

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ELAINE FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGEL BASEADO EM
POLOXAMER-QUITOSANA CONTENDO EUGENOL PARA APLICAÇÃO NA
MUCOSA BUCAL**

**PONTA GROSSA
2019**

ELAINE FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGEL BASEADO EM
POLOXAMER-QUITOSANA CONTENDO EUGENOL PARA APLICAÇÃO NA
MUCOSA BUCAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

Coorientadora: Prof. Dra. Patrícia Mazureki Campos.

PONTA GROSSA
2019

F383 Ferreira, Elaine
Desenvolvimento e avaliação de hidrogel baseado em poloxamer-
quitosana contendo eugenol para aplicação na mucosa bucal / Elaine
Ferreira . Ponta Grossa, 2019.
73 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de
Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à
Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Mazureki Campos.

1. Cavidade bucal. 2. Poloxâmeros. 3. Biopolímeros. I. Farago, Paulo
Vitor. II. Campos, Patrícia Mazureki. III. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615

Ponta Grossa, 04 de abril de 2019.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 08/2019 DA MESTRANDA ELAINE FERREIRA REALIZADA NO DIA 04 DE ABRIL DE 2019, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos quatro dias de abril de dois mil e dezenove, às 09h00min, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – sala 115 - Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professora Doutora Patrícia Mazureki Campos reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Elaine Ferreira na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamento e Correlatos, constituída pela Professora Doutora Patrícia Mazureki Campos (UEPG/PR), demais Doutoradas (membros titulares): Josiane de Fátima Padilha de Paula (UEPG/PR) e Márcia Rezende Siqueira (FACPP/CE). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: “**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGEL EM POLOXAMER-QUITOSANA CONTENDO EUGENOL PARA APLICAÇÃO NA MUCOSA BUCAL.**”

Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): a aprovação está condicionada às alterações sugeridas pela banca.

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Patrícia Mazureki Campos
Patrícia Mazureki Campos 1 - (DEFAR - UEPG) Presidente

Josiane de Fátima Padilha de Paula 2 - (DEFAR - UEPG) – Titular

Márcia Rezende Siqueira 3 - (ODONTOLOGIA - FACPP) – Titular

Dedico esse trabalho com todo meu amor e gratidão aos meus pais João e Eugênia (*in memoriam*), ao meu esposo Rafael (Xuxu), ao meu filho Eduardo e minha filha Luana. Vocês foram os alicerces para que eu alcançasse mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar nessa trajetória, iluminando cada passo percorrido, protegendo-me a cada viagem, tornando-me cada vez mais forte e determinada a enfrentar todas as dificuldades encontradas para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus pais, João Ferreira e Eugênia Ferreira (*in memoriam*), pelo apoio e amor incondicional, pela minha educação, pelo exemplo que me foi repassado, por todo esforço concebido a minha formação.

Ao meu esposo Rafael, por não me deixar desistir, por viver comigo esses anos de estudo, abrindo mão de si, muitas vezes. Obrigada por todo apoio, paciência e dedicação a mim. Sua importância na minha vida e meu amor por você é imensurável.

Aos meus amados filhos Eduardo e Luana, que mesmo com tenra idade, se mostraram compreensivos nos momentos que precisei ausentar-me. Vocês são o meu melhor presente. Meu amor por vocês é incondicional.

Às Faculdades Integradas do Vale do Iguaçu – UNIGUAÇU, pelo espaço laboratorial cedido para a realização das análises, pelo incentivo constante e pela compreensão nos momentos que me ausentei do meu trabalho. Tenho orgulho em fazer parte dessa família.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pela oportunidade de realização do mestrado. Obrigada pelas orientações durante a realização deste trabalho. Pela disposição e pela ajuda.

À minha coorientadora Profa. Dra. Patrícia Mazureki Campos, pessoa, professora, pesquisadora incrível e inspiradora. Obrigada pela paciência, pela dedicação, pela empatia, pelos ensinamentos, pela orientação minuciosa no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Benjamin Carvalho, Profa. Dra. Marina Tolentino Marinho e à mestranda Bianca Drewnowski, que se dispuseram a ajudar na realização dos testes e dedicaram a este trabalho o seu tempo e suas considerações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização do curso.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”

Isaac Newton

RESUMO

FERREIRA, Elaine. **Desenvolvimento e avaliação de hidrogel baseado em poloxamer-quitosana contendo eugenol para aplicação na mucosa bucal**. 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2019.

