UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Lígia de Souza Fernandes

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO TÓPICA CONTENDO CURCUMINA: ESTUDOS DE EFETIVIDADE E SEGURANÇA DAS FORMULAÇÕES

Araraquara (SP)
2017

LÍGIA DE SOUZA FERNANDES

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO TÓPICA CONTENDO CURCUMINA: ESTUDOS DE EFETIVIDADE E SEGURANÇA DAS FORMULAÇÕES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo

Araraquara (SP)
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F366d

Fernandes, Lígia de Souza
Desenvolvimento, caracterização e comparação de formulações para aplicação tópica contendo curcumina: estudos de efetividade e segurança das formulações / Ligia de Souza Fernandes. -- Araraquara, 2017.
197 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Maria Virgínia Scarpa.
Coorientador: Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo.

1. Antifúngica. 2. Análise estrutural. 3. *Candida albicans*. 4. Curcumina. 5. Ensaio anti-CVV *in Vivo. 6.* Estabilidade. 7. Liberação *in vitro.* 8. Validação de método analítico. I. Scarpa, Maria Virginia, orient. II. Araújo, Marcelo Gonzaga de Freitas, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

LIGIA DE SOUZA FERNANDES

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO TÓPICA CONTENDO CURCUMINA: ESTUDOS DE EFETIVIDADE E SEGURANÇA DAS FORMULAÇÕES

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestra em Ciências FarmacÊuticas

Araraquara, 01 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

MARIA VIRGÍNIA COSTA SCARPA (ORIENTADORA)

LUIZ ROBERTO BASSO JÚNIOR

LEILA APARECIDA CHIAVACCI

Dedico este trabalho, com todo meu amor e carinho, à Deus, minha coragem e esperança; aos meus pais, ao meu irmão e às minhas avós, por todo amor, carinho, paciência, compreensão, incentivo e principalmente por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus,** que sempre iluminou o meu caminho.

Aos meus **pais, irmão e avós**, por acreditarem em mim e por sempre me ajudarem. Mãe, seu carinho e companheirismo sempre me deram esperança para seguir em frente. Pai, você é o meu porto seguro e o meu melhor amigo. Meu irmão, companheiro de tantas brincadeiras, quero agradecer por ser meu grande amigo. Avós, é muito bom ter vocês em minha vida! Sou abençoada com uma linda família! A segurança e a certeza de que vocês estão comigo em todas as minhas caminhadas me ajudaram a cumprir esta etapa e me sinto feliz por compartilhar este momento com vocês.

À minha querida **profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa**, pela orientação, paciência, convivência e principalmente pela amizade. Quero agradecer imensamente por ter acreditado em mim e por estar ao meu lado. Hoje, além de orientadora, considero minha amiga! Muito obrigada por todo conhecimento compartilhado, pelas risadas, conselhos, conversas e cafés!

Ao **prof. Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo**, pela coorientação, pela paciência e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento científico.

À **profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida e Dr. Gustavo Rossanezi,** pelas sugestões feitas no exame geral de qualificação, que contribuíram para o aperfeiçoamento do trabalho.

À **profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci**, **profa. Dra. Hérida Regina Nunes Salgado**, **prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, prof. Dr. Celso Valentim Santilli** e **Dr. Selma Gutierrez Antonio** por

disponibilizarem equipamentos e matérias primas de seus laboratórios para a realização de meus experimentos.

Às minhas grandes amigas, que conheci durante a realização deste trabalho e que se tornaram muito importantes em minha vida, **Bianca Malfará, Fátima Rodrigues** e **Bianca Rafael Marco Segatto,** agradeço muito pela amizade, conversas, conselhos, risadas e incentivo de todas vocês.

À **Caroline Magnani Spagnol, Bruno Leonardo Caetano, Eloísa Barbel Manaia, Marina Paiva Abuçafy, Felipe Hugo Alencar Fernandes, Márcia Helena Oyafuso, Flávia Lima Ribeiro Maccari, Flávio Alexandre Carvalho, Danubia Gava** e **Neide Perruci**, por toda paciência e conhecimentos compartilhados, que contribuíram com o meu aprendizado.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação **Cláudia, Christiane, Aniele** e **Daniela** pela paciência, atenção e apoio.

Aos **funcionários** da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

À **todos** aqueles que caso esqueci de citar e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

À **Croda do Brasil Ldta** pela doação das matérias primas utilizadas neste trabalho.

À **CAPES** pelo suporte financeiro.

Epígrafe

“Nunca se afaste de seus sonhos.
Porque se eles forem, você continuará vivendo,
mas terá deixado de existir”.

(Mark Twain)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da curmina (CAS: 458-37-7).....16
Figura 2. Emulsão e tipos de separação em emulsões. 19
Figura 3. Ilustração de um diagrama de fases pseudoternário.....20
Figura 4. Estrutura das microemulsões. 21
Figura 5. Ilustração esquemática das mesofases líquido-cristalinas: (1) mesofase lamelar, (2A) mesofase hexagonal, (2B) mesofase hexagonal reversa, (3): mesofase cúbica de monoleolato de glicerila-água. 22
Figura 6. Célula de difusão utilizada para estudos de liberação *in vitro*. Disponível em: <http://www.hansonresearch.com>. Acesso em abril 2017. 63
Figura 7. Esquema de tratamento do ensaio anti-CVV *in vivo*. 68
Figura 8. Classificação visual dos sistemas formados: (A) – Sistema líquido opaco; (B) – Sistema líquido translúcido; (C) – Sistema visoso opaco; (D) – Sistema viscoso translúcido; (E) – Separação de fases. 73
Figura 9. Diagrama de fases pseudoternário constituído por triglicerídeo cáprico/caprílico (FO), fosfatidilcolina de soja e macrogolglicerol ricinolato - proporção 50:50 (T) e tampão acetato de sódio pH 4,5 (FA); regiões formadas e sistema escolhido para o estudo (ponto F27).....73
Figura 10. (A) - Fotomicrografia sob luz polarizada da C com aumento de 10x; (B) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação C com aumento de 20x; (C) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação C_CUR1% com aumento de 10x; (D) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação C_CUR1% com aumento de 20x. 76
Figura 11. (A) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F27 com aumento de 10x; (B) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F27 com aumento de 20x; (C) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F27_CUR1% com aumento de 10x; (D) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F27_CUR1% com aumento de 20x. 77
Figura 12. Difratogramas dos sistemas C e C_CUR1% e seus componentes. 79
Figura 13. Difratogramas dos sistemas F27 e F27_CUR1% e seus components. 81
Figura 14. Curvas de SAXS dos sistemas C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%.....83
Figura 15. Ensaio de curva de fluxo e de viscosidade em função da taxa de cisalhamento (Hz), à temperatura de 30 ºC ± 1, das formulações C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%. 86
Figura 16. Ensaio da varredura de tensão à temperatura de 30 ºC ± 1 dos sistemas C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%.....91

Figura 17. Ensaio de varredura de freqüência à temperatura de 30 ºC ± 1 dos sistemas C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%.....92
Figura 18. Cromatograma obtido com a injeção da solução preparada a partir de C..96
Figura 19. Cromatograma obtido com a injeção da solução preparada a partir de F27. 96
Figura 20. Cromatograma obtido com a injeção da fase móvel. 96
Figura 21. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C_CUR1%. .97
Figura 22. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27_CUR1%. 97
Figura 23. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C_CUR1% em água, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar. 98
Figura 24. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27_CUR1% em água, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar. 98
Figura 25. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C_CUR1% em hidróxido de sódio 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar....98
Figura 26. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27_CUR1% em hidróxido de sódio 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar. 99
Figura 27. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C_CUR1% em ácido clorídrico 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.....99
Figura 28. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27_CUR1% em ácido clorídrico 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar...99
Figura 29. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra C_CUR1% em peróxido de hidrogênio 10 V, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar. 100
Figura 30. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra F27_CUR1% em peróxido de hidrogênio 10 V, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar. 100
Figura 31. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra C_CUR1% exposta à luz UV por 3 horas em balão volumétrico incolor.....100
Figura 32. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra F27_CUR1% exposta à luz UV por 3 horas em balão volumétrico incolor.....101
Figura 33. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C em água, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.....103
Figura 34. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27 em água, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.....103

Figura 35. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C em hidróxido de sódio 0,1 M, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.....104
Figura 36. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27 em hidróxido de sódio 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar..104
Figura 37. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C em ácido clorídrico 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar. 104
Figura 38. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27 em ácido clorídrico 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar. 105
Figura 39. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra C em peróxido de hidrogênio 10 V, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar. 105
Figura 40. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra F27 em peróxido de hidrogênio 10 V, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar. 105
Figura 41. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra C exposta à luz UV por 3 horas em balão volumétrico incolor. 106
Figura 42. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra F27 exposta à luz UV por 3 horas em balão volumétrico incolor. 106
Figura 43. Curva analítica obtida com injeções de soluções padrão de curcumina diluída em metanol, equação da reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (R^2). 107
Figura 44. Curva da analítica acrescida das concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. 112
Figura 45. Cromatogramas obtidos com a injeção das soluções padrão de curcumina nas concentrações de 0,076; 0,15 e 0,25 µg/mL. 113
Figura 46. Formulção C_CUR1% (A) e formulação F27_CUR1% (B) após teste de centrifugação (3000 rpm por 30 minutos). 116
Figura 47. Fotomicrografia sob luz polarizada do sistema C_CUR1% na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade (análise 15 d), com aumentos de 10x e 20x. 118
Figura 48. Fotomicrografia sob luz polarizada do sistema F27_CUR1% na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade (análise 15 d), com aumentos de 10x e 20x. 119
Figura 49. Ensaio de curva de fluxo em função da taxa de cisalhamento (Hz), à temperatura de 30 ºC ± 1, dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d). 120
Figura 50. Gráficos de viscosidade em função da taxade cisalhamento à temperatura de 30 ºC ± 1, dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d). 121

Figura 51. Ensaio da varredura de tensão à temperatura de 30 ºC ± 1 dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d). 124
Figura 52. Ensaio da varredura de freqüência à temperatura de 30 ºC ± 1 dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d). 125
Figura 53. Injeção em CLAE do meio receptor selecionado, utilizando as mesmas condições do método previamente validado. 129
Figura 54. Curva analítica obtida com injeções de soluções padrão de curcumina dissolvida em metanol, utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas no item 5.3.....130
Figura 55. Curva analítica obtida com injeções de soluções padrão de curcumina dissolvida no meio receptor escolhido, utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas no item 5.3. 130
Figura 56. Perfil de liberação *in vitro* (média Q real (µg/cm^2) da curcumina nas formulações C_CUR1% e F27_CUR1% (média de n=5).....133
Figura 57. Secção do epitélio vaginal de ratas submetidas aos tratamentos com os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1%, C_CUR1% e seus respectivos controles (aumento 100x). A: grupo infectados e sem tratamento; B: grupo controle (sistema sem curcumina); C: controle positivo (nistatina); D: controle positivo (clotrimazol); E: C_CUR0,01%; F: C_CUR0,1%; G: C_CUR1%; H: grupo sem infecção. 142
Figura 58. Efeito dos sistemas F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1% na carga fúngica vaginal de ratas infectadas com *Candida albicans* e seus respectivos controles. Infectados e sem tratamento (losango preenchido), F27 (triângulo preenchido), controle positivo clotrimazol (círculo). Dose 1: F27_CUR0,01% (círculo preenchido), Dose 2: F27_CUR0,1% (quadrado preenchido), Dose 3: F27_CUR1% (quadrado). Dados estão expressos como media ± desvio padrão (n=6). *Diferença estatisticamente significativa comparados aos valores obtidos no dia 1 (p<0.05).....146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do sistema emulsionado. 44
Tabela 2. Composição das soluções receptoras avaliados. 61
Tabela 3. Grupos experimentais e protocolos para avaliação da atividade das formulações desenvolvidas contendo curcumina no tratamento da candidíase vulvovaginal (CVV).....69
Tabela 4. Valores de $q_{máx}$ e razões entre as distâncias interplanares para os sistemas C e C_CUR1%. 83
Tabela 5. Valores de $q_{máx}$ e razões entre as distâncias interplanares para os sistemas F27 e F27_CUR1%. 84
Tabela 6. Cálculo da área de histerese para as curvas de fluxo, à temperatura de 30 ºC ± 1, dasformulações C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%. 87
Tabela 7. Valores de viscosidade aparente mínima para os sistemas C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%. 88
Tabela 8. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) dos sistemas estudados. 89
Tabela 9. Análise mais detalhada dos valores G' e G'' do teste oscilatório para as formulações. 93
Tabela 10. Análise quantitativa dos módulos G' (módulo de armazenamento) e G'' (módulo de perda) e parâmetros viscoelásticos dinâmicos da mucina 0,15% e das misturas C_CUR1% com mucina 0,15% e F27_CUR1% com mucina 0,15%. 94
Tabela 11. Resultado do teor das amostras C_CUR1% expostas às diferentes condições de estresse. 101
Tabela 12. Resultado do teor das amostras F27_CUR1% expostas às diferentes condições de estresse. 102
Tabela 13. Dados da linearidade obtida com as injeções de soluções padrão de curcumina em metanol. 108
Tabela 14. Resultados obtidos na análise da precisão com amostra C_CUR1%, feita pelo mesmo analista. 109
Tabela 15. Resultados obtidos na análise da precisão com amostra F27_CUR1%, feita pelo mesmo analista. 109
Tabela 16. Resultados obtidos na análise da precisão intermediária com amostra C_CUR1%, feita por analistas diferentes e em diferentes dias. 110
Tabela 17. Resultados obtidos na análise da precisão intermediária com amostra F27_CUR1%, feita por analistas diferentes e em diferentes dias. 111

Tabela 18. Valores obtidos no ensaio de exatidão utilizando os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1%. 114
Tabela 19. Valores obtidos no ensaio de exatidão utilizando amostras F27_CUR1%. 115
Tabela 20. Áreas de histerese das curvas de fluxo dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d). 121
Tabela 21. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d). 122
Tabela 22. Valores de viscosidade aparente mínima para os sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d). 122
Tabela 23. Análise quantitativa dos módulos G' e G'' para os sistemas C_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d). 126
Tabela 24. Resultados do teor de curcumina nas formações C_CUR1% e F27_CUR1% submetidas ao estudo de estabilidade preliminar. 127
Tabela 25. Resultado da porcentagem solúvel de curcumina nos meios receptores testados por CLAE. 128
Tabela 26. Liberação da curcumina na formulação C_CUR1%. 131
Tabela 27. Liberação da curcumina na formulação F27_CUR1%. 132
Tabela 28. Aplicação dos modelos matemáticos de cinética de liberação para o sistema C_CUR1%. 134
Tabela 29. Aplicação dos modelos matemáticos de cinética de liberação para o sistema F27_CUR1%. 134
Tabela 30. CIM da curcumina sobre diferentes cepas de *Candida sp.* 137
Tabela 31. Atividade antifúngica da curcumina contra *C. albicans* ATCC 10231 com e sem a presença de ergosterol exógeno. 138
Tabela 32. Número de animais infectados nos diferentes dias de tratamento com os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1% e seus respectivos controles. 140
Tabela 33. Quantificação da carga fúngica nos fluidos vaginais dos animais tratados com os sistemas C, C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1% e seus respectivos controles. 141
Tabela 34. Número de animais infectados nos diferentes dias de tratamento com os sistemas F27, F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1% e seus respectivos controles. 144

Tabela 35. Quantificação da carga fúngica nos fluidos vaginais dos animais tratados com os sistemas F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1% e seus respectivos controles. 145

LISTA DE ABREVIAÇÕES

CFM - Concentração fungicida mínima

SLT - Sistema líquido translúcido

SVT- Sistema viscoso translúcido

SLO - Sistema líquido opaco

SVO - Sistema viscoso opaco

SF - Separação de fases

SAXS - Small Angle X-Ray Scattering (Espalhamento de raios-X de baixo ângulo)

DRX – Difração de raios-X

MPL - Microscopia de luz polarizada

CVV - Candidíase vulvovaginal

CVVR - Candidíase vulvovaginal recorrente

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

pH - Potencial hidrogeniônico

HCL - Ácido clorídrico

NaOH – Hidróxido de sódio

TCC - Cloreto de trifeniltetrazólio

CSD - Caldo Sabouraud Dextrose

ASD - Agar Sabouraud Dextrose

TCM - Triglicerídeo de cadeia média

CIM - Concentração inibitória mínima

FDA - Food and Drug Administration

DAD - Diode array detector

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HPLC - High performance liquid chromatography

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

UV - Ultravioleta

C - Sistema emulsionado

C_CUR0,01% - Sistema emulsionado contendo 0,01% de curcumina

C_CUR0,1% - Sistema emulsionado contendo 0,1% de curcumina

C_CUR1% - Sistema emulsionado contendo 1% de curcumina

CEUA - Conselho de Ética do Uso de Animais

UFC - Unidades formadoras de colônias

FO - Fase oleosa

FA - Fase aquosa

G’ - Módulo de armazenamento

G” - Módulo de perda

F27 - Sistema pseudoternário

F27_CUR0,01% - Sistema pseudoternário contendo 0,01% de curcumina

F27_CUR0,1% - Sistema pseudoternário contendo 0,1% de curcumina

F27_CUR1,0% - Sistema pseudoternário contendo 1% de curcumina

USP - United States Pharmacopoeia

3D - Tridimensional

Análise 15 d - Análise após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar

UV-Vis - Ultravioleta-Visível

RE - Resolução

UFSJ - Universidade Federal de São João Del-Rei (MG)

i.p. - Intraperitonial

ANOVA - Análise de variância

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

ATCC - American Type Culture Collection

LQ - Limite de quantificação

DP - Desvio padrão

CV - Coeficiente de variação

M - Média

FR - Fator resposta

C. albicans - *Candida albicans*

GRAS - Generally Recognized As Safe

EUA - Estados Unidos da América

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ROS - Espécies reativas do oxigênio

EEP - Epitélio estratificado pavimentoso

HPV - Human papilomavirus

ISO - International Organization for Standardization

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ICH - International Conference on Harmonisation

RESUMO

A curcumina é o constituinte majoritário encontrado no rizoma da planta *Curcuma Longa L.,* e apresenta diversas atividades farmacológicas. Diversos estudos comprovaram que a curcumina possui excelente atividade antifúngica, sendo um princípio ativo natural promissor para o tratamento de doenças fúngicas. O objetivo específico deste trabalho foi o desenvolvimento de formulações contendo curcumina que possam ter ação contra a candidíase vulvovaginal (CVV). Para a análise estrutural das formulações foram utilizadas as técnicas de microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X à baixo ângulos, difração de raios-X e comportamento reológico, sendo comprovado que os sistemas desenvolvidos apresentam características adequadas e satisfatórias para a aplicação pretendida e com propriedades mucoadesivas. O método analítico proposto para quantificação da curcumina foi revalidado e utilizado nos ensaios de estabilidade e liberação *in vitro*. As formulações desenvolvidas foram submetidas ao estudo de estabilidade preliminar, com o objetivo de garantir a segurança e eficácia das mesmas, e foi comprovada a estabilidade das formulações desenvolvidas. Posteriormente foram feitos os testes de liberação *in vitro*, para verificar a capacidade da curcumina de ser liberada a partir da formulação e exercer sua atividade farmacológica. O sistema emulsionado e o pseudoternário apresentaram taxas de liberação de 0,48% e 0,78% em 12 horas. A atividade farmacológica *in vitro* deste composto ativo, determinou a concentração inibitória mínima contra a levedura *Candida albicans* e também a concentração eficaz para ser incorporada nos sistemas. Após estes ensaios, foi realizado a atividade anti-CVV *in vivo*, as formulações propostas apresentaram resultados satisfatórios e significativos na redução da carga fúngica nos animais infectados. Dessa forma, o promissor agente antifúngico curcumina, incorporado aos sistemas desenvolvidos, podem ser considerados como novas possibilidades na terapia antifúngica.

Palavras-chave: antifúngica. Análise estrutural. *Candida albicans*. Curcumina. Ensaio anti-CVV *in vivo.* Estabilidade. Liberação *in vitro*. Validação de método analítico.

ABSTRACT

Curcumin is the main active compound found in rhizome of *Curcuma Longa L*. plant and has several pharmacological activities. Several studies have shown that curcumin has excellent antifungal activity and it is a promising natural active compound for treatment of fungal diseases. The research objective was formulations development containing curcumin that may have action against vulvovaginal candidiasis (VVC). For formulations structural analysis were used techniques as polarized light microscopy, small angle X-ray scattering, X-ray diffraction and rheological behavior, and the developed systems has presented adequate and satisfactory characteristics according with research objective and with mucoadhesive properties. The proposed analytical method for curcumin quantification was revalidated, then used in stability study and *in vitro* release assays. The formulations were submitted to a preliminary stability study to guarantee its safety and efficacy, this way stability was proven. Subsequently were performed *in vitro* release tests to verify the curcumin ability of release from formulations and to exert its pharmacological activity. The emulsified and pseudoternary systems presented release rates of 0.48% and 0.78% in 12 hours. With the *in vitro* pharmacological activity test was determined the minimal inhibitory concentration against yeast *Candida albicans* and also the effective concentration to be incorporated in the systems. After these tests was performed *in vivo* anti-VVC activity, the formulations has presented satisfactory and significant results regarding reduction of the fungal load in infected animals. Thus curcumin incorporated in the developed systems can be considered as a new possibility in antifungal therapy.

Keywords: Antifungal. Structural analysis. *Candida albicans*. Curcumin. anti-CVV in vivo assay. Stability. In vitro release. Validation of analytical method.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....VIII
LISTA DE TABELAS..... XII
LISTA DE ABREVIAÇÕES.....XV
RESUMO.....XVIII
ABSTRACT.....XIX

1 INTRODUÇÃO.....1

2 REVISÃO DA LITERATURA 5

2.1 *Candida albicans* 6

2.2 Candidíase vulvovaginal (CVV).....7

2.3 Resistência fúngica e importância de novas terapias antifúngicas 10

2.4 Curcumina.....15

2.5 Sistemas de liberação prolongada 18
2.5.1 Emulsões e sistemas pseudoternários.....18

2.6 Microscopia de luz polarizada (MLP) 24
2.7 Espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS) 25

2.8 Reologia 27

2.9 Estudo de estabilidade prelimiar (BRASIL, 2004).....34

2.9 Validação de metodologia analítica.....35

3 OBJETIVOS.....37

3.1 Objetivo geral.....38

3.2 Objetivos específicos.....38

4 MATERIAIS.....39

4.1 Padrões, matérias-primas e meios de cultura.....40

4.2 Solventes e reagentes 41

4.3 Equipamentos e softwares 41

5 MÉTODOS 43

5.1 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS 44
5.1.1 Preparo do sistema emulsionado.....44
5.1.2 Desenvolvimento do sistema pseudoternário 46
5.1.2.1 Construção do diagrama de fases pseudoternário 46
5.1.2.2 Seleção do sistema pseudoternário a partir do diagrama de fases pseudoternário 48

5.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FORMULAÇÕES ESCOLHIDAS 49
5.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP).....49
5.2.2 Difração de raios-X (DRX) 50
5.2.3 Espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS).....50
5.2.4 Comportamento reológico 51
5.2.5 Mucoadesão *in vitro* 52

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DE CURCUMINA NAS FORMULAÇÕES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) 54
5.3.1 Especificidade/Seletividade.....55
5.3.2 Linearidade 55

5.3.3 Precisão 56
5.3.3.1 Precisão (repetibilidade) 56
5.3.3.2 Precisão intermediária 56
5.3.4 Exatidão 56
5.3.5 Limite de quantificação 56

5.4 ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004) 57
5.4.1 Teste de centrifugação 57
5.4.2 Estudo de estabilidade preliminar 58
5.4.2.1 Características organolépticas 58
5.4.2.2 Determinação do pH 58
5.4.2.3 Microscopia de luz polarizada (MLP) 59
5.4.2.4 Comportamento reológico 59
5.4.2.5 Quantificação da curcumina nas formulações 60

5.5 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DAS FORMULAÇÕES ESCOHIDAS 60
5.5.1 Determinação da solubilidade da curcumina e escolha da solução receptora 60
5.5.2 Preparo da solução tampão acetato de sódio pH 4,5 61
5.5.3 Curva analítica da curcumina na solução receptora 61
5.5.4 Ensaio de liberação *in vitro* e avaliação da cinética de liberação 62

5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* 63
5.6.1 Microrganismos 63
5.6.2 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* 64
5.6.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da curcumina (CIM) 64
5.6.2.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima da curcumina (CFM) 65
5.6.2.3 Avaliação do mecanismo de ação: ligação da curcumina ao ergosterol exógeno 66

5.7 ENSAIOS EXPERIMENTAIS DE CVV *IN VIVO* E TRATAMENTOS 66
5.7.1 *C. albicans,* condições de crescimento e inóculo 66
5.7.2 Preparo das formulações e doses administradas 66
5.7.3 Avaliação da atividade anti-CVV dos sistemas desenvolvidos contendo curcumina 67
5.7.3.1 CVV experimental 67
5.7.3.2 Tratamentos com os sistemas desenvolvidos 69
5.7.3.3 Análise estatística 70

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES 71

6.1 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS 72
6.1.1 Preparo do sistema emulsionado 72
6.1.2 Desenvolvimento de um sistema pseudoternário e nanoestruturado 72
6.1.2.1 Construção do diagrama de fases pseudoternário e seleção da formulação 72

6.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FORMULAÇÕES ESCOLHIDAS 74
6.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP) 74
6.2.2 Difração de raios-X (DRX) 78
6.2.3 Espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS) 82
6.2.4 Comportamento reológico 85
6.2.5 Mucoadesão *in vitro* 94

6.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DE CURCUMINA NAS FORMULAÇÕES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) 95
6.3.1 Especificidade/Seletividade 95
6.3.2 Linearidade 107
6.3.3 Precisão 109
6.3.3.1 Precisão (repetibilidade) 109

6.3.3.2 Precisão intermediária 110
6.3.4 Limite de quantificação 111
6.3.5 Exatidão 113

6.4 ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004) 115
6.4.1 Teste de centrifugação 116
6.4.2 Características organolépticas 117
6.4.3 Determinação do pH 117
6.4.4 Microscopia de luz polarizada 117
6.4.5 Comportamento reológico 120
6.4.6 Quantificação de curcumina nas formulações 126

6.5 AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* 127
6.5.1 Teste de solubilidade e escolha da fase receptora 127
6.5.2 Ensaio de liberação *in vitro* 131

6.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* 137
6.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima da curcumina (CIM) e determinação da concentração fungicida mínima da curcumina (CFM) 137
6.6.2 Avaliação da atividade antifúngica sobre a membrana celular: ensaio de ligação da curcumina ao ergosterol exógeno 138

6.7 ENSAIOS EXPERIMENTAIS DA CVV *IN VIVO* 139
6.7.1 Avaliação da atividade anti-CVV dos sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1% 139
6.7.2 Avaliação da atividade anti-CVV dos sistemas F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1% 144

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 149

8 CONCLUSÃO 153

REFERÊNCIAS 155

APÊNDICE I 173

1 INTRODUÇÃO

A *Candida albicans* é uma espécie polimórfica, ou seja, é capaz de crescer nas formas de levedura, pseudo-hifas e filamentos (hifas), sendo que esta última forma desempenha uma função importante na invasão de tecidos e no estabelecimento de infecções.

A espécie *Candida albicans* é a mais abundante dentre todas as espécies deste gênero e habita de forma comensal os mais variados nichos corporais (MOLERO et al., 1998; BARBEDO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016).

A *Candida albicans* é o princial causador da candidíase vulvovaginal (CVV). Esta infecção representa de 17 a 39% dos casos, sendo que a espécie *Candida albicans* é responsável por 85 a 90% dos casos (SOBEL, 2015; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015; RODRIGUES et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016; MANE et al., 2016; MIRÓ et al., 2017).

A candisíase vulvovaginal caracteriza-se por prurido, ardor, dor ao ter relações sexuais, coceira, eliminação de corrimento vaginal em grumos, inodoros e com aspecto farináceo quando depositado nas roupas. A vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas ocorrendo ardor ao urinar e sensação de queimadura (PATEL et al., 2004; SOBEL, 2007; POWELL & NYIRJESY, 2014).

A *Candida albicans* tem importância tanto quanto à gravidade de suas infecções e quanto à sua capacidade de desenvolver resistência aos antifúngicos (PRASAD & KAPOOR, 2005; MORACE; PERDONI, BORGHI, 2014; WANG, Y. et al., 2015; WANG, B. et al., 2015; LIU et al., 2015; LO et al., 2015).

Como a prevalência da *Candida albicans* é grande, torna-se preocupante a incidência de cepas de *C. albicans* resistentes aos antifúngicos “azóis” disponíveis no mercado, gerando problemas para terapia desta infecção, por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas (PRASAD & KAPOOR, 2005).

Diversos estudos mostraram que curcumina se apresenta como um ótimo agente antifúngico contra *Candida albicans.* A curcumina é o principal composto ativo extraído do rizoma da planta *Curcuma Longa L*. e além da sua atividade antifúngica, este princípio ativo apresenta diversas propriedades farmacológicas (MARTINS et al., 2009; NEELOFAR et al., 2011; ALSHEHRI et al., 2014; SIVIERO et al. 2015; GUNES, et al. 2016; KÖLLNER et al., 2017).

No entanto, o uso da curcumina é limitado devido à sua baixa solubilidade aquosa, resultando em restrições farmacotécnicas, como a dificuldade em incorporá-la nas formulações. Os sistemas para aplicação vaginal atualmente disponíveis, como os cremes, géis, óvulos, também possuem limitações, tais como perda de fármaco no local de ação, o que contribui para uma menor exposição ao princípio ativo. Por via oral, a curcumina apresenta baixa biodisponibilidade e rápido metabolismo hepático, pertencendo aos fármacos de classe IV, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON et al., 1995; CARR et al., 2015).

Dessa forma, o emprego de emulsões e sistemas nanoestruturados (como microemulsões e cristais-líquidos), capazes de contornar o problema de baixa solubilidade aquosa da curcumina, e ainda promover uma liberação prolongada do fármaco no sítio de ação são boas estratégias para novas terapias antifúngicas (BHARDWAJ et al., 2012; SIVIERO et al., 2015; CARR et al., 2015; BAJPAI et al., 2015; LU; KELLY; MIAO, 2016; KÖLLNER et al., 2017).

Considerando a importância que a curcumina tem enquanto composto bioativo e que a complexidade dos diferentes componentes presentes em preparações farmacêuticas podem interferir na eficácia de seus princípios ativos e estes na estabilidade do veículo, faz-se necessário avaliar a estabilidade da formulação, monitorar a estabilidade organoléptica (aspecto, cor e odor) e físico-química, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança das formulações (PAVELIC et al., 2004; SQUIER et al., 2008).

Ao estudar a estabilidade da curcumina nas formulações, é necessário um método analítico confiável e reprodutível. Assim, para dar segurança aos resultados realiza-se a validação do método analítico; os parâmetros avaliados na validação de uma metodologia analítica são: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

O método analítico validado também é utilizado nos ensaios de liberação *in vitro*. Este ensaio é essencial para obter resultados sobre a quantidade de fármaco que é capaz de “sair” da formulação e atingir o sítio alvo. Este ensaio também permite estudar a cinética de liberação do princípio ativo dos sistemas.

O desenvolvimento de um sistema, também envolve sua caracterização

físico-química com o objetivo de conhecer as estruturas e o grau de organização dos arranjos formados, o arranjo estrutural influencia no perfil de liberação do fármaco incorporado e confere diferentes características aos sistemas. A caracterização reológica fornece informações sobre o comportamento reológico desde o momento da aplicação da formulação até até sua permanência no local de ação, também avalia a rede estrutural do sistema e sua influência no perfil de liberação do fármaco.

Este trabalho consiste no desenvolvimento de um sistema de liberação prolongada e na comparação com uma emulsão desenvolvida pelo grupo de pesquisa do coorientador deste trabalho. Outros tópicos importantes abordados são: estabilidade físico-química e comprovação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra *Candida albicans*. Além disso, a avaliação da liberação *in vitro* da curcumina e a análise estrutural dos sistemas, fornecem informações sobre o perfil de liberação do fármaco. Todos esses aspectos abordados são essenciais no desenvolvimento de novos produtos, com o objetivo de obter novas terapias antifúngicas para o tratamento da CVV.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Candida albicans*

A microbiota vaginal normal é rica em *Lactobacillus sp* produtores de ácido lático, responsáveis por manter a acidez do pH vaginal, o que dificulta a proliferação de outros microrganismos; a sua competição pela adesão ao epitélio vaginal também dificulta a proliferação desses outros microrganismos, no entanto, a levedura *Candida albicans* é capaz de crescer neste meio e tornar-se patogênico quando ocorre alguma alteração no ambiente vaginal (fungo comensal oportunista), causando a candidíase vulvovaginal (CVV) (ZIARRUSTA et al., 2002; LINHARES et al., 2005; BARBEDO et al., 2010).

O gênero *Candida sp* compreende mais de 200 espécies, no entanto, apenas algumas têm sido correlacionadas às doenças humanas, como: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis, Candida parapsilosis, Candida tropicalis, Candida glabrata, Candida kefyr, Candida lusitaniae, Candida krusei, Candida guilliermondii, Candida util, Candida lipolytica, Candida famata, Candida haemulonii e Candida rugosa* (SILVA, 2011; RODRIGUES et al., 2016; ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2017).

As espécies de *Candida sp* colonizam de forma frequente a pele e membranas mucosas. A espécie *C. albicans* é a mais abundante e habita de forma comensal diversos nichos corporais, como orofaringe, mucosa oral, trato gastrointestinal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (MOLERO et al., 1998; BARBEDO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016).

O espectro de doenças causadas por *Candida* abrange desde infecções superficiais, como doenças mucocutâneas, até infecções invasivas que podem atingir qualquer órgão levando ao óbito (RODRIGUES et al., 2016).

A *Candida albicans* possui alta capacidade de infestação, pois várias cepas desta espécie podem proliferar em diversas membanas e mucosas de um indívíduo, ao mesmo tempo. Sua rápida proliferação e fixação é um fator preocupante, pois esta levedura possui plasticidade morfogênica, podendo se desenvolver tanto na forma leveduriforme quanto na forma de hifas. Nesta última forma, a proliferação em tecidos do corpo humano ocorre de forma mais abrangente, podendo atingir mucosas e órgãos como fígado, pele e útero (RODRIGUES et al., 2016).

A *C. albicans* é polimórfica, ou seja, apresenta crescimento como levedura a 30 °C, como forma filamentosa (hifas) a 37 °C e como pseudo-hifas. As formas filamentosas proporcionam um aumento da resistência à fagocitose quando comparado com a levedura, assim, a virulência da *Candida albicans* está estritamente relacionada com a capacidade de formação de hifas, sendo esta transição levedura-hifa primordial para o desenvolvimento da infecção (TSANG et al., 2012; ANGEBAULT et al., 2013). Segundo Kashem et al. (2015), existem cepas mutantes de *Candida albicans* que são incapazes de formar filamentos e por isso não conseguem estabelecer infecções robustas, o que sugere que a transição de levedura para hifa é um fator importante para desenvolver a infecção.

Esta mudança morfotípica é regulado por uma rede complexa de elementos sensores que detectam alterações no microambiente e regulam os fatores de transcrição que codificam a formação de hifas, produção de adesinas, enzimas hidrolíticas prejudiciais ao hospedeiro (proteases, fosfolipases e hemolisina) e formação de biofilme, que confere alta capacidade de aderência. Estes fatores mostram a grande capacidade de se defender contra o sistema imunológico do hospedeiro (SARDI et al., 2013; HOLLAND et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016).

O biofilme é o tipo de crescimento prevalente na natureza e consistem em uma complexa população de células associadas às superfícies das mucosas, em níveis sistêmicos ou até mesmo em dispositivos médicos, tornando as células mais resistentes aos antifúngicos (RODRIGUES et al., 2016).

A espécie *Candida albicans* possui muita importância na prática clínica, devido ao grande número de infecções e ainda, devido às infecções severas e letais provocadas por esta espécie (KIM et al., 2011).

2.2 Candidíase vulvovaginal (CVV)

A candidíase pode ser cutânea, mucosa, mucocutânea, visceral e pode atingir até mesmo níveis sistêmicos (candidemia). Os fungos têm preferência por superfícies quentes e úmidas, sendo frequentes nas regiões vaginais e na boca. Estas são as manifestações mais comuns do estado infeccioso e, apesar de normalmente não apresentarem ameaças à vida do hospedeiro, alguns

casos graves da infecção podem alcançar níveis sistêmicos colocando o paciente em risco (NYIRJESY et al., 2008).

Quando a infecção se dá na vagina, chama-se de candidíase vulvovaginal (CVV). A CVV pode ser classificada como complicada ou não complicada, de acordo com as manisfestções clínicas, microbiológicas e resposta do paciente à terapia (NAGASHIMA; YAMAGISHI; MIKAMO, 2016).

Dentre as vulvovaginites, a CVV é a segunda mais frequente, estimada em 17 a 39% dos casos, atrás somente das vaginoses bacterianas, sendo que a espécie *Candida albicans* é responsável por 85 a 90% dos casos, seguida pelas espécies *C. Glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilopsis* (CONSOLARO et al., 2004; LINHARES et al., 2005; SILVEIRA et al., 2010; BARBEDO et al., 2010; LOCKHART, 2014; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015; SOBEL, 2015; RODRIGUES et al., 2016; MANE et al., 2016; MIRÓ et al., 2017).

A CVV é a inflamação da vulva e vagina, caracterizada por prurido, ardor e dor à micção causando sensação de queimadura, dispareunia na vagina, coceira, eliminação de corrimento vaginal em grumos, inodoros e com aspecto farináceo quando depositado nas vestes; a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, também podem ser observadas fissuras, maceração da vulva e colo do útero recobertos por placas brancas ou branco-acinzentadas; as lesões podem estender-se pelo períneo, região perianal e iguinal (PATEL et al., 2004; SOBEL, 2007; ARAÚJO et al., 2011; GAZETA-JÚNIOR et al., 2011; POWELL & NYIRJESY, 2014; SOBEL, 2015).

Esta patologia está relacionada com uma morbidade significativa e afeta mulheres de todas as idades, especialmente na idade adulta, sendo considerada um grande problema de saúde pública. Cerca de 75% das mulheres já tiveram um episódio de CVV aguda durante a vida, sendo que 50% apresentaram outros episódios e 5% a 10% das mulheres desenvolveram candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), definida como quatro ou mais episódios em um ano (SILVEIRA et al., 2010; MIRÓ et al., 2017).

É importante ressaltar que os vários episódios da CVV aguda ou a CVVR afetam profundamente a qualidade de vida das mulheres infectadas (SOBEL, 2015), segundo dados epidiomiológicos, a CVVR afeta 138 milhões de mulheres em todo o mundo (MIRÓ et al., 2017). De acordo com Lockhart

(2014), a candidemia e candidíase estão entre as mais frequentes infecções relacionadas à assistência de saúde e leva à uma significativa morbidade e mortalidade (PATEL et al., 2004; POWELL & NYIRJESY, 2014; VRZAL; BITTNER; NEPERENY, 2015).

Muitos pacientes consideram as infecções vulvovaginais simples e fáceis de tratar e por isso falhas no tratamento e infecções recorrentes ocorrem comumente. Como os sintomas são inespecíficos, o autodiagnóstico e a automedicação são muito comuns (SILVEIRA et al., 2010).

Os pacientes com tais infecções são freqüentemente submetidos aos mesmos esquemas ineficazes de tratamento e para a maioria das mulheres com infecções vaginais crônicas ou recorrentes, deveriam haver abordagens e estudos diferenciados para avaliação e tratamento a fim de produzir resultados satisfatórios. A ausência de testes de diagnóstico rápido, simples e de baixo custo continua a resultar em ambos sobrediagnóstico e subdiagnóstico de candidíase vulvovaginal (RODRIGUES et al., 2016; POWELL & NYIRJESY, 2014).

É muito importante o diagnóstico correto, pois a falta de dignóstico e tratamento incorreto, devido aos sintomas inespecíficos da CVV (pois diversas infecções causam os mesmos sintomas) levam a um número significativo de mulheres portadoras de infecção vaginal de “repetição”, as quais foram tratadas contra uma patologia que não estava ligada ao agente suspeito (SILVEIRA et al., 2010; MIRÓ et al., 2017).

A cultura positiva de levedura permite especiação do organismo causador, que por sua vez pode ter implicações importantes para o tratamento antifúngico. Embora a cultura de células também permite o acesso ao organismo para testes de suscetibilidade aos antifúngicos, tais testes são raramente utilizados. A CVVR (candidíase vulvovaginal recorrente) em algumas mulheres pode ser devido à resistência do microrganismo ao medicamento, por isso essa condição crônica exige tratamento prolongado para obter alívio e resolução dos sintomas (POWELL & NYIRJESY, 2014; MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014; WANG, Y. et al., 2015; WANG, B. et al., 2015; LIU et al., 2015; LO et al., 2015).

Os fatores que aumentam o risco da CVV são: diabetes mellitus não controlada, pacientes com imunossupressão, gravidez, tratamentos de

reposição hormonal, aspectos genéticos, uso de fármacos com amplo espectro de ação e fatores comportamentais, como hábitos de vestuário, higiene pessoal, uso de contraceptivo e práticas sexuais (PATEL et al., 2004; SOBEL, 2007). A modulação ou o desequilíbrio dos hormônios reprodutivos (gravidez, terapia hormonal, uso de anticoncepcionais) e o uso de antibióticos também são fatores que aumentam o risco de incidência da doença (PATEL et al., 2004; FIDEL, 2007; ACHKAR & FRIES, 2010; POWELL & NYIRJESY, 2014; MIRÓ et al., 2017).

Esses fatores de risco estão relacionados à disponibilidade de nutrientes para o fungo, por exemplo, pacientes diabéticos, que possuem alto teor de glicose; os elevados níveis de hormônios reprodutivos que aumentam o teor de glicogênio em células epiteliais vaginais e ainda o estrógeno, que aumenta a adesão do fungo na superfície das células (MIRÓ et al., 2017).

2.3 Resistência fúngica e importância de novas terapias antifúngicas

A *Candida albicans* tem importância não só relacionado à gravidade de suas infecções, mas também à sua capacidade de desenvolver resistência aos antifúngicos (PRASAD & KAPOOR, 2005; MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014; WANG, Y. et al., 2015; WANG, B. et al., 2015; LIU et al., 2015; LO et al., 2015).

Em geral, a maioria das pacientes devem responder de forma imediata ao ratamento realizado com antifúngicos disponíveis no mercado, como o fluconazol, miconazol e nistatina, porém, nos últimos anos esses tratamentos vêm apresentando ineficácia, devido à resistência fúngica aos derivados azólicos; os cremes vaginais à base de anfotericina B também tem sido muito utilizados; no entanto, a utilização a longo prazo deste fármaco apresenta efeitos nefrotóxicos (CHAI et al., 2013).

Segundo Sobel (2015), os estudos epidemiológicos da última década revelaram que quase todas as mulheres diagnosticadas com CVVR causada por *Candida albicans* resistentes ao fluconazol apresentaram uma exposição anterior considerável à este fármaco, o que está associado às pacientes que não aderiram de forma correta aos esquemas de tratamentos com fluconazol, e isso torna-se um fator de risco para o surgimento de cepas resistêntes à este

fármaco. Nestes casos, deve ser determinada a resistência cruzada a outros azóis como alternativas de tratamento para fluconazol. Em casos de resistência cruzada, as opções de terapia intensiva são limitadas e deve-se recorrer à terapia a longo prazo utilizando nistatina vaginal ou ácido bórico, no entanto, estes casos possuem poucos dados de eficácia publicados.

Como a *Candida albicans* é responsável pela maioria das infecções, é preocupante a incidência de cepas de *Candida albicans* resistentes aos antifúngicos “azóis”, que têm aumentado consideravelmente, criando sérios problemas para uma quimioterapia bem-sucedida (PRASAD & KAPOOR, 2005). Estudos mostram que 29 cepas de *Candida albicans* são resistentes ao fluconazol e freqüentemente é demonstrado resistência cruzada a outros medicamentos “triazóis”. A resistência deve ser suspeitada em pacientes aderentes à terapia, mas com a falta de resposta, e que possuem persistentemente resultado positivo para culturas de leveduras (SOBEL et al., 1998; LOCKHART, 2014).

O aumento do uso de antifúngicos, tanto para fins terapêuticos quanto profiláticos, terapias prolongada para CVVR e o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, são fatores de risco para o surgimento da resistência aos medicamentos “azóis” em *C. albicans* (SOBEL et al., 2003; GALLE & GIANINNI, 2004; NUCCI & MARR, 2005; PRASAD & KAPOOR, 2005; DALAZEN et al., 2011; BENEDETTI; FORNARI; SHERVINSK, 2011; SALEHEI; SEIFI; MAHMOUDABADI, 2012; MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014; LOCKHART, 2014; WANG, Y. et al., 2015; WANG, B. et al., 2015; LIU et al., 2015; LO et al., 2015; NAGASHIMA; YAMAGISHI; MIKAMO, 2016).

Estudos com *Candida albicans* mostraram vários mecanismos moleculares associados à resistência ao fluconazol, como por exemplo, as alterações genéticas no gene ERG11. O gene ERG11 codifica a enzima lanosterol 14-alfa demetilase, responsável pela biossíntese do ergosterol (componente da membrana celular dos fungos). A lanosterol 14-alfa demetilase é a proteína alvo de atuação dos fármacos “azóis”, a inibição ocorre através da ligação nitrogênio livre do anel “azol” ao átomo de ferro presente na enzima levando à síntese de compostos tóxicos, que não substituem o ergosterol da membrana fúngica. Então, a sobre-expressão deste gene está relacionado à diminuição da eficácia destes fármacos. Segundo Mane (2016) as mutações

deste gene provocaram um aumento de mais de quádruplo na CIM do fluconazol. Outro mecanismo de resistência se dá pelo transporte dos fármacos para fora da célula através da membrana celular, diminuindo a concentração dos antifúngicos no interior das células fúngicas.

Existem também outros mecanismos de resistência, não esclarecido ainda, mas que não se limitam a alterações na estrutura da membrana plasmática, mas podem estar relacionados com o metabolismo mitocondrial, homeostase do cálcio (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015; MANE et al., 2016).

A grande maioria dos dados analisados associados à resistência ao fluconazol se originam dos EUA e do Reino Unido, enquanto há escassez de dados na literatura sobre a região asiática e outros países em desenvolvimento (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015; RODRIGUES et al., 2016; MANE et al., 2016).

Existem também muitos problemas relacionados aos fármacos disponíveis; vários antifúngicos utilizados para o tratamento de CVV apresentam toxicidade elevada, o fluconazol, por exemplo, causa intolerância gastrintestinal, dor de cabeça, e erupção cutânea como efeitos colateriais o que dificulta também a adesão ao tratamento (SOBEL et al., 1998; RAJESHKUMAR & SUNDARARAMAN, 2012).

Atualmente existem diversas classes terapêuticas antifúngicas disponíveis com diferentes mecanismos de ação, como os agentes poliênicos, imidazóis, triazóis, alilaminas, equinocandinas, entre outros.

Os agentes antifúngicos poliênicos, como a anfotericina B e nistatina, não possuem relatos de resistência fúngica, no entanto, a anfotericina B, fármaco de referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas, teve seu uso restrito à administração sistêmica pois não é absorvida pelo trato gastrintestinal. Apesar de bastante eficaz apresenta elevada toxicidade sistêmica e local, causando significativos efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos. A nistatina também é altamente tóxica quando usada por via sistêmica, o que limita seu uso terapêutico (CAMPOY & ADRIO, 2017; WHALEY et al., 2017)

Os agentes antifúngicos azólicos são classificados em imidazólicos e trizólicos. Os agentes imidazólicos são representados principalmente pelo clotrimazol, cetoconazol, miconazol e tioconazol.

O clotrimazol também teve seu uso restrito à aplicação externa devido à sua alta toxicidade; o miconazol é pouco absorvido pelo trato gastrintestinal e deve ser administrado por via intravenosa, este fármaco é recomendado para o tratamento das infecções causadas por espécies de *Candida sp* mas apresenta elevada concentração inibitória mínima *in vitro* para a maioria das espécies de *Candida sp* (WHALEY et al., 2017).

O cetoconazol apresenta poucos efeitos tóxicos e excelente ação contra a maioria das espécies de *Candida sp*, mas acredita-se que para o tratamento ser eficaz, o antifúngico deve ser administrado por longos períodos (WHALEY et al., 2017).

Os agentes triazólicos, são representados principalmente pelo fluconazol, cetoconazol, itraconazol e voriconazol. O fluconazol possui boa absorção gastrointestinal e é adequado para o tratamento da candidíase superficial (orofaringe, esôfago ou vaginal), apesar de também apresentar efeitos hepatotóxicos. Devido às suas boas propriedades farmacocinéticas e seu amplo espectro de atividade, o fluconazol foi o fármaco de referênia contra doenças fúngicas na década de 90, no entanto, sua prescrição excessiva, tanto para fins profiláticos quanto terapêuticos, ocasionou um aumento da resistência fúngica aos medicamentos “azoís” (CAMPOY & ADRIO, 2017; WHALEY et al., 2017).

Quanto à resistência cruzada entre “azóis”, esta pode ocorrer facilmente, sendo causada pela exposição prévia à esses fármacos, por exemplo, ao se induzir resistência ao fluconazol é possível notar a resistência cruzada ao itraconazol (NUNES et al., 2011).

O itraconazol, possui um amplo espectro de atividade, no entanto, sua característica hidrofóbica causa maior efeito tóxico que o fluconazol. O fluconazol e o itraconazol apresentam também algumas interações medicamentosas procupantes com os fármacos utilizados na quimioterapia da AIDS. Essas interações podem resultar em uma diminuição da concentração dos medicamentos azólicos ou mesmo em um aumento da toxicidade (GUENNEC et al., 1995).

As alilaminas, como a terbinafina, causa hepatotoxicidade e a classe das equinocandinas, utilizadas em casos de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, não são bem absorvidas quando

administradas oralmente, por isso a administração é intravenosa (WHALEY et al., 2017).

Existem outros fármacos disponíveis, como griseofulvina e fluorocitosina, no entanto, também causam hepatotoxicidade. Entretanto, seu maior problema é a alta porcentagem de resistência das cepas de *Candida sp*, sua resistência geralmente ocorre durante o tratamento (WHALEY et al., 2017).

No geral, os agentes antifúngicos são extremamente tóxicos, sendo geralmente associados a muitos efeitos colaterais como nefrotoxicidade, leucopenia, hepatomegalia, letargia, ataxia, anemia entre outros (GUENNEC et al., 1995; CAMPOY & ADRIO, 2017; WHALEY et al., 2017).

A resistência fúngica aos fármacos disponíveis é um problema emergente. Considerando que as leveduras possuem diversos mecanismos para driblar a ação dos fármacos. A *Candida albicans* tem oferecido maior resistência aos antifúngicos, especialmente entre pacientes imunocomprometidos, pacientes transplantados e oncológicos. A resistência fúngica aos medicamentos azóis é cada vez mais relatada e as infecções por *Candida sp* mais susceptíveis às drogas estão gradativamente sendo substituídas por infecções causadas por cepas mais resistentes (GUENNEC et al., 1995; CAMPOY & ADRIO, 2017).

Quanto às aplicações tópicas, os sistemas para aplicação intravaginal atualmente disponíveis, como os cremes, géis, óvulos, também possuem algumas limitações, tais como perda de fármaco no local de ação e mucoadesão restrita, o que contribui para uma menor exposição ao princípio ativo (CARR et al., 2015).

A falta de compostos antifúngicos com poucos efeitos colaterais reforça a importância dos produtos naturais como novas terapias antifúngicas, pois apresentam vantagens quando comparados com os fármacos convencionais, como mínimos efeitos colaterais (toxicidade diminuída para as células do hospedeiro) e portanto, maior adesão ao tratamento e baixo custo (RAJESHKUMAR & SUNDARARAMAN, 2012).

