As CIMs do eugenol contra as cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* foram de 64 e 128 µg/mL, respectivamente. A FNE reduziu os valores das CIMs em 10 e 8 vezes (6 e 16 µg/mL, respectivamente). Além disso, as CFMs foram iguais aos valores de CIMs para ambas as *candidas* de ambas as soluções. A FNB não apresentou atividade antifúngica, para as duas sepas, mesmo na presença da maior concentração testada (1024 µg/mL). Já a FNE obteve ação fungicida, para as duas sepas testes nos valores de CIMs (Tabela IX).

Tabela VII - Efeito inibitório das Formulações nanoestruturadas (FNE e FNB) e do eugenol contra cepas de candidas:

Formulações	Candidas	(µg/mL)			Efeito inibitório
		CIM	CFM	CFM/CIM	
FNB	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	≥1024	≥1024	-	Sem atividade
	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	≥1024	≥1024	-	Sem atividade

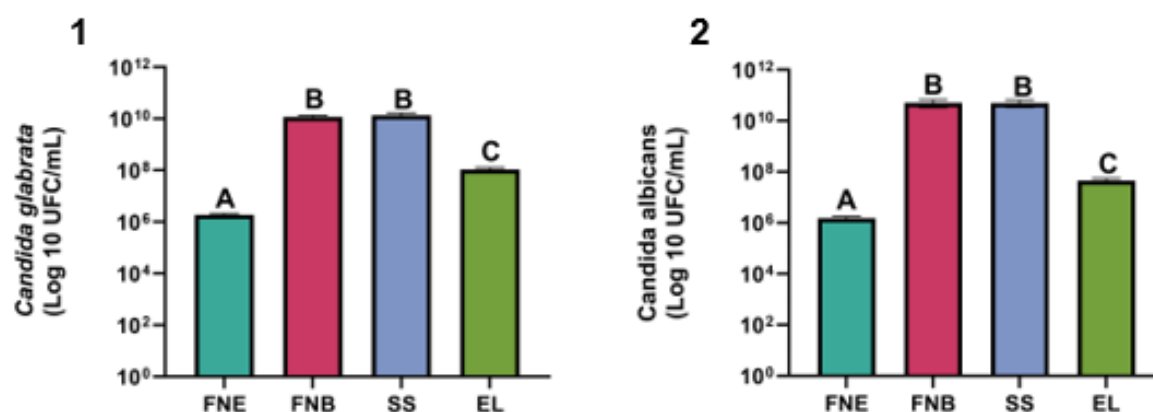
Eugenol	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	64	64	1:1	Fungicida
	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	128	128	1:1	Fungicida
FNE	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6	6	1:1	Fungicida
	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	16	16	1:1	Fungicida

Fonte: autoria própria

3.8 Atividade antifúngica da FNE em biofilmes de *Candida*

A análise quantitativa de biofilme por contagem de células viáveis (UFC) revelaram que a FNE apresentou a maior atividade antimicrobiana, com redução significativa dos biofilmes em comparação com os demais grupos ($p < 0,0001$) (Figura X (1 e 2)). O EL, mesmo na mesma concentração da FNE (0,3%), obteve desempenho inferior contra os biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* ($p < 0,0001$). A FNB e a SS não apresentaram diferença significativa entre si na redução dos biofilmes ($p > 0,999$) (Figura X+ (1 e 2)).

Figura IX - Atividade das soluções testes sobre biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*:



Legenda: (1) One-way ANOVA e teste Tukey: FNE vs. FNB ($P < 0,0001$); FNE vs. SS ($P < 0,0001$); FNE vs. EL ($P < 0,0001$); FNB vs. SS ($P > 0,999$); FNB vs. EL ($P < 0,0001$); EL vs. SS ($P < 0,0001$).

Legenda: (2) One-way ANOVA e teste Tukey: FNE vs. FNB ($P < 0,0001$); FNE vs. SS ($P < 0,0001$); FNE vs. EL ($P < 0,0001$); FNB vs. SS ($P > 0,6888$); FNB vs. EL ($P < 0,0001$); EL vs. SS ($P < 0,0001$).

4. DISCUSSÃO

4.1 Sistema nanotecnológico aplicado (CLN) e componentes da FNE

O presente estudo desenvolveu e caracterizou uma dispersão de CLN contendo eugenol para a higiene de próteses dentárias. A escolha do isolado foi determinada por sua capacidade fungicida contra fungos do gênero *candida* [28, 29, 30]. No entanto, o eugenol apresenta características que desfavorecem seu uso nas indústrias farmacêuticas como, toxicidade em grandes concentrações, volátil e baixa estabilidade termodinâmica [31, 21, 32, 33]. Os nanocarreadores lipídicos apresentam vantagens como, biocompatibilidade, protege fármacos de degradação, aumenta a atividade terapêutica de medicamentos hidrofílicos e lipofílicos mesmo em concentrações baixas de maneira controlada ou direcionada [34, 35, 36]. Portanto, o uso do sistema nanotecnológico foi aplicado no intuito de neutralizar as desvantagens do eugenol e tornar viável a sua aplicação.