As ações dos fármacos podem ser melhoradas através do desenvolvimento de sistemas alternativos de liberação, como o sistema mucoadesivo. Esses sistemas permanecem em contato próximo à membrana mucosa, liberando o fármaco no local de ação. Os hidrogéis tem sido extensivamente pesquisado por suas propriedades de controle sobre a cinética de intumescimento. A quitosana é um biopolímero com propriedade mucoadesiva, assim mostra-se adequado para administração via mucosa, além disso, ela não se inativa ao contato da mucina e sua mucoadesão não diminui com o tempo. Dessa forma, a utilização de hidrogéis de geleificação *in situ* com propriedades mucoadesivas como sistema de liberação de substâncias via mucosa bucal é uma importante estratégia nos tratamentos de afecções e demais procedimentos na cavidade bucal. O eugenol, com propriedades anestésicas, associado a novos sistemas de liberação para tratamento da inflamação bucal, bem como seu uso tópico em afecções periodontais tem sido extensivamente estudado. O presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar um hidrogel baseado em poloxamer-quitosana contendo eugenol para aplicação na mucosa bucal. Para tanto, foram definidos 5 grupos experimentais: hidrogel poloxamer (HP), hidrogel poloxamer-quitosana (HPQ), hidrogel poloxamer-quitosana com eugenol a 1% p/p (HPQEU1); com eugenol a 2% p/p (HPQEU2); e com eugenol a 4% p/p (HPQEU4). A caracterização físico-química procedeu-se por determinação da transição sol-gel pelo método da inversão de tubos, determinação de pH, avaliação turbidimétrica, determinação da espalhabilidade, perfil de textura, quantificação do fármaco por espectrofotometria UV-Vis e determinação do perfil reológico dos hidrogéis. A estabilidade dos hidrogéis foram determinadas por avaliação de pH, turbidez e quantificação do fármaco. A propriedade mucoadesiva foi estudada com modelo *ex vivo* em bochecha de porco. Com a determinação de transição sol/gel as formulações HPQEU1 e HPQEU2 apresentaram-se adequadas com temperaturas de transição de $25,33 \pm 0,57$ °C e, $19,33 \pm 0,57$ °C, respectivamente, porém para HPQEU4 não foi possível a determinação. O perfil de textura e análise de espalhabilidade apresentaram valores favoráveis para a totalidade de formulações estudadas, com melhores resultados para HPQEU1 e HPQEU2. Resultados do estudo da estabilidade permitiram estabelecer critérios mais adequados de armazenamento, sendo mais favorável, o armazenamento em temperatura de 5 ± 2 °C. O perfil reológico das formulações demonstrou valores favoráveis para o comportamento elástico, o que contribui para a retenção no local de aplicação bem como para a liberação do eugenol na mucosa bucal. O teste de mucoadesão demonstrou que as formulações HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4 são capazes de se aderir à mucosa, sendo que o hidrogel HPQEU4 apresentou maior capacidade mucoadesiva. Analisando os hidrogéis poloxamer-quitosana contendo eugenol, observou-se que nenhuma das formulações pesquisadas abrangeu todas as propriedades de maneira satisfatória, entretanto, as formulações que reuniram as características mais próximas das estimadas para aplicação, com intermediária propriedade mucoadesiva e perfil reológico com característico componente elástico, foi o hidrogel HPQEU1, seguido do hidrogel HPQEU2. Portanto, assume-se os hidrogéis contendo eugenol como formulações, de

natureza termorresponsível, para mucosa bucal com capacidade de liberação sustentada de eugenol a serem utilizadas com aplicação odontológica.

Palavras-chave: Cavidade bucal. Poloxâmeros. Anestésico. Biopolímeros.

ABSTRACT

FERREIRA, Elaine. **Development and evaluation of the hydrogel based on poloxamer-chitosan containing eugenol for application to the buccal mucosa.** 2019. 73 s. Dissertation (Master's Degree in Pharmaceutical Sciences). Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2019.