Considerando todo este cenário, conclui-se que o arsenal terapêutico antifúngico é limitado o que torna necessário novas abordagens terapêuticas.

2.4 Curcumina

A curcumina é um princípio ativo extraído do rizoma da planta *Curcuma longa L*., pertencente à família Zingiberaceae, é amplamente utilizada na culinária e na área da saúde, devido às suas importantes ações farmacológicas (RAMSHANKAR & SURESH, 2008; ASHRAFL et al., 2012; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

A curcumina é o principal constituinte ativo da *Curcuma longa L*., sendo também encontrado em outras espécies de Curcuma spp, é comumente chamado de cúrcuma e caracteriza-se por possuir uma forte pigmentação amarela. Possui origem polifenólica e os flavonoides como metabólitos secundários; a curcumina é considerada o marcador químico para esta espécie. Os outros curcuminóides são encontrados de forma minoritária no rizoma da planta *Curcuma longa L.* Os curcuminóides são: curcumina (77%), desmetoxicurcumina (17%) e bis-desmetoxicurcumina (3%) (ANSARI et al., 2005; RAMSHANKAR & SURESH, 2008; GANTAIT, BARMAN, MUKHERJEE, 2010; ASHRAFL et al., 2012; SHEN, JI, 2012; PAULUCCI et al., 2013; LESTARI & INDRAYANTO, 2014; SIVIERO et al., 2015).

A curmunina também é o composto mais conhecido do grupo dos diarileptanóides, compostos formados por dois anéis aromáticos separados por sete carbonos (LESTARI & INDRAYANTO, 2014).

Dentre as propriedades medicinais da curcumina encontram-se: ações anti-inflamatórias, antioxidante, antibactericida, anticoagulante, antitumoral, hipocolesterolemia, antiespasmódica, cicatrizante, possui ações imunomodulátorias, antiprotozoária, anti-diabetes, antiangiogênica, antiartrítica, antisquêmica, hepatoprotetora, anti-alérgica, imunizantes, anti-HIV, anti-fúngica, neuroprotetora, ajuda no tratamento e prevenção de doenças de Alzaimer, doenças respiratórias, depressão e outras aplicações (APLSARLYAKUL, VANITTANAKOM, BUDDHASUKH, 1995; SELVAM et al., 1995; ANSARI et al., 2005; COUSINS et al., 2007; RAMSHANKAR & SURESH, 2008; GANTAIT, BARMAN, MUKHERJEE, 2010; SINGH et al., 2010; ASHRAFL et al., 2012; SHEN, JI, 2012; KORANY et al., 2013; KADAM et al., 2013; PAULUCCI et al., 2013; CAO, XU, LIU, 2014; MEMVANGA et al., 2014;

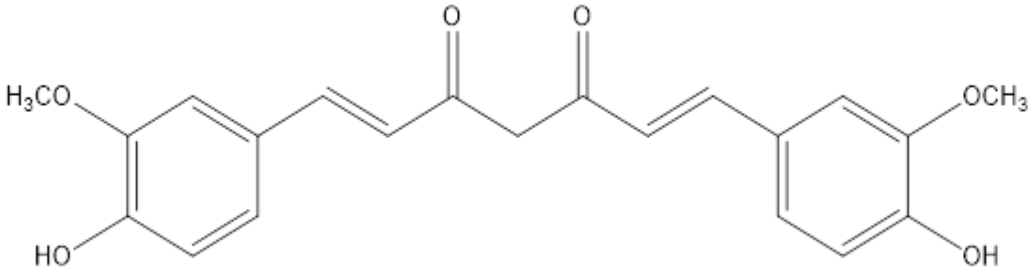
SUETH-SANTIAGO et al., 2015; SILVA-BUZANELLO et al., 2015; SYED et al., 2015; LU, KELLY, MIAO, 2016; TEJADA et al., 2016; GATTOC et al., 2017).

O composto fenólico curcumina, quimicamente nomeado como [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6- heptadieno-3, 5-diona], possui baixa solubilidade em água, em pH neutro e ácido à temperatura ambiente (11 ng/mL, log P = 3,29; características hidrofóbicas); solúvel em dimetilsulfóxido, acetona, clorofórmio, hexano, etanol, metanol, ácido acético glacial, óleos e em pH básico. Possui três hidrogênios ácidos, sendo os hidrogênios adjacentes às duas carbonilas, os mais ácidos deles (pKa_1<1, pKa_2 = 8,38, pKa_3 = 9,88 e pKa_4 = 10,51); a molécula possui isomeria e a cadeia carbônica entre os anéis aromáticos conferem hidrofobicidade e flexibilidade à molécula possibilitando encaixar-se em diversos sítios de ligações, além disso exibem forte absorção entre 420 e 430 nanômetros (comprimentos de onda dentro do espectro de luz visível) quando dissolvida em solvente orgânico (INDIAN PHARMACOPOEIA, 2010; KADAM et al., 2013; XUA et al., 2014; LESTARI & INDRAYANTO, 2014; SUETH-SANTIAGO et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; SIVIERO et al., 2015; TEJADA et al., 2016; BHAGYASHREE, ROHIT, SHRINIWAS, 2017).

Quanto à degradação, a curcumina é facilmente decomposta quando exposta à luz brilhante, condições de alta temperatura, meios oxidativos e pH alcalino (COUSINS et al., 2007; LU, KELLY, MIAO 2016; TEJADA et al., 2016).

A fórmula molecular da curcumina é: $C_{21}H_{20}O_6$, a massa molecular é de 368,91 g/mol e ponto de fusão é 183 ^oC (GANTAIT, BARMAN, MUKHERJEE, 2010; LESTARI & INDRAYANTO, 2014).

Figura 1. Estrutura química da curmina (CAS: 458-37-7).



Estudos recentes demonstram que a curcumina apresenta-se como um promissor agente antifúngico contra *Candida albicans* (ALSHEHRI et al., 2014; SIVIERO et al. 2015; GUNES, et al. 2016; KÖLLNER et al., 2017). Em relação

a sua atividade sobre espécies de *Candida sp*, a curcumina apresentou completa inibição de crescimento das leveduras em concentrações significativas, sendo a *Candida albicans* a mais susceptível entre as espécies do mesmo gênero, e de acordo com Martins (2009), mostrou-se mais eficiente que o fluconazol na inibição da adesão do microrganismo a células do epitélio bucal (NEELOFAR et al., 2011).

Os mecanismos de ação da curcumina sobre *Candida albicans* já descritos incluem inibição do desenvolvimento de hifas, diminuição da biossíntese de ergosterol, modulação da função de ATPase de membrana plasmática fúngica e efeito na produção de exoenzimas fúngicas (LOGAN-SMITH et al., 2001; SOBEL et al., 2003; GADDIPATI et al., 2003; HONG et al., 2004; PRASAD et al., 2004; CHO et al., 2005; MARTINS et al., 2009; SHARMA et al., 2009; JIN et al., 2014).

A curcumina é menos efetiva do que o fluconazol em termos de ação antifúngica propriamente dita, mas suas propriedades de inibição da adesão fúngica nas céulas epiteliais resultam em uma atividade maior que a do fluconazol contra as células fúngicas, o que sugere algum efeito nas propriedades de associação das células fúngicas com as células epiteliais do hospedeiro.

O tipo de efeito apresentado pela curcumina depende em parte, da via de administração, nenhum estudo relatou toxicidade com relação ao uso da curcumina. A baixa biodisponibilidade é um dos maiores problemas com relação à sua utilização clínica e é o fator que limita sua aplicação (baixa solubilidade e baixa absorção), a baixa eficácia na administração oral é agravada por sofrer metabolismo hepático de primeira passagem e metabolismo de fase 2, como a conjugação com ácido glicurônico (ANSARI et al., 2005; SUETH-SANTIAGO et al., 2015; SILVA-BUZANELLO et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; CARR et al., 2015; TEJADA et al., 2016; LU, KELLY, MIAO, 2016).

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), que considera que a solubilidade e a permeabilidade gastrintestinal são características específicas do fármaco, pode-se dizer que a curcumina se encaixa na Classe IV; pertencem à esta classe fármacos com baixa solubilidade e baixa permeabilidade, ou seja, fármacos que apresentam

problemas para administração oral (AMIDON et al., 1995).

Diversos dados sugerem que a resposta imune local, mais que a sistêmica, é importante na proteção durante as vaginites. As vantagens da administração intravaginal é por ser uma rota não invasiva e tão efetiva quanto a administração oral de medicamentos no tratamento de infecções vaginais. Nos estudos clínicos de Mishra & Das (2015), foram demonstrados resultados satisfatórios da aplicação intravaginal de creme contendo curcumina contra o vírus HPV (SRIKRISHNA, CARDOZO, 2013; NAGASHIMA, YAMAGISHI, MIKAMO, 2016).

No entanto, o uso da curcumina também fica limitado devido suas características físico-químicas, como a alta lipofilicidade, resultando em restrições farmacotécnicas.

Dessa forma, o emprego de sistemas nanoestruturados, nanopartículas, lipossomas e outros, capazes de solubilizar e veicular moléculas lípofílicas e ainda promover uma liberação prolongada do fármaco no sítio de ação podem ser boas estratégias para novas terapias antifúngicas (BHARDWAJ et al., 2012; SIVIERO et al., 2015; CARR et al., 2015; BAJPAI et al., 2015; LU, KELLY, MIAO 2016; KÖLLNER et al., 2017).

2.5 Sistemas de liberação prolongada

2.5.1 Emulsões e sistemas pseudoternários

As emulsões são dispersões de duas fases não miscíveis entre si; estes sistemas heterogêneos, formados por uma fase aquosa e uma fase oleosa, tornam-se sistemas mais estáveis na presença de agentes emulsificantes, pois estes agentes atuam reduzindo a tensão interfacial exitente entre as duas fases e por isso, previnem a coalenscência das partículas (SILVA & SOARES, 1996; LEONARDI, 2004; AULTON, 2005).

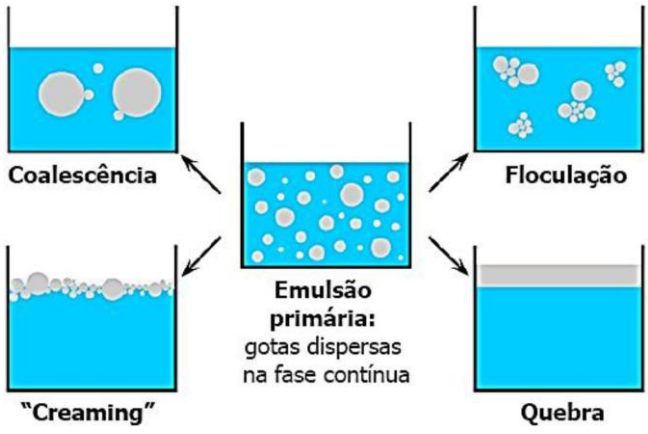
Estes sistemas são utilizados para veicular fármacos lipofílicos e hidrofílicos e também podem formar um sistema de liberação prolongada, no qual o fármaco é liberado por difusão, de acordo com seu coeficiente de partição.

Os diâmetros das gotículas de uma emulsão são da ordem de 0,1 a 100 µm; o sistema é termodinamicamente instável, pois primeiramente ocorre a formação da fase dispersa, depois ocorre a coalescência das gotículas e separação de fases, por isso é necessário a utilização do agente emusificante (tensoativos), o tipo e a quantidade desses agentes irão determinar a estabilidade da emulsão, evitando a separação de fases (AULTON, 2005).

As emulsões representam um grande número de preparações tópicas utilizadas. No geral, são constituídas por vários componentes, sendo os básicos e principais: agentes doadores de consistência, agentes emolientes, emulsionantes, princípios ativos, água, óleos, conservantes, perfume, corantes ou aditivos especiais (SILVA & SOARES, 1996; LEONARDI, 2004; AULTON, 2005).

A separação de fases em uma emulsão é um problema farmacotécnico, é denominada “quebra” e se dá por adição de uma substância imcompatível, crescimento microbiano, mudança de temperatura, entre outros fatores; outros fenômenos de instabilidade são: floculação, coalescência, *creaming* (a fase dispersa sobe à superfície ou desce até o fundo da emulsão) e separação de fases (AULTON, 2005).

Figura 2. Emulsão e tipos de separação em emulsões.



(FRANZOL & REZENDE, 2015)

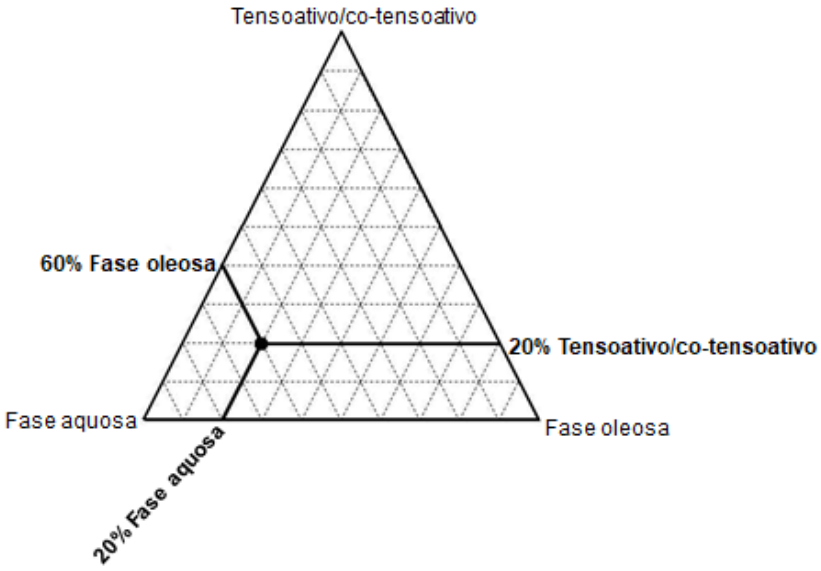
Dessa forma, as emulsões, são consideradas formulações simples, que favorecem a aplicação tópica intravaginal e a administração de princípios ativos hidrossolúveis e/ou lipossolúveis com finalidades específicas (ECCLESTON, 1997).

Para os sistemas pseudoternários, primeiramente utiliza-se o um método

gráfico denominado diagrama de fases pseudoternário. Os diagramas de fases pseudoternários são representados como triângulos equiláteros, nos quais cada vértice corresponde à 100% da fase aquosa, da fase oleosa e do tensoativo (ou mistura de tensoativos). O vértice superior representa o tensoativo, o vértice esquerdo a fase aquosa e, o direito, a fase oleosa. Cada ponto no diagrama mostra a proporção de cada um dos componentes utilizados (OLIVEIRA et al., 2004).

Quando se utiliza mais de um agente tensoativo fixando-se a proporção destes, denomina-se diagrama de fases pseudoternário. Ao construir o diagrama, as misturas dos componentes em diferentes proporções podem gerar vários tipos de agregados, formando regiões específicas e delimitadas nesse diagrama. Pode-se então verificar a presença de emulsões, microemulsões, cristais líquidos entre outros arranjos (OLIVEIRA et al., 2004).

Figura 3. Ilustração de um diagrama de fases pseudoternário.



Fonte: O autor

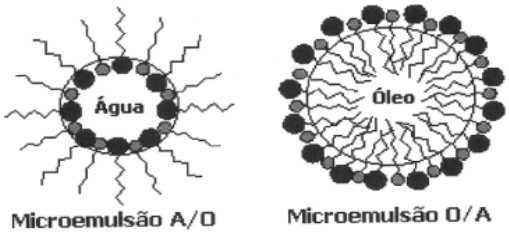
As microemulsões são consideradas sistemas reservatórios na qual o fármaco é compartimentalizado nas gotículas da fase interna, separados por uma interface, por isso, devem atravessar essa interface para serem liberados. Estes sistemas são importantes pois ajudam a contornar problemas de solubilidade de fármacos lipofílicos, modulam a estabilidade, protegem da hidrólise enzimática e melhoram a absorção do fármaco, devido à alta

concentração agentes tensoativos (responsáveis por reduzir a tensão interfacial) (LAWRENCE, REES, 2000; OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA e SCARPA, 2002; FORMARIZ et al., 2005).

De acordo com Oliveira & Scarpa (2002), as microemulsões são capazes de proporcionar ação prolongada, tropismo diferenciado para tecidos ou órgãos do organismo e podem veicular fármacos com diferentes propriedades físico-químicas e graus de hidrofilia/lipofilia. Gasco et al. (1990), por exemplo, descreve um sistema microemulsionado biocompatível de liberação prolongada contendo hormônio luteizante, por isso estes sistemas possuem as vantagens de aumentar a eficácia terapêutica possibilitando a diminuição da dose administrada e minimizando os efeitos colaterais inerentes ao fármaco.

As microemulsões podem solubilizar quantidade considerável de fármacos lipossolúveis no domínio hidrofóbico e/ou fármacos hidrossolúveis na porção hidrofílica. A liberação do fármaco ocorre devido à difusão lenta e contínua do fármaco das gotículas para a fase contínua (GARTI, ANSERIN, 1996).

Figura 4. Estrutura das microemulsões.



(OLIVEIRA et al., 2004)

Os cristais-líquidos também são sistemas pseudoternários (ou ternários, se constituídos por fase aquosa, oleosa e um agente tensoativo) que se posicionam entre os sólidos e líquidos e possuem uma parcial ordem e desordem das espécies atômicas; são chamados também de mesofases, e são classificados como liotrópicos ou termotrópicos.

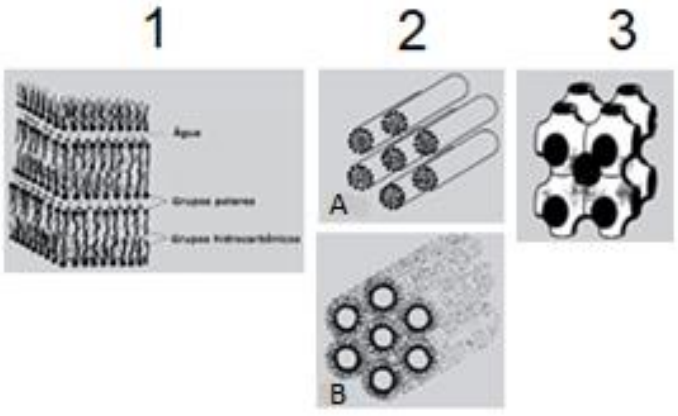
As mesofases liotrópicas são formadas por micelas que se organizam formando regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. Os fármacos incorporados nesses sistemas, podem estar solubilizados nessas duas regiões, dependendo da solubilidade do fármaco. A liberação de fármacos incorporados

em sistemas líquido-cristalinos dependerá da estrutura da mesofase formada e das características físico-químicas do fármaco (ERICSON et al., 1991; LARRSON, 1994; GABBOUN et al., 2001).

As mesofases líquido-cristalinas são geralmente formadas pela presença de tensoativos da classe dos polioxietilenos, polímeros e lipídeos, como os triglicerídeos. Dependendo da temperatura e da concentração dessas moléculas em água, formam-se agregados bem estruturados, tais como mesofases cúbica, hexagonal ou lamelar (ERICSON et al., 1991; LARRSON, 1994; GABBOUN et al., 2001).

A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planas de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando rede unidimensional. A mesofase hexagonal é constituída por micelas cilíndricas, formadas pelas moléculas agrupadas de tensoativos e a água preenche o volume entre os cilindros; na fase hexagonal reversa a fase oleosa fica ao redor dos cilindros formados por canais de água circundadas pela parte polar do tensoativo. Estes arranjos hexagonais, originam estruturas bidimensionais. As mesofases cúbicas são estruturas mais complicadas e visualizadas com maior dificuldade que as outras. As diferentes estruturas dos sistemas líquido-cristalinos influenciam de forma diferente na velocidade de liberação dos fármacos (ERICSON et al., 1991; LARRSON, 1994; EZRAHI et al., 1999; GABBOUN et al., 2001).

Figura 5. Ilustração esquemática das mesofases líquido-cristalinas: (1) mesofase lamelar, (2A) mesofase hexagonal, (2B) mesofase hexagonal reversa, (3): mesofase cúbica de monoleolato de glicerila-água.



(EZRAHI et al., 1999; SHAH et al., 2001)

Vale ressaltar que além dos sistemas líquido-cristalinos, as microemulsões isotrópicas e emulsões também são consideradas mesofases, pois posicionam-se entre os sólidos e líquidos, no entanto, suas interfaces não possuem nenhuma ordem orientacional.

É necessário o conhecimento das estruturas formadas quando se mistura os diferentes componentes, pois cada estrutura provoca um perfil de liberação do fármaco incorporado e dá diferentes características aos sistemas. A caracterização estrutural do sistema, através de técnicas como, espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS), microscopia de luz polarizada, difração de raios-x (DRX), comportamento reológico e outras técnicas, são ferramentas para elucidar a estrutura e consequentemente, conhecer o perfil de liberação do fármaco e eficácia dos sistemas.

O perfil de liberação de um fármaco depende, na prática, de diversos fatores, como o tipo de fármaco, polimorfismo e cristalinidade, tamanho da partícula, solubilidade, quantidade de fármaco incorporado e os componentes da forma farmacêutica. A composição do veículo pode influenciar de modo significativo na liberação das substâncias ativas.

Para os sistemas de liberação prolongada é importante a escolha de um agente apropriado capaz de controlar a liberação do fármaco e manter a ação terapêutica ao longo do tempo e ainda liberar o fámaco em um sítio alvo de ação; é muito comum o uso de um ou mais materiais poliméricos, que possuem a capacidade de modular a liberação dos fármacos a partir das formulações, assim, os sistemas que usam esses agentes também podem ser classificados como sistemas farmacêuticos matriciais.

Os sistemas farmacêuticos matriciais são formados por cadeia poliméricas de uma ou várias substâncias químicas que possuem a função de modular a liberação do fármaco, esses materiais podem ser classificados em matrizes insolúveis e inertes, matrizes insolúveis em água e erodíveis e polímeros hidrofílicos.

As matrizes insolúveis e inertes, como etilcelulose, polietileno e cloreto de polivinila, são aquelas que mantém sua estrutura constante na presença de água, são formadas por polímeros insolúveis, que formam uma estrutura porosa onde o fármaco está disperso. As matrizes lipídicas também não alteram sua estrutura na presença de água (LOPES, LOBO, COSTA, 2005).

As matrizes hidrofílicas, como metilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose, quando em contato com o meio de dissolução ou com o fluido aquoso gastrintestinal, absorvem água, através dos poros da matriz. Ocorre a hidratação do sistema e liberação do fármaco existente à superfície, depois, ocorre o intumescimento e relaxamento das cadeias poliméricas, e forma-se uma camada gelatinosa de polímero, essa camada exterior gelatinosa que vai se formando em contato com meio aquoso sofre erosão enquanto o núcleo vai sendo hidratado (LOPES, LOBO, COSTA, 2005).

As matrizes insolúveis em água e erodíveis, como triglicerídeos cáprico/carpílico, fosatidilcolina de soja e o óleo de rícino hidrogenado, são matrizes hidrofóbicas (lipídicas) e, o controle da liberação do princípio ativo ocorre principalmente por mecanismos de difusão através dos poros ou por erosão, prevalecendo um ou outro mecanismo de acordo com as propriedades do fármaco e dos componentes utilizados (LOPES, LOBO, COSTA, 2005).

2.6 Microscopia de luz polarizada (MLP)

O microscópio utilizado nesta técnica possui dois filtros de polarização, um condensador que permite que todo o feixe de luz propagado se conduza a uma só direção e um analisador, que reconhece a propagação ficando próximo à ocular (CARVALHO et. al., 2009).

Se a substância analisada permitir a passagem da luz polarizada incidente sem modificação da sua propagação, tem-se o fenômeno de isotropia, neste fenômeno não ocorre o desvio da luz polarizada, ou seja, não se tem birrefringência, formando um campo escuro, exemplos desses sistemas são as microemulsões e mesofases cúbicas, neste caso são utilizadas outras técnicas de análises para diferenciar estas duas estruturas (CHORILLI et al., 2009).

A birrefringência é um fenômeno que consiste na criação de dois raios refratados a partir de um único raio inicial, quando este incide sobre um campo anisotrópico. Este efeito provocado que divide o raio de luz em dois, com velocidades distintas, gera diferentes ângulos de refração. Quanto maior a diferença entre os dois índices de refração, mais birrefringente é o material (BECHTOLD, 2005).

Se a amostra desviar o plano da luz incidente, ela é denominada como anisotrópica. Em um campo anisotrópico, a luz polarizada incidente é desviada pelas estruturas presentes que causam birrefringência, dessa forma é possível identificar estruturas típicas de cada mesofase líquido-cristalinas (MÜLLER-GOYMANN, 2004; CALIXTO et. al., 2013).

Os cristais líquidos são espécies anisotrópicas (exceto os cristais líquidos de fase cúbica, que são isotrópicos); o arranjo hexagonal apresenta “estrias” (agregados de tensoativo organizados em cilindros formando estruturas parecidas com fibras), já o arranjo lamelar apresenta-se com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando estruturas denominadas "cruzes de malta” (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

É importante ressaltar que é necessário a análise dos sistemas com e sem a incorporação de princípios ativos. Muitos dados da literatura mostram as modificações nos tipos de mesofases e alterações nas propriedades dos sistemas devido a adição de fármacos e solventes (ENGSTROEM & ENGSTROEM, 1992; CHANG & BODMEIER, 1998; SALLAM et al., 2002; KUMAR et al., 2004; RIZWAN et al, 2009). Segundo Kumar et al. (2004) em seu estudo, a presença do fármaco lipofílico diazepan, favoreceu a formação de mesofase cúbica e hexagonal quando sua concentração foi aumentada no sistema. De acordo com Engstrom & Engstrom (1992) a incorporação de cloridrato de lidocaína promoveu a transição de mesofase cúbica em mesofase lamelar. Chang & Bodmeier (1998) avaliaram o efeito dos fármacos maleato de clorfeniramina e cloridrato de propranolol e solventes na construção do diagrama de fases, os dois fármacos promoveram a transição da mesofase cúbica para mesofase lamelar em altas concentrações e todos os solventes estudados alteraram o diagrama de fases.

2.7 Espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS)

O espalhamento de raios-X à baixo ângulo é uma técnica analítica não destrutiva, utilizada como uma ferramenta na elucidação estrutural de mesofases. Essas características estruturais são reforçadas através dos estudos reológicos, estudos que proporcionam uma melhor definição sobre o comportamento desses sistemas.

Na técnica de SAXS, as nanoestruturas causam um espalhamento da radiação incidente, a radiação incide em ângulos de θ menores que 10°, em ângulos baixos cada distância interplanar gera um espalhamento diferente e correspondente com diferentes estruturas nanométricas, caracterizando, desta forma, os sistemas pelo tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas. Essa técnica também permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada (CARVALHO et al., 2012; MANAIA et al., 2012).

No caso de sistemas líquido-cristalinos ou sistemas organizados a longas distâncias**,** a intensidade de espalhamento *I(q)* produzida exibe forma máxima para valores específicos do vetor de espalhamento *q* formando picos (picos de Bragg). Ao determinar a razão entre os diversos *q* em função da posição do primeiro pico (q1), é possível determinar qual o tipo de mesofase presente. Os agregados micelares e microemulsionados são compostos por regiões heterogêneas como regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, cada região possui uma densidade eletrônica (não homogênea), assim, a intensidade de espalhamento produzida está relacionada com as diferenças entre as densidades eletrônicas de cada região dos sistemas (CARVALHO et al., 2012; MANAIA et al., 2012).

Para estruturas lamelares, a posição relativa dos picos (em relação ao primeiro pico mais intenso) obedece a relação 1:2:3:4 e assim por diante, enquanto que, para estruturas hexagonais a relação é $\sqrt{1}:\sqrt{3}:\sqrt{4}$ e assim por diate. Para os cristais-líquidos de fase cúbica os valores correlacionados são 1,41÷1,73÷2,82÷3 (HOLMQVIST et al., 1997; YARIV *et al.*, 2010).

Em sistemas do tipo micelas e microemulsões, a banda de espalhamento gerada é larga, ou seja, apresenta-se como um pico amplo, associado com a desorganização das micelas (não há ordem orientacional nas interfaces) e portanto, baixa correlação espacial 3D. Já nas mesofases líquido-cristalinas a ordem orientacional nas interfaces é uma condição para a formação desses arranjos (BEAUCAGE et al., 1995).

2.8 Reologia

É importante avaliar o comportamento reológico do sistema para verificar se este é satisfatório para a aplicação proposta. Além disso, os diferentes arranjos estruturais possuem diferentes comportamentos reológicos que também influenciam no perfil de liberação do fármaco.

Os materiais líquidos ideais (líquidos newtonianos) não possuem forma geométrica definida e escoam irreversivelmente quando submetidos a forças externas, já os materiais sólidos apresentam forma geométrica bem definida e se deformados pela ação de forças externas, assumem outra forma geométrica de equilíbrio (SCHRAMM, 2006).

No comportamento de um material viscoso ideal (líquidos newtonianos), as deformações sofridas são contínuas e irreversíveis enquanto submetido a uma tensão de cisalhamento. Esta deformação é também conhecida como escoamento. A propriedade que relaciona a taxa de deformação do corpo ao cisalhamento é a viscosidade. Um material viscoso ideal não é capaz de sustentar uma tensão, dissipando a energia de deformação sob a forma de calor, como é o caso de muitos fluidos, no entanto, os comportamentos ideais são raros natureza.

Um comportamento de um sólido ideal é caracterizado por deformações elásticas, que são deformações reversíveis sofridas por um corpo sob tensão. Ao cessar a tensão o corpo retorna à sua forma e volume original. A energia de deformação é recuperada quando a tensão aplicada ao material cessa, esse é o comportamento de um material sólido ideal (sólido Hookeano).

Muitos materiais, resultantes de misturas sólidos/líquidos, apresentam um comportamento mecânico intermediário entre estes dois extremos, apresentando tanto características viscosas como elásticas, ou seja, possuem características de líquidos com propriedades viscosas e de sólidos com propriedades elásticas, por isso são denominados como materiais viscoelásticos. Ao deformar-se sofrem simultaneamente deformações elásticas e viscosas. Estas substâncias quando submetidas à tensão de cisalhamento sofrem uma deformação e quando esta cessa, ocorre uma certa recuperação da deformação sofrida (comportamento elástico).

Os materiais que são constituídos por mais de uma fase, partículas dispersas em num dispersante, como uma emulsão de líquidos imiscíveis por exemplo, são considerados fluidos estruturados e seu comportamento reológico é de acordo com as interações dos constituintes.

As análises reológicas podem ser contínuas e oscilatórias. Nas análises contínuas, os fluidos newtonianos exibem como curva de fluxo, uma reta onde os pares tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento são constantes, dessa forma, a viscosidade não é afetada pela taxa de cisalhamento, permanecendo com um único valor constante com o aumento da taxa de cisalhamento.

Os fluidos não-newtonianos não exibem esse comportamento de fluxo "ideal" e são aqueles em que a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento não são constantes e quando submetidos a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada, quanto maior esta força, maior será essa orientação na direção do fluxo, conseqüentemente, menor será a viscosidade. Esta classe de fluidos ainda pode ser classificada dependentes e independentes do tempo. Os comportamentos dependentes do tempo são: reopéticos e tixotrópicos; os comportamentos independentes do tempo são: pseudoplástico, plástico ou dilatante (ISAAC et al., 2008; CALIXTO, 2013).

Os fluidos reopéticos apresentam um comportamento inverso ao dos tixotrópicos; a viscosidade destes fluidos aumenta com o tempo de aplicação da tensão, retornando ao estado de baixa viscosidade inicial quando esta tensão cessa; os fluidos dilatantes também apresentam um aumento de viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento, devido ao contato direto entre as partículas sólidas e, conseqüentemente, ocorre um aumento da viscosidade aparente (viscosidade medida em um ponto com uma taxa de cisalhamento constante). Os fluidos reopéticos são dependentes do tempo e os dilatantes são independentes do tempo (ISAAC et al., 2008; CALIXTO, 2013).

A reopexia ocorre quando determinado líquido sofre aumento da viscosidade durante o cisalhamento e quando em repouso, eles recuperam sua forma original, neste comportamento, a curva de fluxo inferior de volta está acima da curva superior.

A reopeticidade e a tixotropia são propriedades de fluxo opostas. O

comportamento tixotrópico é observado pela redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento e a curva descendente (volta) fica abaixo da curva ascendente (ida). Outro comportamento reológico existente é a anti-tixotropia, no qual observa-se também a diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, no entanto, a curva de volta é acima da curva de ida (SCHRAMM, 2006).

Os materiais pseudoplásticos são aqueles nos quais a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, quando não se aplica nenhuma taxa de cisalhamento mas existe uma tensão de cisalhamento, o material é denominado como pseudoplástico com limite de escoamento (ou líquido plástico). Ao cessar a tensão de cisalhamento aplicada, as tensões de cisalhamento são relaxadas e o sistema tende a readquirir a estrutura inicial, muitas vezes os materiais não voltam exatamente na sua estrutura primitiva de tal forma que as curvas ascendentes e descendentes das curvas de fluxo e viscosidade ficam deslocadas, formando uma área de histerse (SCHRAMM, 2006).

As curvas de fluxo de fluidos tixotrópicos apresentam distinção entre as curvas de taxa crescente (curva ascendente - aumento da taxa de cisalhamento) e de taxa decrescente (curva descendente - diminuição da taxa de cisalhamento), formando uma área de histerese (diferença das áreas formadas pelas curvas ascendente e descendente); que define a magnitude da propriedade tixotrópica, assim, a área formada tem dimensão de “energia” necessária para quebrar a estrutura tixotrópica.

Os fluidos não-newtonianos tixotrópicos apresentam viscosidade diminuída com o tempo de aplicação da tensão de cisalhamento, pois além da orientação das moléculas na direção do fluxo, estas possuem ligações intermoleculares formando uma estrutura tridimensional em rede, essa estrutura é quebrada em função do tempo e da taxa de deformação, quando a tensão é cessada voltam a ficar mais viscosos, a estrutura quebrada é reversível, ou seja, ocorre outro aumento na viscosidade (LEE, MOTURI, LEE, 2009).

Nas curvas de fluxo, a taxa de cisalhamento aumenta até um certo valor e, depois, imediatamente diminui até o valor inicial; é possível observar que as curvas ascedentes e descentes não coincidem (não se sobrepõe) pois o

decréscimo da viscosidade do fluido (curva ascendente) pode ou não ser reversível; alguns fluidos tixotrópicos, se mantidos em repouso por um tempo retornarão a sua viscosidade inicial, outros nunca voltarão, ou seja o materilal não se reestrutura exatamente na sua forma ininial mas mesmo assim ocorre um certo um aumento na viscosidade. Os que retornam são chamados de viscoelásticos.

Nos fluidos pseudoplásticos, a diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento depende da orientação e alinhamento das moléculas na direção do fluxo, quando o cisalhamento diminui perde-se esse alinhamento, neste caso, ao plotar a curva de fluxo, as curvas ascendente e descendente se sobrepõem, observando-se somente uma curva. No entanto, a maioria das dispersões, possuem um potencial de formar interações moleculares dependentes do tempo, essas ligações (forças intermoleculares fracas) criam uma estrutura tridimensional em rede (denominado gel), quando submetidas à uma tensão de cisalhamento, apresentam além do alinhamento das moléculas em direção do fluxo, o rompimento dessas ligações. Ao romper essa estrutura a viscosidade diminui, ao atingir níveis mínimos de viscosidade, tem-se o estado sol da dispersão.

Sistema mais organizados estruturalmente causam maior resistência ao fluxo, ou seja, possuem características pseudoplástica, assim, também é possível correlacionar a pseudoplasticidade com as diferentes mesofases (BARNES, 1997).

Os fluidos tixotrópicos possuem um potencial de reverter a estrutura em gel quando mantido em repouso; essa recuperação nem sempre é total e neste caso, não há sobreposição das curvas ascedente e descendente, formando uma área de histerse (BARNES, 1997).

Quanto maior a área de histerese, maior é a energia necessária para quebrar a estrutura tixotrópica e também, quanto maior a área de histerese menor é a capacidade do material em voltar na sua estrutura primária (SCHRAMM, 2006).

Utilizando as curvas de fluxo, se aplica a lei das potências para se obter valores de N, que avaliam o comportamento de fluxo e de K para verificar a viscosidade dos sistemas (SCHRAMM, 2006).

O índice N indica o desvio em relação ao comportamento Newtoniano (N=1), os materiais com comportamento pseudoplástico possuem o índice de comportamento (N) menor que um (comportamento típico de emulsões, suspensões e dispersões) e o índice de comportamento maior que um representa um fluido dilatante (SCHRAMM, 2006).

As análises reológicas oscilatórias, investigam as propriedades viscosas e elásticas dos sistemas, fornecendo informações quanto à natureza estrutural dos mesmos, que implica diretamente no desempenho da formulação (RAO & STEFFE, 1992; SCHRAMM et. al., 2006). A análise reológica contínua permite o estudo do comportamento de fluxo do material quando este este sofre uma determinada tensão (SAVIC et al., 2011), estes estudos são representados graficamente e denominados como curvas de fluxo, nas quais as curvas ascendentes são representadas pela tensão de cisalhamento em função do aumento da taxa de cisalhamento e as curvas descendentes são representadas pela tensão de cisalhamento em função da diminuição da taxa de cisalhamento (SCHRAMM et. al., 2006; PESTANA et. al., 2009).

Para os testes reológicos oscilatórios, é necessário determinar a região na qual esse comportamento viscoelástico é linear; a região viscoleástica linear é a região na qual a tensão aplicada gera uma resposta de deformação proporcional à essa tensão aplicada. Essa proporcionalidade pode ser vista como a habilidade da rede de deformar-se elasticamente mas mantendo a estrutura de rede intacta. Nos testes reológicos, se for utilizada uma tensão superior aos limites mecânicos, a amostra é deformada até a destruição das ligações intermoleculares dos agregados, ocorre então a perda da visocisdade e a energia introduzida é perdida irreversivelmente na forma de calor. Normalmente as tensões que mantém as amostras dentro da região viscoelástica linear são pequenas (SCHRAMM, 2006).

Os fluidos com comportamento viscoelástico, quando submetidos à uma tensão aplicada, abaixo do ponto de deformação crítica, distendem-se, ou seja, sofrem uma elongação espontânea deformando-se (contribuição elástica, como mola tensionada) mas ainda permanecem dentro dos limites de resistência mecânica devido à contribuição viscosa contínua do próprio sistema (SCHRAMM, 2006).

Além de evitar a destruição da amostra, a determinação da faixa de viscoleasticidade linear é importante para os testes oscilatórios; para se obter as regiões lineares e não-lineares, faz-se o teste de verredura de tesão, fixando a frequencia em 1Hz. A faixa em que é possível avaliar os módulos de perda e armazenamento sem a destruição do sistema e onde os módulos são constantes em função da tensão aplicada é a região viscoelástica linear.

Ao determinarnar a faixa de viscolesticidade linear, fixa-se a tensão em um valor baixo e faz-se a varredura de frequencia para que possa ser avaliado o comportamento viscoso e elástico da amostra.

As propriedades reológicas de um material viscoelástico são independentes da tensão aplicada até um nível de deformação crítica (módulos G’ e G’’ constantes em relação à tensão aplicada), após esta deformação crítica causada por uma tensão, o comportamento do material passa a ser não-linear. Assim, o grau de deformação em relação aos módulos de armazenamento (G’) e de perda (G’’) é importante para caracterizar um comportamento viscoelástico. Abaixo do valor de deformação crítica, a estrutura do material permanece intacta; quando G '> G '' tem-se um comportamento de um material “mais elástico” ou seja, mais estruturado, quando a tensão aplicada está acima do nível crítico de deformação ocorre uma perturbação na estrutura da rede do material.

O módulo elástico (G’ ou módulo de armazenagem) é a medida da energia armazenada durante a deformação do material quando a tensão aumenta; quando a tensão é relaxada a energia é liberada, este módulo reflete o comportamento elástico de um material viscoelástico; o módulo viscoso (G’’ ou módulo de perda) é uma medida da energia dissipada pois este módulo não pode armazenar energia, e a tensão aplicada se dissipa na forma de deformação irreversível, este módulo reflete o componente viscoso de um material viscoelástico (CALLENS et al., 2003; CARVALHO et al., 2013).

Altos valores para o módulo de armazenamento indicam uma amostra predominantemente elástica e estruturada, enquanto que o módulo de perda com valores altos indica que uma amostra é predominantemente viscosa e com estrutura mais desorganizada (CALLENS et al., 2003; CARVALHO et al., 2013).

Quando o componente elástico está acima do componente viscoso

significa que o material possui característica mais elástica (módulo de elasticidade é um parâmetro mecânico que proporciona uma medida da rigidez de materiais viscoelásticos), quando ocorre o inverso significa que o material possui característica predominantemente viscosa (módulo viscoso é um parâmetro mecânico que proporciona uma medida da viscosidade de materiais viscoelásticos) (CASSU e FELISBERTI, 2005).

Os sistemas líquido-cristalinos possuem módulos de perda e armazenamento característicos; as mesofases lamelares possuem um comportamento menos elástico, pois possuem uma organização estrutural mais fraca e desorganizada. As mesofases hexagonais, possuem maior valor do módulo de armazenamento evidenciando uma maior organização e viscosidade semelhante à de um gel, altos valores deste módulo também são observados em mesofases cúbicas, indicando maior organização do ponto de vista estrutural, esta mesofase é mais elástica, complexa e muito organizada (CARVALHO et al., 2010a; CARVALHO et al., 2010c; CARVALHO, 2012; CARVALHO et al., 2013; URBAN et al., 2013; OYAFUSO et al., 2015).

Após definir a região viscoelástica linear do sistema, pode-se avaliar as estruturas através do teste de varredura de freqüência, realizado em uma tensão abaixo do valor de deformação crítica. A varredura de frequencia é um teste oscilatório, pois ocorre um aumento periódico da frequência e é útil na obtenção de informações sobre as interações entre as partículas e a estabilidade da rede estrutural dos sistemas analisados.

Em uma varredura de frequência, as oscilações são feitas em ângulos crescentes em radianos/segundos, com amplitude de oscilação e temperatura constantes.

Abaixo da tensão crítica (deformação crítica), o módulo elástico (G') é quase independente da freqüência, como se pode observar em um material mais estruturado. Quanto mais dependente do módulo de elasticidade (G’) mais fluido é o sistema.

O módulo de armazenamento (G’) indica que a energia de tensão é temporariamente armazenada durante o teste, porém pode ser recuperada depois, indicando que o material analisado apresenta características elásticas. Enquanto que o módulo de perda (G”) indica que a energia usada para iniciar o fluxo é irreversivelmente perdida, sendo transformada em calor de

cisalhamento e o material possui então características viscosas (SCHRAMM, 2006).

Segundo Gebhard Schramm (2006), a determinação do comportamento viscoelástico, através da avaliação dos módulos G', G" e η em função da frequência (Hz), é uma ferramenta útil para a caracterização estrutural dos sistemas. Altos valores de G', na presença de grandes quantidades de substâncias poliméricas levam a um comportamento elástico pela maior organização da rede tridimensional (CARVALHO et al., 2012; CALIXTO, 2013).

Outro teste bastante utilizado é o teste de fluência (creep) e recuperação, é um teste de viscoelasticidade que permite diferenciar as respostas elásticas das respostas viscosas, introduzindo o parâmetro de tempo para cada um dos comportamentos e de compliança (J). A compliança define o quão complacente é uma amostra, quanto mais alta a compliança menor o grau de recuperação do sistema (SCHRAMM, 2006).

Os fluidos viscoelásticos durante a fluência (primera parte da curva) apresentam contribuição elástica e viscosa, não podendo ser separadas, o sistema se elonga espontaneamente na direção da força aplicada, como uma mola; a estrutura se deformça dentro de seus limites mecânicos no decorrer do teste, devido à porção viscosa de resistência. Na fase de recuperação (segunda parte da curva) tem-se a resposta viscosa permanentemente mantida e uma parte elástica recuperada (SCHRAMM, 2006).

Os testes de fluência e recuperação são amplamente usados para compreender a estrutura interna de um sistema e as variações estruturais associadas com a introdução de algum componente na sua composição, permitindo diferenciar as respostas elásticas das viscosas; este teste também é frequentemente utilizado para verificar a estabilidade a longo prazo dos sistemas (SCHRAMM, 2006; DOLZ et al., 2008).

2.9 Estudo de estabilidade prelimiar (BRASIL, 2004)

A estabilidade de produtos farmacêuticos visa a obtenção de informações sobre sua estabilidade física e química. A estabilidade dos produtos depende de diversos fatores ambientais como temperatura, umidade e luz e também fatores relacionados ao próprio produto, como propriedades físicas e químicas

das substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processos de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2004; ANVISA, 2005).

Os estudos de estabilidade têm por objetivo avaliar a capacidade de um produto em manter as suas características organolépticas, físico-químicas e microbiológicas em condições extremas de temperatura, garantindo a segurança e a eficácia das formulações. Assim, o estudo da estabilidade deve ser visto como um requisito necessário para a garantir a qualidade do produto (ANVISA, 2004; MOSTEFA et al., 2006).

Para esta avaliação a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (ANVISA), preconiza que o teste deve ser feito em 15 dias e avaliados as características organolépticas (aspecto, cor e odor) e características físicas (pH e viscosidade), no entanto, para este trabalho, também foi avaliado o teor de curcumina na formulação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.9 Validação de metodologia analítica

É muito importante nos estudos de estabilidade e diversos outros ensaios, a quantificação do princípio ativo nos sistemas, que deve permanecer dentro das especificações exigidas pela Anvisa durante o estudo de estabilidade; para isso é necessário que seja utilizado um método analítico adequado para a quantificação do fármaco.

A fim de avaliar a adequabilidade de um método analítico quanto ao seu uso, é necessário fazer uma validação do método analítico.

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o método é adquado para a finalidade pretendida, é uma etapa extremamente importante por garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, dando confiabilidade e segurança aos resultados. Na validação analítica diversos parâmetros são estudados como: especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão e robustez; os parâmetros estão descritos abaixo (BRASIL, 2003).

- Especificidade e seletividade: capacidade que o método possui de

medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz;

- Linearidade: representa a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do princípio ativo na amostra, dentro de um intervalo especificado;
- Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, pode ser avaliada em três níveis:

A) Repetibilidade (precisão intra-corrida), referente à concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação;

B) Precisão intermediária (precisão inter-corridas), referente à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes;

C) Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), referente à concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes;

- Limite de detecção: menor quantidade do princípio ativo presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado;
- Limite de quantificação: menor quantidade do princípio ativo em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis;
- Exatidão: proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro;
- Robustez, que indica a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um sistema pseudoternário e nanoestruturado para otimizar a veiculação do princípio ativo curcumina e avaliar a efetividade e segurança em comparação à uma formulação creme.

3.2 Objetivos específicos

- Incorporar curcumina em um sistema pseudoternário para uso intravaginal;
- Validar um método analítico para análise da concentração do princípio ativo na emulsão e no sistema pseudoternário e nanoestruturado desenvolvido;
- Realizar a análise estrutural dos sistemas por meio de microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS), difração de raios-x (DRX) e ensaios reológicos;
- Avaliar as propriedades mucoadesivas das formulações;
- Realizar estudo de estabilidade preliminar das formulações;
- Avaliar a liberação *in vitro* das formulações;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro*;
- Avaliar de forma experimental a efetividade das formulações contendo curcumina no tratamento de CVV.

4 MATERIAIS

4.1 Padrões, matérias-primas, meios de cultura e cepas

Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl AWS-Croda®);
Álcool cetoestearílico (Oleoquímica®);
Antibiótico amoxicilina (Sandoz®);
Candida albicans isolado clínico 11763;
Candida albicans isolado clínico 1083;
Candida albicans isolado clínico 1203;
Candida albicans isolado clínico 1417;
Candida albicans isolado clínico 1252;
Cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 10231;
Cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 14053,
Cepa padrão de *Candida glabrata* ATCC 2001;
Cepa padrão de *Candida krusei* ATCC 34135;
Ciclofosfamida (Genuxal®, Baxter Brasil®);
Cipionato de estradiol E.C.P® (Zoetis®);
Clotrimazol creme vaginal (EMS®);
Curcumina, grau de pureza de 77% e 78% (Sigma-Aldrich®, lotes SLBD0850V e SLBN7214V);
Estearato de octila (ViaPharma®);
Fosfatidilcolina de soja (Epikuron 200-Lucas Meyer Cosmetics®);
Macrogolglicerol ricinolato (Croduret 50-SS-RB-Croda®);
Metabissulfito de sódio (Synth®);
Metilparabeno (Deg®);
Monoestearato de glicerila (Ely Martins®);
Mucin from porcine stomach Type II (Sigma-Aldrich®);
Nistatina creme vaginal (NeoQuímica®);
Óleo mineral (D´Altomare Química®);
Polawax (Croda do Brasil®);
Rapithix-A60 (ISP do Brasil®);
Sabouraud dextrose agar (Acumedia®, Brasil);
Sabouraud dextrose caldo (Acumedia®, Brasil);
Triglicerídeo cáprico (Crodamol GTCC-LQ-BR-Croda®).

4.2 Solventes e reagentes

Acetato de sódio anidro (Cinética®);
Acetonitrila (J.T.Baker®);
Ácido acético glacial (Quemis®);
Ácido cítrico (Quemis®);
Cloreto de sódio (Vetec®);
Dimetilsulfóxido (Labsynth®);
Etanol (J.T.Baker® e Merck®);
Hidróxido de sódio (Cinética®);
Hipoclorito de sódio (Cuccaro & Cia®);
Metanol (J.T.Baker®);
Peróxido de hidrogênio (Merck®).

4.3 Equipamentos e softwares

Agitador MA 039 (Marconi®);
Autoclave digital (Digitale®);
Balança analítica (Owa labor®);
Balança analítica (Shimadzu®);
Balança semianalítica (Gehaka®);
Banho termostatizado (Quimis®);
Câmara de fluxo laminar (Becner®);
Centrífuga (Sorvall®);
Coluna Agilent Eclipse XDS, 4,6 x 250 mm, 5 µm (Agilent Technologies®);
Contador de colônias (Global Trade®);
Difratômetro de raios-X Rigaku (RINT-2000 goniômetro vertical);
Espectrofotômetro (Quimis®);
Estufa de incubação bacteriológica (Lucadema®);
Homogeneizador de sangue AP 22 (Phoenix®);
Homogeneizador T25 IKA Labortechnik (Ultra Turrax®);
HPLC Agilent, modelo 1100 series com detector Uv-Vis (Agilent Technologies®);

HPLC Waters Alliance com detector DAD (photodiode array) modelo 2996 (Waters®);
Microette HANSON 0700-1251 (Hanson-Research®);
Micropipetas (Labtex®);
Micropipeta de 2 e 20 µL (Eppendorf®);
Micropipeta de 20 e 200 µL (Eppendorf®);
Micropipeta de 100 e 1000 µL (Eppendorf®);
Microscópio de luz polarizada (Olympus BX41® com Câmera acoplada QColor3 Olympus America INC);
Microscópio óptico (Marte®);
Osmose reversa (Gehaka®);
Peagômetro, modelo B-474 (Micronal®);
Placas de petri descartáveis (Prolab®);
Reômetro com dispositivo placa – placa de 20 mm de diâmetro (modelo CLS 100, TA Instruments Carri Med);
Sistema de purificação de água (Milli-Q Plus, MILLIPORE®);
Software GraphPadPrism5®;
Software OriginLab® 2015;
Software Sigma Plot® 10.0;
Termômetro (Incoterm®);
Ultrassom (Unique®);
Vórtex MVS-1 (Biomixer®);
Vórtex KMC 1300 V (Vision®).

5 MÉTODOS

5.1 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS

5.1.1 Preparo do sistema emulsionado

O desenvolvimento do sistema emulsionado foi feito pelo coorientador deste trabalho prof. Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo na UFSJ (Universidade Federal de São João Del Rei - MG) para posterior análise quantitativa do princípio ativo e avaliação quanto à sua efetividade.