Os lipídios de escolha foram a cera de carnaúba (sólido) e o ácido oleico (líquido) e o surfactante, polaxamer 407. São componentes fisiológicos, biodegradáveis e biocompatíveis, que podem incorporar drogas lipofílicas e hidrofílicas dentro da matriz lipídica [37]. O lipídio sólido é a fase dispersa e se caracteriza por sua alta estabilidade contra processos de oxidação [38, 39], o surfactante atua como um emulsificante [36] e o Lipídio líquido atua na imperfeição da matriz que promove maior encapsulamento de fármacos [40].

A concentração do polaxamer usada na formulação 407 foi de 5%. Estudos revelam que porcentagens entre 0,5 e 5% de surfactante aumentam a estabilidade da formulação além de ser consideravelmente seguro (GRAS) (que não poderiam produzir efeitos tóxicos significativos na concentração utilizada) [41, 42, 43]. Já os lipídios foram apresentados na proporção 70:30, na qual é considerada preferível para a mistura. No entanto, dependendo dos atributos da formulação, a proporção pode variar [44].

4.2 Caracterização da FNE

4.2.1 TP

As nanopartículas da FNE apresentaram tamanhos nanométricos ($199,5 \pm 2,55$ (análise no zetasizer (Tabela V)) e ($13,91 \pm 2,79$ em MFA (Figura IV)). As partículas se tornam nanopartículas quando seu tamanho se enquadra na escala nanométrica na 1 a nm a 1000 nm. A principal vantagem é que as propriedades físico-químicas e funcionais melhoram quando se passa para a nanodimensão [45]. A redução do

diâmetro médio pode promover a estabilidade e biodisponibilidade das nanopartículas lipídicas [39].

Notavelmente houve uma redução do tamanho das partículas na leitura em MFA quando comparada a em zetasizer. Isso é justificado pela diferença da análise dos métodos e os seus graus de precisão. A técnica em zetasizer medem o espalhamento dinâmico da luz que é utilizado para calcular o diâmetro médio e não tamanho das partículas, [46, 47]. Já a MFA avalia em três dimensões informações em tempo real dos sistemas lipídicos, com resolução próxima de um nm [48, 49] e por isso apresenta uma análise nanométrica mais fiel das nanopartículas.

4.2.2 IPD

O IPD se refere ao grau de não uniformidade de uma distribuição de tamanho de partículas [50]. O valor (em números) do IPD varia de 0,0 (para uma amostra perfeitamente homogênea em relação ao tamanho de partícula) a 1,0 (para uma amostra altamente heterogênea com múltiplas populações de tamanho de partícula). Valores menores ou iguais a 0,2 geralmente são mais aceitáveis para a otimização de nanopartículas contendo polímeros. Segundo Tamjidi, 2013 [49], valores acima de 0,5 indicam distribuição granulométrica muito ampla, caracterizando alta instabilidade. O presente estudo obteve partículas nanométricas com alta monodispersão ($0,07 \pm 0,02$ (Tabela 5)), na qual indica ótima estabilidade física.

4.2.3 PZ

Os valores de ZP entre -30 e +30 mV são considerados ideais para dispersões coloidais para manter uma boa estabilidade [51, 52]. O sistema torna-se suscetível à desestabilização quando apresenta valores entre 5 e ± 30 mV [53, 54]. Os resultados do presente estudo apresentaram PZ negativo em $-25,86 \pm 0,65$ (Tabela V). Mesmo com valores a baixo da média, a dispersão se manteve estável em todo o período avaliado (Figura VII (C)). Isso pode ser explicado pela presença do estabilizador estérico Poloxamer 407.

Sufactantes como o poloxamer, ao serem adsorvido na superfície, resulta na mudança no plano de cisalhamento da partícula [55]. A sua cadeia polimérica promove uma repulsão das partículas (força entrópica) no que possibilita uma distância considerável entre elas. Com isso a força de Van der Waals torna-se fraca para para

promover a agregação das partículas [56, 57]. Embora PZ forneça informações sobre as forças repulsivas eletrostáticas, ele não fornece nenhuma visão sobre as forças atrativas de van der Waals. Portanto, formulações como a FNE, desenvolvida nesse estudo, pode apresentar ótima estabilidade mesmo com PZ abaixo do valor considerável.