The drugs actions may be improved through the development of release systems, like the mucoadhesive system. These systems keep touching near the absorption tissue, the mucous membrane, releasing the drug to the site of action. The hydrogel has been extensively studied due to its properties of the swelling kinetics control. The chitosan is a biopolymer with mucoadhesive property, which is suitable for administration through the mucous, besides, it is not inactivated when contacts the mucin and its mucoadhesion does not decrease during the time. Thus, the use of *in situ* gelation of hydrogels with mucoadhesive properties as release system of substances by buccal route is an important strategy in treatments of affections and others procedures in buccal cavity. Eugenol, with anesthetic properties, associated to new release systems for the treatment of buccal inflammation, as well as its topical use in periodontal diseases has been extensively studied. This study aimed to develop and evaluate a hydrogel based on poloxamer-chitosan containing eugenol for application to the buccal mucosa to optimize its anesthetic properties. Five experimental groups were determined: poloxamer hydrogel (PH), poloxamer-chitosan hydrogel (PCH), poloxamer-chitosan hydrogel with 1% w/w eugenol (PCHEU1), poloxamer-chitosan hydrogel with 2% w/w eugenol (PCHEU2), poloxamer-chitosan hydrogel with 4% w/w eugenol (PCHEU4). The physico-chemical characterization was carried out by determination of the sol-gel transition by the tube inversion method; determination of pH, turbidimetric evaluation, determination of scatterability, texture profile, quantification of the drug by UV-vis spectrophotometry and determination of the rheological profile of the hydrogels. Stability study utilized pH and turbidity evaluations and quantification of the drug. The mucoadhesive property was studied with *ex vivo* model in pig cheek. The sol / gel transition determination demonstrated that the PCHEU1 and PCHEU2 formulations were suitable with transition temperatures of 25.33 ± 0.57 °C and, 19.33 ± 0.57 °C, respectively, however for PCHEU4, it was not possible to determinate. The texture profile and scatterability analysis presented acceptable values for the totality of formulations, with better results for PCHEU1 and PCHEU2. Stability study allowed establishing more adequate storage criteria, being more favorable at 5 ± 2 °C. The rheological profile of the formulations showed favorable values for the elastic behavior, which contributes to retention at the application site as well as to the eugenol release in the buccal mucosa. The mucoadhesion test showed that the PCHEU1, PCHEU2 and PCHEU4 formulations are able to adhere to the mucosa, being the PCHEU4 with the highest mucoadhesive ability. Considering all the analysis for the hydrogels containing eugenol, none of the studied formulations covered, satisfactorily, all the properties, however, the PCHEU1 formulation had the closest profile related with application with intermediate mucoadhesive properties as well as the rheological profile, followed by the PCHEU2 hydrogel. Therefore, the hydrogels containing eugenol are suggested as formulations, with thermoresponsive nature, for buccal mucosa with the ability of sustained release to be used with dentistry application.

Key words: Buccal cavity. Poloxamers. Anesthetic. Biopolymer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da mucosa bucal.....	19
Figura 2 - Representação da estrutura do hidrogel.	22
Figura 3 - Processo de gelificação dos polaxâmeros.	24
Figura 4 - Estrutura química do eugenol.	28
Figura 5 - Etapas experimentais do estudo.	33
Figura 6 - Teste da espalhabilidade.	37
Figura 7 - Reômetro oscilatório.	38
Figura 8 - Análise de textura.	40
Figura 9 - Adaptação do texturômetro para realização do teste.....	42
Figura 10 - Formulações preparadas.	43
Figura 11 - Valores de transmitância dos hidrogéis 24 h após o preparo	46
Figura 12 - Principais alterações organolépticas na avaliação da estabilidade.....	49
Figura 13 - pH das formulações armazenadas a 5 °C durante 30 dias.	50
Figura 14 - pH das formulações armazenadas à 25 °C durante 30 dias.	51
Figura 15 - pH das formulações armazenadas à 45 °C durante 30 dias.	52
Figura 16 - Espalhabilidade das formulações em relação ao peso adicionado	57
Figura 17 - Resultado da análise das propriedades reológicas do hidrogel HP.	59
Figura 18 - Resultado da análise das propriedades reológicas do hidrogel HPQ.	59
Figura 19 - Análise das propriedades reológicas do hidrogel HPQEU1.	60
Figura 20 - Análise das propriedades reológicas do hidrogel HPQEU2.	60
Figura 21 - Análise das propriedades reológicas do hidrogel HPQEU4.	60
Figura 22 - Curva analítica do eugenol	64
Quadro 1 - Parâmetros mecânicos de perfil de textura.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das formulações de hidrogel.	34
Tabela 2 - Determinação da espalhabilidade e pesos utilizados.	37
Tabela 3 - Diluições da solução padrão.	41
Tabela 4 - Valores de pH dos hidrogéis 24 h após o preparo.	45
Tabela 5 - Avaliação dos hidrogéis armazenados a 5 °C durante 30 dias.	47
Tabela 6 - Avaliação dos hidrogéis armazenados a 25 °C durante 30 dias.	48
Tabela 7 - Avaliação dos hidrogéis armazenados a 45 °C durante 30 dias.	48
Tabela 8 - Avaliação das formulações armazenadas a 5 °C durante 30 dias.	53
Tabela 9 - Avaliação das formulações armazenadas a 25 °C durante 30 dias.	53
Tabela 10 - Avaliação das formulações armazenadas a 45 °C durante 30 dias.	54
Tabela 11 - Quantificação de eugenol em HPQEU1* durante 30 dias.	55
Tabela 12 - Quantificação de eugenol em HPQEU2* durante 30 dias.	55
Tabela 13 - Quantificação de eugenol em HPQEU4* durante 30 dias.	56
Tabela 14 - Valores de espalhabilidade das formulações.	57
Tabela 15 - Propriedades mecânicas das formulações de hidrogel.	61
Tabela 16 - Quantificação de eugenol nas formulações 24 h após o preparo.	64
Tabela 17 - Resultados $\pm$ DP das propriedades mucoadesivas dos hidrogéis.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – *American Type Culture Collection*
CCG – Concentração crítica de gel
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI – *Clinical Laboratory Standards Internacional*
DMSO - Dimetilsulfóxido
DP - Desvio padrão
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
Ei – Espalhabilidade
FDA – *Food and Drug Administration*
HP – Hidrogel poloxamer
HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose
HPQ – Hidrogel poloxamer – quitosana
HPQEU1 – Hidrogel poloxamer-quitosana com eugenol 1%
HPQEU2 – Hidrogel poloxamer-quitosana com eugenol 2%
HPQEU4 - Hidrogel poloxamer-quitosana com eugenol 4%
ICH – *International Conference of Harmonisation*
KDa – Kilo Dalton
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio
OE – oxietileno
OP – oxipropileno
P.A. – Para análise
PEG – Polietilenoglicol
pH – Potencial hidrogeniônico
pka – Constante de acidez
Qsp – Quantidade suficiente para
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
Rpm – Rotações por minuto
RPMI – meio de cultura sintético complexo
Sol-gel – solução/ gel
Tsol/gel – Temperatura de transição solução / gel
UV – Vis – Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	porcentagem
%T	porcentagem de transmitância
<	menor que
>	maior que
®	marca registrada
π	pi
3T3	linhagem celular
C3	três carbonos
CO ₂	dióxido de carbono
d	diâmetro
g	grama
G'	módulo de armazenamento
G''	módulo de perda
h	hora
Hz	hertz
L	litro
mg	miligrama
mg/ L	miligramas por litro
mg/mL	miligramas por mililitros
mm	milímetro
mm.s ⁻¹	milímetro por segundo
mm ²	milímetro ao quadrado
N	newton
N.s ⁻¹	newton por segundo
nm	nanômetros
D'	viscosidade dinâmica
°C	graus celsius
°C / min	grau celsius por minuto
<i>p</i>	significância estatística
p/p	peso-peso
p/v	peso-volume
Pa	pascal
Pa.s	pascal por segundo
s	segundo
U. mL ⁻¹	unidade por mililitro
v/v	volume – volume
δ	tangente de defasagem
λ máx	comprimento de onda máximo
µg/ mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
µm	micrometros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NA CAVIDADE BUCAL.....	19
3.2	HIDROGÉIS PARA APLICAÇÃO NA MUCOSA BUCAL	21
3.2.1	Poloxâmeros.....	23
3.2.2	Sistemas de liberação mucoadesivos	25
3.2.3	Quitosana	26
3.3	EUGENOL EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NA CAVIDADE BUCAL	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	EQUIPAMENTOS	31
4.2	REAGENTES E SOLVENTES	31
4.2.1	Fármaco	31
4.2.2	Polímeros.....	31
4.2.3	Solventes e demais reagentes.....	32
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
4.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	33
4.5.1	Preparo dos hidrogéis.....	33
4.5.2	Determinação da transição de fase Sol→Gel	34
4.6	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	35
4.6.1	Determinação de pH	35
4.6.2	Determinação turbidimétrica.....	35
4.7	ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS	35
4.8	DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE	36
4.9	CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA	38
4.10	ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA.....	39
4.11	QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO	40
4.11.1	Varredura espectrofotométrica (UV-Vis).....	40
4.11.2	Curva analítica do eugenol.....	40
4.11.3	Determinação do teor de eugenol nos hidrogéis.....	41
4.12	ESTUDO DE MUCOADESÃO EX VIVO.....	41