A Tabela 1 apresenta a composição da formulação desenvolvida bem como a quantidade de cada componente.

Tabela 1. Composição do sistema emulsionado.

	Componentes	**%**
Ativo	Curcumina	0,01%, 0,1%, 1,0%
Fase oleosa	Polawax	14,0
	Álcool cetoestearílico	4,0
	Monoestearato de glicerila	2,0
	Óleo mineral	2,0
	Estearato de octila	6,0
Fase aquosa	Rapithix A-60	1,50
	Metabissulfito de sódio	0,01
	Metilparabeno	0,10
	Água	q.s.p 100%
	Ácido cítrico	q.s.p pH 4-4,5

q.s.p. = quantidade suficiente para.

A formulação representada na Tabela 1 foi preparada aquecendo-se os componentes da fase oleosa e aquosa separadamente à 75 ºC até a completa fusão dos materiais graxos. A fase aquosa foi adicionada na fase oleosa sob agitação manual até atingir a temperatura ambiente. Após o resfriamento, a curcumina foi incorporada à formulação nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0% baseado nos resultados da concentração inibitória mínima (CIM) obtida neste trabalho. Para garantir a homogeneidade da formulação submeteu-se a agitação mecânica por 5 minutos e o pH da formulação foi ajustado a 4,0 - 4,5 (pH fisiológico vaginal).

Foram utilizados coadjuvantes técnicos com o propósito de minimizar os efeitos de oxidação e contaminação, de fornecer estabilidade ao sistema emulsionado e viscosidade adequada para sua aplicação intravaginal.

O polawax é uma combinação otimizada de emulsificantes e estabilizantes de origem vegetal, e o álcool cetoestearílico é uma mistura de álcool estearílico com álcool cetílico; estes componentes são importantes na formulação como agentes de emulsivos. A combinação de ceras é muito comum para se obter filmes interfaciais complexos garantindo a estabilidade da formulação.

O monoestearato de glicerila é um emulsionante secundário, capaz de dar consistência e também auxiliar na estabilidade da formulação. O Rapithix-A60 é um inovador polímero de modificação reológica adicionado na formulação também como agente formador de emulsão, é utilizado para ajustar a viscosidade do sistema e fornece flexibilidade à formulação, devido à tolerância ao cisalhamento.

Os tensoativos podem ser iônicos e não-iônicos, sendo que este último apesenta vantagens por serem menos tóxicos e menos sensíveis às variações de eletrólitos e pH, além disso, não possuem forças repulsivas elétricas, o que contribui para estabilidade da emulsão. Neste trabalho foram utilizados tensoativos não-iônicos.

O metabissulfito de sódio foi utilizado como agente antioxidante da formulação, para evitar o aparecimento de compostos de degradação consequentes do processo oxidativo. O estearato de octila foi utilizado como emoliente, ajudando na espalhabilidade; o óleo mineral foi utilizado como emoliente e lubrificante (PRISTA, 2002; AULTON 2005).

O conservante antimicrobiano utilizado foi o metilparabeno; e o ácido cítrico foi utilizado para acertar o pH da formulação (PRISTA, 2002; AULTON 2005).

O pH ideal da formulação foi padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância biológica para produtos intravaginais, que é em torno de 4,5. Considerando o pH fisiológico vaginal em torno de 4,5 e o pH patológico na candidíase vulvovaginal é entre 2 e 4, o pH ideal para a formulação proposta foi em torno de 4,5 ± 1,0 (GIRALDO et al., 1999; ÁLVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007; THOMPSON, 2013,

p. 243; GARCIA et al., 2009). O pH deve ser compatível com os demais componentes da formulação, garantindo a eficácia e segurança do produto (ANVISA, 2004).

Devido à dificuldade de solubilização da curcumina, esta foi incorporada ao final do preparo do sistema emulsionado (sem princípio ativo), a utilização do homegeneidor automático ajudou a garantir a homogeneidade do princípio ativo na formulação.

Foi necessário acondicionar a formulação em tubo de alumínio para evitar a fotodegradação da curcumina e o contato da formulação com o ar (COUSINS et al., 2007; LU, KELLY, MIAO 2016; TEJADA et al., 2016).

Foi feita a análise estrutural do sistema emulsionado através de microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), difração de raios-X (DRX) e comportamento reológico. Também foi avaliada a estabilidade e efetividade da formulação. Para estes estudos foram analisadas formulações sem curcumina e com curcumina nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0% baseado nos resultados da concentração inibitória mínima obtida neste trabalho.

5.1.2 Desenvolvimento do sistema pseudoternário

5.1.2.1 Construção do diagrama de fases pseudoternário

Para a construção do diagrama de fases pseudoternário, foram preparadas trinta e seis amostras (pontos) de 2 mL em frascos transparentes com tampa. Cada ponto, correspondente a um ponto do diagrama de fases pseudoternário, foi feito adicionando-se o tensoativo/co-tensoativo na fase oleosa, esta mistura foi aquecida em banho termostatizado até a fusão completa dos materiais, foi adicionada então a fase aquosa levemente aquecida, seguida de agitação até o resfriamento para homogeneização dos componentes.

Foram utilizados: triglicerídeo cáprico/caprílico (Crodamol GTCC-LQ-BR® – fase oleosa), fosfatidilcolina de soja (Epikuron 200®) e macrogolglicerol ricinolato (Croduret 50-SS-RB®) na proporção de 50:50 (tensoativo/co-tensoativo) e solução tampão acetato de sódio pH 4,5 (fase aquosa) (CRODA,

2014a; CRODA, 2014b; LUCAS MEYER COSMETICS).

Após o preparo e homogeneização dos componentes, cada ponto do diagrama de fases pseudoternário foi deixado em repouso por 24 horas, para a estabilização dos sistemas formados, após este período, foram classificados visualmente contra um fundo escuro como: sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso transparente (SVT), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso opaco (SVO) e separação de fases (SF).

A escolha do tampão acetato de sódio 0,01 *M* pH 4,5 como fase aquosa se deu por conta do pH fisiológico vaginal, além disso, o tampão acetato de sódio pH 4,5 possui total aplicabilidade em formulações de uso interno (GIRALDO et al., 1999; ÁLVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007; GARCIA et al., 2009; THOMPSON, 2013, p. 243).

Um importante aspecto a ser estudado no desenvolvimento de sistemas são os constituintes dos mesmos, pois muitos adjuvantes farmacêuticos possuem limitações quanto à sua biocompatibilidade. Neste trabalho, o triglicerídeo cáprico/caprílico foi escolhido como constituinte da fase oleosa da formulação; é um triglicerídeo de cadeia média (TCM) constituído por ésteres de ácidos caprílicos e cápricos. Por ser derivado de ácidos graxos saturados, possui baixa viscosidade, proporcionam grande estabilidade oxidativa e são considerados toxicologicamente e dermatologicamente inócuos, classificados como GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA. Possuem ampla aplicação como veículo para preparações tópicas e são excelentes diluentes para princípios ativos (CRODA, 2014a).

Foi utilizada uma mistura de tensoativos para que fosse possível reduzir ainda mais a tensão interfacial do sistema, tornando-o mais estável quanto à separação de fases. Dessa forma como agentes tensoativo/co-tensoativo, foram utilizados a lecitina de soja e o macrogolglicerol ricinolato (óleo de rícino hidrogenado) na proporção 50:50 (CRUZ & UCKUN, 2001).

Na escolha da lecitina de soja foi levado em conta a biocompatibilidade e biodegradação das lecitinas de origem vegetal (lecitina de soja). As lecitinas são fosfolipídios de origem natural largamente utilizados no preparo de sistemas de liberação lipídicos, são capazes de reduzir a tensão interfacial e aumentar a repulsão entre as gotículas, sendo por isso um dos principais fatores relacionados à estabilidade do sistema de liberação (OLIVEIRA &

SCARPA, 2001; OLIVEIRA, SCARPA, CERA, 2002; CHORILLI et al., 2007; DAMASCENO et al., 2011).

O macrogolglicerol ricinolato (óleo de rícino hidrogenado ou PEG-40) também exerce a função de agente tensoativo, ou seja, reduz a tensão superficial das substâncias a serem emulsionadas e ajuda na solubilização dos componentes da formulação. É um solubilizador não iônico e agente emulsionante no qual os principais componentes são de gliceril polietileno oxiestearato de glicol que em conjunto com ésteres de ácidos graxos de gliceril de poligliceril, formam a parte hidrofóbica do óleo de rícino hidrogenado. É utilizado para solubilizar os óleos etéreos, vitaminas e substância ativas hidrofóbicas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005; CRODA, 2014b).

É importante destacar que os tensoativos escolhidos são de caráter não-iônicos, uma vez que estes são mais aceitáveis em aplicações farmacêuticas, pois são menos afetados pelas mudanças de pH e forças iônicas; e ainda contornam os problemas de toxicidade relativos aos agentes tensoativos (CRUZ & UCKUN, 2001; CHORILLI et al., 2007).

Como agente conservante do sistema, foi utilizado o benzoato de sódio na concentração de 0,1% e dissolvido na fase aquosa.

5.1.2.2 Seleção do sistema pseudoternário a partir do diagrama de fases pseudoternário

Foi escolhido um sistema para incorporação da curcumina que tivesse a viscosidade adequada para uma aplicação intravaginal. A curcumina foi incorporada ao sistema ao final do preparo, utilizou-se o homogeneizador automático para garantir a uniformidade do conteúdo da formulação. O armazenameto da formulação foi feito em tubo de alumínio para evitar a fotodegradação da curcumina e o contato da formulação com o ar (COUSINS et al., 2007; LU, KELLY, MIAO 2016; TEJADA et al., 2016).

Foi feita a análise estrutural do sistema pseudoternário escolhido utilizando microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), difração de raios-x (DRX) e comportamento reológico, também foi avaliado a estabilidade e efetividade da formulação, para estes estudos foram analisadas formulações sem curcumina e com curcumina nas

concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0% baseado nos resultados da concentração inibitória mínima obtida neste trabalho.

5.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FORMULAÇÕES ESCOLHIDAS

5.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)

Colocou-se uma pequena quantidade das formulações sobre uma lâmina de vidro e cobriu-se as amostras com lamínula, para análise por microscopia de luz polarizada com aumento de 10 e 20 vezes. Avaliou-se a homogeneidade das dispersões e com o auxílio da polarização, observou-se a presença de áreas de isotropia e/ou anisotropia. A análise foi realizada a temperatura ambiente (25 ± 2 ºC).

O microscópio de polarização utiliza dois filtros polarizadores no caminho da luz, um acima e outro abaixo da amostra, sendo um deles analisador e o outro polarizador. O feixe luminoso é conduzido pelo filtro em uma só direção, processo que recebe o nome de plano de luz polarizada. A luz é polarizada em um plano à medida que passa através do primeiro filtro e alcança a amostra. Partes padronizadas ou cristalinas, com espaçamento regular, giram a luz passando através delas. Em seguida, uma porção dessa luz “girada” passa através do segundo filtro de polarização, de modo que sejam observadas áreas luminosas regularmente espaçadas, que contrastam em um plano de fundo escuro. De maneira geral um objeto amorfo (não refringente) se colocado na platina do microscópio e com os prismas na mesma posição em ângulo reto, será observado um campo escuro, pois a luz não será dividida pela amostra, neste caso tem-se um campo isotrópico. No caso de estruturas cristalinas ou birrefringentes, como cristais-líquidos, uma imagem luminosa aparecerá em fundo escuro formando um campo anisotrópico; cada mesofase apresenta uma estrutura óptica típica, dessa forma, a interação entre a amostra e a luz polarizada, fornece informações sobre as estruturas do sistema analisado (CHORILLI et al., 2009).

5.2.2 Difração de raios-X (DRX)

Na técnica de difração de raios-X ocorre um fenômeno no qual os átomos de um cristal, em virtude de seu espaçamento uniforme, causam um padrão de interferência das ondas de um feixe incidente de raios-X. Essa técnica é empregada para verificar a presença de estruturas cristalinas, nas quais os átomos dos cristais fazem com que o feixe de raios-X incidente difrate em muitas direções específicas (FIGUEIREDO NETO et al., 1985).

Foram analisados os componentes semi-sólidos e sólidos dos sistemas emulsionado e pseudoternário. Foi utilizado o difratômetro de raios-X Rigaku (RINT-2000 goniômetro vertical) nas seguintes condições: raios-x: 40 kV/50 mA, velocidade de varredura: 2 segundos a cada 0,02º em um intervalo de 3º até 40º, fenda de divergência: 1/4 deg, fenda de divergência horizontal: 5 mm, fenda de espalhamento: 8 mm. Cada plano de átomos nos arranjos cristalinos causam uma difração típica da radiação incidente, de acordo com suas estruturas internas; assim, foram medidas as intensidades dos feixes difratados em função dos ângulos de difração.

5.2.3 Espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS)

O arranjo estrutural dos sistemas foi analisado também por SAXS. Os dados foram coletados na estação de medidas D11-A SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) em Campinas - SP, em monocromador do tipo Si (111) comprimento de onda de 1,608 Å. As amostras foram colocadas em uma cela à temperatura ambiente. O espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades das amostras com e sem curcumina foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

Foi determinada a intensidade de espalhamento I(q) (expressa em unidades arbitrárias) em função do módulo do vetor de espalhamento (q) utilizando um detector de raios-X sensível à posição bidimensional.

5.2.4 Comportamento reológico

O comportamento reológico das amostras, tanto para reologia oscilatória quanto continua, foi avaliado empregando-se reômetro AR2000ex (TA Instruments) com geometria placa/placa (20 mm de diâmetro) em temperatura de 30 ºC, cada teste foi feito em triplicata.

Para a análise reológica contínua foram avaliadas as propriedades de fluxo e escomento dos sistemas quando estes sofrem uma determinada tensão. Este estudo é composto por duas etapas, a primeira na qual aumenta-se a taxa de cisalhamento e depois diminui-se essa taxa, formando as curvas ascedente e descendente (SCHRAMM et. al., 2006; PESTANA et. al., 2009; SAVIC et al., 2011).

O comportamento de fluxo (ou escoamento) do material foi determinado através da análise de um gráfico, chamado curva de fluxo, que correlaciona a tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, sendo que a taxa de cisalhamento utilizada para a curva ascendente foi de 0 a 100 Hz por 120 segundos e para a curva descendente foi de 100 a 0 Hz, também por 120 segundos. A partir dos dados obtidos neste teste também é possível obter a visosidade em função da taxa de cisalhamento, que vai de 0 a 100 Hz (curva ascendente) e 100 a 0 Hz (curva descendente).

Foram avaliadas também as áreas de histerese para as curvas de fluxo, com o objetivo de avaliar o grau de tixotropia e anti-tixotropia dos sistemas, o índice de comportamento de fluxo e de consistência e ainda, a viscosidade aparente mínima.

Na análise reológica oscilatória utilizou-se o reômetro em modo *fluency (flow)*. Uma pequena quantidade de amostra foi colocada sobre a base inferior do reômetro. Aguardou-se 3 minutos em repouso para equilíbrio térmico da amostra com a temperatura do equipamento.

No teste de varredura de tensão colocou-se o reômetro em modo *amplitude sweep,* podendo assim determinar a região viscoelástica linear e seleção da tensão que será empregada nas análises de varredura de frequência e nos ensaios de fluência e recuperação, para estes testes é necessário utilizar uma tensão que não provoque a destruição do sistema.

Assim, foi feita uma varredura de tensão através de uma tensão de cisalhamento variável de 0 a 100 Pa com frequência constante de 1 Hz.

Após a determinação da região viscoelástica, colocou-se o reômetro em modo *frequency sweep* para avaliação da varredura de frequência. Neste teste as amostras foram submetidas à tensão constante de 1 Pa, utilizando frequências variáveis de 1 a 100 Hz e assim foram determinados os módulos elástico (G') e viscoso (G'') das formulações e com os resultados obtidos, foi feita uma análise quantitativa dos módulos G' e G''.

Todos os ensaios foram realizados nos sistemas com e sem a incorporação da curcumina, em triplicata sob temperatura de 30 ºC ±1.

5.2.5 Mucoadesão *in vitro*

Existem diversos modos de avaliar as propriedades mucoadesivas de um sistema, como elipsometria, resistência à tração e medidas reológicas. Neste trabalho foi utilizado medidas reológicas oscilatórias para avaliar as propriedades mucoadesivas dos sistemas emulsionado e pseudoternário (IVARSSON & WAHLGREN, 2012).

Inicialmente foi preparada uma dispersão contendo 20 mg de mucina (Sigma-Aldrich®) em 100 mL de ácido clorídrico 0,1*M,* resultando na concentração final de 20% (p/v) de mucina. Essa mistura foi agitada suavemente em agitador magnético por 3 horas a 25ºC. Foi pesado cerca de 15 g de cada um dos sistemas (C_CUR1% e F27_CUR1%) e adicionou-se 100 mL de ácido clorídrico 0,1 *M* (HASSAN & GALLO, 1990).

Para análise reológica oscilatória foram feitas 3 misturas contendo:

- 6 mL da dispersão de mucina com 2 mL do sistema C_CUR1% em ácido clorídrico 0,1 *M*;
- 6 mL da dispersão de mucina com 2 mL do sistema F27_CUR1% em ácido clorídrico 0,1 *M*;
- 6mL da dispersão de mucina com 2 mL de ácido clorídrico 0,1 *M*.

Ao final, a concentração da mucina nas misturas foi de 15% (p/v) (HASSAN & GALLO, 1990).

Para análise reológica oscilatória utilizou-se reômetro AR2000ex (TA

Instruments) com geometria placa/placa em modo *fluency (flow)*. Uma pequena quantidade de amostra foi colocada sobre a base inferior do reômetro. Aguardou-se 3 minutos em repouso para equilíbrio térmico da amostra com a temperatura do equipamento.

No teste de varredura de tensão colocou-se o reômetro em modo *amplitude sweep,* para seleção da tensão que será empregada nas análises de varredura de frequência. Assim, foi feita uma varredura de tensão através de uma tensão de cisalhamento variável de 0 a 100 Pa com frequência constante de 1 Hz (MORTAZAVI, 1995; MADSEN, EBERTH, SMART, 1998; HÄGERSTRÖM, PAULSSON, EDSMAN, 2000; ANDRADE, PARENTE, ARES, 2014).

Na varredura de frequência, colocou-se o reômetro em modo *frequency sweep.* Neste teste as amostras foram submetidas à tensão constante de 1 Pa, utilizando frequências variáveis de 1 a 100 Hz. Todos os ensaios foram realizados em triplicata sob temperatura de 36,5 ºC ±1 (MORTAZAVI, 1995; MADSEN, EBERTH, SMART, 1998; HÄGERSTRÖM, PAULSSON, EDSMAN, 2000; ANDRADE, PARENTE, ARES, 2014).

Para avaliar as propriedades mucoadesivas dos sistemas a partir dos resultados da varredura de frequência, foi feita a análise quantitativa dos módulos G’ e G’’ e análise dos parâmetros viscoelásticos dinâmicos (ΔG', ΔG'', Tan δ) de acordo com as Equações 1, 2 e 3 (MADSEN, EBERTH, SMART, 1998; HÄGERSTRÖM, PAULSSON, EDSMAN, 2000; ANDRADE, PARENTE, ARES, 2014).

$$\Delta G' = G'_{(mistura)} - G'_{(mucina)} \qquad \textbf{Equação 1}$$

$$\Delta G'' = G''_{(mistura)} - G''_{(mucina)} \qquad \textbf{Equação 2}$$

$$\text{Tan } \delta = G''/G' \qquad \textbf{Equação 3}$$

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DE CURCUMINA NAS FORMULAÇÕES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para a quantificação da curcumina nas formulações provenientes dos estudos de estabilidade preliminar e estudos de liberação *in vitro*, foi utilizado um método analítico descrito na literatura por Wichitnithad et al. (2009) e aprimorado por Fonseca-Santos, Gremião e Chorilli (2016).

O método foi revalidado de acordo com as diretrizes estabelecidas pelos órgãos nacionais e internacionais, como RE 899/2003 (ANVISA), ISO 17025 (INMETRO), ICH (2010) e outros guias que exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental para garantir a segurança e a confiabilidade dos resultados.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca AGILENT, modelo 1100 Series com detector UV-Vis. A fase móvel foi composta por acetonitrila (grau HPLC) e ácido acético 2% (v/v) na proporção de 50:50, a coluna cromatográfica foi C18 Agilent Eclipse XDS 4,6 x 250 mm (5 µm) e as condições cromatográficas foram: fluxo 1,2 mL/min, injeção de 20 µL, detecção à 425 nm e temperatura do forno 34°C (JAYAPRAKASHA, RAO, SAKARIAH, 2002; JADHAV, MAHADIK, PARADKAR, 2007; WICHITNITHAD et al., 2009; KOOP et al., 2013; FONSECA-SANTOS, GREMIÃO, CHORILLI, 2016).

As soluções padrão e amostra foram diluídas em metanol (grau HPLC) obtendo concentração final teórica de 0,001 mg/mL; 0,050 mg/mL e 0,010 mg/mL.

A solução amostra foi preparada a partir da pesagem de 1000 mg de formulação contendo 0,01%, 0,1% e 1,0% de curcumina e diluídas em balão volumétrico de 100 mL, assim obteve-se três soluções amostra com curcumina nas concentrações de cerca de 0,001 mg/mL; 0,050 mg/mL e 0,100 mg/mL. As soluções amostras foram levadas ao banho de ultrassom por uma hora, em temperatura ambiente.

Os parâmetros avaliados foram: especificidade/seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e limite de quantificação.

5.3.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade do método analítico foi avaliada com as formulações contendo 1% de curcumina.

Foi avaliado a influência dos sistemas sem curcumina, representados por C (sistema emulsionado) e F27 (sistema pseudoternário), e da fase móvel na quantificação do pico da curcumina.

Além disso, quando as impurezas e produtos de degradação não estão disponíveis, a seletividade pode ser avaliada submetendo-se o analito a condições de estresse, que forçam a obtenção de produtos de degradação, sendo possível verificar a interferência destes produtos na análise.

Pimeiramente, foi pesado 1,0 g de cada formulação base (formulação sem o princípio ativo) em balão volumétrico de 100 mL, assim, pôde-se avaliar se houve alguma interferência do placebo no pico de interesse. Também foram preparadas amostras pesando 1,0 g das formulações contendo 1% de curcumina e submetendo-as em contato com 3 mL de: água, solução de hidróxido de sódio 0,1 *M*, solução de ácido clorídrico 0,1 *M*, solução de peróxido de hidrogênio 10 V e em luz ultravioleta (254 nm), por um período de 3 horas. O teste de estresse foi realizado utilizando-se o sistema C_CUR1% (sistema emulsionado contendo 1% de curcumina) e F27_CUR1% (sistema pseudoternário contendo 1% de curcumina). Desta forma, foi possível verificar a presença de picos de produtos de degradação que poderiam interferir no pico de interesse.

5.3.2 Linearidade

Para avaliação da linearidade foram preparados seis padrões de curcumina em diferentes concentrações finais práticas, em triplicata: Padrão 1: 0,8 µg/mL; Padrão 2: 10,1 µg/mL; Padrão 3: 31,0 µg/mL; Padrão 4: 40,5 µg/mL; Padrão 5: 85,4 µg/mL; Padrão 6: 120 µg/mL. Foi avaliada a relação linear e os resultados foram tratados pelo coeficiente de variação em relação ao fator de resposta de cada concentração.

5.3.3 Precisão

5.3.3.1 Precisão (repetibilidade)

De acordo com a RE 899/2003 (BRASIL, 2003), a repetibilidade do método pode ser verificada com nove determinações no mínimo, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, cada uma em triplicata ou ainda um mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

A avaliação da precisão intra-corrida (repetibilidade) foi realizada utilizando-se as formulações contendo 1,0% de curcumina com concentração final teórica correspondente a 0,010 mg/mL. A análise foi feita em sextuplicata para cada sistema, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista.

5.3.3.2 Precisão intermediária

A precisão inter-corrida (intermediária) foi realizada da mesma forma e nas mesmas condições que a precisão por repetibilidade, mas com analistas diferentes e em dias diferentes. Analisou-se desta forma a concordância dos resultados através do coeficiente de variação.

5.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pela recuperação do princípio ativo na matriz, para isso, foram utilizadas as formulações contendo curcumina nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0%. A análise foi feita em triplicata e a exatidão foi expressa pela porcentagem de curcumina nas formulações.

5.3.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação pode ser estabelecido por meio da análise de soluções com concentrações decrescentes do princípio ativo até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003).

O limite de quantificação foi obtido diluindo-se a solução Padrão 1 (0,8 µg/mL) e analisando-se a resposta obtida no cromatógrafo até a mínima concentração em que se obteve uma resposta com precisão e exatidão. A concentração mínima foi testada em triplicata e os resultados foram avaliados através do cálculo do coeficiente de variação.

Também foi calculado o limite de quantificação teórico, de acordo com a Equação 4:

$$LQ = \frac{10DP}{B}$$

Equação 4

Na qual:

DP: o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação

B: inclinação da curva analítica

5.4 ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004)

5.4.1 Teste de centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado conforme descrito no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004), embora não seja obrigatória sua execução em medicamentos, é uma ferramenta importante e foi utilizada com o intuito de auxiliar e orientar na escolha da formulação adequada, que será utilizada no estudo de estabilidade preliminar e demais testes.

As formulações desenvolvidas foram submetidas à centrifugação à 3000 rpm por 30 minutos e avaliadas visualmente quanto ao aspecto, cor, precipitações e separação de fases.

5.4.2 Estudo de estabilidade preliminar

As formulações submetidas ao teste de centrifugação, que não apresentaram sinais visuais de instabilidade, foram submetidas ao estudo de estabilidade preliminar, este estudo de estabilidade foi realizado com as formulações contendo 1% de curcumina.

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado para avaliar a estabilidade física e química das formulações. As formulações desenvolvidas foram submetidas ao ciclo, de alternância de temperatura de 4°C ± 2 por 24 horas e 40 °C ± 2 (com umidade controlada a 75%) por mais 24 horas, durante 15 dias consecutivos. Os parâmetros monitorados foram: características organolépticas, pH, comportamento reológico, microscopia de luz polarizada e teor de curcumina. Todas as análises foram feitas em triplicata; o comportamento reológico e microscopia de luz polaizada foram realizados no primeiro e décimo quinto dia do ensaio (BRASIL, 2004).

5.4.2.1 Características organolépticas

A avaliação macroscópica foi feita observando-se as características organolépticas, levando em consideração os seguintes parâmetros: aspecto, cor e odor, durante os 15 dias de estudo de estabilidade.

5.4.2.2 Determinação do pH

Segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), existem dois métodos para verificar o potencial hidrogeniônico de uma amostra: o potenciométrico onde a determinação é feita medindo-se a diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra, e o método colorimétrico, que utiliza indicadores universais, escalas preparadas com soluções tampões e indicadores. Este método não possui alta sensibilidade mas possui a vantagem de ser rápido, fácil e de baixo custo.

Considerando que para o método potenciométrico é necessário um eletrodo adequado ao tipo de formulação a ser analisada, e devido à

consistência e forte pigmentação das formulações, o método escolhido para medir o pH foi utilizando papel indicador de pH (0-14) Merck® (BRASIL, 2004).

O controle do pH em produtos de aplicação intravaginal tem como objetivo manter as condições do pH vaginal preservando a flora normal feminina, além de não causar irritações na mucosa vaginal. Além disso, o pH de uma formulação deve permanecer estável e compatível com os demais componentes do sistema, garantindo a eficácia e segurança do produto; alterações no pH podem indicar instabilidade, muitas vezes não perceptíveis visualmente. Considerando que o pH fisiológico vaginal em torno de 4,5 e que o pH patológico na candidíase vulvovaginal é entre 2 e 4, o pH ideal para as formulações propostas foi de 4,5 ± 1,0 (GIRALDO et al.,1999; ÁLVAREZ et al., 2007).

5.4.2.3 Microscopia de luz polarizada (MLP)

A avaliação quanto ao aspecto microscópico foi feita colocando-se uma pequena quantidade de formulação na lâmina para análise em microscópio de luz polarizada com aumento de 10 e 20 vezes, conforme descrito no item 5.2.1.

Foi avaliado a presença de campos isotrópicos e anisotrópicos e observado se as estruturas características dos sistemas estudados permaneceram estavéis ao longo do estudo de estabilidade preliminar. Foram avaliadas as amostras no início (análise inicial) e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar sob as condições descritas.

5.4.2.4 Comportamento reológico

O comportamento reológico das amostras submetidas ao estudo de estabilidade preliminar foi efetuado em reômetro AR2000ex (TA Instruments®) com geometria placa/placa (20 mm de diâmetro) em temperatura de 30 ºC ± 1. Os testes realizados foram feitos em triplicata conforme descritos no item 5.2.4. Foram avaliadas as amostras no início (análise inicial) e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar sob as condições descritas.

5.4.2.5 Quantificação da curcumina nas formulações

Foi pesado exatamente cerca de 1,0 g do sistema emulsionado contendo 1% de curcumina em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se cerca de 60 mL de metanol e levou-se as amostras ao banho de ultrassom por uma hora, após esta etapa, o volume do balão volumétrico foi completado até o menisco com metanol e o conteúdo foi homogeneizado, filtrou-se uma pequena alíquota em unidade filtrante RC 0,45 µm para um recipiente limpo e seco, a amostra foi analisada de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 5.3. O mesmo procedimento foi feito pesando-se 1,0 g do sistema pseudoternário contendo 1% de curcumina. Cada amostra foi analisada em duplicata.

5.5 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DAS FORMULAÇÕES ESCOLHIDAS

5.5.1 Determinação da solubilidade da curcumina e escolha da solução receptora

Os ensaios de liberação *in vitro* devem ser conduzidos sob *condições sink*, as quais garantem que a concentração do fármaco no meio, durante todo o teste, esteja entre 10 à 15 % do valor de saturação do meio receptor, isso impede que a concentração do fármaco no meio receptor se aproxime da concentração de saturação do meio. Dessa forma, a velocidade de liberação está relacionada com a liberação do princípio ativo a partir da formulação e não é influenciada pela saturação do meio receptor.

Para que fosse possível a escolha da melhor solução receptora, que pudesse garantir a *condição sink* nos ensaios realizados, primeiramente foi avaliada a solubilidade da curcumina em diversos meios receptores.

Para avaliar a solubilidade da curcumina nas diversas fases receptoras, foi adicionado exatamente cerca de 13,7 mg (excesso) de curcumina em 25 mL de solução receptora, a partir desse resultado obteve-se o coeficiente de saturação dos meios receptores. Cada amostra preparada foi filtrada em membrana filtrante RC 0,45 µm e a quantidade de curcumina dissolvida no

meio foi analisada por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), conforme método analítico descrito no item 5.3. A Tabela 2 mostra os meios receptores avaliados.

Tabela 2. Composição das soluções receptoras avaliados.

Meios receptores
Tampão acetato* pH 4,5 + Procetyl® (2%)
Tampão acetato* pH 4,5 + Etanol (5%)
Tampão acetato* pH 4,5 + Etanol (20%)
Tampão acetato* pH 4,5 + Etanol (30%)
Tampão acetato* pH 4,5 + Etanol (50%)
Propilenoglicol (15%) + Span® 80 (1%) + Etanol (5%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)
Propilenoglicol (7,5%) + Procetyl® (2%) + Etanol (5%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)
Propilenoglicol (15%) + Span 80® (1%) + Etanol (20%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)
Propilenoglicol (15%) + Span 80® (1%) + Etanol (30%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)
Propilenoglicol (15%) + Span 80® (1%) + Etanol (50%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)
Propilenoglicol (8%) + Span 80® (2%) + Etanol (30%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)
Procetyl® (5%) + Etanol (30%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)
Propilenoglicol (10%) + Procetyl® (3%) + Etanol (30%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)

*Tampão acetato de sódio 0,01M pH 4,5; q.s.p. = quantidade suficiente para.

5.5.2 Preparo da solução tampão acetato de sódio pH 4,5

A solução tampão acetato de sódio pH 4,5 foi preparada segundo a Farmacopeia Americana (USP 38, 2015), pesando-se 2,99 g de acetato de sódio ($NaC_2H_3O_2.3H_2O$) para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionou-se cerca de 600 mL de água ultrapura e adicionou-se 14 mL de solução de ácido acético *2 M*. O volume foi completado com água ultrapura para 1000 mL. O pH foi verificado em peagômetro e procedido os ajustes para pH 4,5, com HCl puro ou solução de NAOH 10%.

5.5.3 Curva analítica da curcumina na solução receptora

Foi contruída uma curva analítica partindo-se de uma solução estoque de 426,0 µg/mL de curcumina na solução receptora escolhida. Foram preparadas novas diluições nas concentrações finais práticas de 2, 100, 200 e 300 µg/mL.

Estas soluções foram filtradas em unidade filtrante RC 0,45 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme os parâmetros cromatográficos descritos no item 5.3. Cada concentração descrita foi feita em triplicata.

As médias das áreas dos picos cromatográficos obtidos foram utilizados para verificar a relação linear e a obtenção do coeficiente de correlação.

5.5.4 Ensaio de liberação *in vitro* e avaliação da cinética de liberação

Para avaliar a liberação da curcumina a partir das formulações, utilizou-se equipamento automatizado de permeação cutânea da marca Hanson-Research, contendo seis células de Franz modificadas (Figura 5) com 7 mL de volume aproximadamente. No ensaio de liberação *in vitro* foi utilizado membrana sintética de acetato de celulose 0,45 µm (Sigma-Aldrich®). As células de Franz foram preenchidas com a solução receptora escolhida. As formulações foram pesadas tarando-se a balança com o anel dosador, para estimar a quantidade de formulação colocada sobre a membrana disposta na célula de difusão (aproximadamente 290,0 mg e área de exposição de 1,77 cm^2).

Os experimentos foram conduzidos a 37°C ± 1 e a solução receptora foi constantemente agitada a 300 rpm, por meio de placa magnética agitadora, localizada abaixo das células de Franz. As formulações foram transferidas com auxílio de espátula para o anel dosador colocado sobre a membrana disposta na célula de difusão.

Foram coletadas alíquotas de 1,5 mL nos tempos de 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas, filtradas em membrana RC 0,45 µm e analisadas por CLAE para a quantificação de curcumina no meio receptor. Foi utilizada coluna C18 Agilent Eclipse XDS 4,6 x 250 mm (5 µm), a fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila e ácido acético 2% (v/v) na proporção de 50:50 (v/v), fluxo 1,2 mL/min, injeção de 20 µL, detecção à 425 nm e temperatura do forno 34°C ± 1. Um volume de 0,8 mL foi desprezado antes do início de cada coleta. As alíquotas coletadas e os volumes desprezados foram repostos automaticamente com o objetivo de manter a condição *sink* do sistema.

A Equação 5 (USP, 2015), demonstrada abaixo, foi utilizada para calcular

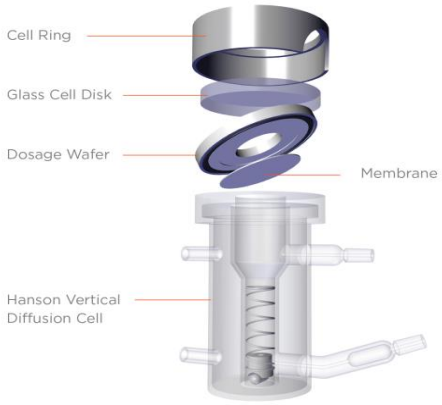
a quantidade real liberada (Q real) em cada tempo de coleta:

Q real, t = Ct . Vr + ΣVc .Cc **Equação 5**

No qual:
Q real, t = quantidade real liberada referente ao tempo t;
Ct = concentração obtida referente ao tempo t;
Vr = volume da solução receptora (7 mL);
Cc = concentração da amostragem anterior;
Vc = volume amostrado (coletado + limpeza).

O perfil de liberação das formulações foi avaliado matematicamente seguindo diversos modelos de cinética de liberação propostos na literatura. Os coeficientes de correlação (r) da fração linear das curvas de liberação foram estabelecidos pela inclinação da reta obtida por regressão linear. A Figura 6 mostra a célula de Franz utilizada no experimento.

Figura 6. Célula de difusão utilizada para estudos de liberação *in vitro*. Disponível em: <http://www.hansonresearch.com>. Acesso em abril 2017.



5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

5.6.1 Microrganismos

Foram utilizadas neste trabalho as seguintes cepas: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida glabrata* ATCC 2001,

Candida krusei ATCC 34135 e 5 cepas de *Candida albicans* de origem clínica, identificadas e cedidas pelo Laboratório Biocentro Ltda., em Divinópolis-MG (Bioquímica Responsável: Dra. Marivalda A. R. Oliveira).

As leveduras ficaram mantidas em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) acrescido de 20% de glicerol a -20 ºC e para o uso foram reativadas transferindo-se uma alíquota para CSD e incabação à 36ºC ± 1 por 48 horas.

5.6.2 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

5.6.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da curcumina (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) da curcumina foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo, conforme descrito no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), no entanto, o caldo RPMI-1640 foi substituído pelo Caldo Sabouroud Dextrose (CSD) (ARAÚJO et al., 2013).

A levedura reativada foi semeada através de estrias em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubada por 24 horas a 37ºC ± 1.

Colônias isoladas foram coletadas e transferidas para um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina estéril (0,85%) até obter a densidade celular equivalente a 0,5 na escala McFarland (correspondente a 10^6 UFC/mL). A densidade correta foi ajustada através de leitura espectrofotométrica a 530 nm, na qual a absorbância varia entre 0,08 a 0,10. A partir dessa solução foi feita uma diluição de 1:50 em solução salina, obtendo uma concentração de cerca de 10^4 UFC/mL.

Em microplacas de 96 poços, foi adicionado 80 µL de CSD em cada poço. As microdiluições foram feitas colocando-se 100 µL da solução teste no primeiro poço, resultando em um volume final de 180 µL. A partir do primeiro poço foi transferido 100 µL para o segundo poço, já contendo 80 µL de meio, resultando também em um volume final de 180 µL; foram feitas as mesmas microdiluições para os poços subsequentes. Ao final, cada poço continha o volume de 80 µL, então foi adicionado 20 µL do inóculo em cada poço, assim, o

volume final de cada poço foi de 100 µL e a concentração do inóculo foi cerca de 10^3 UFC/mL.

A curcumina foi diluída em etanol e testada em um range de 1,9 a 1000 µg/mL. O controle positivo utilizado foi o cetoconazol em concentrações que variaram de 0,97 µg/ml a 1000 µg/mL. O cetoconazol utilizado como controle positivo pois é citado como um dos fármacos para referência pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

O etanol foi utilizado como controle negativo e também foi realizado um controle de crescimento fúngico (sem a adição da curcumina). As microplacas foram incubadas a 37 ºC ± 1 por 48 horas e a inibição do crescimento foi determinada visualmente e confirmada por meio da adição de 50 µL do reagente cloreto de trifeniltetrazólio (TCC) a 2% e reincubação das placas a 35 °C ± 1 por 3 horas.

O crescimento fúngico foi revelado pela mudança da coloração do meio para vermelho, enquanto que a ausência de crescimento não há alteração na cor. A CIM foi considerada a menor concentração do agente testado capaz de impedir o crescimento microbiano visível (ARAÚJO et al., 2013).

5.6.2.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima da curcumina (CFM)

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) da curcumina foi determinada a partir do teste feito para a obtenção da concentração inibitória minima. Para isso, foi inoculado 10 µL da suspensão dos poços nos quais não houve crescimento visível (após 48 horas de incubação e anterior à adição de TCC), em uma placa de Petri contendo meio Ágar Sabouroud Dextrose (ASD), utilizando o método de espalhamento com alça de Drigalski. O procedimento foi feito então com as concentrações referentes à CIM e acima da CIM obtida. As placas foram incubadas a 37ºC± 1 por 48 horas. A CFM foi considerada a menor concentração do agente testado capaz de causar a morte de qualquer colônia de levedura em meio de cultura sólido.

5.6.2.3 Avaliação do mecanismo de ação: ligação da curcumina ao ergosterol exógeno

Para determinar se a curcumina liga-se ao esterol da membrana fúngica, foi realizado (novamente) o teste para determinação da concentração inibitória mínima da curcumina, pelo método da microdiluição, com adição de ergosterol (200 µg/mL) nos poços teste. Se atividade da curcumina for devido à sua ligação ao ergosterol, o ergosterol exógeno impede a ligação ao ergosterol da membrana fúngica. Como consequência, tem-se um aumento do valor da CIM na presença do ergosterol exógeno. A nistatina foi utilizada como controle positivo pois seu mecanismo de ação se dá pela ligação ao ergosterol da membrana fúngica.

5.7 ENSAIOS EXPERIMENTAIS DE CVV *IN VIVO* E TRATAMENTOS

5.7.1 *C. albicans,* condições de crescimento e inóculo

Para este estudo foi utilizada a cepa padrão de *C. albicans* ATCC 10231 previamente cultivada em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Acumedia®, Brasil), no período de 48 horas a 37°C ± 1. O preparo do inóculo utilizado no experimento foi feito transferindo-se uma ou duas colônias da levedura em 10 mL de solução salina 0,85%. O número de células viáveis foi ajustado e padronizado por espectrofotometria com densidade óptica de 0,15 a 530 nm, adicionando-se mais colônias ou diluindo com solução salina, até obter a concentração de $1x10^7$ células/mL. Este inóculo foi utilizado para induzir a infecção nos ensaios *in vivo* (ARAÚJO et al., 2013).

5.7.2 Preparo das formulações e doses administradas

Para este estudo foram avaliados os sistemas emulsionado e pseudoternário desenvolvidos, cada um contendo curcumina em três concentrações: 0,01%, 0,1% e 1,0%. Essas concentrações são baseadas na concentração inibitória mínima obtida neste trabalho. O preparo e a composição do sistema emulsionado (representado por “C”) está descrito no

descrito no item 5.1.1, após a incorporação da curcumina nestas três concentrações, os sistemas foram denominados como C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1%. O sistema pseudoternário (representado por “F27”) foi preparado conforme descrito no item 5.1.2.2 e após a incorporação da curcumina nas três concentrações, os sistemas também foram denominados como F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1%.

5.7.3 Avaliação da atividade anti-CVV dos sistemas desenvolvidos contendo curcumina

5.7.3.1 CVV experimental

Os ensaios *in vivo* foram feitos no Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ - Campus Cento-Oeste Dona Lindu – MG) com o prof. Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo, coorientador deste trabalho.

Para o ensaio *in vivo* utilizou-se ratas da espécie *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar) com aproximadamente 8 semanas e peso corporal entre 150 e 200 g. Os animais foram obtidos no biotério central da UFSJ (Campus Dom Bosco) e foram coletivamente alojados na sala de experimentação animal do Laboratório de Farmacologia (Campus Centro-Oeste da UFSJ), por 5 dias antes do início dos experimentos. A temperatura da sala foi monitorada em 25 ^{o}C ± 1; os animais tiveram acesso livre a água e alimentação e foram submetidos ao ciclo claro/escuro de 12 horas, conforme as orientações institucionais. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSJ (Protocolos 008/2015 e 014/2017 – Apêndice 1).

Para o estabelecimento da infecção vaginal nas ratas foi administrado estradiol, com o objetivo induzir um estado pseudo-estro, que transforma o epitélio colunar em epitélio escamoso estratificado, aumenta o conteúdo de glicogênio, o pH e aumenta substratos que favorecem o estabelecimento da infecção por *Candida albicans*, além de inibir as defesas imunes locais. Foi administrado cipionato de estradiol por via subcutânea e uma dose diária de 0,2 mg/mL de cipionato de estradiol (E.C.P®, Pfizer Brasil) do 1º ao 4º dia do

experimento. A administração de cipionato de estradiol foi repetida por mais duas vezes após o estabelecimento da infecção, com um intervalo de 72 horas entre as doses (8º e 11º dias de experimento) (ARAÚJO et al., 2013).

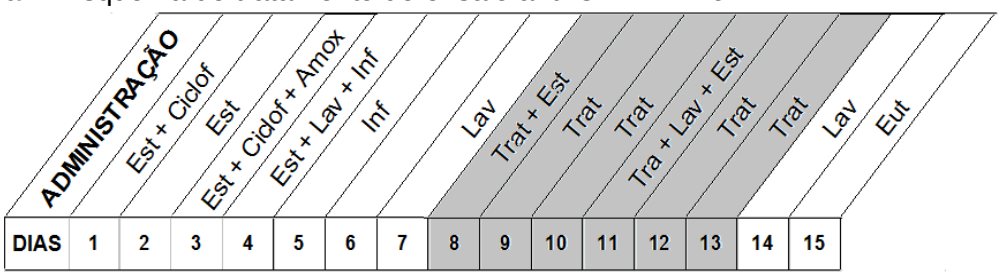
Também foi utilizado ciclofosfamida como imunossupressor, pois inibe a produção de anticorpos e a resposta imune celular e humoral. Foi feita a administração de uma dose de ciclofosfamida (Genuxal®, Baxter Brasil) de 50 mg/kg de acordo com o peso corpóreo e por via intraperitoneal (i.p.: 0,3 mL), a administração foi feita no primeiro e no terceiro dia do experimento (DHAWAN et al., 2009; NAGLIK et al., 2008).

Para favorecer o desenvolvimento fúngico e reduzir a microbiota bacteriana local foi utilizado o antibiótico amoxicilina (Sandoz®). No dia anterior à indução da infecção, a amoxicilina foi adicionada aos bebedouros dos animais na concentração de 250 mg/L (DAHWAN et al., 2009, ARAÚJO et al., 2013).

Todas essas condições foram estabelecidas para que fosse possível obter uma infecção crônica e homogênea em todos os animais.

As ratas foram inoculadas intravaginalmente com 0,2 mL do inóculo com o auxílio de uma micropipeta com pontas descartáveis no 4º e 5º dias do experimento. Dois dias após a infecção (7º dia), amostras dos fluidos vaginais das ratas foram plaqueadas para verificar o estabelecimento da infecção. A infecção foi considerada suficiente se a contagem de colônias apresentasse, no mínimo, 1,0 x 10^2 UFC/mL por animal, nas culturas do fluido vaginal. Os animais foram tratados com as formulações contendo curcumina e respectivos controles uma vez ao dia por 6 dias. A Figura 7 apresenta o esquema cronológico do experimento de acordo com as substâncias administradas, os dias nas cores cinza correspondem ao tratamento.

Figura 7. Esquema de tratamento do ensaio anti-CVV *in vivo*.



*Est: estradiol; Ciclo: ciclofosfamida; Amox: amoxicilina; Lav: lavagem vaginal; Inf: infecção; Trat: tratamento; Eut: eutanásia.

5.7.3.2 Tratamentos com os sistemas desenvolvidos

Para cada um dos dois sistemas desenvolvidos neste trabalho teve-se ratas (n=48) igualmente randomizadas dentro dos seguintes grupos (6 animais por grupo): grupo controle não infectado, grupo controle infectado e não tratado, grupo controle positivo tratado com creme vaginal de nistatina, grupo controle positivo tratado com creme vaginal de clotrimazol, grupo controle negativo (infectado e tratado com os sistemas sem curcumina) e, por fim, 3 grupos infectados e tratados com cada sistema desenvolvido nas três concentrações diferentes de curcumina (Tabela 3). O clotrimazol foi escolhido como controle positivo por ser o fármaco de escolha para aplicação intravaginal no tratamento da candidíase vulvovaginal.

Tabela 3. Grupos experimentais e protocolos para avaliação da atividade das formulações desenvolvidas contendo curcumina no tratamento da candidíase vulvovaginal (CVV).

Grupos	Infecção	Tratamento	Volume (mL)
Grupo 1 - Controle: não infectados	-	Solução salina (0,85%)	0,1
Grupo 2 - Controle: infectados e não tratados	+	Solução salina (0,85%)	0,1
Grupo 3 - Controle positivo 1	+	Clotrimazol (creme vaginal)	0,1
Grupo 4 – Controle positivo 2	+	Nistatina (creme vaginal)	0,1
Grupo 5 - Curcumina: dose A	+	Formulação 0,01%	0,1
Grupo 6 - curcumina: dose B	+	Formulação 0,1%	0,1
Grupo 7 - curcumina: dose C	+	Formulação 1,0%	0,1
Grupo 8 – Controle negativo: veículo	+	Formulação sem curcumina	0,1

(-) grupos que não receberam o inóculo; (+) grupos que receberam o inóculo; n=6.

Para avaliar os efeitos da curcumina quanto ao tratamento da CVV, os dois sistemas desenvolvidos nas diferentes concentrações de curcumina e

seus controles foram administrados intravaginalmente a partir do 8º dia de experimento nos animais infectados, conforme esquematizado na Figura 7.

O tratamento foi feito administrando-se intravaginalmente 100 µL de cada sistema com o auxílio de micropipeta com ponteiras descartáveis, esse volume corresponde a 100 mg das formulações. Essa relação de massa e volume foi obtida através de pelo menos 20 medições, pipetando-se 100 µL e verificando o peso correspondente. Foi escolhido administrar 100 µL porque esse é o volume do canal vaginal das ratas.

Os tratamentos foram administrados nos animais infectados uma vez ao dia, durante 6 dias consecutivos, sempre no mesmo horário. No 11° e 14° dias de experimento, foram realizadas lavagens vaginais para coleta e cultivo do fluido em placas contendo Ágar Sabouroud Dextrose (ASD). Após a última coleta do fluido vaginal (15° dia), foi efetuada a eutanásia dos animais e remoção longitudinal dos canais vaginais, os quais foram processados para confecção de lâminas para estudo histológico. As secções vaginais foram coradas com hematoxilina e eosina e visualizada por microscopia ótica.

5.7.3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente casualisados, com o cálculo da estatística e de seu respectivo valor *p,* utilizando o software GraphPadPrism5®.

Nos casos em que $p<0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS

6.1.1 Preparo do sistema emulsionado

A emulsão desenvolvida pelo prof. Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo, teve característica opaca, viscosa e caráter não-iônico. Foi elaborada com o intuito de ser simples, estável, de fácil preparo e de baixo custo para o tratamento da candidíase vulvovaginal.

Após a incorporação da curcumina, o sistema emulsionado mostrou-se fortemente amarelo e consistente.

Foram obtidas, desta forma, três formulações com características e consistências semelhantes, mas com diferentes concentrações de curcumina, baseadas na concentração inibitória mínima obtida neste tranalho.

Para este trabalho, o sistema emulsionado sem curcumina foi nomeado como “C” e as formulações com curcumina foram nomeadas como: “C_CUR0,01%” (com curcumina na concentração de 0,01%), “C_CUR0,1%” (com curcumina na concentração de 0,1%) e “C_CUR1%” (com curcumina na concentração de 1,0%).

6.1.2 Desenvolvimento de um sistema pseudoternário e nanoestruturado

6.1.2.1 Construção do diagrama de fases pseudoternário e seleção da formulação

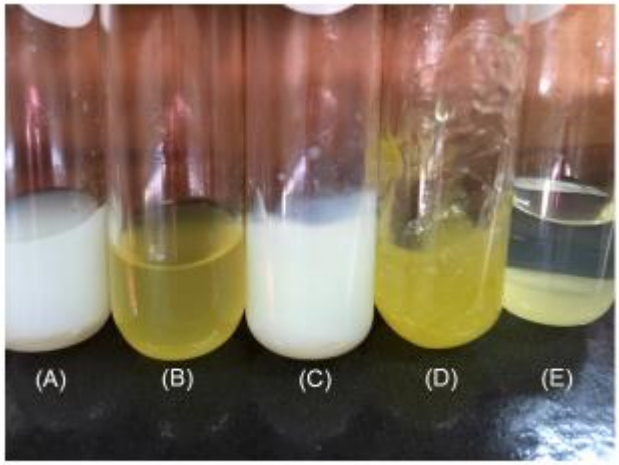
O método utilizado na construção do diagrama de fases pseudoternário permitiu explorar várias composições, obtendo assim diferentes sistemas, com isso foi possível descrever as condições experimentais em que são formados emulsões e sistemas nanoestruturados como microemulsões e cristais-líquidos, ainda foi possível definir as regiões de transição entre os sistemas.