4.2.4 EE

A EE do atual trabalho foi $83.07 \pm 0,23$ % (Tabela V). Esse alto teor de encapsulação pode ser justificado pela presença do lípidio líquido na formulação, pois possibilita a formação imperfeita da matriz lipídica e, conseqüentemente, potencializar o maior aprisionamento do fármaco [40].

O eugenol apresenta alta solubilidade na fase oleosa e isso também pode ser um fator influente para a melhor EE [58]. Estudos afirmam que substâncias ativas com alta solubilidade lipídica apresentam EE relativamente elevado, acima de 80% [59].

4.2.5 Morfologia

A análise morfológica em MFA apresentou nanopartículas esféricas. De acordo com a literatura partículas esférica promovem maior potencial para liberação controlada e proteção contra degradação dos fármacos. Além disso, permitem a redução da quantidade tensoativos sem perder a estabilidade, devido à minimização da área de superfície específica [60, 39].

4.2.6 FTIR-ATR

Os espectros de FT-IR de lípidios sólido e líquido na FNE mostraram uma banda ampla e nenhum pico, respectivamente na faixa de 1200–1350 cm^{-1} (Figura V). Isso se associa à redução da cristalinidade da cera após adição do ácido oléico. Por isso, apresentam partículas menores e alto encapsulamento [61, 17].

O pico presente na cera de carnúba no número de onda 1740-1750 cm^{-1} , se refere ao éster carbonila (C=O) que também se apresenta em FNB e FNE. Formulações que apresentam esse tipo de característica, oriundo de C=O, tendem a reduzir a sazonalidade que representa a presença de estabilidade da formulação. Isso pode ser garantido pela presença do lípidio sólido utilizado [62, 63].

4.2.7 pH

O pH “normal” da superfície da pele (SC) da maioria das partes do corpo é ácido e está na faixa de pH 4,1–5,8 [64]. A FNE apresentou ser segura para o seu contato em pele (pH de $4,70 \pm 0,008$ (Tabela VI)). O teste alternativo, HET-CAM, reafirmou a a segurança da formulação, *in vitro*, ao mensurar o grau de irritabilidade para pele/mucosas (não irritável).

4.3 Validação de método analítico para quantificação do eugenol por espectroscopia UV-VIS

Para quantificar a concentração de eugenol no CLN foi aplicada a técnica de espectrométrica UV-Vis. Devido a presença interferentes, com absorvância no mesmo comprimento de onda do fármaco, foi realizada derivação espectrofotométrica no intuito de melhorar as análises quantitativas da formulação estudada [65].

A exatidão do método foi avaliada pela determinação de três concentrações de eugenol (baixa 80% (24 µg/mL), média 100% (30 µg/mL) e alta 120% (36 µg/mL)) compostas pela a adição de 5 µg/mL da FNE. Este parâmetro é analisado através da precisão da extração do fármaco de uma faixa determinada e que os valores (%) teóricos da quantificação devem está próximos de 100% [22]. O método realizado obteve percentuais próximos de 100 % nas três concentrações testadas (baixa, média e alta) (Tabela VII).

As variações como, marca do solvente, comprimento de onda e velocidade de leitura foram aplicadas para a determinação da robustez. Trata-se de um método método quantitativo que analisa o impacto das variações ambientais apresentadas nos resultados obtidos [22]. O método aplicado foi robusto, pois não houve alteração significativa nos valores quantificados em relação às mudanças dos parâmetros utilizados ($p > 0,05$).

A Interferência da matriz na quantificação do eugenol variou entre -2,29 e 7,53 (Tabela VII). Todos os efeitos foram considerados baixos. Segundo Niessen, 2006 [66], valores menores do que 20 (<20) estão na faixa considerada como efeitos matriciais baixos.

4.4 Estabilidade termodinâmica:

A FNE teve alterações significativas ($P < 0,05$) do tamanho da partícula e IPD em relação ao tempo de temperaturas específicas, (amostra em -5 ± 2 °C no tempo zero para o de 45 e 90 dias e amostra em 28 ± 2 °C no tempo zero para o de 45 dias, respectivamente (Figura VII A e B). Essas alterações podem está associadas à modificação cristalina devido a incorporação do ativo, pois pode influenciar nas interações entre os lipídios e tensoativo utilizado. Outros fatores são, taxas de aquecimento e resfriamento, temperatura de armazenamento e, principalmente, dos materiais utilizados na formulação [60, 39].