4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	PREPARO DOS HIDROGÉIS.....	43
5.2	TRANSIÇÃO DE FASE SOL → GEL	43
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	45
5.3.1	Determinação de pH	45
5.3.2	Determinação turbidimétrica.....	46
5.4	ESTUDO DE ESTABILIDADE	47
5.4.1	Teste de centrifugação	47
5.4.2	Avaliação organoléptica	47
5.4.3	Avaliação de valores de pH	50
5.4.4	Avaliação turbidimétrica	52
5.4.5	Quantificação de eugenol.....	55
5.5	DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE	56
5.6	PROPRIEDADES REOLÓGICAS.....	59
5.7	ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA.....	61
5.8	QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO	63
5.8.1	Varredura espectrofotométrica (UV-Vis).....	63
5.8.2	Curva analítica do eugenol.....	63
5.8.3	Determinação do teor de eugenol nos hidrogéis.....	64
5.9	ESTUDO DE MUCOADESÃO EX VIVO.....	65
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

Em busca de vias de administração alternativas para a veiculação de fármacos, comparada com a convencional administração oral, são exploradas a administração tópica em várias mucosas como possíveis rotas de entrega de substâncias. Desde a invenção do comprimido sublingual de nitroglicerina, a via mucosa bucal gerou interesse como uma abordagem substitutiva de liberação de fármacos (BATHEJA; THAKUR; MICHNIAK, 2006).

A cavidade oral e o vestíbulo da boca são inteiramente revestidos por membranas mucosas relativamente lisas contendo numerosas glândulas pequenas. Divide-se em epitélio oral, membrana basal, lâmina própria e uma área que contém tecido adiposo e principais vasos sanguíneos e nervos. Pode-se afirmar até certo ponto que a estrutura da mucosa se assemelha à da pele (WASHINGTON; WASHINGTON; G. WILSON, 2001).

