

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Thais Francine Ribeiro Alves

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVOS
PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL E VEICULAÇÃO DE CURCUMINA**

Sorocaba/SP

2016

Thais Francine Ribeiro Alves

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVOS
PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL E VEICULAÇÃO DE CURCUMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Sorocaba/SP

2016

Ficha Catalográfica

A482d Alves, Thais Francine Ribeiro
Desenvolvimento e avaliação de hidrogéis termorresponsivos para administração vaginal e veiculação de curcumina / Thais Francine Ribeiro Alves. – 2016.
139 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2016.

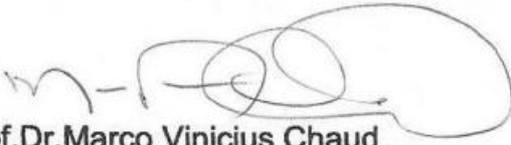
1.
farmacologia. 2. Química farmacêutica. 3. Medicamentos – Formas de dosagem. 4. Medicamentos – Formas farmacêuticas. I. Chaud, Marco Vinícius, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Thais Francine Ribeiro Alves

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVOS
PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL E VEICULAÇÃO DE CURCUMINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

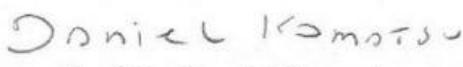
Banca examinadora:



Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud
Universidade de Sorocaba



Prof. Dr. Marlus Chorilli
Universidade Estadual de São Paulo



Prof. Dr. Daniel Komatsu
Pontifícia Universidade Católica

Dedico este trabalho à minha família, namorado e amigos por estarem ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação fosse realizada. Não sendo possível nomear a todos, há, no entanto alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero.

Agradeço a Deus que esteve sempre ao meu lado durante esta caminhada, que muita das vezes não foi nada fácil. Porém, Ele me deu duas características que estão inseridas em minha alma: persistência e determinação! Contudo, não teria chegado até aqui sem a ajuda de alguns anjos que Ele me enviou, a saber:

A meus pais, José e Susana, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

Ao meu noivo Danilo, ouvinte atento de algumas dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, pelo apoio, pela confiança e pela valorização sempre tão entusiasta do meu trabalho, dando-me, desta forma, coragem para ultrapassar a culpa pelo tempo que a cada dia lhe subtraía.

Ao meus irmãos, Maria Eduarda e Mateus que sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho. Obrigada pela confiança!

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud que acreditou em meu potencial de uma forma que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponível e disposto a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver todo conhecimento possível. Você foi e é referência profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar tanto em mim!

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Katiusca da Silva Pontes e Juliana Ferreira Souza que se tornaram verdadeiras amigas e tornaram mais leve e divertido os dias no laboratório. Aos poucos nos tornamos mais que amigas, quase irmãs... Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês!

À minha eterna amiga Francielle Cristina Corrêa Neves Lopes que sempre esteve ao meu lado, desde a época da graduação. Obrigada por todas as vezes que

acreditou e apostou em mim quando dizia a seguinte frase: “Tha você é sucesso!”. Além de agradecer quero dizer que sempre estaremos na caminhada das nossas vidas!!!!

À minha amiga Márcia Araújo Rebelo por estar ao meu lado em todos os momentos do desenvolvimento deste projeto, inclusive nos que quase surtei. Por todo conhecimento adquirido durante meu estágio da graduação. Obrigada por todas as conversas fossem elas pessoais ou não. Por aqueles momentos de loucura onde planejamos projetos de pesquisa, para serem realizados em 1 mês ou até menos. Foi muito bom poder contar com você!

Ao meu amigo e prof. Edson Cearense Segundo por todo incentivo, conversas, aprendizagem e colaboração!

Às profs.Dras. Denise Grotto e Angela Faustino Jozala por todo apoio e colaboração!

À Uniso por ter me acolhido durante a graduação e por possibilitar a realização do mestrado.

À Capes pelo incentivo financeiro.

*“Cada sonho que você deixa para trás é um
pedaço do seu futuro que deixa de existir”*

(Steve Jobs)

RESUMO

INTRODUÇÃO: A retenção vaginal, o tempo de liberação e ausência de irritação local são os principais desafios para o desenvolvimento de formas farmacêuticas para administração local. Sistemas termorresponsivos com propriedades físiomecânicas adequadas e preparados com materiais biocompatíveis podem ser útil para aumentar o tempo de retenção, controlar a liberação do fármaco, diminuir a irritação local e melhorar a adesão ao tratamento. A curcumina (CUR) é um composto fitoquímico reconhecida pela baixa toxicidade intrínseca e ampla variedade de efeitos terapêuticos. **METODOLOGIA:** Para veiculação na forma de hidrogel termorresponsivo, a baixa solubilidade da CUR em água foi resolvida pela preparação de dispersões sólidas (DS) com carreadores hidrossolúveis, tais como poloxamer 407 (P407) e hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M), utilizando tecnologia de coprecipitação e fusão. As DS foram caracterizadas por equilíbrio de solubilidade (ES), estabilidade da CUR em meio aquoso, cinética de degradação, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios X (DR-X). Os hidrogéis termorresponsivos foram preparados utilizando mistura dos polímeros P407, HPMC K4M e quitosana (Qt) em tampão citrato-fosfato pH 4,5 à 4°C. As DS, misturas físicas (MF) e CUR livre foram dispersas nos hidrogéis com massa equivalente a 400 µg. mL⁻¹ de CUR. A avaliação dos hidrogéis termorresponsivos contendo DS-CUR foram comparadas com as mesmas formulações contendo mistura física (MF-CUR) e CUR livre. As propriedades físico-químicas foram avaliadas e comparadas para potencial hidrogeniônico (pH), viscosidade na temperatura de transição sol-gel, taxa de erosão, propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade, adesividade, coesividade e mucoadesão), comportamento reológico e perfil de liberação da CUR. **RESULTADO:** O ES mostrou melhor resultado para DSf (1:2) com HPMC K4M e para DSc com P407 (1:2), respectivamente, 680 e 755 vezes maior quando comparado a CUR livre. As DS de CUR com P407 e HPMC K4M aumentaram a estabilidade da CUR prevenindo a degradação química tanto em pH 4,5 como em pH 7,0. A cinética de degradação da CUR foi de ordem zero para todas formulações, exceto para DSf CUR:HPMC K4M 1:2 e CUR livre em pH 7,0 (cinética de primeira ordem). As curvas de DSC e DR-X mostraram mudança no estado cristalino da CUR na presença de P407. A

morfologia das DS observadas por MEV sugere alteração no cristalino da CUR. As curvas obtidas por FTIR mostraram que os estiramentos dos grupamentos químicos da CUR permaneceram inalterados tanto na mistura física (MF) como na DS. Para as formulações de hidrogéis termorresponsivos, os melhores resultados foram obtidos para os hidrogéis (formulação M20) formulados com a dispersão sólida (DS-CUR) obtida por coprecipitação com P407 (1:2 m/m). Os resultados para pH, viscosidade e taxa de erosão foram respectivamente $4,05 \pm 0,01$, 8100 cP, 51,3%. Os resultados para as propriedades mecânicas de dureza, compressibilidade, adesividade, coesividade e mucoadesão (força máxima para separação) foram respectivamente $24,1 \pm 0,45$ g, $286,21 \pm 10,64$ g.s⁻¹, $30, \pm 1,22$ g.s⁻¹, $20,81 \pm 1,65$ g e $8,53 \pm 0,41$ g. O comportamento reológico das formulações (P20 CUR, P20 MF, P20 DS, M20 DS) apresentaram perfil pseudoplástico e característica tixotrópica. O perfil de dissolução da CUR na formulação M20 DS mostrou liberação controlada (52%), enquanto a M20 liberou praticamente toda CUR da formulação (94,17%) ao final de 180 min.. As curvas de DSC mostraram que houve a permanência da CUR no estado amorfo quando incorporado ao hidrogel termorresponsivo na forma de DS. Os espectros obtidos por FTIR mostraram que os estiramentos dos grupamentos químicos da CUR permaneceram quimicamente estáveis nos hidrogéis termorresponsivos. A temperatura crítica de micelização permitiu avaliar a influência da CUR na temperatura de micelização e temperatura de gelificação, onde o deslocamento da faixa de temperatura está relacionado à viscosidade da formulação. A atividade antioxidante da CUR nas formulações de hidrogel termorresponsivo M20 DS, P20 DS e P20 CUR, foi acima de 80%. A atividade antimicrobiana da CUR quando nos hidrogéis termorresponsivos mostrou ser mais efetivo quando comparado à concentração inibitória mínima da CUR em meio aquoso. **CONCLUSÃO:** Dessa forma, as análises dos resultados mostram que a técnica de DS foi eficaz para aumentar a solubilidade e estabilidade da CUR em água, e a sua incorporação nos hidrogéis termorresponsivos (M20 DS) apresentam potencial para administração vaginal e tratamento de mucosite vaginal.

Palavras-chave: Hidrogel Termorresponsivo. Administração Vaginal. Curcumina. Dispersões Sólidas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Thermally sensitive hydrogels or thermoresponsive have been the focus of studies because of its practicality in the application and few side effects Vaginal administration of drugs whose main advantage is avoiding hepatic metabolism, reduce the incidence and severity of secondary gastrointestinal effects and decrease hepatic side effects of drugs. Curcumin (CUR) is a phytochemical compound recognized by low intrinsic toxicity and wide variety of therapeutic effects.

METHOD: To incorporate as thermoresponsive gel lower solubility CUR in water was solved by preparation solid dispersions (SD) with carriers hidrosoluble such as poloxamer 407 (P407) and hydroxypropylmethylcellulose K4M (HPMC K4M), using fusion and co-precipitation technology. The SD were characterized by solubility equilibrium (SE), differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (DR-X). The thermoresponsive hydrogels were prepared using mixture of P407 polymers, HPMC K4M and chitosan (Qt) in citrate-phosphate buffer pH 4.5 for the cold technique. The SD, physical mixture (PM) and free CUR were dispersed in hydrogels with a mass equivalent to 400 ug. mL⁻¹ CUR. The evaluation of thermoresponsives hydrogels containing SD-CUR were compared with the same formulations with physical mixture (PM-CUR) and free CUR. The physico-chemical properties were made and compared to hydrogenic potential (pH), viscosity at the temperature of sol-gel transition, erosion rate, mechanical properties (hardness, compressibility, adhesiveness, cohesiveness and mucoadhesion), rheological properties and release profile of CUR. **RESULT:** ES showed best result for SDf (1: 2) with HPMC K4M and SDc with P407 (1: 2), respectively 680 and 755 times higher when compared to free CUR. The SD CUR with P407 and HPMC K4M increased stability CUR preventing chemical degradation both pH 4.5 and pH 7.0. The CUR degradation kinetics was zero order for all formulations except for FSD CUR: HPMC K4M 1: 2 and CUR free at pH 7.0 (first order kinetics). The curves of DSC and DR-X showed change in the crystalline state of curcumin in the presence of P407. The morphology observed by SEM DS suggests changes in the crystalline state of the curcumina. The curves obtained by FTIR showed that stretches chemical group of curcumina remained unchanged in both the physical mixture (PM) as the SD. For hydrogels thermoresponsive formulations, the best results were obtained for hydrogels

(formulation M20) formulated with the solid dispersion (SD-CUR) obtained by coprecipitation P407 (1: 2 m / m). The results for pH, viscosity and erosion rate were respectively 4.05 ± 0.01 , 8100 cP, 51.3%. The results for the mechanical properties of hardness, compressibility, adhesiveness, cohesiveness and mucoadhesion (maximum force for separation) were respectively $24.1 \text{ g} \pm 0.45$, $286.21 \pm 10.64 \text{ gs}^{-1}$, $30 \pm 1.22 \text{ gs}^{-1}$, $20.81 \pm 1.65 \text{ g}$, $8.53 \pm 0.41 \text{ g}$. The rheological behavior of formulations (P20 CUR, P20 PM, P20 SD, M20 SD) had profile pseudoplastic and thixotropic characteristics. The dissolution profile of the formulation CUR SD showed that has M20 controlled release (52%), while M20 has released practically all CUR of formulation (94.17%) at 180 min. The DSC curves demonstrate that the permanence of CUR in the amorphous state when incorporated into thermoresponsive hydrogel in the form of SD. The curves obtained by FTIR showed that stretches chemical group of curcumina remained chemically stable in thermoresponsive hydrogels. The critical micellization temperature allowed to evaluate the influence of micellization temperature and gelling temperature of CUR, where the temperature shift range is related to the viscosity of the formulation. The antioxidant activity of CUR in hydrogel formulções thermoresponsive M20 DS, DS P20 and P20 CUR, was above 80%. The antimicrobial activity of curcumina when in the termorresponsivos hydrogels was more effective compared to the minimal inhibitory concentration curcumina in an aqueous medium. **CONCLUSION:** Thus, the analysis of the results showed that the DS technique was more efficient to increase solubility and stability in water CUR, and their incorporation into hydrogels termorresponsivos (M20 DS) have the potential for vaginal administration and treatment of vaginal mucositis.

Key words: Thermoresponsive hydrogel. Vaginal administration. Curcumin. Dispersions Solid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da mucosa vaginal.....	26
Figura 2 - Estrutura esquemática de copolímeros em bloco	33
Figura 3 - Esquema ilustrativo do processo de micelização seguida por gelificação de copolímeros em bloco	34
Figura 4 - Diagrama esquemático das etapas envolvidas na preparação e caracterização das dispersões sólidas.....	57
Figura 5 - Curva Analítica da CUR, λ 427 nm	62
Figura 6 - Equilíbrio de solubilidade das amostras de DS, MF e CUR (<i>insert</i>).....	63
Figura 7 – Estabilidade da CUR em meio aquoso pH 4,5 (A) e pH 7,0 (B) das DSf CUR:HPMC K4M 1:2 , DSc CUR: P407 1:2 e respectivas misturas físicas MF CUR: HPMC K4M 1:2 e MF CUR: P407 2:1	65
Figura 8 - Curvas termoanalíticas das amostras de (A) CUR, polímeros, (B) DS e respectivas MF.....	68
Figura 9 - Espectros de FTIR das amostras de CUR, polímeros, DS e respectivas MF	69
Figura 10 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de CUR livre (A), DSf HPMC K4M 1:2 (B) e DSc CUR: P407 1:2 (C).....	70
Figura 11 - Difração de raios X das amostras de CUR livre, DSf HPMC K4M 1:2 e DSc CUR: P407 1:2	71
Figura 12 - Delineamento experimental para o desenvolvimento e avaliação de hidrogel termorresponsivo	77
Figura 13 - Representação esquemática do analisador de textura, TAXTPlus, e de uma curva típica de análise do perfil (A) compressibilidade, (B) adesividade, (C) dureza e (D) coesividade.	80
Figura 14 - Viscosidade na temperatura T _{sol-gel} das amostras de (A) P17 (<i>insert</i>), P18- P20 e M17 (<i>insert</i>), M18-M20.	84
Figura 15 - Propriedades mecânicas de dureza (C), compressibilidade (A), adesividade (B) e coesividade (D) das formulações P20, M18, M19 e M20 (média de um $n=3$).....	86
Figura 16 - Delineamento experimental para avaliação de hidrogéis termorresponsivo contendo curcumina	94

Figura 17 - Representação esquemática do analisador de textura, TAXTPlus, e de uma curva típica de análise do perfil (A) compressibilidade, (B) adesividade, (C) dureza e (D) coesividade.	98
Figura 18 - Representação esquemática teste <i>in vitro</i> de mucoadesão (a) e de uma curva típica (força x tempo) da força de trabalho necessário para destacar o disco de mucina da superfície da formulação (b)	99
Figura 19 - Perfil de erosão dos hidrogéis termorresponsivos formulações contendo somente P407 (A) e formulações contendo P407/HPMC K4M/Qt (B).....	108
Figura 20 - Propriedades mecânicas de dureza (C), coesividade (D), compressibilidade (A), adesividade (B) e dos hidrogéis termorresponsivos.	110
Figura 21 - Perfil do comportamento reológico das formulações P20 CUR (A), P20 MF(B), P20 DS (C), M20 CUR (D), M20 MF (E) e M20 DS (F)	113
Figura 22 – Perfil de liberação e dissolução da CUR nas formulações P20 CUR, P20 DS, M20 CUR e M20 DS.....	114
Figura 23 - Curvas termoanalíticas das amostras de hidrogel termorresponsivo contendo CUR (P20 CUR, P20 DS, M20 CUR e M20 DS), HPMC K4M, Qt, P407 e CUR	115
Figura 24 – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier das amostras de hidrogel termorresponsivo contendo CUR (P20 CUR, P20 DS, M20 CUR e M20 DS), HPMC K4M, Qt, P407 e CUR.....	117
Figura 25 – Curva termoanalítica da temperatura crítica de micelização das amostras P20, M20, P20 CUR, M20 CUR, P20 DS e M20 DS.	119
Figura 26 – Atividade antioxidante das amostras de hidrogel termorresponsivo	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mecanismos de mucoadesão	31
Tabela 2 - Composição de diversos tipos de HPMC	36
Tabela 3 - Solubilidade da CUR em diversos meios	38
Tabela 4 - Valores da equação da reta e coeficiente de regressão da curva analítica da CUR	62
Tabela 5 – Cinética de degradação da CUR em meio aquoso pH 4,5 e 7,0.	66
Tabela 6 - Temperatura de fusão, entalpia de fusão (ΔH) e entalpia de transição vítrea ($\Delta H T_g$) das amostras de CUR, polímeros, DS e respectivas MF.	68
Tabela 7 - Formulações dos hidrogéis	78
Tabela 8 - Temperatura de gelificação das formulações (sol-gel).....	81
Tabela 9 - Temperatura de fusão das formulações (gel-sol).....	82
Tabela 10 - Potencial hidrogeniônico das formulações P17-P20/M17-M20	82
Tabela 11 - Propriedades mecânicas dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade das formulações P20, M18, M19 e M20 ($M \pm DP$).....	86
Tabela 12 - Formulação dos hidrogéis contendo curcumina.....	96
Tabela 13 - Descrição das amostras aplicadas no ensaio de atividade antimicrobiana.....	103
Tabela 14 - Valores de pH para as formulações de hidrogel termorresponsivo	104
Tabela 15 - Viscosidade (cP) das formulações dos hidrogéis termorresponsivos...	106
Tabela 16 - Propriedades mecânicas de dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade dos hidrogéis termorresponsivos ($M \pm DP$)	110
Tabela 17 – Resultado do trabalho de mucoadesão de discos de mucina sobre a superfície dos hidrogéis termorresponsivos ($M \pm DP$).....	112
Tabela 18 - Ensaio de atividade antimicrobiana, amostras contra os microrganismos <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	122

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection.

CIM: Concentração inibitória mínima

CST: Temperatura crítica de solução

CUR: Curcumina

DS: Dispersão sólida

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

DSc: Dispersão sólida obtida por coprecipitação

DSf: Dispersão sólida obtida por fusão

DS-CUR: Dispersão sólida de curcumina

DR-X: difração de raios X

ES: Equilíbrio de solubilidade

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

HMPC K4M: Hidroxipropilmetilcelulose K4M

Ks: Coeficiente de solubilidade

LCST: Abaixo da temperatura de solução crítica

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MF: Mistura física

MF-CUR: Mistura física de curcumina

M17: Hidrogel mistura P407 (17%)/Qt/HPMC K4M

M18: Hidrogel mistura P407 (18%)/Qt/HPMC K4M

M19: Hidrogel mistura P407 (19%)/Qt/HPMC K4M

M20: Hidrogel mistura P407 (20%)/Qt/HPMC K4M

M18 CUR: Hidrogel mistura P407 (18%)/Qt/HPMC K4M com curcumina livre

M18 MF: Hidrogel mistura P407 (18%)/Qt/HPMC K4M com mistura física CUR:P407 2:1

M18 DS: Hidrogel mistura P407 (18%)/Qt/HPMC K4M com dispersão sólida obtida por coprecipitação CUR:P407 1:2

M20 CUR: Hidrogel mistura P407 (20%)/Qt/HPMC K4M com curcumina livre

M20 MF: Hidrogel mistura P407 (20%)/Qt/HPMC K4M com mistura física CUR:P407 2:1

M20 DS: Hidrogel mistura P407 (20%)/Qt/HPMC K4M com dispersão sólida obtida por coprecipitação CUR:P407 1:2

PEO: Polioxietileno

PM: Physical mixture

PPO: Polioxipropileno

Ph: Potencial hidrogeniônico

P407: Poloxamer 407

P17: Hidrogel de poloxamer 407 a 17%

P18: Hidrogel de poloxamer 407 a 18%

P19: Hidrogel de poloxamer 407 a 19%

P20: Hidrogel de poloxamer 407 a 20%

P18 CUR: Hidrogel de poloxamer 407 a 18% com curcumina livre.

P18 MF: Hidrogel de poloxamer 407 a 18% com mistura física CUR:P407 2:1

P18 DS: Hidrogel de poloxamer 407 a 18% com dispersão sólida obtida por coprecipitação CUR:P407 1:2

P20 CUR: de poloxamer 407 a 20% com curcumina livre.

P20 MF: Hidrogel de poloxamer 407 a 20% com mistura física CUR:P407 2:1

P20 DS: Hidrogel de poloxamer 407 a 20% com dispersão sólida obtida por coprecipitação CUR:P407 1:2

Qt: Quitosana

SD: Solid dispersion

UCST: Acima da temperatura de solução crítica

Tg: Transição vítrea

Tm: Temperatura de micelização

TSB: Caldo tríptico de soja

Tsol-gel: Transição solução-gel

UV-VIS: Ultravioleta-visível

ΔG : Variação de energia livre no sistema

ΔH : Variação de entalpia

$\Delta H T_g$: Variação de entalpia de transição vítrea

ΔS : Variação de entropia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVO.....	24
2.1	GERAL.....	24
2.2	ESPECÍFICO.....	24

CAPÍTULO I

3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1	ANATOMIA, FISILOGIA E HISTOLOGIA VAGINAL.....	26
3.2	BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS.....	27
3.3	FORMAS FARMACÊUTICAS HIDROGELATINOSAS PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL.....	28
3.3.1	GEL HIDROGELATINOSO.....	28
3.3.2	HIDROGEL TERMORRESPONSIVO.....	28
3.3.3	MECANISMO DE MUCOADESÃO.....	30
3.3.4	MECANISMOS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	31
3.3.5	POLÍMEROS EMPREGADOS NA PREPARAÇÃO DO HIDROGEL TERMORRESPONSIVO....	32
3.4	CURCUMINA.....	36
3.5	DISPERSÃO SÓLIDA.....	38
3.6	AVALIAÇÃO FÍSICA E BIOLÓGICA.....	41
3.6.1	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	41
3.6.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	41
3.6.3	DIFRAÇÃO RAIOS X.....	42
3.6.4	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER.....	42
3.6.5	COMPORTAMENTO DE FLUXO.....	43
3.6.6	PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	44
3.6.7	MUCOADESÃO.....	45
3.6.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	45
3.6.9	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	45
3.7	CONSIDERAÇÃO FINAL.....	46
3.8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	47

CAPÍTULO II

4 PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO CURCUMINA.....	55
4.1 RESUMO	55
4.2 ABSTRACT	56
4.3 OBJETIVO	57
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	57
4.5 MATERIAL E MÉTODO.....	58
4.5.1 ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA PARA DETERMINAÇÃO DO PICO MÁXIMO DE ABSORBÂNCIA E CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DE CUR	58
4.5.2 PREPARAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS DE CUR.....	58
4.5.3 PREPARAÇÃO DAS MISTURAS FÍSICAS	59
4.5.4 EQUILÍBRIO DE SOLUBILIDADE	59
4.5.5 ESTABILIDADE DA CUR EM MEIO AQUOSO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS.....	59
4.5.6 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DA CUR NAS DS.....	60
4.5.7 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	60
4.5.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER	60
4.5.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	60
4.5.10 DIFRAÇÃO DE RAIOS X	61
4.6 RESULTADO E DISCUSSÃO	61
4.6.1 CURVA ANALÍTICA DE CUR.....	61
4.6.2 EQUILÍBRIO DE SOLUBILIDADE	62
4.6.3 ESTABILIDADE DA CUR EM MEIO AQUOSO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS.....	63
4.6.4 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DA CUR NAS DS.....	65
4.6.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	66
4.6.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER	69
4.6.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	70
4.6.8 DIFRAÇÃO DE RAIOS X	71
4.7 CONCLUSÃO.....	72
4.8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	72
 CAPÍTULO III	
5 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVO PARA APLICAÇÃO VAGINAL.....	75

5.1	RESUMO	75
5.2	ABSTRACT	76
5.3	OBJETIVO	77
5.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	77
5.5	MATERIAL E MÉTODO.....	78
5.5.1	PREPARAÇÃO DO HIDROGEL TERMORRESPONSIVO	78
5.5.2	TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO SOL-GEL E GEL-SOL.....	79
5.5.3	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO	79
5.5.4	VISCOSIDADE NA TEMPERATURA $T_{SOL-GEL}$	79
5.5.5	PROPRIEDADE MECÂNICA	80
5.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
5.6.1	TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO SOL-GEL E GEL-SOL.....	81
5.6.2	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO	82
5.6.3	VISCOSIDADE NA TEMPERATURA $T_{SOL-GEL}$	82
5.6.4	PROPRIEDADES MECÂNICAS	84
5.7	CONCLUSÃO.....	86
5.8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	87

CAPÍTULO IV

6	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVOS CONTENDO CURCUMINA.....	90
6.1	RESUMO	90
6.2	ABSTRACT	92
6.3	OBJETIVO	94
6.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	94
6.5	MATERIAL E MÉTODO.....	95
6.5.1	PREPARAÇÃO DO HIDROGEL TERMORRESPONSIVO	95
6.5.2	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO	96
6.5.3	VISCOSIDADE DOS HIDROGÉIS	97
6.5.4	EROSÃO DO HIDROGEL TERMORRESPONSIVO.....	97
6.5.5	PROPRIEDADES MECÂNICAS	98
6.5.6	PROPRIEDADES MUCOADESIVAS	98
6.5.7	COMPORTAMENTO REOLÓGICO	100

6.5.8	PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CUR	100
6.5.9	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	101
6.5.10	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER.....	101
6.5.11	TEMPERATURA CRÍTICA DE MICELIZAÇÃO	101
6.5.12	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	101
6.5.13	AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	102
6.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
6.6.1	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO	104
6.6.2	VISCOSIDADE DO HIDROGEL TERMORRESPONSIVO.....	105
6.6.3	EROSÃO DO HIDROGEL TERMORRESPONSIVO.....	106
	FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA.....	108
6.6.4	PROPriedADE MECÂNICA.....	108
6.6.5	PROPriedADE MUcOADESIVA.....	110
6.6.6	COMPORTAMENTO REOLÓGICO.....	112
6.6.7	PERFIL DE LIBERAÇÃO E DISSOLUÇÃO.....	113
	FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA.....	114
6.6.8	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	114
6.6.9	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER	116
6.6.10	TEMPERATURA CRÍTICA DE MICELIZAÇÃO	117
6.6.11	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	119
6.6.12	AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	121
6.7	CONCLUSÃO.....	122
6.8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	125
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	128
	REFERÊNCIA.....	130

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi redigido na forma de capítulos, contendo revisão bibliográfica (Capítulo I), preparação e avaliação de dispersões sólidas contendo curcumina (Capítulo II), desenvolvimento e avaliação de hidrogéis termorresponsivos (Capítulo III) e avaliação das propriedades físico-químicas de hidrogéis termorresponsivos contendo curcumina (Capítulo IV).

O Capítulo I aborda a revisão bibliográfica sobre o tema deste trabalho. A cavidade vaginal tem sido utilizada para a administração de fármacos com ação local ou sistêmica. A administração vaginal de fármacos tem como principais vantagens evitar o metabolismo hepático, reduzir a incidência e severidade dos efeitos gastrintestinais secundários e diminuir efeitos secundários hepáticos de fármacos. Várias estratégias de formulações foram estudadas para vencer os inúmeros desafios biofarmacotécnicos impostos pelas características físico-químicas do ativo. A curcumina é um composto fitoquímico com diversas propriedades terapêuticas, porém é muito pouco solúvel em água. Portanto, a hidrofiliabilidade da curcumina precisa ser melhorada para controlar a liberação e aumentar a biodisponibilidade dos curcuminóides. Dispersões sólidas são formulações farmacêuticas mais utilizadas para melhorar a solubilidade de compostos pouco solúveis. As formas farmacêuticas de hidrogel e os filmes podem ser mais bem adequados para este tipo de aplicação. Estas formas farmacêuticas são capazes de recobrir uma ampla área de superfície da mucosa, tanto para proteção física como para liberação do fármaco. Este propósito pode ser alcançado por meio de veículos mucoadesivos termorresponsivos, possíveis de serem administrados na forma de um hidrogel de baixa viscosidade para alcançar a máxima viscosidade em temperatura corpórea.

O Capítulo II aborda a preparação e avaliação de dispersões sólidas contendo curcumina pelas técnicas de coprecipitação com os carreadores hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M) e poloxamer 407 (P407). As dispersões sólidas foram caracterizadas por equilíbrio de solubilidade (ES), cinética de degradação da CUR, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios X (DR-X).

O Capítulo III aborda o desenvolvimento e avaliação de hidrogéis termorresponsivos com requisitos específicos para administração vaginal. Os hidrogéis foram preparados com Poloxamer (P407), e mistura de P407, quitosana (Qt) com hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M) em tampão citrato-fosfato pH 4,5. O potencial hidrogeniônico, viscosidade dos hidrogéis em função da temperatura e as propriedades mecânicas de dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade foram avaliados.

O Capítulo IV aborda a incorporação das dispersões sólidas nos hidrogéis termorresponsivos selecionados, respectivamente, a partir dos resultados apresentados no Capítulo II e Capítulo III. As propriedades físicas e físico-químicas dos hidrogéis termorresponsivos contendo curcumina foram avaliadas quanto ao potencial hidrogeniônico, viscosidade, erosão do hidrogel, propriedades mecânicas, mucoadesão, comportamento reológico, perfil de liberação da curcumina, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, temperatura crítica de micelização, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Desenvolver e avaliar formulações na forma farmacêutica de hidrogel termorresponsivo para veiculação de curcumina em dispersões sólidas com potencial para administração vaginal.

2.2 Específico

- Preparar dispersões sólidas de curcumina utilizando técnicas de coprecipitação e fusão;
- Avaliar o equilíbrio de solubilidade e a estabilidade física e química da curcumina nas dispersões sólidas;
- Avaliar o uso da associação de poloxamer com hidroxipropilmetilcelulose K4M e quitosana nas propriedades de gel termorresponsivo;
- Avaliar a influência da curcumina nas propriedades físicas e físico- químicas dos hidrogéis termorresponsivos (fluxo, dureza, compressibilidade, adesividade, coesividade, mucoadesão, transição de fase sol-gel, erosão, temperatura crítica de micelização, calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier);
- Avaliar a estabilidade química da curcumina na dispersão sólida e no hidrogel;
- Avaliar o perfil de liberação da curcumina das formulações de hidrogéis termorresponsivos contendo curcumina livre, mistura-física e dispersão sólida;
- Avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana da curcumina nas formulações de hidrogel termorresponsivo contendo curcumina livre e dispersão sólida.

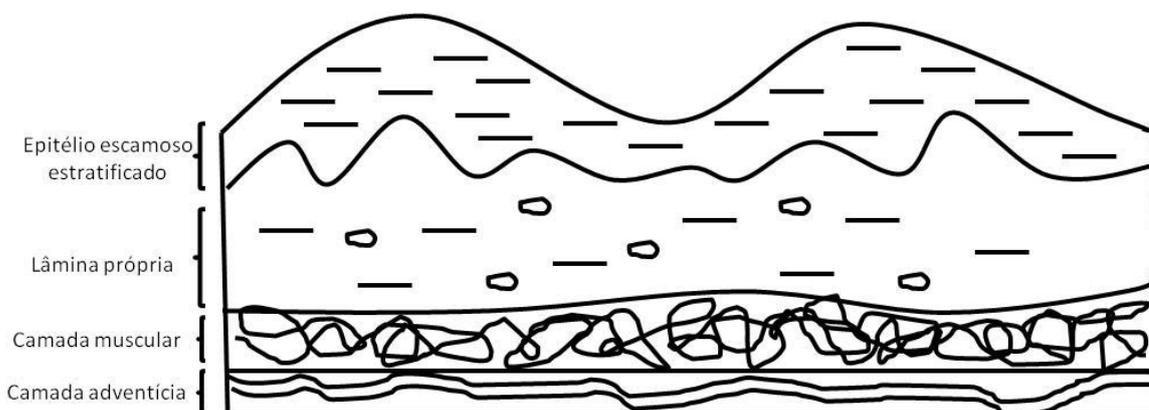
CAPÍTULO I

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Anatomia, fisiologia e histologia vaginal

A vagina é o órgão genital feminino, importante na reprodução humana, posicionada entre o reto e a uretra com comprimento de aproximadamente 9 cm. Este órgão apresenta característica tubular e fibromuscular, que compreende desde o vestíbulo vaginal até o colo do útero com pregas transversais que aumentam a área de superfície (DAS NEVES; BAHIA, 2006; VALENTA, 2005). Histologicamente a parede vaginal é composta por quatro camadas distintas (Figura 1): epitélio escamoso estratificado, lâmina própria, camada muscular e adventícia (DAS NEVES; BAHIA, 2006).

Figura 1 - Representação esquemática da mucosa vaginal



Fonte: Elaboração própria

Apesar de ser um tecido de mucosa, a vagina não apresenta glândulas. A secreção vaginal consiste em uma mistura de fluídos oriundos de inúmeras fontes. O fluído vaginal é constituído de 90 - 95% de água, sais orgânicos e inorgânicos, ureia, glicerol, ácidos graxos, albumina, enzimas, leucócitos e detritos epiteliais (VALENTA, 2005). Com algumas variações ao longo do ciclo menstrual a produção diária normal de fluído vaginal está em torno de 6 g/dia, e o volume presente na vagina é de aproximadamente 0,5 – 0,75 mL (AKA-ANY-GRAH et al., 2010; CAMELLA et al., 2015). A irrigação sanguínea é realizada principalmente pelo ramo vaginal da artéria uterina. O pH vaginal esta na faixa de 3,5 - 4,5, este valor é mantido pela presença de *Lactobacillus spp* que converte o glicogênio, proveniente de células epiteliais descamadas, em ácido láctico. Além desse papel os *Lactobacillus sp* desenvolvem importante função no controle de infecções por patógenos oportunistas. O pH

vaginal é uma importante barreira fisiológica e deve ser levado em consideração na administração e absorção de fármacos administrados por tal via (VALENTA, 2005).