Mesmo com a presença de alterações específicas citadas no parágrafo anterior, a FNE manteve todos os parâmetros aceitáveis para o sistema aplicado (CLN) durante os 90 dias de armazenamento nas duas temperaturas testadas (baixa e ambiente). Essa estabilidade pode ser justificada pela presença da cera de carnaúba como lipídio sólido. Trata-se de um ácido graxo de cadeia longa e conseqüentemente apresenta degradação lenta que promove boa estabilidade [67]. Os resultados desse estudo corroboram com os estudos de Averina, 2010 [68] e Krambeck, 2021 [52].

4.5 Liberação

A liberação *in vitro* fornecem informações sobre o mecanismo de liberação dos fármacos, correlacionando com resultados *in vivo* [69]. O presente estudo utilizou o modelo celular de difusão com uso de membrana de diálise, pois permite que o fármaco encapsulado em um sistema nanoparticulado (CLN) seja transferido para um compartimento receptor para a sua análise de quantificação [70].

Na FNE, apresentou um perfil de liberação controlada com quantidade acumulada de eugenol de 44,21% em 24 horas. Isso já era esperado devido a capacidade do sistema aplicado em aprisionar um ativo em uma matriz lipídica desordenada que dificulta sua liberação rápida [40, 69]. O tipo de estabilizador também pode influenciar no controle da liberação. Sulfactantes como o poloxamer 407, utilizado neste estudo, contribuem para uma degradação mais lenta do sistema devido o seu efeito estérico [56].

O modelo Korsmeyer-Peppas foi o que mais se ajustou na análise cinética de liberação da da FNE. A presença do poloxamer 407 na formulação pode ter influenciado no melhor ajuste desse modelo já que ele representa uma relação que

descreve a liberação do fármaco de um sistema polimérico, dependendo do tipo de dissolução em questão [71, 72].

O (N) apresentado no modelo Korsmeyer-Peppas na FNE foi de 0,6488. Com base no valor deste expoente, a liberação e difusão do fármaco foi controlada por transporte não-Fickiano o que parece indicar a difusão anômala como superposição por inchaço [73].

4.8 Atividade antifúngica da FNE

A FNE e o EL apresentaram atividade fungicida contra cepas isoladas (Tabela IX) e em biofilmes de *Candidas* (*C. albicans* e *C. glabrata*) (Figura X). Vários estudos já comprovaram essa ação antifúngica do eugenol contra essa espécie de microorganismo [28, 17, 29, 12]. Sobre o mecanismo de ação, esse composto ativo pode se ligar à membrana da *Candida* e diminuir a biossíntese do ergosterol pela sua capacidade de se ligar à membrana da *candida* e danificar sua parede celular [74]. Além disso, o eugenol é capaz de aumentar os níveis de peroxidação lipídica e de espécies reativas de oxigênio, e assim induz o estresse oxidativo que provoca aumento da permeabilidade na membrana celular do fungo [75, 76]. O fármaco também pode interagir com as proteínas adesivas ALS resultando numa diminuição considerável da capacidade de adesão do fungo e promover o desarranjo de biofilmes formados (*C.albicans*) [3].

A CIM (6 µg/mL) e a UFC (6 µg/mL) da FNE, contra cepas de *C. albicans*, foram reduzidas em até 10 vezes do que às concentrações do EL (CIM (64 µg/mL) e a UFC (64 µg/mL)) (Tabela IX). Além disso, houve uma redução significativa dos biofilmes pré-formados após aplicação, por 8 horas, da FNE em comparação ao EL, mesmo contendo a mesma concentração (0,3%). Esses resultados podem ser justificados pela forma de apresentação das partículas da FNE em escala nanométrica (13,91 nm), pois possibilita o aumento da área de superfície de contato e, conseqüentemente, aumenta as chances do ativo nanoencapsulado entrar em contato com a parede celular do fungo presente no meio [18]. Além disso, o sistema aplicado é capaz de controlar a liberação do eugenol, aumentando sua atividade e possibilita a sua ação direcionada para o microorganismo [77, 35, 36].