As ações dos fármacos podem ser melhoradas através do desenvolvimento de sistemas de liberação, como o sistema mucoadesivo. Esses sistemas permanecem em contato próximo com o tecido de absorção, a membrana mucosa, liberando o fármaco no local de ação, o que pode levar a um aumento da biodisponibilidade com efeitos locais e sistêmicos. A mucoadesão é atualmente explicada por algumas teorias como a de adsorção e difusão, dentre outras (CARVALHO et al., 2010).

Os hidrogéis são compostos de homopolímero hidrofílico ou de redes de copolímeros que podem intumescer na presença de água ou fluidos fisiológicos. Reticulações químicas (ligações covalentes) ou junções físicas (forças secundárias, encadeamento de cadeias) fornecem aos hidrogéis uma característica de aumento do volume e estrutura tridimensional. Os hidrogéis tem sido um tema de extensa pesquisa nas últimas décadas e suas propriedades como o alto teor de água e o possível controle sobre a cinética de intumescimento torna-os muito atraentes para aplicações biomédicas (KLOUDA; MIKOS, 2008).

Um número crescente de sistemas de formação de gel *in situ* tem sido relatado na literatura para vários produtos farmacêuticos e aplicações biomédicas. Recentemente, os géis *in situ* também foram aprovados como formas de dosagem mais apropriadas para aplicações tópicas pela facilidade de administração. Pois em resposta às condições ambientais como pH, temperatura ou força iônica do meio, uma

solução de polímero pode se transformar em uma forma de gel (TUGCU-DEMIROZ, 2017).

Os poloxâmeros são copolímeros que contém propriedade de gelificação termorresponsível, em consequência da transição sol-gel em temperatura fisiológica. A gelificação depende da concentração do polímero, que em solução aquosa, estimulada pelo aumento da temperatura, organiza-se em micelas, aumentando sua viscosidade. Estes, são conhecidos como géis termossensíveis ou termorresponsivos, sendo os poloxâmeros de poli(oxietileno) e poli(oxipropileno), os polímeros responsáveis por esta transformação (ALVES, 2018).

A quitosana pode ser usada como polímero mucoadesivo para administração de substâncias através de várias superfícies mucosas. O uso de quitosana em sistemas de liberação de fármacos tem sido extenso, tanto para uso sistêmico como para liberação local de substâncias. O tratamento local com sistemas mucoadesivos de liberação de fármacos pode oferecer vantagens como frequência de administração reduzida e tempo de residência prolongado. A vantagem adicional da quitosana como polímero mucoadesivo é que ela não se inativa ao contato da mucina e sua mucoadesão não diminui com o tempo (ANDERSEN, 2015).

A proposta de uso do eugenol como anestésico local foi demonstrado pelo estudo de Park et al. (2009), que sugeriram sua adequação para anestesia dentária. Sendo assim, demais estudos sobre as propriedades anestésicas do eugenol tem sido abordado e associado a novos sistemas de liberação utilizados para tratamento da inflamação bucal e para uso tópico nas afecções periodontais.

O tratamento de gengivite e doenças periodontais exige o uso de uma combinação de antibacterianos, analgésicos, agentes anti-inflamatórios e anestésicos locais em concentração eficaz no local, além de tempo de residência prolongado e efeitos colaterais diminuídos. No entanto, nenhum composto sintético possui estas propriedades. Desse modo, uma atenção tem-se dado ao eugenol, como candidato adequado que preenche todos os requisitos (JADHAV et al., 2004).

A utilização de hidrogéis de geleificação *in situ* com propriedades mucoadesivas como sistema de liberação de substâncias via mucosa bucal é uma importante estratégia nos tratamentos de afecções e demais procedimentos na cavidade bucal. Dessa forma, este estudo teve como proposição desenvolver formulação de hidrogel baseado em poloxamer-quitosana contendo eugenol, que oferece propriedade mecânica e mucoadesiva superior por proporcionar maior tempo

de retenção no local de aplicação. Assim, uma vez que a literatura não traz estudos específicos com esta perspectiva, o presente estudo surge como alternativa promissora para otimizar o tratamento das afecções que acometem a cavidade bucal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar um hidrogel baseado em poloxamer-quitosana contendo eugenol para aplicação na mucosa bucal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver hidrogel baseado em poloxamer-quitosana contendo eugenol nas concentrações de 1, 2 e 4% (p / p);
- Caracterizar o hidrogel desenvolvido através de determinação turbidimétrica, determinação de pH, temperatura de transição sol-gel e teste de espalhabilidade;
- Efetuar estudo de estabilidade submetendo as amostras a diferentes temperaturas e tempo de armazenamento;
- Proceder a caracterização reológica e análise de textura dos hidrogéis;
- Executar estudo de mucoadesão *ex vivo* do hidrogel contendo eugenol.