As características fisiológicas e bioquímicas da cavidade vaginal são influenciadas pela idade e por alterações hormonais relacionadas ao ciclo menstrual, especialmente devido ao estrógeno. Estas características vaginais influenciam na permeação de fármacos, uma vez que dependem da espessura da camada superficial da mucosa (epitélio escamoso), rigidez celular, composição e organização lipídica no espaço intercelular (LAW et al., 1995).

3.2 Biodisponibilidade de fármacos

A cavidade vaginal tem sido utilizada para a administração de fármacos com ação local (agentes antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, antivirais, anti-inflamatórios, antioxidantes, agentes espermicidas, prostaglandinas e esteróides) ou sistêmica (TUĞCU-DEMIRÖZ; ACARTÜRK; ERDOĞAN, 2013). A absorção de fármacos por via vaginal pode ocorrer por mecanismo passivo ou ativo, semelhante ao que ocorre por outras vias de administração não endovenosa. Os mecanismos passivos de permeação mucosal incluem a via transcelular e paracelular, que representam respectivamente, um processo de difusão intracelular e intercelular pelas junções *tight junction*. No mecanismo ativo, os transportadores geram gradientes de concentração através das barreiras, mecanismo transcelular primária ou secundária. O mecanismo transcelular secundário é indiretamente acoplado a adenosina trifosfato (ATP), já o primário utiliza diretamente ATP durante o ciclo de transporte de fármaco (MARTINEZ; AMIDON, 2002). Substâncias lipofílicas são absorvidas via intracelular (ou transcelular), enquanto as hidrofílicas por via intercelular (ou paracelular) ou atravessam os poros aquosos presentes na mucosa vaginal. As características físico-químicas dos excipientes da formulação são importantes para modular a liberação do fármaco, de acordo com o perfil de liberação desejado, promover mucoadesão e aumentar viscosidade. Os adjuvantes farmacotécnicos utilizados nas formulações para administração vaginal podem causar irritação, inflamação ou dano na mucosa, podendo levar à ruptura momentânea e reversível da barreira mucosal, melhorando biodisponibilidade do fármaco, porém expondo a mucosa a agentes infecciosos ou xenobióticos (GALI et al., 2010).

3.3 Formas farmacêuticas hidrogelatinosas para administração vaginal

3.3.1 Gel hidrogelatinoso

A administração vaginal de fármacos tem como principais vantagens evitar o metabolismo hepático, reduzir a incidência e severidade dos efeitos gastrintestinais secundários e diminuir efeitos secundários hepáticos de fármacos. Formas farmacêuticas (FF) semi-sólidas (cremes, pomadas e géis), comprimidos, cápsulas, líquidas (soluções ou suspensões), filmes vaginais e anéis vaginais podem ser utilizados para aplicação vaginal. As principais vantagens das FF semi-sólidas são aceitabilidade, baixo custo financeiro, consistência e capacidade de aderência a superfícies por um período de tempo. Por outro lado, sistemas semi-sólidos convencionais de liberação de fármacos apresentam como principais desvantagens o desconforto, rápida remoção do local de aplicação, perda de viscosidade por ação da temperatura ou pH e consequente escoamento do produto para fora da cavidade vaginal (DAS NEVES; BAHIA, 2006).

Os géis são materiais formados por redes tridimensionais de polímeros totalmente ou parcialmente hidrofílicos. Em água, tais materiais possuem capacidade de intumescimento até alcançar o equilíbrio. Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que quando dispersos em meio aquoso doam viscosidade à preparação (CORRÊA et al., 2005).

A gelificação de uma dispersão polimérica pode ocorrer por fotopolimerização, ligação química cruzada ou por reticulação iônica. Sistemas de gelificação *in situ* ganham crescente atenção tanto para administração vaginal como retal. Estes sistemas são denominados de "materiais inteligentes", pois respondem a alterações fisiológicas da temperatura, pH ou força iônica (KRISTL; GRABNAR, 2014).

3.3.2 Hidrogel termorresponsivo

Hidrogéis termicamente sensíveis ou termorresponsivos têm sido foco de estudos devido sua praticidade na aplicação e baixos efeitos indesejáveis. Em concentrações adequadas apresentam transição de fase líquida para gel ($T_{sol-gel}$), próxima ou igual à temperatura corpórea. Essa transição $T_{sol-gel}$ pode ser modulada de acordo com a concentração do polímero ou associação com outros polímeros e agentes reticulantes. Geralmente, as temperaturas de gelificação são consideradas adequadas na faixa de 25 – 37°C (DAS NEVES; BAHIA, 2006). Os

polímeros biodegradáveis e termorresponsivos são candidatos potenciais para liberação modificada de fármacos, terapia celular e para engenharia de tecidos (KRISTL; GRABNAR, 2014).

A gelificação de dispersões poliméricas induzida por temperatura pode ocorrer por diferentes processos. Os mecanismos de termo-geleificação incluem transição *coil-to-helix*, interações hidrofóbicas, empacotamento micelar e combinações mais complexas, como aumento micelar e interações hidrofóbicas. As características mais comuns de homopolímeros hidrofílicos termossensíveis é a presença de grupamentos hidrofóbicos, metil, etil, e propil (QIU; PARK, 2012). As interações que ocorrem em uma dispersão polimérica aquosa são do tipo: polímero-polímero, polímero-moléculas de água e entre moléculas de água (KLOUDA; MIKOS, 2008).

A estrutura de polímeros termossensíveis apresenta um equilíbrio entre os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente, polioxipropileno (PPO) e polioxietileno (PEO). Uma pequena alteração na temperatura da dispersão polimérica aquosa pode gerar um novo ajuste das interações hidrofóbicas e hidrofílicas entre os blocos de polímero e moléculas de água (BAJPAI et al., 2008). A temperatura de solução crítica (CST) é definida como a temperatura na qual a dispersão polimérica sofre separação de fases. Abaixo da CST os polímeros são solúveis em água e acima da CST se tornam hidrofóbicos e insolúveis, formando uma dispersão gelatinosa (BROMBERG; RON, 1998; PEPPAS, 2000). Ou seja, à medida que a exposição do bloco hidrofóbico PPO é reduzida com a diminuição da temperatura, a exposição do bloco hidrofílico PEO é aumentada, permitindo a solubilização do polímero em meio aquoso. Com o aumento da temperatura, as ligações absorvem pouca quantidade de água ocasionando a formação de duas fases com diferentes concentrações de polímero formando o hidrogel (CAI; SUO, 2011; ZENG et al., 2014).

Termodinamicamente, a mudança abrupta na solubilidade dos polímeros em resposta a mudança de temperatura é regulada pela energia livre do sistema (ΔG), ou energia livre de Gibbs (SCHILD, 1992). Uma mudança na temperatura resulta em energia livre negativa no sistema, o que desfavorece a associação polímero-água permitindo interações entre as cadeias do polímero. Na interrelação termodinâmica ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), a energia livre negativa de associação (ΔG) é atribuída à maior entropia do sistema em relação à variação de entalpia ($T\Delta S > \Delta H$) (RUEL-GARIÉPY;

LEROUX, 2004). O termo entálpico (ΔH) está relacionado com as interações entre o polímero e o solvente, favorecendo a dissolução do polímero, enquanto o termo entrópico (ΔS) se relaciona com as interações hidrofóbicas, levando à precipitação do mesmo (SCHMALJOHANN, 2006, AGUILAR et al., 2007). Assim um comportamento LCST (abaixo da temperatura de solução crítica) é considerado processo entálpico, já um comportamento UCST (acima da temperatura de solução crítica) é um processo entrópico (WARD; GEORGIU, 2011). As propriedades termorreversíveis destes géis podem ser avaliadas pelos parâmetros reológicos tais como as mudanças de tensão de cisalhamento sobre as taxas de cisalhamento, temperatura de transição ($T_{sol-gel}$) e módulos de viscoelasticidade (JEANG; KIM; BAE, 2011).

3.3.3 Mecanismo de mucoadesão

O processo de mucoadesão envolve a ligação de um polímero natural ou sintético a um substrato biológico. É um método prático de retenção ou de direcionamento do fármaco, aspecto relevante na liberação controlada de fármacos e na inovação terapêutica (HUANG et al., 2000). Dispositivos mucoadesivos podem melhorar a eficácia terapêutica de fármacos, mantendo concentração plasmática em níveis terapêuticos durante longos períodos de tempo. Além disso, tem a capacidade de proteger o agente terapêutico contra a degradação enzimática (nucleases e proteases) aumentando a biodisponibilidade (BRAVO-OSUNA et al., 2007). No entanto, para uma melhor compreensão do fenômeno de bioadesão, é necessário examinar as principais características físico-químicas do substrato no qual um polímero ou um complexo polimérico irá se aderir mais especificamente ao muco e a superfície do tecido epitelial.

O muco é um gel viscoelástico inteiramente hidratado que recobre a superfície das mucosas. A principal e mais importante função do muco é proteger as células epiteliais de danos físicos, químicos e/ou biológicos provocados por ação mecânica, xenobióticos e microrganismos patogênicos. Além desta função, o muco promove lubrificação e atua como agente molhante e controlador do teor de água na superfície adjacente ao epitélio (FIGUEIRAS et al., 2008; DE VRIES et al., 1988). O muco é composto de mucina, anticorpo IgA, enzimas, tensoativos e lipídios livres. Os anticorpos são mucofílicos e combatem a entrada de microrganismos na superfície epitelial (WU et al., 1994). A mucina são glicoproteínas altamente glicosiladas que

consistem em cerca de subunidades de 500 kDa, unidas por pontes dissulfeto que garantem a formação de estruturas capazes de aprisionarem elevada quantidade de água facilitando a formação de uma camada viscoelástica de proteção sobre a superfície da mucosa. A presença de ácido siálico e de ésteres de sulfato confere ao muco uma carga elétrica negativa nas extremidades da cadeia de oligossacarídeos. O pKa aproximado do ácido varia entre 1,0 a 2,5, desta forma, no pH fisiológico, este composto está totalmente na forma ionizada (aniônica) (SLOMIANY et al., 1988).

A mucoadesão pode ocorrer por mecanismos de ligações não específicas e não covalentes, mas de natureza eletrostática ou por ligações de hidrogênio; sistemas que intumescem ou aumentam a viscosidade quando entram em contato com algum estímulo fisiológico e sua mucoadesão é resultado da formação de uma matriz mais reticulada (Tabela 1 e Figura 2) (PARK; ROBINSON, 1984). Assim, o mecanismo de mucoadesivo dos polaxâmeros pode ser explicado pelas suas propriedades reológicas, que diminuem a depuração mucociliar e aumentam o tempo de contato com a mucosa vaginal (SALMAZI, 2015).

Tabela 1 – Mecanismos de mucoadesão

Mecanismos de mucoadesão	Exemplo
Ligações de hidrogênio	Polietilenoglicol
Interações eletrostáticas	Quitosana
Interações hidrofóbicas	Fosfatidilcolina
Interpenetração de cadeias poliméricas	Sistema polimérico
Aumento da viscosidade <i>in situ</i> por estímulo de temperatura ou pH fisiológico	Poloxamer Carbômeros

Fonte: Elaboração própria

3.3.4 Mecanismos para liberação de fármacos

Os mecanismos para liberação de fármaco a partir de hidrogéis podem ocorrer principalmente por difusão e/ou erosão. Para fármacos muito solúveis, a liberação ocorre pela difusão do fármaco através da camada gelificada, enquanto para fármacos pouco ou muito pouco solúveis a liberação é controlada pelo processo de erosão.

a. Difusão

A difusão é o processo pelo qual a molécula do fármaco é transportada de acordo com o seu gradiente de concentração, ou seja, é o movimento aleatório da molécula de região mais concentrada para a menos concentrada. O processo de difusão depende do volume livre de polímero e da mobilidade das cadeias poliméricas. A mobilidade das cadeias é afetada pela extensão de insaturações, grau de ligação cruzada, cristalinidade e natureza dos substituintes. A difusão ocorre preferencialmente através das regiões amorfas do polímero, ou seja, nas regiões onde as cadeias poliméricas estão mais desordenadas. Outros fatores que favorecem a difusão é relaxação das cadeias poliméricas, taxa de intumescimento e a solubilidade do fármaco (SIEPMANN; GOPFERICH, 2001; VERGNAUD; AI, 2000).

b. Erosão

Nos sistemas cuja liberação é controlada por erosão o fármaco está incorporado em polímeros hidrossolúveis ou pouco solúveis. A liberação do fármaco por erosão envolve dois processos sequenciais dependentes do tempo, a difusão do meio de dissolução para o interior da matriz com consequente dilatação e relaxação das cadeias poliméricas e consequente formação de uma camada gelatinosa. Nestes casos, o fenômeno de erosão do retículo polimérico pode ocorrer em modo mais ou menos simultâneo até a completa desagregação das cadeias poliméricas. A maneira como ocorre a erosão do polímero está diretamente ligada ao perfil de liberação do fármaco. Em sistemas reticulados, a taxa de erosão depende da hidrofilicidade, solubilidade do polímero e erosão química ou enzimática (SIEPMANN; GOPFERICH, 2001; VERGNAUD; AI, 2000).

3.3.5 Polímeros empregados na preparação do hidrogel termorresponsivo

a. Poloxamer 407 (P407)

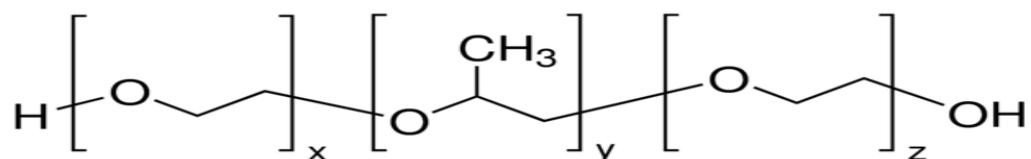
Poloxamer ou Pluronics são uma família tribloco de copolímeros lançados a cerca de 65 anos e foram sintetizados por polimerização sequencial de monômeros de óxido de etileno e óxido de propilenos na presença de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio (RICCI et al., 2002). A molécula de poloxamer é composta de 2 blocos hidrofílicos de polioxi-etileno (PEO) separados por um bloco hidrofóbico de

polioxipropilenos (PPO), Figura 2. O Poloxamer possui propriedades anfífilas as quais dependem da relação de massa entre PEO: PPO. Ao variar a razão molar entre os blocos PEO: PPO, a lipofilicidade e a hidrofiliicidade do polímero pode ser facilmente modificada. O P407, com uma massa molecular nominal de 12.600g.mol^{-1} e uma relação de massa PEO: PPO de 2:1 é mais hidrofílico, e tem sido amplamente usado em sistemas construídos para liberação controlada de fármacos em preparções tópicas, oftálmicas, intravenosa, pulmonar ou para solução e suspensão oral. (TALASAZ et al., 2008). O P407 forma micelas em concentrações baixas e gel termicamente reversível em concentrações elevadas.

O fenômeno termogelificante do P407 é perfeitamente reversível e é caracterizada por uma temperatura específica de transição $T_{\text{sol-gel}}$. Abaixo desta temperatura, a amostra apresenta baixa viscosidade e acima transita para forma semi-sólida. A termogelificação resulta da interação de diferentes segmentos do copolímero. O aumento da temperatura promove a agregação em micelas, e esta micelização ocorre devido à desidratação dos blocos polioxipropileno, hidrofóbicos, caracterizando o primeiro passo no processo de gelificação. Estas micelas são esféricas com núcleo de polioxipropileno desidratadas envolvidas no seu exterior por cadeias de polioxietileno hidratadas. Esta micelização é seguida por gelificação das amostras suficientemente concentradas (Figura 3) (DUMORTIER et al., 2006; KOFFI et al., 2006).

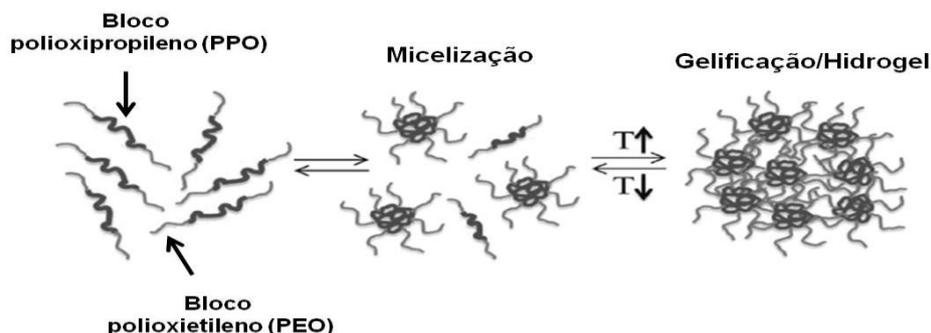
De acordo com Liu e Chu (2000), uma estrutura cúbica é obtida para concentrações de 20 e 40% P407 em água. Estas estruturas cúbicas micelares e formações micelares complexas dão origem a géis de alta viscosidade, rigidez moderada e lenta erosão do gel. Tais propriedades facilitam a incorporação tanto de fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos.

Figura 2 - Estrutura esquemática de copolímeros em bloco



Fonte: (TALASAZ et al., 2008)

Figura 3 - Esquema ilustrativo do processo de micelização seguida por gelificação de copolímeros em bloco



Fonte: Adaptado de DUMORTIER et al., 2006

No entanto, é relatado que os polímeros bioadesivos devem ser adicionados às formulações para modular a viscosidade do hidrogel e aumentar a propriedade bioadesiva. Os polímeros mucoadesivos utilizados foram a hidroxipropilmetilcelulose, polímero não iônico (HPMC), poloxâmero análogos como o poloxamer 188 (P 188), bem como a quitosana, polímero catiônico. O impacto dos polímeros bioadesivos sobre as temperaturas de gelificação depende da natureza dos aditivos bioadesivos (polímeros) e da concentração nas formulações (KOFFI et al., 2006; YUAN et al., 2012).

b. Quitosana

A quitosana (Qt) é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina. Este composto, constituído por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, é um polissacarídeo abundante na natureza (SENEL; MCCLURE, 2004). As unidades monoméricas que representam a estrutura química da Qt são compostas de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. Devido sua baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, estabilidade química e propriedades bioadesivas, foi aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) e tem sido amplamente aplicado nas diferentes áreas de ciência dos materiais e biomédica (GONG et al., 2013; PERIOLI et al., 2008). Biomateriais à base de Qt tiveram utilização sugerida como bioadesivo, cicatrizante, antimicrobiano, antioxidante, material para bandagem, sutura, lentes ópticas e molde para enxerto de pele (FELT, 1998). A similaridade entre a estrutura química da Qt e do ácido hialurônico reforça a indicação do uso deste biopolímero como agente cicatrizador e reparador de tecidos, pois é capaz de aumentar as funções de células

inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (UNEO, et al, 2001).

A solubilidade da Qt esta relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-NH_3^+$) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e também maior a sua solvatação em água (SANTOS; SOARES, 2003). A dispersão aquosa da Qt origina géis, que podem ser utilizados diretamente ou transformados em outros materiais na tentativa de utilização como biomateriais. Fatores como pH do solvente, concentração e massa molecular da quitosana estão diretamente relacionados à viscosidade e propriedades do biomaterial obtido (RATHKE; HUDSON, 1993; RAVI KUMAR, 2000).

c. Hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M)

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um polímero amplamente utilizado na indústria farmacêutica, em formas farmacêuticas para uso oral e tópico. Devido suas propriedades de intumescência e gelificação é utilizado no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada o que permitem modular a liberação de compostos ativos. Uma das principais características do HPMC é a elevada capacidade de intumescimento, que tem efeito significativo sobre a cinética de liberação do fármaco incorporado. Em contato com a água ou fluido biológico resulta no relaxamento com expansão de volume da cadeia polimérica. Em seguida, o fármaco incorporado difunde para fora do sistema (SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

Os diversos tipos de HPMC (Tabela 2) existentes para comercialização apresentam propriedades físico-químicas distintas, as quais são afetadas pelo teor de grupamentos metoxil; hidroxipropil e grau de polimerização. Os grupamentos hidroxipropil devido sua natureza hidrófila contribuem na taxa de hidratação do polímero, ao contrário dos grupos metoxil que são relativamente hidrófobos. Ou seja, polímeros de HPMC com o grau de substituição K vão formar mais rapidamente a camada gelificante, inversamente aos polímeros com o grau de substituição F, que apresentam menor taxa de hidratação (SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

Tabela 2 - Composição de diversos tipos de HPMC

Tipo	Teor em grupos metoxil (%)	Teor em grupos hidroxipropil (%)
A	27-31	-
E	28-30	07-12
F	27-30	04-7
K	19-24	07-12

Fonte: (SIEPMANN; PEPPAS, 2001)

3.4 Curcumina

A curcumina (CUR) é um composto fitoquímico de cor amarelo-alaranjado com estrutura polifenólica de baixa massa molar isolada a partir do rizoma do açafrão (*Curcuma longa*), cresce naturalmente na Índia e em outras partes do sudeste da Ásia. A CUR é um diferuloilmetano, sendo uma molécula lipofílica com vários grupos fenólicos e duplas ligações conjugadas (DHULE et al., 2012; ESATBEYOGLU et al., 2012).

As propriedades terapêuticas da CUR são conhecidas e, recentemente vem sendo estudada no combate a vários tipos de neoplasias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, antimicrobiana, antifúngica, cicatrizante e contra espécies reativas de oxigênio (EROS), (MAZZARINO et al., 2010) devido a capacidade de inibir o dano oxidativo induzido em queratinócitos humano e fibroblastos, um dos principais responsáveis pelo processo de inflamação através do mecanismo de “*downregulation*” dos caminhos PI3K/AKT/NFκB (PANCHATCHARAM et al, 2006; SIDHU et al,1998). Diferentes estudos têm demonstrado sua baixa toxicidade intrínseca e ampla variedade de efeitos terapêuticos (AGGARWAL et al, 2003; MAHESHWARI et al., 2006; AK; GÜLÇİN, 2008; PARI et al., 2008; GILDA et al., 2010; ANITHA et al., 2011).

A absorção da CUR através de células epiteliais luminiais ocorre por transporte passivo. No trato gastrointestinal (TGI), apenas a CUR solúvel pode ser absorvida pelas células epiteliais luminiais. CUR insolúvel passa direto pelo TGI, resultando na excreção de fezes. Portanto, a solubilização da CUR no TGI é o primeiro passo para o aumento da absorção. A CUR é metabolizada por enzimas de fase I e II. Fase I é um processo redutivo catalisada por enzimas, incluindo a álcool desidrogenase (ADH), no citosol do fígado ou da mucosa intestinal. Os metabolitos desta fase incluem dihydrocurcumin (DHC), THC e hexahydrocurcumin (HHC), que

existem na forma livre ou conjugada, principalmente glucuronídeos. A formação de conjugados ocorre através do metabolismo de fase II. UDP-Glucuronosiltransferases presentes nos enterócitos ou hepatócitos catalisa a formação de glucuronídeo, enquanto sulfotransferases catalisa a formação de sulfato (ESATBEYOGLU et al., 2012; KURITA; MAKINO, 2013).

Da mesma forma, as propriedades biológicas da CUR como ação antimicrobiana, antifúngica, cicatrizante e contra espécies reativas de oxigênio (MAZZARINO et al., 2010), sugerem que este composto apresentam potencial para agir sobre mucosas, especialmente na mucosite e suas comorbidades. A cavidade vaginal com pH entre 3,5 - 4,5 é um ambiente fisiológico que favorece a estabilidade química da CUR e a veiculação em formas farmacêuticas que prolongam o tempo de atividade terapêutica,

Apesar dos diversos efeitos terapêuticos, a utilização clínica de CUR é restringida por problemas farmacocinéticos, tais como baixa biodisponibilidade oral, devido a baixa solubilidade em água, instabilidade em valores de pH neutro e alcalino, metabolismo extensivo e rápida eliminação (KURITA; MAKINO, 2013; MAHESHWARI et al., 2006; RAMALINGAM; KO, 2015).

A solubilidade da CUR em vários meios é mostrada na Tabela 3. Em água, a CUR é insolúvel a pH ácido e neutro, embora o aumento de solubilidade em pH alcalino ocorra devido a ionização do grupamento hidroxil fenólico. A sua solubilidade é limitada em meios orgânicos comuns, como etanol e óleos vegetais, o que torna difícil a preparação de formulações líquidas convencionais. No entanto, recentes descobertas mostram o aumento da solubilidade da CUR em alguns óleos e tensoativos (KURITA; MAKINO, 2013).

A estabilidade de soluções aquosas de CUR (água ou mistura de água / meio orgânico) é dependente do pH, sendo razoavelmente estável a um pH de 1-6, estômago ou no intestino delgado, onde a sua degradação é muito lenta. No entanto, a sua solubilidade é baixa nesta faixa de pH. A CUR é instável em pH > 7 sob condições de pH fisiológico, tal como tampão de fosfato 0,1M (pH 7,2) a 37 ° C, mais de 90% de CUR é degradado dentro de 30 min. A CUR tem propriedades de indicador ácido-base. Em pH <1 CUR está no estado protonado e apresenta cor avermelhada, enquanto em pH 1 - 7 apresenta cor amarelo brilhante. Em pH > 7, a CUR se encontra desprotonada novamente, apresentando cor avermelhada em solução (ESATBEYOGLU et al., 2012; KURITA; MAKINO, 2013). A degradação da

CUR prossegue de acordo com uma cinética de primeira ordem. Em meio alcalino, os produtos de degradação hidrolíticas vanilina, ácido ferúlico e metano feruloil foram detectados (ESATBEYOGLU et al., 2012).

A solubilização da CUR no TGI é o primeiro passo para o aumento da sua absorção. A redução do tamanho da partícula da CUR resulta no aumento da taxa de dissolução por meio do aumento da área de superfície. A modificação da forma cristalina, polimorfismos ou estado amorfo, pode contribuir para o aumento da solubilidade ou a taxa de dissolução da CUR (KURITA; MAKINO, 2013). Várias estratégias de formulações são estudadas para vencer os inúmeros desafios biofarmacotécnicos impostos pelas características físico-químicas da CUR. Entre elas, sistemas nanoparticulados, dispersões sólidas, microparticulados, lipossomas, complexação com fosfolipídios e ciclodextrinas (CHUAH, A.M. et al., 2014).

Além da sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, propriedades antimicrobianas e antifúngicas a torna um agente promissor para o tratamento de inflamação, infecção ou mucosite vaginal (BERGINC et al., 2012).

Tabela 3 - Solubilidade da CUR em diversos meios

	Meio	Solubilidade (mg/mL)
Água	Tampão pH 5,0	11 (ng/mL)
Solventes orgânicos	Propilenoglicol	6,52
	Etanol	Aproximadamente 1,0
	Acetona	Aproximadamente 25,0
	Polietilenoglicol 400	35,38
Óleo	Amendoim	0,17
	Milho	1,48
	Gergelim	0,97
	Soja	0,95
Tensoativos	Triglicerídeo de cadeia média	3,45
	Polietilenoglicol 40 hidrogenado	103,94
	Tween 80	34,38

Fonte: Adaptado de (KURITA; MAKINO, 2013)

3.5 Dispersão Sólida

Dispersões sólidas (DS) são formulações farmacêuticas utilizadas, principalmente com a finalidade de melhorar a solubilidade de compostos pouco solúveis em água. O termo "dispersão sólida" é utilizado para descrever a mistura de compostos ativo em uma matriz biologicamente inerte e hidrossolúvel, geralmente com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade oral. Na área farmacêutica, as DS

têm sido tradicionalmente obtidas por aquecimento de misturas do fármaco e do polímero para o estado fundido, seguido de nova solidificação através do resfriamento. Métodos alternativos envolvem a dissolução dos componentes em solvente volátil mútuo, seguido por evaporação do solvente e coprecipitação do composto ativo com o carreador ou matriz. A miscibilidade entre fármaco e o polímero é importante para a formação de um sistema de dispersão sólida solúvel e estável (HUANG; DAI, 2014; LI et al., 2013; SEO et al., 2012).

Pelo menos quatro métodos de preparação de dispersões sólidas têm sido utilizados para fármacos com alto ponto de fusão e baixa solubilidade em solventes orgânicos comuns: extrusão por fusão, aplicável a fármacos com ponto de fusão mais baixos, secagem por atomização, fusão por micro-ondas e coprecipitação (PATIL; BELGAMWAR; PATIL, 2013; SEO et al., 2012).

Na formulação das dispersões sólidas, independente da técnica empregada, é necessário considerar a escolha do carreador, a proporção e as propriedades físico-químicas para caracterização das DS. Os critérios de escolha dos carreadores estão direcionados para compostos que possam aumentar a taxa de dissolução do fármaco, seja não tóxico, farmacologicamente inativo, física e quimicamente estável ou que possam controlar a liberação do fármaco (BIKIARIS, 2011). A formulação ótima de fármaco-carreador requer conhecimentos sobre solubilidade do fármaco no carreador e o mecanismo de inibição de crescimento do cristal, os quais em última análise devem controlar a estabilidade do produto.

Não existe proporção pré-estabelecida entre fármaco e carreador para alcançar um resultado ótimo, as combinações binárias ou terciárias devem ser individualmente estabelecidas (KARAVAS; GEORGARAKIS et al., 2007). Parâmetros de solubilidade e análise térmica fornecem informações úteis para prever a miscibilidade do fármaco com o excipiente dissolvido ou fundido (MENG et al., 2015). Quando a solubilidade do fármaco é muito baixa, uma fração alta do carreador é necessária para liberar o fármaco no estado solubilizado. Quando a solubilidade do fármaco em água é elevada um carreador menos solúvel em água é requerido, em maior concentração para promover uma liberação controlada do fármaco (LEUNER; DRESSMAN, 2000).

Quando o carreador é um polímero, este pode interagir fisicamente com as moléculas do fármaco para formar complexo polímero-fármaco por ligações fracas, como ligação de hidrogênio, Van de Waals e interações iônicas. As interações

moleculares formadas nas dispersões sólidas podem inibir a recristalização do fármaco e aumentar a estabilidade física do sistema. A miscibilidade entre o fármaco e o polímero contribui de forma significativa para melhorar o equilíbrio de solubilidade e aumentar a taxa de dissolução (HUANG; DAI, 2014; MENG et al., 2015).

No método de preparação por evaporação do solvente, o carreador e o fármaco são dissolvidos em solvente geralmente orgânico, ambos estáveis, e o solvente é evaporado a uma temperatura fixa e a pressão reduzida. Com a remoção do solvente ocorre uma supersaturação do meio seguido de precipitação simultânea dos constituintes. O solvente, aderido à superfície da partícula coprecipitada, é removido por secagem com auxílio de vácuo. Contudo, nestes casos, há a possibilidade de formação de solvatos (DAS et al., 1960). O método de preparação por evaporação é indicado para fármacos termolábeis, passíveis de degradação na temperatura de fusão do carreador. A dificuldade desse método está em encontrar um solvente que dissolva tanto o fármaco como o carreador. Além disso, o uso de diferentes solventes pode induzir o aparecimento de diferentes polimorfos (SETHIA; SQUILLANTE, 2003).

Uma nova abordagem baseada na utilização de radiação de microondas tornou-se um método reconhecido. A radiação de micro-ondas consiste em ondas eletromagnéticas com frequências entre 0,3-300 GHz, que passa através dos materiais e faz com que suas moléculas oscilem, gerando calor. A radiação de micro-ondas oferece várias vantagens, tais como aquecimento volumétrico rápido, sem superaquecimento na superfície, economia de energia, maior produtividade e menores custos operacionais e tempo de preparação (PATIL; BELGAMWAR; PATIL, 2013).

Uma vantagem particular da técnica de fusão para a formação de DS é quando se tem a presença de carreador e fármaco solúveis em diferentes meios orgânicos. Embora frequentemente aplicada, o método de fusão tem limitações como a compatibilidade entre fármaco e carreador com boa homogeneização. Quando o fármaco e o carreador são incompatíveis, duas fases líquidas ou suspensão podem ser observadas na mistura aquecida, que resulta na forma de uma dispersão sólida não homogênea, e este problema pode ser evitado utilizando tensoativos. Outro problema pode surgir durante o resfriamento, o fármaco e o carreador podem sofrer mudanças na miscibilidade, levando a separação de fases.

Foi observado que quando a mistura é resfriada lentamente, o fármaco se recristaliza, enquanto que o resfriamento rápido produz dispersões sólidas amorfas (DAS et al., 1960).

3.6 Avaliação física e biológica

3.6.1 Calorimetria exploratória diferencial

Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma ferramenta termodinâmica para uma avaliação direta da energia térmica absorvida, a qual ocorre em uma faixa pré-determinada de aumento ou redução da temperatura. Particularmente, a calorimetria é aplicada para monitorar mudanças na fase de transição de substâncias puras ou misturas (PRIVALOV, 1995).

Em condições experimentais mais simples, a energia é fornecida simultaneamente para o cadinho de referência (branco) e para o cadinho contendo a amostra a ser analisada. A diferença entre a energia requerida para a amostra em relação à requerida para o branco é a quantidade de calor absorvido (evento endotérmico) ou liberado (evento exotérmico) pelas moléculas da amostra. Em geral, transições de fase, desidratações, reduções e algumas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto que cristalizações, oxidações, algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos (COOPER, 2000, COOPER, 2004).

Como um método termodinâmico, a tecnologia DSC pode prever a estabilidade das substâncias ou das suas misturas em diferentes condições experimentais tais como pH, força iônica e osmolaridade (MAGHAMI, 2010, PRIVALOV, 1995).

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a análise de superfície e microanálise elementar, especialmente utilizada para análise morfológica de partículas, polímeros, proteínas, sementes, compostos inorgânicos e orgânicos. A imagem obtida da amostra é ampliada e tri-dimensional. A formação da imagem ocorre a partir da interação de um feixe de elétrons com o material. O feixe

de elétrons (elétrons primários) gerado por efeito termo-iônico é acelerado pela diferença de potencial, e alinhados em uma coluna ótico-eletrônica, sendo conduzida à câmara que contém a amostra. Este feixe de elétrons ao focalizar um ponto da amostra, gera sinais que são captados e amplificados fornecendo um sinal elétrico gerando a imagem. Conforme o feixe varre a área em análise, uma imagem virtual vai sendo formada ponto a ponto (DUARTE; JUCHEM; PULZ, 2003).

3.6.3 Difração raios X

A técnica de difração de raios X (DR-X) é um método preciso e eficiente largamente empregado em pesquisa científica e tecnológica, particularmente, para ensaios não destrutivos em aplicações industriais.