De acordo com a classificação visual dos diferentes sistemas, formou-se diferentes regiões no diagrama de fases pseudoternário, sendo possível delimitar cada uma dessas regiões.

A Figura 8 mostra os sistemas formados e e suas classificações; a Figura

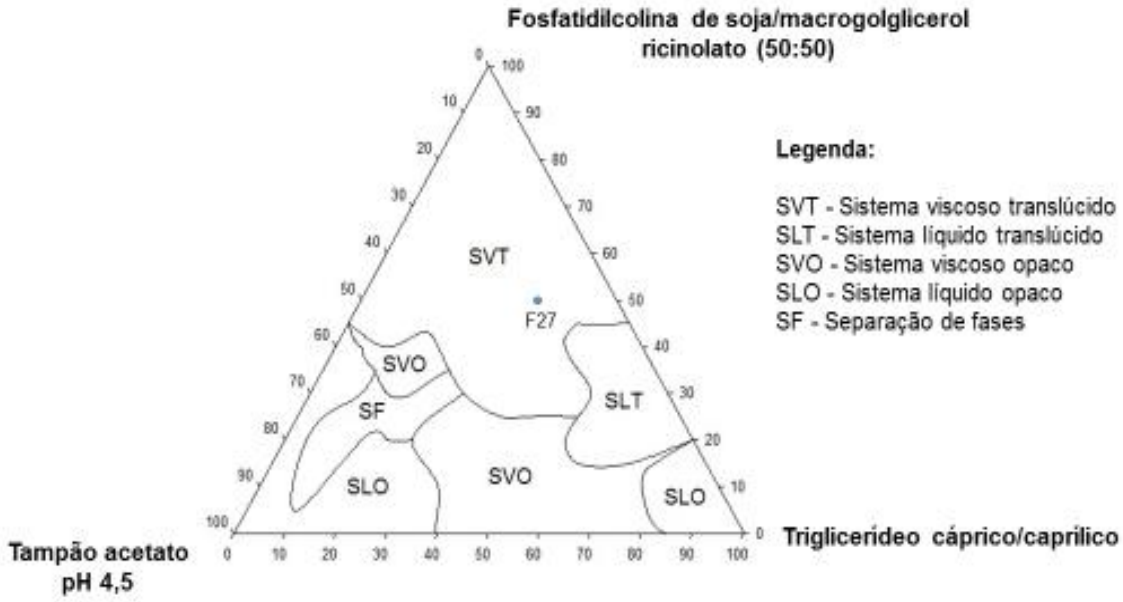
9 mostra o diagrama de fases pseudoternário, as diferentes regiões formadas e os componentes do diagrama de fases.

Figura 8. Classificação visual dos sistemas formados: (A) – Sistema líquido opaco; (B) – Sistema líquido translúcido; (C) – Sistema visoso opaco; (D) – Sistema viscoso translúcido; (E) – Separação de fases.



Fonte: O autor

Figura 9. Diagrama de fases pseudoternário constituído por triglicerídeo cáprico/caprílico (FO), fosfatidilcolina de soja e macrogolglicerol ricinolato - proporção 50:50 (T) e tampão acetato de sódio pH 4,5 (FA); regiões formadas e sistema escolhido para o estudo (ponto F27).



Fonte: O autor

Alterando-se as proporções das fases aquosa, oleosa e tensoativos foi possível encontrar o sistema ideal, com consistência adequada para uma

aplicação intravaginal, dessa forma, o sistema selecionado para incorporar a curcumina, realizar a análise estrutural, estudo de estabilidade, estudos de liberação *in vitro* e estudos *in vivo*, foi o F27 (ponto 27 do diagrama de fases correspondente à um sistema viscoso translúcido), composto por 30% de fase oleosa (triglicerídeo cáprico/caprílico), 20% de fase aquosa (tampão acetato de sódio pH 4,5) e 50% de tensoativo/co-tensoativo (fosfatidilcolina de soja e macrogolglicerol ricinolato, proporção 50:50).

De acordo com o diagrama de fases pseudoternário, os sistemas viscosos translúcidos possuem aproximadamente até 60% de fase oleosa, menos do que 55% de fase aquosa e no mínimo 30% de tensoativo/co-tensoativo. Quando se tem uma pequena concentração de fase oleosa e de tensoativo/co-tensoativo; e grandes concentrações de fase aquosa tem-se os sistemas que separaram fases.

A escolha do sistema ideal foi feita de acordo com a aplicabilidade desejada, o sistema translúcido de viscosidade elevada foi escolhido para que este pudesse permanecer mais tempo no local de ação (mucoadesão) proporcionando alta concentração do fármaco no local; e também para que fosse capaz de facilitar a incorporação da curcumina, princípio ativo de baixa solubilidade aquosa (OLIVEIRA & SCARPA, 2001).

Baseado na concentração inibitória mínima obtida neste trabalho, utilizou-se o sistema F27 para a incorporação da curcumina em três concentrações diferentes: 0,01%, 0,1% e 1,0%. Foram obtidas três formulações representadas por: “F27_CUR0,01%” (com curcumina na concentração de 0,01%), “F27_CUR0,1%” (com curcumina na concentração de 0,1%) e “F27_CUR1%” (com curcumina na concentração de 1,0%).

6.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FORMULAÇÕES ESCOLHIDAS

6.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)

A microscopia de luz polarizada é uma técnica complementar para a análise estrutural dos sistemas. É uma técnica simples e rápida para a identificação das estruturas internas desses sistemas, considerando que os diferentes arranjos apresentam suas estruturas ópticas típicas.

Um sistema é anisotrópico se for capaz de desviar o plano de luz incidente, como as mesofases hexagonal e lamelar e estruturas cristalinas, ou isotrópico, se não desviar a luz, como mesofases cúbicas e microemulsões.

A difração de raios-X e espalhamento de raios-X à baixo ângulo são técnicas precisas na caracterização dos sistemas e podem confirmar os resultados sugeridos pela microscopia de luz polarizada. Quando se tem, por exemplo, uma mesofase cúbica ou microemulsões, representadas por campo escuro ou ainda quando há uma mistura de mesofases e estruturas cristalinas dentro dos sistemas, é primordial o emprego dessas técnicas precisas para caracterização estrutural dos sistemas (MALMSTEN, 2002; CHORILLI et al., 2007).

A Figura 10 apresenta as fotomicrografias obtidas na análise da microscopia de luz polarizada dos sistemas C e C_CUR1%, com lentes de aumento de 10 e 20 vezes. A Figura 11 apresenta as fotomicrografias obtidas na análise dos sistemas F27 e F27_CUR1%, com lentes de aumento de 10 e 20 vezes.

Figura 10. (A) - Fotomicrografia sob luz polarizada da C com aumento de 10x; (B) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação C com aumento de 20x; (C) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação C_CUR1% com aumento de 10x; (D) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação C_CUR1% com aumento de 20x.

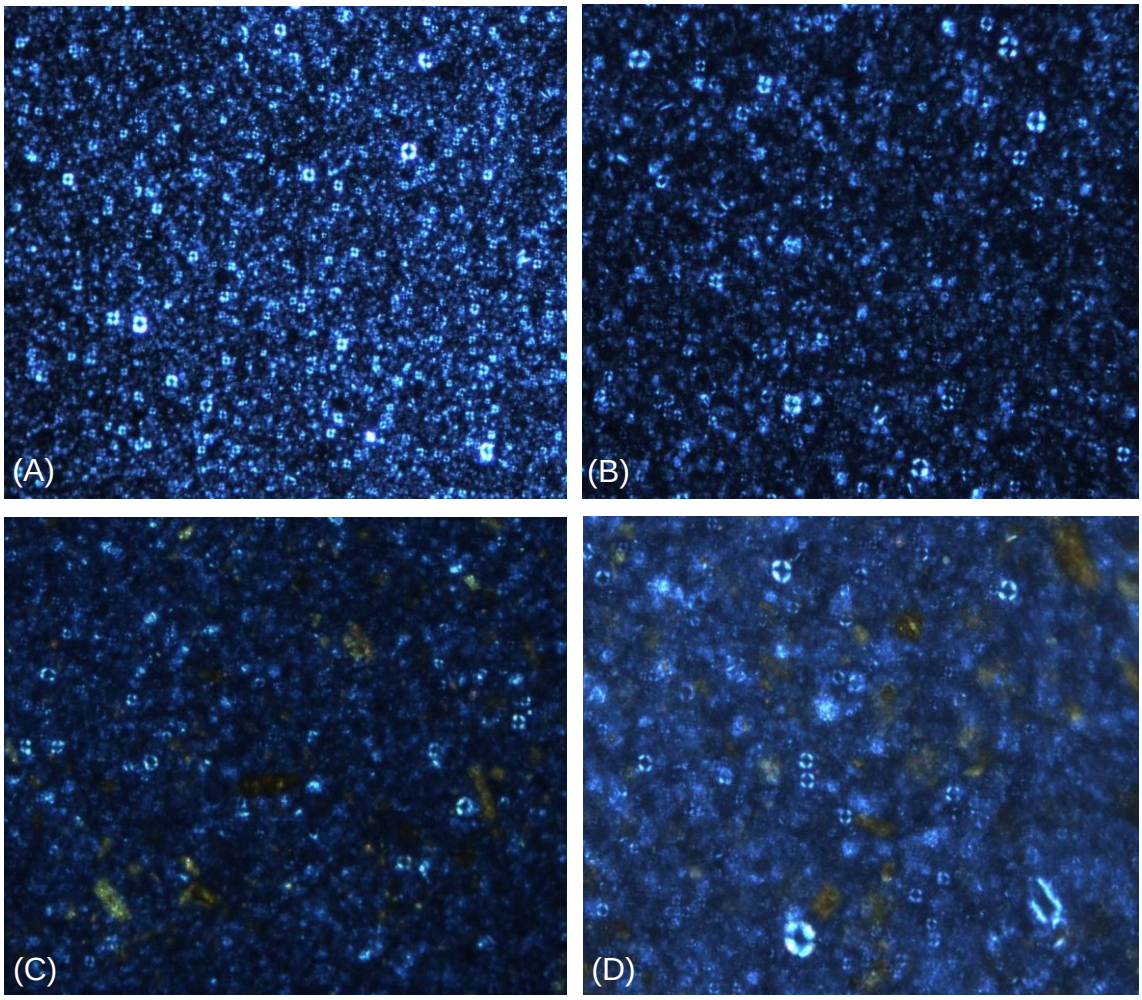
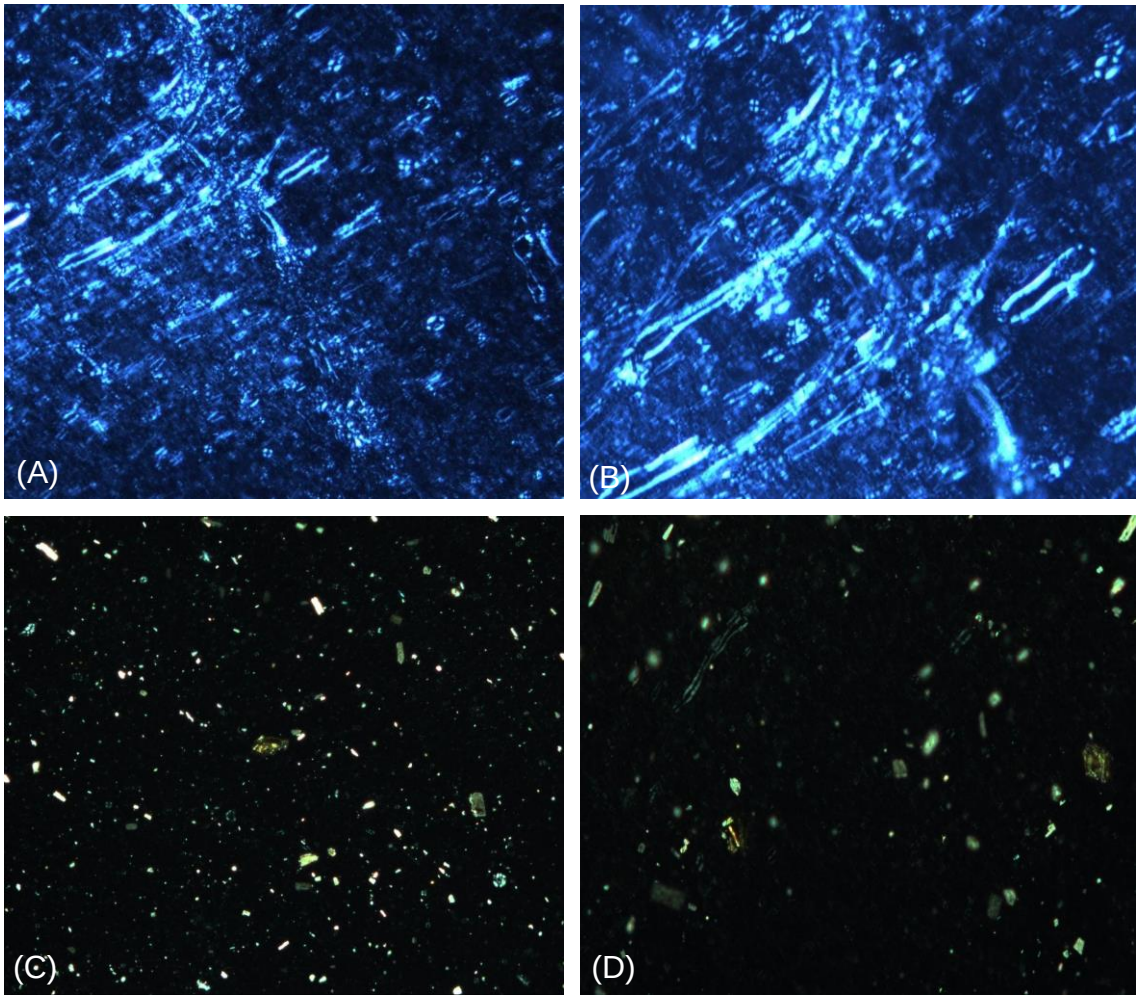


Figura 11. (A) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F27 com aumento de 10x; (B) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F27 com aumento de 20x; (C) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F27_CUR1% com aumento de 10x; (D) - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação F27_CUR1% com aumento de 20x.



Conforme observado na Figura 10 (A e B), o sistema C apresentou estruturas anisotrópicas representadas por “cruzez de malta”, típica de mesofase lamelar, nessa mesofase, as moléculas arranjam-se em bicamadas (lamelas) alternadas de moléculas de tensoativo e de solvente, as lamelas sobrepostas, formam as "cruzes de malta" quando incide a luz polarizada (WANG & ZHOU et al., 2009).

De acordo com a fotomicrografia, a estrutura lamelar permaneceu após a incorporação de 1% de curcumina (sistema C_CUR1%) e aparentemente a curcumina mostrou-se na forma cristalizada, conforme mostra a Figura 10 (C e D).

Na Figura 11 (A e B), o sistema F27 também apresentou estrutururas anisotrópicas sugerindo cristais, provenientes de algum componente do sistema, foram identificadas também algumas “cruzes de matla”, sugerindo uma mistura de cristais propriamente ditos e mesofase lamelar. Já na Figura 11 (C e D), com a incorporação de 1% de curcumina (sistema F27_CUR1%), foi observado um campo escuro com possíveis estruturas cristalinas, sugerindo que houve a modificação do sistema observado anteriormente (sem curcumina). Foi possível observar regiões isotrópicas (campo escuro) e anisotrópicas (composto pelos cristais).

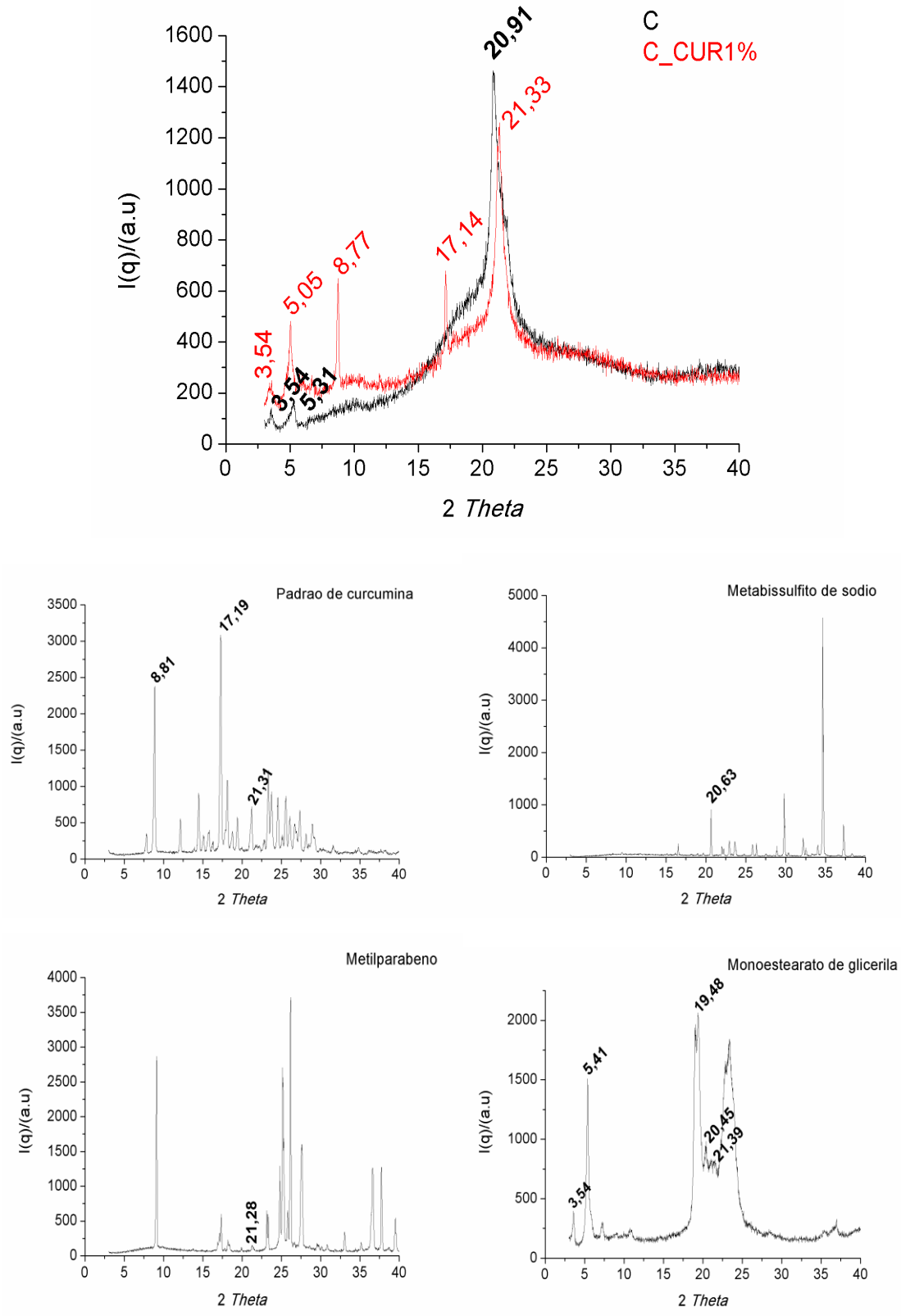
Para a verificar e confirmar a presença de estruturas cristalinas nos sistemas e suas origens, foi feita a análise por difração de raios-X.

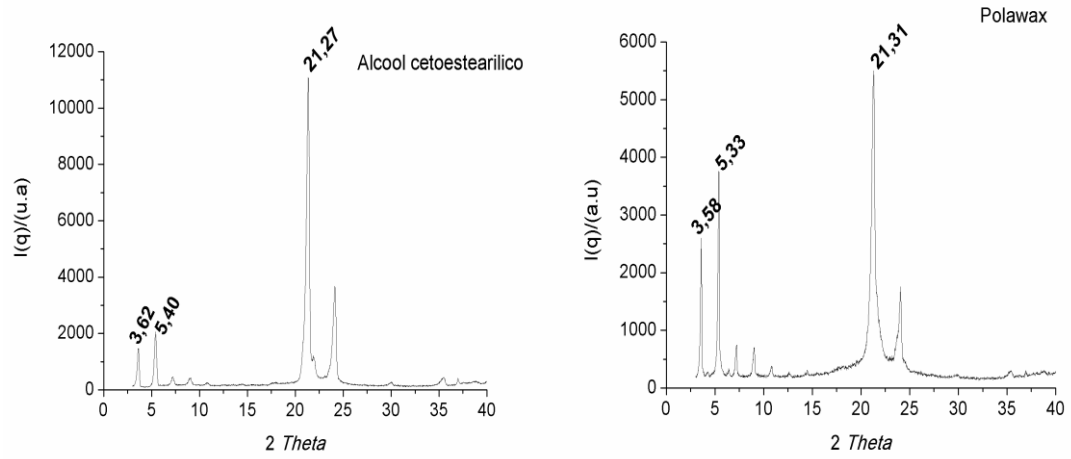
6.2.2 Difração de raios-X (DRX)

A técnica de difração de raios-X é empregada para o estudo de sistemas que apresentam arranjos ordenados, como átomos de uma estrutura cristalinas, o plano de reflexão torna possível calcular a distância entre os átomos, obtendo informações sobre o arranjo estrutural das amostras (MERTA *et al*., 2001).

A difração de raios-X foi utilizada tanto para verificar se o sistema era amorfo ou cristalino, o grau de cristalinidade das amostras e a origem dos cristais presentes nos sistemas desenvolvidos. Os resultados encontram-se na Figura 12 e na Figura 13.

Figura 12. Difratogramas dos sistemas C e C_CUR1% e seus componentes.





De acordo com os difratogramas da Figura 12, os sistemas C e C_CUR1% apresentaram picos estreitos e definidos, o que mostra a presença de estruturas cristalinas.

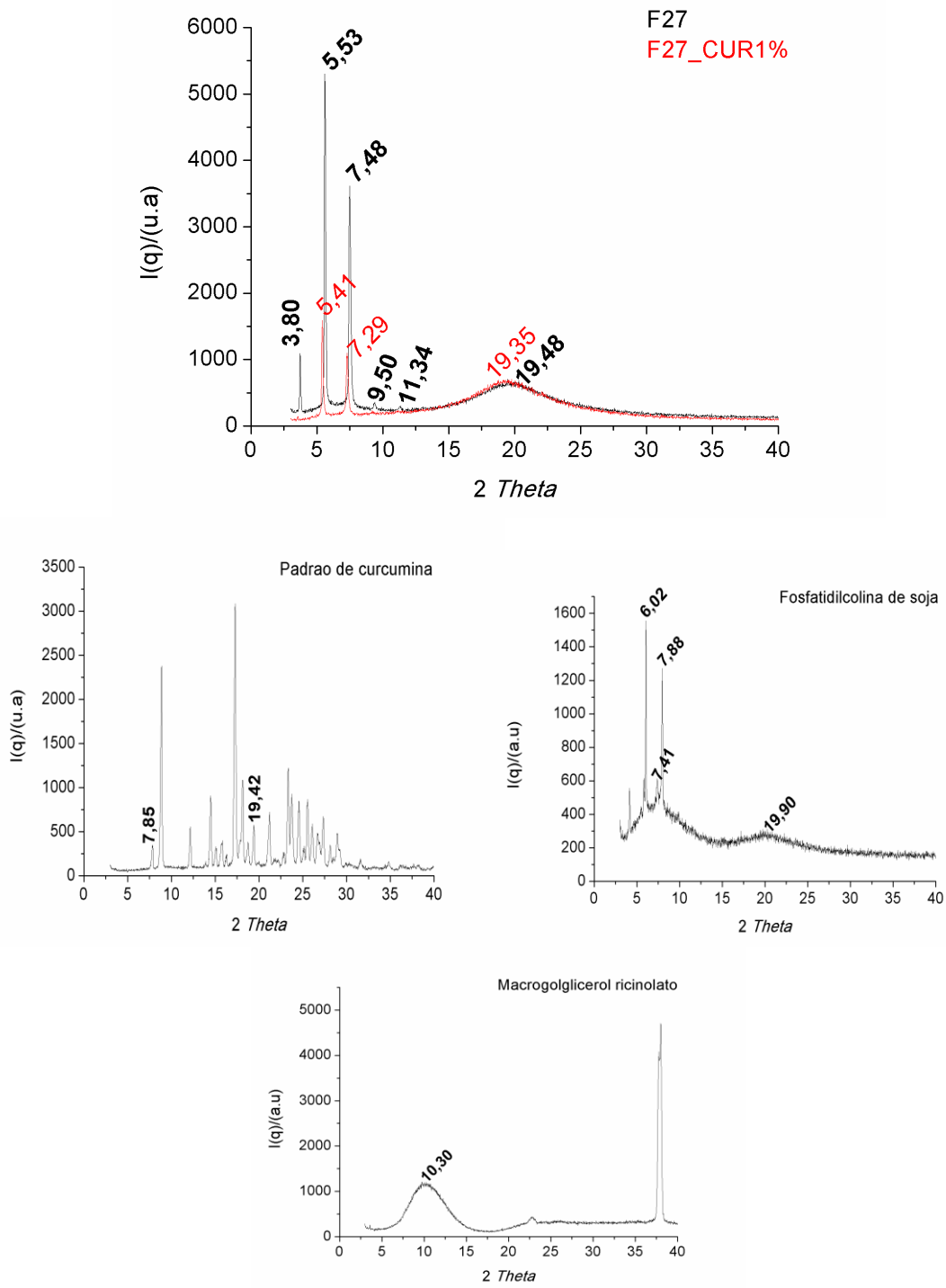
Os componentes dos sistemas também apresentaram cristalinidade. Os difratogramas dos componentes dos sistemas apresentaram picos comuns no difratograma tanto em C quanto em C_CUR1%, o quais estão identificados pelos valores correspondentes aos ângulos dos feixes refratados, o que mostra a presença de cristais provenientes dos componentes dos sistemas.

A curcumina também mostrou-se cristalina; os dois picos nas posições de 8,77 e 17,14, presentes no difratograma do sistema C_CUR1%, correspondem à curcumina, pois só estão presentes neste sistema e no padrão de curcumina, estes cristais de curcumina foram observados na microscopia de luz polarizada do sistema C_CUR1%.

Percebe-se que todos os componentes da formulação apresentaram-se na forma cristalina, e quando se observa os difratogramas de C e C_CUR1%, as estruturas cristalinas presentes não estão relacionadas somente à um material, mas à uma somatória de muitas estruturas cristalinas.

Observa-se também uma tendência dos materiais a tornarem-se menos cristalinos quando misturados para comporem o sistema. Isso foi verificado pela presença de muitos picos nos difratogramas dos componentes dos sistemas separadamente e pelo desaparecimento de alguns desses picos quando os componentes estão formando os sistemas.

Figura 13. Difratogramas dos sistemas F27 e F27_CUR1% e seus components.



De acordo com os difratogramas da Figura 13, os sistemas F27 e F27_CUR1% apresentaram picos estreitos e definidos, o que sugere a presença de estruturas cristalinas e um pico com maior amplitude, que sugere um estado amorfo, o que nos leva a concluir que os sistemas são constituídos por uma mistura de estruturas cristalinas e estruturas amorfas.

O difratograma da fosfatidilcolina de soja apresentou picos comuns no

difratograma tanto de F27 quanto F27_CUR1%, os quais estão identificados pelos valores correspondentes aos ângulos dos feixes refratados, isso mostra a presença de cristais provenientes desse componente nos sistemas, conforme pôde ser observado na microscopia de luz polarizada.

No difratograma do macrogolglicerol ricinolato observa-se um pico comum com o difratograma de F27 mas que não aparece em F27_CUR1%, e também houve o desaparecimento dos picos quando este material foi adicionado ao sistema, o que mostra que houve amorfização desse material. Também foi observado a tendência dos componentes em tornarem-se menos cristalinos a medida que foram misturados para comporem os sistemas.

A curcumina também se mostrou cristalina; e apresentou picos próximos aos picos da fosfatidilcolina de soja, conforme mostra o difratograma do sistema F27_CUR1%, sendo assim, as formas cristalinas observadas nos difratogramas de F27_CUR1%, está relacionada à uma somatória de estruturas cristalinas, estruturas que também foram visualizadas na microscopia de luz polarizada.

6.2.3 Espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS)

Na microscopia de luz polarizada também foi visualizado estruturas típicas de mesofases líquido-cristalina nos sistemas emulsionado e pseudoternário, como “cruzes de malta”. Para a elucidação dessas estruturas foi utilizada a técnica de espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS). Esta técnica permite a verificação de arranjos contendo distâncias interplanares maiores, ou seja, permite a elucidação de estruturas maiores, como mesofases líquido-cristalinas. Na difração de raios-X avalia-se a distância entre os átomos das estruturas cristalinas. Portanto, as duas técnicas são utilizadas para a análise estrutural de sistemas, mas com diferentes objetivos. Muitas vezes é possível identificar a presença de cristais propriamente ditos nas curvas de SAXS, dependendo da reflexão causada pela estrutura cristalina.

O SAXS é uma ferramenta muito empregada na elucidação estrutural de mesofases, fornecendo informações sobre tamanho, forma, quantidade e arranjo dos objetos espalhadores da amostra.

Os arranjos estruturais sugeridos pela microscopia de luz polarizada

confirmam os dados obtidos por SAXS. A Figura 14 apresenta as curvas de SAXS que relacionam as intensidades de espalhamento I(q) em função do vetor de espalhamento (q) dos sistemas estudados.

Para determinar o tipo de estrutura presente nos sistemas verificou-se a posição dos picos (q1, q2, q3, etc.) e determinou-se a razão entre os diversos *q* em função da posição do primeiro pico (q1). A partir dos valores obtidos foi possível determinar qual o tipo de mesofase presente, conforme apresentado nas Tabelas 4 e 5.

Figura 14. Curvas de SAXS dos sistemas C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%.

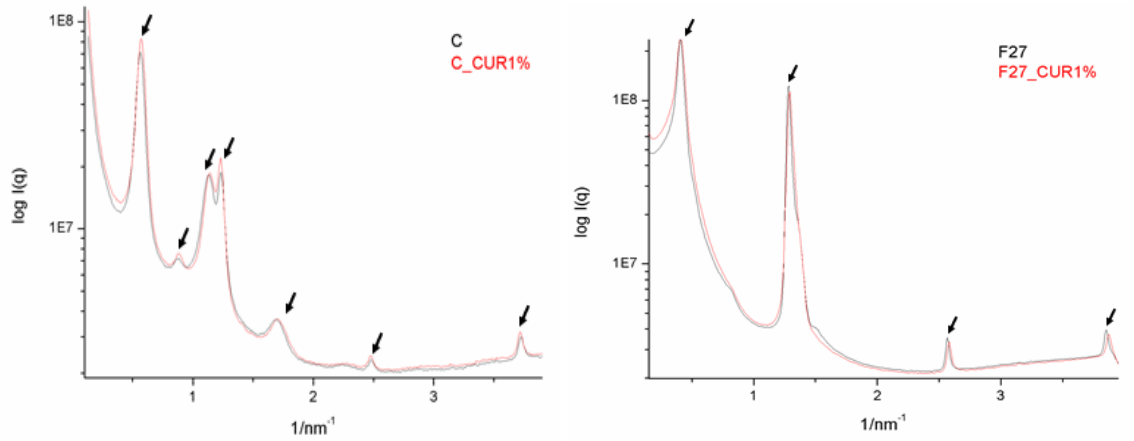


Tabela 4. Valores de $q_{máx}$ e razões entre as distâncias interplanares para os sistemas C e C_CUR1%.

Sistema	$q_{máx1}$	$q_{máx2}$	$q_{máx3}$	$q_{máx4}$	$q_{máx5}$	$q_{máx6}$	$q_{máx7}$
C	0,56	0,88	1,13	1,23	1,69	2,48	3,72
C_CUR1%	0,57	0,88	1,14	1,23	1,70	2,47	3,72

	d2/d1	d3/d1	d4/d1	d5/d1	d6/d1	d7/d1	Tipo de mesofase
C	1,57	2,02	2,20	3,02	4,43	6,64	Lamelar
C_CUR1%	1,54	2,00	2,16	2,98	4,33	6,53	Lamelar

Tabela 5. Valores de $q_{máx}$ e razões entre as distâncias interplanares para os sistemas F27 e F27_CUR1%.

Sistema	$q_{máx1}$	$q_{máx2}$	$q_{máx3}$	$q_{máx4}$
F27	0,40	1,28	2,57	3,85
F27_CUR1%	0,41	1,29	2,58	3,88

	d2/d1	d3/d1	d4/d1	Tipo de mesofase
F27	3,20	6,43	9,63	Lamelar
F27_CUR1%	3,15	6,29	9,46	Lamelar

As curvas de SAXS para sistemas micelares, emulsões e microemulsões apresentam-se, normalmente, como um único pico largo, dificultando a diferenciação desses sistemas. Para mesofases líquido-cristalinas, os picos apresentam-se intensos e finos; os picos de intensidade máxima causado por cada objeto espalhador e a razão entre as distâncias interplanares permitem determinar o tipo de arranjo que os sistemas se organizam (PATEL & PATEL, 2010).

Para os sistemas C e C_CUR1%, não se observou um comportamento típico de uma emulsão propriamente dita, pois apresentaram curvas de SAXS com diversos picos, sugerindo uma estrutura mais organizada do que uma emulsão, conforme apresentado na Figura 14.

De acordo com a Tabela 4, os picos apresentaram duas periodicidades na relação de 1:2:3, observadas pelas distâncias interplanares d2/d1:d5/d1 e também d4/d1:d6/d1:d7/d1. Estas relações são típicas de mesofases lamerares. Assim, de acordo com as distâncias interplanares, pode existir uma mistura de mesofases lamelares ou uma mistura de mesofase lamelar com cristais propriamente ditos. Esses dados confirmaram os resultados obtidos na microscopia de luz polarizada, que mostrou a presença de “cruzes de malta” e cristais de curcumina.

Para os sistemas F27 e F27_CUR1% (Tabela 5) observou-se a relação de 1:2:3 nas distâncias interplanares, o que mostra a presença de mesofases lamelares. Ao observar as curvas de SAXS desses sistemas (Figura 14), nota-se a presença não característica do primeiro pico, mais largo e na posição 0,40 e 0,41, respectivamente; que pode ser devido à presença das estruturas

cristalinas provenientes de algum componente dos sistemas; dependendo do ângulo do feixe difratado na DRX, este pode ser visualizado na análise por SAXS.

As fotomicrografias e a difração de raios-X corroboram com estes resultados; pois para todos os sistemas foram observados arranjos típicos de mesofases lamelares e a presença de muitas estruturas cristalinas. As mesofases líquido-cristalinas normalmente são formadas pela presença de tensoativos, polímeros e lipídeos, assim como os componentes utilizados neste trabalho.

Vale ressaltar que não houve mudanças nas curvas de SAXS após a incorporação da curcumina nos sistemas e que a concentração dos tensoativos nos sistemas estão acima de suas concentrações micelares críticas, pois foi possível observar a micelização e organização das moléculas.

Foi importante a análise estrutural dos sistemas, visto que os diferentes arranjos e estruturas cristalinas modificam a velocidade de liberação dos fármacos a partir das formulações, aumentando sua solubilidade, e por serem sistemas reservatórios, podem diminuir a toxicidade dos fármacos e aumentar a eficácia terapêutica.

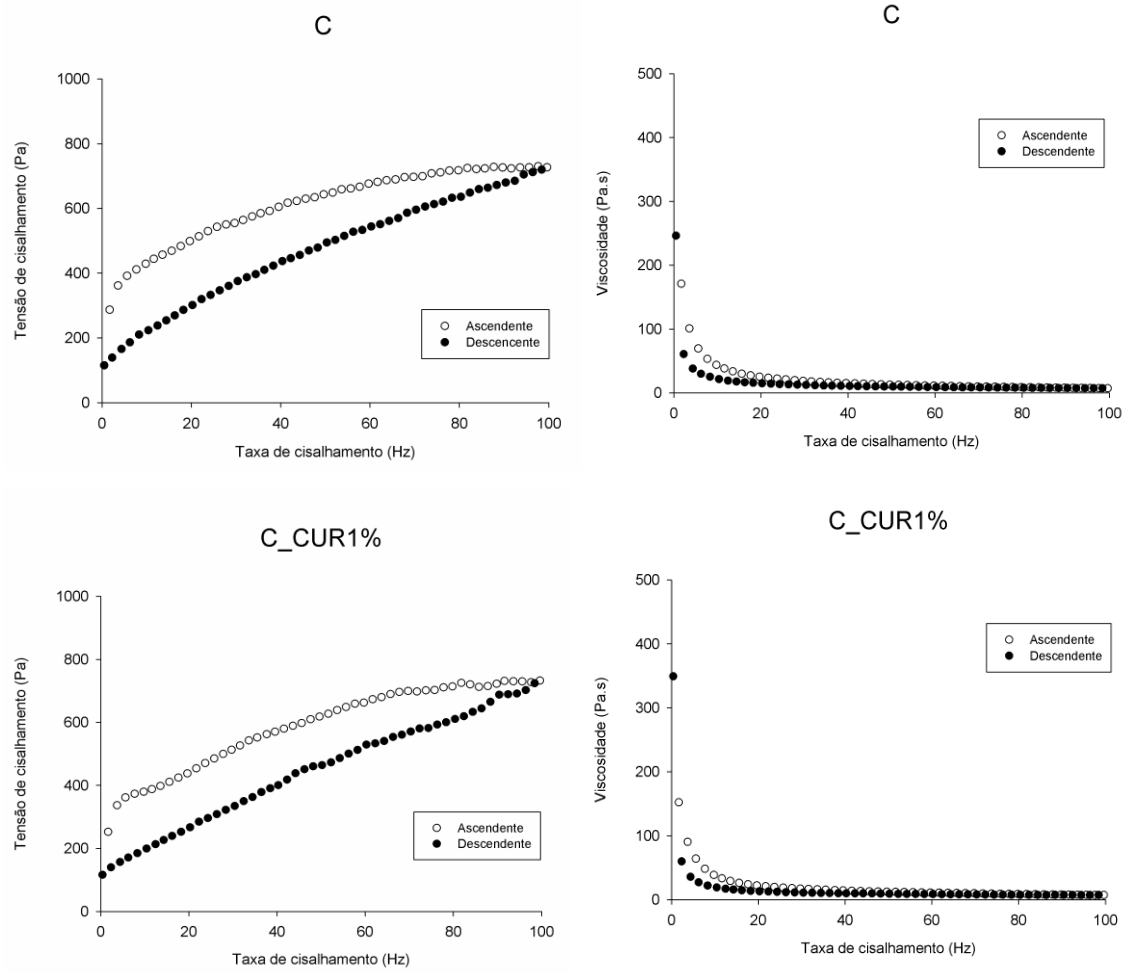
6.2.4 Comportamento reológico

A fim de avaliar as características estruturais das formulações, foram avaliados os comportamentos Newtoniano ou não-Newtoniano, perfil plástico, pseudoplástico ou dilatante, tixotropia e reopexia e comportamento viscoelástico. Foi importante avaliar o comportamento reológico do sistema para verificar se este seria adequado para a aplicação proposta. Além disso, os diferentes arranjos estruturais possuem diferentes comportamentos reológicos que também influenciam no perfil de liberação do fármaco.

A análise reológica contínua permite o estudo do comportamento de fluxo do material quando este sofre determinada tensão. Estes estudos são representados graficamente e denominados como curvas de fluxo (RAO & STEFFE, 1992; SCHRAMM et. al., 2006; PESTANA et. al., 2009; SAVIC et al., 2011).

Na análise reológica contínua, pode-se observar as curvas de fluxo e de viscosidade referentes aos sistemas estudados, com e sem a incorporação de curcumina (C e C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%). Na Figura 15, tem-se os gráficos da tensão de cisalhamento (Pa) e da viscosidade (Pa.s) em função da taxa de cisalhamento (1/s). A Tabela 6 apresenta a área de histerese das curvas de fluxo e a Tabela 7 apresenta a viscosidade aparente mínima dos mesmos sistemas.

Figura 15. Ensaio de curva de fluxo e de viscosidade em função da taxa de cisalhamento (Hz), à temperatura de 30 ºC ± 1, das formulações C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%.



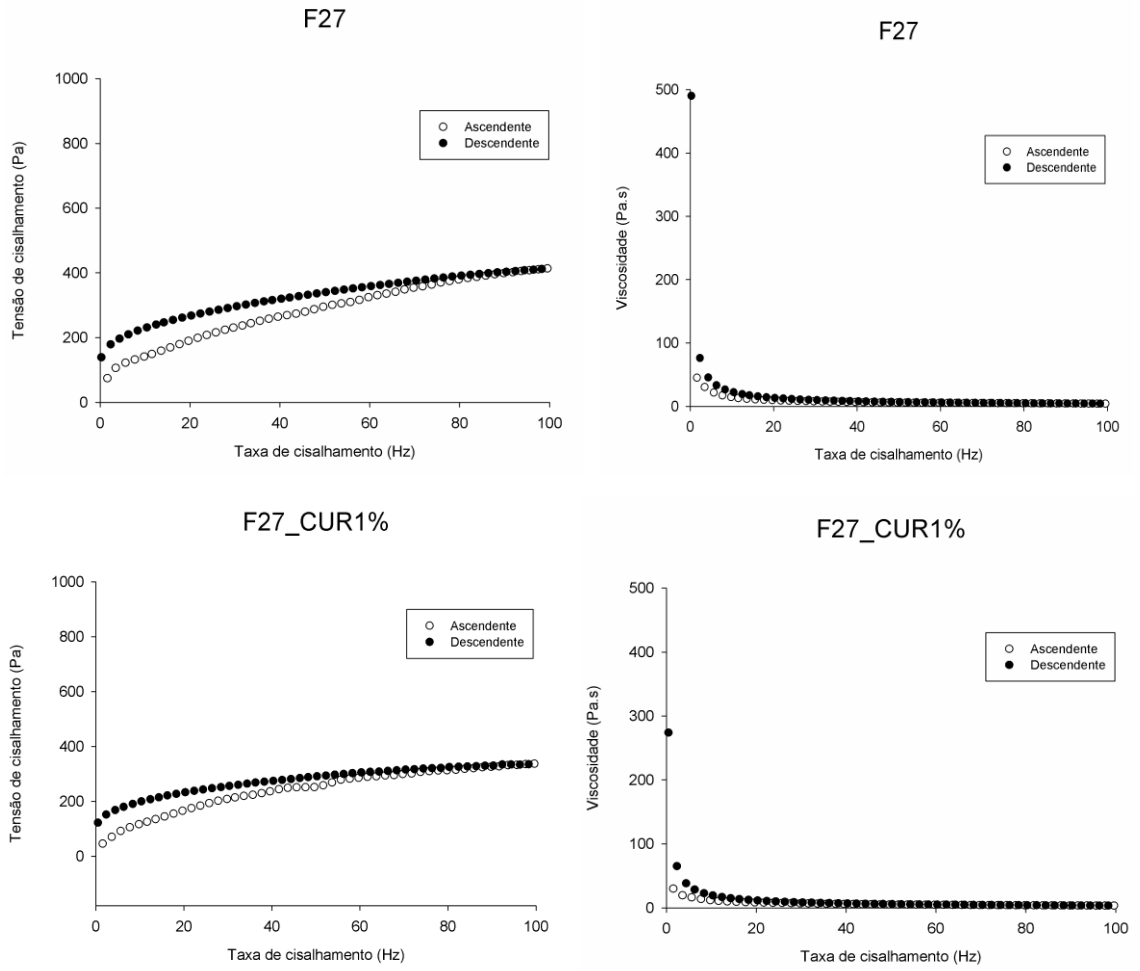


Tabela 6. Cálculo da área de histerese para as curvas de fluxo, à temperatura de 30 ºC ± 1, dasformulações C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%.

	Curva ascendente	**Curva descendente**	**Área de histerese**
C	59480,04	44299,84	15180,20
C_CUR1%	57153,48	42017,79	15135,69
F27	27840,02	31180,28	-3340,26
F27_CUR1%	23821,53	26392,35	-2570,82

Tabela 7. Valores de viscosidade aparente mínima para os sistemas C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%.

Viscosidade aparente mínima (Pa.s)	Sistema			
	C	C_CUR1%	F27	F27_CUR1%
1	7,87	8,17	4,54	3,36
2	6,94	6,80	3,74	3,51
3	7,08	7,09	3,96	3,29
Média*	7,30[a]	7,35[a]	4,08[b]	3,39[b]

*Média dos três valores. [a] não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de viscosidade aparente mínima de C e C_CUR1% ($p<0,05$); [b] não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de viscosidade aparente mínima de F27 e F27_CUR1% ($p<0,05$).

Pode-se observar nos reogramas da Figura 15, que os sistemas estudados mostraram-se como fluidos não-newtonianos, pseudoplásticos, tixotrópicos (C e C_CUR1%) e antitixotrópicos (F27 e F27_CUR1%), pois não apresentaram linearidade entre a tensão e a taxa (velocidade) de cisalhamento, apresentaram diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento e possuem diferenças nas curvas ascendentes e descendentes, sendo que para sistemas tixotrópicos a curva descendente está abaixo da ascendente e para sistemas antitixotrópicos ocorre o inverso.

Conforme também se observa na Figura 15 e Tabela 6, o sistema C_CUR1% apresentou menor tixotropia em relação ao sistema C, observado pela menor área de histerese, ou seja, a energia necessária para romper a estrutura tixóprica de C_CUR1% é menor do que para C. Para C_CUR1%, a aproximação entre as curvas mostra maior recuperação em relação ao estado inicial, comprovando o caráter predominantemente elástico da formulação e um estado maior de organização.

Nos sistemas F27 e F27_CUR1% foi observado o fenômeno de anti-tixotropia, pois apresentam viscosidade diminuída conforme aumenta a taxa de cisalhamento e após diminuir a tensão de cisalhamento, os sistemas adquirem mais viscosidade do que inicialmente e as curvas descendentes ficam acima das curvas ascendentes, ou seja, aumentam as suas resistências ao fluxo.

O sistema F27_CUR1% apresentou menor anti-tixotropia, observada pela menor área de histerese (considerando em módulo), ou seja, a energia necessária para modificar a estrutura tixotrópica de F27_CUR1% é menor do

que para F27. Para F27_CUR1%, a aproximação entre as curvas mostra maior recuperação em relação ao estado inicial, comprovando também o caráter predominantemente elástico da formulação e um estado maior de organização.

De acordo com o observado na Tabela 7, não houve alteração estatisticamente significativa na viscosidade aparente mínima quando se incorpora 1% de curcumina nos sistemas. Os sistemas C e C_CUR1% apresentaram maior viscosidade aparente mínima do que os sistemas F27 e F27_CUR1%, sendo estes últimos, sistemas menos elásticos. Os resultados de viscosidade corroboram com os resultados obtidos por espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS), pois mesofases lamelares apresentam-se como materiais viscosos (FORMARIZ et al., 2005).

Foram calculados também, utilizando os reogramas, os valores de *n* para verificar o comportamento de fluxo e de *K*, para verificar a viscosidade dos sistemas, conforme Equação 6. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

$$\tau = K.\gamma^n \qquad \textbf{Equação 6}$$

Na qual:

τ: Tensão de cisalhamento
K: parâmetro relacionado à consistência (índice de consistência)
n: índice de comportamento do fluido

Tabela 8. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) dos sistemas estudados.

Formulação	n	K
C	0,2374	251,826
C_CUR1%	0,2949	194,177
F27	0,4749	46,7485
F27_CUR1%	0,4432	45,2601

O índice *n* indica o desvio em relação ao comportamento Newtoniano (n=1), os materiais com comportamento pseudoplástico, tixotrópicos e anti-tixotrópicos, possuem o índice de comportamento (n) menor que 1 (comportamento típico de emulsões, suspensões e dispersões) e o índice de comportamento maior que 1 representa um fluido reopético (CARVALHO et. al., 2009). O valor de *n* menor que 1 para todos os sistemas confirmam os

comportamentos não-newtonianos, pseudoplásticos, tixotrópicos e anti-tixotrópicos, conforme apresentado na Tabela 8.

Quanto aos valores de *K* (índice de consistência), relacionado com a viscosidade dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1% apresesentam-se com menores índices de consistência em relação aos sistemas sem curcumina, isso mostra novamente o caráter mais elástico dos sistemas com curcumina.

A pseudoplasticidade dos sistemas estudados é uma vantagem na administração intravaginal, pois durante a aplicação da tensão a formulação apresenta facilidade para fluir e chegar até no ambiente intravaginal, quando a tensão é cessada o sistema recupera-se parcialmente (tixotropia). A anti-tixotropia também foi vantajosa pelas mesmas características e principalmente porque ocorre aumento da viscosidade, que pode impedir que o produto escorra após o procedimento de aplicação e permaneça mais tempo na região vaginal, aumentando a eficácia da formulação.

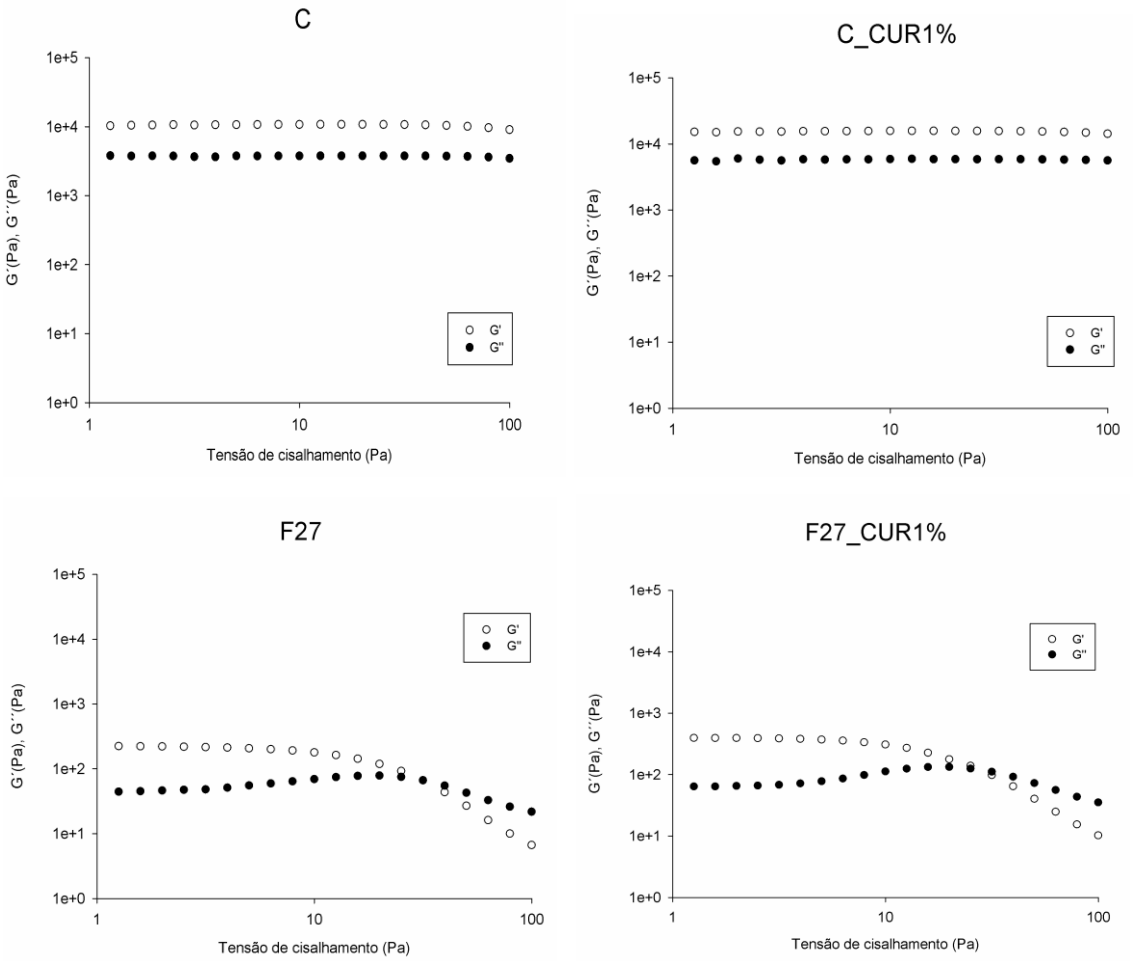
Dados da literatura mostram outros estudos nos quais os comportamentos pseudoplásticos, tixotrópicos e anti-tixotrópicos são mais vantajosos para a administração intravaginal, também mostram que estas características ajudaram a chegar no objetivo da aplicação proposta, assim como neste trabalho (BOODTS, 2003; GAO et al., 2003; NARAYANA et al., 2009; TUĞCU-DEMIRÖZ et al., 2013).