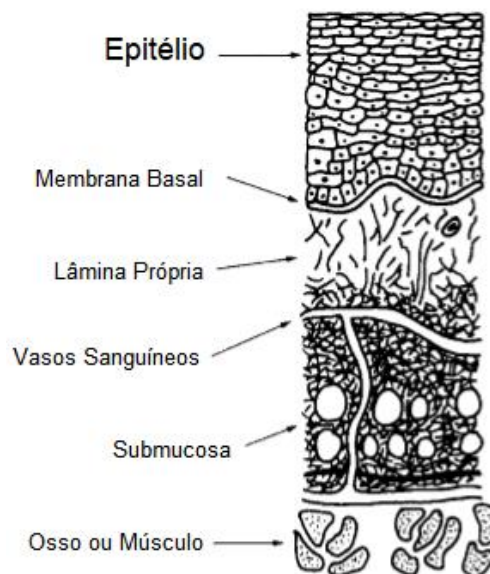
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NA CAVIDADE BUCAL

A cavidade bucal ou boca é o ponto de entrada de alimento e ar no corpo, sendo a boca e os lábios essenciais para os seres humanos para permitir a fala, modificando a passagem do ar. Esta estrutura é também referida como a cavidade bucal, mas estritamente falando, isso deve ser confinado à área da bochecha interna. A boca se estende dos lábios até a orofaringe na parte posterior e é dividida em duas regiões: (a) o vestíbulo oral externo, que é delimitado pelas bochechas e pelos lábios, e (b) o vestíbulo oral interior, que é delimitado pelos arcos maxilares e mandibulares dentais (WASHINGTON; WASHINGTON; G. WILSON, 2001).

A cavidade bucal e o vestíbulo são inteiramente revestidos por membranas mucosas relativamente lisas contendo numerosas glândulas pequenas. Divide-se em a) epitélio oral, b) membrana basal, que liga o epitélio ao tecido conjuntivo, c) lâmina própria, que é subjacente ao tecido conjuntivo e d) uma área que contém tecido adiposo ou tecido conjuntivo glandular com importantes vasos sanguíneos e nervos (CUBAYACHI, 2014). Estes tecidos localizam-se sobre uma camada de músculo ou osso, conforme mostrado na figura 1.

Figura 1. Representação da mucosa bucal.



Fonte: Adaptado de WASHINGTON; WASHINGTON; G. WILSON (2001).

A superfície da mucosa bucal é revestida por uma fina camada de muco, o que representa uma das barreiras para a liberação transmucosa bucal. O muco faz parte da saliva secretada pelas glândulas salivares. O componente chave do muco é a mucina que pertence à uma classe de glicoproteínas macromoleculares anfotéricas. A mucina representa apenas uma pequena proporção (1 – 5%) da constituição total do muco. Em valores de pH normal (6,8) da mucosa bucal, o muco está carregado negativamente devido ao ácido siálico e resíduos de sulfato, formando uma estrutura de gel fortemente coesiva que se fixa na superfície da célula epitelial como uma camada gelatinosa (LAM et al., 2013).

Os sistemas de liberação através da mucosa visam fornecer ação local e /ou sistêmica dos fármacos por meio de superfícies mucosas. Eles incluem uma grande variedade de formas e dosagens variando de líquido para semissólido e sólido. Novas e inovadoras ideias (incluem-se aqui estratégias que otimizam o sistema de liberação de substâncias, seja por aumento da característica de mucoadesão ou aumento da retenção da substância no local, entre outros) estão sendo cada vez mais acrescentadas a esses sistemas de liberação, a fim de melhorar ainda mais, sua eficácia e segurança (JUG et al., 2018).

A aplicação tópica de substâncias permite a ação direta na lesão oromucosa, aumentando assim a sua capacidade terapêutica. Numerosas afecções orais podem ser tratadas com eficácia por vários agentes terapêuticos tópicos, estes, tem sido amplamente utilizados como primeira linha de terapia em diferentes condições como infecções orais, distúrbios dos mais variados e mucosite. Há muitas formulações diferentes que são utilizadas para administração local de substâncias, como formulações mucoadesivas, géis, pomadas, sprays e enxaguatórios bucais (SHASTRY et al., 2015).

A liberação de fármacos através da mucosa bucal pode ser obtida através de 4 vias: (i) sublingual (assoalho da boca), (ii) bucal (revestimento das bochechas), (iii) orofaríngea (boca e garganta) e (iv) periodontal (gengivas). Variações na espessura e composição dos epitélios podem afetar a absorção do fármaco. A mucosa sublingual é a mais permeável seguida pela bucal, mesmo que ambas as regiões não sejam queratinizadas. O epitélio sublingual é, no entanto, mais fino e imerso na saliva, o que auxilia na absorção de substâncias (WASHINGTON; WASHINGTON; G. WILSON, 2001).