A DR-X permite a identificação de fases cristalinas numa mistura, avaliação da estrutura cristalina, índice de cristalinidade e avaliação do tamanho médio do cristal de pós e filmes poliméricos. A determinação das fases cristalinas é possível quando os átomos se encontram de forma ordenada. E essa configuração é formada por planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. Quando um cristal é exposto a um feixe de raios X, o mesmo interage com os átomos presentes na amostra, originando o fenômeno de difração (CALLISTER; RETHWISH, 2009; McLACHLAN, 1957).

3.6.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que permite a identificação de substâncias orgânicas ou minerais através dos grupos funcionais presentes nas moléculas, bem como a quantificação do composto analisado (SILVERSTEIN, 2000).

A FTIR consiste, basicamente, na geração de um interferograma, utilizando um interferômetro do tipo configuração derivada, que é formado por um espelho fixo, um espelho móvel e um divisor de feixe. Os espectros são obtidos pelo cálculo da transformada de Fourier do referido interferograma, reproduzidos na forma de um gráfico de tempo contra a intensidade do sinal denominado interferograma. O espectrômetro registra o resultado na forma de uma banda de absorção, fornecendo evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à

interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular (CHRISTIAN, 1994).

A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam (SILVERSTEIN, 2000). As posições das bandas no espectro podem ser apresentadas em número de ondas, utilizando a unidade centímetro inverso ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) ou em micrômetros ($2,5 - 16 \text{ }\mu\text{m}$). Essencialmente, existem duas vibrações fundamentais: vibração de estiramento (*stretching*), onde os átomos permanecem no mesmo eixo da ligação, porém a distância entre os átomos aumenta ou diminui e a vibração angular (*bending*), onde as posições dos átomos mudam em relação ao seu eixo de ligação original (SILVERSTEIN, 1991).

3.6.5 Comportamento de fluxo

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo da matéria. A viscosidade é a propriedade física que caracteriza a resistência de um fluido ao escoamento, a uma dada temperatura. O estudo reológico de sistemas poliméricos tem auxiliado tanto na compreensão da estrutura molecular de muitos tipos de polímeros, quanto na forma como esta conformação estrutural afeta o comportamento reológico, quer em condições permanentes, quer em deformação intermitente (LEE; MOTURI; LEE, 2009).

As propriedades reológicas de uma substância podem ou não dependerem do tempo e da taxa de cisalhamento. A avaliação das propriedades reológicas para as formas farmacêuticas do tipo gel é importante para prever o seu comportamento *in vivo*. As propriedades de fluxo podem prever o comportamento de difusão das formulações por todo revestimento do epitélio vaginal, especialmente nos géis termossensíveis que contêm polímeros mucoadesivo. Géis multi-componente podem apresentar comportamentos complexos de fluxo devido à possível interação entre os componentes, assim as características reológicas precisam ser controladas e compreendidas (LEE; MOTURI; LEE, 2009; SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

A partir da análise da relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento, os fluídos podem ser classificados em fluídos newtonianos e não newtonianos.

➤ Flúidos Newtonianos

Um sistema é dito considerado ter comportamento Newtoniano de fluxo quando sua viscosidade é dependente da taxa de cisalhamento e dependem do líquido, temperatura e pressão. Nos fluidos newtonianos a tensão é diretamente proporcional à taxa de deformação. É possível observar que a viscosidade diminui à medida que a temperatura aumenta ao passo que aumenta com o aumento da pressão (LEE; MOTURI; LEE, 2009).

➤ Flúidos Não - Newtonianos

Um sistema é dito considerado ter comportamento não - Newtoniano de fluxo quando a tensão de cisalhamento é indiretamente proporcional a taxa deformação. A viscosidade dos fluidos não - Newtonianos altera de acordo com a taxa de cisalhamento. Os sistemas não - Newtonianos podem ser de três divididos em três outras subclasses: plástico, pseudoplástico e dilatante (LEE; MOTURI; LEE, 2009).

3.6.6 Propriedades mecânicas

No desenvolvimento de formas de dosagem tópica várias propriedades são desejáveis para a formulação, tais como fácil remoção do produto a partir da embalagem de armazenamento, boa capacidade de espalhabilidade, boa propriedade mucoadesiva e viscosidade aceitável. A análise do perfil de textura (TPA) permite avaliar as propriedades de textura das formulações diferentes semi-sólidas, com a finalidade de reunir informações sobre a estrutura física gel. Portanto, APT é importante para prever o comportamento de uma amostra em diferentes condições ambientais e fisiológicas. A partir do gráfico resultante de tempo x força, os seguintes parâmetros mecânicos podem ser descrito:

1. Dureza (força necessária para atingir uma determinada deformação);
2. Adesividade (trabalho necessário para vencer as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da sonda);
3. Compressibilidade (o trabalho necessário para deformar o produto durante a primeira compressão da sonda);
4. Coesividade (efeito da tensão de cisalhamento sobre as propriedades estruturais da formulação) (BALOGLU et al., 2011; GRELA; MARCINIAK; PLUTA, 2014; HURLER, 2011; JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997).

3.6.7 Mucoadesão

Propriedade mucoadesiva pode ser avaliada por meio de um ensaio de tração, onde se analisa a interação entre a forma farmacêutica e a superfície da mucosa em temperatura corpórea. Se a força mucoadesiva for grande, maior será o tempo de residência e quantidade de formulação que permanecerá na cavidade vaginal. No entanto, se a força mucoadesiva for excessiva, o gel pode danificar a membrana mucosa (BALOGLU et al., 2011; JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997).

3.6.8 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de derivados vegetais pode ser avaliada pela determinação da concentração mínima necessária para inibir o crescimento bacteriano, de forma que quanto menor for a concentração inibitória mínima (CIM) maior será a potência. Um aspecto bastante relevante na determinação da CIM de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações. Vários métodos permitem avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos derivados vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição (PINTO et al., 2003).

3.6.9 Atividade Antioxidante

Os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido tem importante papel nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos fisiológicos ou devido a fatores ambientais, podem ocorrer doenças e danos profundos em tecidos. Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação inibindo os radicais livres e a complexação de metais. Os compostos fenólicos, como a CUR, também são potentes antioxidantes que podem agir como redutores de oxigênio singleto, atuando nas reações de oxidação lipídica e na quelatação de metais (MAZZARINO et al., 2010). Dentre os métodos de avaliação da ação antioxidante se destacam o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o método de sequestro de radicais livres DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (ALVES et al., 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

O método de oxidação do β -caroteno/ ácido linoléico avalia a capacidade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, e está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno, induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. O método de DPPH• está baseado na descoloração de uma solução composta por radicais estáveis de DPPH• (cor violeta) quando adicionada de uma substância com capacidade de ceder um átomo de hidrogênio. O método de oxidação do β -caroteno/ ácido linoléico determina a capacidade de uma amostra em proteger o substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de inibição de radicais DPPH• se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante picrilhidrazila (ALVES et al., 2010;DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

3.7 Consideração Final

A cavidade vaginal tem sido utilizada para a administração de fármacos para ação local ou sistêmica. As formas farmacêuticas para formação de gel *in situ* são, potencialmente, mais adequadas para este tipo de aplicação, pois são capazes de recobrir uma maior área de superfície da mucosa vaginal, aumentam a proteção física e modulam a liberação de fármacos. A gelificação *in situ* pode ser alcançada por meio de formulações termorresponsivas, possíveis de serem administradas na forma de um hidrogel de baixa viscosidade para alcançar a máxima viscosidade na temperatura corpórea. A gelificação *in situ* associada à mucoadesão facilita a aplicação intravaginal, melhora a adesão ao tratamento, retém o gel na superfície da mucosa e viabiliza a liberação controlada do fármaco.

A curcumina foi escolhida como fármaco modelo por ser um composto com diversas propriedades terapêuticas, além disso é um desafio para ser formulada como medicamento seja por ser muito pouco solúvel em água e sua baixa estabilidade química em meio aquoso.

A tecnologia de dispersões sólidas é uma estratégia para melhorar a hidrofiliabilidade e a taxa de dissolução da curcumina e, desta forma, aumentar a biodisponibilidade dos curcuminóides. As dispersões sólidas associada a uma formulação com pH 4,5-5.0 oferecem um grau de proteção maior contra degradação química da curcumina.

3.8 Referência Bibliográfica

AGUILAR, C.E. et al. Smart Polymers and their applications as biomaterials. **Topics in tissue engineering**, v.3, 2007.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, n.10, p.2202-2210, 2010.

ANITHA, A. et al. Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 452-461. 2011.

AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 23, p. 363-398. 2003.

AK, T.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chem. Biological Interaction**, v. 174, p. 27-37. 2008.

AKA-ANY-GRAH, A. et al. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnike**, v. 76, n. 2, p. 296–303, out. 2010.

BAJPAI, A. K. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33, n. 11, p. 1088–1118, 2008.

BALOGLU, E. et al. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 6, p. 627–636, 2011.]

BERGINC, K. et al. Development and evaluation of an in vitro vaginal model for assessment of drug's biopharmaceutical properties: curcumin. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1045–53, dez. 2012.

BIKIARIS, D. N. Solid dispersions, part I: recent evolutions and future opportunities in manufacturing methods for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion Drug Delivery**, v.8, n.11, p.1501-1519, 2011.

BRAVO-OSUNA, I. et al. In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly (isobutyl cyanoacrylate) core- shell nanoparticles. **International Journal Pharmaceutical**, n.338, p.284-290, 2007.

BROMBERG, L. E.; RON, E. S. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 197–221, 1998.

CAI, S.; SUO, Z. Mechanics and chemical thermodynamics of phase transition in temperature-sensitive hydrogels. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 59, n. 11, p. 2259–2278, 2011.

CALLISTER, W.D.J.; RETHWISH, D.G. Materials science and engineering. **Willeys & Sons, Incorporated**, ed 8, 2009.

CARAMELLA, C. M. et al. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 1–14, 2015.

CHRISTIAN, D.G. Analytical chemistry: solutions manual. **John Willeys & Sons, Incorporated**, ed.162,1994.

CHUAH, A.M. et al. Enhanced bioavailability and bioefficacy of an amorphous solid dispersion of curcumin. **Food Chemistry**, n. 156, p. 227-233, 2014.

COOPER, A. Biophysical chemistry. **Royal Society of Chemistry**, p.103-107,2004.

COOPER, A. Microcalorimetry of protein- DNA interactions in travers A, Buckle M (eds): DNA- protein interactions. **Oxford University Press**, p.125-139, 2000.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, 2005.

DAS NEVES, J.; BAHIA, M. F. Gels as vaginal drug delivery systems. **International journal of pharmaceutics**, v. 318, n. 1-2, p. 1–14, 2 ago. 2006.

DAS, S. K. et al. Solid Dispersions : An Approach to Enhance the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. n. 1, p. 37–46, 1960.

De VRIES, M.E. et al. Hydrogels for buccal drug delivery: properties relevant for muco- adhesion. **Journal of Biomedical Materials Research**, n.11, p. 1023-1032, 1988.

DHULE, S. S. et al. Curcumin-loaded γ -cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 4, p. 440–451, maio 2012.

DUARTE, L.; JUCHEM, P.; PULZ, G. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas exemplos brasileiros, v. 30, n. 2, p. 3–15, 2003.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β - caroteno/ ácido linoleico e métodos de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.26, p.446-452, 2006.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–28, dez. 2006.

ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin-From Molecule to Biological Function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 29 maio 2012.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. **Drug Delivery Industrial Pharmacy**, n.24, p. 979-993, 1998.

FIGUEIRAS, A. et al. A comprehensive development strategy in buccal drug delivery. **AAPS Pharmaceutical Science Technology**, n.4, p.1703-1712, 2008.

GALI, Y. et al. In Vitro Evaluation of Viability, Integrity, and Inflammation in Genital Epithelia upon Exposure to Pharmaceutical Excipients and Candidate Microbicides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5105–5114, 2010.

GILDA S. et al. Activity of water-soluble turmeric extract using hydrophilic excipients. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 59-66. 2010.

GONG, C. et al. Thermosensitive Polymeric Hydrogels As Drug Delivery Systems. **Current Medicinal Chemistry**, p. 79–94, 2013.

GRELA, K. P.; MARCINIAK, D. M.; PLUTA, J. Stability evaluation of thermosensitive drug carrier systems based on Pluronic F-127 polymer. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 71, n. 1, p. 12–14, 2014.

HUANG, F.S. et al. Role of epidermal growth factor and its receptor in chemotherapy-induced intestinal injury. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.252, p. 432-442, 2002.

HUANG, Y.; DAI, W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 18–25, fev. 2014.

HURLER, J. Improved Texture Analysis for Hydrogel Characterization : Gel Cohesiveness , Adhesiveness , and Hardness. **Journal of Applied Polymer Science**, 2011.

JEANG, B.; KIM, S.W.; BAE, Y.H. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.54, p 37-51, 2002.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural , viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, p. 223–233, 1997.

KARAVAS, E., E. GEORGARAKIS, et al. Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions. **European Journal Pharmacy and Biopharmacy**, n.3, p.334-347, 2007.

KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 1, p. 34–45, 2008.

KOFFI, A. A. et al. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of

quinine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 328–335, mar. 2006.

KRISTL, J.; GRABNAR, P. A. Thermo-responsive polymers : Insights into decisive hydrogel characteristics , mechanisms of gelation , and promising biomedical applications. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 472, p. 262–275, 2014.

LAW, S. et al. Regional variation in content, composition and organization of porcine epithelial barrier lipids revealed by thin-layer chromatography and transmission electron microscopy. **Archives of oral biology**, v. 40, n. 12, p. 1085–1091, 1995.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 2, p. 88–98, jun. 2009.

LEUNER, C. e J. DRESSMAN. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal Pharmacy and Biopharmacy**, v.50, n.1, p.47- 60, 2000.

LI, B. et al. Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices. **Carbohydrate Polymers**, n.98(1), p.1108–16, 2013.

LIU, T.; CHU, B. Formation of homogeneous gel- like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solutions: FCC to BCC phase transition. **Journal of Applied Cristalografia**, n.33, p. 727-730, 2000.

MAGHAMI, P. et al. Relationship between stability and bioluminescence color of firefly luciferase. **Photochemical Photobiological Science**, n. 9, p.376-385, 2010.

MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life sciences**, v. 78, n. 18, p. 2081–7, 27 mar. 2006.

MARTINEZ, M.N.;AMIDON, G.L. A Mechanistic approach to **understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals**. **Journal Clinic Pharmacology**, n. 42, p. 620-643, 2002.

MAZZARINO, L. et al. Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 219-226. 2010.

McLACHLAN, D.J. X- ray crystal structure. **McGranw: New York**, ed.1, 1957.

MENG, F. et al. Investigation and correlation of drug polymer miscibility and molecular interactions by various approaches for the preparation of amorphous solid dispersions. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 12–24, 25 abr. 2015.

PANCHATCHARAM M. et al. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and Celular Biochemistry**, 290, 87–96, 2006.

PARI, L. et al. Role of curcumin in health and disease. **Arch PhysiolBiochem**, v. 2, n. 114, p. 127-49. 2008.

PARK, K.; ROBNSON, J.R. Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 19, p. 107-127, 1984.

PATIL, P. H.; BELGAMWAR, V. S.; PATIL, P. R. Enhancement of solubility and dissolution rate of poorly water soluble raloxifene using microwave induced fusion method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 49, 2013.

PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

PERIOLI, L. et al. Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 141–145, out. 2008.

PINTO, T.J.A; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. **Atheneu**, ed.2, 2003.

PRIVALOV, G. et al. Precise scanning calorimeter for studying thermal properties of biological macromolecules in dilute pollution. **Analytical Biochemistry**, n.232, p. 79-85, 1995.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 49–60, dez. 2012.

RAMALINGAM, P.; KO, Y. T. Enhanced oral delivery of curcumin from N-trimethyl chitosan surface-modified solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic and brain distribution evaluations. **Pharmaceutical research**, v. 32, n. 2, p. 389–402, fev. 2015.

RATHKE, T.D.; HUDSON, S.M. Determination of the degree of N- deacetylction in chitin an chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy. **Polymer Chemistry Edition**, n.31, p. 749, 1993.

RAVI KUMAR, N.M.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, n. 46, p. 1-27, 2000.

RICCI, E. J. et al. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 17, p. 161–167, 2002.

RUEL-GARIÉPY, E.; LEROUX, J.C. In situ- forming hydrogels- review of temperature- sensitive systems. **Journal Pharmaceutical Biopharmaceutical**, n 58, p. 409-426, 2004.

SALMAZI, R, et al. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Nanomedicine**, p. 4815–4824, 2015.

SANTOS, J.E. et al. Polímeros: ciência e tecnologia. **Ciência e Tecnologia**, n.13, p. 242, 2003.

SCHILD, H.G. Poly (N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, **Progress Polymer Science**. n. 17, p 163-249, 1992.

SCHMALJOHANN, D. Thermo – and pH-responsive polymers in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.58, p.1655-1670, 2006.

SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potencial applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Review**, n. 56, p. 1467- 1980, 2004.

SEO, S.W. et al. Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol® HS15 as a carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, n.424(1-2), p.18–25, 2012.

SETHIA, S. e E. SQUILLANTE. Solid dispersions: revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.20, p.215-247, 2003.

SIDHU, G.S., MANI, H., GADDIPATI, J.P., SINGH, A.K., SETH, P., BANAUDHA, K.K., PATNAIK, G.K., MAHESHWARI, R.K. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. **Wound Repair and Regeneration** 7 (5), 362–374, 1999.

SIEPMANN, J.; GOPFERICH, A. Mathematical modeling of bioerodible , polymeric drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 229–247, 2001.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 48, p. 139–157, 2001.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Spectrometric identification of organic compounds. **John Willeys & Sons, Incorporated**, ed.5, 1991.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos. **John Willeys & Sons, Incorporated**, ed.6, 2000.

SLOMIANY, B.L. et al. Role of associated and covalently bound lipids in salivary mucin hydrophobicity: effect of proteolysis and disulfide bridge reduction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n.3, p 1046-1053, 1988.

TALASAZ, A. H. H. et al. In situ gel forming systems of poloxamer 407 and hydroxypropyl cellulose or hydroxypropyl methyl cellulose mixtures for controlled

delivery of vancomycin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, n. 4, p. 2369–2374, 2008.

TUĞCU-DEMİRÖZ, F.; ACARTÜRK, F.; ERDOĞAN, D. Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: Formulation, in vitro and in vivo evaluations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 1, p. 25–39, 2013.

UNEO, H. et al. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. **Biomaterials**, n.22, p. 1667-1673, 2001.

VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1692–1712, 3 nov. 2005.

VERGNAUD, J. M.; AI, A. Effect of the nature of the polymer and of the process of drug release (diffusion or erosion) for oral dosage forms. **Computational and Theoretical Polymer Science**, v. 10, p. 383–390, 2000.

WARD, M.A.; GEORGIU, T.K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. **Polymers**, n. 3, p.1215-1242, 2011.

WU, A.M. et al. Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n.1, p.39-55,1994.

YUAN, Y. et al. Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide. **International journal of pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 114–9, 1 jul. 2012.

ZENG, N. et al. Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: Relation between micellization, gelation, mechanic and release properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 467, n. 1-2, p. 70–83, 2014.

CAPÍTULO II

4 PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO CURCUMINA

4.1 Resumo

A tecnologia de dispersão sólida (DS) consiste em dispersar um ou mais ativos em um carreador capaz de modificar as propriedades físico-químicas do composto, com a finalidade de modificar equilíbrio de solubilidade e alterar a taxa de dissolução. A curcumina (CUR) tem demonstrado ampla variedade de atividades biológicas. No entanto, a baixa biodisponibilidade oral de CUR, devido à baixa solubilidade em água, representa uma barreira significativa para a sua ação terapêutica. O objetivo do presente estudo foi utilizar a tecnologia da DS para melhorar a solubilidade aquosa da CUR. Como carreador para preparação das DS foi utilizado hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M) ou poloxamer 407 (P407), nas razões de massa de 1:1, 1:2 e 2:1 (CUR: polímero). As DS foram preparadas pelas técnicas de coprecipitação (DSc) e fusão usando micro-ondas (DSf). As DS foram caracterizadas por equilíbrio de solubilidade (ES), estabilidade química (espectroscopia UV), cinética de degradação, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios X (DR-X). O ES mostrou melhor resultado para DSf (1:2) com HPMC K4M e para DSc com P407 (1:2). As DS de CUR com P407 e HPMC K4M aumentaram a estabilidade da CUR prevenindo a degradação química tanto em pH 4,5 como em pH 7,0. A cinética de degradação da CUR foi de ordem zero para todas formulações, exceto para DSf CUR:HPMC K4M 1:2 e CUR livre em pH 7,0 (cinética de primeira ordem). As curvas de DSC e DR-X mostraram mudança no estado cristalino da CUR na presença de P407. A morfologia das DS observadas por MEV sugere alteração no cristalino da CUR. As curvas obtidas por FTIR mostraram que os estiramentos dos grupamentos químicos da CUR permaneceram inalterados tanto na mistura física (MF) como na DS. A tecnologia das DS aumentou a estabilidade da CUR, tampão pH 4,5 e 7,0, e sua solubilidade em água (755 vezes em relação a CUR livre). Os melhores resultados foram encontrados para DSc CUR com P407 na proporção 1:2.

4.2 Abstract

The solid dispersion technology (SD) consists one or more actives dispersed in a carrier able to modify the physicochemical properties of the compound, in order to modify equilibrium solubility and dissolution rate change. Curcumin (CUR) has demonstrated broad range of biological activities.

However, the low oral bioavailability CUR, due to the low solubility in water represents a significant barrier to their therapeutic action. The aim of this study was to use the SD technology to enhance the aqueous solubility of the CUR. As carrier for the preparation of SD was used K4M hydroxypropyl methylcellulose (HPMC K4M) or poloxamer 407 (P407), the mass ratios of 1:1, 1:2 and 2:1 (CUR: polymer). The SD were prepared by coprecipitation techniques (SDc) and melting using microwave (SDf). The SD were characterized by solubility equilibrium (SE), degradation kinetics, chemical stability (UV spectroscopy), differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (DR-X). The SE showed the best result for SDf (1: 2) with HPMC K4M and SDc for P407 (1: 2). The solids dispersions of CUR with P407 and HPMC K4M increased stability CUR preventing chemical degradation in both pH 4.5 and pH 7.0. The kinetics degradation of CUR was zero order for all formulations, except for SDf CUR:HPMC K4M 1:2 and CUR free at pH 7,0 (first-order kinetics). The curves of DSC and DR-X showed the change in the crystalline state of CUR in the presence of P407. The morphology observed by SEM of the SD suggests changes in the crystalline state of the CUR. The curves obtained by FTIR showed that the stretches of chemical groups CUR remained unchanged in both the physical mixture (PM) and SD. The DS technology increased the stability of CUR, pH 4.5 buffer and 7.0 and its solubility in water (755 times compared to free CUR). The best results were found for CUR DSc to P407 in a ratio of 1: 2.

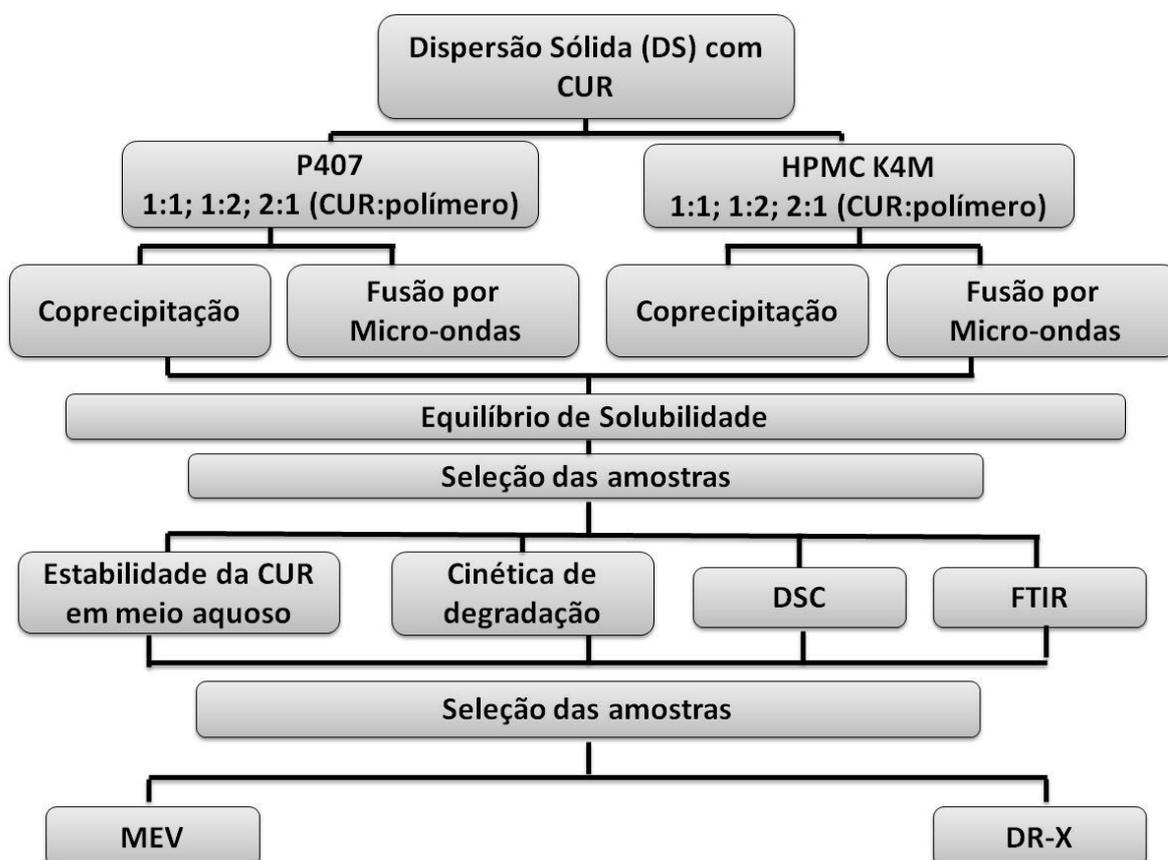
4.3 Objetivo

O objetivo do presente estudo foi obter e avaliar dispersões sólidas pelas técnicas de coprecipitação e fusão, utilizando como carreadores a hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M) ou poloxamer 407 (P407).

4.4 Delineamento experimental

Para o desenvolvimento deste capítulo, foram realizadas etapas de preparação e caracterização das dispersões sólidas (DS) e das matérias primas (Figura 4). As análises de caracterização foram baseadas na identificação de propriedades físicas, físico-químicas e biológicas das DS para veiculação da curcumina (CUR).

Figura 4 - Diagrama esquemático das etapas envolvidas na preparação e caracterização das dispersões sólidas



CUR - curcumina, P407 - poloxamer 407, HPMC K4M - hidroxipropilmetilcelulose K4M, DSC – calorimetria exploratória diferencial, FTIR - espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, MEV – microscopia eletrônica de varredura, DR-X – difração de raio X.

Fonte: Elaboração própria

4.5 Material e Método

Curcumina (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA), Hidroxipropilmetilcelulose K4M (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA) e Poloxamer 407 (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA). As demais matérias primas utilizadas eram de grau de pureza para uso farmacêutico.

4.5.1 Espectrofotometria de varredura para determinação do pico máximo de absorvância e construção da curva analítica de CUR

Para determinação do pico máximo de absorvância foi preparada uma solução de CUR ($2\mu\text{g. mL}^{-1}$) em etanol 95% (v/v). O comprimento de maior absorvância foi determinado em espectrofotômetro UV-VIS (FEMTO - 880 XI, São Paulo, Brasil) entre os comprimentos de onda de 190 - 800 nm.

A construção da curva analítica para CUR foi realizada entre as concentrações de $0,25\mu\text{g.mL}^{-1}$ – $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução etanólica 95% (v/v). As soluções foram analisadas por espectroscopia UV - visível a 427nm (pico máximo de absorvância). Cada solução foi preparada em triplicata.

4.5.2 Preparação das dispersões sólidas de CUR

As dispersões sólidas (DS) foram preparadas pelas técnicas de coprecipitação e fusão por micro-ondas.

Para obtenção das dispersões sólidas, pelo processo de coprecipitação, quantidades adequadas de CUR, HPMC K4M e P407 foram pesadas e dispersadas separadamente em etanol 95%. As dispersões etanólicas foram misturadas para uma razão de 1:1; 1:2 e 2:1 m/m de CUR:HPMC K4M e CUR:P407. A evaporação do solvente foi feita sob pressão de -650 mmHg, na temperatura de $50 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando evaporador rotativo (TE-211,TECNAL, Piracicaba, Brasil). Para obtenção das DS por fusão, misturas de CUR: HPMC K4M, CUR:P407 (1:1; 1:2; 2:1 m/m) foram pulverizadas, umedecidas com água e transferidas para um cadinho de porcelana e aquecidas em forno micro-ondas (Brastemp Ative-BMS45A, São Paulo, Brasil) em potência 420W até fusão do material. As DS foram mantidas na temperatura ambiente para resfriamento. As DS foram pulverizadas e padronizadas em tamis de 60 mesh (250 μm). As DS obtidas foram armazenadas em dessecador,

ambientado com sílica, e mantidas ao abrigo da luz na temperatura ambiente até o momento do uso.

4.5.3 Preparação das misturas físicas

As misturas físicas (MF) CUR: HPMC K4M, CUR: P407 nas proporções 1:2; 1:1 e 2:1 m/m foram preparadas em gral e misturadas com pistilo. Após a mistura os pós foram pulverizados e padronizados em tamis de 80 mesh (180 μ m). As MF obtidas foram armazenadas em dessecador ambientado com sílica, e mantidas ao abrigo da luz na temperatura ambiente até o momento do uso.

4.5.4 Equilíbrio de solubilidade

O equilíbrio de solubilidade da CUR em água foi determinado para a CUR livre, misturas físicas e dispersões sólidas. As amostras foram pesadas para uma concentração de 5 mg.mL⁻¹. Essa concentração de CUR foi estipulada para uma massa acima do coeficiente de solubilidade (Ks) determinado experimentalmente (dados não apresentados). As DS foram mantidas sob agitação constante por 48h em câmara de agitação orbital, com temperatura controlada para 25°C (TE-4200, TECNAL, Piracicaba, Brasil). As amostras foram centrifugadas (Rotor LS3/Combate, CELM, São Paulo, Brasil) a 3000 rpm durante 10 min. e o sobrenadante foi recolhido, para determinar a massa de CUR dissolvida na água. O teste foi realizado com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$)

4.5.5 Estabilidade da CUR em meio aquoso das dispersões sólidas

Para a avaliação da estabilidade da CUR livre, DS e MF, uma massa correspondente a 1 mg de CUR foi dispersa em 10 mL de tampão citrato (pH 4,5) e tampão fosfato (pH 7,0). A concentração de CUR nas amostras foi determinada após 24 e 48 horas e posteriormente em intervalos de 7 dias, por um período de 21 dias, mantidas sob refrigeração ($\pm 10^\circ\text{C}$). As alíquotas foram retiradas do meio aquoso e diluídas em etanol 95%. A concentração de CUR em cada tempo foi medida por espectrometria UV (427nm) e determinada utilizando a equação da reta. A medida de CUR não degradada foi realizada em triplicata, e a Equação 1 foi utilizada para se obter a concentração de CUR não degradada a cada intervalo de tempo.

$$CUR_D \% = 100 - \left(\frac{T_i - T_f}{T_i} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde CUR_D é % de CUR degradada em cada tempo, T_f é a massa de CUR não degradada e T_i é a massa de CUR inicial. O teste foi realizado com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$)

4.5.6 Cinética de degradação da CUR nas DS

A cinética de degradação da CUR nas DS foi determinada por tratamento matemático dos resultados obtidos no estudo de estabilidade da CUR (DS, MF e Livre) em meio aquoso (item 4.6.3). Para a definição da cinética de degradação da CUR (ordem zero, primeira ordem e pseudoprimeira ordem) em cada amostra, os dados foram plotados graficamente e o coeficiente de correlação linear (r) foi determinado para cada perfil de degradação.

4.5.7 Calorimetria exploratória diferencial

A caracterização termoanalítica foi realizada utilizando DSC (Thermal Analyzer TA 60W – Shimadzu DSC-60, Kyoto, Japão) em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, na faixa de aquecimento de $25 - 200^\circ\text{C}$, sob uma razão de aquecimento de $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. A massa de amostra empregada para análise das DS, MF, HPMC K4M, P407 e CUR foi de aproximadamente 2 mg.

4.5.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho da CUR livre, DS, MF e polímeros foram obtidos pelo espectro de varredura na faixa de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, (IR-Affinity-1 – Shimadzu, Kyoto, Japão) com resolução de 4 cm^{-1} e 128 scans. Pastilhas de KBr foram preparadas misturando 2 mg da amostra com 200 mg de KBr.

4.5.9 Microscopia eletrônica de varredura

Uma pequena porção do pó ou das dispersões foi colocada em uma fita adesiva de carbono dupla face presa a um suporte de alumínio. Os suportes foram recobertos com uma fina camada de íons de ouro no metalizador (SC7620

SpatterCoater). As amostras foram submetidas à condição de vácuo, o gás argônio foi liberado como meio que forma o plasma para ionizar a placa metálica de ouro e a corrente foi ajustada para 3 mA, durante 3 min para obter um filme de recobrimento com espessura ~ 92 Å. Em seguida, as amostras foram aleatoriamente microfotografadas e digitalizadas. Para a análise das amostras foi utilizada tensão de aceleração igual 15 kV e corrente do feixe igual a 100 pA.