Vale ressaltar que o sistema F27_CUR1%, possui alta capacidade de reestruturação quando a tensão aplicada é cessada, o aumento da viscosidade torna-se uma característica fundamental para a aplicação desejada.

Foi feito também a análise reológica oscilatória, que investiga as propriedades viscosas e elásticas das formulações obtidas, fornecendo informações quanto à natureza estrutural dos sistemas, que implica diretamente no desempenho da formulação (SCHRAMM et. al., 2006).

As formulações desenvolvidas (C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%) foram submetidas ao teste de varredura de tensão (teste oscilatório), em faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 100 Pa e frequência fixa de 1Hz, à temperatura de 30°C ± 1, de acordo com a Figura 16, sendo possível determinar a região de viscoelasticidade linear.

Figura 16. Ensaio da varredura de tensão à temperatura de 30 ºC ± 1 dos sistemas C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%.



O teste de varredura de tensão avalia a viscosidade e elasticidade dos materiais, bem como a região viscoelástica linear dos mesmos. Conforme representado na Figura 16 (C e C_CUR1%) o módulo de armazenamento ou módulo elástico (G') é maior do que o módulo de perda ou viscoso (G") em toda faixa de tensão analisada, demonstrando a predominância do caráter elástico das formulações e sendo esta, a região viscoelástica linear.

Na mesma Figura 16 (F27 e F27_CUR1%), pode-se observar que o módulo de armazenamento ou módulo elástico (G') é maior que o módulo de perda ou viscoso (G") até o ponto de tensão equivalente a 92,55 Pa e 98,22 Pa (pontos de deformação crítica) para F27 e F27_CUR1%, respectivamente, após este valor ocorre uma desestruturação dos materiais. Dessa forma, a região viscoelástica desses sistemas se dá até o ponto de deformação crítica.

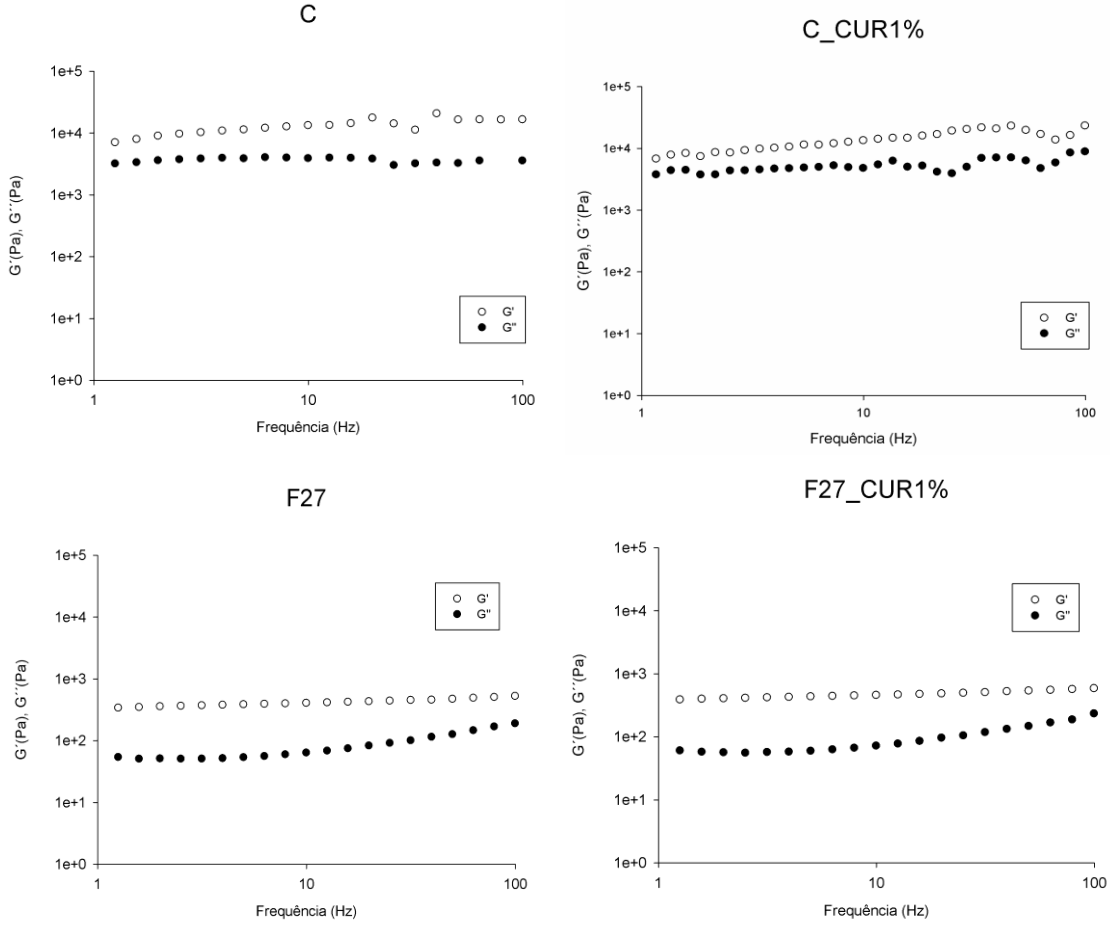
Nota-se no sistema F27, o aumento no valor do ponto de deformação

crítica quando se incorporou curcumina (F27_CUR1%), o que sugere que a curcumina torna o sistema mais elástico. Os sistemas C e C_CUR1% possuem maior região viscoeléstica linear do que os sistemas F27 e F27_CUR1%.

Após definir a região viscoelástica linear pôde-se avaliar a estabilidade da rede estrutural dos sistemas através da varredura de freqüência, em uma tensão abaixo do valor de deformação crítica. Assim, a tensão de 1 Pa foi utilizada nos demais testes, pois valores superiores a esse podem destruir as estruturas dos sistemas, é necessário que os testes sejam feitos sem que haja destruição da rede estrutural.

Outro teste oscilatório realizado foi a varredura de frequência, para os sistemas C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1% em tensão de cisalhamento fixa de 1 Pa e frequência de 1,0 a 100 Hz, à temperatura de 30 °C± 1. De acordo com a Figura 17, foi possível determinar os comportamentos elástico e viscoso dos materiais.

Figura 17. Ensaio de varredura de freqüência à temperatura de 30 ºC ± 1 dos sistemas C, C_CUR1%, F27 e F27_CUR1%.



Na Figura 17, pode ser observado a evolução dos módulos G’ (componente elástico) e G’’ (componente viscoso) em função da frequência aplicada nas formulações. Para C e C_CUR1%, o módulo elástico (G’) foi maior do que o módulo viscoso (G”) em toda a faixa de frequência, confirmando o caráter elástico dos sistemas. Nos sistemas F27 e F27_CUR1%, o módulo G’ permaneceu maior. No entanto, na evolução dos módulos a diferença entre G’ e G’’ diminuiu, o sistema apresentou uma contribuição maior do módulo viscoso conforme o aumento da frequência, ou seja, com o aumento da frequência houve uma tendência a ter uma rede estrutural mais desorganizada.

A Tabela 9, apresenta a análise detalhada dos valores G’ e G’’ do teste de varredura de frequencia para as formulações (SCHRAMM, 2006), sendo uma ferramenta útil para a caracterização estrutural dos sistemas.

Tabela 9. Análise mais detalhada dos valores G’ e G’’ do teste oscilatório para as formulações.

Sistema	G' (Pa)	G'' (Pa)
C	12639,13	3467,58
C_CUR1%	28544,07	8709,72
F27	441,67	121,72
F27_CUR1%	499,41	138,51

De acordo com a Tabela 9, podemos observar que o valor do módulo de armazenamento (G’) foi superior ao G’’, mostrando a predominância do caráter elástico para todos os sistemas descritos. Ao subtrair aos valores de G’ pelo G’’, para cada um dos sistemas, percebe-se que ocorre um afastamento dos módulos quando se incorpora curcumina em C (C_CUR1%) e em F27 (F27_CUR1%), isso mostra que as formulações após a incorporação da curcumina ficaram com caráter mais elástico quando comparados aos sistemas sem curcumina, conforme visto no teste de varredura de tensão. Os sistemas C e C_CUR1% possuem maior caráter elástico do que F27 e F27_CUR1% (CARVALHO et al., 2012; CALIXTO, 2013).

No geral, os dois sistemas possuem comportamento reológico vantajoso, porém de formas diferentes, cada um com suas características.

6.2.5 Mucoadesão *in vitro*

A avaliação das propriedades mucoadesivas dos sistemas emulsionado e pseudoternário, foi feita através das análises quantitativas dos módulos G’ e G’’ e dos parâmetros viscoelásticos dinâmicos, os resultados encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Análise quantitativa dos módulos G’ (módulo de armazenamento) e G’’ (módulo de perda) e parâmetros viscoelásticos dinâmicos da mucina 0,15% e das misturas C_CUR1% com mucina 0,15% e F27_CUR1% com mucina 0,15%.

Amostra	G' (Pa)	G'' (Pa)	ΔG'	ΔG''	Tan δ
Mucina 0,15%	10,41	3,96	-	-	0,38
C_CUR1% + Mucina 0,15%	46,42	28,52	36,01	24,56	0,61
F27_CUR1% + Mucina 0,15%	47,12	31,42	36,71	27,45	0,67

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, na análise quantitativa dos módulos G’ e G’’ obtidos nos testes de varredura de frequência, observa-se o afastamento dos módulos de armazenamento e de perda nas misturas dos sistemas com a mucina em comparação à mucina sozinha, o que mostra a predominância e o aumento do caráter elástico nas misturas, sugerindo que houve a formação de uma rede estrutural mais ordenada nas misturas (ΔG' > ΔG'' e tan δ <1) (MORTAZAVI, 1995; MADSEN, EBERTH, SMART, 1998; HÄGERSTRÖM, PAULSSON, EDSMAN, 2000; ANDRADE, PARENTE, ARES, 2014).

Os valores de ΔG' e ΔG'', mostram as propriedades mucoadesivas dos sistemas, uma vez que foram subtraídos os valores referente somente à mucina. Observa-se também que os valores de ΔG' são maiores que os valores de ΔG'' nas misturas dos sistemas com mucina 0,15%, o que reforça o aumento do caráter elástico dos sistemas quando estão em contato com a mucina (MORTAZAVI, 1995; MADSEN, EBERTH, SMART, 1998; HÄGERSTRÖM, PAULSSON, EDSMAN, 2000; ANDRADE, PARENTE, ARES, 2014).

Tan δ indica a viscoelasticidade geral da amostra, tan δ menor que 1 indica resposta elástica (semelhante ao gel) e tan δ maior que 1, indica

resposta semelhante a de um líquido. Assim, quanto menor a tan δ maior a elasticidade da amostra analisada. Conforme a Tabela 10, os valores de tan δ são menores que 1 e portanto, também indicam resposta elástica dos sistemas em contato com a mucina (MADSEN, EBERTH, SMART, 1998; ANDRADE, PARENTE, ARES, 2014).

O aumento do caráter elástico nas misturas dos sistemas com a mucina é visto como uma interação causada pela mucoadesão. De acordo com os resultados obtidos, os dois sistemas desenvolvidos formam uma rede estrutural mais organizada ao entrar em contato com a mucina, o que mostra que os componentes dos sistemas possuem propriedades mucoadesivas. A mucoadesão dos sistemas aliada aos comportamentos reológicos observados resultam em sistemas capazes de aumentar a eficácia terapêutica promovendo maior contato do princípio ativo com a mucosa vaginal infectada (MORTAZAVI, 1995; MADSEN, EBERTH, SMART, 1998; HÄGERSTRÖM, PAULSSON, EDSMAN, 2000; ANDRADE, PARENTE, ARES, 2014).

6.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DE CURCUMINA NAS FORMULAÇÕES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

6.3.1 Especificidade/Seletividade

Para a avaliação da especificidade/seletividade do método injetou-se a fase móvel e os placebos dos dois sistemas escolhidos (formulações base, ou seja, sem curcumina). Os cromatogramas obtidos com as soluções placebo e com a fase móvel não apresentaram picos próximos ao tempo de retenção do pico da curcumina (aproximadamente 7,7 minutos), portanto, não interferiram na análise. A Figura 18, representa a injeção da solução de C e a Figura 19 a injeção da solução de F27. A Figura 20, mostra a injeção da fase móvel; também não houve influência da fase móvel na análise.

Figura 18. Cromatograma obtido com a injeção da solução preparada a partir de C.

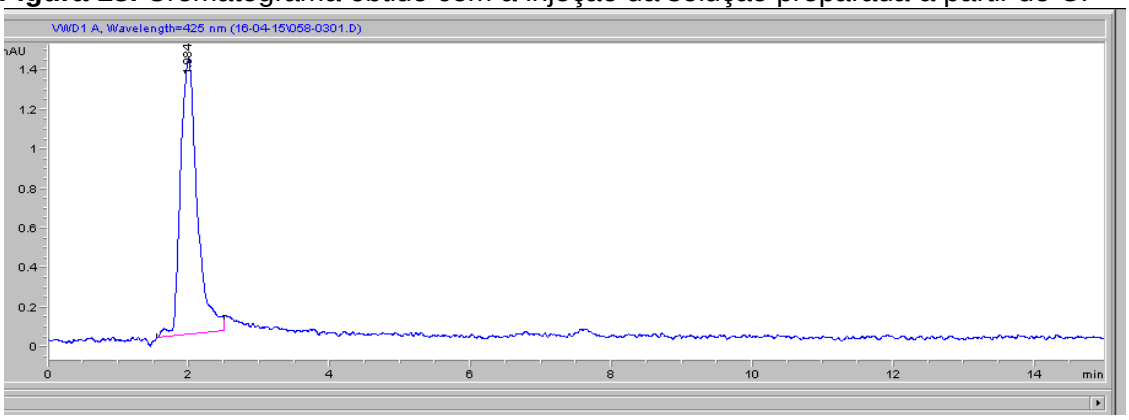


Figura 19. Cromatograma obtido com a injeção da solução preparada a partir de F27.

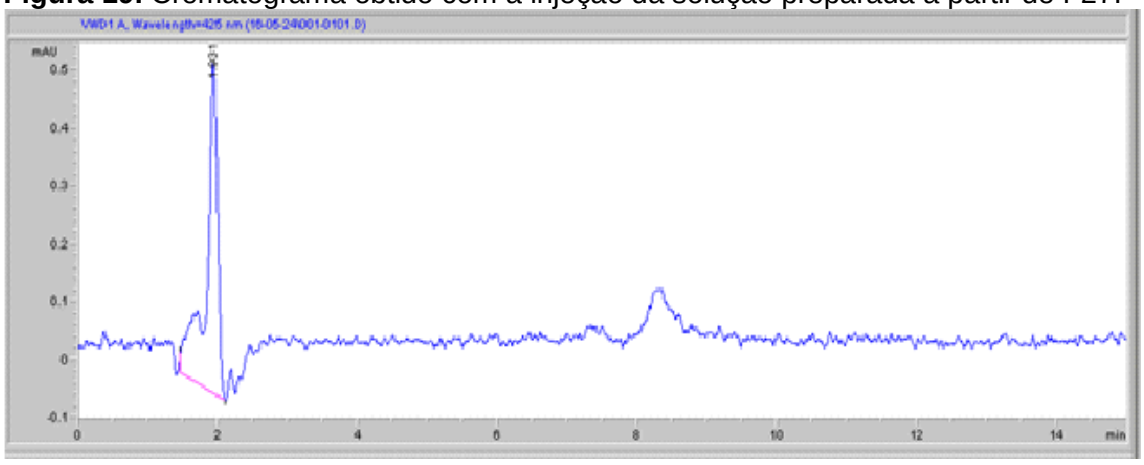
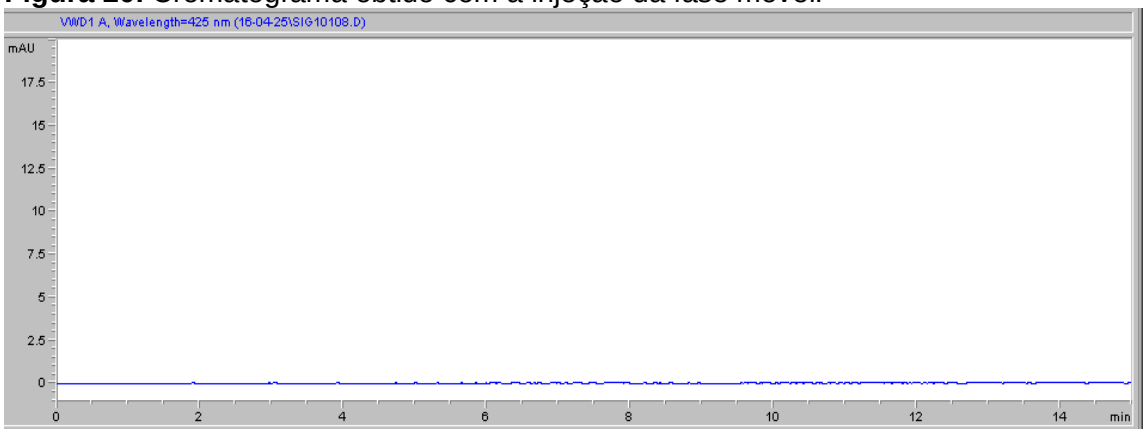


Figura 20. Cromatograma obtido com a injeção da fase móvel.



Os cromatogramas das Figuras 18 e 19, apresentam uma pequena área no tempo de retenção próximo ao pico da curcumina, no entanto sua intensidade é menor do que 2,0% em relação à intensidade do pico principal, conforme especificado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

A seletividade foi realizada também por meio do teste de estresse, sendo que os produtos de degradação deste fármaco não estão disponíveis no

mercado. Esta análise foi utilizada para verificar a influência dos produtos de degradação no pico do princípio ativo. Portanto, injetou-se em CLAE diferentes soluções com concentração de 0,1 mg/mL de curcumina contendo, água, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e exposição à luz ultravioleta. Após o período de exposição (3 horas) estas soluções foram injetadas em CLAE, e deste modo foram obtidos os cromatogramas observados nas Figuras 21 a 32. Notou-se que não existem interferentes no pico de análise da curcumina, ou seja, não foi observado nenhum pico próximo ao tempo de retenção do padrão curcumina. A curcumina é o terceiro pico, de maior intensidade (tempo de retenção em aproximadamente 7,7 minutos), os dois picos anteriores são referentes aos outros curcuminóides (desmetoxicurcumina e bis-desmetoxicurcumina).

Figura 21. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C_CUR1%.

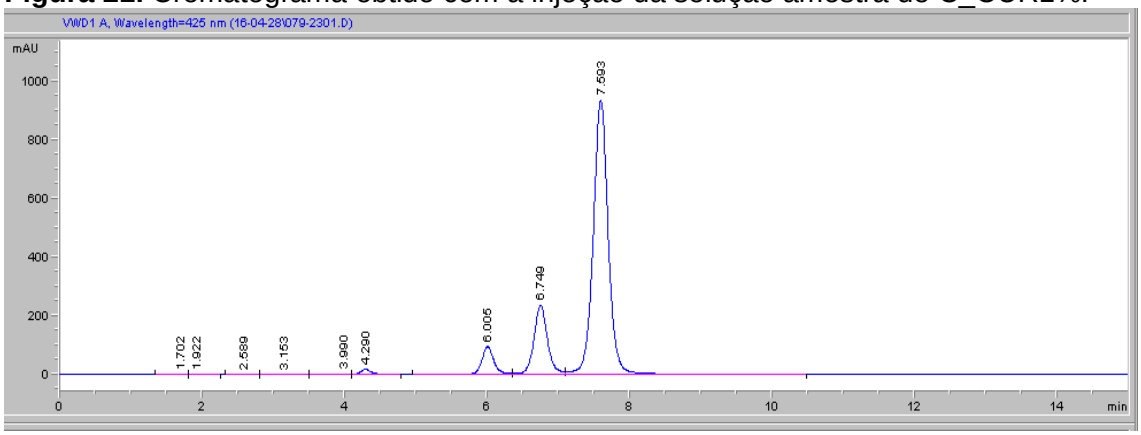


Figura 22. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27_CUR1%.

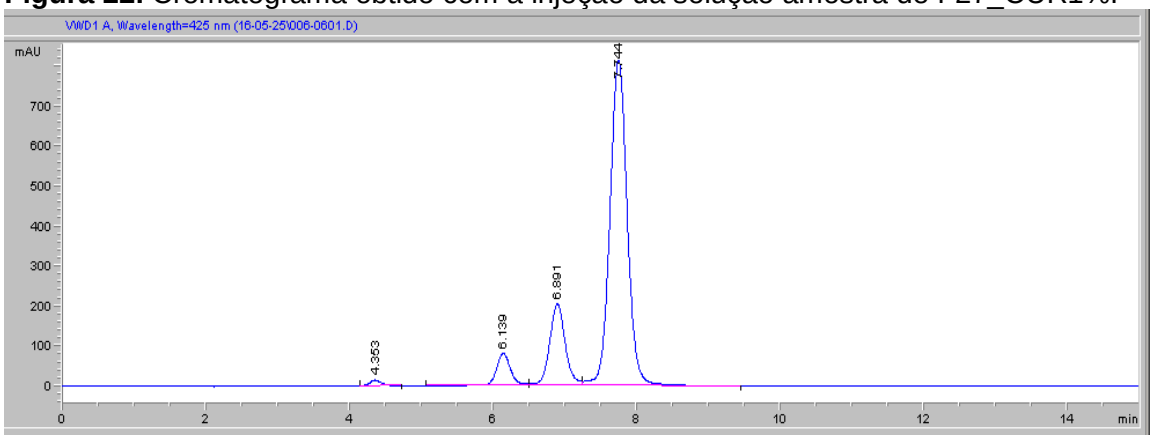


Figura 23. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C_CUR1% em água, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

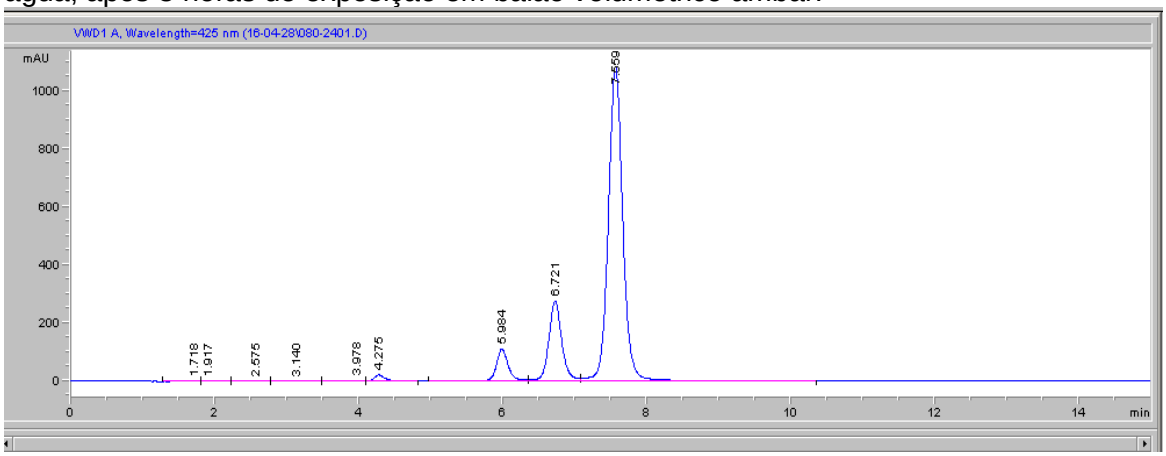


Figura 24. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27_CUR1% em água, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

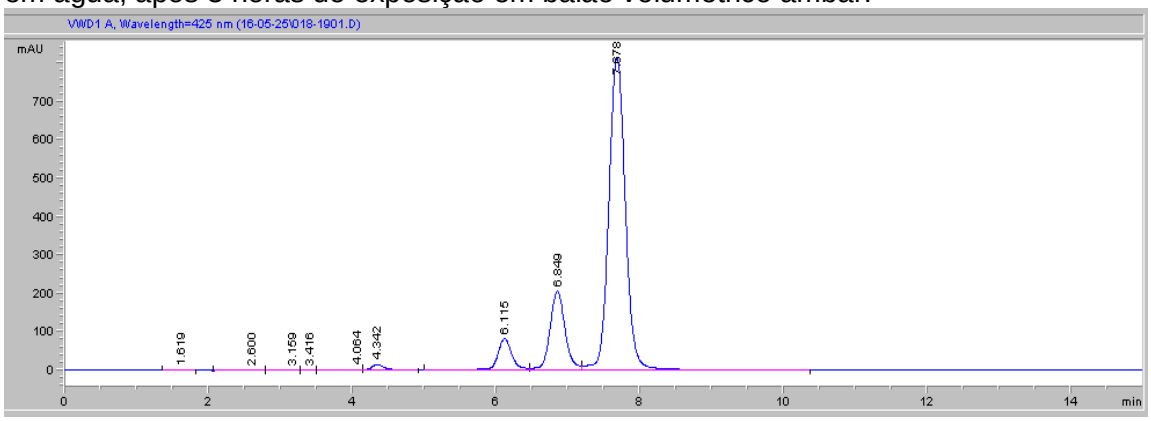


Figura 25. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C_CUR1% em hidróxido de sódio 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

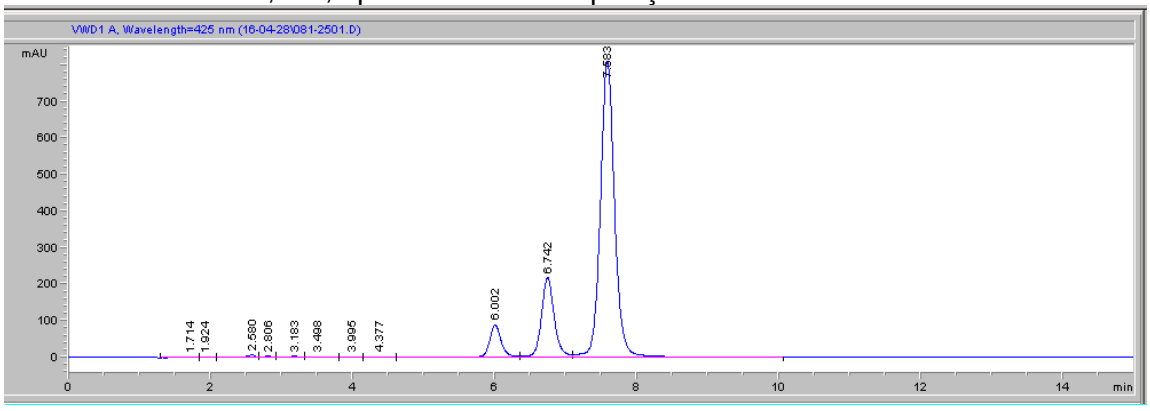


Figura 26. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27_CUR1% em hidróxido de sódio 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

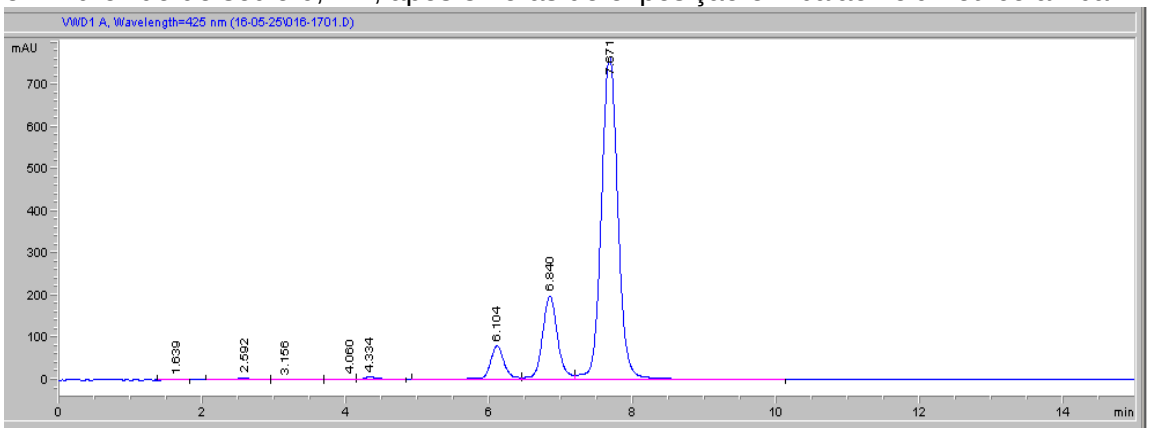


Figura 27. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C_CUR1% em ácido clorídrico 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

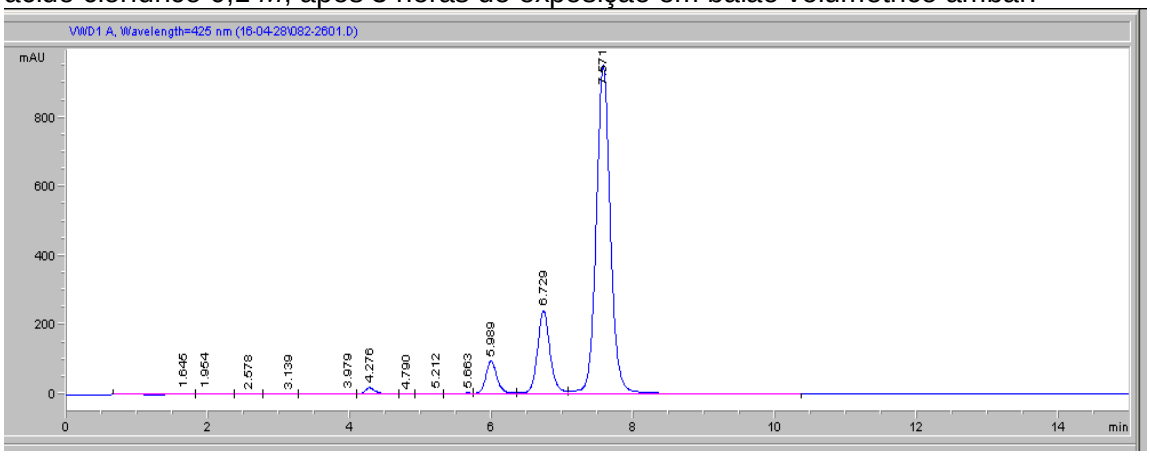


Figura 28. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27_CUR1% em ácido clorídrico 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

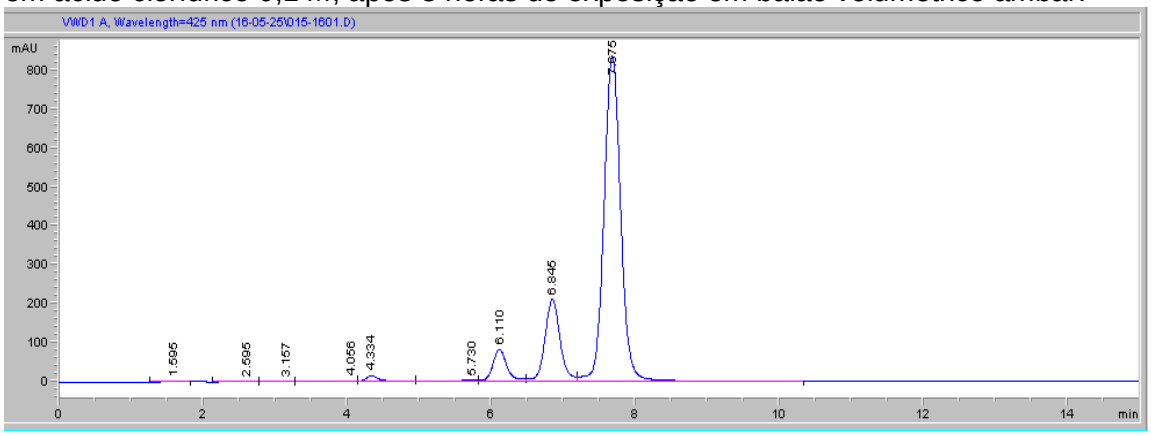


Figura 29. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra C_CUR1% em peróxido de hidrogênio 10 V, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

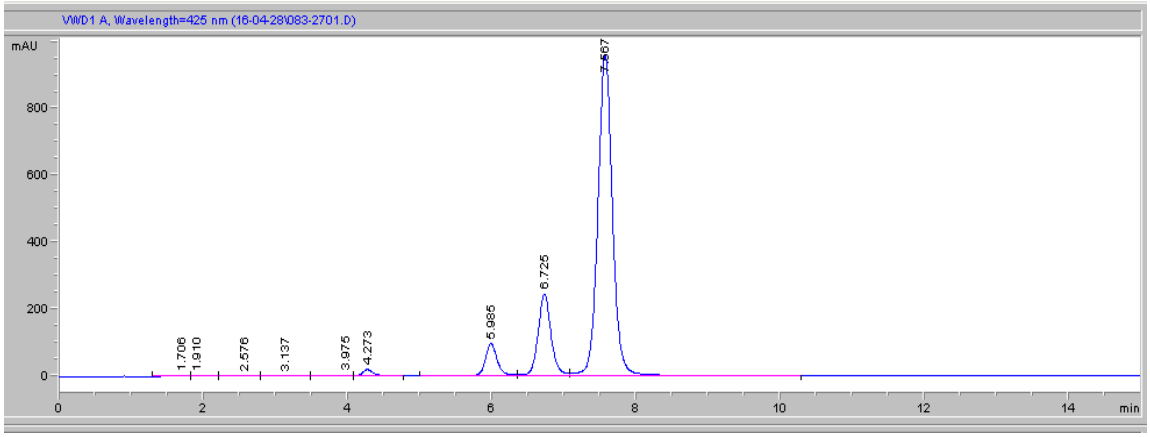


Figura 30. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra F27_CUR1% em peróxido de hidrogênio 10 V, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

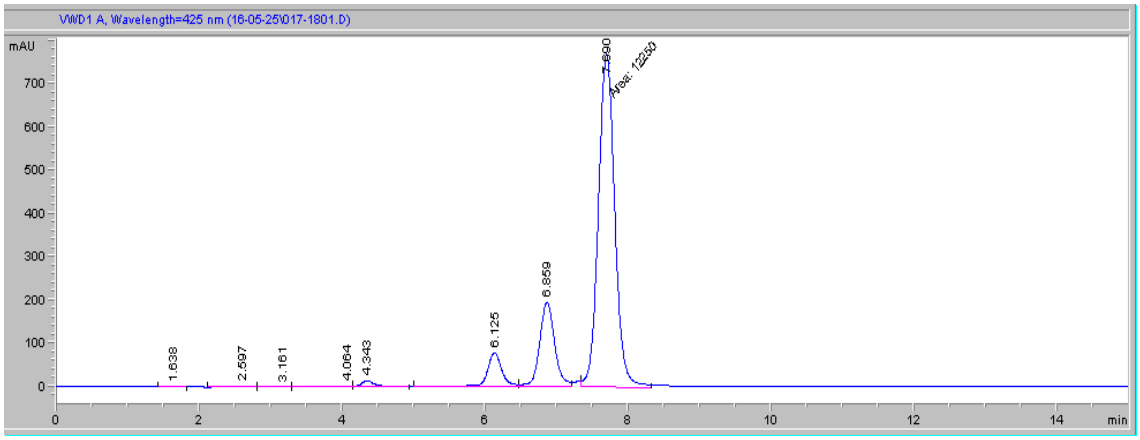


Figura 31. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra C_CUR1% exposta à luz UV por 3 horas em balão volumétrico incolor.

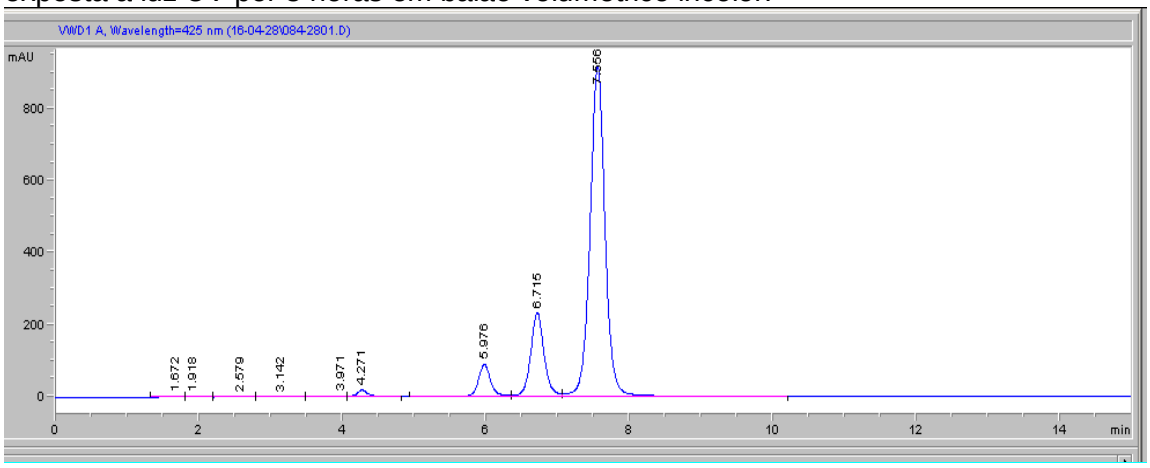
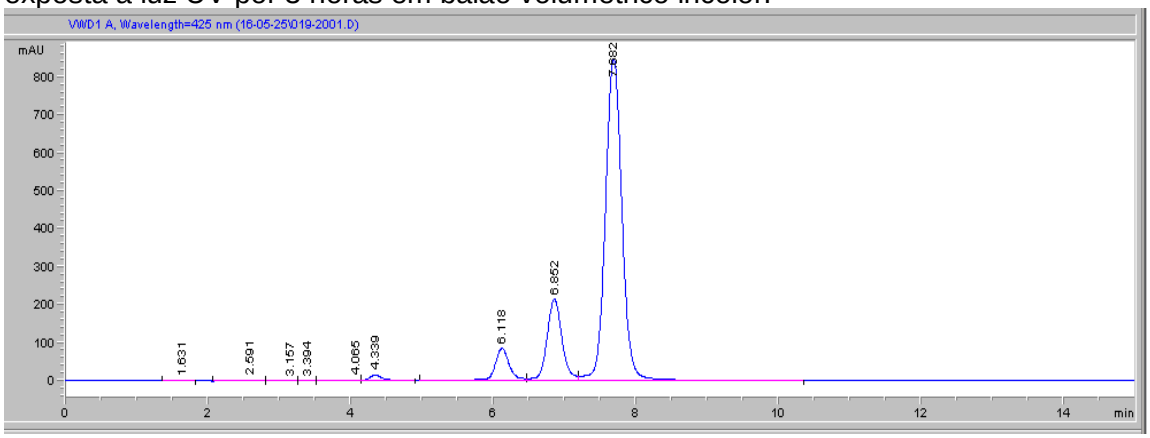


Figura 32. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra F27_CUR1% exposta à luz UV por 3 horas em balão volumétrico incolor.



Foram avaliados também os teores de curcumina das amostras submetidas aos testes de estresse conforme descrito acima; os resultados encontram-se nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Resultado do teor das amostras C_CUR1% expostas às diferentes condições de estresse.

Amostra	Área obtida	Teor (%)	Média*	DP*	CV*
Amostra normal	13893,80	102,31	101,52	2,02	1,99
Amostra em água	15270,50	99,75			
Amostra em hidróxido de sódio 0,1 *M*	12433,10	98,64			
Amostra em ácido clorídrico 0,1 *M*	13406,70	102,17			
Amostra em peróxido de hidrogênio 10 V	13698,10	101,95			
Amostra exposta à luz UV	13535,10	104,31			

***** CV coeficiente de variação - menor que 5%; DP – desvio padrão.

Tabela 12. Resultado do teor das amostras F27_CUR1% expostas às diferentes condições de estresse.

Amostras	Área obtida	Teor (%)	Média*	DP*	CV*
Amostra normal	13740,80	97,35	95,35	4,04	4,24
Amostra em água	13225,50	98,02			
Amostra em hidróxido de sódio 0,1 *M*	12446,30	92,60			
Amostra em ácido clorídrico 0,1 *M*	13643,60	97,67			
Amostra em peróxido de hidrogênio 10 V	12250,00	88,30			
Amostra exposta à luz UV	13863,60	98,14			

***** CV coeficiente de variação - menor que 5%; DP – desvio padrão.

Os resultados dos teores das amostras C_CUR1% submetidas às condições de estresse encontram-se dentro dos limites especificados pela ANVISA e o coefiente de variação foi de 1,99%, sendo que o valor máximo aceito é de 2,0% (BRASIL, 2003).

Para as amostras F27_CUR1%, submetidas às condições de estresse, nota-se que apesar do coefiente de variação ser menor do que 5%, duas amostras tiveram o teor abaixo da especificação (95% a 105%), confirmando que a curcumina possui estabilidade reduzida em meios alcalinos e oxidativos, conforme consta na literatura. Assim, deve-se evitar o contato do sistema contendo curcumina com essas condições de estresse (TONNENSEN & KARLSEN, 1985; RUSIG & MARTINS, 1992; FILHO et al., 2000; COUSINS et al., 2007; LU, KELLY, MIAO 2016; TEJADA et al., 2016).

No sistema F27_CUR1%, a curcumina fica mais exposta às soluções degradantes, devido à menor elasticidade do sistema F27_CUR1% em relação ao C_CUR1%, isso explica o fato de que neste último sistema não foram encontrados teores abaixo da especificação nos meios alcalinos e na presença de peróxido de hidrogênio.

Sabe-se que o fato de não aparecer picos de degradação, não significa que não houve degradação, mas indica que se houve degradação o pico não pode ser visto no comprimento utilizado ou se houve degradação gerando um

produto de decomposição com o mesmo tempo de retenção também não seria possível identificá-lo. Para uma análise mais detalhada dos produtos de degradação seria necessário um detector DAD.

Os sistemas sem curcumina (representados por C e F27) também foram submetidos às mesmas condições de estresses descritas para as amostras contendo curcumina. Assim pôde-se avaliar a influência da degradação dos componentes dos sistemas no pico de interesse e os cromatogramas encontram-se nas Figuras 33 a 42.

Figura 33. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C em água, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

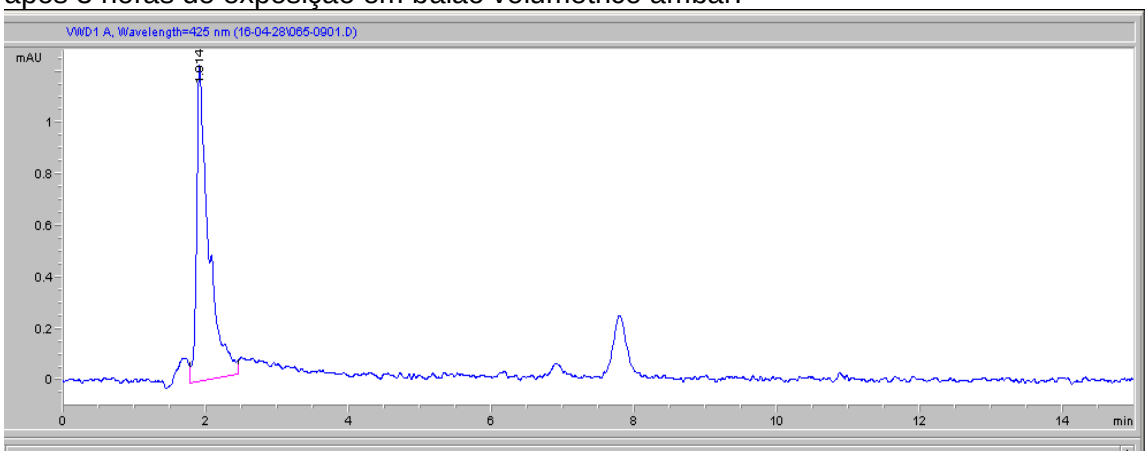


Figura 34. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27 em água, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

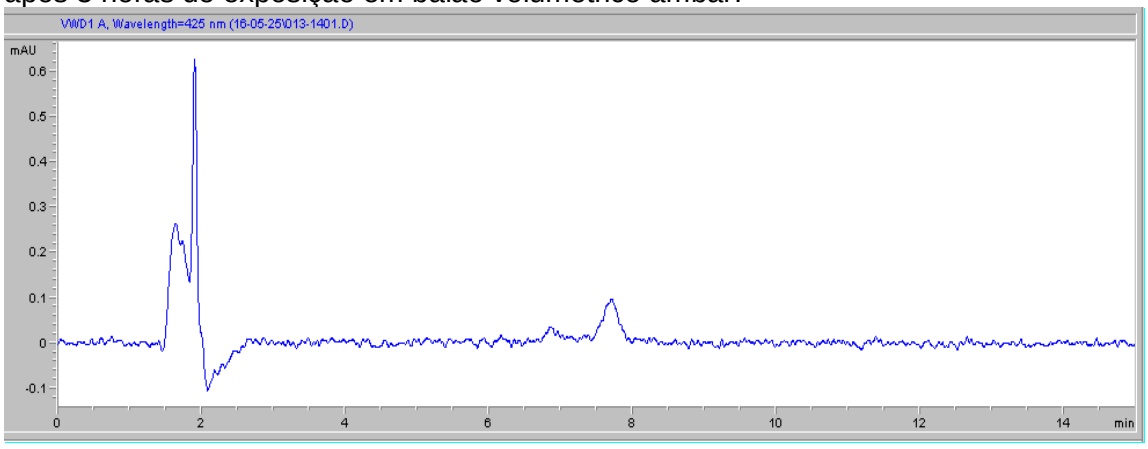


Figura 35. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C em hidróxido de sódio 0,1 M, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

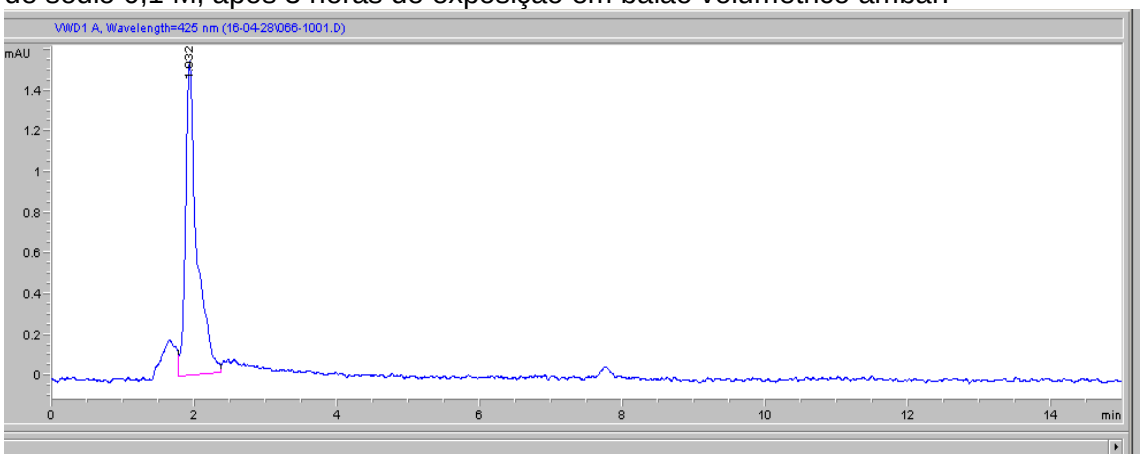


Figura 36. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27 em hidróxido de sódio 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

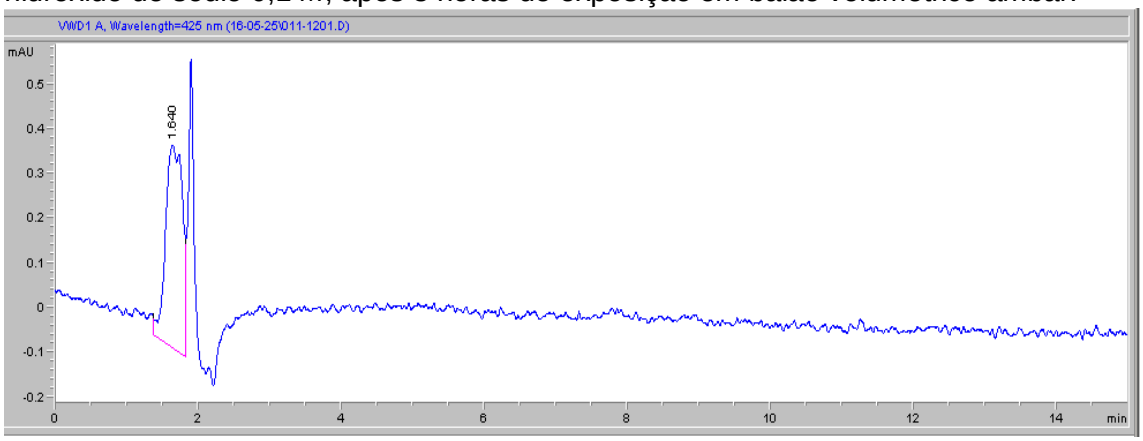


Figura 37. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de C em ácido clorídrico 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

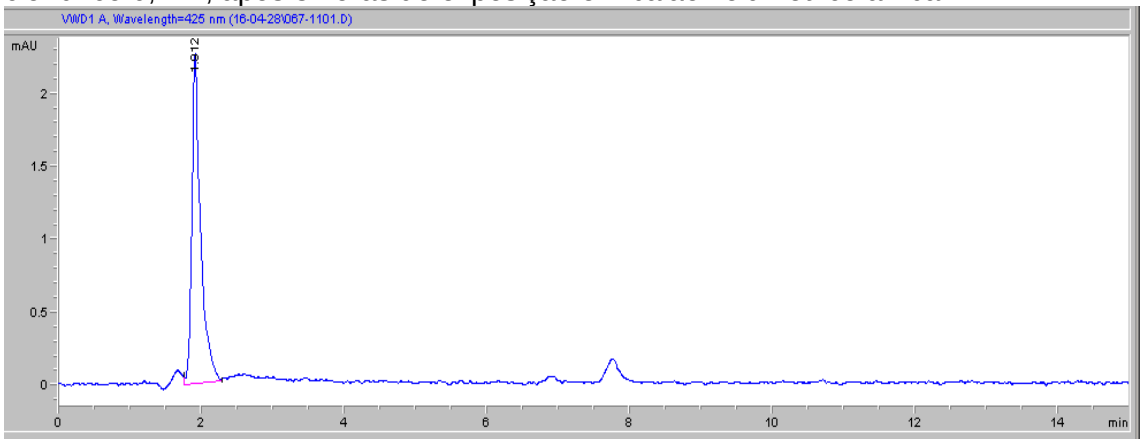


Figura 38. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra de F27 em ácido clorídrico 0,1 *M*, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

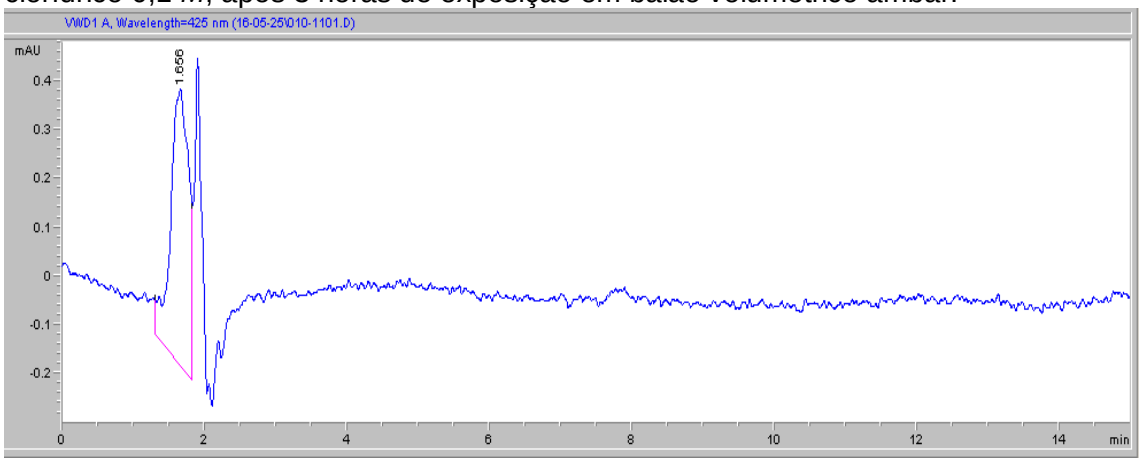


Figura 39. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra C em peróxido de hidrogênio 10 V, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

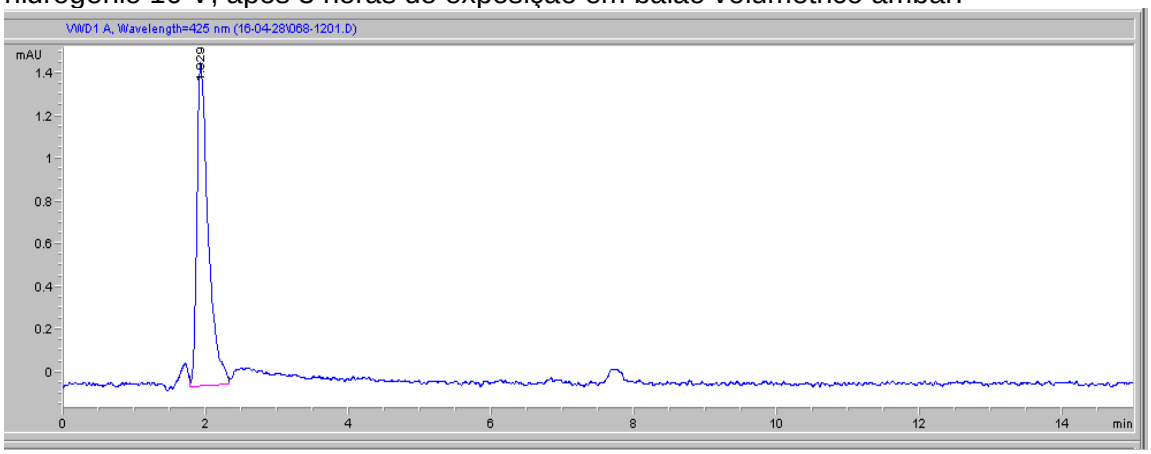


Figura 40. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra F27 em peróxido de hidrogênio 10 V, após 3 horas de exposição em balão volumétrico âmbar.