A permeação das substâncias através das membranas mucosas depende de vários aspectos da formulação, os quais determinarão a quantidade e a taxa liberada da substância da formulação, a solubilidade da substância na saliva e, portanto, a concentração da substância nos tecidos. Além disso, a formulação também pode influenciar no tempo em que a substância permanece em contato com a membrana mucosa, chamado tempo de residência. Já a concentração pode ser modulada pela quantidade de substância na formulação, pela sua taxa de liberação e pela sua solubilidade na saliva. Os dois primeiros fatores variam em função dos diferentes tipos de formulações, e o último pode ser influenciado pela alteração das propriedades da saliva que afetam a solubilidade (por exemplo, pH) (BATHEJA et al., 2006).

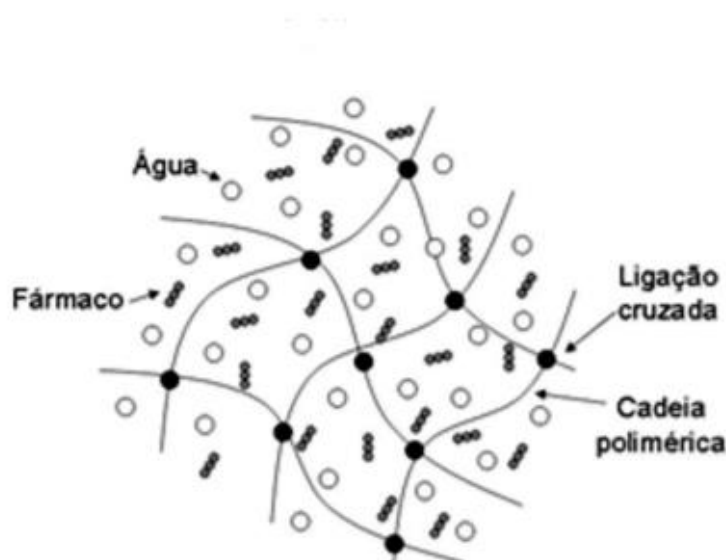
Rathbone; Pather; Senel (2015) descreveram em seu trabalho sobre as vantagens e as desvantagens da cavidade bucal para liberação de fármacos. O comparativo foi construído a partir de informações adaptadas das revisões já publicadas. Foi sugerido que há vantagens e desvantagens para esse local de liberação de fármacos. A cavidade bucal é um local atraente para liberação de fármacos, local ou sistêmico. Sendo assim, a decisão de utilizar a cavidade bucal para este fim, deve ser baseada em uma comparação com outros locais de liberação, no que diz respeito aos seguintes parâmetros: os objetivos clínicos do tratamento, as propriedades físico-químicas inerentes ao fármaco, as vantagens relativas da via, a oportunidade de diferenciação do produto, a população de pacientes que utilizará, o custo da produção e o tempo de pesquisa e desenvolvimento.

3.2 HIDROGÉIS PARA APLICAÇÃO NA MUCOSA BUCAL

Os hidrogéis são candidatos adequados para o propósito de aplicação de fármacos na mucosa bucal por conta de sua alta flexibilidade e biocompatibilidade, além de promover liberação sustentada de substâncias veiculadas (VRIES et al., 1988). Em geral, o termo hidrogel designa uma matriz hidrofílica intumescida ou dilatada com capacidade limitada de intumescimento em água ou meio aquoso (Figura 2). Os hidrogéis podem ser classificados em três tipos. No sentido estrito de 'hidrogéis', as cadeias moleculares da rede não são completamente liberadas da matriz por causa da reticulação. Assim, o limite entre a matriz e o meio aquoso é muito definida, e as moléculas do fármaco são liberadas através dos espaços entre a rede. Este tipo de hidrogel tem uma superfície lisa e é menos incompatível na boca. Por

outro lado, os hidrogéis em um sentido amplo incluem a matriz com materiais hidrossolúveis tais como derivados de celulose e gomas naturais. E, os pseudo-hidrogéis incham infinitamente e as moléculas componentes se dissolvem da superfície da matriz. A dissolução da matriz aumenta a viscosidade da saliva e, conseqüentemente, provoca uma boca pegajosa (NAGAI; MACHIDA, 1993).

Figura 2. Representação da estrutura do hidrogel.



Fonte: Adaptado de MELO et al. (2012).

Dependendo do mecanismo de formação de gel, os hidrogéis podem ser classificados como: (i) géis químicos (ou permanentes) se a transição solução – gel (Sol - gel) envolver a formação de uma rede polimérica quimicamente reticulada e (ii) géis físicos (ou reversíveis) se o gel se formar através de interações não covalentes entre as cadeias. No caso de géis físicos sensíveis ao estímulo, a transição sol - gel é desencadeada por alterações físico-químicas (GIOFFREDI et al., 2016).