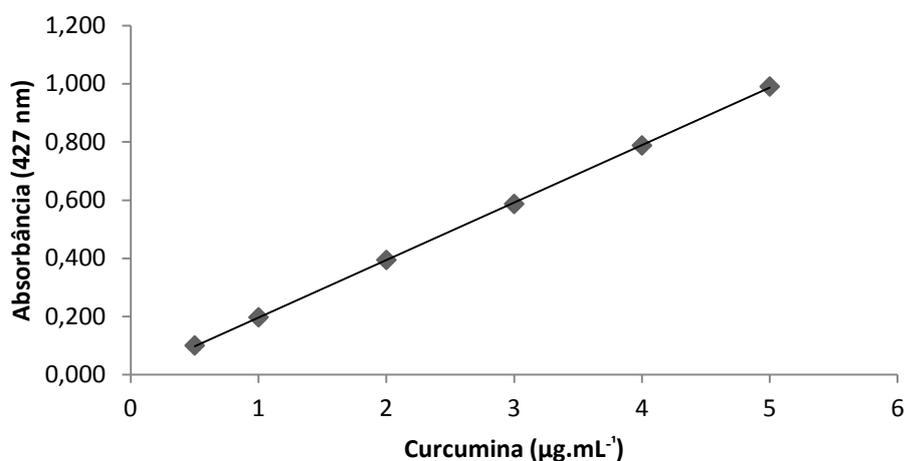
4.5.10 Difração de raios X

Os estudos de difração de raios X (DR-X) das amostras foram realizados utilizando difratômetro de raios X (X'Pert-MPD, Philips Analytical X Ray, Almelo, Netherlands), com níquel purificado e radiação de cobre ($\lambda = 1,54060$ Å). Todas as análises foram realizadas com a difração em ângulo de 2θ , variando de 5 a 40° , velocidade $0,02^\circ.s^{-1}$. A voltagem e corrente usadas foram 40 kV e 40 pA, respectivamente.

4.6 Resultado e Discussão

4.6.1 Curva analítica de CUR

O espectro de absorção no UV - visível mostrou o máximo de absorção no comprimento de onda de 427nm. O mesmo resultado foi descrito por Li J.et al, 2013. O método analítico para quantificação da CUR foi aceito pela confirmação da linearidade na faixa de 0,25 a $5 \mu g.mL^{-1}$. Os resultados obtidos com a curva analítica apresentados na Figura 5 são a média de 3 determinações. O coeficiente de correlação linear (r) determinado foi 0,999 (Tabela 4) indicando relação funcional linear entre a concentração da CUR e a absorção em λ 427 nm.

Figura 5 - Curva Analítica da CUR, λ 427 nm

Fonte: Elaboração própria

Tabela 4 - Valores da equação da reta e coeficiente de regressão da curva analítica da CUR

Parâmetros Avaliados	Resultados Analíticos
Equação da reta	$y = 0,197x - 0,001$
Coeficiente de correlação linear (r)	0,999

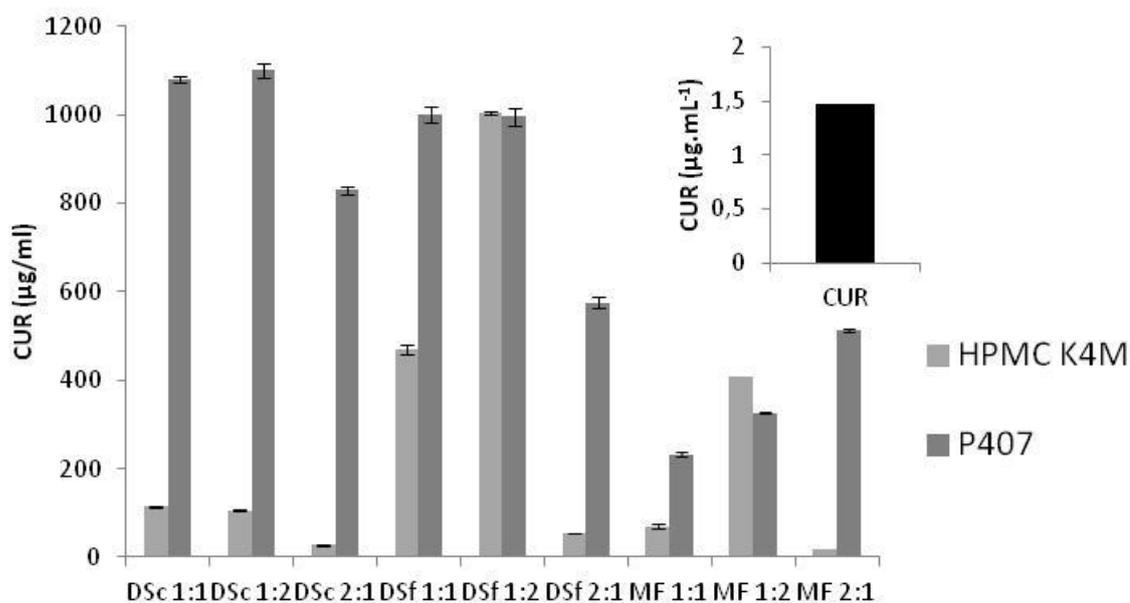
Fonte: Elaboração própria

4.6.2 Equilíbrio de solubilidade

O resultado do estudo de equilíbrio de solubilidade das DS de CUR e respectivas MF são apresentados na Figura 6. Em comparação com o equilíbrio de solubilidade da CUR ($1,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$) os melhores resultados foram encontrados para DS 1:2 com P407, obtida por coprecipitação. O equilíbrio de solubilidade alcançado para DS P407 1:2 m/m ($1110,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi 755 vezes maior que o equilíbrio da solubilidade da CUR livre e 3,4 vezes maior que a MF 1:2 m/m ($325,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Considerando a técnica de fusão os melhores resultados para equilíbrio de solubilidade foram alcançados com as DS de P407 1:1 ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e P407 ($996 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e HPMC K4M ($1002,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) na proporção 1:2 m/m. Comparando estes resultados com o equilíbrio de solubilidade da CUR e das respectivas MF, a solubilidade da CUR nas DS foram respectivamente 680 vezes maior que a CUR livre e 4,31 vezes maior que MF CUR:P407 1:1, e 2,45 vezes maior que MF CUR:HPMC K4M 1:2, e 3,07 vezes maior que MF CUR:P407 1:2.

Para P407, a técnica de coprecipitação apresenta os melhores resultados de solubilidade da CUR independente da proporção CUR: P407. Para o HPMC K4M a técnica de fusão apresenta a melhor solubilidade da CUR na proporção CUR: HPMC K4M 1:1 e 1:2 m/m.

Figura 6 - Equilíbrio de solubilidade das amostras de DS, MF e CUR (*insert*).



Fonte: Elaboração própria

Com base na análise dos resultados de equilíbrio de solubilidade as amostras DSf CUR:HPMC K4M 1:2, DSc CUR: P407 1:2 e respectivas misturas físicas MF CUR: HPMC K4M 1:2 e MF CUR: P407 2:1 foram selecionadas para avaliação da estabilidade, cinética de degradação, DSC e FTIR.

Embora a solidificação mais rápida da fase polimérica das DS tenha um potencial para alcançar uma maior fração de dispersão molecular do fármaco e assim aumentar a solubilidade (HUANG et al., 2011), nossos resultados mostram que a maior solubilidade da CUR nas DS com P407 1:2 m/m obtida pela técnica de coprecipitação, pode ser atribuída ao maior carregamento de CUR no estado amorfo.

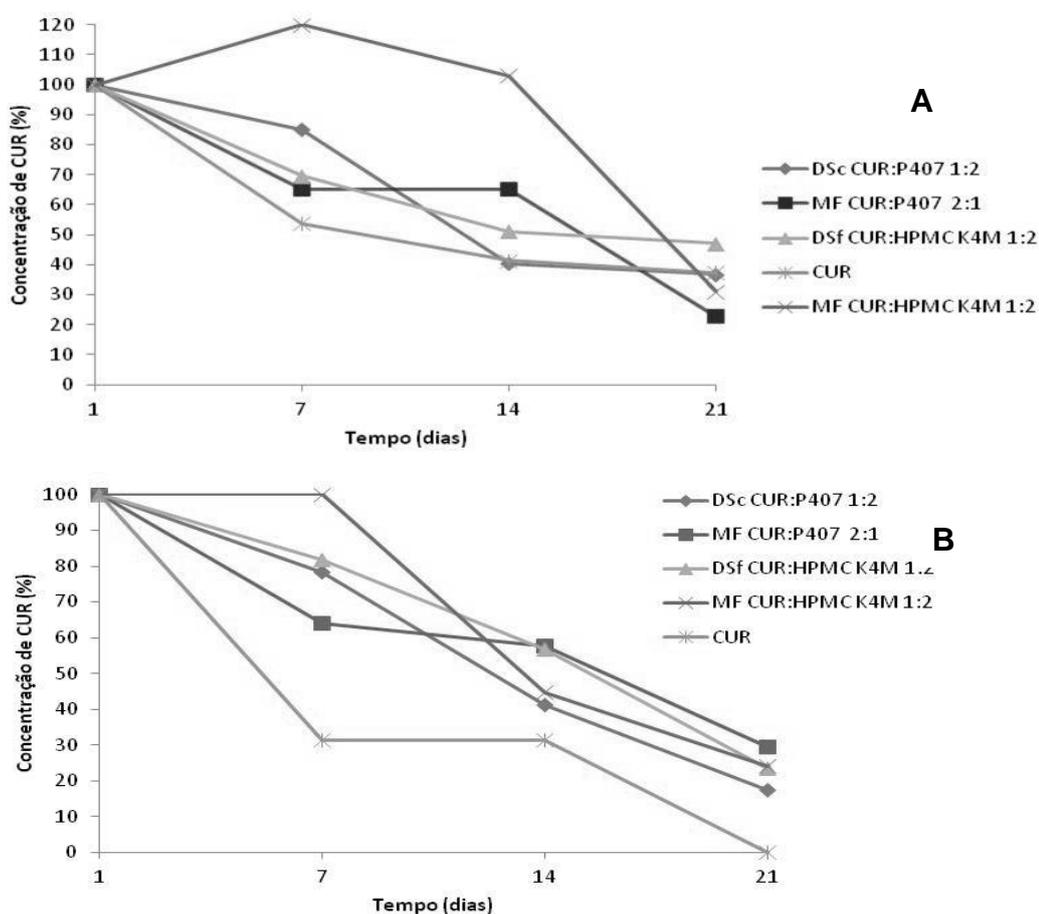
4.6.3 Estabilidade da CUR em meio aquoso das dispersões sólidas

Os resultados dos estudos de estabilidade da CUR em pH 4,5 e 7,0 são apresentados na Figura 7 (Painel A e B). A CUR é uma molécula lipofílica derivada

do diferuloilmetano e apresenta vários grupos fenólicos e duplas ligações conjugadas. As características químicas da CUR sugere degradação oxidativa e hidrolítica (KURITA; MAKINO, 2013; SEO et al., 2012). Na molécula da CUR existe em equilíbrio entre as formas ceto-enol-dicetona, que é fortemente favorecida pela ligação intramolecular - H. A degradação hidrolítica da CUR ocorre inicialmente com o ataque do OH⁻ nucleofílico no carbono da porção ceto - enol (SEO et al., 2012).

A análise dos resultados mostra que a presença dos polímeros P407 e HPMC K4M reduziu a degradação da CUR durante o período de estudo. No entanto, a CUR nas DS é ainda mais estável que a CUR nas MF. As DSf CUR:HPMC K4M apresentaram maior estabilidade quando comparadas as DSc CUR:P407 para ambos os meios. O aumento evidenciado para MF CUR:HPMC K4M mostra que neste intervalo de tempo o percentual de CUR dissolvida no meio foi maior que o percentual de CUR degrada. O perfil das curvas DSc CUR:P407 1:2 e DSf CUR:HPMC K4M indicam que após o tempo de estudo em pH 4,5, a CUR assume uma tendência de degradação constante, a qual acompanha o perfil de degradação da CUR livre, e diferentemente das curvas apresentadas pelas MF. A comparação da estabilidade da CUR na presença dos polímeros mostra que o HPMC K4M contribui mais para a estabilidade da CUR do que P407, tanto nas DS quanto nas MF, prevenindo a degradação química. Este resultado confirmou que o encapsulamento da CUR evita a degradação hidrolítica, devido à proteção do radical ceto-enol da molécula de CUR a partir do ataque nucleofílico de íon OH⁻. Na presença dos polímeros a estabilidade da CUR é maior para pH 4,5 do que para pH 7,0. Estes resultados colaboram com a via de administração proposta neste estudo. Uma vez que o pH da cavidade vaginal, em condições fisiológicas, varia de 4,5 - 5,5.

Figura 7 – Estabilidade da CUR em meio aquoso pH 4,5 (A) e pH 7,0 (B) das DSf CUR:HPMC K4M 1:2 , DSc CUR: P407 1:2 e respectivas misturas físicas MF CUR: HPMC K4M 1:2 e MF CUR: P407 2:1



Fonte: Elaboração própria

4.6.4 Cinética de degradação da CUR nas DS

As cinéticas de degradação da CUR nas amostras de DS, MF e CUR livre são apresentadas na Tabela 5. O coeficiente de correlação linear dos dados obtidos no estudo de estabilidade química da CUR, indica que as amostras em meio aquoso (pH 4,5) apresentaram comportamento cinético de ordem zero, ou seja, a velocidade de degradação é independente da concentração de CUR. Em pH 7,0 apenas as amostras DSc CUR:P407 1:2, MF CUR:P407 2:1 e MF CUR:HPMC K4M 1:2 apresentaram cinética de degradação de ordem zero, as demais (DSf CUR:HPMC K4M 1:2 e CUR livre) apresentaram cinética de degradação de primeira ordem, ou seja, a velocidade de degradação é proporcional a concentração de CUR.

Tabela 5 – Cinética de degradação da CUR em meio aquoso pH 4,5 e 7,0.

pH 4,5			
	Ordem Zero (<i>r</i>)	Primeira Ordem (<i>r</i>)	Pseudo Primeira Ordem (<i>r</i>)
DSc CUR:P407 1:2	0,994*	0,973	0,881
MF CUR:P407 2:1	0,970*	0,964	0,866
DSf CUR:HPMC K4M 1:2	0,991*	0,949	0,709
MF CUR:HPMC K4M 1:2	0,942*	0,347	0,928
CUR	0,92*	0,866	0,866
pH 7,0			
	Ordem Zero	Primeira Ordem	Pseudo Primeira Ordem
DSc CUR:P407 1:2	0,952*	0,95	0,950
MF CUR:P407 2:1	0,946*	0,908	0,919
DSf CUR:HPMC K4M 1:2	0,948	0,969*	0,791
MF CUR:HPMC K4M 1:2	0,942*	0,754	0,734
CUR	0,871	0,973*	0,183

* Ordem de cinética selecionada

Fonte: Elaboração própria

4.6.5 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas termoanalíticas das amostras são apresentadas na Figura 8 (A) CUR, HPMC K4M, P407, (B) MF CUR: HPMC K4M 1:2, DSf CUR: HPMC K4M 1:2, MF CUR: P407 2:1 e DSc CUR: P407 1:2, as temperaturas de fusão e as respectivas entalpias de fusão e $\Delta H T_g$ (entalpia de transição vítrea) são apresentadas na Tabela 6.

Na Figura 8 A o evento térmico em 173,28°C corresponde ao ponto de fusão da CUR (WANG, MA, & TU, 2015). O evento térmico na faixa de 159,13 – 163,88°C sugere um estágio de Tg para CUR. O ponto de fusão para P407 em 55,91° C corresponde ao descrito na literatura (KWEON et al., 2002). O HPMC K4M é um composto amorfo e o evento térmico na faixa de 30-70°C corresponde à perda de água. Conte et.al (1988), relatam que a Tg do HPMC K4M é de 57°C, este evento térmico foi confirmado nos nossos resultados.

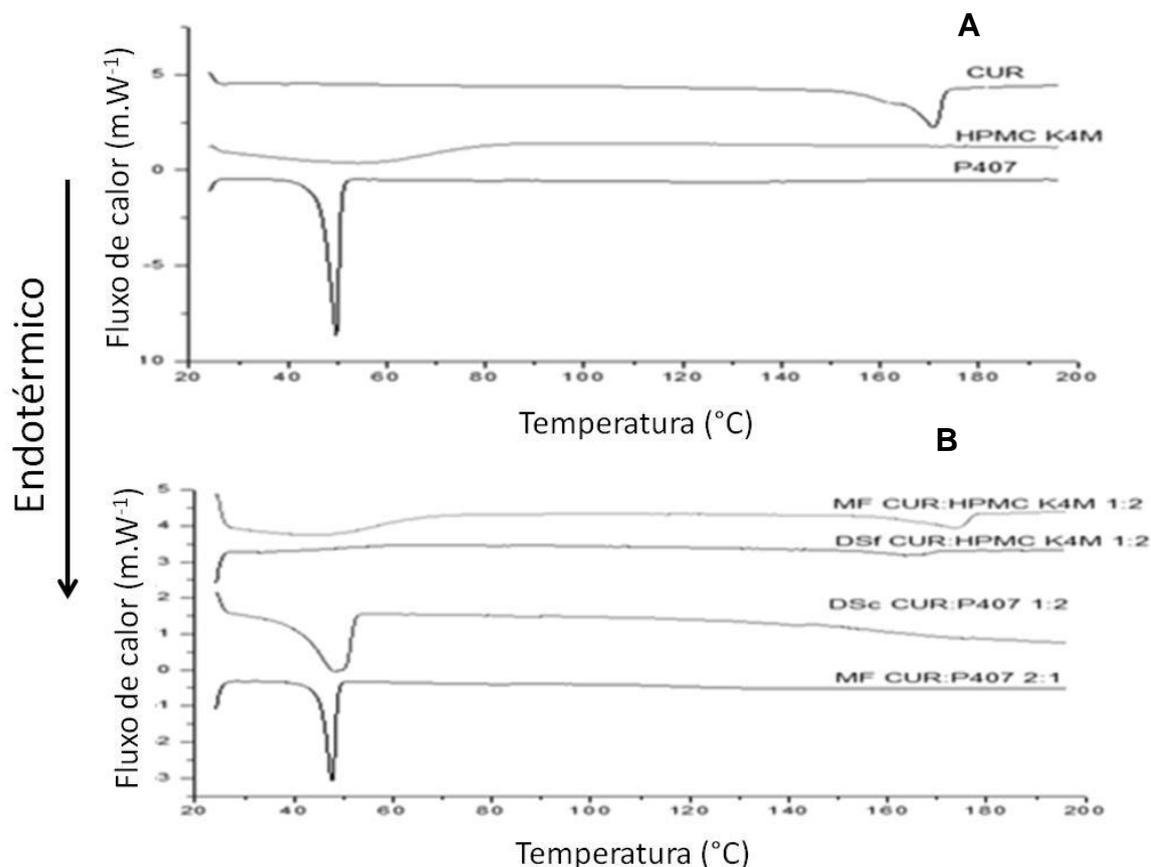
Na Figura 8 B nenhum evento de térmico de fusão para CUR pode ser observado na DS com P407 (DSc CUR:P407 1:2) e MF (CUR:P407 2:1). A Figura 8 B mostra um valor de Tg (aproximadamente 147°C) da DSc CUR:P407 1:2, o qual não é observado para a CUR livre, P407 ou MF CUR:P407 2:1. Este evento pode estar relacionado com a mudança do estado sólido da CUR, indicando uma redução

da cristalinidade. O ΔH de fusão na DS obtida por coprecipitação (DSc) foi de -81,17 J/g, este valor de entalpia corresponde a energia gasta para fusão do P407 e é menor que o ΔH do P407 puro (-144,66 J/g). A ausência de evento térmico na faixa de 170°C, referente a CUR, na amostra MF CUR:P407 2:1 pode estar relacionado ao processo de fusão entre o polímero e a CUR gerando uma DS por fusão durante a rampa de aquecimento da análise.

Nas DS de CUR com HPMC K4M um evento térmico na faixa entre 170,54 – 177,38°C pode ser observado na curva DSf CUR:HPMC K4M 1:2, o qual pode estar relacionado com amorfização incompleta da CUR. Para DSf HPMC K4M a entalpia de fusão da CUR diminui para -7,95 J/g o que confirma a amorfização da CUR (-102,08 J/g). Na curva MF CUR: HPMC K4M 1:2 o pico de fusão da CUR aparece em 173,53°C e é precedido por um estágio de Tg na faixa entre 157,34 – 162,32°C.

A maior solubilização aquosa no estado amorfo baseia-se na energia de solvatação envolvida no processo de dissolução devido à disposição das moléculas nesse sistema, que são arranjadas ao acaso. Portanto, nesse caso, baixa energia de solvatação é requerida para separá-las e homogeneizá-las ao meio, proporcionando uma dissolução mais rápida e efetiva. Assim, o desenvolvimento de formulações contendo o fármaco na forma amorfa é frequentemente benéfico em termos de dissolução e biodisponibilidade. A redução da cristalinidade da CUR demonstrada nos resultados de DSC é um dos fatores que contribui para explicar a melhora da solubilidade da CUR nas DS e MF com P407 e HPMC K4M.

Figura 8 - Curvas termoanalíticas das amostras de (A) CUR, polímeros, (B) DS e respectivas MF.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 6 - Temperatura de fusão, entalpia de fusão (ΔH) e entalpia de transição vítrea ($\Delta H T_g$) das amostras de CUR, polímeros, DS e respectivas MF.

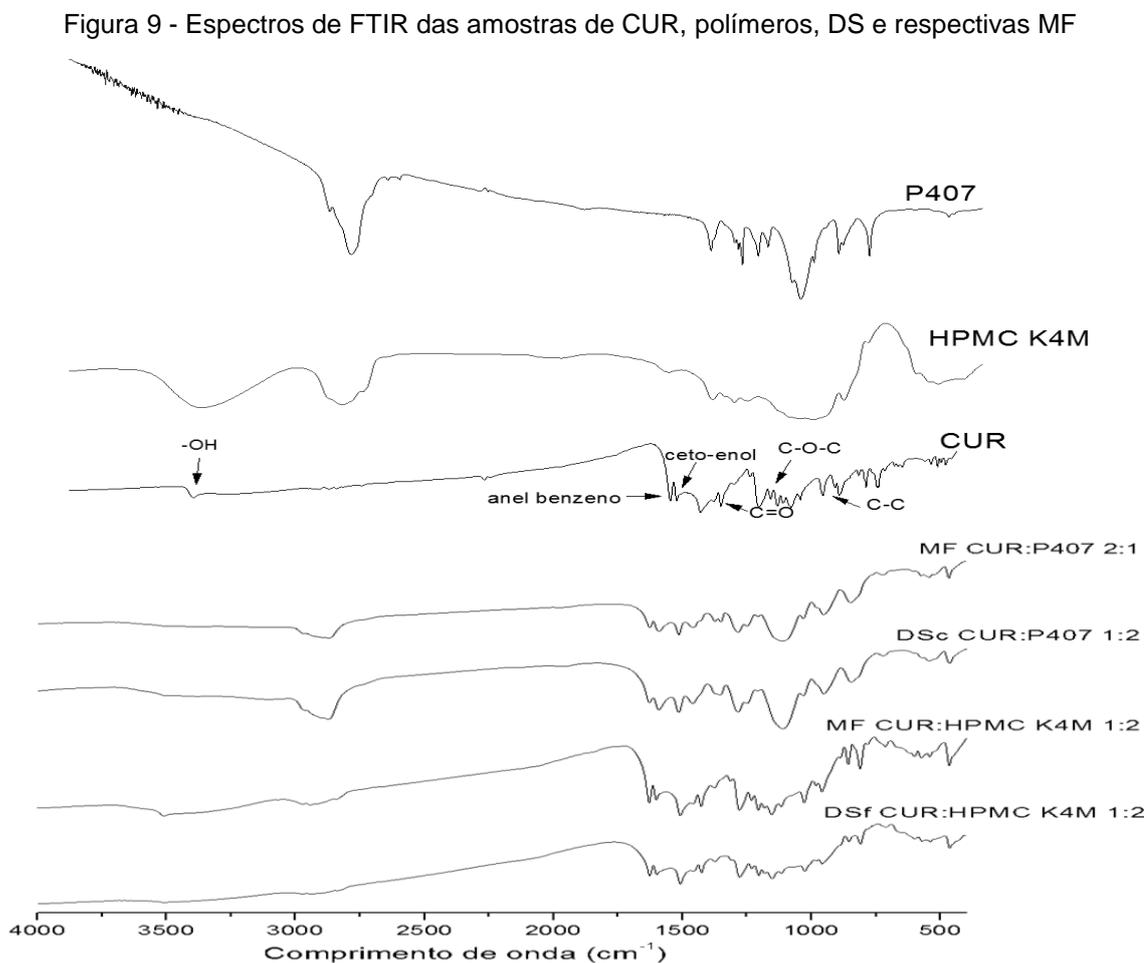
Amostra	Ponto de fusão (°C)	ΔH (J/g) CUR	$\Delta H T_g$ CUR (J/g)	$\Delta H T_g$ Polímeros (J/g)
CUR	173,28	-102,08	5,78	
P407	56,15	-	-	12,35
HPMC K4M	-	-	-	-
DSc CUR:P407 1:2	48,99	-	-	5,97
DSf CUR:HPMC K4M 1:2	170,65	-7,95	0,12	
MF CUR:P407 2:1	54,34	-	-	6,68
MF CUR:HPMC K4M 1:2	173,53	-24,58	0,8	-

Fonte: Elaboração própria

4.6.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Por meio dos espectros de infravermelho apresentados na Figura 9, é possível identificar os estiramentos característicos para a CUR. O estiramento referente a C=O na região de 1400 cm^{-1} . O estiramento referente à conversão ceto – enol pode ser observado na região entre $1562\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$. O estiramento referente ao anel benzeno pode ser identificado em 1600 cm^{-1} . O estiramento referente C=C do composto aromático pode ser identificado em 1380 e 1000 cm^{-1} . Na região de 1230 cm^{-1} é possível identificar estiramentos da banda de C-O-C. O estiramento em 3510 e 3500 cm^{-1} é referente à presença da OH do grupo fenol. Este resultado para FTIR da CUR está em acordo com os resultados descritos por Darandale & Vavia (2012); Gangwar et al. (2012) e Li j.et al (2015)

Os mesmos estiramentos referentes à CUR foram observados nas MF e DS da CUR com P407 e HPMC K4M. Estes resultados mostram que não houve interação química entre a CUR e os carreadores decorrentes do processo.



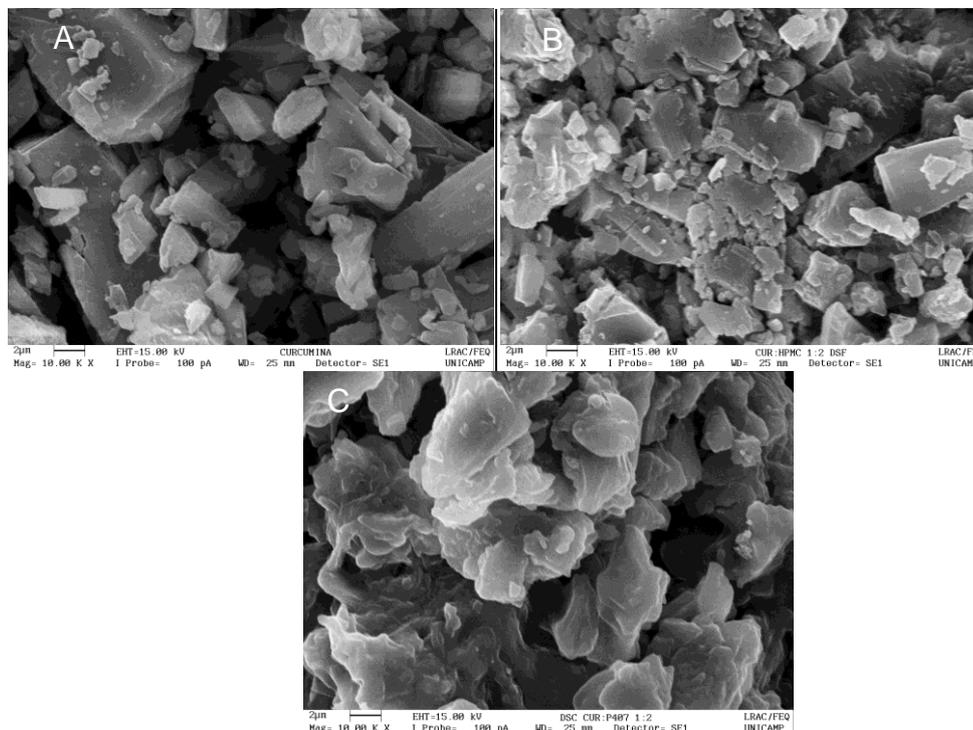
Fonte: Elaboração própria

Com base na análise dos resultados de DSC e FTIR as amostras DSf CUR:HPMC K4M 1:2, DSc CUR: P407 1:2 e CUR livre foram selecionadas para avaliação da cristalinidade por DR-X e MEV.

4.6.7 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 10 mostra as imagens de MEV para CUR livre, DSf HPMC K4M 1:2 e DSc CUR: P407 1:2. A imagem de CUR livre (A) exibe partículas grandes de formato irregular e tamanho variado. Nas imagens da DS com HPMC K4M (B) é possível observar a presença de cristais de CUR dispersos na matriz de HPMC K4M. Em contraste com as imagens da CUR livre e da DS com HPMC K4M, não é possível observar a presença de cristais de CUR livres na DSc CUR: P407 1:2 (C). Esses resultados corroboram para explicar a ausência de picos de fusão da CUR na curva de DSC da DSc CUR: P407 1:2 (Figura 8 B) e a menor intensidade dos picos de difração na Figura 11.

Figura 10 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de CUR livre (A), DSf HPMC K4M 1:2 (B) e DSc CUR: P407 1:2 (C).



Fonte: Elaboração própria

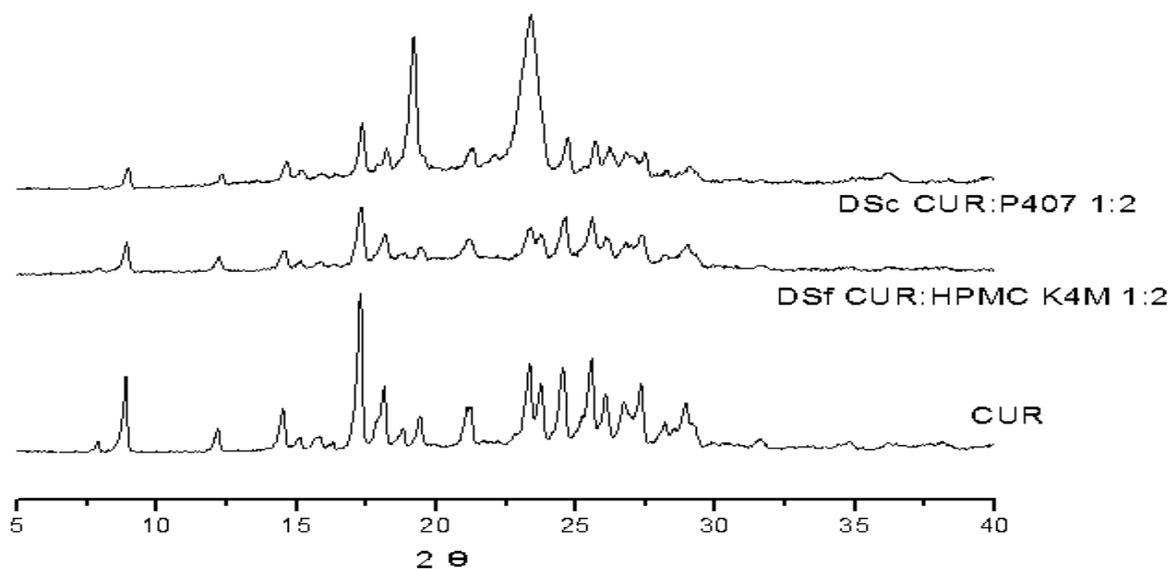
4.6.8 Difração de raios X

As curvas dos difratogramas com os respectivos ângulos de Bragg, para as amostras de DS e CUR livre são apresentadas na Figura 11. Os resultados para CUR livre estão em acordo com aqueles apresentados por J. Li et al., (2015). Os picos que caracterizam a cristalinidade da CUR são identificados em 8.89° , 11.87° , 14.25° , 17.33° , 17.87° , 24.51° e 27.07° 2θ .

A análise dos resultados confirma a presença de cristais de CUR para DSf CUR: HPMC K4M 1:2. A menor intensidade dos sinais que confirmam a presença de espaço cristalino nessa formulação mostra que houve uma amorfização parcial da CUR na DSf.

De acordo com os resultados dos estudos apresentados por Kweon et al., 2002, o P407 apresenta picos de difração típicos em $19,2^\circ$, $23,5^\circ$ e $26,2^\circ$ 2θ . No difratograma da DSc CUR: P407 1:2 os picos referentes ao P407 não foram alterados indicando que este polímero manteve a forma cristalina após a preparação da DS. Embora, tenha ocorrido uma redução da intensidade dos picos da CUR não é possível afirmar que ocorreu uma modificação completa do estado cristalino para amorfo como indicado nas curvas de DSC.

Figura 11 - Difração de raios X das amostras de CUR livre, DSf HPMC K4M 1:2 e DSc CUR: P407 1:2



Fonte: Elaboração própria

4.7 Conclusão

Tanto a técnica de coprecipitação como fusão para a obtenção das DS aumentou a solubilidade da CUR em água. O melhor resultado foi encontrado para a técnica de coprecipitação, CUR: P407 1:2 m/m.

As DS de CUR com P407 e HPMC K4M aumentaram a estabilidade da CUR prevenindo a degradação química, tanto em pH 4,5 como em pH 7,0.

As curvas de DSC e DR-X mostraram mudança no estado cristalino da CUR na presença de P407. Na presença de P407 a CUR passou do estado cristalino para um estado de transição vítrea. Na presença de HPMC K4M a CUR permaneceu no estado cristalino, no entanto a energia de fusão requerida (ΔH) foi menor quando comparada com a CUR livre. Desta forma, o aumento da solubilidade da CUR nas DS pode ser atribuído à mudança do estado cristalino, ao aumento da área de superfície e à hidrofobicidade do P407 e do HPMC K4M.

A modificação no estado cristalino da DS e do aumento da área de superfície pode ser confirmada nas imagens obtidas por MEV.

Os espectros obtidos por FTIR mostraram que os estiramentos dos grupamentos químicos da CUR permaneceram estáveis tanto na MF como na DS, o que permite afirmar que a CUR é quimicamente estável na presença de P407 e HPMC K4M.

A tecnologia de DS obtidas por coprecipitação e fusão associada, respectivamente, aos polímeros P407 e HPMC K4M aumentaram a estabilidade da CUR, tampão pH 4,5 e 7,0, e sua solubilidade em água. A melhor proporção CUR: Polímero foi 1:2 tanto para P407 como para HPMC K4M.

4.8 Referência Bibliográfica

DARANDALE, S. S., & VAVIA, P. R. Cyclodextrin-based nanosponges of curcumin: formulation and physicochemical characterization. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, n. 75, p. 315–322., 2012.

GANGWAR, R. K. et al. Conjugation of curcumin with PVP capped gold nanoparticles for improving bioavailability. **Materials Science and Engineering: C**, n.32, p.2659–2663, 2012.