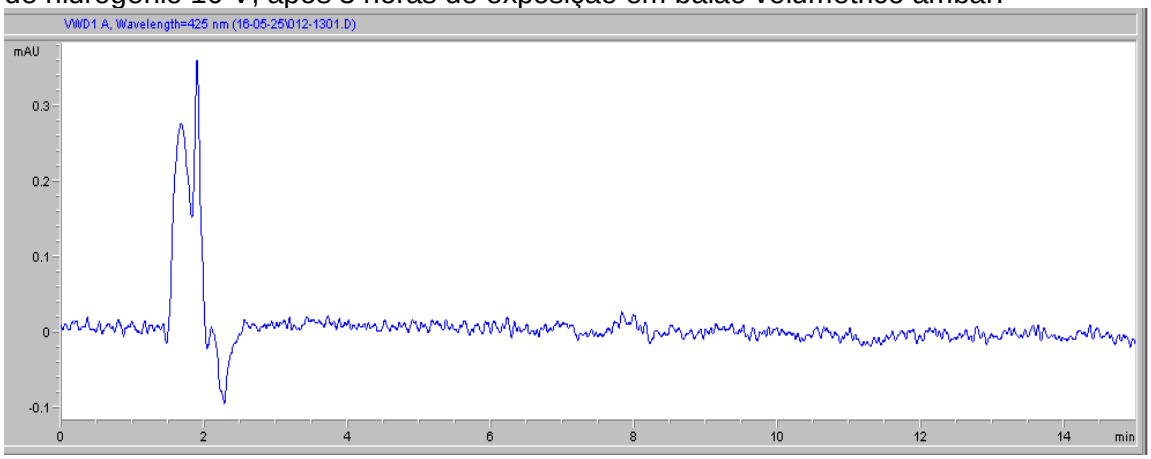


Figura 41. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra C exposta à luz UV por 3 horas em balão volumétrico incolor.

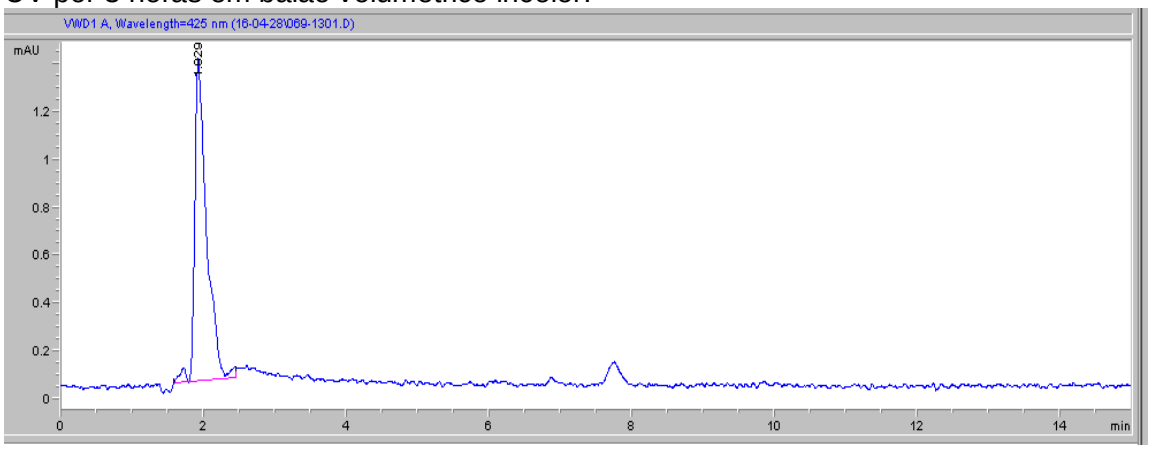
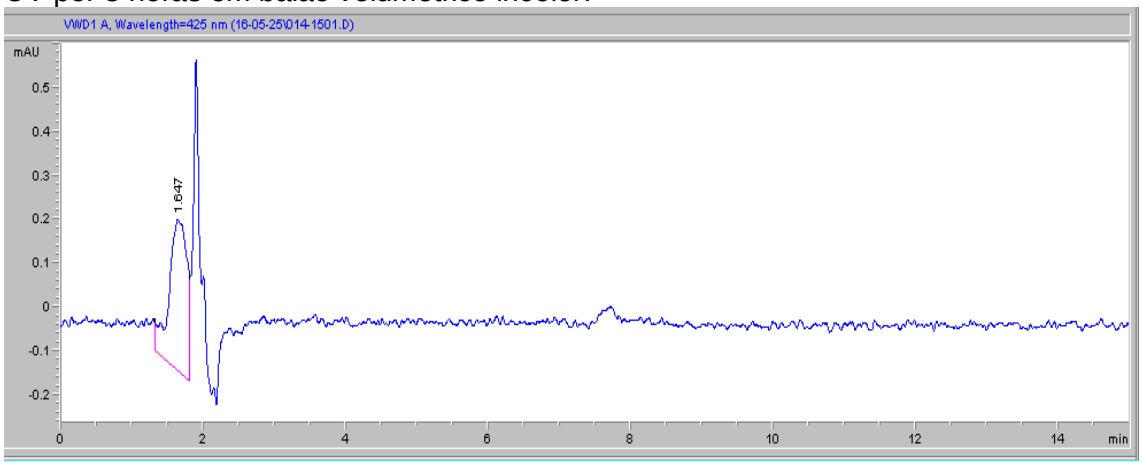


Figura 42. Cromatograma obtido com a injeção da solução amostra F27 exposta à luz UV por 3 horas em balão volumétrico incolor.

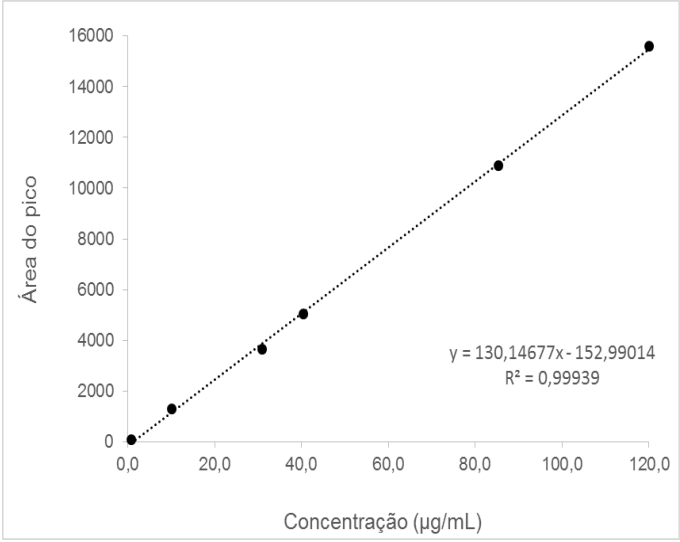


Conforme mostram os cromatogramas das Figuras 33 a 42, houve um aparecimento de um pequeno pico próximo ao tempo de retenção do pico principal, no entanto, este sinal é muito baixo e segundo a legislação (ANVISA, 2003) a área do pico interferente pode ser no máximo 2,0% da área do pico principal. Considerando a área do pico da curcumina nas amostras, os pequenos picos nos placebos não apresentam interferência significante, sendo bem menor do que 2%. Pode-se observar então, que não houve influência de produtos de degradação dos componentes dos sistemas na quantificação da curcumina. Nas condições normais também não houve nenhuma interferência das formulações base no pico de interesse.

6.3.2 Linearidade

A Figura 43 representa a curva analítica obtida a partir de seis concentrações do analito, e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 13. O padrão de curcumina foi diluído em metanol (grau HPLC) e injetado em CLAE em concentrações crescentes.

Figura 43. Curva analítica obtida com injeções de soluções padrão de curcumina diluída em metanol, equação da reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (R^2).



A curva analítica apresentada na Figura 43, apresenta-se linear no intervalo de concentração de 0,8 a 120 µg/mL, com coeficiente de correlação linear de 0,9994. O critério mínimo aceitável pela ANVISA é de 0,99 (BRASIL, 2003).

A Tabela 13 apresenta os resultados da linearidade obtidos com as soluções padrão de curcumina em metanol.

Tabela 13. Dados da linearidade obtida com as injeções de soluções padrão de curcumina em metanol.

Concentração final prática (µg/mL)	Área*	FR*	DP*	CV*	CV geral*
0,80	74,50	0,010740	0,000204	1,90	1,01
10,10	1287,70	0,007845	0,000144	1,83	
31,00	3638,40	0,008521	0,000100	1,17	
40,50	5055,70	0,008012	0,000140	1,75	
85,40	10904,15	0,007832	0,000025	0,32	
120,00	15577,85	0,007703	0,000037	0,49	

*média de três valores; FR – fator resposta; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação: menor que 2%.

O coeficiente de variação foi calculado utilizando-se a Equação 7:

$$CV = \frac{DP}{M} \times 100 \qquad \textbf{Equação 7}$$

Na qual:

CV = coeficiente de variação
DP = desvio padrão do fator de resposta
M = média determinada do fator de resposta

A Tabela 13 mostra que os coeficientes de variação entre as amostras de mesma concentração foram relativamente baixos e menores que 2%, sendo que o maior valor apresentado foi de 1,90%. Os coeficientes de variação entre todas as amostras de todas as concentrações, representado como CV geral, foi de 1,01%.

O fator de resposta foi utilizado para avaliar se houve correlação dependente entre a concentração da amostra e a resposta e foi calculado pela razão entre a concentração do padrão e sua respectiva área obtida. O cálculo do coeficiente de variação foi feito utilizando-se este fator de resposta.

6.3.3 Precisão

A precisão foi realizada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Para avaliar a precisão do método foram utilizadas as amostras C_CUR1% e F27_CUR1% e foi avaliada a concordância entre os resultados.

6.3.3.1 Precisão (repetibilidade)

As Tabelas 14 e 15 apresentam os resultados da precisão por repetibilidade usando as formulações C_CUR1% e F27_CUR1%.

Tabela 14. Resultados obtidos na análise da precisão com amostra C_CUR1%, feita pelo mesmo analista.

Área obtida	Teor (%)	Média	DP	CV
13403,90	95,36	97,31	1,5774	1,62
13828,10	99,38			
13522,20	96,67			
14690,90	98,95			
13559,50	97,30			
13460,50	96,19			

*****média dos 6 valores; DP– desvio padrão, CV – coeficiente de variação (%): menor que 5%.

Tabela 15. Resultados obtidos na análise da precisão com amostra F27_CUR1%, feita pelo mesmo analista.

Área obtida*	Teor (%)	Média*	DP*	CV*
13179,50	101,45	102,43	0,76	0,75
13098,70	103,19			
13489,20	102,99			
14069,00	102,66			
13226,50	101,50			
13327,90	102,82			

*****média dos 6 valores; DP– desvio padrão, CV – coeficiente de variação (%): menor que 5%.

A análise foi feita em sextuplicata para cada um dos sistemas desenvolvidos. Na precisão (repetibilidade), foi avaliado o CV das seis amostras. Os CV entre as amostras C_CUR1% e F27_CUR1% realizados no

mesmo dia, conforme apresentado nas Tabelas 14 e 15, foram inferiores a 2%, apresentando valores de 1,62% e 0,75%, respectivamente. A ANVISA (BRASIL, 2003) permite para a análise de precisão um coeficiente de variação de 5%.

6.3.3.2 Precisão intermediária

As Tabelas 16 e 17 apresentam os resultados obtidos na precisão intermediária, utilizando as formulações C_CUR1% e F27_CUR1%.

Tabela 16. Resultados obtidos na análise da precisão intermediária com amostra C_CUR1%, feita por analistas diferentes e em diferentes dias.

Área obtida	Teor (%)	Média*	DP*	CV*
13403,90	95,36	97,98	1,48	1,51
13828,10	99,38			
13522,20	96,67			
14690,90	98,95			
13559,50	97,30			
13460,50	96,19			
14016,20	98,22			
13380,70	96,94			
14274,50	98,90			
14819,60	100,44			
14525,50	98,74			
14262,00	98,68			

*****média dos 12 valores; DP – desvio padrão, CV – coeficiente de variação (%): menor que 5%.

Tabela 17. Resultados obtidos na análise da precisão intermediária com amostra F27_CUR1%, feita por analistas diferentes e em diferentes dias.

Área obtida	Teor (%)	Média*	DP*	CV*
13179,50	101,45	99,93	2,69	2,69
13098,70	103,19			
13489,20	102,99			
14069,00	102,66			
13226,50	101,50			
13327,90	102,82			
13740,80	97,35			
14803,60	97,24			
13418,70	98,40			
13576,30	97,04			
13945,90	97,12			
13163,20	97,38			

*****média dos 12 valores; DP – desvio padrão, CV – coeficiente de variação (%): menor que 5%.

Foram preparadas mais seis amostras de cada sistema desenvolvido e a avaliação da precisão intermediária foi avaliada utilizando o CV em relação à média e desvio padrão do teor das doze amostras. Para cada análise foi preparado um padrão com concentração aproximada das amostras. Os CV entre as análises com amostras de mesma concentração, realizadas em dias diferentes, foram de 1,51% e 2,69%, para os sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, respectivamente. Portanto os valores obtidos para o CV na análise de precisão intermediária estão dentro das especificações da ANVISA, 2003.

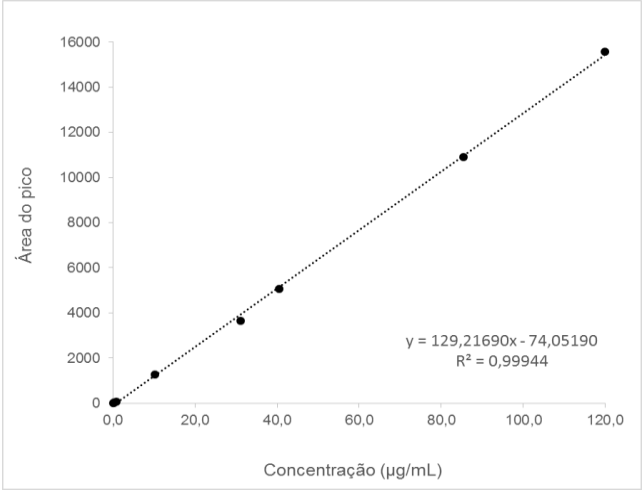
A variação encontrada na precisão feita em diferentes dias, com diferentes analistas, foi maior pois as variáveis também foram maiores.

6.3.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi obtido de modo experimental, injetando-se concentrações baixas da solução padrão de curcumina, cerca da metade da concentração da solução anterior, partiu-se de uma solução padrão na concentração de 0,8 µg/mL. Na Figura 44, encontra-se a curva analítica, acrescida das concentrações de 0,076 µg/mL; 0,15 µg/mL e 0,25 µg/mL, utilizadas no ensaio de limite de quantificação. Observa-se que o coeficiente de

correlação (R^2) da curva obtida foi acima de 0,99. Este teste foi realizado pois no ensaio de liberação *in vitro* poderia ser encontrada uma concentração muito baixa de curcumina na fase receptora. O coeficiente de variação da amostra na concentração de 0,076 µg/mL foi 0,77%. Não foram testadas concentrações menores que 0,076 µg/mL, pois este valor já está abaixo do esperado no teste de liberação *in vitro*.

Figura 44. Curva da analítica acrescida das concentrações próximas ao suposto limite de quantificação.



Pode-se observar que na Figura 44, o valor obtido do coeficiente de correlação ficou muito próximo ao obtido na análise de linearidade demonstrada na Figura 43, indicando que as concentrações que foram incluídas ainda respondem linearmente na obtenção da resposta (área do pico). De acordo com este teste a amostra pode ser quantificada com segurança, mesmo na concentração de 0,076 µg/mL. O CV das áreas obtidas nesta concentração mínima foi igual a 0,77%, dentro do limite especificado pela ANVISA que é de 5% (BRASIL, 2003). De acordo com a Equação 8, o limite de quantificação teórico é 0,096 µg/mL, mas experimentalmente foi possível quantificar até 0,076 µg/mL (suposto limite de quantificação) (BRASIL, 2003).

$$LQ = \frac{10DP}{B}$$

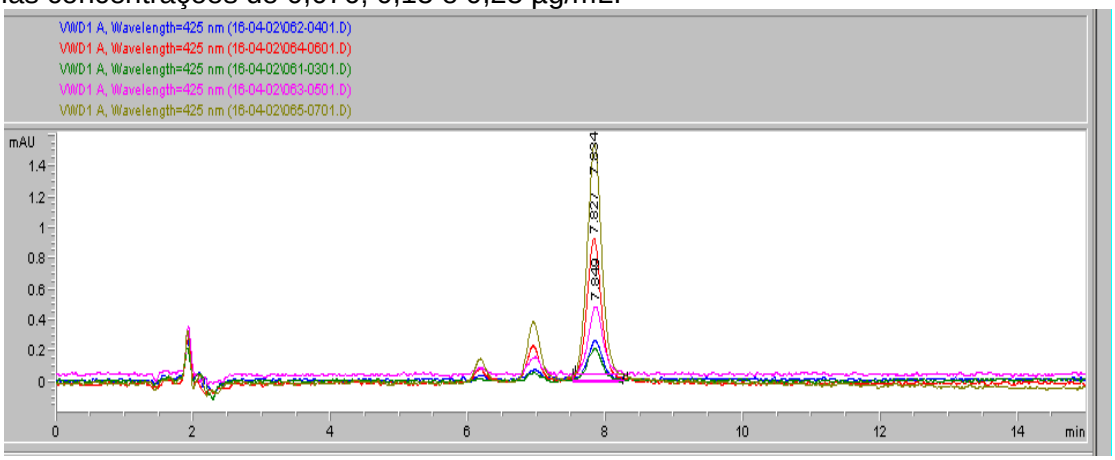
Equação 8

Na qual:

DP: o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação
B: inclinação da da curva de calibração

A Figura 45 apresenta os picos obtidos com a injeção das soluções padrão de curcumina nas concentrações de 0,076; 0,15 e 0,25 µg/mL, que foram utilizadas na análise do limite de quantificação.

Figura 45. Cromatogramas obtidos com a injeção das soluções padrão de curcumina nas concentrações de 0,076; 0,15 e 0,25 µg/mL.



6.3.5 Exatidão

A Tabela 18 apresenta os resultados encontrados na análise da exatidão do método analítico. Para avaliar este parâmetro, a curcumina foi incorporada no sistema emulsionado (C) nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0%, resultando nas concentrações baixa, média e alta, nos valores aproximados de 0,08 µg/mL, 40 µg/mL e 110 µg/mL, contemplando toda faixa linear de trabalho. As recuperações do princípio ativo nas formulações foram avaliadas de acordo com a Equação 9, utilizando uma solução padrão de curcumina. O fator resposta foi calculado dividindo a concentração final pela área correspondente, e assim, calculado o coeficiente de variação.

Tabela 18. Valores obtidos no ensaio de exatidão utilizando os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1%.

Concentração (μg/mL)	Áreas	FR*	DP*	CV*	CV geral*	Recuperação (%)	Média Recuperação (%)
0,87	97,9	0,000009				102,15	
0,84	95,4	0,000009	0,00000008	0,908		102,93	
0,87	99,4	0,000009				104,02	
38,91	4866,5	0,000008				101,94	
39,66	4849,5	0,000008	0,00000009	1,143	4,13	99,68	100,28
39,33	4843,3	0,000008				100,38	
111,53	13403,9	0,000008				95,36	
110,41	13828,1	0,000008	0,00000017	2,096		99,38	
110,99	13522,2	0,000008				96,67	

*FR – fator de resposta, DP – desvio padrão, CV – coeficiente de variação.

$$\frac{AA \times [Pd] \times 100}{AP \times [Am]} \qquad \textbf{Equação 9}$$

Na qual:

AA = área média da amostra
AP = área média do padrão
[Pd] = concentração média teórica do padrão
[Am] = concentração média teórica da amostra

Para o sistema pseudoternário desenvolvido, a exatidão do método analítico também foi avaliada calculando-se a recuperação do princípio ativo na matriz, para isso foram utililizados os resultados de teor de curcumina obtidos no ensaio de precisão intermediária para o sistema F27_CUR1%.

As recuperações do princípio ativo nas formulações também foram avaliadas de acordo com a Equação 9, utilizando uma solução padrão de curcumina. O fator resposta foi calculado dividindo a concentração final pela área correspondente, e assim, calculado o coeficiente de variação.

A Tabela 19 apresenta os resultados encontrados na análise da exatidão do método analítico para o sistema F27_CUR1%.

Tabela 19. Valores obtidos no ensaio de exatidão utilizando amostras F27_CUR1%.

Concentração (µg/mL)	Área	FR*	Média	DP*	CV*	Recuperação (%)	Média Recuperação (%)
102,168	13179,5	7,75E-06				101,45	
99,833	13098,7	7,62E-06				103,19	
103,010	13489,2	7,64E-06				102,99	
107,782	14069,0	7,66E-06				102,66	
102,489	13226,5	7,75E-06				101,50	
101,948	13327,9	7,65E-06	7,62E-06	7,45E-08	0,98	102,82	99,93
104,053	13740,8	7,57E-06				97,35	
112,223	14803,6	7,58E-06				97,24	
100,524	13418,7	7,49E-06				98,40	
103,131	13576,3	7,60E-06				97,04	
105,857	13945,9	7,59E-06				97,12	
99,642	13163,2	7,57E-06				97,38	

*FR – fator de resposta, DP – desvio padrão, CV – coeficiente de variação.

Tanto para os resultados apresentados na Tabela 18 quanto os resultados da Tabela 19, a exatidão do método foi calculada a partir do fator de resposta (FR) e da recuperação do princípio ativo nos sistemas. Os CV obtidos foram de 4,13% e 0,98%. A recuperação ficou entre 95% e 105%, conforme determinado pela ANVISA, obtendo-se uma recuperação média de 100,28% e 99,93% (BRASIL, 2003).

Segundo ANVISA (BRASIL, 2003), uma das formas de se avaliar a exatidão do método analítico é pela análise de amostras nas quais uma quantidade conhecida de fármaco é adicionada à mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado), conforme feito neste trabalho.

6.4 ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004)

O estudo de estabilidade possui diversas aplicações e importâncias, como por exemplo: orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento, dar direções no sentido de aperfeiçoar as formulações, estimar do prazo de validade do produto e avaliar o grau de estabilidade do produto em determinado intervalo de tempo e condições experimentais. Resumindo, todos esses dados fornecem confiabilidade e segurança aos produtos desenvolvidos (BRASIL, 2004).

Segundo ANVISA (BRASIL, 2004), recomenda-se submeter o produto ao teste de centrifugação antes de iniciar os estudos de estabilidade, assim, as formulações escolhidas foram submetidas ao teste de centrifugação à 3.000 rpm durante 30 minutos. Ao final, foram avaliadas visualmente quanto ao aspecto, cor, odor, precipitações e separação de fases.

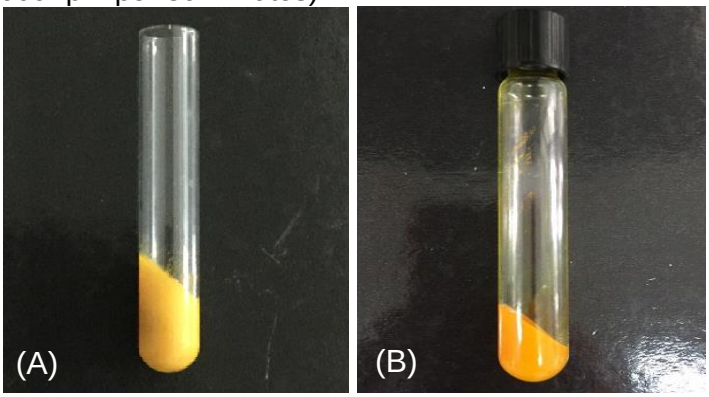
6.4.1 Teste de centrifugação

O teste de centrifução é realizado como etapa inicial no desenvolvimento de formulações. É um teste rápido e que é capaz de fornecer informações sobre a instabilidade da formulação quanto à separação de fases, avaliando a presença de coalescência ou cremeação. Possui então, a finalidade de auxiliar na triagem das formulações (SILVA & SOARES, 1996).

As emulsões e os sistemas pseudoternários são considerados estáveis se os constituintes da fase dispersa mantiverem-se na fase dispersante, após submetê-las a agitação e força da gravidade. Após a manipulação dos sistemas escolhidos, estes foram submetidos ao teste de centrifugação.

Ao final, tanto o sistema C_CUR1% e F27_CUR1%, foram considerados estáveis, conforme mostra a Figua 46, pois após submetê-los ao teste de centrifugação, não foi observado precipitação, separação de fases (coalescência, cremeação e floculação) e formação de *caking* (sedimento compacto). Logo, estas formulações estiveram aptas para o prosseguimento do estudo de estabilidade (BRASIL, 2004; ANTONIO, 2007).

Figura 46. Formulção C_CUR1% (A) e formulação F27_CUR1% (B) após teste de centrifugação (3000 rpm por 30 minutos).



6.4.2 Características organolépticas

A formulação C_CUR1% possui aspecto homogêneo, semi-sólido, de coloração fortemente amarelada, opaca e inodora. O sistema F27_CUR1% também possui aspecto homogêneo, semi-sólido, opaca e inodora, no entanto apresenta coloração ainda mais forte, tendendo à coloração alaranjada.

As duas formulações escolhidas em estudo não apresentaram alterações no aspecto físico macroscópico, ou seja, não ocorreram alterações quanto ao aspecto, cor, odor, consistência ou separação de fases, durante o período de 15 dias nas condições propostas no estudo de estabilidade preliminar.

6.4.3 Determinação do pH

O pH ideal das formulações foi padronizado de acordo com o pH de maior estabilidade da curcumina e o de tolerância biológica para produtos intravaginais, foi então estabelecido o valor de 4,5 ± 1,0.

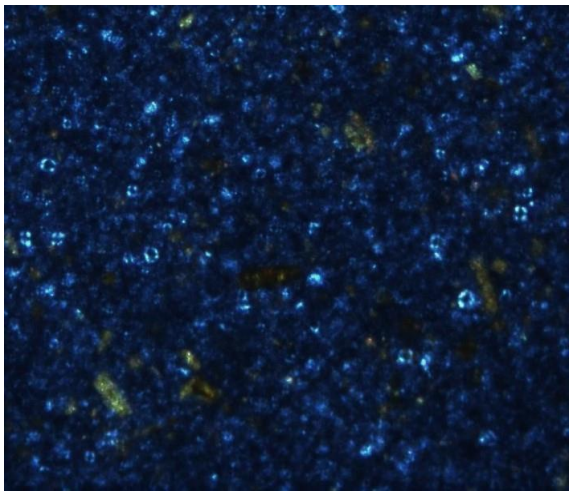
De acordo com o método colorimétrico aplicado, tanto a formulação C_CUR1% quanto a F27_CUR1% mantiveram os valores pH em torno de 4,5 e 5,0 respectivamente, durante o período de 15 dias nas condições propostas no estudo de estabilidade.

6.4.4 Microscopia de luz polarizada

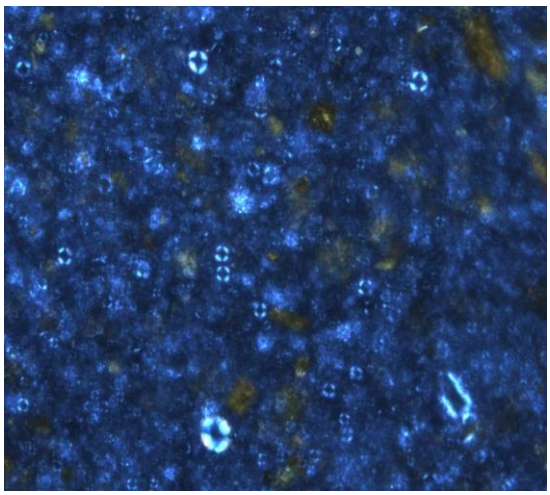
Na Figura 47 encontram-se as fotomicrografias do sistema C_CUR1% no início do estudo de estabilidade preliminar (análise inicial) e as fotomicrografias da mesma amostra submetida às condições propostas para o estudo de estabilidade após 15 dias.

Figura 47. Fotomicrografia sob luz polarizada do sistema C_CUR1% na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade (análise 15 d), com aumentos de 10x e 20x.

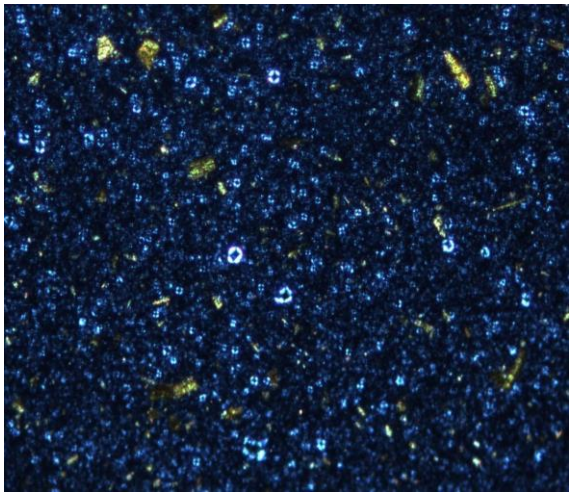
Sistema C_CUR1% (análise inicial)
- aumento de 10 x



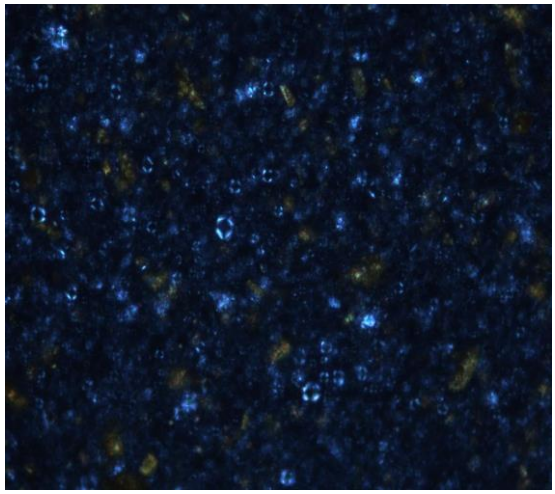
Sistema C_CUR1% (análise inicial)
- aumento de 20 x



Sistema C_CUR1% (análise inicial)
- aumento de 10 x



Sistema C_CUR1% (análise 15 d)
- aumento de 20 x

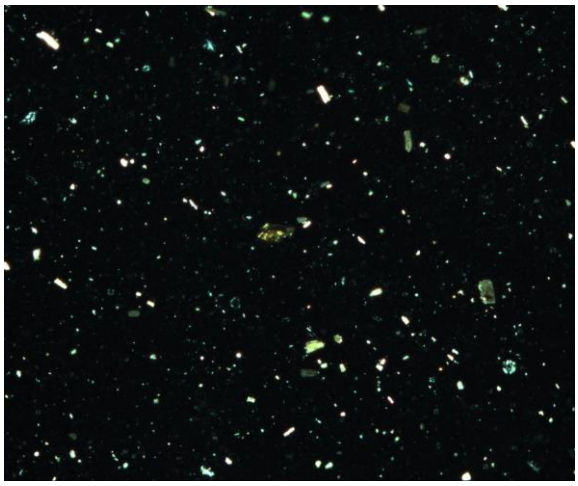


As fotomicrografias da Figura 47 mostram que os sistemas C e C_CUR1%, submetidos aos ciclos de temperaturas, permaneceram com suas estruturas microscópicas estáveis. Foram identificadas “cruzes de malta”, típica de mesofase lamelar e cristais de curcumina, tanto na análise incial quanto ao final dos 15 dias de estudo, para os dois sistemas.

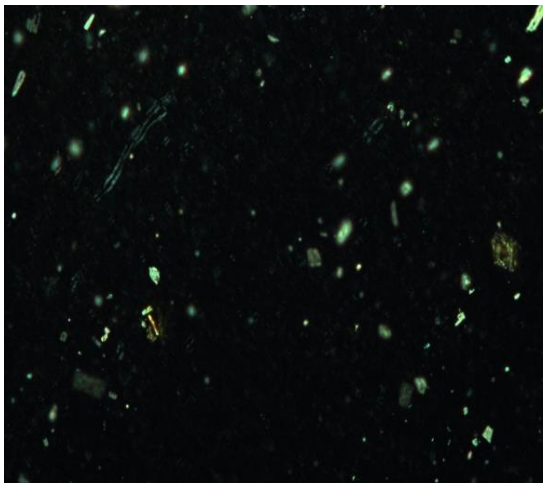
A Figura 48, mostra as fotomicrografias do sistema F27_CUR1%, no início do estudo de estabilidade preliminar (análise inicial) e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar.

Figura 48. Fotomicrografia sob luz polarizada do sistema F27_CUR1% na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade (análise 15 d), com aumentos de 10x e 20x.

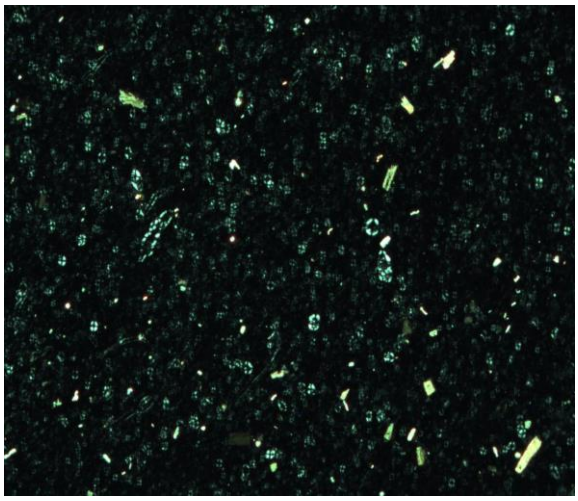
Sistema F27_CUR1% (análise inicial)
- aumento de 10 x



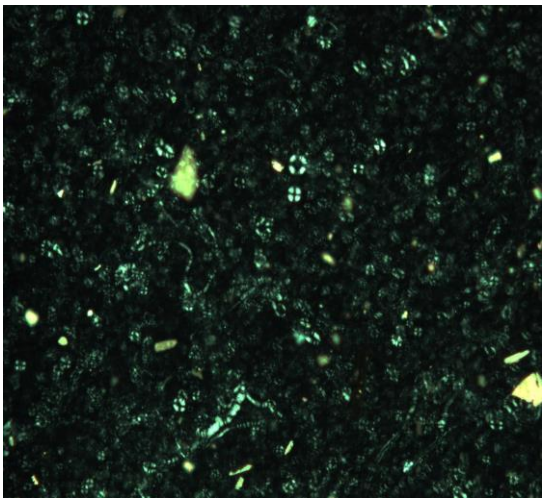
Sistema F27_CUR1% (análise inicial)
- aumento de 20 x



Sistema F27_CUR1% (análise 15 d)
- aumento de 10 x



Sistema F27_CUR1% (análise 15 d)
- aumento de 20 x



Conforme as fotomicrografias da Figura 48, no sistema F27_CUR1% (análise inicial), houve a presença de campo escuro com estruturas cristalinas. Após 15 dias de estudo, observou-se o mesmo campo escuro com estruturas cristalinas e observou-se também algumas “cruzes de malta”.

No geral, pode-se afirmar que não houve mudanças preocupantes ou significativas nas microestruturas dos sistemas ao final do estudo de estabilidade preliminar, sendo consideradas estáveis do ponto de vista microestrutural.

6.4.5 Comportamento reológico

Nas Figuras 49 e 50, encontram-se as curvas de fluxo e de visosidade obtidas dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e análise após 15 de estudo de estabilidade preliminar; a Tabela 20 apresenta as áreas de histerese relativas às curvas de fluxo. Foram calculados também, utilizando os reogramas, os valores de *n* para verificar o comportamento de fluxo e de *K*, para verificar a consistência dos sistemas, conforme Equação 6, do item 6.2.4, estes resultados encontram-se na Tabela 21. Na Tabela 22, encontram-se os valores de viscosidade aparente mínima para estes sistemas.

Figura 49. Ensaio de curva de fluxo em função da taxa de cisalhamento (Hz), à temperatura de 30 ºC ± 1, dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d).

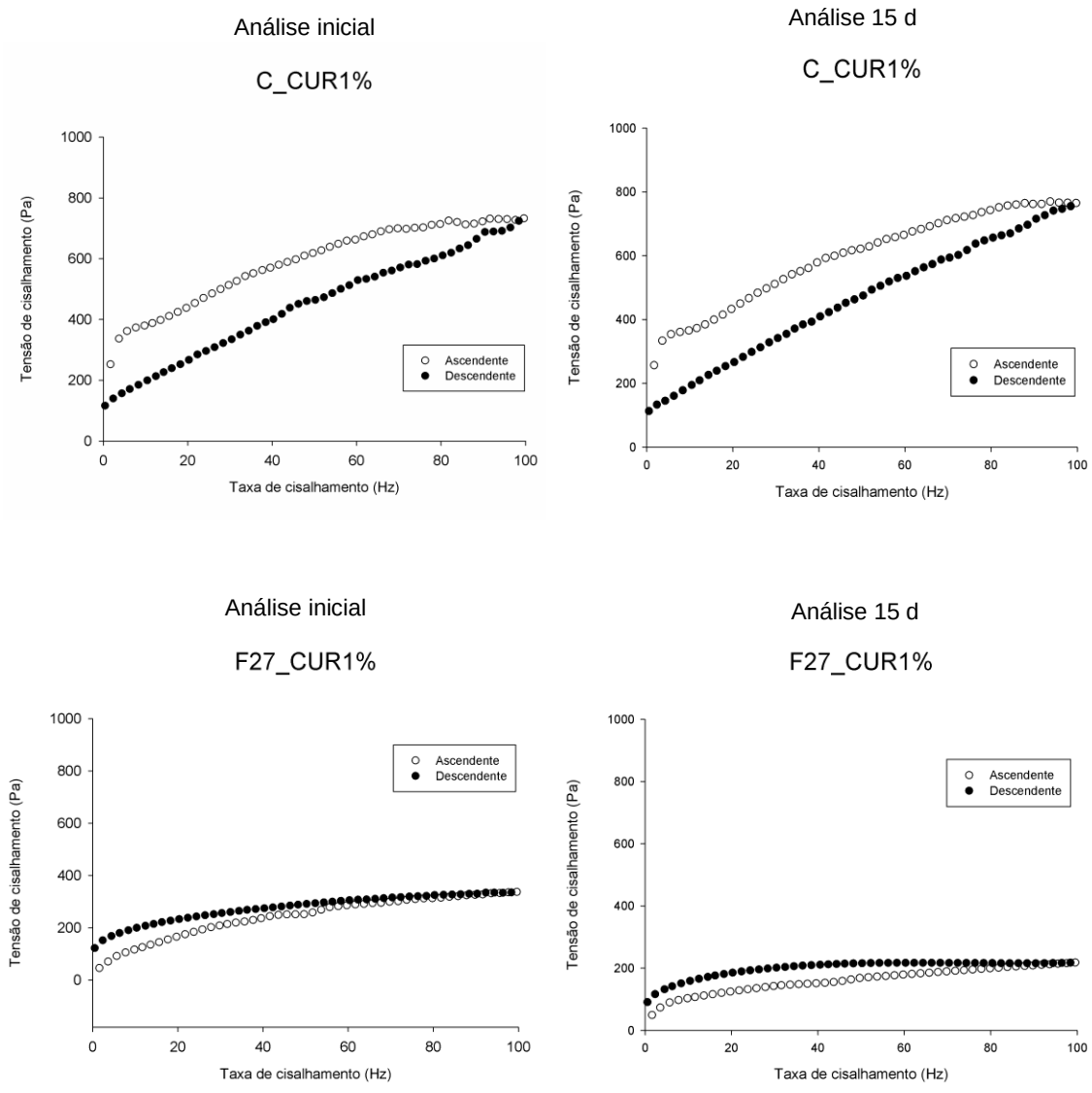


Figura 50. Gráficos de viscosidade em função da taxade cisalhamento à temperatura de 30 ºC ± 1, dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d).

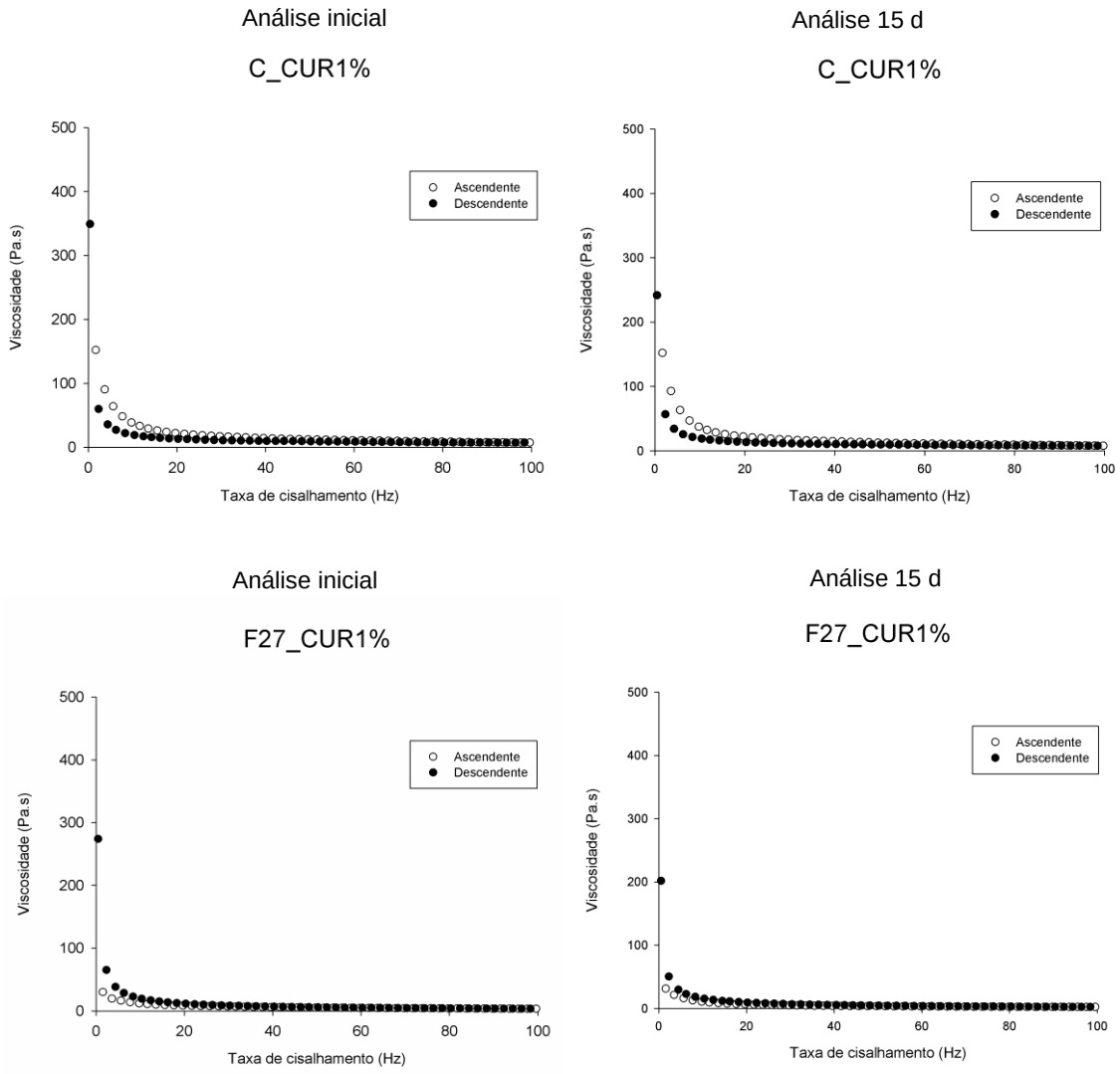


Tabela 20. Áreas de histerese das curvas de fluxo dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d).

	Curva ascendente	**Curva descendente**	**Área de histerese**
C_CUR1% (análise inicial)	57153,48	42017,79	15135,69
C_CUR1% (análise 15 d)	58199,68	43441,34	14758,33
F27_CUR1%(análise inicial)	23821,53	26392,35	-2570,82
F27_CUR1% (análise 15 d)	14654,04	17577,95	-3398,88

Tabela 21. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d).

Sistema	N	K
C_CUR1% (análise inicial)	0,2949	194,177
C_CUR1% (análise 15 d)	0,3282	173,495
F27_CUR1% (análise inicial)	0,4432	45,2601
F27_CUR1% (análise 15 d)	0,3350	45,8049

Tabela 22. Valores de viscosidade aparente mínima para os sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d).

Viscosidade aparente mínima (Pa.s)	Sistema			
	C_CUR1% (análise inicial)	C_CUR1% (análise 15 d)	F27_CUR1% (análise inicial)	F27_CUR1% (análise 15 d)
1	8,17	8,20	3,36	2,38
2	6,80	7,59	3,51	2,22
3	7,09	7,23	3,29	1,96
Média*	7,35[a]	7,67[a]	3,39[b]	2,19[b]

*Média dos três valores. [a] não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de viscosidade aparente mínima do sistema C_CUR1% na análise inicial e análise 15 d ($p<0,05$).[b] houve diferença estatisticamente significativa nos valores de viscosidade aparente mínima do sistema F27_CUR1% na análise inicial e análise 15 d ($p<0,05$).

De acordo com as Figuras 49 e 50, após 15 dias de estudo de estabilidade, o sistema C_CUR1% apresentou-se como não-newtoniano, pseudoplástico e tixotrópico, conforme inicialmente. O sistema F27_CUR1% apresentou-se como não-newtoniano, pseudoplástico e anti-tixotrópico, também conforme observado nas análises iniciais.

De acordo com a Tabela 20, o sistema C_CUR1% não apresentou alteração significativa nas áreas de histerese obtidas na análise incial e após 15 dias de estudo de estabilidade; para o sistema F27_CUR1% (análise 15 d) em relação ao F27_CUR1% (análise inicial), houve aumento na área de histerese (valor em módulo) indicando nesse caso, maior energia necessária para quebrar as estruturas anti-tixotrópicas e, portanto, menor capacidade de recuperação do sistema em relação à sua forma inicial, o sistema também readquire viscosidade ao cessar a tensão, mostrado pela curva descendente acima da curva ascendente.

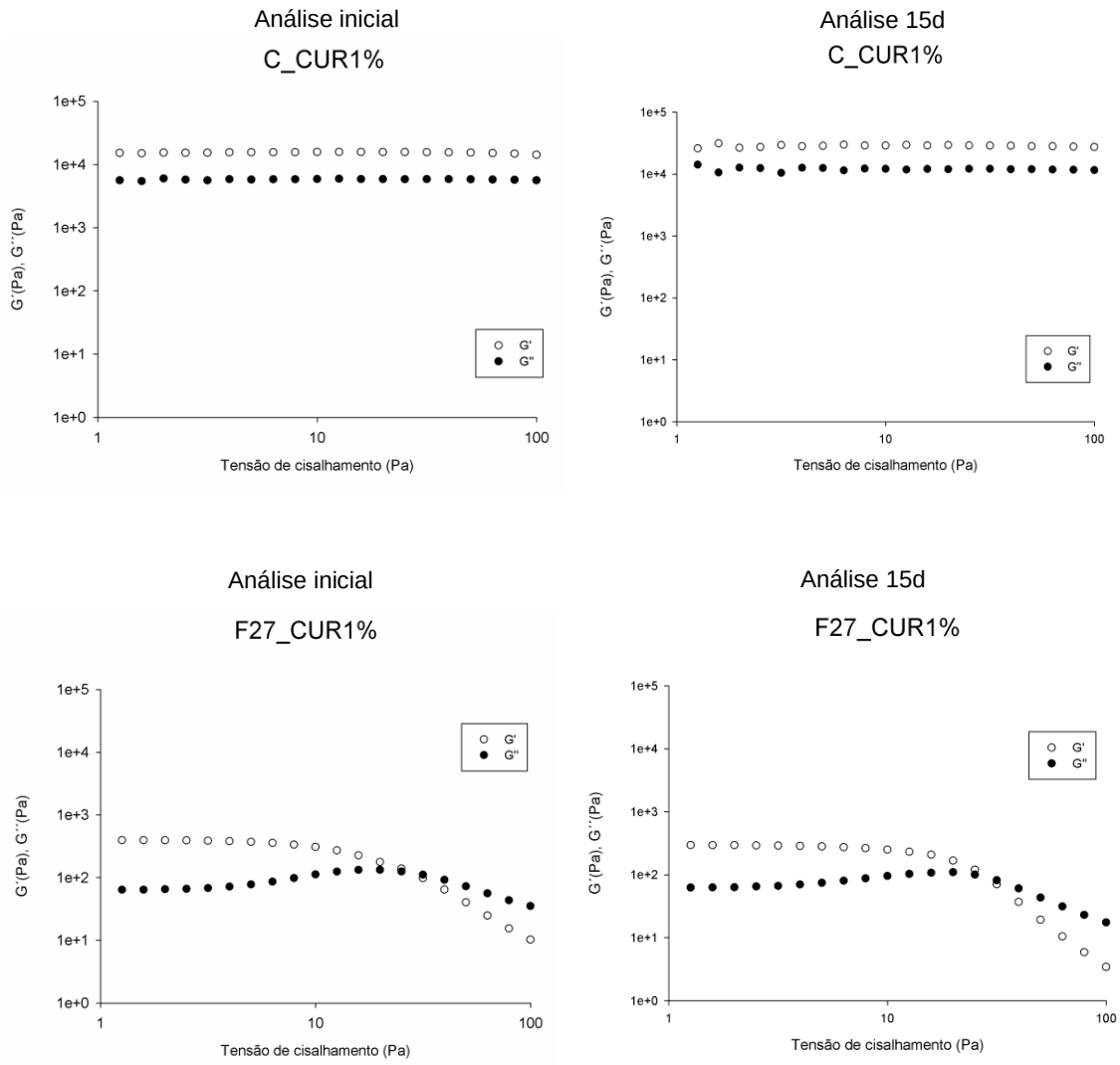
Conforme a Tabela 21, todos os sistemas apresentaram valores de *n* menores que 1, confirmando o comportamento pseudoplástico mesmo após os 15 dias de estudo de estabilidade. Para C_CUR1% houve diminuição no valor de *K*, parâmetro relacionado à viscosidade dos sistemas; isso mostra uma diminuição da viscosidade, conforme visto nos testes anteriores, que mostraram o aumento do caráter elástico ou o possível ressecamento da formulação. Para F27_CUR1%, houve um ligeiro aumento no valor de *K*, de modo não significativo, mas que pode mostrar a maior contribuição do módulo viscoso após os 15 dias de estudo de estabilidade.