5. CONCLUSÕES

A Formulação nanoestruturada carregada de eugenol foi desenvolvida com sucesso e apresentou parâmetros de caracterizações dentro dos valores aceitáveis. Além disso, obteve atividade fungicida contra as cepas isoladas e reduziu significativamente os biofilmes de *Candidas (albicans e glabata)*. A FNE, na concentração de 0,3% de eugenol, apresentou desempenho superior ao EL na mesma concentração. Portanto, CLNs mostraram um sistema com grande potencial para administração de ativos antigúngicos para a higiene de próteses dentárias apresentando perspectiva de aplicação futura no mercado odontológico.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro de Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – (88887. 675954/2022-00).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rocha R, Santos G, Duarte TN, de Oliveira Corrêa G, Nampo FK, De S, et al. Chemical cleaning methods for prostheses colonized by *Candida* spp: A systematic review. *Journal of prosthetic dentistry*. 2020;124(6):653–58. doi: 10.1016/j.prosdent.2019.10.004.
2. Achkar JM, Fries BC. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Apr;23(2):253-73. doi: 10.1128/CMR.00076-09.
3. El-Baz AM, Mosbah RA, Goda RM, Mansour B, Sultana T, Dahms TES, et al. Back to nature: Combating *Candida albicans* biofilm, phospholipase and hemolysin using plant essential oils. *Antibiotics*. 2021 Jan1;10(1):1–18.
4. Kilic K, Koc AN, Tekinsen FF, Yildiz P, Kilic D, Zararsiz G, Kilic E. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in bar- and locator-retained overdentures. *J Oral Implantol*. 2014 Oct;40(5):549-56. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-12-00048.
5. Armstrong-James D, Brown GD, Netea MG, Zelante T, Gresnigt MS, van de Veerdonk FL, Levitz SM. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. *Lancet Infect Dis*. 2017 Dec;17(12):393-402. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30442-5.
6. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol*. 2021 Jul;131(1):11-22. doi: 10.1111/jam.14949.
7. Schmutzler A, Rauch A, Nitschke I, Lethaus B, Hahnel S. Cleaning of removable dental prostheses - a systematic review. *J Evid Based Dent Pract*. 2021 Dec;21(4):101644. doi: 10.1016/j.jebdp.2021.101644.
8. Papadopoulos T, Polyzois G, Tapanli A, Frangou M. The effect of disinfecting solutions on bending properties and weight changes of Co-Cr and Ti-6Al-7Nb alloys for dentures. *Odontology*. 2011 Jan;99(1):77-82. doi: 10.1007/s10266-010-0135-2.
9. Slaughter RJ, Watts M, Vale JA, Grieve JR, Schep LJ. The clinical toxicology of sodium hypochlorite. *Clin Toxicol (Phila)*. 2019 May;57(5):303-311. doi: 10.1080/15563650.2018.1543889.
10. Paranhos HFO, Bezzon OL, Davi LR, Felipucci DN, Silva CH, Pagnano VO. Effect of cleanser solutions on the color of acrylic resins associated with titanium and nickel-chromium alloys. *Braz Oral Res*. 2014;28:S1806-83242014000100234. doi: 10.1590/1807-3107bor-2014.vol28.0017.
11. Arruda CNF, Salles MM, Oliveira VC, Macedo AP, da Silva CHL, Paranhos HFO. Using denture cleansers to control biofilm from dentures and brushes: A randomized crossover clinical trial. *Int J Prosthodont*. 2021 May/June;34(3):291–299. doi: 10.11607/ijp.6665.

12. Saracino IM, Foschi C, Pavoni M, Spigarelli R, Valerii MC, Spisni E. Antifungal Activity of Natural Compounds vs. *Candida* spp.: A Mixture of Cinnamaldehyde and Eugenol Shows Promising In Vitro Results. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Jan 8;11(1):73. doi: 10.3390/antibiotics11010073.
13. Martins C, Doran C, Laires A, Rueff J, Rodrigues AS. Genotoxic and apoptotic activities of the food flavourings myristicin and eugenol in AA8 and XRCC1 deficient EM9 cells. *Food Chem Toxicol*. 2011 Feb;49(2):385-92. doi: 10.1016/j.fct.2010.11.013.
14. Fuentes C, Fuentes A, Barat JM, Ruiz MJ. Relevant essential oil components: a minireview on increasing applications and potential toxicity. *Toxicol Mech Methods*. 2021 Oct;31(8):559-565. doi: 10.1080/15376516.2021.1940408.
15. Muller RH, Keck CM. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol*. 2004 Sep 30;113(1-3):151-70. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.06.007.
16. Souto EB, Müller RH, Gohla S. A novel approach based on lipid nanoparticles (SLN) for topical delivery of alpha-lipoic acid. *J Microencapsul*. 2005 Sep;22(6):581-92. doi: 10.1080/02652040500162378.
17. Garg A, Singh S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011 Oct 15;87(2):280-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.05.030.
18. Elmowafy M, Al-Sanea MM. Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies. *Saudi Pharm J*. 2021 Sep;29(9):999-1012. doi: 10.1016/j.jsps.2021.07.015.
19. Vijayakumar A, Baskaran R, Jang YS, Oh SH, Yoo BK. Quercetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticle Dispersion with Improved Physicochemical Properties and Cellular Uptake. *AAPS PharmSciTech*. 2017 Apr;18(3):875-883. doi: 10.1208/s12249-016-0573-4.
20. Lopes CE, Langoski G, Klein T, Ferrari PC, Farago PV. A simple HPLC method for the determination of halcinonide in lipid nanoparticles: development, validation, encapsulation efficiency, and *in vitro* drug permeation. *Braz J Pharm Sci*. 2017;53(2):e15250. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902017000215250>.
21. Pramod K, Aji Alex MR, Singh M, Dang S, Ansari SH, Ali J. Eugenol nanocapsule for enhanced therapeutic activity against periodontal infections. *J Drug Target*. 2016;24(1):24-33. doi: 10.3109/1061186X.2015.1052071.
22. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos. 2017. Available at: https://www.in.gov.br/mat_eria/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412

23. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada RDC nº 318, 6 de novembro, 2019. Disponível em: [rdc_318_2019_comp.pdf \(fitoterapiabrasil.com.br\)](https://www.anvisa.gov.br/rdc/318_2019_comp.pdf).
24. Monton C, Settharaksa S, Suksaereeb J, Chusuta T. The preparation, characterization, and stability evaluation of a microemulsion-based oral spray containing clove oil for the treatment of oral candidiasis. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020 Apr;57:101735. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101735>.
25. Journal Officiel de la République Française. Arrête du 27 décembre 1996 relatif aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques. Annexe IV: méthode officiel d'évaluation du potentiel irritant par application sur la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poule, p. 19137-8.
26. Corrado MC, Alves EN, Presgrave OAF, Presgrave RF, Costa RN, Delgado IF. Potencial tóxico de dentifrícios: avaliação comparativa entre o teste de irritação da mucosa oral em hamsters e o método het-cam toxic potential of dentifrices: comparative evaluation between oral mucosal hamster irritation test and het-cam. *Revista Analytica* 2012;61:48-57. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8841>.
27. Leal ALAB, Bezerra CF, Rocha JE, Santos ATL, Cruz RP, Carneiro JNP, et al. Piper cernuum Vell.: Chemical profile and antimicrobial potential evaluation. *Industrial Crops and Products*. 2019;140:1-9. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111577.
28. He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against Candida albicans biofilms. *Mycopathologia*. 2007 Mar;163(3):137-43. doi: 10.1007/s11046-007-0097-2.
29. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral Candida isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med*. 2011 Nov 26;11:119. doi: 10.1186/1472-6882-11-119.
30. Jafri H, Khan MSA, Ahmad I. In vitro efficacy of eugenol in inhibiting single and mixed-biofilms of drug-resistant strains of Candida albicans and Streptococcus mutans. *Phytomedicine*. 2019 Feb 15;54:206-213. doi: 10.1016/j.phymed.2018.10.005.
31. Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19(1):212–217. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200006>.
32. Khalil AA, Rahman UU, Khan MR, Amna S; Mehmood T, Khan M. Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. *RSC Adv*. 2017;7(52):32669–81. doi:10.1039/c7ra04803c.

33. Mohammadi NS, Özgüneş H, Başaran N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turk J Pharm Sci.* 2017 Aug;14(2):201-06. doi: 10.4274/tjps.62207.
34. Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Res Pharm Sci.* 2018 Aug;13(4):288-303. doi: 10.4103/1735-5362.235156.
35. Akel H, Ismail R, Katona G, Sabir F, Ambrus R, Csóka I. A comparison study of lipid and polymeric nanoparticles in the nasal delivery of meloxicam: Formulation, characterization, and in vitro evaluation. *Int J Pharm.* 2021 Jul 15;604:120724. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120724.
36. Viegas C, Patrício AB, Prata JM, Nadhman A, Chintamaneni PK, Fonte P. Solid Lipid Nanoparticles vs. Nanostructured Lipid Carriers: A Comparative Review. *Pharmaceutics.* 2023 May 25;15(6):1593. doi: 10.3390/pharmaceutics15061593.
37. Jaiswal P, Gidwani B, Vyas A. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(1):27-40. doi: 10.3109/21691401.2014.909822.
38. Garzón MLS, Vázquez MLR, Robles LV, García BF, Hernández AL. (2009) Efecto de los componentes de la formulación em las propiedades de las nanopartículas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2009;40(2):26-40. Disponible em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912942005>.
39. Santos SV, Badan RAP, Andrade SMH. Solid lipid nanoparticles as carriers for lipophilic compounds for applications in foods. *Food Res Int.* 2019 Aug;122:610-626. doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.032.
40. Radtke M, Souto EB, Müller RH. Nanostructured lipid carriers: a novel generation of solid lipid drug carriers. *Pharm Technol Eur.* 2005;17(4):45–50. Disponible em: https://alfrescostaticfiles.s3.amazonaws.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/9bace9ea-0bdf-464c-8f03-710dbdaf0585/article-154318.pdf.
41. Fonte P, Nogueira T, Gehm C, Ferreira D, Sarmiento B. Chitosan-coated solid lipid nanoparticles enhance the oral absorption of insulin. *Drug Deliv Transl Res.* 2011 Aug;1(4):299-308. doi: 10.1007/s13346-011-0023-5.
42. Morales JO, Valdés K, Morales J, Oyarzun-Ampuero F. Lipid nanoparticles for the topical delivery of retinoids and derivatives. *Nanomedicine (Lond).* 2015 Jan;10(2):253-69. doi: 10.2217/nnm.14.159.
43. Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Adv Pharm Bull.* 2015 Sep;5(3):305-13. doi: 10.15171/apb.2015.043.