HUANG, J. et al. Interplay of formulation and process methodology on the extent of nifedipine molecular dispersion in polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 59–67, 2011.

KURITA, T., & MAKINO, Y. Novel Curcumin Oral Delivery Systems. **Anticancer Research**, p.2807–2821, 2013.

KWEON, H. et al. Preparation of a Novel Poloxamer Hydrogel. **Journal of applied Polymer Science**, v.88, p.2670-2676, 2002.

LI, B. et al. Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices. **Carbohydrate Polymers**, n.98(1), p.1108–16, 2013.

LI, J. et al.. Curcumin-Eudragit® E PO solid dispersion: A simple and potent method to solve the problems of curcumin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik**, v.94, p.322–32, 2015.

SEO, S.W. et al. Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol® HS15 as a carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, n.424(1-2), p.18–25, 2012.

WANG, J., MA, W., & TU, P. The mechanism of self-assembled mixed micelles in improving curcumin oral absorption: In vitro and in vivo. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v.133, p.108–19, 2015.

CAPÍTULO III

5 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVO PARA APLICAÇÃO VAGINAL

5.1 Resumo

A via vaginal é um desafio para a formulação de formas farmacêuticas para liberação modificada de fármacos. Entre os principais desafios está o tempo de residência da forma farmacêutica no local de aplicação e a área de superfície no contato com a mucosa vaginal. O objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar hidrogéis termorresponsivos para aplicação vaginal, com propriedades compatíveis relativas à temperatura de transição sol-gel ($T_{sol-gel}$), potencial hidrogênionico (pH), viscosidade e propriedades mecânicas. Os hidrogéis foram preparados com Poloxamer 407 (P407) em diferentes concentrações (17, 18, 19 e 20%), e mistura de P407 em diferentes concentrações (17, 18, 19 e 20%), quitosana (Qt) e hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M) em tampão citrato-fosfato pH 4,5 à temperatura de 4°C. A temperatura de $T_{sol-gel}$ foi determinada pela técnica de inversão de tubos. A viscosidade dos hidrogéis foi avaliada em função da temperatura para determinar o ponto de inflexão da transição sol-gel. O pH e as propriedades mecânicas de dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade foram avaliadas e comparadas entre as formulações. As formulações P18, P19, P20, M18 e M20 apresentaram o ponto de inflexão de $T_{sol-gel}$ na faixa de temperatura entre 33-37°C. O pH das formulações de $4,50 \pm 0,03$ foi compatível com o pH vaginal e com a melhor estabilidade da CUR. A mistura do P407 com Qt e HPMC K4M aumentou a viscosidade da formulação, mas não alterou a faixa de temperatura $T_{sol-gel}$. As propriedades mecânicas das formulações P20, M18 e M20 foram compatíveis para aplicação vaginal. A dureza e compressibilidade foram adequadas para permitir que o hidrogel termorresponsivo seja facilmente removido da embalagem e espalhado sobre a mucosa epitelial, enquanto a adesividade sugere boas propriedades mucoadesivas. A análise dos resultados mostra que as formulações P20, M18 e M20 reúnem características adequadas para veiculação de CUR na forma farmacêutica de hidrogel termorresponsivo para administração vaginal. A adição dos polímeros HPMC K4M e Qt permitiram modular a temperaturas de gelificação, aumentar a viscosidade e as propriedades bioadesivas do hidrogel.

5.2 Abstract

The vaginal route is a challenge to formulate pharmaceutical forms for modified release of drugs. The main challenge is the residence time of the dosage form at the local of application and the surface area in contact with the vaginal mucosa. The aim of this study was to develop and evaluate thermoresponsive hydrogels for vaginal application, with consistent properties relative to temperature sol-gel transition ($T_{sol-gel}$) hidogenionic potential (pH), viscosity and mechanical properties. The hydrogel was prepared using Poloxamer 407 (P407), mixture with P407, chitosan (Qt) and hydroxypropylmethylcellulose K4M (HPMC K4M) in buffer citrate-phosphate pH 4.5 in 4°C temperature. The $T_{sol-gel}$ temperature was determined by tube inversion technique. The viscosity of the hydrogels was evaluated as a function of temperature to determine the inflection point of the sol-gel transition. The pH and the mechanical properties of hardness, compressibility, cohesiveness and adhesiveness were evaluated and compared between formulations. The formulations P18, P19, P20, M18 and M20 showed the $T_{sol-gel}$ inflection point in a temperature between 33-37 °C. The pH of the formulations of 4.50 ± 0.03 was consistent with the vaginal pH and a better stability of the CUR. The mixture of the P407 with Qt and K4M HPMC increased the viscosity of the formulation, but it didn't change the $T_{sol-gel}$ temperature range. The mechanical properties of the formulations P20, M18 and M20 were consistent for vaginal application. The hardness and compressibility were suitable to allow the hydrogel thermoresponsive to be easily removed from packaging and spread over the mucosal epithelium while the adhesion suggests good mucoadhesive properties. Addition of polymer as HPMC K4M and chitosan allowed modular gelation temperature, increase viscosity and bioadhesive properties of the hydrogel.

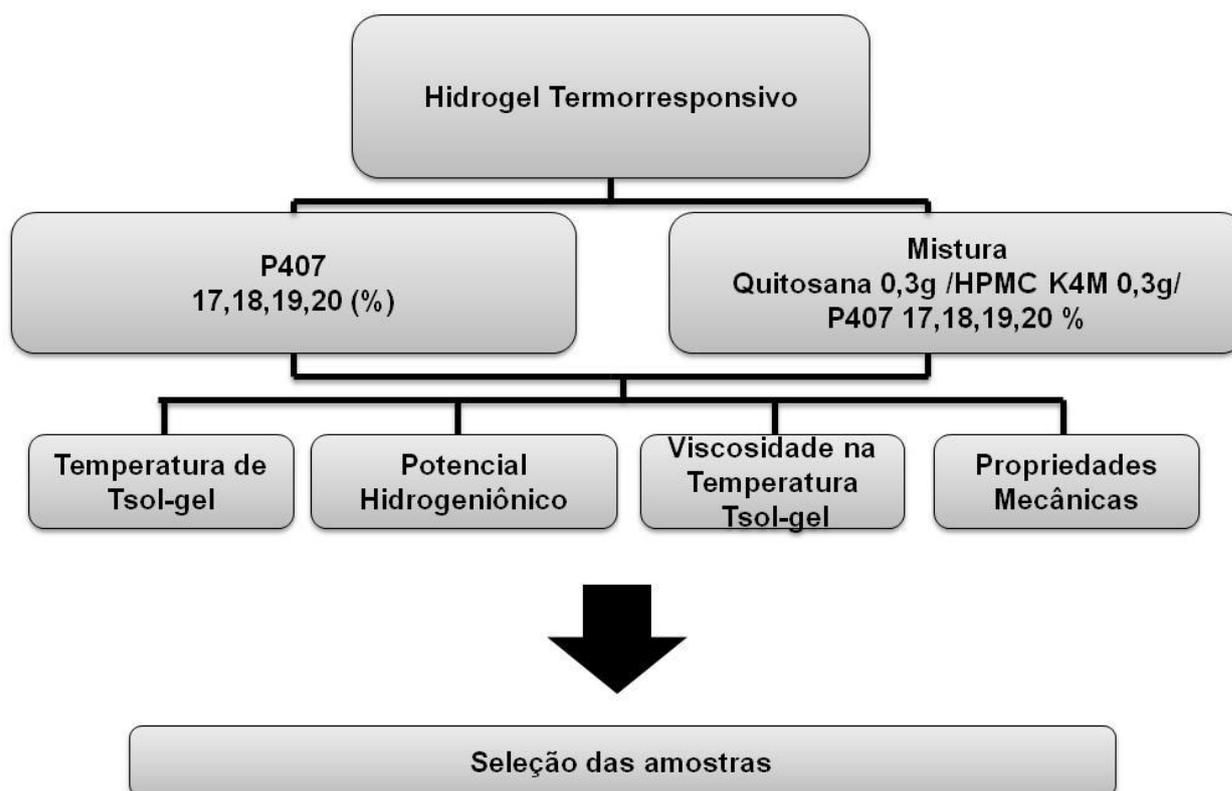
5.3 Objetivo

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar hidrogéis termorresponsivos com requisitos específicos para administração vaginal quanto à temperatura de transição sol-gel ($T_{sol-gel}$), potencial hidrogeniônico, viscosidade e propriedades mecânicas.

5.4 Delineamento experimental

Para o desenvolvimento deste capítulo foram realizadas etapas de preparação e caracterização dos hidrogéis termorresponsivos e das matérias primas (Figura 12). As análises de caracterização foram baseadas na identificação de propriedades físicas e físico-químicas.

Figura 12 - Delineamento experimental para o desenvolvimento e avaliação de hidrogel termorresponsivo



CUR - curcumina, P407 - poloxamer 407, HPMC K4M - hidroxipropilmetilcelulose K4M.

Fonte: Elaboração própria

5.5 Material e Método

Quitosana (Qt) de média massa molar 75-85% desacetilada (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA), Hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA) e Poloxamer 407 (P407) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA). As demais matérias primas utilizadas eram de grau de pureza para uso farmacêutico.

5.5.1 Preparação do hidrogel termorresponsivo

As formulações dos hidrogéis termorresponsivos contendo P407 (P17, P18, P19, P20) e das misturas P407/HPMC K4M/Qt (M17, M18, M19, M20) são apresentadas na Tabela 7. As dispersões de P407 foram preparadas a frio conforme descrito por Schomolka (IRVING, 1972). Resumidamente, as formulações P17 – P20 foram preparadas por dispersão de P407 em solução aquosa tamponada (citrato-fosfato pH 4,5). A massa de P407 correspondente a cada formulação foi dispersa no tampão e mantida a 4°C em banho termostatizado (Brookfield – TC 550, Massachusetts, USA) até que uma solução límpida fosse obtida.

As formulações M17 – M20 foram preparadas pela mistura dos polímeros P407, HPMC K4M e Qt. A solução de P407 foi preparada conforme descrito acima. A dispersão de Qt foi preparada a 10% em ácido acético glacial (1,5%). Para compor a mistura de polímeros, o HPMC K4M foi adicionado à solução de P407 mantida a 4°C, e homogeneizado até completa dispersão. Nesta mistura foi adicionado a Qt previamente dissolvida em ácido acético e resfriada até 4°C. A mistura dos polímeros foi homogeneizada por agitação manual.

Tabela 7 - Formulações dos hidrogéis

Formulações	P407 (g)	HPMC K4M (g)	Qt (g)	Tampão Citrato-Fosfato (pH 4,5) (mL)
P17	17	-	-	100,0
P18	18	-	-	100,0
P19	19	-	-	100,0
P20	20	-	-	100,0
M17	17	0,3	0,3	100,0
M18	18	0,3	0,3	100,0
M19	19	0,3	0,3	100,0
M20	20	0,3	0,3	100,0

Fonte: Elaboração própria

5.5.2 Temperatura de transição sol-gel e gel-sol

As temperaturas de gelificação dos hidrogéis termorresponsivos (P17 – P20/ M17 – M20) foram avaliadas pelo Método Visual por Inversão do Tubo, conforme descrita por Ur-Rehman, et al. (2010). Resumidamente, os tubos de ensaio contendo 1g da amostra foram colocados em banho de água circulante, termostatizado (Brookfield – TC 550, Massachusetts, USA). A temperatura da água no banho foi aumentada, gradativamente de 25 até 40°C, numa escala de 1°C a cada 10 min. A temperatura de transição sol-gel foi registrada no ponto em que o hidrogel termorresponsivo parou de fluir por movimento de inclinação do tubo (90°). Para avaliar a temperatura de transição gel-sol (fusão) uma rampa de resfriamento dos hidrogéis termorresponsivos foi estabelecida numa escala de -1°C a cada 10 min. A temperatura de transição gel-sol foi registrada no ponto em que o hidrogel termorresponsivo voltou a fluir por movimento de inclinação do tubo. As medidas das temperaturas de transição foram realizadas em triplicata.

5.5.3 Potencial hidrogeniônico

O pH das formulações P17 – P20/ M17 – M20 foi medido na temperatura de 25°C usando peagômetro (Tecnal, TEC-5, Piracicaba, BR). Para medida do pH uma amostra de 1g de cada hidrogel termorresponsivo foi dispersa em 9 mL de água purificada previamente neutralizada. As medidas foram realizadas em triplicata.

5.5.4 Viscosidade na temperatura T_{sol-gel}

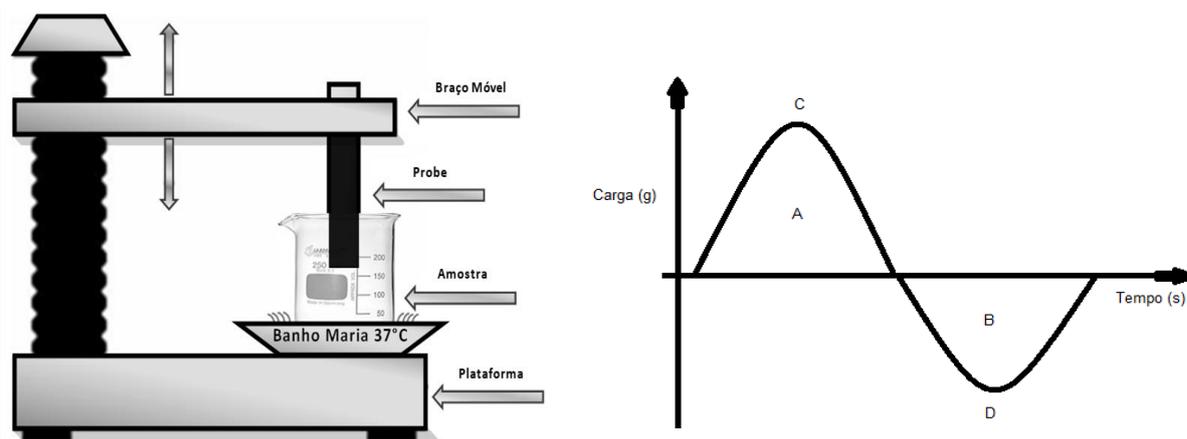
O comportamento de fluxo dos hidrogéis termorresponsivos P17 – P20/ M17 – M20 foram determinadas usando viscosímetro rotativo digital (Brookfield – DVI Prime, Massachusetts, USA). O *spindle* foi previamente selecionado, por tentativa e erro, até que a medida do erro relativo (% torque) fosse maior do que 10% e menor que 100%. Quando o percentual de torque era superior a 100% o tamanho do *spindle* foi reduzido sucessivamente até que o percentual de torque ficasse entre 10 e 100%. Inversamente, se leitura era inferior a 10% o tamanho do *spindle* foi aumentado sucessivamente até que o percentual de torque ficasse entre 10 e 100%. Para avaliar a transição de fase sol-gel a temperatura da água no banho (Brookfield – TC 550, Massachusetts, USA) foi aumentada, gradativamente, de 25 até 40°C,

numa escala de 1°C a cada 10 min. O registro dos resultados para viscosidade (cP) foi realizado usando software *Wingather 3.0*.

5.5.5 Propriedade mecânica

As propriedades mecânicas (dureza, compressão, adesividade e coesividade) foram analisadas por relação carga (g) x tempo (s). Uma representação esquemática do analisador de textura e de uma curva típica resistência mecânica é apresentada na Figura 13. As formulações P17 – P20/ M17 – M20 foram determinadas usando probe controlado por software, TAXTPlus Analisador de Textura (Stable Micro Systems, UK). Antes das análises o texturômetro foi calibrado com uma célula de carga com massa de 5 kg. Uma amostra de cada formulação foi transferida para um béquer de vidro e mantida em banho de água com temperatura ajustada para 37 ° C. Uma sonda analítica com 10 mm de diâmetro foi comprimida sobre a superfície das amostras, com uma força de 0,049 N. O procedimento para cada amostra foi repetido por 3 vezes com intervalo de (15s) entre uma compressão e outra. A velocidade do teste foi definida para uma taxa de 1 mm.s⁻¹, modo *strain* de 10%. A profundidade de penetração da sonda foi definida para 15 mm.

Figura 13 - Representação esquemática do analisador de textura, TAXTPlus, e de uma curva típica de análise do perfil (A) compressibilidade, (B) adesividade, (C) dureza e (D) coesividade.



Fonte: Elaboração própria

5.6 Resultados e Discussão

5.6.1 Temperatura de transição sol-gel e gel-sol

Os resultados do estudo de transição sol-gel (Tsol-gel) são apresentados na Tabela 8. Todas as formulações com exceção de P17, M17 e M19 apresentaram características promissoras para administração vaginal. As formulações P17 e M17 apresentaram Tsol-gel superior a 40°C, e a formulação M19 apresentou Tsol-gel próxima a 39°C, o que inviabiliza a sua utilização para administração vaginal cuja temperatura fisiológica é em torno de 37°C.

Os resultados do estudo de transição gel-sol (Tgel-sol) são apresentados na Tabela 9. As Tgel-sol de todas as formulações correspondem à Tsol-gel. Esses resultados mostram o comportamento tixotrópico das formulações hidrogelatinosas. Essa propriedade associada à adesividade do hidrogel (Figura 15) garante a imediata fixação da formulação sobre a mucosa vaginal.

Moléculas de P407 apresentam reticulação em meio aquoso, o que transforma as dispersões de P407 em gel, cuja viscosidade aumenta com o aumento da temperatura (BALOGLU et al., 2011). A temperatura de transição sol-gel (Tsol-gel) é aquela onde ocorre a transição do estado líquido para gel. A faixa adequada para a temperatura de gelificação das formulações para administração vaginal é entre 30-37°C. A temperatura de transição sol-gel do P407 é influenciada pela concentração desse polímero em meio aquoso (BALOGLU et al., 2011). Quando a temperatura de Tsol-gel é elevada, a formulação permanece no estado líquido na temperatura fisiológica. Neste caso a administração por via vaginal se torna inadequada. Para Tsol-gel abaixo de 30°C a viscosidade aumentada dificulta a manipulação e aplicação da formulação (Tabela 8 e Figura 14).

Tabela 8 - Temperatura de gelificação das formulações (sol-gel)

Formulação	T1 (°C)	T2(°C)	T3(°C)	Média ± DP
P17	>40	>40	>40	-
P18	34	34,3	34,5	34,3 ± 0,251
P19	30	30,6	30,2	30,3 ± 0,305
P20	28,5	28,9	28,7	28,7 ± 0,2
M17	>40	>40	>40	-
M18	35	35,2	35	35,1± 0,115
M19	38,9	39,2	39	39,0 ± 0,153
M20	33	32,8	33,1	32,9 ± 0,153

Fonte: Elaboração Própria

Tabela 9 - Temperatura de fusão das formulações (gel-sol)

Formulação	T1 (°C)	T2(°C)	T3(°C)	Média ± DP
P17	>40	>40	>40	-
P18	33,9	34,1	34,5	34,16±0,3
P19	30,2	30,1	30,1	30,13± 0,05
P20	28,3	28,5	28,5	28,43± 0,11
M17	>40	>40	>40	-
M18	35,1	35,5	35	35,2 ± 0,264
M19	38,1	38,9	39,2	38,73± 0,56
M20	33,4	32,3	32,7	32,8± 0,55

Fonte: Elaboração Própria

5.6.2 Potencial hidrogeniônico

A análise dos resultados apresentados na Tabela 10 mostram que o pH das formulações não é alterado pela concentração do P407 (P17 - P20) nem pela inclusão da Qt (0,3%) e HPMC K4M (0,3%), formulações M17 - M20. O pH próximo a 4,5 é compatível com o pH vaginal e com a melhor estabilidade da CUR (Kurita & Makino, 2013; Seo S. et al, 2012), além disso, garante a solubilidade da Qt (pKa 6,5) nas formulações e a protonação do grupo amino. O grupo amino protonado é importante para melhorar a adesividade (Figura 15) e a mucoadesão por ligação eletrostática com o grupo carboxílico do ácido siálico, presente no muco.

Tabela 10 - Potencial hidrogeniônico das formulações P17-P20/M17-M20

Formulação	pH
P17	4,52 ± 0,02
P18	4,53 ± 0,00
P19	4,51 ± 0,00
P20	4,49 ± 0,02
M17	4,51 ± 0,01
M18	4,54 ± 0,01
M19	4,52 ± 0,03
M20	4,54 ± 0,03

Fonte: Elaboração Própria

5.6.3 Viscosidade na temperatura T_{sol-gel}

As propriedades termorresponsivas dos hidrogéis foram avaliadas pela temperatura de T_{sol-gel}. As curvas obtidas com as diferentes formulações são apresentadas na Figura 14 (Painel A e B) e as medidas da viscosidade são características para formulações contendo P407 (KWEON et al., 2002).

A análise dos resultados apresentados na Figura 14 mostra que a viscosidade dos hidrogéis é baixa, na fase sol, na temperatura menor que 31°C (viscosidade < 122.740 cP para P20 e maior que 840.000 cP para M20). Os resultados obtidos para avaliação da viscosidade das formulações confirmam os resultados do estudo de T_{sol-gel} (Tabela 8).

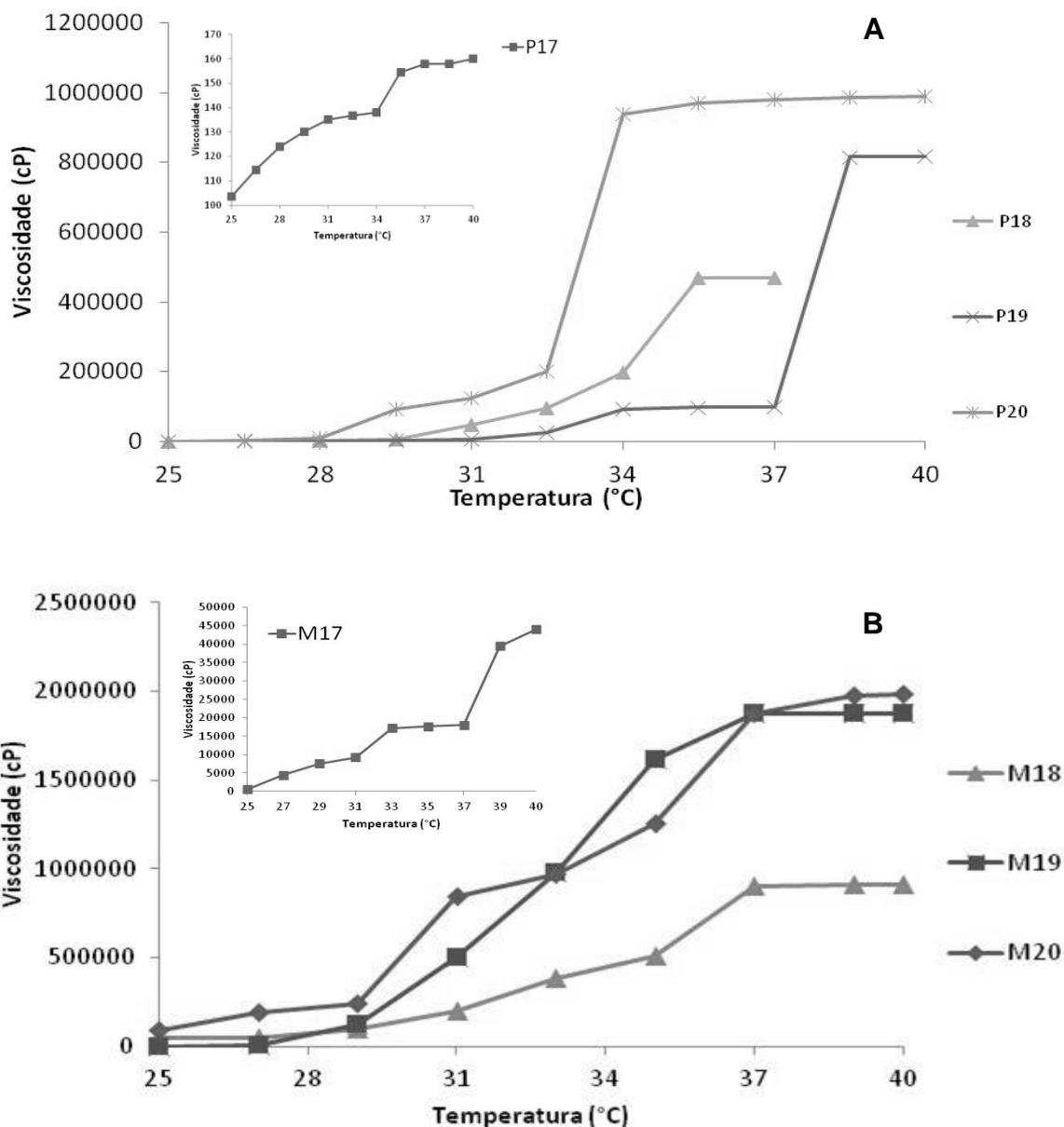
Na Figura 14, painel A, a análise dos resultados mostra a baixa viscosidade da formulação P17 (*insert*), nesta concentração não há uma temperatura de T_{sol-gel} definida. Para as formulações P18 – P20, o *lag time* para alcançar o estado de transição gel varia de acordo com a concentração do polímero. Para a formulação P18 o ponto de inflexão para T_{sol-gel} inicia em 29°C e se estende até 35°C para completa gelificação do hidrogel em 37°C. Para a formulação P19 o ponto de inflexão inicia em 32°C e se estende até 38°C onde ocorre à completa gelificação desta formulação. Para a formulação P20 o ponto de inflexão para T_{sol-gel} inicia em 25°C e se estende até 32°C, gelificando completamente entre 32 e 35°C.

Na Figura 14, painel B, a análise dos resultados mostra a baixa viscosidade da formulação M17 (*insert*). Nesta concentração a temperatura T_{sol-gel} se estende entre 25 e 37°C, no entanto a viscosidade é baixa para aplicação vaginal.

Para as formulações M18 – M20, o *lag time* para alcançar o estado de transição gel varia de acordo com a concentração do P407. Para a formulação M18 o ponto de inflexão para T_{sol-gel} inicia em 29°C e se estende até 35°C para completa gelificação do hidrogel termorresponsivo em 37°C. Para a formulação M19 o ponto de inflexão inicia em 27°C e se estende até 35°C onde ocorre à completa gelificação desta formulação. Para a formulação M20 o ponto de inflexão para T_{sol-gel} inicia em 25°C e se estende até 29°C, gelificando completamente entre 29 e 37°C. As formulações M18 e M20 foram selecionadas para posterior incorporação da CUR devido às viscosidades nas temperaturas de transição.

A adição de Qt (0,3%) e HPMC K4M (0,3%) aumentou a viscosidade do hidrogel termorresponsivo e alterou a T_{sol-gel} e o perfil da curva (viscosidade x temperatura) para M19 e M20. Na mistura de polímeros a mudança do estado físico do hidrogel termorresponsivo ocorreu de forma gradativa, ao contrário da mudança abrupta observada nas formulações P19 e P20. Essa mudança mais lenta na T_{sol-gel} favorece o espalhamento do hidrogel termorresponsivo na superfície da mucosa vaginal e permite o melhor espalhamento do hidrogel termorresponsivo e o recobrimento de uma maior área de superfície.

Figura 14 - Viscosidade na temperatura T_{sol-gel} das amostras de (A) P17 (*insert*), P18- P20 e M17 (*insert*), M18-M20.



Fonte: Elaboração Própria

5.6.4 Propriedades mecânicas

A Figura 15 mostra a relação entre a resistência mecânica do hidrogel termorresponsivo em função do tempo, para as formulações P20 e M18 – M20. As demais formulações (P17 - P19 e M17) não apresentaram viscosidade suficiente para avaliação das propriedades mecânicas usando o texturômetro TAXTPlus. Neste estudo as propriedades mecânicas avaliadas foram dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade. Na Tabela 11 são apresentados os valores nominais para cada propriedade mecânica. A análise dos resultados mostra

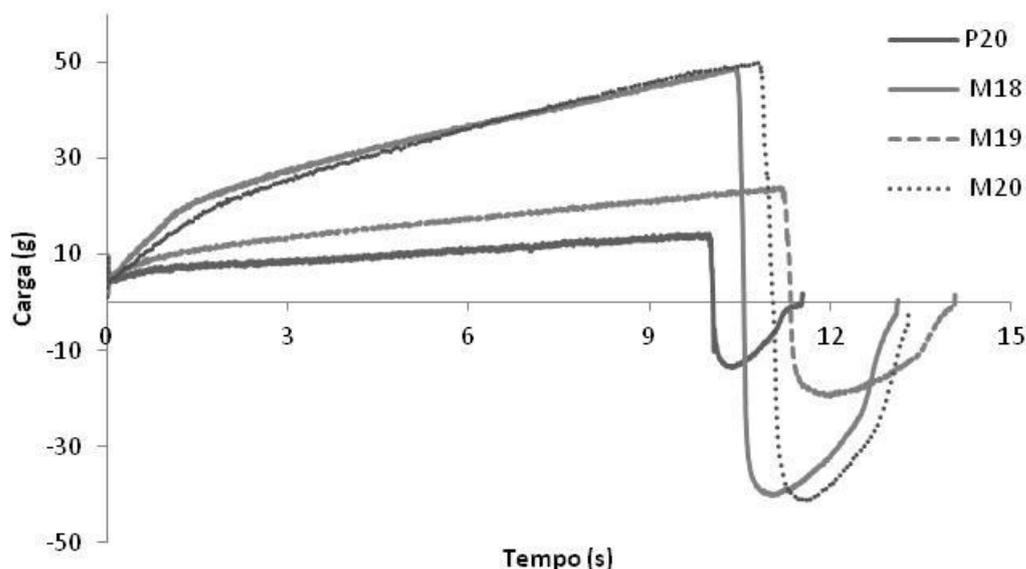
que as formulações contendo Qt e HPMC K4M apresentam resistência mecânica maior quando comparada com P20. Embora a viscosidade da formulação M18 seja menor que a viscosidade da formulação M19, a resistência mecânica das formulações M18 e M20 são estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$), e maiores que a resistência mecânica da formulação M19 ($p < 0,05$). Esta relação entre a viscosidade e a resistência mecânica sugere que a relação entre esses dois parâmetros não são diretamente proporcionais.

Os hidrogéis termorresponsivos para aplicação vaginal devem ser compostos por redes poliméricas capazes de resistir a estresses físicos e químicos e ao mesmo tempo, proporcionar um contato íntimo e prolongado com a superfície da mucosa, no local de aplicação. Um dos parâmetros a ser considerado na análise das propriedades mecânicas é o equilíbrio entre o trabalho necessário para vencer as forças de atração, representado pela área negativa (B) na Figura 15 (adesividade) e o efeito da tensão de cisalhamento sobre as propriedades estruturais da formulação, representado pelo pico negativo (D) na Figura 15 (coesividade). A adesividade é uma propriedade relacionada à mucoadesão e definida como o trabalho necessário para destacar o *probe* da amostra enquanto suas forças de coesão são quebradas (BALOGLU et al., 2011).

A força necessária para atingir uma determinada deformação (dureza), representada pelo pico positivo (C) na Figura 15, está relacionada com a facilidade de aplicação do hidrogel termorresponsivo sobre uma determinada superfície. A área positiva (A) representada na Figura 15 está relacionada ao trabalho necessário para deformar o produto (compressibilidade) e deve estar relacionado com a dureza do hidrogel termorresponsivo (BALOGLU et al., 2011; HURLER, 2011; JONES, WOOLFSON, & BROWN, 1997), e com o estresse/trabalho requerido para remover a amostra da embalagem. Esta característica quantifica a deformação da amostra durante compressão (TUĞCU-DEMİRÖZ, ACARTÜRK, & ERDOĞAN, 2013).

As formulações P18, P20, M18 e M20 foram selecionadas para posterior incorporação da CUR devido às viscosidades e propriedades mecânicas apresentadas nas temperaturas de transição.

Figura 15 - Propriedades mecânicas de dureza (C), compressibilidade (A), adesividade (B) e coesividade (D) das formulações P20, M18, M19 e M20 (média de um $n=3$).



Fonte: Elaboração Própria

Tabela 11 - Propriedades mecânicas dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade das formulações P20, M18, M19 e M20 ($M \pm DP$)

Formulação	Dureza (g)	Compressibilidade ($g \cdot s^{-1}$)	Adesividade ($g \cdot s^{-1}$)	Coesividade (g)
P20	$15,0 \pm 1,0^b$	$101,0 \pm 1,0^b$	$12,0 \pm 1,0^b$	$14,0 \pm 1,0^b$
M18	$49,0 \pm 2,0^a$	$349,0 \pm 3,0^a$	$74,0 \pm 4,0^a$	$40,0 \pm 2,0^a$
M19	$24,0 \pm 2,0^c$	$188,0 \pm 2,0^c$	$38,0 \pm 6,0^c$	$20,0 \pm 1,0^c$
M20	$51,0 \pm 5,0^a$	$363,0 \pm 19,0^a$	$70,0 \pm 4,0^a$	$42,0 \pm 5,0^a$

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores ($p > 0,05$) ($n=3$). Os demais resultados são estatisticamente diferentes.

Fonte: Elaboração Própria

5.7 Conclusão

Exceto as formulações P17, M17 e M19 as demais formulações apresentaram o ponto de inflexão de Tsol-gel na faixa de temperatura entre 33 - 37°C.

O pH das formulações não é alterado pela concentração do P407 (P17 - P20) nem pela inclusão da Qt (0,3%) e HPMC K4M (0,3%), formulações M17 - M20. O pH próximo a 4,5 é compatível com o pH vaginal e com a melhor estabilidade da CUR.

A propriedade de transição sol-gel e gel-sol associada à adesividade da formulação melhora a comodidade posológica permitindo a aplicação do produto com estas propriedades em qualquer hora do dia sem necessidade de permanência da usuária na posição decúbito dorsal.

A mistura do P407 com Qt e HPMC K4M aumentou a viscosidade da formulação, porém não alterou a faixa de temperatura T_{sol-gel}. O aumento da viscosidade melhora a adesividade e a retenção da formulação no local de aplicação. A faixa de temperatura de transição facilitou a manipulação e a aplicação do hidrogel termorresponsivo.

Os resultados obtidos na avaliação das propriedades mecânicas das formulações P18, P20, M18 e M20, sugerem que as formulações dos hidrogéis termorresponsivos são adequadas para aplicação vaginal. A dureza e compressibilidade estão relacionadas com a facilidade de remoção do hidrogel da embalagem e com o espalhamento do hidrogel sobre a mucosa epitelial. Os resultados para as formulações M18 e M20 são melhores que aqueles obtidos para a formulação P20 e M19. Com base nos resultados de T_{sol-gel} e propriedades mecânicas as formulações P18, P20, M18 e M20 foram selecionadas para a veiculação da curcumina. A adição dos polímeros HPMC K4M e Qt permitiram modular a temperaturas de gelificação, aumentar a viscosidade e as propriedades bioadesivas do hidrogel.