No sistema C_CUR1% não houve alteração estatisticamente significativa nos valores de viscosidade aparente mínima ao final do estudo de estabilidade, já para o sistema F27_CUR1% houve diminuição estatisticamente significativa nos valores de viscosidade aparente mínima, confirmando o aumento da contribuição viscosa do sistema ao final do estudo de estabilidade, conforme Tabela 22.

Vale ressaltar que as características tixotrópicas e anti-tixotrópica dos sistemas, comprovada pelos valores de comportamento de fluxo menores que 1, permaneceram mesmo após os 15 dias de estudo de estabilidade, isso é importante do ponto de vista de aplicabilidade, considerando que é vantajoso os sistemas manterem essas características com o decorrer do tempo.

Os sistemas foram submetidos ao teste de varredura de tensão, em faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 100 Pa e frequência fixa de 1Hz, à temperatura de 30 °C ± 1, após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar repetiu-se o teste de varredura de tensão, nas mesmas condições descritas. Os resultados encontram-se na Figura 51, para os sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e análise após 15 dias de estudo de estabilidade.

Figura 51. Ensaio da varredura de tensão à temperatura de 30 ºC ± 1 dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d).



De acordo com a Figura 51, o sistema C_CUR1% (análise inicial e análise 15 d) manteve a região viscoélástica linear até a tensão de cisalhameto de 100 Pa e módulo G’ superior ao G’’ durante a varredura de tensão.

Ainda na Figura 51, o sistema F27_CUR1% (análise inicial) possuiu o módulo de armazenamento ou módulo elástico (G’) maior do que o módulo de perda ou viscoso (G”) até o ponto de tensão equivalente a 98,22 Pa (ponto de deformação crítica). Após 15 dias de estudo de estabilidade, G’ é maior do que G’’ até ponto de tensão equivalente a 70,80 Pa (ponto de deformação crítica), isso demonstra que as condições extremas de temperatura também causaram uma diminuição do ponto de deformação crítica do sistema e na região viscoelástica linear.

O sistema C_CUR1% apresentou-se mais estável que F27_CUR1% após os 15 dias de estudo, pois manteve a região viscoelástica linear até 100 Pa.

Também foi realizado o teste de varredura de frequência dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e análise após 15 dias de estudo, em tensão de cisalhamento fixa de 1 Pa e frequência de 1,0 a 100 Hz, os resultados encontram-se na Figura 52. As análises quantitativas dos módulos G' e G'' encontram-se na Tabela 23.

Figura 52. Ensaio da varredura de freqüência à temperatura de 30 ºC ± 1 dos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d).

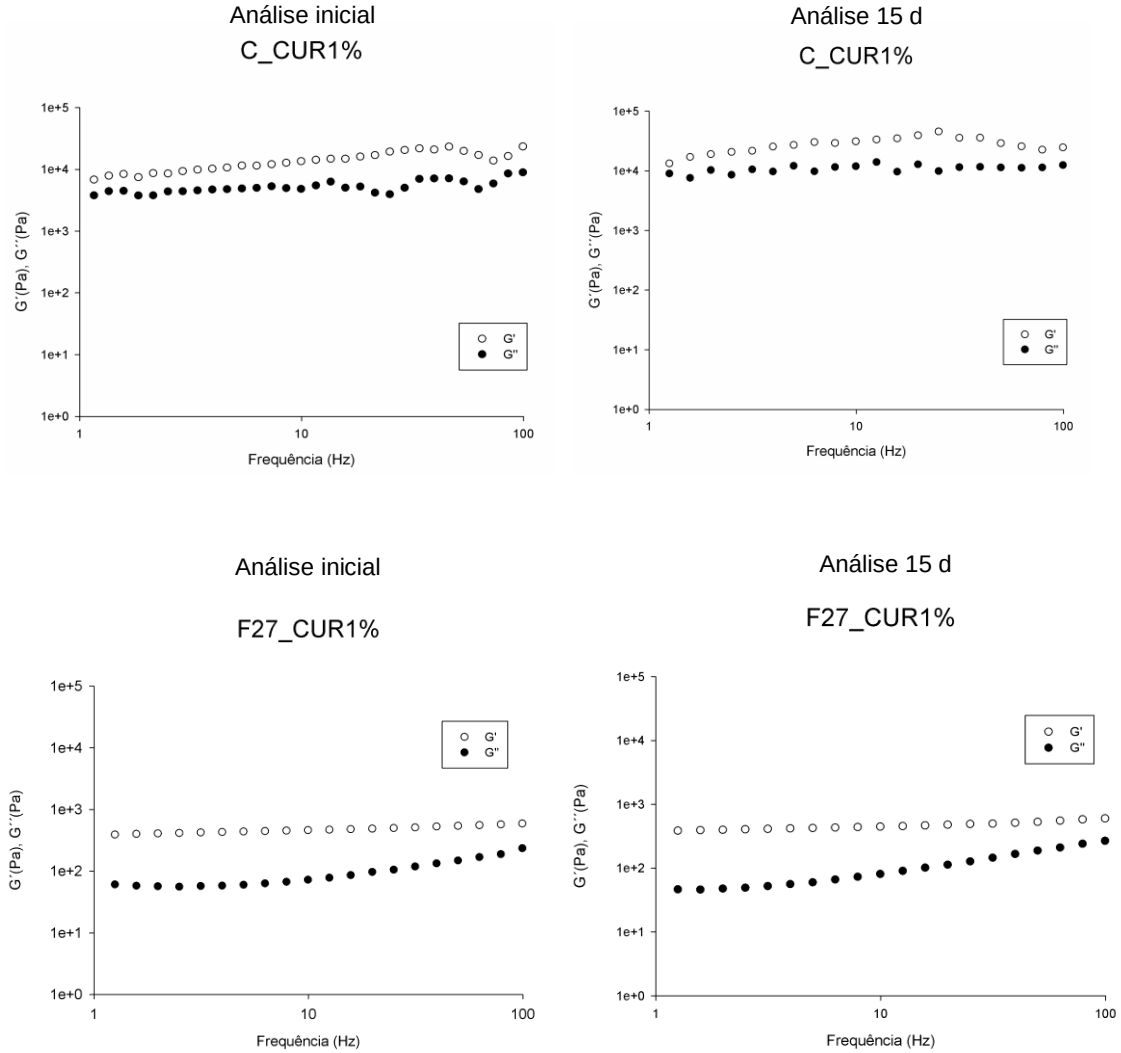


Tabela 23. Análise quantitativa dos módulos G’ e G’’ para os sistemas C_CUR1%, na análise inicial e após 15 dias de estudo de estabilidade preliminar (análise 15 d).

Sistema	G' (Pa)	G'' (Pa)
C_CUR1% (análise inicial)	28544,1	8709,7
C_CUR1% (análise 15 d)	33238,6	8617,0
F27_CUR1% (análise inicial)	499,4	138,5
F27_CUR1% (análise 15 d)	501,0	161,2

De acordo com a Figura 52, no sistema C_CUR1%, o módulo G’ permaneceu maior que o módulo G’’ em toda a faixa de frequencia, sugerindo o caráter mais elástico do sistema mesmo após os 15 dias de estudo de estabilidade. Pode-se observar, na Tabela 23, a predominância do módulo G’ e um afastamento dos módulos G’ e G’’ após os 15 dias de estudo, sugerindo maior elasticidade do sistema ou ressecamento da formulação após este período de estudo.

No sistema F27_CUR1%, observa-se o módulo G’ maior que G’’ em toda faixa de frequência analisada, o que mostra a predominância do cáreter elástico do sistema mesmo após 15 dias de estudo de estabilidade, isso também pode ser observado na Tabela 23. No entanto, houve uma aproximação dos módulos de armazenamento e de perda após 15 dias de estudo de estabilidade, o que mostra que após este período houve uma maior contribuição do módulo viscoso do sistema.

Ao comparar os dois sistemas, C_CUR1% ainda apresentou maior caráter elástico do que F27_CUR1% mesmo após 15 dias de estudo de estabilidade.

6.4.6 Quantificação de curcumina nas formulações

A quantificação do princípio ativo foi realizada após a metodologia analítica ter sido revalidada.

Conforme Tabela 24, os resultados de teor obtidos a partir dos sistemas contendo 1% de curcumina expostos às condições de ciclos de temperatura (temperatura de 4 °C ± 2 por 24 horas e 40 °C ± 2 por mais 24 horas, durante 15 dias consecutivos e umidade controlada a 75%), estão dentro dos limites especificados, de 95 a 105% (BRASIL, 2005).

Tabela 24. Resultados do teor de curcumina nas formações C_CUR1% e F27_CUR1% submetidas ao estudo de estabilidade preliminar.

Análise	C_CUR1%*	F27_CUR1%*
Análise inicial	102,61	99,48
Análise no 7º dia do experimento	102,90	99,18
Análise no 15º dia do experimento	102,69	98,18
Média	102,73	98,94
DP	0,15	0,68
CV	0,15	0,69

*Média de duas amostras. DP – desvio padrão. CV – coeficiente de variação: inferior a 2%.

6.5 AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

6.5.1 Teste de solubilidade e escolha da fase receptora

O estudo da solubilidade do fármaco na solução receptora é muito importante para garantir a condição *sink* do experimento. Foram testadas treze diferentes soluções receptoras contendo curcumina na concentração de 432 µg/mL (excesso), no entanto, devido à baixa solubilidade aquosa, muitos meios receptores solubilizaram uma pequena quantidade de curcumina resultando em baixas concentrações dissolvidas; a Tabela 25 mostra os meios receptores testados e as porcentagens de curcumina solubilizada.

Tabela 25. Resultado da porcentagem solúvel de curcumina nos meios receptores testados por CLAE.

Meio receptor	Concentração final obtida (µg/mL)	% Solubilizada
Tampão acetato* pH 4,5 + Procetyl® (2%)	35,82	8,29
Tampão acetato* pH 4,5 + Etanol (5%)	48,24	11,36
Tampão acetato* pH 4,5 + Etanol (20%)	182,70	42,31
Tampão acetato* pH 4,5 + Etanol (30%)	264,05	61,46
Tampão acetato* pH 4,5 + Etanol (50%)	297,58	69,62
Propilenoglicol (15%) + Span® 80 (1%) + Etanol (5%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)	228,28	53,29
Propilenoglicol (7,5%) + Procetyl® (2%) + Etanol (5%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)	88,31	20,66
Propilenoglicol (15%) + Span 80® (1%) + Etanol (20%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)	296,32	68,18
Propilenoglicol (15%) + Span 80® (1%) + Etanol (30%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)	259,22	60,25
Propilenoglicol (15%) + Span 80® (1%) + Etanol (50%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)	302,88	70,86
Propilenoglicol (8%) + Span 80® (2%) + Etanol (30%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)	323,15	74,89
Procetyl® (5%) + Etanol (30%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)	431,26	101,19
Propilenoglicol (10%) + Procetyl® (3%) + Etanol (30%) + Tampão acetato* pH 4,5 (qsp)	387,84	91,74

***** Tampão acetato de sódio 0,01*M* pH 4,5.

Conforme apresentado na Tabela 25, a curcumina tem solubilidade significativamente superior em meios contendo tensoativos e etanol, em quantidades mais elevadas. Nota-se que a quantidade de curcumina solúvel no meio aumenta conforme aumentam-se as quantidades dos tensoativos e etanol. A solubilidade da curcumina somente em tampão acetato de sódio pH 4,5 com 2% de Procetyl® é extremamente baixa, o que limita o ensaio de liberação *in vitro*, pois a baixa solubilidade no meio receptor dificulta a saída do fármaco a partir da formulação pela falta de afinidade pelo meio receptor então, não se consegue avaliar de fato a liberação do fármaco a partir da formulação.

Foi escolhido o tampão acetato pH 4,5 devido ao pH vaginal fisiológico e patológico na candidíase vulvovaginal serem próximos a este valor, além disso, a curcumina apresenta maior estabilidade em meios mais ácidos.

De acordo com diversos guias e protocolos vigentes, no caso de fármacos lipofílicos é permitido o uso de solventes orgânicos, como etanol em misturas hidroalcoólicas na proporção 1:1 ou o uso de surfactante não iônico PEG-20 oleil éter a 6% em água; na literatura há diversos trabalhos em que foram necessários o uso de artifícios, como modificadores de solubilidade (potencializadores ou intensificadores), para que fosse possível a realização do

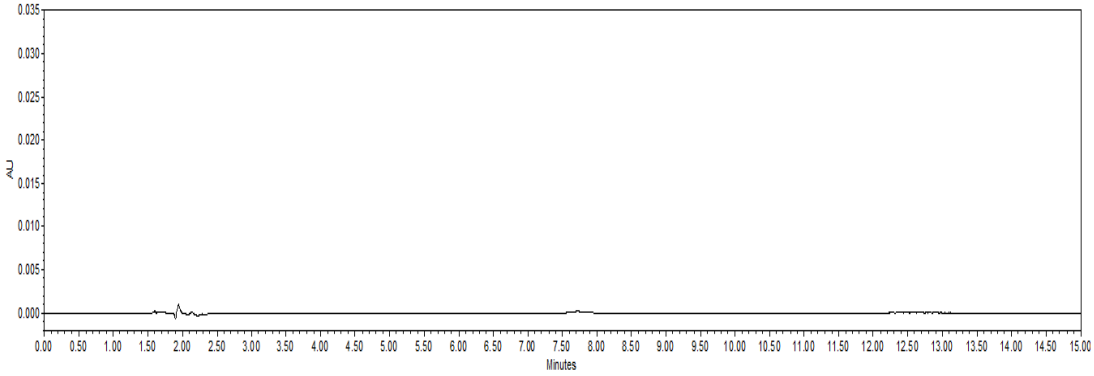
estudo *in vitro* (BRONAUGH & STEWART, 1984; BRONAUGH & STEWART, 1985; CDER, 1997; KAST et al., 2002; OECD, 2004; MENDONÇA et al., 2009).

Assim, baseado nos resultados obtidos, para garantir as *condições sink* e a melhor estabilidade e solubilidade do fármaco, o meio receptor escolhido para este estudo foi tampão acetato de sódio (0,01*M*) pH 4,5 com Procetyl® (5%) e etanol (30%), que apresentou 101,19% de curcumina dissolvida, o que evita a saturação do meio receptor e dessa forma, não influencia no ensaio de liberação *in vitro*, pois a saturação do meio se dá em uma concentração muito superior à quantidade máxima liberada de curcumina a partir das formulações.

É importante ressaltar que o meio receptor escolhido não possui a composição mais adequada, mas foi necessário para avaliar a liberação da curcumina a partir dos sistemas e garantir as condições *sink* dos experimentos. A limitação causada por fármacos lipofílicos no sentido de baixa solubilidade aquosa dificulta a análise do perfil de liberação e este problema é relatado por diversos autores na literatura. Os modificadores de solubilidade utilizados neste trabalho e suas concentrações estão de acordo com os guias vigentes (CDER, 1997; OECD, 2004).

Após a seleção do meio receptor, este foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas condições cromatográficas descritas no item 5.3, para verificar a influência da fase receptora na quantificação da curcumina. O resultado obtido encontra-se na Figura 53.

Figura 53. Injeção em CLAE do meio receptor selecionado, utilizando as mesmas condições do método previamente validado.



Verifica-se na Figura 53 que o meio receptor não influencia nas análises, pois não se observa o aparecimento de picos interferentes no mesmo tempo de retenção da curcumina.

De acordo com os cálculos teóricos de liberação *in vitro* máxima e mínima da curcumina nos sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, foi construída uma curva analítica com injeções de soluções padrão de curcumina dissolvido em metanol, para que fosse estabelecido a faixa linear de trabalho e garantir que qualquer que seja a quantidade liberada, esta estará dentro da faixa linear. A Figura 54, mostra a curva analítica obtida. A fim de verificar a resposta linear no meio receptor escolhido, foi feita outra curva analítica obtida com injeções de soluções de curcumina dissolvidas no meio receptor, conforme mostra Figura 55.

Figura 54. Curva analítica obtida com injeções de soluções padrão de curcumina dissolvida em metanol, utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas no item 5.3.

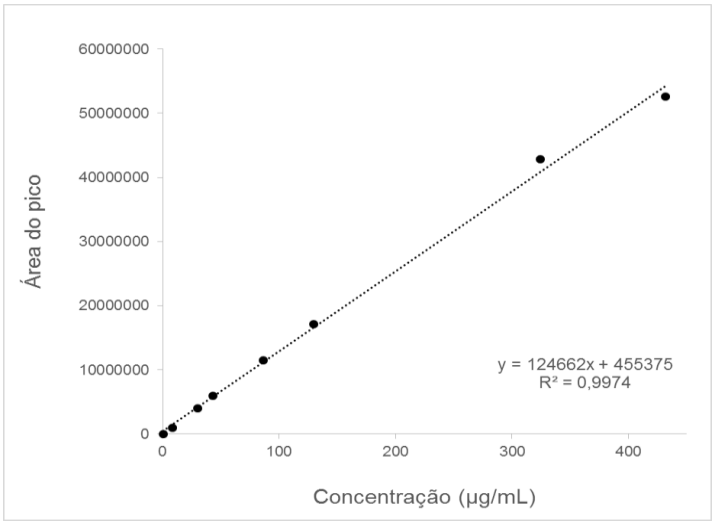
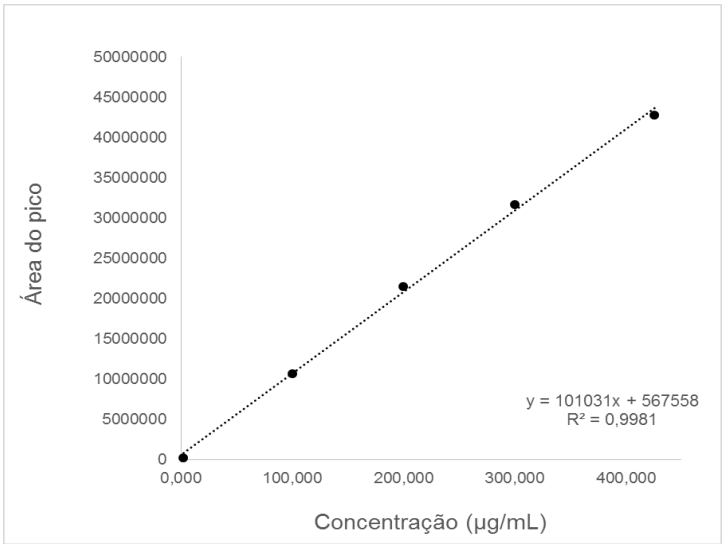


Figura 55. Curva analítica obtida com injeções de soluções padrão de curcumina dissolvida no meio receptor escolhido, utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas no item 5.3.



As curvas analíticas apresentadas nas Figuras 54 e 55, apresentaram-se lineares no intervalo de concentração de 2,0 a 430 µg/mL, com coeficientes de correlação linear de 0,9974 e 0,9981, respectivamente. O critério mínimo aceitável pela ANVISA é de 0,99 (BRASIL, 2003).

6.5.2 Ensaio de liberação *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* foi feito para verificar a capacidade da formulação de liberar o princípio ativo e avaliar a influência das estruturas que compõe os sistemas na liberação do fármaco, para isso, foi avaliado a quantidade de fármaco liberada em um intervalo específico de tempo. Ao verificar o perfil de liberação da curcumina a partir dos sistemas foi possível entender os mecanismos de liberação do fármaco em um intervalo de tempo e estabelecer o modelo de cinética de liberação mais adequado.

As formulações avaliadas foram C_CUR1% e F27_CUR1%, os tempos analisados foram: 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas, sendo que as amostras das soluções receptoras foram coletadas e analisadas por CLAE, conforme as condições cromatográficas descritas no item 5.3. Após cada tempo de coleta houve reposição do meio receptor nas células. Os resultados encontram-se nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26. Liberação da curcumina na formulação C_CUR1%.

Tempo (horas)	Média Q real (µg/cm^2)	Liberação (%)	CV (%)
1	0,07	0,004	8,28
2	0,55	0,031	8,22
4	1,99	0,108	9,98
6	3,77	0,210	9,36
8	5,68	0,316	9,83
12	8,54	0,476	6,94

*CV – coeficiente de variação: máximo 10%.

Tabela 27. Liberação da curcumina na formulação F27_CUR1%.

Tempo (horas)	Média Q real (µg/cm²)	Liberação (%)	CV (%)
1	0,08	0,005	9,37
2	0,12	0,007	6,59
4	2,33	0,147	9,80
6	4,40	0,272	8,94
8	6,62	0,409	9,79
12	12,59	0,778	9,91

*CV – coeficiente de variação: máximo 10 %.

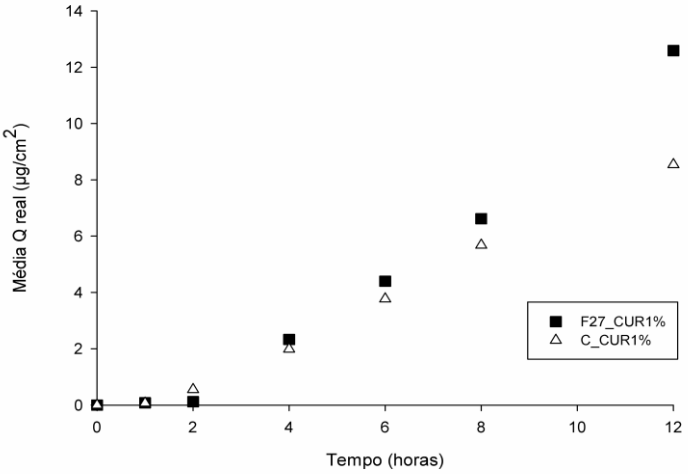
A quantidade real liberada, em µg/cm^2, foi calculada utilizando-se a Equação 5 descrita no item 5.5.4, também foram calculadas as médias (n=5) das quantidades liberadas e os coeficientes de variação. As Tabelas 26 e 27 apresentam a porcentagem de curcumina que atravessou a membrana de acetato de celulose por cm^2, considerando a quantidade de amostra e a concentração do princípio ativo presente no anel dosador em cada um dos sistemas (C_CUR1% e F27_CUR1%) no enaio de liberação *in vitro*.

De acordo com as Tabelas 26 e 27, os valores obtidos para o coeficiente de variação (CV) no ensaio de liberação para cada uma das formulações estão dentro das especificações, ou seja, a variação entre as amostras no mesmo tempo de coleta são menores que 10%.

O teste de liberação *in vitro* também indica a uniformidade de doses de formulações semi-sólidas, portanto presume-se que as duas formulações avaliadas estão uniformes, devido ao coeficiente de variação dentro das especificações.

Os resultados obtidos demonstram que em até 12 horas de ensaio foram liberados 8,54 µg/cm^2 (0,48%) de curcumina da formulação C_CUR1% e 12,59 µg/cm^2 (0,78%) de curcumina da formulação F27_CUR1%. O gráfico dos perfis de liberação encontra-se na Figura 56.

Figura 56. Perfil de liberação *in vitro* (média Q real (µg/cm^2) da curcumina nas formulações C_CUR1% e F27_CUR1% (média de n=5).



A quantidade de curcumina liberada no sistema F27_CUR1% foi maior do que no sistema C_CUR1%, confirmando que sistemas pseudoternários possuem a capacidade de aumentar a solubilidade de fármacos lipofílicos. Além disso, apesar de ser um sistema reservatório, de acordo com os ensaios reológicos oscilatórios, o sistema F27_CUR1% possui menor elasticidade o que pode facilitar a liberação do fármaco.

As mesofases lamelares que compões os sistemas desenvolvidos neste trabalho, formam uma rede unidimensional, são estruturas mais flexíveis, ou seja, menos rígidas que as mesofases hexagonais e cúbicas, o que favorece a liberação do fármaco.

No entanto, os dois sistemas apresentaram baixa liberação do fármaco, o que torna os ensaios *in vivo* essenciais para confirmar a eficácia da formulação. Se a quantidade de fármaco liberada, mesmo que em baixas concentrações, for capaz de exercer sua atividade farmacológica *in vivo* de modo satisfatório, os sistemas estão de acordo com o uso pretendido.

A presença dos cristais de curcumina pode ser muito vantajosa, pois os critais superficiais ficam em contato com a mucosa vaginal, promovendo o efeito terapêutico desejado, enquanto que os cristais no interior da matriz vão sendo liberados.

A escolha dos sistemas foi de acordo com sua aplicabilidade intravaginal, assim, foram escolhidas formulações com maior viscosidade para que permanecesse mais tempo no local de ação. Para isso foi necessário que os sistemas apresentassem elevada quantidade de fase oleosa e tensoativos; dessa forma, os baixos valores de liberação sugerem que o fármaco possui

maior afinidade pelo sistema, ainda mais por ter forte característica lipofílica, tendo sua afinidade pelo muco vaginal (de característica mais aquosa) bem menor, o que pode reter o fármaco na sua estrutura e retardar a saída deste a partir da matriz, resultando em baixa porcentagem de liberação em 12 horas, conforme feito na análise.

Considerando a influência dos componentes dos sistemas na liberação de um fármaco, diversos modelos matemáticos foram aplicados com intuito de descrever a liberação do fármaco a partir da matriz e fornecer informações sobre os fenômenos responsáveis pela liberação.

Para identificar o modelo cinético de liberação mais adequado aos sistemas, foram utilizados os resultados dos ensaios de liberação *in vitro* aplicados aos modelos matemáticos de cinética de liberação mais freqüentemente usados, os resultados estão apresentados nas Tabelas 28 e 29.

Tabela 28. Aplicação dos modelos matemáticos de cinética de liberação para o sistema C_CUR1%.

Modelos matemáticos	**R^2 (ajustado)**	**k**	**n**	**b**
Baker e Lonsdale	0,7484	0,00006	-	-
Korsmeyer-Peppas	0,9919	0,37330	1,2702	-
Hixon e Crowell	0,9680	0,00230	-	-
Higuchi (ordem pseudo-zero)	0,7521	1,80940	-	-
Primeira ordem	0,9667	0,00700	-	-
Weibull	0,9999	0,96680	-	17,9806

Tabela 29. Aplicação dos modelos matemáticos de cinética de liberação para o sistema F27_CUR1%.

Modelos matemáticos	**R^2 (ajustado)**	**k**	**n**	**b**
Baker e Lonsdale	0,6656	0,00010	-	-
Korsmeyer-Peppas	0,9964	0,24210	1,5917	-
Hixon e Crowell	0,9192	0,00310	-	-
Higuchi (ordem pseudo-zero)	0,6706	2,36440	-	-
Primeira ordem	0,9160	0,00940	-	-
Weibull	0,9411	0,87110	-	4,7176

O modelo de liberação mais adequado é obtido através do coeficiente de

determinação (R^2), pois avalia o ajuste do modelo para a função *Q(t).* Vale ressaltar que é importante se trabalhar com coeficiente de determinação ajustado (COSTA, 2002).

Com a aplicação dos modelos matemáticos (Tabelas 28 e 29) e comparação dos diferentes valores de coeficientes de correlação linear (R^2) obtidos, pode-se observar que os modelos de cinéticas de liberação que apresentaram os maiores valores de R^2, ou seja, mais próximos de 0,99, são os modelos de Weibull e Peppas, para os sistemas C_CUR1% e F27_CUR1%, respectivamente.

O modelo de Weibull baseia-se na Equação 10 descrita abaixo:

$$m = 1 - \exp\left[\frac{-(t - T_i)^b}{a}\right]$$

Equação 10

Na qual:

m: Fração acumulada de fármaco
t: Tempo final
Ti: Tempo de latência (até que o processo de dissolução ocorra)
b: Curva como forma exponencial
a: Parâmetro de escala (relacionado com tempo decorrido de ensaio)

Este modelo matemático é muito utilizado, pois se aplica a quase todos os tipos de curvas de dissolução/liberação, no entanto, por ser um modelo empírico não apresenta fundamentos cinéticos e por isso, pode não caracterizar adequadamente as propriedades cinéticas de liberação do fármaco (PAPADOPOULOU et al., 2006).

O valor de *b* da equação ajuda na definição do mecanismo de transporte do fármaco; *b*=1 expressa liberação de primeira ordem, *b* entre 0,75 e 1 expressa mecanismo de difusão fickiniana (Caso I) e transporte de Caso II; *b* maior que 1 é uma curva sigmoidal indicando mecanismo complexo de liberação, onde ocorre intumescimento e erosão simultaneamente para liberação do fármaco, como é o caso do sistema C_CUR1%, no qual *b*=17,98 (COSTA & LOBO, 2001; MANADAS, PINA, VEIGA, 2002; PAPADOPOULOU et al., 2006).

O modelo de Korsmeyer-Peppas (1981) analisa o mecanismo de difusão

do fármaco através de uma matriz polimérica intumescível. O modelo é baseado na Lei das Potências e relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo, conforme Equação 11.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k.t^n$$

Equação 11

Na qual:

Mt: Quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo t
M∞: Quantidade total de fármaco liberado no tempo infinito
K: Constante cinética
n: Expoente de liberação

Neste modelo, faz-se a análise do valor do expoente *n* da equação que caracteriza os diferentes comportamentos de liberação. Valores de *n* igual a 0,5 tem-se difusão Fickiana (Caso I, no qual ocorre difusão do solvente através da rede polimérica, seguida da difusão do fármaco para o meio), valores de *n* entre 0,5 e 1 expressam um modelo não Fickiano caracterizado por um mecanismo de transporte anômalo (associação de diferentes mecanismos de liberação), para *n*=1 indica transporte de Caso II e *n* maior que 1 expressa transporte de Caso II (KORSMEYER & PEPPAS, 1981; RITGER & PEPPAS, 1987; SIEPMANN & PEPPAS, 2000; COSTA & LOBO, 2001; MANADAS, PINA, VEIGA, 2002).

Para o sistema F27_CUR1% tem *n* maior que 1, o que indica modelo de super transporte de Caso II.

Corbo (1994), descreve um trabalho com um sistema semi-sólido e um fármaco lipofílico e descreve também baixas quantidades de fármaco liberadas, assim como neste trabalho. A liberação intrínseca do fármaco é dificultada por estar completamente dissolvido no sistema semi-sólido. O autor relata a dificuldade de trabalhar com compostos extremamente hidrofóbicos e, os meios receptores mais apropriados, muitas vezes não podem aumentar a interação da formulação com o meio receptor. Uma alternativa para essas limitações seriam o uso de outros aparatos, como o cilindro rotativo invertido. Com o uso do cilindro rotativo invertido, por exemplo, há um maior efeito da interface das formulações com o meio receptor, aumento a taxa de liberação do

fármaco. No caso deste trabalho uma outra opção seria avaliar a liberação *in vitro* por pelo menos 24 horas.

6.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

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

A Tabela 30 apresenta os resultados da CIM e CFM obtidos na avaliação da atividade antifúngica da curcumina, utilizando diferentes espécies de *Candida* e diferentes isolados clínicos de *Candida albicans*.

Tabela 30. CIM da curcumina sobre diferentes cepas de *Candida sp.*

Microrganismos	CIM*	CFM*	CIM* Controle positivo
C. albicans ATCC 10231	1000	-	62,5
C. albicans isolado clínico 11763	-	-	0,97
C. albicans isolado clínico 1083	-	-	0,97
C. albicans isolado clínico 1203	1000	-	0,97
C. albicans isolado clínico 1417	1000	-	0,97
C. albicans isolado clínico 1252	1000	-	0,97
C. glabrata ATCC 2001	125	-	1,95
C. krusei ATCC 34135	500	-	0,97

*Valores em µg/mL. (-) > 1000 µg/mL. Controle positivo: cetoconazol.

De acordo com a Tabela 30, os resultados da CIM para a atividade antifúngica mostram que a curcumina apresentou melhores resultados contra as espécies *Candida glabrata* e *Candida krusei*, em relação à *Candida albicans* e seus isolados clínicos, com valores de CIM de 125 µg/mL e 500 µg/mL respectivamente.

O antifúngico cetoconazol apresentou resultados satisfatórios para todas as espécies testadas, conforme esperado, pois é um antifúngico potente, utilizado por via tópica, é um dos fármacos citado como referência pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* e utilizado como controle positivo em muitos estudos (CLSI, 2008).

Os resultados de CFM mostraram que a curcumina não apresenta efeitos fungicida frente à nenhuma espécie de *Candida sp*, dentro do range de curcumina testado.

Os resultados de CIM obtidos neste estudo foram maiores comparados à alguns estudos já realizados, neste estudo, a curcumina apresentou atividade antifúngica contra as cepas de *Candida albicans* com valores de CIM maiores ou iguais a 1000 μg/mL (ÇIKRIKÇI, MOZIOGLU, YILMAZ, 2008; MARTINS et al., 2009; NEELOFAR et al., 2011; MOGHADAMTOUSI, 2014).

De acordo com o valor obtido de CIM de 1000 μg/mL para a cepa *Candida albicans* ATCC 10231, foram estabelecidas as doses utilizadas neste estudo. A dose estabelecida foi de 0,1%, pois quando administrado no animal a partir de um volume de 100 μL (equivalente a 100 mg da formulação), é possível chegar na concentração de 1000 μg/mL. Este valor foi escolhido como a dose intermediária e a partir dela, foram escolhidas as doses de 0,01% e 1,0%, considerando que antifúngicos de aplicação tópica são dose dependentes, é necessária a administração de doses acima da CIM para observar o efeito antifúngico (ANDES, 2003; MÜLLER et al., 2013). Por outro lado, quando administrado por via intravaginal, a formulação pode o favorecer o contato do princípio ativo com a mucosa infectada, o que pode fazer com que doses menores que a CIM tenha efetividade.

6.6.2 Avaliação da atividade antifúngica sobre a membrana celular: ensaio de ligação da curcumina ao ergosterol exógeno

Os resultados da avaliação da ação da curcumina sobre o ergosterol apresentam-se na Tabela 31.

Tabela 31. Atividade antifúngica da curcumina contra *C. albicans* ATCC 10231 com e sem a presença de ergosterol exógeno.

Princípio ativo	CIM com ergosterol exógeno*	CIM sem ergosterol exógeno*
Curcumina	2000	1000
Nistatina	31,25	3,9

*Valores em μg/mL.

Os resultados da Tabela 31 sugerem que a curcumina apresenta mecanismo de ação sobre o ergosterol da membrana celular da *Candida albicans*, assim como a nistatina. O ergosterol é um componente da membrana fúngica; quando incorporado ao meio, o fármaco pode ligar-se ao ergosterol exógeno e ao ergosterol de membrana da *Candida albicans*, aumentando o valor da CIM, sugerindo um possível mecanismo de ação.

De acordo com Sharma et al. (2009), os mecanismos relatados de ação da curcumina também incluem geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), defeitos na via de biossíntese do ergosterol e diminuição do desenvolvimento de hifas (SHARMA et al., 2010).

Quando um princípio ativo se liga-se ao ergosterol exógeno, pode ocorrer redução da eficácia do antifúngico, dessa forma, é necessário usar concentração mais elevada do princípio ativo para inibir o crescimento da levedura em relação à CIM sem a adição exógena de ergosterol. Conforme Tabela 31, a nistatina, cujo mecanismo de ação é de ligação ao ergosterol que compõe a membrana fúngica, foi utilizada como controle positivo neste experimento e teve seu valor de CIM elevado em aproximadamente 10 vezes; a CIM da curcumina frente a *Candida albicans* aumentou somente 2 vezes após a adição do ergosterol exógeno, mesmo com essa pequena alteração, sugere-se que houve sua ligação ao ergosterol, sendo este um possível mecanismos de ação.

A curcumina pode ligar-se à outros esteróis da membrana de modo não significativo pois o ergosterol é o principal esterol das membranas das células fúngicas e o fato de estar presente somente nos fungos e não nas células do hospedeiro, garantem a especificidade deste teste.

6.7 ENSAIOS EXPERIMENTAIS DE CVV *IN VIVO* E TRATAMENTOS

6.7.1 Avaliação da atividade anti-CVV dos sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1%

A Tabela 32 descreve a evolução do número de animais infectados no 1°, 3° e 6° dia de tratamento.

Tabela 32. Número de animais infectados nos diferentes dias de tratamento com os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1% e seus respectivos controles.

Tratamentos	**Animais infectados**		
	1º DIA	**3º DIA**	**6º DIA**
	N/n* (%)	N/n (%)	N/n (%)
Sem tratamento	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)
Nistatina	6/6 (100)	3/6 (50)	3/6 (50)
Clotrimazol	6/6 (100)	3/6 (50)	0/6 (0)
C	6/6 (100)	4/6 (66,6)	4/6 (66,6)
C_CUR0,01%	6/6 (100)	5/6 (83,3)	1/6 (16,6)
C_CUR0,1%	6/6 (100)	3/6 (50)	1/6 (16,6)
C_CUR1%	6/6 (100)	3/6 (50)	1/6 (16,6)

*N: número de animais infectados; n: número total de animais por grupo.

O grupo de animais infectados e sem tratamento manteve a infecção até o fim do experimento. No grupo controle positivo, animais tratados com nistatina, metade dos animais permaneceram infectados após a segunda lavagem, o que não se alterou deste ponto em diante. No grupo controle positivo tratado com clotrimazol, foi observado diminuição progressiva do número de animais infectados, com verificação de cura da infecção em todos os animais após a 3ª lavagem (6° dia de tratamento). No grupo controle negativo (sistema C), 4 animais permaneceram infectados no último dia do experimento. Nos outros três grupos tratados com os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1%, houve redução progressiva do número de animais infectados. Ao final do tratamento houve apenas um animal infectado em cada um desses grupos.

Quanto à carga fúngica obtida dos fluidos vaginais dos animais ao longo do tratamento, os resultados encontram-se na Tabela 33.

Tabela 33. Quantificação da carga fúngica nos fluidos vaginais dos animais tratados com os sistemas C, C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1% e seus respectivos controles.

Tratamento	1º DIA[a]	3º DIA[a]	6º DIA[a]	Redução da carga fúngica (%)
Sem tratamento	5,03 ± 2,52	2,82 ± 0,45	3,55 ± 0,39[c]	29,42
Nistatina	5,54 ± 2,16	2,44 ± 1,85	2,28 ± 0,19[b]	58,84
Clotrimazol	2,88 ± 0,59	0,71 ± 0,66	0,00 ± 0,00[b]	100
C	3,09 ± 0,61	2,54 ± 0,79	2,31 ± 1,39[c]	25,24
C_CUR0,01%	2,89 ± 0,14	1,17 ± 0,91	0,43 ± 1,04[b]	85,12[d]
C_CUR0,1%	2,41 ± 0,14	0,87 ± 0,75	0,40 ± 0,97[b]	83,40[d]
C_CUR1%	2,41 ± 0,18	1,30 ± 0,00	0,25 ± 0,61[b]	89,63[d]

[a] Log UFC/mL ± Desvio Padrão. [b] diferença estatisticamente significativa em relação ao 1º DIA ($p<0,05$); [c] não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao 1º DIA ($p<0,05$); [d] não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$).

De acordo com a Tabela 33, no sexto dia de tratamento não foi observada redução estatisticamente significativa das cargas fúngicas nos grupos infectados não tratado e no controle negativo (tratado com a formulação sem princípio ativo). Os animais tratados com nistatina e clotrimazol apresentaram redução progressiva dos valores, chegando à redução total da carga fúngica no grupo tratado com clotrimazol. Os animais tratados com as três diferentes concentrações de curcumina apresentaram redução estatisticamente significativa ao final do tratamento, quando comparados aos valores obtidos no primeiro dia de tratamento.

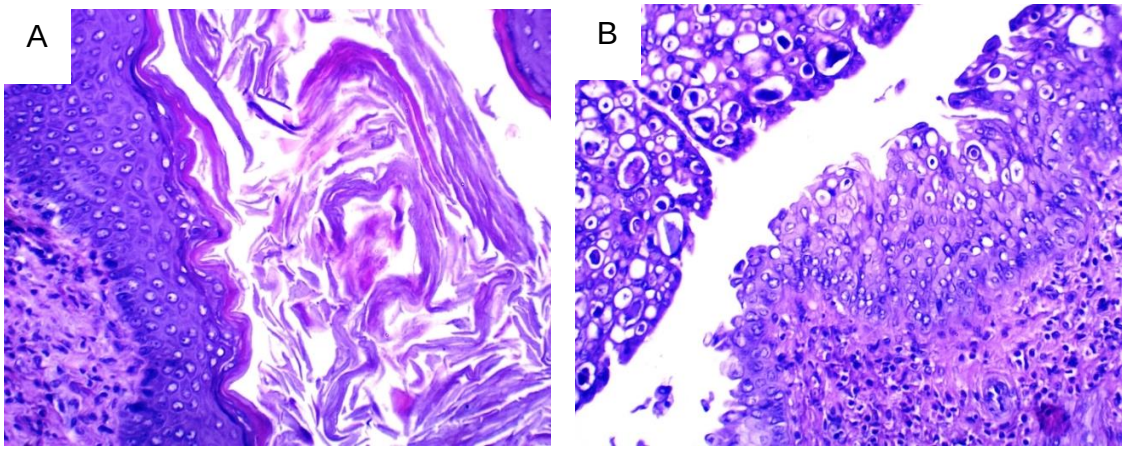
Os resultados mostram ligeira redução da carga fúngica nos grupos infectados e sem tratamento e controle negativo, após o sexto dia de tratamento, sendo os valores de 29,42% e 25,24% respectivamente, no entanto, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao primeiro dia de tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa na redução da carga fúngica entre os três grupos tratados com os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1%.

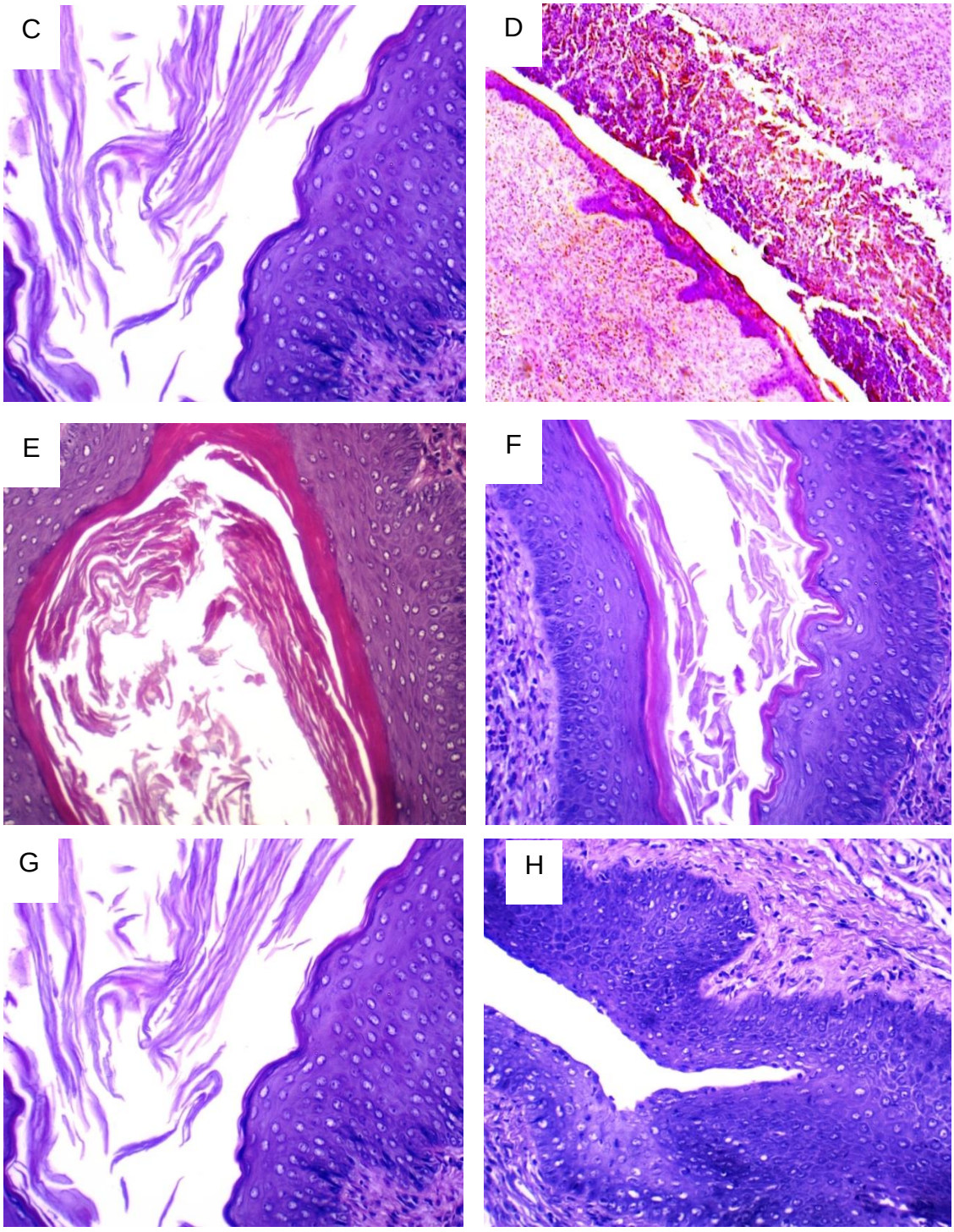
A análise histológica, teve como objetivo verificar a redução do infiltrado inflamatório causado pela infecção. Nos resultados apresentados na Figura 57, podemos observar que o grupo de animais infectados e sem tratamento **(A)** mostra o epitélio estratificado pavimentoso (EEP) com células íntegras, com

presença de camada bem espessa do estrato córneo na luz do canal vaginal. No grupo controle da formulação (sistema C - sem curcumina) **(B)** observa-se o EEP com células tumefeitas e ausência de estrato córneo no canal vaginal.

No do grupo tratado com nistatina **(C)** o EEP mostra células íntegras e com presença de camada do estrato córneo no canal vaginal. O grupo **(D)** (clotrimazol) mostra significativa redução do processo inflamatório e discreta presença de estrato córneo na luz do canal. Nos animais tratados com os sistemas C_CUR0,01% e C_CUR0,1% **(E e F)** observa-se o EEP com células íntegras e com presença de camada bem espessa do estrato córneo na luz do canal vaginal, enquanto que nos animais tratados com o sistema C_CUR1% **(G)** o EEP apresenta-se com células tumefeitas com acúmulo intracelular de substância e com ausência de estrato córneo no canal. Os animais sem infecção **(H)** apresentaram o epitélio de aspecto normal e mucosa sem sinais de inflamação.

Figura 57. Secção do epitélio vaginal de ratas submetidas aos tratamentos com os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1%, C_CUR1% e seus respectivos controles (aumento 100x). A: grupo infectados e sem tratamento; B: grupo controle (sistema sem curcumina); C: controle positivo (nistatina); D: controle positivo (clotrimazol); E: C_CUR0,01%; F: C_CUR0,1%; G: C_CUR1%; H: grupo sem infecção.





De acordo com a Tabela 33 e Figura 57, após o estabelecimento da infeção, o tratamento realizado com os sistemas contendo curcumina foi capaz de reduzir progressivamente a carga fúngica ao longo dos dias de experimento. Nos três grupos de animais que receberam as diferentes concentrações de curcumina, a redução da carga fúngica foi estatisticamente significativa. Mesmo a menor concentração de curcumina (0,01%) foi eficaz na redução da infecção.

A análise histopatológica mostrou mucosa normal nos animais não infectados e, em todos os tratamentos, foi possível observar a presença, na mucosa vaginal, de intenso infiltrado inflamatório localizado logo abaixo do epitélio (lâmina própria). Apesar do tratamento com os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1% apresentarem resultado de redução de carga fúngica semelhantes, eles não foram capazes de reduzir totalmente os sinais de inflamação. No entanto, no grupo tratado com C_CUR1% observa-se redução do infiltrado inflamatório quando comparado aos grupos tratados com C_CUR0,01% e C_CUR0,1%. Nos animais tratados com clotrimazol observou-se mudanças regenerativas associadas à restauração da mucosa vaginal.

6.7.2 Avaliação da atividade anti-CVV dos sistemas F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1%

A Tabela 34 descreve a evolução do número de animais infectados no 1°, 3° e 6° dia de tratamento.

Tabela 34. Número de animais infectados nos diferentes dias de tratamento com os sistemas F27, F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1% e seus respectivos controles.

Tratamentos	**Animais infectados**		
	1º DIA	**3º DIA**	**6º DIA**
	N/n*	N/n*	N/n*
Sem tratamento	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)
Clotrimazol	6/6 (100)	5/6 (83,3)	0/6 (0)
F27	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)
F27_CUR0,01%	6/6 (100)	6/6 (100)	5/6 (83,3)
F27_CUR0,1%	6/6 (100)	5/6 (83,3)	2/6 (33,3)
F27_CUR1%	6/6 (100)	5/6 (83,3)	0/6 (0)

*N: número de animais infectados / n: número total de animais por grupo.

De acordo com a Tabela 34, o grupo de animais infectados e sem tratamento manteve a infecção até o fim do experimento. No grupo controle positivo, animais tratados com clotrimazol, foi observado diminuição progressiva do número de animais infectados, com verificação de cura da

infecção em todos os animais após a 3ª lavagem (6° dia de tratamento). No grupo controle negativo (sistema F27), todos os animais mantiveram a infecção até o fim do experimento. Nos três grupos tratados com os sistemas F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1%, houve redução progressiva do número de animais infectados ao final do tratamento, sendo que no grupo tratado com F27_CUR1%, foi verificada a cura da infecção em todos os animais após a 3ª lavagem (6° dia de tratamento).

Quanto à carga fúngica obtida dos fluidos vaginais dos animais ao longo do tratamento, os resultados encontram-se na Tabela 35.

Tabela 35. Quantificação da carga fúngica nos fluidos vaginais dos animais tratados com os sistemas F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1% e seus respectivos controles.

Tratamento	1º DIA[a]	3º DIA[a]	6º DIA[a]	Redução da carga fúngica (%)
Sem tratamento	4,22 ± 0,36	4,08 ± 0,70	3,85 ± 0,29	8,77
Clotrimazol	4,36 ± 0,58	2,09 ± 0,64	0,00 ± 0,00 *	100
F27	4,46 ± 0,07	4,12 ± 0,20	4,13 ± 0,14	7,40
F27_CUR0,01%	4,28 ± 0,81	2,60 ± 0,47	1,74 ± 0,18 *	59,46[b]
F27_CUR0,1%	4,43 ± 0,36	2,64 ± 1,49	0,91 ± 0,08 *	79,46[b]
F27_CUR1%	4,90 ± 0,39	2,48 ± 1,44	0,00 ± 0,00 *	100[b]

[a] Log UFC/mL ± Desvio Padrão. * Diferença estatisticamente significativa comparados aos valores obtidos no 1º DIA (p<0.05); [b] Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$).