44. Beloqui A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Préat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine*. 2016 Jan;12(1):143-61. doi: 10.1016/j.nano.2015.09.004.
45. Müller RH, Shegokar R, Keck CM. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol*. 2011 Sep;8(3):207-27. doi: 10.2174/157016311796799062.
46. Robles LV, García FB, Garzón SML, Hernández LA, Vázquez RML. Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas*. 2008;39(1):38-52. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57939107.pdf>.
47. Yoon G, Park JW, Yonn I. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2013;43:353–362. doi: 10.1007/s40005-013-0087-y.
48. Domingo C, Saurina J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: towards green and sustainable pharmaceuticals: a review. *Anal Chim Acta*. 2012 Sep26;744:8-22. doi: 10.1016/j.aca.2012.07.010.
49. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2013;19:29-43. doi: 10.1016/j.ifset.2013.03.002.
50. Bera B. Nanoporous silicon prepared by vapour phase strain etch and sacrificial technique. In *Proceedings of the International Conference on Microelectronic Circuit and System (Micro)*. 2015;1:42–45. Disponível em: <https://research.ijcaonline.org/micro2015/number1/micro1742.pdf>.
51. Loo Ch, Basri M, Ismail R, Lau H, Tejo B, Kanthimathi M, Hassan H, Choo Y. Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:13-22. doi: 10.2147/IJN.S35648.
52. Krambeck K, Silva V, Silva R, Fernandes C, Cagide F, Borges F, Santos D, Otero-Espinar F, Lobo JMS, Amaral MH. Design and characterization of Nanostructured lipid carriers (NLC) and Nanostructured lipid carrier-based hydrogels containing *Passiflora edulis* seeds oil. *Int J Pharm*. 2021 May 1;600:120444. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120444.
53. Santos GS, Pereira GG, Bender EA, Colomé LM, Guterres SS. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. *Química Nova*. 2012;35(7):1388-94. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/HyWY8VMBb4bKxRmC5Cg5MFh/?format=pdf&lang=pt>.
54. Madureira AR, Campos DA, Fonte P, Nunes S, Reis F, Gomes AM, et al. Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for

- rosmarinic acid oral delivery. RSC Advances. 2015;5:22665-73. doi: 10.1039/c4ra15802d.
55. Redhead HM, Davis SS, Illum L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. J Control Release. 2001 Feb 23;70(3):353-63. doi: 10.1016/s0168-3659(00)00367-9.
56. Friedrich RB, Kann B, Coradini K, Offerhaus HL, Beck RC, Windbergs M. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. Eur J Pharm Sci. 2015 Oct 12;78:204-13. doi: 10.1016/j.ejps.2015.07.018.
57. Khosa A, Reddi S, Saha RN. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. Biomed Pharmacother. 2018 Jul;103:598-613. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.055.
58. Cheow WS, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces C. 2011;85(2), 214-220. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.02.033.
59. Müller RH, Runge SA, Ravelli V, Thünemann AF, Mehnert W, Souto EB. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. Eur J Pharm Biopharm. 2008;68(3):535-44. doi:10.1016/j.ejpb.2007.07.006.
60. Bunjes H, Unruh T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. Adv Drug Deliv Rev. 2007 Jul 10;59(6):379-402. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.013.
61. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. Adv Drug Deliv Rev. 2002 Nov 1;54(1):131-55. doi: 10.1016/s0169-409x(02)00118-7.
62. Djunaidi MC, Astuti TN, Siahaan P. Computational approach to evaluate eugenol affinity and derivatives empirical against Cu (II). Molekul. 2019;14(2):149-56, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.20884/1.jm.2019.14.2.467>.
63. Chen J, Wang Y, Cao J, Wang W. Improved water repellency and dimensional stability of wood via impregnation with an epoxidized linseed oil and carnauba wax complex emulsion. Forests. 2020;11(3): 1-13. doi:10.3390/f11030271.
64. Proksch E. pH in nature, humans and skin. J Dermatol. 2018 Sep;45(9):1044-1052. doi: 10.1111/1346-8138.14489.
65. Redasani VK, Patel PR, Marathe DY, Chaudhari SR, Shirkhedkar AA, Surana SJ. A review on derivative uvspectrophotometry analysis of drugs in pharmaceutical formulations and biological samples review. J Chil Chem Soc. 2018;63(3):4126-34. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-97072018000304126>.