5.8 Referência Bibliográfica

BALOGLU, E. et al. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 6, p. 627–636, 2011.

HURLER, J. Improved Texture Analysis for Hydrogel Characterization : Gel Cohesiveness , Adhesiveness , and Hardness. **Journal of Applied Polymer Science**, 2011.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural , viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, p. 223–233, 1997.

KURITA, T., & MAKINO, Y. Novel Curcumin Oral Delivery Systems. **Anticancer Research**, p.2807–2821, 2013.

KWEON, H. et al. Preparation of a Novel Poloxamer Hydrogel, 2002.

SEO, S.W. et al. Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol® HS15 as a carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, n.424(1-2), p.18–25, 2012.

TUĞCU-DEMİRÖZ, F.; ACARTÜRK, F.; ERDOĞAN, D. Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: Formulation, in vitro and in vivo evaluations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 1, p. 25–39, 2013.

UR-REHMAN, T., TAVELIN, S., GRUBNER, G. Effect of DMSO on micellization, gelation and drug release profile of P407. **Internacional Journal of Pharmaceutical**. 394, 92–98. 2010.

CAPÍTULO IV

6 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO–QUÍMICAS DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVOS CONTENDO CURCUMINA

6.1 Resumo

A curcumina (*Curcuma longa*) é um composto fitoquímico com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobiana e antifúngicas. A curcumina (CUR) é um diferuloilmetano, com vários grupos fenólicos e duplas ligações conjugadas. A CUR é praticamente insolúvel em água e quimicamente instável. Desta forma, a estabilidade física e química da CUR deve ser garantida pela robustez das formulações farmacêuticas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da curcumina nas propriedades físico–químicas de hidrogéis termorresponsivos. Os hidrogéis foram preparados com Poloxamer 407 (P407), e mistura de P407, quitosana (Qt) e hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M) em tampão citrato-fosfato pH 4,5. A CUR foi veiculada nos hidrogéis na concentração de 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em dispersões sólidas, mistura física e CUR livre. As propriedades físico-químicas foram avaliadas e comparadas para potencial hidrogeniônico (pH), viscosidade na temperatura de transição sol-gel, taxa de erosão, propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade, adesividade, coesividade e mucoadesão), comportamento reológico, perfil de liberação da CUR, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), temperatura crítica de micelização, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. Os melhores resultados foram obtidos para os hidrogéis (formulação M20) formulados com a dispersão sólida (DS-CUR) obtida por coprecipitação com P407 (1:2 m/m). Os resultados para pH, viscosidade e taxa de erosão foram respectivamente 4,05 \pm 0,01, 8100 cP, 51,3%. Os resultados para as propriedades mecânicas de dureza, compressibilidade, adesividade, coesividade e mucoadesão (força máxima para separação) foram respectivamente 24,1 \pm 0,45 g, 286,21 \pm 10,64 $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$, 30, \pm 1,22 $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$, 20,81 \pm 1,65 g e 8,53 \pm 0,41 g. O comportamento reológico das formulações (P20 CUR, P20 MF, P20 DS, M20 DS) apresentaram perfil pseudoplástico e característica tixotrópica. O perfil de dissolução da CUR na formulação M20 DS mostrou liberação controlada (52%), enquanto a M20 liberou praticamente toda CUR da formulação (94,17%) ao final de 180 min. A análise dos resultados permite concluir que a DS-CUR na concentração de 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ não influencia significativamente ($p < 0,05$) nas propriedades físicas e físico-químicas, com exceção da taxa de erosão. As

curvas de DSC mostraram que houve a permanência da CUR no estado amorfo quando incorporado ao hidrogel termorresponsivo na forma de DS. Os espectros obtidos por FTIR mostraram que os estiramentos dos grupamentos químicos da CUR permaneceram quimicamente estáveis nos hidrogéis termorresponsivos. A temperatura crítica de micelização permitiu avaliar a influência da CUR na temperatura de micelização e temperatura de gelificação, onde o deslocamento da faixa de temperatura está relacionado à viscosidade da formulação. A atividade antioxidante da CUR nas formulações de hidrogel termorresponsivo M20 DS, P20 DS e P20 CUR, foi acima de 80%. A CUR em solução aquosa apresentou resultado de concentração inibitória mínima de $0,1\text{g.mL}^{-1}$ (dados não demonstrados), porém, quando em solução polimérica P20 ou M20 a CUR apresentou atividade antimicrobiana na faixa de concentração entre $222 - 379\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. A formulação de hidrogel termorresponsivo contido de P407/Qt /HPMC K4M e DS-CUR é potencialmente adequado para a liberação controlada de CUR intravaginal.

6.2 Abstract

Curcumin (*Curcuma longa*) is a phytochemical compound with anti-inflammatory and antioxidant properties. Curcumin (CUR) is a diferuloylmethane with several phenolic groups and conjugated double bonds. The CUR is practically insoluble in water and chemically unstable. Thus, the physical and chemical stability CUR must be guaranteed by the strength of the pharmaceutical formulations. The aim of this study was to evaluate the influence of curcumin on the physicochemical properties of hydrogels thermoresponsive. Hydrogels were prepared using Poloxamer 407 (P407), mixture with P407, chitosan (Qt) and hydroxypropylmethylcellulose K4M (HPMC K4M) in buffer citrate-phosphate pH 4.5. The CUR was introduced in hydrogels at a concentration of 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in solid dispersions, physical mixture and free CUR. The physico-chemical properties were assessed and compared to hydrogenic potential (pH), viscosity at the temperature of sol-gel transition, erosion rate, mechanical properties (hardness, compressibility, adhesiveness, cohesiveness and mucoadhesion), rheological properties and release profile of CUR, differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (FTIR), critical temperature of micellization, antioxidant activity and antimicrobial activity. The best results were obtained for hydrogels (M20 formulation), formulated with the solid dispersion (SD-CUR) obtained by subsequent precipitation with SD-P407 (1: 2 m / m). The results for pH, viscosity and erosion rate were respectively 4.05 ± 0.01 , 8100 cP, 51.3%. The results for the mechanical properties of hardness, compressibility, adhesiveness, cohesiveness and mucoadhesion (maximum force for separation) were, respectively, $24,1 \pm 0,45$ g, $286,21 \pm 10,64$ $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$, $30, \pm 1,22$ $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$, $20,81 \pm 1,65$ g e $8,53 \pm 0,41$ g. The rheological behavior of formulation (P20 CUR, P20 MF, P20 DS, M20 DS) showed pseudoplastic profile and thixotropic characteristics. The dissolution profile of the CUR in M20 DS showed controlled release formulation (52%), while M20 has released substantially all of curcumin formulation (94.17%) at 180 min. Analysis of the results shows that the SD-CUR at a concentration of 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ doesn't influence significantly ($p < 0.05$) in physical and physicochemical properties except the erosion rate. DSC curves showed to had permanence of CUR in the amorphous state when incorporated into the hydrogel thermoresponsive as DS. The spectra obtained by FTIR showed that stretches of chemical CUR groups

remained chemically stable in thermoresponsive hydrogels. The critical micellization temperature allowed evaluating the influence of the CUR in micellization temperature and gelling temperature, where the temperature shift range is related to the viscosity of the formulation. The antioxidant activity of CUR in hydrogel formulations thermoresponsive M20 SD, P20 SD and P20 CUR, was above 80%. CUR in aqueous solution presents the results of minimum inhibitory concentration $0,1\text{g.mL}^{-1}$ (data not showed), whereas in the polymer P20 and M20 to CUR solution presented antimicrobial activity in the concentration range between $222\text{-}379\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. The thermoresponsive hydrogel formulation has been contained of the P407/ Qt / HPMC K4M and SD-CUR is potentially suitable for the controlled release of intravaginal of the CUR.

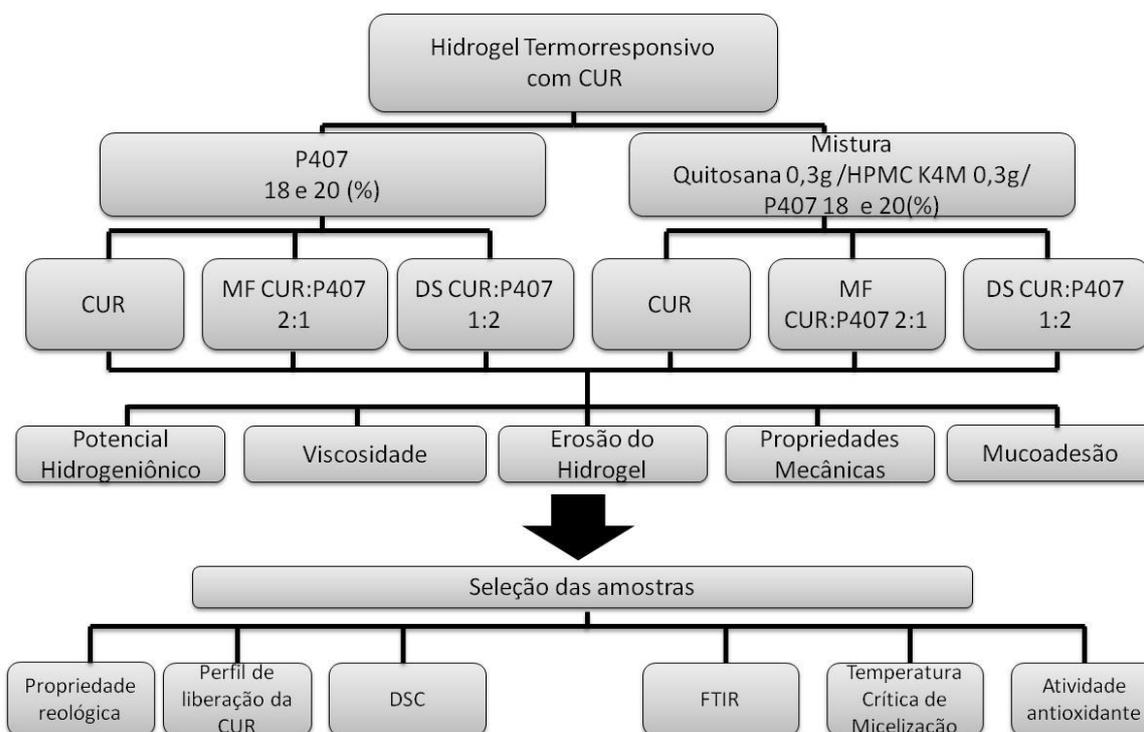
6.3 Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da curcumina nas propriedades físico-químicas de hidrogéis termorresponsivos.

6.4 Delineamento experimental

Para o desenvolvimento deste capítulo foram realizadas etapas de incorporação da curcumina e dispersões sólidas selecionadas nos hidrogéis termorresponsivos, avaliação e caracterização físicas e físico-químicas das formulações (Figura 16).

Figura 16 - Delineamento experimental para avaliação de hidrogéis termorresponsivo contendo curcumina



CUR - curcumina, P407 - poloxamer 407, HPMC K4M - hidroxipropilmetilcelulose K4M, MF - mistura física, DS - dispersão sólida, DSC – calorimetria exploratória diferencial, FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

Fonte: Elaboração Própria

6.5 Material e Método

Curcumina (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA), Hidroxipropilmetilcelulose K4M (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA), Quitosana (Qt) de média massa molar 75-85% desacetilada (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA) e Poloxamer 407 (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA). A dispersão sólida CUR: P407 1:2 e a mistura física CUR:P407 2:1, foram obtidas conforme descrito no Capítulo II. As demais matérias primas utilizadas eram de grau de pureza para uso farmacêutico.

6.5.1 Preparação do hidrogel termorresponsivo

As formulações dos hidrogéis termorresponsivos (Tabela 12) contendo poloxamer 407 (P407), hidroxipropilmetilcelulose K4M (HPMC K4M), quitosana (Qt), curcumina livre (CUR), mistura física CUR: P407 2:1 (MF) e dispersão sólida CUR: P4071:2 (DS) foram preparadas a frio conforme descrito por Schomolka (IRVING, 1972). Resumidamente, as formulações P18 e P20 foram preparadas por dispersão de P407 em solução aquosa tamponada (citrato-fosfato pH 4,5). A massa de P407 correspondente a cada formulação foi dispersa no tampão (citrato-fosfato pH 4,5) e mantida a 4°C em banho termostatizado (Brookfield – TC 550, Massachusetts, USA) até que uma solução límpida fosse obtida. As DS, MF e CUR foram dispersas nos hidrogéis com massa equivalente a 400 µg. mL⁻¹ de CUR.

As formulações M18 e M20 (Tabela 11) foram preparadas pela mistura dos polímeros P407, HPMC K4M e Qt. A solução de P407 foi preparada conforme descrito acima. A dispersão de Qt foi preparada a 10% em ácido acético glacial (1,5%). Para compor a mistura de polímeros, o HPMC K4M foi adicionado à solução de P407 na temperatura de 4°C e homogeneizado manualmente até completa dispersão. Nesta mistura foi adicionada a Qt previamente dissolvida em ácido acético e resfriada até 4°C. A dispersão foi homogeneizada por agitação manual. As DS, MF e CUR foram dispersas no hidrogel termorresponsivo por agitação. A concentração de CUR (400 µg.mL⁻¹) em cada formulação foi, inicialmente, estabelecida com base na concentração inibitória mínima (BASNIWAL, 2011).

Tabela 12 - Formulação dos hidrogéis contendo curcumina

Formulação	P407 (g)	HPMC K4M (g)	Qt (g)	Tampão Citrato-Fosfato (mL)	CUR (mg)	MF CUR:P407 2:1 (mg)	DS CUR:P407 1:2 (mg)
P18	18,0	-	-	100,0	-	-	-
P20	20,0	-	-	100,0	-	-	-
M18	18,0	0,3	0,3	100,0	-	-	-
M20	20,0	0,3	0,3	100,0	-	-	-
P18 CUR	18,0	-	-	100,0	0,4	-	-
P18 MF	18,0	-	-	100,0	-	0,6*	-
P18 DS	18,0	-	-	100,0	-	-	1,2*
P20 CUR	20,0	-	-	100,0	0,4	-	-
P20 MF	20,0	-	-	100,0	-	0,6*	-
P20 DS	20,0	-	-	100,0	-	-	1,2*
M18 CUR	18,0	0,3	0,3	100,0	0,4	-	-
M18 MF	18,0	0,3	0,3	100,0	-	0,6*	-
M18 DS	18,0	0,3	0,3	100,0	-	-	1,2*
M20 CUR	20,0	0,3	0,3	100,0	0,4	-	-
M20 MF	20,0	0,3	0,3	100,0	-	0,6*	-
M20 CUR	20,0	0,3	0,3	100,0	-	-	1,2

* Equivalente a 0,4mg de CUR

Fonte: Elaboração Própria

6.5.2 Potencial hidrogeniônico

O pH das formulações P18 e P20/ M18 e M20 contendo ou não DS, MF e CUR foi medido na temperatura de 25°C usando peagômetro (Tecnal, TEC-5, Piracicaba, BR). Para medida do pH, uma amostra de 1g de cada hidrogel termorresponsivo foi dispersa em 9 mL de água purificada previamente neutralizada. As medidas foram realizadas em triplicata.

6.5.3 Viscosidade dos hidrogéis

A viscosidade dos hidrogéis termorresponsivos P18 e P20/ M18 e M20 contendo ou não DS, MF e CUR foram determinadas usando viscosímetro rotativo digital (Brookfield – DVI Prime, Massachusetts, USA). O *spindle* foi previamente selecionado, por tentativa e erro, até que a medida do erro relativo (% torque) fosse maior do que 10% e menor que 100%. Quando o percentual de torque era superior a 100% o tamanho do *spindle* foi reduzido sucessivamente até que o percentual de torque ficasse entre 10 e 100%. Inversamente, se leitura era inferior a 10% o tamanho do *spindle* era aumentado sucessivamente até que o percentual de torque ficasse entre 10 e 100%. A medida da viscosidade foi realizada nas temperaturas de 25, 30 e 37°C. As temperaturas foram mantidas constantes durante as medidas de viscosidade usando banho de água termostatizado (Brookfield – TC 550, Massachusetts, USA).

6.5.4 Erosão do hidrogel termorresponsivo

O perfil de erosão do hidrogel termorresponsivo foi determinado por método gravimétrico, conforme descrito por Ur-Rehman et al. (2010). Resumidamente, uma amostra de 1,0 g de cada formulação P18, P20, M18 e M20 com e sem adição de DS, MF ou CUR foi transferida para um tubo de ensaio e aquecida até 37°C. Um volume de 0,3 mL de água previamente aquecida, a 37°C, foi adicionado ao tubo de ensaio (diâmetro de 16mm) contendo a amostra do hidrogel termorresponsivo. A cada intervalo de tempo de 10 min a camada de água sobre o hidrogel termorresponsivo era removida por aspiração. A massa de hidrogel termorresponsivo que permanecia no tubo ensaio era pesada e um novo volume de água (0,3 mL) era adicionado sobre a amostra do hidrogel termorresponsivo. Este procedimento foi repetido durante 90 min. A porcentagem de hidrogel termorresponsivo que não sofreu erosão em função do tempo (MH_t) foi calculada usando a Equação 2.

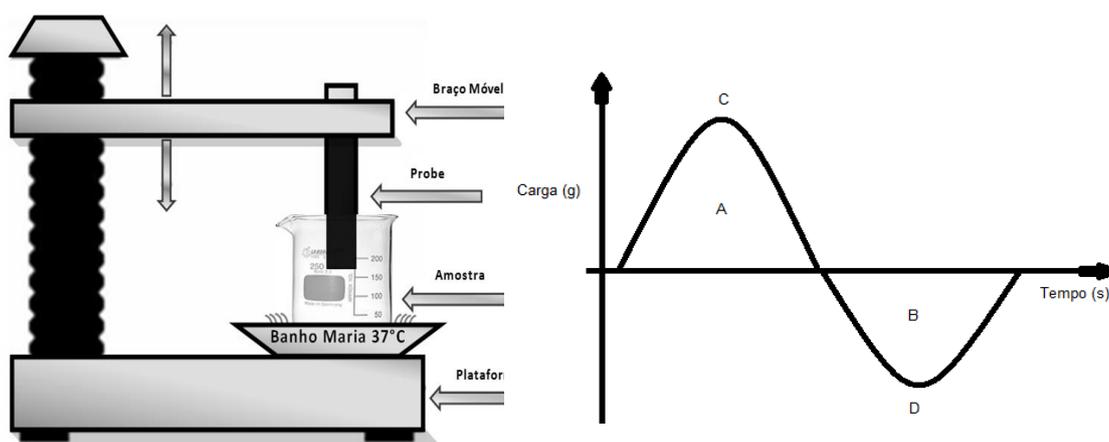
$$\text{MHt}(\%) = \frac{M_f \times 100}{M_i} \quad \text{Equação 2}$$

Onde M_i é a massa de hidrogel termorresponsivo no tempo zero, M_f a massa de hidrogel termorresponsivo no tempo 90 min.

6.5.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas (dureza, compressão, adesividade, coesividade, elasticidade) foram analisadas por relação carga (g) x tempo (s). Uma representação esquemática do analisador de textura e de uma curva típica resistência mecânica é apresentada na Figura 17. As formulações P18 e P20/ M18 e M20 contendo ou não DS, MF e CUR foram determinadas usando *probe* controlado por software, TAXTPlus Analisador de Textura (Stable Micro Systems, UK). Antes das análises o texturômetro foi calibrado com uma célula de carga com massa de 5 kg. Uma amostra de cada formulação foi transferida para um béquer de vidro e mantida em banho de água com temperatura ajustada para 37 ° C. Uma sonda analítica com 10 mm de diâmetro foi comprimida sobre a superfície das amostras, com uma força de 0,049 N. O procedimento para cada amostra foi repetido por 3 vezes com intervalo de (15s) entre uma compressão e outra. A velocidade do teste foi definida para uma taxa de 1 mm.s⁻¹, modo *strain* de 10%. A profundidade de penetração da sonda foi definida para 15 mm.

Figura 17 - Representação esquemática do analisador de textura, TAXTPlus, e de uma curva típica de análise do perfil (A) compressibilidade, (B) adesividade, (C) dureza e (D) coesividade.



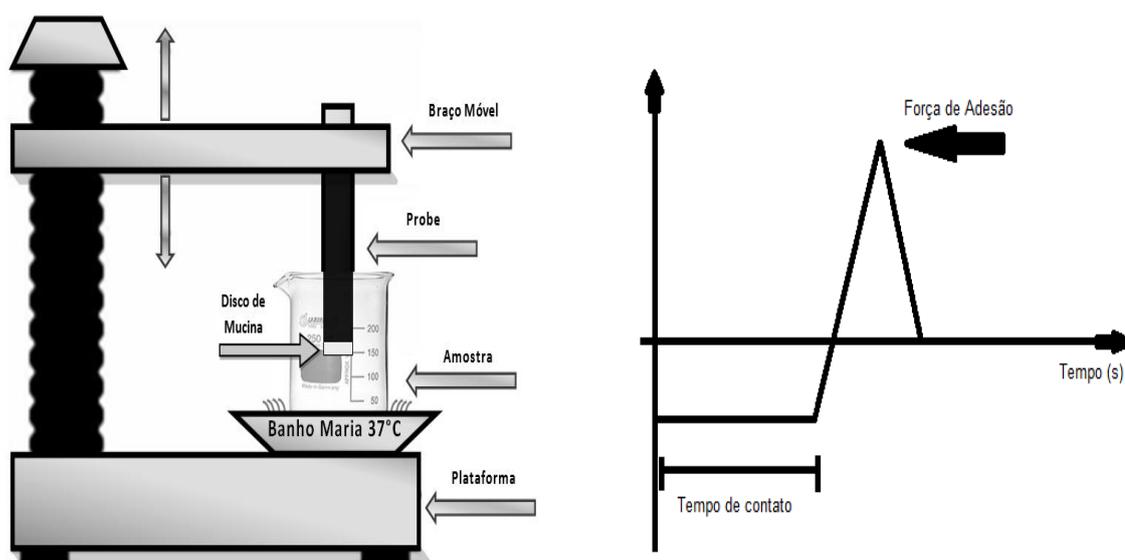
Fonte: Elaboração própria

6.5.6 Propriedades mucoadesivas

As propriedades mucoadesivas das formulações P18, P20, M18 e M20 contendo DS, MF e CUR foram avaliadas sobre a superfície de discos de mucina utilizando TAXTPlus Analisador de Textura (Stable Micro Systems, UK). Uma representação esquemática do analisador de textura e de uma curva típica de

mucoadesão é apresentada na Figura 18. Os discos de mucina foram preparados por compressão (Lemaq, Máquina compressora rotativa, Mini Express LM-D8, Diadema, BR), utilizando punções planos, matriz cilíndrica com diâmetro de 8 mm e carga de compressão de 8 toneladas, da mucina (110 mg) com diâmetro de 8mm e espessura de 0,2 mm. Antes do teste de mucoadesão, o disco de mucina foi hidratado por submersão em água purificada durante 0,5 min. O excesso de água na superfície do disco foi removido com o auxílio de papel absorvente. Os discos de mucina foram fixados com fita adesiva de dupla face na extremidade inferior da sonda analítica. Uma amostra de cada formulação foi transferida para um béquer de vidro e mantida em banho de água com temperatura ajustada para 37 ° C. O disco de mucina fixado na sonda foi comprimido, sobre a superfície das amostras, com uma força de 0,1 N, direcionada no sentido apical → basal. O tempo de contato do disco com a superfície das amostras foi padronizado em 300 s, estipulado para que ocorresse um contato íntimo entre o disco de mucina e a amostra. A sonda foi removida da superfície do filme com uma velocidade constante de 1,0 mm.s⁻¹. A força necessária para destacar o disco de mucina da superfície de cada formulação foi determinada a partir de uma relação tempo x força. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

Figura 18 - Representação esquemática teste *in vitro* de mucoadesão (a) e de uma curva típica (força x tempo) da força de trabalho necessário para destacar o disco de mucina da superfície da formulação (b)



Fonte: Elaboração própria

Com base nos resultados de pH, viscosidade, erosão, propriedades mecânicas e mucoadesão, as formulações P20 CUR, P20 MF, P20 DS, M20 CUR, M20 MF e M20 DS foram selecionadas para avaliação do comportamento reológico.

6.5.7 Comportamento Reológico

O *spindle* previamente selecionado no estudo de viscosidade foi utilizado para avaliação do comportamento reológico. As medidas de viscosidade para estudo do comportamento reológico foram realizadas com o aumento gradativo da velocidade de rotação de 20 para 100 rpm, e redução gradativa da velocidade de rotação de 100 para 20 rpm. O intervalo de leitura entre cada velocidade de rotação foi de 5 min. Durante todo o estudo a temperatura foi mantida em 37 °C, com auxílio de banho-maria (Brookfield – TC 550, Massachusetts, USA). O registro dos resultados para viscosidade (cP), taxa de cisalhamento (1/sec) e tensão de cisalhamento (D/cm²) foi realizado pelo software *Wingather* 3.0.

6.5.8 Perfil de liberação da CUR

O estudo do perfil de liberação da CUR foi realizado com as formulações P20 CUR, P20 DS, M20 CUR e M20 DS. Para a avaliação do perfil de liberação, 2 mL do hidrogel termorresponsivo cuidadosamente medido com pipeta semi-automática foi depositado em placas para cultura de células com fundo chato, com dimensão de 35 mm de diâmetro e 17,5 mm de profundidade. Em cada poço da placa contendo a amostra foi adicionado 5,0 mL de água purificada. O sistema foi mantido em agitador orbital (Tecnal, TE-4200, Piracicaba, BR), na temperatura de 37°C e 50 rpm. As condições *sink* foram estabelecidas com base no estudo de equilíbrio de solubilidade (Capítulo II) e mantidas durante o experimento. Uma alíquota de 1 mL, do sobrenadante, foi retirada nos intervalos de tempo de 5, 10, 15, 20, 40, 60, 90, 120, 150 e 180 min. O volume do meio foi mantido constante pela adição de 1 mL de água purificada pré-aquecida a 37°C. As alíquotas foram diluídas em etanol 70% e a absorbância da CUR determinada por espectroscopia UV ($\lambda = 427$ nm). O cálculo da concentração de CUR foi realizado utilizando a equação da reta obtida da curva analítica (Capítulo II). O experimento foi conduzido em triplicata.

6.5.9 Calorimetria exploratória diferencial

A caracterização termoanalítica foi realizada utilizando DSC (Thermal Analyzer TA 60W – Shimadzu DSC-60, Kyoto, Japão) em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $30\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de aquecimento de $25 - 200^\circ\text{C}$, sob uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. As amostras de hidrogéis termorresponsivos foram previamente secas em estufa de circulação forçada de ar (Tecnal-TE- 394. Piracicaba, Brasil) a 30°C , até eliminação total de água. A massa de amostra empregada para análise de DSC foi de aproximadamente 2 mg.

6.5.10 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho dos hidrogéis contendo CUR livre, DS, MF e polímeros foram obtidos pelo espectro de varredura na faixa de $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$, (IR-Affinity-1 – Shimadzu, Kyoto, Japão) com resolução de 4 cm^{-1} e 128 scans. Para a preparação das pastilhas de KBr, as amostras de hidrogéis termorresponsivos foram previamente secas em estufa de circulação forçada de ar (Tecnal-TE- 394. Piracicaba, Brasil) a 30°C , até eliminação total de água. As pastilhas de KBr foram preparadas misturando 2 mg da amostra de hidrogel termorresponsivo seco com 200 mg de KBr.

6.5.11 Temperatura crítica de micelização

A caracterização termoanalítica foi realizada utilizando DSC (TA Instruments - DSC 2920, USA) com o objetivo de determinar a temperatura crítica de micelização (TCM). As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de aquecimento de $10 - 40^\circ\text{C}$, sob uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A massa de amostra empregada para análise de DSC foi de aproximadamente 2 mg.

6.5.12 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos hidrogéis termorresponsivos P20, M20, P20 CUR, P20 DS, M20 CUR e M20 DS foram determinadas usando DPPH como um radical livre. A concentração da solução etanólica de DPPH utilizada foi de $0,1\text{mM}$. Após a adição de DPPH às amostras, a absorvância foi determinada no

comprimento de onda de 515 nm em espectrofotômetro (Lambda 35, PerkinElmer, USA) nos tempos 0, 15, 30 45 e 60 min. Os tubos contendo as amostras foram mantidos ao abrigo de luz. A capacidade da amostra em sequestrar o radical (DPPH), expressa como percentual de inibição, foi calculada de acordo com a Equação 3 e representada graficamente.

:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs}^1 - \text{Abs}^2}{\text{Abs}^1} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: Abs1 = absorvância do controle

Abs2 = absorvância da amostra a ser testada

6.5.13 Avaliação da atividade antimicrobiana

a) Crescimento e contagem dos micro-organismos

Para o ensaio microbiológico foram utilizados os micro-organismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9721) (microrganismos gram-negativos) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10390) (microrganismos gram-positivos). O crescimento dos micro-organismos foi preparado assepticamente em erlenmeyers contendo caldo tríptico de soja (TSB). Os micro-organismos foram diluídos em solução salina NaCl 0,9% para a contagem dos micro-organismos, através da técnica *pour plate*. As placas foram armazenadas na estufa à 37°C por 24 horas. Após o crescimento, os micro-organismos foram contados respeitando o intervalo de 30 a 300 colônias, e selecionada a solução contendo 10⁶ UFC/mL para realizar o ensaio.

b) Avaliação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana das amostras foi realizada a metodologia clássica de diluição sucessiva em tubos adaptada, concentração inibitória mínima (CIM). Foram utilizadas microplacas de 96 poços onde foram colocados, nos poços do perímetro exterior, 300 µL de água estéril deionizada para minimizar a evaporação do meio de cultura dos poços de teste durante a incubação.

Para cada amostra foram utilizados 4 poços, 2 contendo 100 µL de meio de cultura (TSB) e 100 µL da solução teste, os quais nomeamos de n^o da amostra e a letra D (desafio); e 2 poços contendo apenas a 100 µL da solução teste. Foi adicionado em todos os poços 10 µL do inóculo (microrganismo em teste) em

concentração conhecida, estimada em 10^6 UFC/mL. Os poços de controle positivo foram constituídos de meio de cultura + inóculo e o controle negativo foram constituídos de meio de cultura + amostra. As placas foram tampadas e incubadas à temperatura ótima de crescimento do microrganismo em questão, por 24h. Foram avaliadas 6 amostras (Tabela 13).

Após o período de incubação foi inoculado o conteúdo (5 μ L) de cada poço em placas de Petri, contendo ágar de meio de cultura específico para cada microrganismo em teste. O resultado foi analisado com base na ausência ou não de crescimento bacteriano.

Tabela 13 - Descrição das amostras aplicadas no ensaio de atividade antimicrobiana.

Amostra	Descrição
1	M20 DS
1D	M20 DS + TSB
2	M20
2D	M20 + TSB
3	M20 CUR
3D	M20 CUR + TSB
4	P20 DS
4D	P20 DS + TSB
5	P20 CUR
5D	P20 CUR + TSB
6	P20
6D	P20 + TSB

TSB – Caldo Trípico de Soja

Fonte: Elaboração Própria

6.6 Resultados e Discussão

6.6.1 Potencial hidrogeniônico

O pH vaginal na faixa de 3,5 – 4,5 é importante para manter estável a microbiota e controle de infecções por patógenos oportunistas. Neste valor de pH os *Lactobacillus spp* convertem o glicogênio, proveniente de células epiteliais descamadas, em ácido láctico. A não alteração dos valores de pH fisiológico é uma condição que deve ser considerada durante o desenvolvimento de formulações de uso tópico para aplicação na cavidade vaginal (VALENTA, 2005).

As medidas de pH para os hidrogéis são apresentados na Tabela 14. A concentração de P407 não interferiu no valor de pH ($p > 0,05$) dos hidrogéis. A adição da solução de Qt e HPMC K4M diminuíram o pH das misturas, quando comparado com o pH dos hidrogéis contendo apenas P407 ($p < 0,05$). O pH das formulações favorece a estabilidade da CUR (KURITA; MAKINO, 2013; SEO et al., 2012) e compatível para uso vaginal (VALENTA, 2005). A análise dos resultados mostra que as formulações são adequadas para garantir o teor de CUR e o uso na cavidade vaginal.

Tabela 14 - Valores de pH para as formulações de hidrogel termorresponsivo

Formulação	pH
P18 CUR	4,52 ± 0,02 ^a
P18 MF	4,53 ± 0,01 ^a
P18 DS	4,53 ± 0,02 ^a
P20 CUR	4,41 ± 0,03 ^a
P20 MF	4,41 ± 0,01 ^a
P20 DS	4,52 ± 0,02 ^a
M18 CUR	4,07 ± 0,03 ^b
M18 MF	3,99 ± 0,01 ^b
M18 DS	4,1 ± 0,14 ^b
M20 CUR	4,09 ± 0,02 ^b
M20 MF	3,97 ± 0,02 ^b
M20 DS	4,05 ± 0,01 ^b

As letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores ($p > 0,05$) ($n=3$). Os demais resultados são estatisticamente diferentes.

Fonte: Elaboração própria

6.6.2 Viscosidade do hidrogel termorresponsivo

Na aplicação de produtos tópicos na cavidade vaginal, a viscosidade e a mucoadesão contribuem para fixar a formulação sobre a mucosa epitelial. Esta propriedade também contribui para controlar a liberação de fármaco e melhorar a adesão ao tratamento com produtos nas formas farmacêuticas de gel, creme ou pomada. O aumento da viscosidade *in situ*, com base na temperatura ou pH facilita a aplicação e o espalhamento das formulações sobre a mucosa epitelial (KRISTL; GRABNAR, 2014). Os resultados para viscosidade das formulações de hidrogel termorresponsivo são apresentados na Tabela 15. Para as formulações de P407 a 18% (P18) a viscosidade diminui com a mistura de Qt e HPMC K4M (M18), ou pela adição da CUR livre (P18 CUR; M18 CUR), MF (P18 MF; M18 MF) e DS (P18 DS; M18 DS). A análise desses resultados mostra que as formulações dos hidrogéis usando 18% de P407 não são termorresponsivas na temperatura até 37°C. Para as formulações com P407 a 20% o ponto de inflexão para o T_{sol-gel} inicia em 30°C e atinge o máximo de viscosidade na temperatura de 37°C. Quando as formulações dos demais hidrogéis são comparadas com P407 a 20% (P20), uma redução na viscosidade pode ser observada na presença Qt, HPMC K4M (M20) e de CUR (P20 CUR, P20 MF, P20 DS, M20 CUR e M20 MF), exceto para a formulação que contém Qt, HPMC K4M e DS (M20 DS). A análise desses resultados mostra que a CUR nas DS é mais adequada para preparação de hidrogéis termorresponsivos com P407, Qt e HPMC K4M (M20 DS).