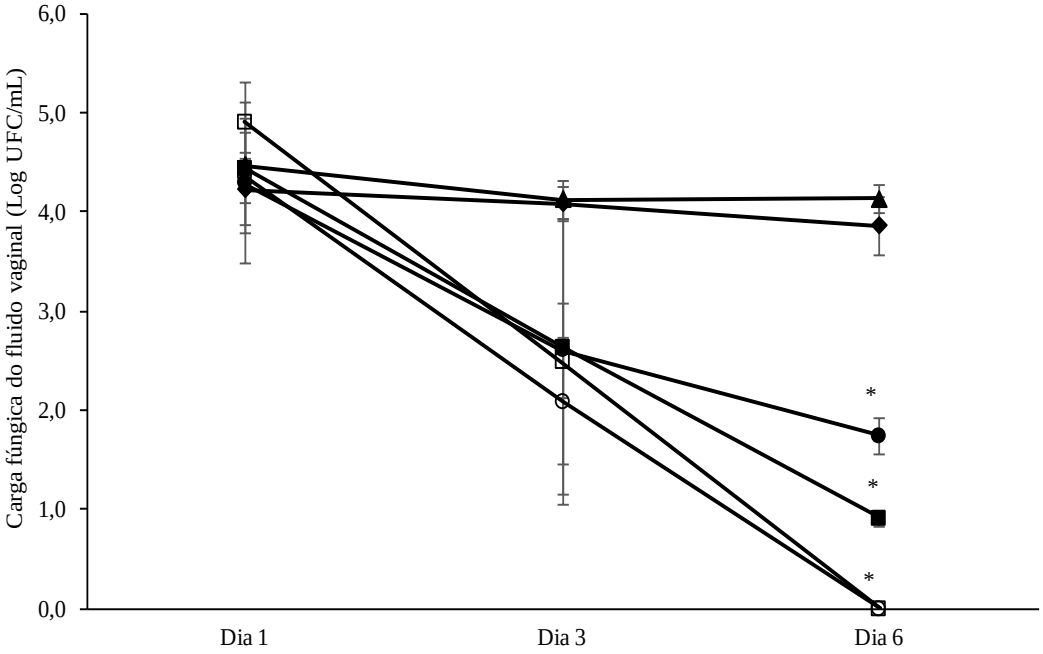
De acordo com a Tabela 35, no sexto dia de tratamento não foi observada redução significativa da carga fúngica nos grupos infectados e sem tratamento e no controle negativo (tratado com a formulação sem princípio ativo). Os animais tratados com clotrimazol apresentaram redução progressiva dos valores, chegando à redução total da carga fúngica. Os animais tratados com os sistemas nas três diferentes concentrações de curcumina apresentaram redução estatisticamente significativa ao final do tratamento, quando comparados aos valores obtidos no primeiro dia de tratamento, sendo que ao final do tratamento, o sistema F27_CUR1% apresentou redução total da carga fúngica como o clotrimazol. Houve diferença estatisticamente significativa na redução da carga fúngica dos quatro grupos tratados com os sistemas

F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1%, F27_CUR1% e clotrimazol em relação ao 1º dia de tratamento.

Houve diferença estatisticamente significativa na redução da carga fúngica entre os três grupos tratados com os sistemas F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1%, F27_CUR1%.

Todos os resultados da Tabela 35 estão apresentados graficamente na Figura 58.

Figura 58. Efeito dos sistemas F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1% na carga fúngica vaginal de ratas infectadas com *Candida albicans* e seus respectivos controles. Infectados e sem tratamento (losango preenchido), F27 (triângulo preenchido), controle positivo clotrimazol (círculo). Dose 1: F27_CUR0,01% (círculo preenchido), Dose 2: F27_CUR0,1% (quadrado preenchido), Dose 3: F27_CUR1% (quadrado). Dados estão expressos como media ± desvio padrão (n=6). *Diferença estatisticamente significativa comparados aos valores obtidos no dia 1 (p<0.05).



É importante ressaltar que o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de sistemas para aplicação tópica intravaginal, proporcionando o contato do principio ativo com a mucosa vaginal (efeito local), sem que tenha absorção do princípio ativo, por isso foi utilizado o clotrimazol como controle positivo nos ensaios *in vivo*, pois este é o fármaco de escolha para aplicação intravaginal no tratamento da CVV.

A presença dos grupos controles fortalece a confiabilidade dos resultados com a curcumina, tornando pouco provável a ocorrência de resultados falso-

positivos. As ratas infectadas e não tratadas, ao serem comparadas às infectadas e tratadas com algum medicamento, apresentaram redução pequena de sua carga fúngica, observação possivelmente atribuída aos seus mecanismos naturais de respostas imunológicas que, sozinhos, não foram capazes de curar a infecção. Esta é, também, a principal hipótese para a redução não significativa da carga fúngica nos animais que receberam apenas o sistema sem curcumina.

Os dados coletados a partir do grupo de ratas que receberam apenas o sistema sem curcumina reafirmam o objetivo da sua inclusão no estudo: esclarecer se a atividade sobre *Candida albicans* pode ter sido devida à ação de componentes do creme, e não somente à curcumina. A redução não significativa de carga fúngica obtida, bem como a menor porcentagem alcançada em relação aos animais que não receberam nenhum tratamento, apoiam a hipótese de que o sucesso do tratamento deve-se realmente à atividade da curcumina.

O uso dos controles positivos foi importante para a comparação entre os resultados por eles promovidos com os resultados obtidos com a curcumina, e também reside no fato serem opções terapêuticas recomendadas para o tratamento de CVV que possuem mecanismos de ação diferentes. Embora ambos atuem promovendo desestabilização da membrana celular, a nistatina age ligando-se às moléculas de ergosterol e provocando o rompimento da estabilidade da membrana fúngica. O clotrimazol atua inibindo a enzima 14α-esterol desmetilase, o que leva ao acumulo de 14α-metil esteróis que, por sua vez, rompem as cadeias fosfolipídicas e levam à degradação da membrana e morte celular.

O grupo de ratas infectadas e tratadas com clotrimazol obteve redução total da sua carga fúngica, conforme esperado, pois o clotrimazol é um dos fármacos de primeira escolha para tratamento clínico da CVV. A nistatina, no entanto, não proporcionou, no experimento, o efeito esperado, e acredita-se que isso tenha ocorrido devido ao seu uso por tempo menor do que o preconizado por protocolos de tratamento clínico, que é cerca de 14 dias.

Estes resultados comprovam o potencial antifúngico da curcumina *in vivo*. Os resultados também sugerem que os sistemas desenvolvidos conferem maior estabilidade química à curcumina e permitem seu contato mais

prolongado com a mucosa vaginal, aumentando a eficácia do tratamento, o que foi comprovado nos ensaios de mucoadesão *in vitro*, nos quais os resultados obtidos mostram que os sistemas possuem propriedades mucoadesivas e podem assim, aumentar a eficácia terapêutica.

Entre os sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1%, não houve diferença estatisticamente significativa na redução da carga fúngica em relação ao 1º dia de tratamento, no entanto, os sistemas F27_CUR0,01%, F27_CUR0,1% e F27_CUR1% apresentaram diferença estatisticamente significativa na redução da carga fúngica em relação ao 1º dia de tratamento, mostrando que quanto maior a concentração de curcumina, maior foi o efeito na redução da carga fúngica.

O sistema F27_CUR1% apresentou redução total da carga fúngica, apresentando resultados iguais ao controle positivo (clotrimazol). Este resultado foi confirmado pelo ensaio de liberação *in vitro*, no qual o sistema F27_CUR1% liberou maior quantidade de curcumina do que C_CUR1%.

Além disso, de acordo com os dados obtidos nos testes reológicos contínuos, esta formulação também possui propriedades anti-tixotrópicas, o que podem aumentar a mucoadesão da formulação na mucosa vaginal devido ao aumento da viscosidade do sistema no interior do ambiente vaginal e aumentar a eficácia terapêutica.

As porcentagens de redução das cargas fúgicas mesmo nos grupos tratados com formulações contendo curcumina abaixo da CIM (concentração de 0,01%) sugerem que as formulações aumetaram a eficácia do tratamento, provavelmente devido à uma somatória das vantagens dos sistemas desenvolvidos.

Outro aspecto importante está relacionado ao esquema terapêutico proposto no experimento, que consiste em uma única aplicação diária, durante um período de 6 dias e se utilizado na prática clínica poderá proporcior à paciente maior conforto e maior chance de adesão ao tratamento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagrama de fases paseudoternário, composto por triglicerídeo cáprico/caprílico (FO), tampão acetato de sódio pH 4,5 (FA) e fosfatidilcolina de soja e macrogolglicerol ricinolato, proporção 50:50 (T), apresentou regiões formadas por SLT, SLO, SVT, SVO e SF.

Para a incorporação do princípio ativo curcumina, foi escolhido o sistema composto por 30% de fase oleosa (triglicerídeo cáprico/caprílico), 20% de fase aquosa (tampão acetato de sódio pH 4,5) e 50% de tensoativo/co-tensoativo (fosfatidilcolina de soja e macrogolglicerol ricinolato, proporção 50:50); além disso, a curcumina também foi incorporada em uma emulsão. Estes dois sistemas apresentaram viscosidades adequadas para aplicação intravaginal e foram escolhidos para a incorporação do fármaco e para análise estrutural, estudo de estabilidade, estudos de liberação *in vitro* e ensaios *in vivo.*

De acordo com a microscopia de luz polarizada, difração de raios-X e espalhamento de raios-X à baixo ângulo, não se pode dizer que o sistema emulsionado é uma emulsão propriamente dita, pois é constituído por mesofases lamelares e cristais propriamente ditos, apresentando dessa forma um certo grau de organização. No sistema pseudoternário também foi observado a organização do sistema constituído por cristais juntamente com mesofase lamelar.

Os estudos reológicos mostram que o sistema F27_CUR1% é menos elástico que o C_CUR1%, provavelmente o F27_CUR1% tenha uma rede estrutural menos rígida, apesar dos dois sistemas apresentarem mesofases lamelares. É importante ressaltar que os comportamentos tixotrópicos e anti-tixotrópicos dos sistemas são vantajosos para aplicação intravaginal e possuem fundamental importância no desempenho e eficácia das formulações no tratamento da candidíase vulvovaginal (CVV). O sistema emulsionado e o sistema pseudoternário apresentaram propriedades mucoadesivas, que favorece a permanência da formulação no local de ação aumentando o contato da mucosa vaginal com o princípio ativo, o que aumenta a eficácia terapêutica.

O estudo de estabilidade preliminar, foi importante para avaliar os aspectos físicos e o teor de curcumina das amostras submetidas às condições extremas de temperatura. As duas formulações mostraram-se estáveis pois não houve alterações no aspecto físico macroscópico, no pH e no teor de curcumina. Algumas mudanças foram observadas na microscopia de luz

polarizada, mas foram insignificantes. Nas análises reológicas, o sistema C_CUR1% manteve os valores de viscosidades aparente mínima até o final do estudo e também manteve suas características de fuidos não-newtonianos, pseudoplásticos e tixotrópricos. No sistema F27_CUR1% houve diminuição significativa nos valores de viscosidade aparente mínima, no entanto, as características de fuidos não-newtonianos, pseudoplásticos, e anti-tixotrópicos permaneceram até o final do estudo.

O método analítico proposto para quantificação da curcumina por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se adequado, obtendo-se valores satisfatórios em todos os parâmetros da validação de metodologia analítica.

Os estudos de liberação *in vitro* tiveram como objetivo avaliar o desempenho das formulações para isso, foi escolhido o meio receptor composto por tampão acetato de sódio (0,01*M*) pH 4,5 com Procetyl® (5%) e etanol (30%). Essa composição não é a mais adequada, mas foi necessária para garantir a estabilidade e solubilidade do fármaco e dessa forma, avaliar a liberação da curcumina garantindo as condições *sink*. A limitação causada pela hidrofobicidade da curcumina dificultou a análise do perfil de liberação.

O sistema F27_CUR1% apresentou maior taxa de liberação em relação ao sistema C_CUR1%, com valores de 0,78% e 0,48% respectivamente, isso mostra que os sistemas pseudoternários aumentam a solubilidade de fármacos lipifílicos aumentando assim a liberação dos mesmos. Além disso, de acordo com os testes reológicos oscilatório, esta formulação possui característica menos elástica do que C_CUR1%, facilitando a liberação do fármaco a partir da matriz. As taxas de liberação foram baixas e os ensaios *in vivo* ajudaram a avaliar se, mesmo em baixas quantidades, a curumina teria o efeito terapêutico desejado.

Nos ensaios *in vivo* foram encontrados resultados muito satisfatórios. O sistema F27_CUR1% apresentou redução total da carga fúngica como o clotrimazol, fármaco de escolha para aplicação tópica utilizado no tatamento da CVV. Além disso, as propriedades mucoadesivas dos sistemas podem ter contribuído para a eficácia terapêutica.

Para complementar os resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, foi feita a análise histopatológica dos sistemas C_CUR0,01%, C_CUR0,1% e C_CUR1%.

Os resultados mostraram que apesar da redução da carga fúngica, estes sistemas não foram capazes de reduzir totalmente os sinais da inflamação. No entanto, no grupo tratado com C_CUR1% observou-se uma redução do infiltrado inflamatório.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que, os dois sistemas, emulsionado e pseudoternário desenvolvidos, foram eficazes no tratamento da candidíase vulvoginal causada por *Candida albicans*. Apesar da baixa taxa de liberação da curcumina a partir das formulações, nos ensaios *in vivo* houve redução estatisticamente significativa das cargas fúngicas.

Os sistemas estudados, organizados em estruturas lamelares e cristalinas, possuem propriedades reológicas e mucoadesivas satisfatórias para aplicação intravaginal e foram aprovados no estudo de estabilidade preliminar, atingindo o objetivo deste trabalho.

É importante a continuidade deste projeto de pesquisa, para confirmação da não toxicidade das formulações desenvolvidas, estudos de citotoxicidade, avaliação da ligação da curcumina aos outros componentes da membrana fúngica, estudo de permeação *in vitro*, avaliar outros possíveis mecanismos de ação da curcumina, realizar estudos clínicos e reavaliar a liberação *in vitro* da curcumina a partir das formulações por um tempo maior.

REFERÊNCIAS

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. Candida infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 23, p. 253 - 273, 2010.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, 1995.

ANDES, D. Clinical pharmacodynamics of antifungals. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, p. 635-649, 2003.

ANGEBAULT, C.; DJOSSOU, F.; ABÉLANET, S.; PERMAL, E.; SOLTANA, M. B.; DIANCOURT, L.; BOUCHIER, C.; WOERTHER, P. L.; CATZEFLIS, F.; ANDREMONT, A.; D'ENFERT, C.; BOUGNOUX, M. E. *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi Amerindians. **Journal of Infectious Diseases,** v. 208, n. 10, p. 1705-1716, 2013.

ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação Cutânea *in vitro* como Ferramenta Auxiliar para o Estudo de Formulações Semi-sólidas de Cetoconazol para Aplicações Tópicas.** 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ALSHEHRI, S. M.; NAUSHAD, M.; AHAMAD, T.; ALOTHMAN, Z. A,; ALDALBAHI, A. Synthesis, characterization of curcumin based ecofriendly antimicrobial bio-adsorbent for the removal of phenol from aqueous médium. **Chemical Engineering Journal**, v. 254, p. 181 - 189, 2014.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, n. 43, p. 319 - 327, 2007.

ANDRADE, A. O.; PARENTE, M. E.; ARES, G. Screening of ucoadhesive vaginal gel formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 931-941, 2014.

ANSARI, M. J.; AHMAD, S.; KOHLI, K.; ALI, J.; KHAR, R. K. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 39 p. 132 - 138, 2005.

ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of Candida Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 62-75, 2017.

ARAÚJO, M. G. F.; PACÍFICO, M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ICELY, P. A.; MIRÓ, M. S.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E. Evaluation of Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, n. 7, p. 673–682, 2013.

ASHRAFL, K.; MUJEEB, M.; AHMAD, A.; AMIR, M.; MALLICK, M. N.; SHARMA, D. Validated HPTLC analysis method for quantification of variability in content of curcumin in Curcuma longa L (turmeric) collected from different geographical region of India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S584-S588, 2012.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2° ed., Porto Alegre: Artmed, p.677, p.115, 2005.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARNES, H. A. Thixotropy a review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 70, p. 1-33, 1997.

BEAUCAGE, G. *et al.* Multiple size scale structures in silica-siloxane composites studied by small-angle scattering. **American Chemical Society Symposia Proceedings**, v. 585, p. 97-111, 1995.

BECHTOLD, I. H. Cristais-líquidos: Um sistema complexo de simples aplicação. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 27, n. 3, p. 333 - 342, (2005).

BENEDETTI, V. P.; FORNARI, G.; SHERVINSK, N. R. Avaliação da susceptibilidade a antifúngicos de diferentes espécies de leveduras Candida isoladas de mucosa bucal e pele. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, p. 93 - 95, 2011.

BHAGYASHREE, V.; ROHIT, K.; SHRINIWAS, P. Formulation and evaluation of cream containing curcumin and lycopene for the antioxidante and antibacterial activity. European jornal of pharmaceutical and medical research, v. 4, n. 5, p. 394-399, 2017.

B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2 ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Disponíel em www.eurachem.org.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Comissão da Farmacopeia Brasileira. Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira. 2ª edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 175, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 899, de 29/05/2003. **Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da União. Brasília, 02/06/2003, seção 1 (a).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Resolução – RE no. 1, de 29 de julho de 2005, **Guia para a realização de estudos de estabilidade**, D.O.U-Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 01 de agosto de 2005.

BRONAUGH, R. L.; STEWART, R. F. Methods for *In Vitro* Percutaneous Absorption: Studies III: hydrophobic compouds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 9, 1984.

BRONAUGH, R. L.; STEWART, R. F. Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies IV: the Flow-Through Diffusion Cell. **Journal of pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 1, 1985.

CALIXTO, G.M.F. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do *Streptococcus mutans*,** 2013. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo –

Brasil). p.105 2013.

CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J. P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 55, n. 3, p. 323-328, 2003.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.

CAO, Y.; XU, R. X.; LIU, Z. A high-throughput quantification method of curcuminoids and curcumin metabolites in human plasma via high-performanceliquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, n. 949 - 950, p. 70 - 78, 2014.

CARR, K. R.; IOFFE, Y. J.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P.; CHAN, P. J. Combined ultrasound-curcumin treatment of human cervical cancer cells. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 193, p. 96-101, 2015.

CARVALHO, D. M.; TAKEUCHI, K. P.; GERALDINE, R. M.; MOURA, C. J.; TORRES, M. C. L. Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 115-119, 2015.

CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina**, 2009. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil). p. 143, 2009.

CARVALHO, F. C.; BARBI, M. S.; SARMENTO, V. H.; CHIAVACCI, L. A.; NETTO, F. M.; GREMIÃO, M. P. D. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 430–439, 2010a.

CARVALHO, C. F; BRUSCHI, M.L; EVANGELISTA, R.C; GREMIÃO, M.P.D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** vol. 46, n.1, p. 17, 2010b.

CARVALHO, F. C.; CALIXTO, G.; HATAKEYAMA, I. N.; LUZ, G. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy Journal**, v. 39, n. 11, p. 1750–1757, 2013.

CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G.; GREMIAO, M. P. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 84, n. 1, p. 219-227, 2013.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio (muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros**, v. 24, n. 2, p. 203-213, 2014.

CARVALHO, F. C.; ROCHA E SILVA, H.; LUZ, G. M.; BARBI, M. D. A.; LANDGRAF, D. S.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H.; DREMIÃO, M. P. D. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactantcontaining systems designed as a

potential platform for topical drug delivery. **Journal of biomedical nanotechnology,** v. 8, n. 2, 2012.

CARVALHO, F. C.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; BARBI, M. S.; GREMIÃO, M. P. D. Development and in vitro evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 99, n. 5, p. 2367-2374, 2010c.

CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 255-263, 2005.

CHANG, C. M.; BODMEIER, R. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 173, p. 51–60, 1998.

CHEN, W.; FAN-HAVARD, P.; YEE, L. D.; CAO, Y.; STONER, G. D.; CHAN, K. K.; LIU, Z. A liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for quantification of curcumin-O-glucuronide and curcumin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, n. 900, p. 89– 93, 2012.

CHO, J. W.; PARK, K.; KWEON, G. R.; JANG, B. C.; BAEK, W. K.; SUH, M. H.; KIM, C, W.; LEE, K. S.; SUH, S. I. Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 37, p. 186 - 192, 2005.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Fármacia**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CHORILLI, M.; PRESTES, P. S.; RIGON, R. B.; LEONARDI, G. R.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.

ÇIKRIKÇI, S.; MOZIOĞLU, E.; YILMAZ, H. Biological Activity of Curcuminoids Isolated from Curcuma longa. **Records of Natural Products Journal**, v. 2, n. 1, p. 19-24, 2008.

CORBO, M.; PARTAK, R.; MARVEL, J.; SCHULTZ, S. N. G.; BUSKIRK, G. V. Utility of *in vitro* Release Testing Methods for Semi-solid Formulations in which the active is fully solubalized**. Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 10, 1994.

COSTA, P. J. C. Avaliação *in vitro* da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

CROSS, S.E; RUSSEL, M.; SOUTHWELL, I.; ROBERTS, M.S. Human skin penetration of the major components of Australian tee tree oil applied in it pure form and as a 20% solution *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic,** v. 69, p. 214 - 222, 2008.

CRUZ, D. J. O.; UCKUN, M. F. Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraceptio**n, v. 64, p. 113-123, 2001.

DALAZEN, D.; ZANROSSOI, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N. L.; FUENTEFRIA, A. M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de Candida spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 33 - 38; 2011.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Báscia e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DHAWAN, S.; PAL, A.; ANCHA, R.; BAWANKULE, D.U.; YADAV, N.P.; DAROKAR, M.P.; KHANUJA, S.P.S. Efficacy of CIM 1166, a combination of compounds derived from Mentha spp. in alleviating experimental vulvovaginal candidiasis in mice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 161-163, 2009.

DOLZ, M.; HERNANDEZ, M. J.; DELEGIDO, J. Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 421-427, 2008.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305 - 311, 2005.

ENGSTROM, S.; ENGSTROM, L. Phase behavior of the lidocaine-monoolein- water system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 79, p. 113–122, 1992.

ERICSSON, B.; ERIKSSON, P. O.; LOFROTH, J. E.; ENGSTROM, S. Polymeric drugs and drug delivery systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 22, p. 251–265, 1991.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 5ª edição, 2005.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. **Handkook of Microemulsion Science and Technology**, v .7, p.195-240, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba e copaíba.** 1998. 147p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

FEUERSCHUETTE, O. H. M.; SILVEIRA, S. K.; FEUERSCHUETTE, I.; CORRÊA, T.; GRANDO, L.; TREPAN, A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **Femina** (Rio de Janeiro), v. 38, n. 1, p. 31-36, 2010.

FICHA DE INFORMAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, CRODAMOL GTCC-LQ-(BR) (triglicerídeo cáprico/caprílico), Croda do Brasil, 2014a.

FICHA DE INFORMAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, CRODURET 50-SS-(BR) (macrogolclicerol ricinolato), Croda do Brasil, 2014b.

FIDEL, P. History and update on host defense against vaginal candidiasis. **The Journal of Immunology**, n. 57, p. 2 -12, 2007.

FIGUEIREDO NETO, A. M.; LEVELUT, A. M.; LIEBERT, L.; GALERNE, Y. Biaxial Nematic Lyomesophase Studied by X-Ray Diffraction. **Molecular Crystals and Liquid Crystals Journal**, v. 129, n. 1-3, p. 191-198, 1985.

FILHO, A. B. C.; SOUZA, R. J.; BRAZ, L. T.; TAVARES, M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, 2000.

FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals in *in vitro* performance tests. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, 2016.

FORMARIZ, T. P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorrubicina.** 2008. 228 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. S. A.; GREMIÃO; M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171 - 177, 2006.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25, p. 1-9, 2015.

GABBOUN, N. H.; NAJIB, N. M.; IBRAHIM, H. G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant sustems across rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, p. 73-80, 2001.

GADDIPATI, J. P.; SUNDAR, S. V.; CALEMINE, J.; SETH, P.; SIDHU, G. S.; MAHESHWARI, R. K. Differential regulation of cytokines and transcription factors in liver by curcumin following hemorrhage/resuscitation. **Shock**, v. 19, p. 150 - 156, 2003.

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 229 - 236, 2004.

GANTAIT, A.; BARMAN, T.; MUKHERJEE, P. K. Validated method for estimation of curcumin in turmeric powder. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 10, n. 2, p. 247-250, 2011.

GARCIA, C. C.; GERMANO, C.; OSTI, N. M.; CHORILLI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de melaleuca. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 236-240, 2009.

GASCO, M. R.; PATTARINO, F.; LATTANZI, F. Long-acting delivery systems for peptides: reduced plasma testosterone levels in male rats after a single injection. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 62, p. 119-123, 1990.

GATTOC, L.; FREW, P. M.; THOMAS, S. N.; EASLEY, K. A.; WARD, L.; CHOW, S. H. H.; URA, C. A.; FLOWERS, L. Phase I dose-escalation trial of intravaginal curcumin in women for cervical dysplasia. **Journal of Clinical Trials**, v. 9, p. 1–10, 2017.

GIRALDO, P.; NEUER, A.; FILHO-RIBEIRO, A.; LINHARES, I.; WITKIN, S. S. Detection of the Human 70-kD and 60-kD Heat Shock Proteins in the Vagina: Relation to Microbial Flora, Vaginal pH, and Method of Contraception. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 7, p. 23-25, 1999.

GRAS-Generally Recognized As Safe. **Food and Drug Administration**, 2013.

GUENNEC, R. L.; REYNES, J.; MALLIE, M.; PUJOL, C.; JANBON, F.; BASTIDE, J. M. Fluconazole- and Itraconazole-Resistant *Candida albicans* Strains from AIDS Patients: Multilocus Enzyme Electrophoresis Analysis and Antifungal Susceptibilities. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2732-2737, 1995.

GUIDANCE DOCUMENT FOR THE CONDUCT OF SKIN ABSORPTION STUDIES. OECD Environment Directorate, Environment, Health and Safety, França, 2004.

GUIDANCE FOR INDUSTRY: NONSTERILE SEMISOLID DOSAGE FORMS, SCALE-UP AND POSTAPPROVAL CHANGES: CHEMISTRY, MANUFACTURING, AND CONTROLS; *IN VITRO* RELEASE TESTING AND *IN VIVO* BIOEQUIVALENCE DOCUMENTATION (CDER). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 1997.

GUNES, H.; GULEN, D.; MUTLU, R.; GUMUS, A.; TAS, T.; TOPKAYA, A. E. Antibacterial effects of curcumin: An *in vitro* minimum inhibitory concentration study. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 2, p. 246-250, 2016.

HÄGERSTRÖM, H.; PAULSSON, M.; EDSMAN, K. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 301–309, 2000.

HASSAN, E. E.; GALLO, J. M. A Simple Rheological Method for the in Vitro Assessment of Mucin-Polymer Bioahesive Bond Strength. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 5, p. 491-495, 1990.

HOLANDA, A. A. R.; FERNANDES, A. C. S.; BEZERRA, C. M.; FERREIRA, M. A. F.; HOLANDA, M R. R.; HOLANDA, J. C. P.; MILAN, E. P. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, n. 29, p. 3 - 9, 2007.

HOLLAND, L. M.; SCHRODER, M. S.; TURNER, S. A.; TAFF, H.; ANDES, D.; GRÓZER, Z.; GÁCSER, A.; AMES, L., HAYNES, HIGGINS, D. G.; BUTLER. Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. **Plos Pathogens Journal,** v. 10, n. 9, p. 1-18, 2014.

HOLMQVIST, P. *et al.* Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer-Water-Oil Systems by Varying the Oil Type. **Macromolecules**. v. 30, p. 6788-6797, 1997.

HONG, L.; BOSE, J.; JU, J.; RYU, J. H.; CHEN, X.; SANG, S.; LEE, M. J.; YANG, C. S. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A (2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 1671 - 1679, 2004.

INDIAN PHARMACOPOEIA COMMISSION. **Indian pharmacopoeia**. 6th. ed. Ghaziabad, 2010. v.3, p. 2507 – 2508.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Quality guidelines: Pharmaceutical, Biologics, and Medical Device Guidance Documents. ICH Q 3B (R2): Impurities in New Drug Products. 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH), Topic Q1 A (R2) Stability Testing of new drugs substances and products. Note for Guidance on stability testing: stability testing of new drug substances and products (CPMP/ICH/2736/99), Agosto 2003.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 81- 96, 2008.

ISO/IEC 17025:2005. Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories. 2012.

IVARSSON, D.; WAHLGREN, M. Comparison of in vitro methods of measuring mucoadhesion: Ellipsometry, tensile strength and rheological measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 353– 359, 2012.

JADHAV, B. K.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R. Development and validation of improved reversed phase-HPLC method for simultaneous determination of curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin. **Cromatographia**, v. 65, p. 483-488, 2007.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M.; SAKARIAH, K. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3668-3672, 2002.

JIAO, H.; SHEN, W.; OHE, Y.; MIURA, K.; TAMURA, T.; SAIJO, N. A new 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay for testing macrophage cytotoxicity to L1210 and its drug- resistant cell lines *in vitro*. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 35, p. 412-416, 1992.

JIN, W.; WANG, J.; ZHU, T.; YUAN, B.; NI, H.; JIANG, J.; WANG, H.; LIANG, W. Anti-inflammatory effects of curcumin in experimental spinal cord injury in rats. **Inflammation Research**, v. 29, 2014 [Epub ahead of print]

KADAM, P. V.; BHINGARE, C. L.; NIKAM, R. Y.; PAWAR, S. A. Development and validation of UV Spectrophotometric method for the estimation of Curcumin in cream formulation. **Pharmaceutical Methods**, v. 4, n. 2, p. 43-45, 2013.

KASHEM, S. W.; IGYARTO, B. Z.; GERAMI-NEJAD, M.; KUMAMOTO, Y.; MOHAMMED, J.; JARRETT, E.; DRUMMOND, R. A.; ZURAWSKI, S. M.; ZURAWSKI, G.; BERMAN, J.; IWASAKI, A.; BROWN, G. D.; KAPLAN, D. H. Candida albicans

Morphology and Dendritic Cell Subsets Determine T Helper Cell Differentiation. **Immunity**, v. 42, p. 356–366, 2015.

KAST, C. E.; VALENTA, C.; LEOPOLD, M.; BERNKOP-SCHNURCH. Design and *in vitro* evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole. **Journal of Controlled Release**, v. 81, p. 347–354, 2002.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **Journal of Microbiology,** v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.

KÖLLNER S.; NARDIN, I.; MARKT, R.; GRIESSER, J.; PRÜFERT, F.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Self-emulsifying drug delivery systems: Design of a novel vaginal delivery system for curcumin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 268–275, 2017.

KOOP, H. S.; FREITAS, R. A.; SOUZA, L. M.; MARTINEZ, G. R.; SILVEIRA, J. L. M. Development and validation of a RP-HPLC–PDA method. **Chromatographia**, n. 76, p. 1041–1048, 2013.

KORANY, M. A.; HAGGAG, R. S.; RAGAB, M. A. A.; ELMALLAH, O. A. A validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of Silymarin and Curcumin in various dosage forms. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. **Journal of Membrane Science**, v. 9, p. 211-227, 1981.

KUMAR, M.K.; SHAH, M.H.; KETKAR, A.; MAHADIK, K.R.; PARADKAR, A. Effect of drug solubility and different excipients on floating behavior and release from glyceryl monooleate matrices**. International Journal of Pharmaceutics,** v. 272, p. 151–160, 2004.

LARRSON, K. Lipids-Molecular Organization, Physical Functions and Technical Applications. **The Oily Press**. Dondee, 1994. p. 171.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 89–121, 2000.

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

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia aplicada.** São Paulo: Medfarma, p. 50-52, 2004.

LIM, Y. S.; KWON, S. K.; PARK, J. H.; CHO, C. G.; PARK, S. W.; KIM, W. K. Enhanced Mucosal Healing With Curcumin in Animal Oral Ulcer Model. **The laryngoscope**, v. 126, p. 68-70, 2016.

LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; CAETANO M. E.; NISSA, M. D.; GONÇALVES, A. K.; GIRALDO, H. P. D. Candidíase vulvovaginal recorrente: fisiopatogênese, diagnóstico e tratamento. **Revista Ciências Medicas.** v. 14, p. 373-378, 2005.

LIU, J. Y.; SHI, C.; WANG, Y.; LI, W. J.; ZHAO, Y.; XIANG, M. J. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 153 - 161, 2015.

LOCKHART, S. R. Current Epidemiology of *Candida* Infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 36, n. 17, p. 131 - 136, 2014.
LOGAN-SMITH, M. J.; LOCKYER, P. J.; EAST, J. M.; LEE, A. G. Curcumin, a molecule that inhibits the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum but increases the rate of accumulation of Ca2+. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 46905 - 46911, 2001.

LO, H. J.; TSENG, K. Y.; KAO, Y. Y.; TSAO, M. Y.; LO, H. L.; YANG, Y. L. Cph1p negatively regulates MDR1 involved in drug resistance in *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 45, p. 617 - 621, 2015.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrifílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LU, W.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols.**Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 1-9, 2016.

MADSEN, F.; EBERTH, K.; SMART, J. D. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration. **Journal of Controlled Release**, v. 50, p. 167–178, 1998.

MALMSTEN, M. **Surfactants and Polymers in Drug Delivery**. New York: Infoma Healthcare, 2002. 348 p.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal Pharmeutical Science,** v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002

MANAIA, E. B. **Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO2 para proteção solar e liberação controlada de terpinem-4-ol**. 2012. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

MANE, A.; VIDHATE, P.; KUSRO, C.; WAMAN, V.; SAXENA, V.; KULKARNI-KALE, U.; RISBUD, A. Molecular mechanisms associated with Fluconazole resistance in clinical Candida albicans isolates from India. **Mycoses**, v. 59, p. 93-100, 2016.

MARTINS, C. V. B.; SILVA, D. L.; NERES, A. T. M.; MAGALHÃES, T. F. F.; WATANABE, G. A.; MODOLO, L. V.; SABINO, A. A.; FATIMA, Â.; RESENDE, M. A. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 337 - 339, 2009.

MAZZARI, L.; TRAVELET, C.; ORTEGA-MURILLO, S.; OTSUKA, I.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI, R. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, p. 58–66, 2012.

MEMVANGA, P. B.; MBINZE, J. K.; ROZET, E.; HUBERT, P.; PRÉAT, V.; MARINI, R. D. Development ofaliquidchromatographicmethodforthe simultaneous quantification of curcumin, β-arteether, tetrahydrocurcumin and dihydroartemisinin. Application tolipid-based formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 88, p. 447–456, 2014.

MENDONÇA, C.C.; SILVA, I. C. L.; RODRIGUES, K. A.; CAMPOS, M. A. L.; MEDEIROS, M. C. M.; CASTELI, V. C.; FERRARI, M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P. Emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação *in vitro.* **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 35-46, 2009.

MERTA, J.; TORKKELI, M.; IKONEN, T.; SERIMAA, R.; STENIUS, P. Structure of cationic starch (CS)/anionic surfactant complexes studied by small-angle x-ray scattering (SAXS). **Macromolecules,** v. 34, n.9, p.2937-2946, 2001.

MIRÓ, M. S.; RODRÍGUEZ, E.; VIGEZZI, C.; ICELY, P. A.; FREITAS ARAÚJO, M. G. F.; RIERA, F. O.; VARGAS, L.; ABIEGA, C.; CAEIRO, J. P.; SOTOMAYOR, C. E. Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafios. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 2, p. 65-71, 2017.

MISHRA, A.; DAS, B. C. Curcumin as an anti-human papillomavirus and anti-cancer compound. **Future Oncology Journal**, v. 11, n. 18, p. 2487–2490, 2015.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; KADIR, H. A.; HASSANDARVISH, P.; TAJIK, H.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. **BioMed Research International**, 2014.

MOLERO, G.; DÍEZ-OREJAS, R.; NAVARRO-GARCIA, MONTEOLIVA, L.; PLA, J.; GIL, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M.; NOMBELA, C. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. **International Microbiology,** v. 1, n. 2, p. 95-106, 1998.

MORACE, G; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in Candida species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, n. 2, p. 254 - 259, 2014.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite).** 158p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MORTAZAVI, S. A. An *in vitro* assessment of mucus/mucoadhesive interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, p. 173-182, 1995.

MOSTEFA, N. M.; SADOK, A. H.; SABRI, N.; HADJI, A. Determination of optimal cream formulation from longterm stability investigation using a surface response modeling. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 3, p. 211-8, 2006.

MÜLLER, G. G.; JOSÉ-KARA, N.; CASTRO, R. S. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração. **Revista Brasileira de Oftalmolologia**, v. 72, n. 2, p. 132-41, 2013.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 58, p. 343–356, 2004.

Natural Health Products Ingredients Database - Turmeric monograph. Health Canada: disponível em: http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhpid-bdipsn/monoReq.do?id=216, acesso em 29/11/2015.

NAGASHIMA, M.; YAMAGISHI, Y.; MIKAMO, H. Antifungal susceptibilities of Candida species isolated from the patients with vaginal candidiasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, p. 124-126, 2016.

NAGLIK, J. R.; FIDEL, P. L. J.; ODDS, F. C. Animal models of mucosal Candida infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 283, n. 2, p. 129-39, 2008.

NAGY, I.; KORECK, A.; KIS, K., KENDERESSY-SZABO, A.; SZELL, M.; DOBOZY, M.; KEMENY, L. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human b-defensin-2 in vaginal epithelial cells. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 1117 - 1127, 2005.

NEELOFAR, K.; SHREAZ, S.; RIMPLE, B.; MURALIDHAR, S.; NIKHAT, M.; KHAN, L. A. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 204 - 210, 2011.

NEWBURGER, S. H. Manual of Cosmetic Analisys, editor Senzel, A. J., 2ªed, 1997.

NGWA, G. Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development. **Journal of Drug Delivery Science Technology**, v. 10, n. 5, p. 56-59, 2010.

NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 521 - 528, 2005.

NUNES, E. B.; MONTEIRO, J. C. M. S.; NUNES, N. B.; PAES, A. L. V. Perfil de sensibilidade do gênero Candida a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

NYIRJESY, P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 637–652, 2008.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Microemulsões I: Fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v. 13, n. 9/10, 2001.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CERA, L. F. R. Microemulsões II: Aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Infarma**, v. 14, n. 7/8, 2002.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; RODRIGUES, L. F.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

ORNELAS-AGUIRRE, J. M.; GOMEZ-MEDA, B. C.; ZAMORA-PEREZ, A. L.; RAMOS-IBARRA, M. L.; BATISTA-GONZALEZ, C. M.; ZUNIGA-GONZALEZ, G. M. Micronucleus induction by metronidazole in rat vaginal mucosa. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, n. 5, p. 352-356, 2006.

OYAFUSO, M. H.; CARVALHO, F. C.; CHIAVACCI, L. A.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Design and Characterization of Silicone and Surfactant Based Systems for Topical Drug Delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology,** v. 15, n. 1, p. 817-826, 2015.

PAPADOPOULOU, V., KOSMIDIS, K., VLACHOU, M., MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v.309, p.44–50, 2006.

PATEL, D. A.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J. D.; LEAMAN, D.; NYIRJESY, P.; WEITZ, V.; FOXMAN, B. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: Results of a prospective cohort study**. American Journal of Obstetrics and Gynecology**, n. 190, p. 644 - 653, 2004.

PATEL, R.; PATEL, T. N. Liquid crystals and their applicattion in the field of drug delivery. In: FANUN, M. **Colloids in Drug Delivery**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p.311-336.

PAULUCCI, V. P; COUTO, R. O.; TEIXEIRA, C. C. C.; FREITAS, L. A. P. Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 94 - 100, 2013.

PAVELIC, E.; SKALKO-BASNET, N.; JALSENJAK, I. Liposomal gel with chloramphenicol: Characterisation and *in vitro* release. **Acta Pharmaceutica**, v. 54, p. 319 -330, 2004.

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

POWELL, A. M; NYIRJESY, P. Recurrent vulvovaginitis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, n. 28, p. 967 - 976, 2014.

PRASAD, N. S.; RAGHAVENDRA, R.; LOKESH, B. R.; NAIDU, K. A. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. **Prost Leukotriene Essent Fatty Acids**, v. 70, p. 521 - 5218, 2004.

PRASAD, R.; KAPOOR, K. Multidrug Resistance in Yeast *Candida*. **International Review of Cytology**, v. 242, p. 215 - 248, 2005.

PRISTA, L. V. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Porto Alegre: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

RAJESHKUMAR, R.; SUNDARARAMAN, S. Emergence of Candida spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – status Quo. **Mycoses**, v. 55, p. 60–73, 2012.
RAMSHANKAR, Y. V.; SURESH, S. A sensitive reversed phase HPLC method for the determinadtion of curcumin. **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, n. 17, p. 71-74, 2009.

RAO, M. A.; STEFFE, M. A. Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid food. Viscoelastic properties of foods. **New York: Elsevier Applied Sciece***,* p. 207-231, 1992.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. 1ªed., Canoas-RS e UNESP Botucatu-SP, ULBRA, p. 173 - 199, 2003.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non- sweliable devices in the form os slabs, apheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 23-36, 1986.

RIZWAN, S. B.; HANLEY, T.; BOYD, B. J.; RADES, T.; HOOK, S. Liquid Crystalline Systems of Phytantriol and Glyceryl Monooleate Containing a Hydrophilic Protein: Characterisation, Swelling and Release Kinetics. **Journal of Pharmaceutical**

Sciences, v. 98, n. 11, 2009.

RODRIGUES, M. E.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Novel strategies to fight Candida species infection. **Critical Reviews in Microbiology**; v. 42, n. 4, p. 594–606, 2016.

RUSIG, O.; MARTINS, M. C. Efeito da temperatura, do pH e da luz sobre extratos de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e curcumina. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 158-64, 1992.

SALEHEI, Z.; SEIFI, Z.; MAHMOUDABADI, A. Z. Sensitivity of vaginal isolates of Candida to eight antifungal drugs isolated from Ahvaz, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 5, p. 574 - 577, 2012.

SALLAM, A.; KHALIL, E.; IBRAHIM, H.; FREIJ, I. Formulation of an oral dosage form utilizing the properties of cubic liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 343-352, 2002.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. 2, p. 2-13, 2015.

SARDI, J. C. O, SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA A. M.; GIANNINI, M. J. S. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SAVIC, S.; LUKIC, M.; JAKSIC, I.; REICHL, S.; TAMBURIC, S.; GOYMANN, C.M. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. **Journal Colloid Interface Science,** v. 358, n. 1, p. 182-191, 2011.

SCCP/0970 - SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS – **Basic Criteria** for the *in vitr*o assessment of dermal absorption of cosmetics ingredientes, 2006.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. 2.ed, São Paulo: Artliber Editora, 2006.

SHAH, J. S.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47 p. 229-250, 2001.

SHARMA, M., MANOHARLAL, R., PURI, N., AND PRASAD, R. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans.* **Bioscience Reports**, v. 30, n. 6, p. 391–404, 2010.

SHARMA, M.; MANOHARLAL, R.; SHUKLA, S.; PURI, N.; PRASAD, T.; AMBUDKAR, S. V.; PRASAD, R. Curcumin modulates efflux mediated by yeast ABC multidrug transporters and is synergistic with antifungals. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 3256 - 3265, 2009.

SHIOZAWA, P.; CECHI, D.; FIGUEIREDO, M. A. P.; SEKIGUCHI, L. T.; BAGNOLI, F.; LIMA, S. M. R. R. Tratamento da candidíase vaginal recorrente: revisão atualizada. Arquivos Médicos dos Hospitais da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, n. 52, p. 48 - 50, 2007.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Hydrophilic Matrices for Controlled Drug Delivery: An Improved Mathematical Model to Predict the Resulting Drug Release Kinetics. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 10, 2000.

SILVA, B. R. F. 2013. 165 f. **Tese de doutorado** - Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho (Faculdade de Ciências Farmacêuticas). Desenvolvimento e caracterização físico-química e biofarmacêutica de nano e microemulsões lipídicas de uso intravenoso contendo metildiidrojasmonato.

SILVA-BUZANELLO, R. A.; FERRO, A. C.; BONA, E.; CARDOZO-FILHO, L.; ARAÚJO, P. H. H.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H. Validation of an Ultraviolet–visible (UV–Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly (L-lactic acid) nanoparticles. **Food Chemistry**, n. 172, p. 99 - 104, 2015.

SILVA, E. C.; SOARES, I. C. Tecnologia de emulsoes. **Cosmetics & Toiletries**, v. 8, n.5, p.37-46, 1996.

SILVA, H. M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea.** 2011. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás (Goiás – Brasil). p.68. 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora UFRGS, 2004.

SINGH, R. S. P.; DAS, U.; DIMMOCK, J. R.; ALCORN, J. A general HPLC–UV method for the quantitative determination of curcumin analogues containing the 1,5-diaryl-3-oxo-1,4-pentadienyl pharmacophore in rat biomatrices. **Journal of Chromatography B**, n. 878, p. 2796 - 2802, 2010.

SIVIERO, A.; GALLO, E.; MAGGINI, V.; GORI, L.; MUGELLI, A.; FIRENZUOLI, F.; VANNACCI, A. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of herbal medicine**, v. 5, p. 57-70, 2015.

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 214, p. 15-21, 2015.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **The lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961 - 1971, 2007.

SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R. W.; FOXMAN, B.; LEDGER, W. J; NYIRJESY, P. R.; REED, B. D.; SUMMERS, P. R. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 178, n. 2, p. 203 – 211, 1998.

SOBEL, J. D.; ZERVOS, M.; REED, B. D.; HOOTON, T.; SOPER, D.; NYIRJESY, P.; HEINE, M. W.; WILLEMS, J.; PANZER, H. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated Candida vaginitis: clinical implications. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 34 - 38, 2003.

SQUIER, C. A.; MANTZ, M. J.; SCHLIECERT, P. M.; DAVIS, C. C. Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 1, p. 9 - 21, 2008.

SRIKRISHNA, S.; CARDOZO, L. The vagina as a route for drug delivery: a review. **International Urogynecology Journal,** v. 24, p. 537-543, 2013.

SUETH-SANTIAGOA, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; LIMA, M. E. F. CURCUMINA, O PÓ DOURADO DO AÇAFRÃO-DA-TERRA: INTROSPECÇÕES SOBRE QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

SYED, H. K.; LIEW, K. B.; LOH, G. O. K.; PEH, K. K. Stability indicating HPLC–UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. **Food Chemistry**, v. 170, p. 321-326, 2015.

TECHNICAL DATA SHEET, EPIKURON 200 (fosfatidilcolina de soja), LUCAS MEYER COSMETICS.

TEJADA, S.; MANAYI, A.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; SUREDA, A.; ZHAJHEYDARI, Z.; GORTZI, O.; PAZOKI-TOROUDI, H.; NABAVI, S. M. Wound Healing Effects of Curcumin: A Short Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology***,* v. 17, p. 1002-1007, 2016.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J.; HENEGOUWEN, G. B. V. Studies on curcumin and curcuminoids VIII: Photochemical stability of curcumin. **European Food Research and Technology**, v. 183, n. 2, p. 116-122, 1986.

TSANG, P. W.; BANDARA, H. M.; FONG, W. P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. **Plos One Journal,** v. 7, n. 11, p. 1-8, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 38 – NF 33. The United States Pharmacopeia. Rockville, Convention, 2015.

URBAN, M. C. C.; LANDGRAF, D. S.; OYAFUSO, M. H.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; CHORILLI, M.; CORRÊA, M. A.; GREMIÃO, M. P. D. Development and *In vitro* Skin Delivery of Dexamethasone Acetate- Loaded Surfactant-Based Systems. **Journal of Nanopharmaceutics and Drug Delivery,** v. 1, n. 3, p. 323-334, 2013.

VARELAS, C. G.; DIXON, D. G.; STEINER, C. A. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. **Journal of Controlled Release**, v. 34, p. 185-192, 1995.

VRZAL, V.; BITTNER, L.; NEPERENY, J. Use of yeast lysate in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Procedia in Vaccinology**, n. 9, p. 35 - 37, 2015.

WANG, B.; HUANG, L. H.; ZHAO, J. X; WEI, M.; FANG, H.; WANG, D. Y.; WANG, H. F.; YIN, J. G.; XIANG, M. ERG11 mutations associated with azole resistance in Candida albicans isolates from vulvovaginal candidosis patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 11, p. 909 - 914, 2015.

WANG, Y.; LIU, J. Y.; SHI, C.; LI, W. J.; ZHAO, Y.; YAN, L.; XIANG, M. J. Mutations in transcription factor Mrr2p contribute to fluconazoleresistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 46, p. 552 - 559, 2015.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A.; BAKER, K. S.; ROGERS, D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans Candida Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12, 2017.

WICHITNITHAD, W.; JONGAROONNGAMSANG, N.; PUMMANGURA, S.; ROJSITTHISAK, P. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. **Phytochemical analisys**, v. 20, n. 4, p. 314-319, 2009.

XUA, H.; PAXTONB, J.; LIMB, J; LI, Y.; WUA, Z. Development of a gradient high performance liquid chromatography assay for simultaneous analysis of hydrophilic gemcitabine and lipophilic curcumin using a central composite design and its application in liposome development. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 98, p. 371–378, 2014.

YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. *In vitro* permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 78, p. 185–192, 2010.

ZHANG, J.; DONG, B.; ZHENG, L.; LI, N.; LI, X. Lyotropic liquid crystalline phases formed in ternary mixtures of 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide/p-xylene/water: A SAXS, POM, and rheology study. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 321, n. 1, p. 159-165, 2008.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvovaginitis candidiásica, **Revista Iberoamericana de Micologia,** v. 19, p. 22-24, 2002.

ZÚÑIGA-GONZALEZ, G.; GÓMEZ-MEDA, B. C.; ZAMORA-PEREZ, A.; RAMOS-IBARRA, M. L.; BATISTA-GONZÁLEZ, C. M.; ESPINOZA-JIMÉNEZ, S.; GALLEGOS-ARREOLA, M. P.; ÁLVAREZ-MOYA, C.; TORRES-BUGARÍN, O. Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide-treated rats. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 42, n. 4, p. 306–310, 2003.

APÊNDICE I

UFSJ
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Desenvolvimento, validação e estudo pré-clínico de creme vaginal contendo curcumina para o tratamento de candidíase vaginal"**, **Protocolo nº 008/2015** sob a responsabilidade de Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo e que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo. Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de São João del-Rei, em reunião de 10/07/2015

Vigência do Projeto	Início: 01/04/2015 Término: 01/06/2016
Espécie / Linhagem	*Rattus novergicus*, linhagem Wistar Heterogênio
Nº de animais	60
Peso / Idade	150g / 8 semanas
Sexo	Feminino
Origem	Biotário, fazenda, aviário, etc.

Leila de Genova Gaya

Prof.ª Leila de Genova Gaya

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA-UFSJ

Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSJ – CEUA/UFSJ

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito de uma microemulsão de aplicação vaginal contendo curcumina no tratamento de candidíase vulvovaginal experimental", protocolo nº 014/2017 sob a responsabilidade de Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de São João del-Rei, em reunião de data da reunião.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Início: 01/06/2017 Término: 01/06/2018
Espécie/Linhagem/raça	Rattus norvegicus / Wistar
Nº de animais	61
Peso / Idade	100 g / 8 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da UFSJ Praça Dom Helvécio , Nº 74 , Dom Bosco São João del Rei – MG Cep: 36301-160

Prof.ª Liliam Midori Ide

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA-UFSJ