66. Niessen WM, Manini P, Andreoli R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2006 Nov-Dec;25(6):881-99. doi: 10.1002/mas.20097.
67. Sharma VK, Diwan A, Sardana S, Dhall V. Solid Lipid Nanoparticles System: An Overview. *Int J Res Pharm Sci.* [Internet]. 2011 Aug 31;2(3):450-61. Disponível em: <https://ijrps.com/home/article/view/319>.
68. Averina ES, Seewald G, Müller RH, Radnaeva LD, Popov DV. Nanostructured lipid carriers (NLC) on the basis of Siberian pine (*Pinus sibirica*) seed oil. *Pharmazie.* 2010 Jan;65(1):25-31. Disponível em: <https://doi.org/10.1691/ph.2010.9203>.
69. Espinosa-Olivares MA, Delgado-Buenrostro NL, Chirino YI, Trejo-Márquez MA, Pascual-Bustamante S, Ganem-Rondero A. Nanostructured lipid carriers loaded with curcuminoids: Physicochemical characterization, in vitro release, ex vivo skin penetration, stability and antioxidant activity. *Eur J Pharm Sci.* 2020 Dec 1;155:105533. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105533.
70. Balzus B, Colombo M, Sahle FF, Zoubari G, Staufenbiel S, Bodmeier R. Comparison of different in vitro release methods used to investigate nanocarriers intended for dermal application. *Int J Pharm.* 2016 Nov 20;513(1-2):247-254. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.033.
71. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 2001 May;13(2):123-33. doi: 10.1016/s0928-0987(01)00095-1.
72. Gouda R, Baishya H, Qing Z. Application of mathematical models in drug release kinetics of carbidopa and levodopa ER tablets. *J Dev Drugs.* 2017;6(2):1-8. doi: 10.4172/2329-6631.1000171.
73. Nagaich U, Gulati N. Nanostructured lipid carriers (NLC) based controlled release topical gel of clobetasol propionate: design and in vivo characterization. *Drug Deliv Transl Res.* 2016 Jun;6(3):289-98. doi: 10.1007/s13346-016-0291-1.
74. Ahmad A, Wani MY, Khan A, Manzoor N, Molepo J. Synergistic Interactions of Eugenol-tosylate and Its Congeners with Fluconazole against *Candida albicans*. *PLoS One.* 2015 Dec 22;10(12):e0145053. doi: 10.1371/journal.pone.0145053.
75. Lone SA, Ahmad A. Inhibitory effect of novel Eugenol Tosylate Congeners on pathogenicity of *Candida albicans*. *BMC Complement Med Ther.* 2020 Apr 29;20(1):131. doi: 10.1186/s12906-020-02929-0.
76. Didehdar M, Chegini Z, Shariati A. Eugenol: A novel therapeutic agent for the inhibition of *Candida* species infection. *Front Pharmacol.* 2022 Aug 9;13:872127. doi: 10.3389/fphar.2022.872127.
77. Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications,

advantages and disadvantages. Res Pharm Sci. 2018 Aug;13(4):288-303. doi: 10.4103/1735-5362.235156.

Revista para a publicação:

INÍCIO A FOB ENSINO PESQUISA EXTENSÃO INFORMAÇÕES PACIENTE EVENTOS / PUBLICAÇÕES

JAOS – Journal of Applied Oral Science

SciELO ABCD USP PORTAL DE REVISTAS

Web of Science™ Science Citation Index Expanded (SCIE) Scopus®

PMC PubMed Central®

DOAJ Journal Citation Reports™

PubMed

JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE

2022

p.br/wp-content/uploads/sites/179/2023/10/jaos_1.jpg

Link de acesso: <https://www1.fob.usp.br/pesquisa/jaos-revista-da-fob/>