Tabela 15 - Viscosidade (cP) das formulações dos hidrogéis termorresponsivos

Formulação	25°C	30°C	37°C
Viscosidade (cP)			
P18	75,0	100,0	4590,0
P18 CUR	60,0	80,0	330,0
P18 MF	65,0	85,0	420,0
P18 DS	65,0	85,0	315,0
M18	70,0	100,0	100,0
M18 CUR	70,0	90,0	90,0
M18 MF	70,0	95,0	90,0
M18 DS	80,0	95,0	95,0
P20	865,0	7420,0	8050,0
P20 CUR	100,0	3160,0	7280,0
P20 MF	120,0	5240,0	6760,0
P20 DS	120,0	5350,0	7480,0
M20	130,0	3370,0	7490,0
M20 CUR	140,0	2640,0	6400,0
M20 MF	140,0	2560,0	6300,0
M20 DS	165,0	3110,0	8100,0

Fonte: Elaboração própria

6.6.3 Erosão do hidrogel termorresponsivo

A mudança na temperatura ambiental influencia a taxa de erosão de hidrogéis termorresponsivos. Para estas formulações, a energia livre (ΔG) negativa do sistema resulta em associação desfavorável da ligação polímero-água, permitindo assim maior interação entre as cadeias do polímero (hidrofóbico) e moléculas de água (ligação de hidrogênio), cuja interação aumenta a entropia do sistema. Subsequentemente, como a energia livre do sistema é negativa ($\Delta H < T\Delta S$) ocorre maior interação molecular, o que determina a transição sol-gel (KLOUDA; MIKOS, 2008), e controla a taxa de erosão do hidrogel termorresponsivo uma vez que no ponto de transição sol-gel o polímero solvatado desidrata rapidamente e muda para uma estrutura mais hidrofóbica.

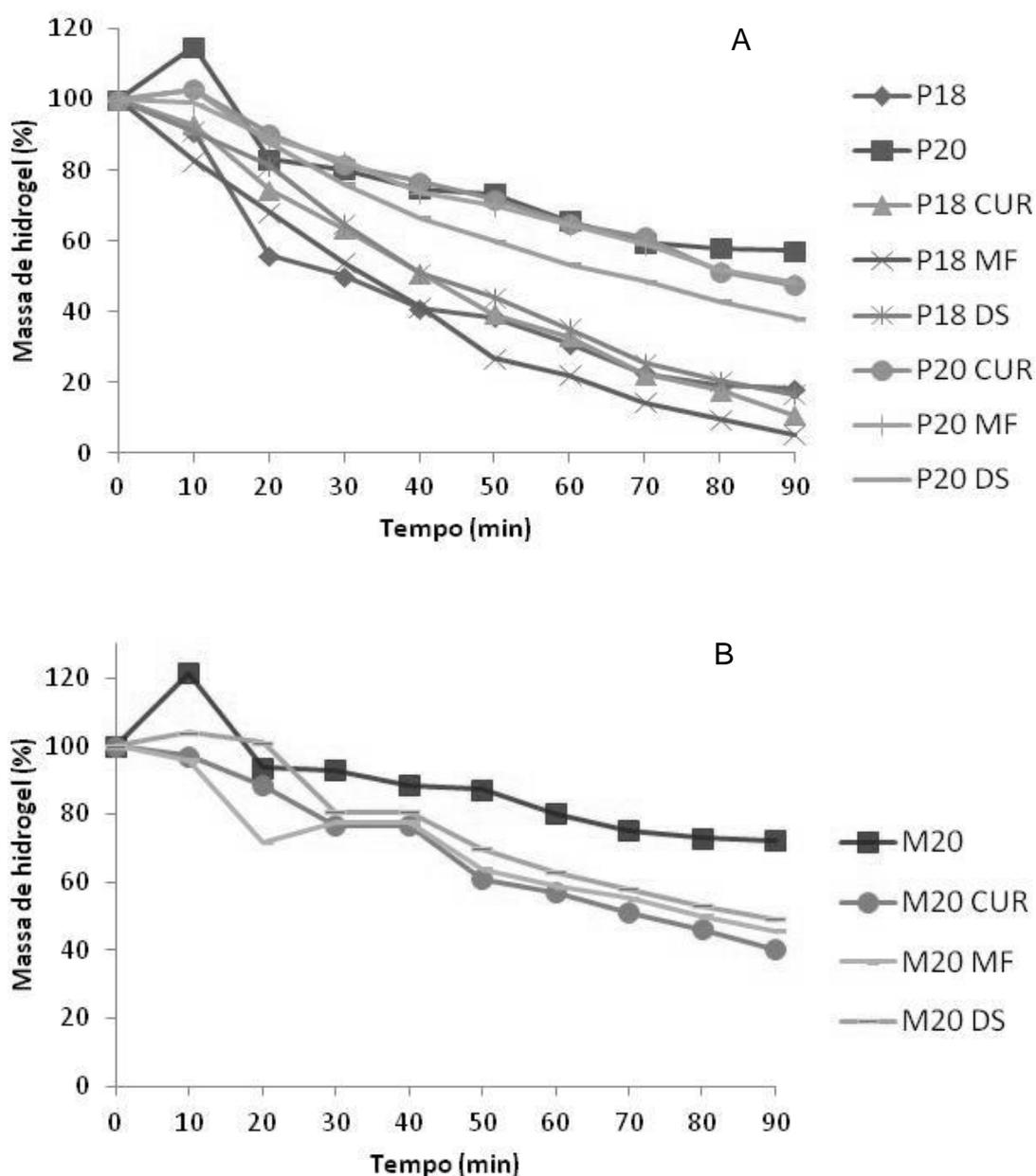
A Figura 19 (A e B) mostra os resultados de erosão das formulações dos hidrogéis termorresponsivos. Na Figura 19 A estão representados os resultados para as formulações com P407 a 18 e 20% com CUR livre, MF e DS. A taxa de erosão para as formulações com 18% de P407 (81,6%) é maior que a taxa de erosão das

formulações com 20% de P407 (42,7%). Para as formulações com 20% de P407, a presença de CUR livre (83,3%), MF (52,4%) e DS (51,8%) aumenta a taxa de erosão. Nestas formulações o aumento da taxa de erosão pode ser atribuído à presença da CUR, embora esta seja maior para CUR livre do que para MF e DS.

Na Figura 19 B estão representados os resultados para as formulações M20 (P407/Q_t/HPMC K4M), M20 CUR livre, M20 MF e M20 DS. Quando comparado com M20 a presença de CUR aumenta a taxa de erosão. Na presença da DS a taxa de erosão (51,3%) após 90 min é inferior a MF (59,8%) e CUR livre (61,9%).

A medida da taxa de erosão do hidrogel termorresponsivo é importante para estimar o tempo de permanência da formulação sobre a mucosa epitelial e o perfil de liberação do fármaco. Conforme descrito por Aka-Any-Grah et al., 2010, a diluição do hidrogel de P407 com HPMC K4M aumenta a T_{sol-gel} e não interfere na mucoadesão, sugerindo que apesar da erosão o hidrogel permanece aderido na mucosa vaginal. A análise dos resultados obtidos nesse estudo, para um volume fixo de 0,3 mL de solvente (água purificada), com erosão na faixa de 51% (P20 DS e M20 DS) sugere que os hidrogéis termorresponsivos com CUR-DS podem permanecer aderidos na mucosa vaginal com taxa de liberação controlada. A hipótese sobre a taxa de liberação controlada em função da taxa de erosão foi confirmada nos estudos de dissolução *in vitro*.

Figura 19 - Perfil de erosão dos hidrogéis termoresponsivos formulações contendo somente P407 (A) e formulações contendo P407/HMPC K4M/Qt (B)



Fonte: Elaboração própria

6.6.4 Propriedade mecânica

As redes poliméricas dos hidrogéis devem possuir propriedades mecânicas capazes de resistir a estresses físicos e químicos e ao mesmo tempo, proporcionar um contato íntimo e prolongado com a superfície da mucosa. O tempo de permanência do hidrogel no local de aplicação é influenciado pela renovação do fluido vaginal (transudato e muco vaginal) e pela reticulação dos polímeros. O

equilíbrio entre o efeito do fluido vaginal e a resistência mecânica dos polímeros pode ser medido pela dureza, coesividade, compressibilidade, adesividade e mucoadesão do hidrogel termorresponsivo.

Um dos parâmetros a ser considerado na análise das propriedades mecânicas é o equilíbrio entre o trabalho necessário para vencer as forças de atração, adesividade e coesividade, representados na Figura 20, respectivamente, pela área negativa (B) e pelo pico negativo (D). A adesividade é uma propriedade relacionada à mucoadesão e definida como o trabalho necessário para destacar o *probe* da amostra enquanto suas forças de coesão são quebradas (BALOGLU et al., 2011).

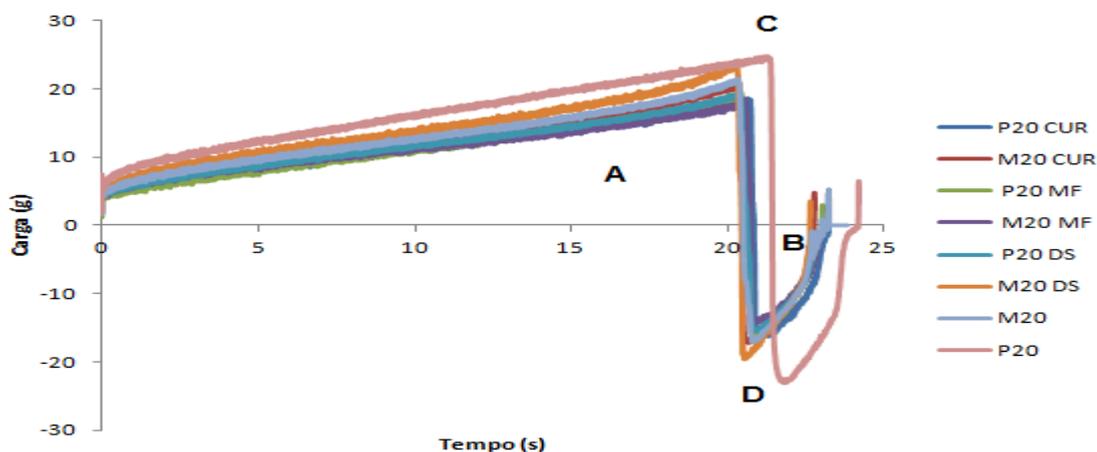
A força necessária para atingir uma determinada deformação (dureza), representada pelo pico positivo (C) na Figura 20, está relacionada com a facilidade de aplicação do hidrogel termorresponsivo sobre uma determinada superfície. A área positiva (A), representada na Figura 20, está relacionada ao trabalho necessário para deformar o produto (compressibilidade) e está relacionado com a dureza do hidrogel termorresponsivo (BALOGLU et al., 2011; HURLER, 2011) e com o estresse/trabalho requerido para remover o produto da embalagem. A compressibilidade quantifica a deformação do produto durante compressão (TUĞCU-DEMİRÖZ; ACARTÜRK; ERDOĞAN, 2013).

A Tabela 16 mostra os valores numéricos e o tratamento estatístico dos resultados de resistência mecânica dos hidrogéis termorresponsivos. Dureza, coesividade, compressibilidade e adesividade das formulações apenas com P407 diminuíram ($p < 0,05$) na presença de CUR (CUR livre, MF e DS). Nenhuma diferença estatística foi observada entre as formulações P20 CUR, P20 MF e P20 DS ($p > 0,05$). Nas formulações com P407/Q \dagger /HPMC K4M (M20) a presença de CUR nas DS (M20 DS) não interfere na resistência mecânica ($p > 0,05$).

Comparando as formulações M20 com CUR, a M20 DS apresenta dureza maior ($p < 0,05$) que as formulações M20 CUR e M20 MF. A presença de CUR não interfere na compressibilidade das formulações M20, os resultados são estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Para medida de coesividade e adesividade os resultados obtidos com M20 CUR e M20 MF são estatisticamente iguais ($p > 0,05$). No entanto, M20 CUR é estatisticamente igual a M20 DS ($p > 0,05$).

Em valores nominais a formulação M20 DS é mais adequada para veiculação da CUR em hidrogéis termorresponsivos para administração vaginal.

Figura 20 - Propriedades mecânicas de dureza (C), coesividade (D), compressibilidade (A), adesividade (B) e dos hidrogéis termorresponsivos.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 16 - Propriedades mecânicas de dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade dos hidrogéis termorresponsivos (M \pm DP)

Formulação	Dureza (g) - C	Coesividade (g) - D	Compressibilidade (g/s) - A	Adesividade (g/s) - B
P20	25,06 \pm 1,59 ^a	26,06 \pm 1,74 ^c	352,19 \pm 34,69 ^a	41,05 \pm 2,44 ^c
P20 CUR	19,53 \pm 1,33 ^{cd}	18,06 \pm 0,94 ^{ab}	251,09 \pm 24,49 ^b	29,04 \pm 2,14 ^{ab}
P20 MF	19,92 \pm 0,70 ^{cd}	18,76 \pm 1,80 ^{ab}	232,72 \pm 28,82 ^b	26,76 \pm 2,45 ^{ab}
P20 DS	21,39 \pm 0,53 ^c	18,91 \pm 0,23 ^{ab}	277,32 \pm 13,05 ^b	31,32 \pm 0,31 ^b
M20	21,97 \pm 0,70 ^{bc}	18,91 \pm 1,11 ^{ab}	267,90 \pm 10,11 ^b	32,16 \pm 3,54 ^b
M20 CUR	21,23 \pm 0,72 ^{cd}	18,68 \pm 0,92 ^{ab}	258,53 \pm 13,18 ^b	27,79 \pm 1,29 ^{ab}
M20 MF	18,64 \pm 0,88 ^d	16,55 \pm 1,91 ^a	235,94 \pm 14,70 ^b	23,96 \pm 1,75 ^a
M20 DS	24,10 \pm 0,45 ^{ab}	20,81 \pm 1,65 ^{bc}	286,21 \pm 10,64 ^b	30,50 \pm 1,22 ^b

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores ($p > 0,05$) ($n=3$). Os demais resultados são estatisticamente diferentes.

Fonte: Elaboração própria

6.6.5 Propriedade mucoadesiva

O termo mucoadesão pode ser considerado para se referir ao subgrupo de bioadesão e, mais especificamente, nos casos em que a formulação interage com a camada de muco que recobre o tecido mucosal. A maioria dos métodos são baseados na mimetização das condições *in vivo*. Os parâmetros de mucoadesão podem ser avaliados por diferentes métodos *in vivo*, *ex - vivo* ou *in vitro*, as medidas das propriedades de mucoadesão é medida pelo tempo de contato ou pela força

requirida para separar a formulação do tecido (*ex - vivo*) ou de discos de mucina (*in vitro*) (EDSMAN; HÄGERSTRÖM, 2005).

Os resultados para força máxima para separação (g), trabalho de adesão ($\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$) e deformação para o pico (mm) para as formulações são apresentados na Tabela 17. A análise dos resultados mostra que a força máxima para separação (F_{max}) do disco de mucina da superfície do hidrogel termorresponsivo não é influenciada ($p > 0,05$) pela presença da CUR nas formulações com P407 (P20). Nas formulações com P407/Qt /HPMC K4M (M20) a CUR aumenta a força de mucoadesão ($p < 0,05$). A F_{max} corresponderia à força máxima necessária para separar o hidrogel da mucosa. O trabalho de adesão ($W \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}$) não é influenciado significativamente ($p > 0,05$) pela diferença entre as formulações P20 e M20. Uma diferença estatística ($p < 0,05$) pode ser observada entre as formulações P20 e M20 CUR e M20 MF, no entanto, não há razões para comparar estas formulações, uma vez que P20 contém apenas P407 enquanto que M20 é composta de P407/HPMC K4M/Qt K4M. Embora o maior valor nominal de W seja para M20 MF ($290,851 \pm 46,98$) o desvio é relativamente grande o que sugere não uniformidade da formulação de hidrogel termorresponsivo. A deformação para o pico, medida em milímetro, sugere uma medida de elasticidade da adesão, a qual corresponde à distância necessária para alcançar a separação (F_{max}). Com base nos resultados a elasticidade das formulações P20 é estatisticamente igual ($p > 0,05$). Para as formulações M20 a presença da CUR (M20 DS) diminui a elasticidade da adesão ($p < 0,05$).

Embora os valores nominais sejam maiores para M20 CUR e M20 DS não há diferença estatística entre as formulações P20 CUR, P20 MF, P20 DS com M20 CUR, M20 MF e M20 DS. Estes resultados sugerem que a mucoadesão (F_{max}) é controlada pelo P407 na formulação a 37°C . Como o P407 é um composto não iônico, o mecanismo de mucoadesão ocorre, preferencialmente, por interpenetração das cadeias do polímero com a mucina. A força máxima para separação (mucoadesão) é equivalente para todas as formulações (Tabela 17). Em valores nominais a M20 na presença de CUR (CUR livre, MF e DS) apresenta maior força de mucoadesão.

Tabela 17 – Resultado do trabalho de mucoadesão de discos de mucina sobre a superfície dos hidrogéis termorresponsivos (M ± DP)

Formulações	Força máxima para separação (g)	Trabalho de adesão (g.s ⁻¹)	Deformação para o pico (mm)
P20	7,659 ± 0,32 ^{ab}	181,95 ± 18,94 ^b	2,33 ± 1,10 ^{bc}
P20 CUR	7,42 ± 0,16 ^{ab}	244,35 ± 8,48 ^{ab}	3,04 ± 0,30 ^{ab}
P20 MF	7,65 ^{ab}	245,98 ± 3,01 ^{ab}	3,05 ± 0,05 ^{ab}
P20 DS	7,54 ± 0,16 ^{ab}	226,88 ± 10,78 ^{ab}	2,80 ± 0,34 ^{bc}
M20	6,73 ^b	226,20 ± 8,16 ^{ab}	3,05 ± 0,09 ^{ab}
M20 CUR	8,58 ± 0,82 ^a	268,39 ± 14,57 ^a	3,69 ± 0,144 ^a
M20 MF	8,28 ± 0,57 ^a	290,85 ± 46,98 ^a	2,84 ± 0,13 ^{abc}
M20 DS	8,53 ± 0,41 ^a	243,61 ± 10,65 ^{ab}	2,17 ± 0,14 ^c

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores ($p > 0,05$) ($n=3$). Os demais resultados são estatisticamente diferentes.

Fonte: Elaboração própria

6.6.6 Comportamento reológico

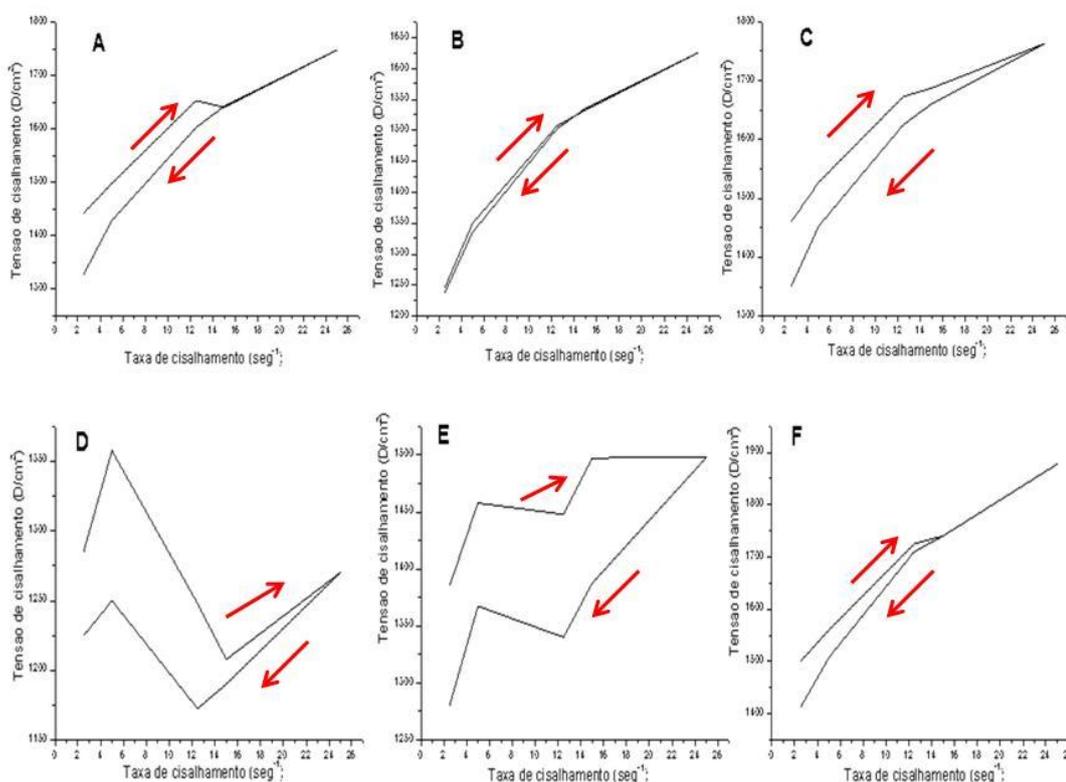
Os resultados apresentados na Figura 21 (A - F) mostram a relação entre a tensão de cisalhamento (*shear stress*) e a taxa de cisalhamento (*shear rate*) para as formulações P20 CUR, P20 MF, P20 DS, M20 CUR, M20 MF e M20 DS, respectivamente.

Na Figura 21 (A, B, C e F) a tensão de cisalhamento aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento (setas ascendentes) e diminui com a redução da taxa de cisalhamento (setas descendentes). A viscosidade dos hidrogéis altera com a variação da taxa de cisalhamento, para mais ou para menos. Neste caso, a análise dos resultados mostra que as formulações P20 CUR, P20 MF, P20 DS e M20 DS apresentam comportamento de fluxo não-newtoniano (a taxa de cisalhamento não varia na mesma proporção da tensão de cisalhamento) e pseudoplástico (tensão de cisalhamento aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento). Esse tipo de comportamento de fluxo é denominado “*shear thinning*”, isto é, a estrutura da molécula do polímero em dispersão é temporariamente alterada para uma orientação paralela a superfície do *spindle* (LI et al., 2012).

O perfil clássico de fluxo não-newtoniano e pseudoplástico não pode ser observado para as formulações M20 CUR (Figura 21 D) e M20 MF (Figura 21 E). No

entanto, a presença de uma região de histerese pode ser observada para todas as formulações (Figura 21 A - F). A área de histerese é caracterizada pela diferença entre a energia armazenada durante o aumento da taxa de cisalhamento e a energia dissipada durante a redução da taxa de cisalhamento e sugere comportamento tixotrópico para todas as formulações.

Figura 21 - Perfil do comportamento reológico das formulações P20 CUR (A), P20 MF(B), P20 DS (C), M20 CUR (D), M20 MF (E) e M20 DS (F)



Fonte: Elaboração própria

6.6.7 Perfil de liberação e dissolução

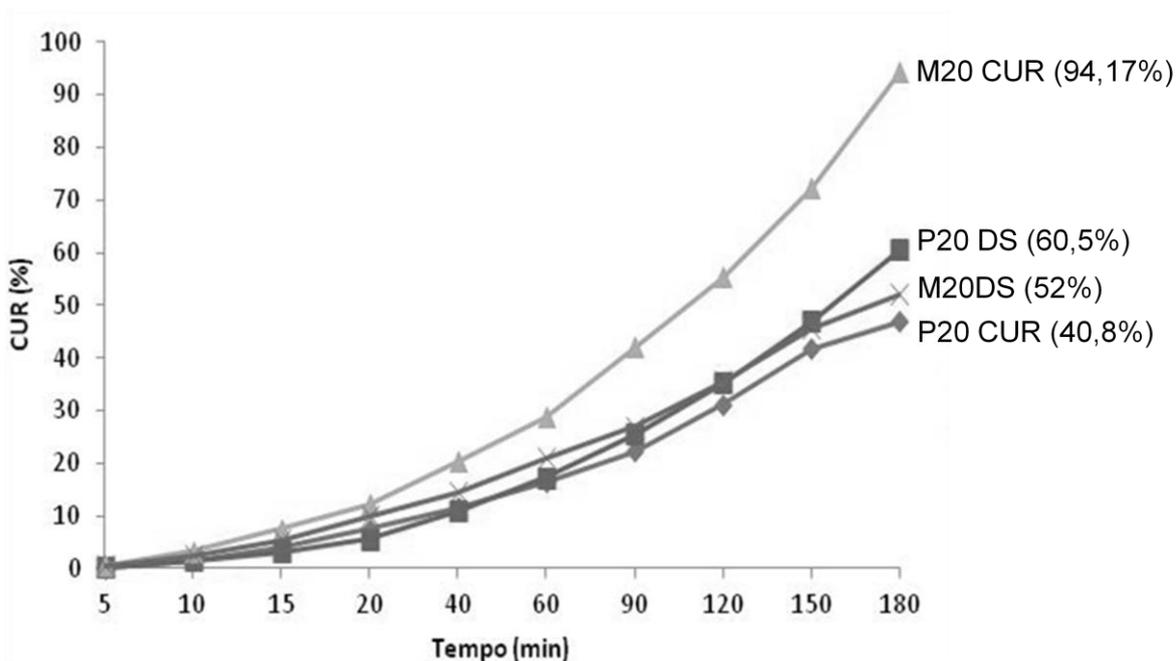
Os perfis de liberação e dissolução (Figura 22) mostram que a CUR é liberada das formulações de forma controlada ao longo de 180 min.

Para as formulações P20 o percentual de liberação ao longo de 180 min. é de 40,8% e 60,5%, respectivamente para P20 CUR e P20 DS. Para formulação P20 CUR a viscosidade é 7280 cP e a taxa de erosão é de 52,4%, enquanto que para P20 DS a viscosidade é 7480,0 cP e a taxa de erosão é de 61,9%. Para as formulações P20 a taxa de erosão do hidrogel termorresponsivo controla a velocidade de liberação e dissolução da CUR.

Para as formulações M20 o percentual de liberação ao longo de 180 min. é de 94,17% e 52%, respectivamente para M20 CUR e M20 DS. Para formulação M20 CUR a viscosidade é 6400 cP e a taxa de erosão é de 59,8%, enquanto que para M20 DS a viscosidade é 8100 cP e a taxa de erosão é de 50,9%. Para as formulações M20 a viscosidade do hidrogel termorresponsivo controla a velocidade de liberação e dissolução da CUR.

A análise desses resultados com base no percentual liberado e no perfil das curvas mostra que a liberação de CUR das formulações P20 CUR, P20 DS e M20 DS poderia acontecer gradualmente, por um intervalo de tempo maior que 180 min. A massa de CUR liberada da formulação M20 DS nos 180 min. é maior que a massa liberada para P20 DS e P20 CUR. Esse perfil de liberação/dissolução favoreceria uma ação terapêutica mais efetiva da CUR nos primeiros 180 min., para M20 DS com manutenção da ação terapêutica a partir desse tempo, uma vez que o percentual liberado foi de 52%.

Figura 22 – Perfil de liberação e dissolução da CUR nas formulações P20 CUR, P20 DS, M20 CUR e M20 DS



Fonte: Elaboração própria

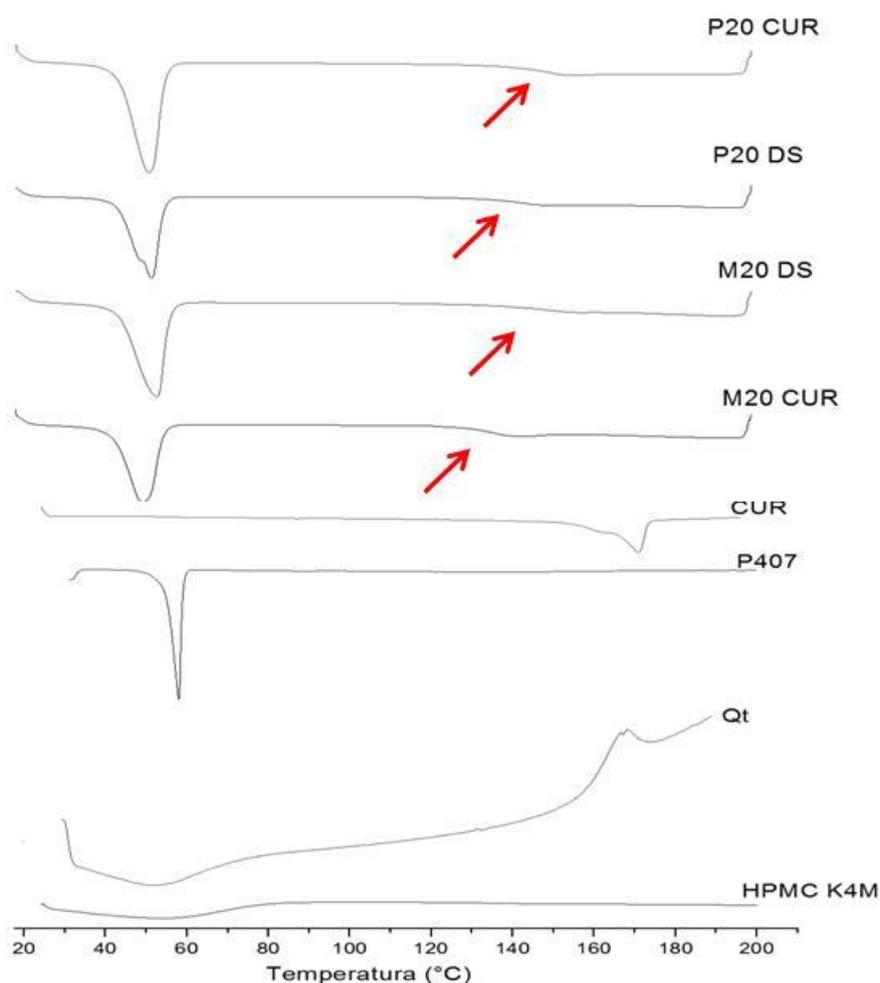
6.6.8 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas termoanalíticas das amostras são apresentadas na Figura 23, e os eventos térmicos são indicados com setas. O evento térmico em 173,28°C

corresponde ao ponto de fusão da CUR (WANG, MA, & TU, 2015). O evento térmico na faixa de 159,13 – 163,88°C sugere um estágio de Tg para CUR. O ponto de fusão para P407 em 55,91° C corresponde ao descrito na literatura (KWEON et al., 2002). O HPMC K4M é um composto amorfo e o evento térmico na faixa de 30-70°C corresponde à perda de água (CONTE et.al 1988).

Para as amostras de hidrogel termorresponsivo nenhum evento térmico de fusão para CUR pode ser observado nas formulações. A ausência de picos de fusão da CUR pode estar relacionada com a mudança do estado sólido da CUR, indicando uma redução da cristalinidade. A não formação de novos picos de fusão nas curvas termoanalíticas das amostras de hidrogel termorresponsivo, indica que não houve a formação de um novo composto químico referente ao processo de preparação do hidrogel termorresponsivo contendo CUR.

Figura 23 - Curvas termoanalíticas das amostras de hidrogel termorresponsivo contendo CUR (P20 CUR, P20 DS, M20 CUR e M20 DS), HPMC K4M, Qt, P407 e CUR



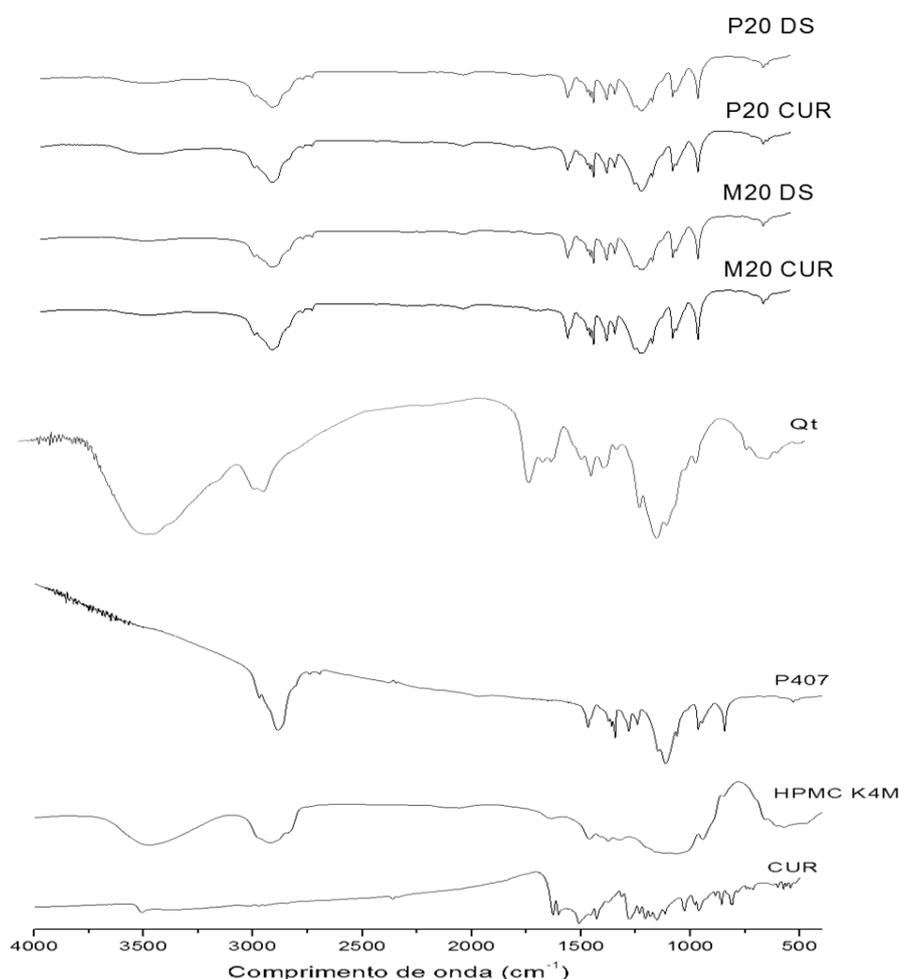
Fonte: Elaboração própria

6.6.9 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Por meio dos espectros de infravermelho apresentados na Figura 24, é possível identificar os estiramentos característicos para a CUR. O estiramento referente a C=O na região de 1510 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} . O estiramento referente à conversão ceto – enol pode ser observado na região entre $1562\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$. O estiramento referente ao anel benzeno pode ser identificado em 1600 cm^{-1} . O estiramento referente C=C do composto aromático pode ser identificado em 1380 e 1000 cm^{-1} . Na região de 1270 cm^{-1} é possível identificar estiramentos da banda de C-O-C. O estiramento em 3510 e 3500 cm^{-1} é referente à presença da OH do grupo fenol. Este resultado para FTIR da CUR está em acordo com os resultados descritos por Darandale & Vavia (2012); Gangwar et al. (2012) e Li J. et al (2015).

Os mesmos estiramentos referentes à CUR podem ser observados nas amostras dos hidrogéis termorresponsivos contendo CUR. Estes resultados mostram que não há interação química entre a CUR e os carreadores.

Figura 24 – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier das amostras de hidrogel termorresponsivo contendo CUR (P20 CUR, P20 DS, M20 CUR e M20 DS), HPMC K4M, Qt, P407 e CUR



Fonte: Elaboração própria

6.6.10 Temperatura crítica de micelização

As curvas termoanalíticas da temperatura de micelização das amostras são apresentadas na Figura 25. A formação de micelas não é uma questão de simples separação de fases, experimentalmente, esta região é determinada pelo plote de medidas de algumas propriedades físicas e espectroscópicas que mudam bruscamente com a formação das micelas em função da concentração do tensoativo ou da temperatura da solução (MANSUR; GONZÁLEZ; LUCAS, 1999). Estas propriedades físicas compreendem: tensão superficial, densidade, condutividade específica, pressão osmótica e detergência (MANSUR; GONZÁLEZ; LUCAS, 1999). Termodinamicamente, a mudança abrupta na solubilidade dos polímeros em resposta a mudança de temperatura é regulada pela energia livre do sistema (ΔG),

ou energia livre de Gibbs (SCHILD, 1992). Uma mudança na temperatura resulta em energia livre negativa no sistema, o que desfavorece a associação polímero-água permitindo interações entre as cadeias do polímero. Na interrelação termodinâmica ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), a energia livre negativa de associação (ΔG) é atribuída à maior entropia do sistema em relação à variação de entalpia ($T\Delta S > \Delta H$) (RUEL-GARIÉPY; LEROUX, 2004).

Nossa investigação na temperatura $T_{sol-gel}$ com técnicas visual e reológica, evidenciou macroscopicamente o crescimento da interação entre as micelas do P407 induzida pela temperatura. A análise térmica do DSC (Figura 25) foi realizada para obter informações mais consistentes sobre as propriedades de micelização do P407 (P20) da mistura do P407 com HPMC K4M e Qt (M20) na presença ou ausência da CUR livre (P20 CUR e M20 CUR) e CUR DS (P20 DS e M20 DS).

A formulação P20, hidrogel sem CUR, a curva DSC mostra eventos endotérmicos em 15°C e uma banda mais larga na faixa de temperatura entre 22 e 38°C, o primeiro corresponde à formação das micelas do P407 (T_m), o segundo representa o rearranjo das micelas correspondente ao aumento da viscosidade (Tabela 14) que ocorre a partir de 25°C até 37°C, chamado temperatura de gelificação. Para a formulação com CUR livre (P20 CUR) o evento endotérmico marcante ocorre na T_m entre 12 e 22°C. Entretanto, a região da temperatura de gelificação não pode ser identificada por ser muito menor que o pico de micelização. A redução da área de pico da temperatura de gelificação esta relacionada com a viscosidade da formulação P20 na presença de CUR (Tabela 14). Para a formulação de P407 contendo CUR DS (P20 DS), o evento endotérmico relacionado à T_m ocorre na faixa entre 8 e 22°C, já o evento da temperatura de gelificação aparece entre 22 e 32°C. A variação no ponto de T_m e temperatura de gelificação de P20 CUR e P20 DS pode ter ocorrido devido ao rearranjo micelar causado pela presença de CUR nas formulações.

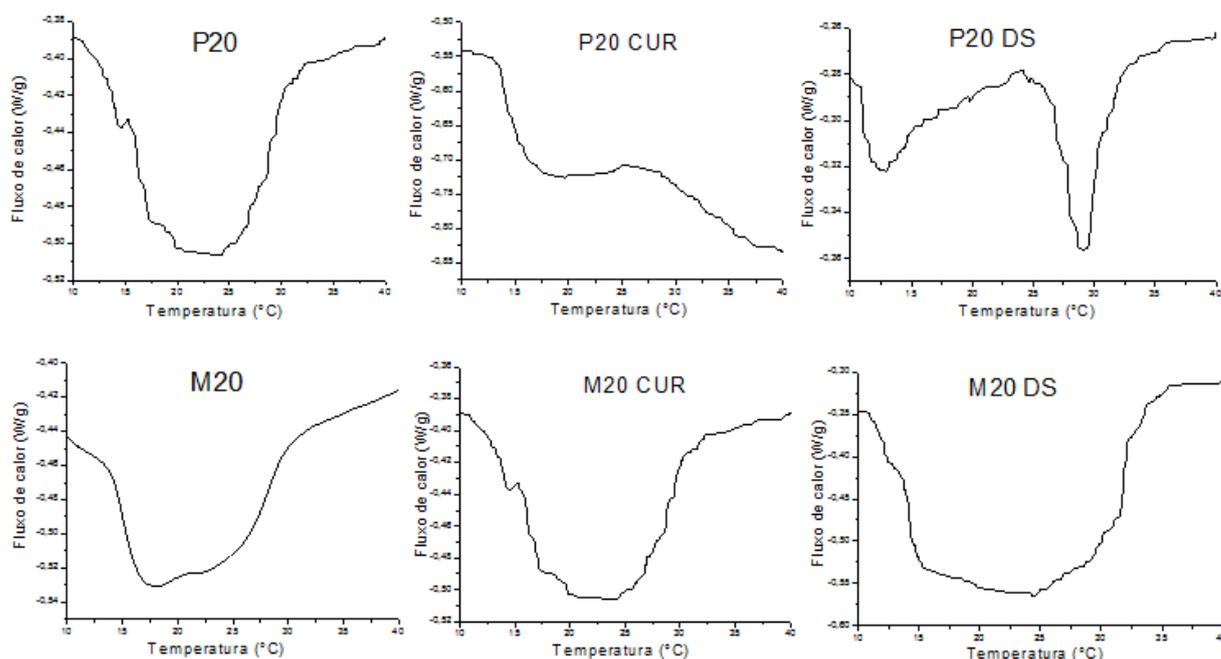
Para a amostra contendo a mistura de P407 com HPMC K4M e Qt (M20), a T_m pode ser observada no evento endotérmico que ocorre entre 12 e 20°C e a temperatura de gelificação entre 25 e 30°C. A comparação entre P20 e M20 mostra que o rearranjo micelar induzido pela temperatura é influenciado pela presença do HPMC K4M e Qt. A presença de CUR na formulação M20 (M20 CUR) não influencia na T_m do hidrogel. No entanto, há uma separação nítida entre a T_m e temperatura

de gelificação, o que não ocorre para M20. Na presença da DS (M20 DS) a temperatura de gelificação ocorre imediatamente após a micelização.

A análise desses resultados evidenciam os achados na técnica visual (Tabela 8, Capítulo III, página 79) e reológica (Tabela 14).

Como mencionado anteriormente a energia livre negativa de interação (ΔG) é atribuída à maior entropia do sistema em relação à variação de entalpia ($T\Delta S > \Delta H$), então a energia de micelização é negativa (Figura 25), assim micelas termodinamicamente estáveis espontaneamente conforme Zeng et al. (2014). Segundo Alexandridis e Hatton (1995), a energia livre de micelização é uma função do bloco polioxipropileno (PPO) do copolímero P407. Estes efeitos podem ser devido à capacidade deste copolímero em romper a estrutura aquosa e então modular as cápsulas de água ao redor do bloco PPO.

Figura 25 – Curva termoanalítica da temperatura crítica de micelização das amostras P20, M20, P20 CUR, M20 CUR, P20 DS e M20 DS.



Fonte:Elaboração Própria

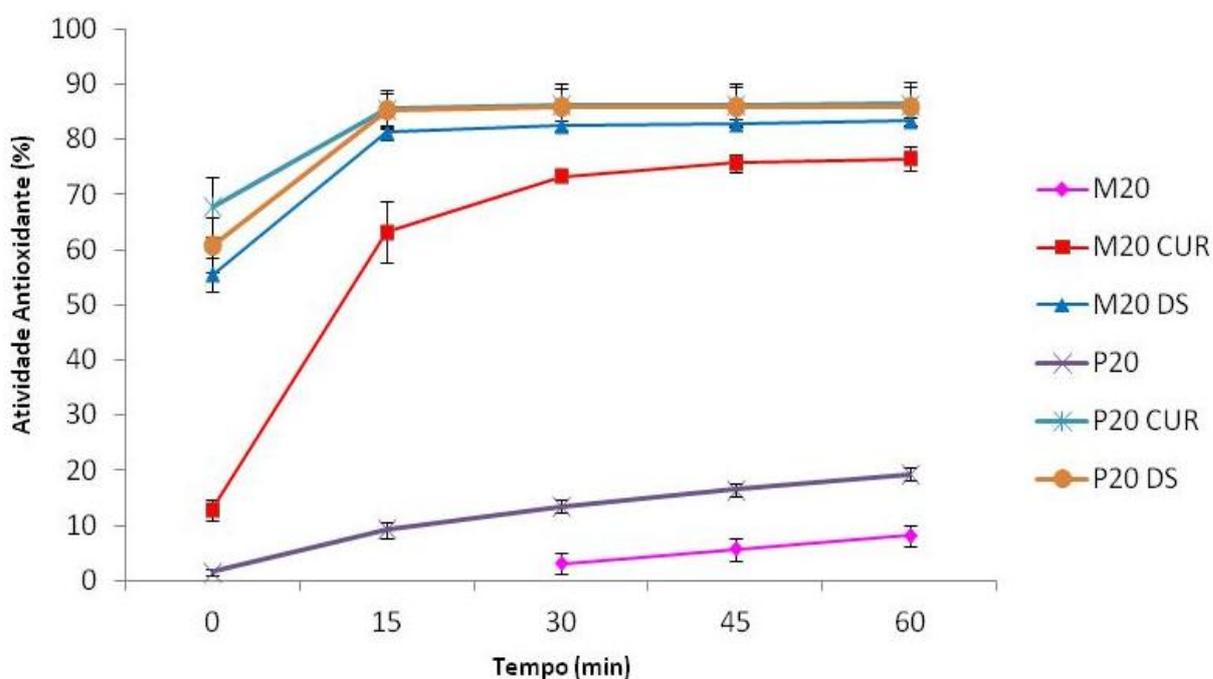
6.6.11 Atividade antioxidante

Os pigmentos curcuminóides (curcumina, bisdesmetoxicurcumina e desmetoxicurcumina) podem apresentar capacidade antioxidante maior ou igual a alguns compostos sintéticos (CHATTERJEE, S., PADWAL-DESAI, S.R., THOMAS, 1999). A presença do grupamento fenólico, β - dicetona, bem como os grupos

metoxi contribui para a atividade antioxidante da CUR. Alguns autores têm demonstrado que as propriedades de eliminação de radicais resultam principalmente da ação do grupamento fenólico (ESATBEYOGLU et al., 2012).

A atividade antioxidante dos hidrogéis termorresponsivos, com ou sem CUR, são apresentados na Figura 26. A capacidade antioxidante dos hidrogéis contendo DS e CUR livre (P20 DS, P20 CUR, M20 DS e M20 CUR), aumentou significativamente quando comparado aos hidrogéis não contendo CUR (P20 e M20). O hidrogel termorresponsivo M20 apresentou atividade antioxidante a partir de 30 min do início do teste e menor atividade antioxidante compara a formulação P20. Esse resultado permite afirmar que a Qt e HPMC K4M adicionados ao P407 não potencializa a ação antioxidante do hidrogel. Com exceção de M20 CUR (76,5%), as demais formulações contendo CUR livre ou DS (M20 DS, P20 CUR e P20 DS), apresentaram percentual de atividade antioxidante acima de 80% ao final de 60 min. A análise dos resultados indica a potencial utilização do hidrogel termorresponsivo contendo CUR como agente antioxidante no tratamento de várias doenças que são resultados do estresse oxidativo.

Figura 26 – Atividade antioxidante das amostras de hidrogel termorresponsivo



Fonte:Elaboração Própria

6.6.12 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana apresentados na Tabela 18 indicam uma efetividade das amostras (1D, 2D, 3D, 4D, 5D, 6D) para bactérias gram positiva (*S. aureus*) quanto gram negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*).

Na literatura estudada foi observado que os autores discordam sobre a relação da atividade antimicrobiana da CUR. Apisariyakul et al. (1995) e Péret-Almeida (2008) não observaram ação antifúngica e antimicrobiana em seus trabalhos. Já Basniwal e colaboradores (2011) observaram a atividade antimicrobiana da CUR. Os autores demonstraram que a CUR (150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus*, 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *E. coli* e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*, em meio DMSO) causou a lise celular pela quebra da cadeia de peptídeoglicanos da membrana plasmática e das estruturas das organelas do citoplasma, essa observação foi realizada por microscopia eletrônica de transmitância, onde foi possível avaliar o mecanismo de ação da CUR em relação ao *S. aureus*.

O estudo antibacteriano sobre extrato aquoso do rizoma de *Curcuma longa* demonstrou valor de CIM na faixa de 4 a 16 g.L^{-1} contra *S. aureus* e *E. coli* (ZANDI, 2014). Em nosso estudo assim como Zandi (2014), o experimento foi realizado utilizando solução aquosa de CUR, onde o resultado de CIM foi de 0,1 g.mL^{-1} (dados não demonstrados). Porém, quando em solução polimérica P20 ou M20 a CUR apresentou atividade antimicrobiana na faixa de concentração entre 222 – 379 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nosso trabalho, então, corrobora com descrição da literatura.

Tabela 18 - Ensaio de atividade antimicrobiana, amostras contra os microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Amostra	Descrição	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S aureus</i>
1	M20 DS	-	-	-
1D	M20 DS + TSB	-	+	+
2	M20	-	-	-
2D	M20 + TSB	-	+	+
3	M20 CUR	-	-	-
3D	M20 CUR + TSB	-	+	+
4	P20 DS	+	-	-
4D	P20 DS + TSB	-	+	+
5	P20 CUR	+	-	-
5D	P20 CUR + TSB	-	+	+
6	P20	-	-	-
6D	P20 + TSB	-	+	+

TSB – Caldo Triptico de Soja, (+) indica crescimento microbiano positivo (-) indica crescimento microbiano negativo

Fonte:Elaboração Própria

6.7 Conclusão

O pH das formulações favoreceu a estabilidade da CUR e é compatível para uso vaginal. Os resultados mostraram que as formulações foram adequadas para garantir o teor de CUR e o uso na cavidade vaginal.

A viscosidade e as propriedades mecânicas dos hidrogéis sem CUR (Capítulo III) foram comparados com as mesmas formulações (Capítulo IV), Desta comparação foi possível concluir que lotes diferentes de P407, adquiridos do mesmo fornecedor (Sigma Aldrich) apresentaram comportamento estrutural e mecânico diferente.

Os resultados de viscosidade sugerem que a CUR nas DS é mais adequada para preparação de hidrogéis termorresponsivos com P407, Qt e HPMC K4M (M20 DS).

Com erosão, *in vitro*, na faixa de 51% (P20 DS e M20 DS) após 180 min, os hidrogéis termorresponsivos com CUR-DS podem permanecer por mais tempo aderidos à mucosa vaginal.

Nas formulações com P407/Qt/HPMC K4M (M20) a presença de CUR nas DS (M20 DS) não interferiu na resistência mecânica dos hidrogéis termorresponsivos.

Em valores nominais, a formulação M20 DS foi mais adequada para veiculação da CUR em hidrogéis termorresponsivos para administração vaginal.

Nas formulações com P407/HPMC K4M/Qt (M20) a CUR aumentou a força de mucoadesão dos hidrogéis termorresponsivos. Em valores nominais a formulação M20 na presença de CUR (CUR livre, MF e DS) apresentou maior força de mucoadesão.

As formulações com CUR (P20 CUR, P20 MF, P20 DS e M20 DS) apresentaram comportamento de fluxo não-newtoniano e pseudoplástico. A presença de uma região de histerese sugere que todas as formulações apresentaram comportamento tixotrópico

A liberação de CUR das formulações P20 CUR, P20 DS e M20 DS aconteceu de forma controlada no intervalo de tempo de 180 min. O perfil de liberação/dissolução da formulação M20 DS pode favorecer uma ação terapêutica mais efetiva da CUR nos primeiros 180 min. e sugere a manutenção da ação terapêutica a partir desse tempo, uma vez que o percentual liberado foi de 52% e a curva mostra característica ascendente.

As curvas de DSC mostraram que houve a permanência da CUR no estado amorfo quando incorporado ao hidrogel termorresponsivo na forma de DS. A CUR incorporada no estado livre ao hidrogel termorresponsivo passou do estado cristalino para o estado amorfo, não sendo possível observar o pico de fusão da CUR nas curvas termoanalíticas de DSC.

Os espectros obtidos por FTIR mostraram que os estiramentos dos grupamentos químicos da CUR permaneceram quimicamente estáveis nos hidrogéis termorresponsivos.

A análise térmica de DSC permitiu concluir que presença de CUR na formulação M20 (M20 CUR) não influencia na T_m do hidrogel. Já a formulação P20 na presença de CUR, ocorreu redução na área do pico de temperatura de gelificação, que esta relacionada com a viscosidade da formulação.

A análise dos resultados da atividade antioxidante indica a potencial utilização do hidrogel termorresponsivo contendo CUR como agente antioxidante no tratamento de várias doenças que são resultados do estresse oxidativo. %.

A atividade antimicrobiana da CUR quando nos hidrogéis termorresponsivos mostrou ser mais efetivo quando comparado à concentração inibitória mínima da CUR em meio aquoso.

6.8 Referência Bibliográfica

AKA-ANY-GRAH, A. et al. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 76, n. 2, p. 296–303, out. 2010.

ALEXANDRIDIS, P.; ALAN HATTON, T. Poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide)poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, n. 1-2, p. 1–46, 1995.

APISARIYAKUL, A; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of tumeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 49, p. 163–169, 1995.

BALOGLU, E. et al. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 6, p. 627–636, 2011.

BASNIWAL, et al. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.2056-2061, 2011.

CONTE, U., et al. Swellingactivated drug delivery systems. **Biomaterials**, 9, 489-493, 1988.

CHATTERJEE, S.,PADWAL-DESAI, S.R., THOMAS, P. Effect of γ -irradiation on the antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts. **Food Research International**. V.32, n. 7, p.487-490, 1999.

DARANDALE, S. S., & VAVIA, P. R. Cyclodextrin-based nanosponges of curcumin: formulation and physicochemical characterization. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, n. 75, p. 315–322., 2012.

EDSMAN, K.; HÄGERSTRÖM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, p. 3–22, 2005.

ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin-From Molecule to Biological Function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 29 maio 2012.

GANGWAR, R. K. et al. Conjugation of curcumin with PVP capped gold nanoparticles for improving bioavailability. **Materials Science and Engineering: C**, n.32, p.2659–2663, 2012.

HURLER, J. Improved Texture Analysis for Hydrogel Characterization : Gel Cohesiveness , Adhesiveness , and Hardness. **Journal of Applied Polymer Science**, 2011.

KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 1, p. 34–45, 2008.

KRISTL, J.; GRABNAR, P. A. Thermoresponsive polymers : Insights into decisive hydrogel characteristics , mechanisms of gelation , and promising biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, p. 262–275, 2014.

KURITA, T., & MAKINO, Y. Novel Curcumin Oral Delivery Systems. **Anticancer Research**, p.2807–2821, 2013.

LI, S. et al. The viscosity distribution around a rising bubble in shear-thinning non-newtonian fluids. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 265–274, 2012.

MANSUR, C. R. E.; GONZÁLEZ, G.; LUCAS, E. F. Estudo de soluções aquosas de copolímeros em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Polímeros**, v. 9, n. 2, p. 45–53, 1999.

PÉRET-ALMEIDA, L. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 875–881, 2008.

RUEL-GARIÉPY, E.; LEROUX, J.C. In situ- forming hydrogels- review of temperature- sensitive systems. **Journal Pharmaceutical Biopharmaceutical**, n 58, p. 409-426, 2004.

SEO, S.-W. et al. Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol® HS15 as a carrier. **International journal of pharmaceutics**, v. 424, n. 1-2, p. 18–25, 15 mar. 2012.

SCHILD, H.G. Poly (N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, **Progress Polymer Science**. n. 17, p 163-249, 1992.

TUĞCU-DEMİRÖZ, F.; ACARTÜRK, F.; ERDOĞAN, D. Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: Formulation, in vitro and in vivo evaluations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 1, p. 25–39, 2013.

VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1692–1712, 3 nov. 2005.

UR-REHMAN, T., TAVELIN, S., GRUBNER, G. Effect of DMSO on micellization, gelation and drug release profile of P407. **Internacional Journal of Pharmaceutical**. 394, 92–98. 2010.

ZANDI, K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed research international**, v. 2014, p. 186864, 2014.

ZENG, N. et al. Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: Relation between micellization, gelation, mechanic and release properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 467, n. 1-2, p. 70–83, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Tanto a técnica de coprecipitação como fusão, para a obtenção das DS, aumentaram a solubilidade da CUR em água. O melhor resultado foi encontrado para a técnica de coprecipitação, CUR: P407 1:2 m/m.
- A formulação (M20) de hidrogéis composta de P407/Qt/HPMC K4M (20/0,3/0,03g) é uma alternativa viável para a veiculação de curcumina.
- Com base no conjunto dos resultados a formulação M20 DS reúne propriedades químicas, físicas e mecânicas adequadas para veiculação da curcumina e administração vaginal.

REFERÊNCIA

AGUILAR, C.E. et al. Smart Polymers and their applications as biomaterials. **Topics in tissue engineering**, v.3, 2007.

ALEXANDRIDIS, P.; ALAN HATTON, T. Poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide)poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, n. 1-2, p. 1–46, 1995.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, n.10, p.2202-2210, 2010.

ANITHA, A. et al. Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 452-461. 2011.

AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 23, p. 363-398. 2003.

AK, T.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chem. Biological Interaction**, v. 174, p. 27-37. 2008.

AKA-ANY-GRAH, A. et al. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnike**, v. 76, n. 2, p. 296–303, out. 2010.

APISARIYAKUL, A; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of tumeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 49, p. 163–169, 1995.

BAJPAI, A. K. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33, n. 11, p. 1088–1118, 2008.

BALOGLU, E. et al. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 6, p. 627–636, 2011.

BASNIWAL, et al. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.2056-2061, 2011.

BIKIARIS, D. N. Solid dispersions, part I: recent evolutions and future opportunities in manufacturing methods for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion Drug Delivery**, v.8, n.11, p.1501-1519, 2011.

BRAVO-OSUNA, I. et al. In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly (isobutyl cyanoacrylate) core- shell nanoparticles. **International Journal Pharmaceutical**, n.338, p.284-290, 2007.

BROMBERG, L. E.; RON, E. S. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 197–221, 1998.

CAI, S.; SUO, Z. Mechanics and chemical thermodynamics of phase transition in temperature-sensitive hydrogels. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 59, n. 11, p. 2259–2278, 2011.

CALLISTER, W.D.J.; RETHWISH, D.G. Materials science and engineering. **Wileys & Sons, Incorporated**, ed 8, 2009.493, 1988.

CHATTERJEE, S.,PADWAL-DESAI, S.R., THOMAS, P. Effect of γ -irradiation on the antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts. **Food Research International**. V.32, n. 7, p.487-490, 1999.

CHRISTIAN, D.G. Analytical chemistry: solutions manual. **John Wileys & Sons, Incorporated**, ed.162,1994.

CHUAH, A.M. et al. Enhanced bioavailability and bioefficacy of an amorphous solid dispersion of curcumin. **Food Chemistry**, n. 156, p. 227-233, 2014.

CONTE, U., et al. Swellingactivated drug delivery systems. **Biomaterials**, 9, 489-493, 1988.

COOPER, A. Biophysical chemistry. **Royal Society of Chemistry**, p.103-107,2004.

COOPER, A. Microcalorimetry of protein- DNA interactions in travers A, Buckle M (eds): DNA- protein interactions. **Oxford University Press**, p.125-139, 2000.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos.**Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, 2005.

DARANDALE, S. S., & VAVIA, P. R. Cyclodextrin-based nanosponges of curcumin: formulation and physicochemical characterization. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**,n. 75, p. 315–322., 2012.

DAS NEVES, J.; BAHIA, M. F. Gels as vaginal drug delivery systems. **International journal of pharmaceutics**, v. 318, n. 1-2, p. 1–14, 2 ago. 2006.

DAS, S. K. et al. Solid Dispersions : An Approach to Enhance the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. n. 1, p. 37–46, 1960.

De VRIES, M.E. et al. Hydrogels for buccal drug delivery: properties relevant for muco- adhesion. **Journal of Biomedical Materials Research**, n.11, p. 1023-1032, 1988.

DHULE, S. S. et al. Curcumin-loaded γ -cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 4, p. 440–451, maio 2012.

DUARTE, L.; JUCHEM, P.; PULZ, G. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas exemplos brasileiros, v. 30, n. 2, p. 3–15, 2003.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β - caroteno/ ácido linoleico e métodos de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.26, p.446-452, 2006.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–28, dez. 2006.

ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin-From Molecule to Biological Function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 29 maio 2012.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. **Drug Delivery Industrial Pharmacy**, n.24, p. 979-993, 1998.

FIGUEIRAS, A. et al. A comprehensive development strategy in buccal drug delivery. **AAPS Pharmaceutical Science Technology**, n.4, p.1703-1712, 2008.

GALI, Y. et al. In Vitro Evaluation of Viability, Integrity, and Inflammation in Genital Epithelia upon Exposure to Pharmaceutical Excipients and Candidate Microbicides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5105–5114, 2010.

GANGWAR, R. K. et al. Conjugation of curcumin with PVP capped gold nanoparticles for improving bioavailability. **Materials Science and Engineering: C**, n.32, p.2659–2663, 2012.

GILDA S. et al. Activity of water-soluble turmeric extract using hydrophilic excipients. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 59-66. 2010.

GONG, C. et al. Thermosensitive Polymeric Hydrogels As Drug Delivery Systems. **Current Medicinal Chemistry**, p. 79–94, 2013.

GRELA, K. P.; MARCINIAK, D. M.; PLUTA, J. Stability evaluation of thermosensitive drug carrier systems based on Pluronic F-127 polymer. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 71, n. 1, p. 12–14, 2014.

HUANG, F.S. et al. Role of epidermal growth factor and its receptor in chemotherapy-induced intestinal injury. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.252, p. 432-442, 2002.

HUANG, Y.; DAI, W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 18–25, fev. 2014.

HURLER, J. Improved Texture Analysis for Hydrogel Characterization : Gel Cohesiveness , Adhesiveness , and Hardness. **Journal of Applied Polymer Science**, 2011.

JEANG, B.; KIM, S.W.; BAE, Y.H. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.54, p 37-51, 2002.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural , viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, p. 223–233, 1997.

KARAVAS, E., E. GEORGARAKIS, et al. Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions. **European Journal Pharmacy and Biopharmacy**, n.3, p.334-347, 2007.

KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 1, p. 34–45, 2008.

KOFFI, A. A. et al. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 328–335, mar. 2006.

KRISTL, J.; GRABNAR, P. A. Thermoresponsive polymers : Insights into decisive hydrogel characteristics , mechanisms of gelation , and promising biomedical applications. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 472, p. 262–275, 2014.

KURITA, T., & MAKINO, Y. Novel Curcumin Oral Delivery Systems. **Anticancer Research**, p.2807–2821, 2013.

KWEON, H. et al. Preparation of a Novel Poloxamer Hydrogel. **Journal of applied Polymer Science**, v.88, p.2670-2676, 2002.

LAW, S. et al. Regional variation in content, composition and organization of porcine epithelial barrier lipids revealed by thin-layer chromatography and transmission electron microscopy. **Archives of oral biology**, v. 40, n. 12, p. 1085–1091, 1995.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 2, p. 88–98, jun. 2009.

LEUNER, C. e J. DRESSMAN. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal Pharmacy and Biopharmacy**, v.50, n.1, p.47- 60, 2000.

LI, B. et al. Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices. **Carbohydrate Polymers**, n.98(1), p.1108–16, 2013.

LI, J. et al.. Curcumin-Eudragit® E PO solid dispersion: A simple and potent method to solve the problems of curcumin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik**, v.94, p.322–32, 2015.

LIU, T.; CHU, B. Formation of homogeneous gel- like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solutions: FCC to BCC phase transition. **Journal of Applied Cristalografia**, n.33, p. 727-730, 2000.

MAGHAMI, P. et al. Relationship between stability and bioluminescence color of firefly luciferase. **Photochemical Photobiological Science**, n. 9, p.376-385, 2010.

MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life sciences**, v. 78, n. 18, p. 2081–7, 27 mar. 2006.

MANSUR, C. R. E.; GONZÁLEZ, G.; LUCAS, E. F. Estudo de soluções aquosas de copolímeros em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Polímeros**, v. 9, n. 2, p. 45–53, 1999.

MARTINEZ, M.N.;AMIDON, G.L. A Mechanistic approach to **understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals**. **Journal Clinic Pharmacology**, n. 42, p. 620-643, 2002.

MAZZARINO, L. et al. Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 219-226. 2010.

McLACHLAN, D.J. X- ray crystal structure. **McGranw: New York**, ed.1, 1957.

MENG, F. et al. Investigation and correlation of drug polymer miscibility and molecular interactions by various approaches for the preparation of amorphous solid dispersions. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 12–24, 25 abr. 2015.

PANCHATCHARAM M. et al. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and Celular Biochemistry**, 290, 87–96,2006.

PARI, L. et al. Role of curcumin in health and disease. **Arch PhysiolBiochem**, v. 2, n. 114, p. 127-49. 2008.

PARK, K.; ROBNSON, J.R. Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 19, p. 107-127, 1984.

PATIL, P. H.; BELGAMWAR, V. S.; PATIL, P. R. Enhancement of solubility and dissolution rate of poorly water soluble raloxifene using microwave induced fusion method.**Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 49, 2013.

PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

PERIOLI, L. et al. Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 141–145, out. 2008.

PINTO, T.J.A; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. **Atheneu**, ed.2, 2003.

PRIVALOV, G. et al. Precise scanning calorimeter for studying thermal properties of biological macromolecules in dilute solution. **Analytical Biochemistry**, n.232, p. 79-85, 1995.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 49–60, dez. 2012.

RAMALINGAM, P.; KO, Y. T. Enhanced oral delivery of curcumin from N-trimethyl chitosan surface-modified solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic and brain distribution evaluations. **Pharmaceutical research**, v. 32, n. 2, p. 389–402, fev. 2015.

RATHKE, T.D.; HUDSON, S.M. Determination of the degree of N- deacetylcetion in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy. **Polymer Chemistry Edition**, n.31, p. 749, 1993.

RAVI KUMAR, N.M.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, n. 46, p. 1-27, 2000.

RICCI, E. J. et al. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 17, p. 161–167, 2002.

RUEL-GARIÉPY, E.; LEROUX, J.C. In situ- forming hydrogels- review of temperature- sensitive systems. **Journal Pharmaceutical Biopharmaceutical**, n 58, p. 409-426, 2004.

SALMAZI, R, et al. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Nanomedicine**, p. 4815–4824, 2015.

SANTOS, J.E. et al. Polímeros: ciência e tecnologia. **Ciência e Tecnologia**, n.13, p. 242, 2003.

SCHILD, H.G. Poly (N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, **Progress Polymer Science**. n. 17, p 163-249, 1992.

SCHMALJOHANN, D. Thermo – and pH-responsive polymers in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.58, p.1655-1670, 2006.

SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Review**, n. 56, p. 1467- 1980, 2004.

SEO, S.W. et al. Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol® HS15 as a carrier. **International Journal of**

Pharmaceutics, n.424(1-2), p.18–25, 2012.

SETHIA, S. e E. SQUILLANTE. Solid dispersions: revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.20, p.215-247, 2003.

SIEPMANN, J.; GOPFERICH, A. Mathematical modeling of bioerodible , polymeric drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 229–247, 2001.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 48, p. 139–157, 2001.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Spectrometric identification of organic compounds. **John Willeys & Sons, Incorporated**, ed.5, 1991.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos. **John Willeys & Sons, Incorporated**, ed.6, 2000.

SLOMIANY, B.L. et al. Role of associated and covalently bound lipids in salivary mucin hydrophobicity: effect of proteolysis and disulfide bridge reduction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n.3, p 1046-1053, 1988.

TALASAZ, A. H. H. et al. In situ gel forming systems of poloxamer 407 and hydroxypropyl cellulose or hydroxypropyl methyl cellulose mixtures for controlled delivery of vancomycin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, n. 4, p. 2369–2374, 2008.

TUĞCU-DEMİRÖZ, F.; ACARTÜRK, F.; ERDOĞAN, D. Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: Formulation, in vitro and in vivo evaluations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 1, p. 25–39, 2013.

UNEO, H. et al. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. **Biomaterials**, n.22, p. 1667-1673, 2001.

UR-REHMAN, T., TAVELIN, S., GRUBNER, G. Effect of DMSO on micellization, gelation and drug release profile of P407. **Internacional Journal of Pharmaceutical**. 394, 92–98. 2010.

VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1692–1712, 3 nov. 2005.

VERGNAUD, J. M.; AI, A. Effect of the nature of the polymer and of the process of drug release (diffusion or erosion) for oral dosage forms. **Computational and Theoretical Polymer Science**, v. 10, p. 383–390, 2000.

WANG, J., MA, W., & TU, P. The mechanism of self-assembled mixed micelles in improving curcumin oral absorption: In vitro and in vivo. **Colloids and Surfaces. B**,

Biointerfaces, v.133, p.108–19, 2015.

WARD, M.A.; GEORGIU, T.K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. *Polymers*, n. 3, p.1215-1242, 2011.

WU, A.M. et al. Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n.1, p.39-55, 1994.

YUAN, Y. et al. Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide. **International journal of pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 114–9, 1 jul. 2012.

ZANDI, K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed research international**, v. 2014, p. 186864, 2014.

ZENG, N. et al. Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: Relation between micellization, gelation, mechanic and release properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 467, n. 1-2, p. 70–83, 2014.