Existem muitas estruturas de macromoléculas diferentes que são possíveis para a formação dos hidrogéis físicos e químicos. Eles incluem redes reticuladas ou entrelaçadas de homopolímeros lineares, copolímeros lineares e copolímeros de bloco ou enxerto. Os hidrogéis também podem ter muitas formas físicas diferentes, incluindo (a) formas moldadas sólidas (por exemplo, lentes de contato gelatinosas), (b) pó prensado (pílulas ou cápsulas para ingestão oral), (c) micropartículas (sistemas bioadesivos de tratamentos de feridas), (d) revestimentos (por exemplo, em implantes ou cateteres; em revestimento entérico em comprimidos), (e) membranas ou folhas

(emplastro de liberação transdérmica), (f) sólidos encapsulados (por exemplo, em bombas osmóticas), e (g) líquidos (que formam géis aquecendo ou resfriando) (HOFFMAN, 2012).

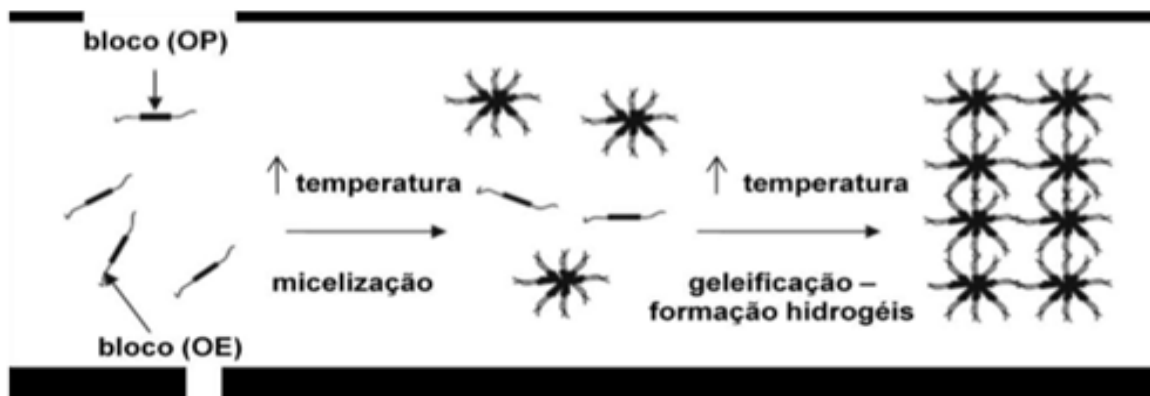
Desse modo, uma forma farmacêutica líquida baseada em uma solução de geleificação *in situ* composta por polímeros que sofrem transição sol - gel em contato com a mucosa, como resultado de mudanças de temperatura, pH ou presença de íons, induzidas pelo ambiente fisiológico, provaram ser uma forma de liberação controlada mais conveniente e eficiente (QI et al., 2007).

3.2.1 Poloxâmeros

Poloxâmeros são uma família de copolímeros triblocos com um bloco central de óxido de polipropileno hidrofóbico flanqueado por dois blocos de óxido de polietileno hidrofílico (FAKHARI; CORCORAN; SCHWARZ, 2017). Estes podem ser formados por poloxâmeros de poli(oxietileno) (OE) e poli(oxipropileno) (OP), que são os polímeros responsáveis pelas propriedades características do mesmo. Os poloxâmeros possuem propriedades de gelificação termossensível ou termorresponsível, em consequência da transição sol-gel em temperatura fisiológica. A gelificação depende da concentração do polímero, que em solução aquosa, organiza-se em micelas (Figura 3) com o aumento da temperatura. A formação de micelas leva ao aumento da viscosidade (ALVES, 2018).

Esta característica de termogelificação resulta de interações entre diferentes segmentos do copolímero. A agregação em micelas é devido à desidratação de blocos poli - OP hidrofóbico, o que representa o primeiro passo para o processo de gelificação. Desse modo, as micelas apresentam-se esféricas com núcleo poli – OP desidratado com um envoltório externo de cadeias de poli- OE inchadas. Essa micelização é seguida por geleificação e esta é atribuída ao “empacotamento” ordenado das micelas (DUMORTIER et al., 2006). O gel físico formado após essa transição sol - gel propicia uma melhor propriedade acerca do aumento tempo de residência no local de aplicação, otimizando a eficácia de sistemas de liberação de fármacos.

Figura 3. Processo de geleificação dos polaxâmeros.



Fonte: Adaptado de ALVES (2018).

Entre os poloxâmeros, o poloxamer 407 é um tensoativo não iônico com uma ampla gama de aplicações. O peso molecular do poloxâmero 407 é de aproximadamente 12,6 kDa com comprimentos de dois blocos de óxido de polietileno hidrofílico de 101 unidades de repetição e um bloco de óxido de polipropileno hidrofóbico de 56 unidades de repetição, as quais estão arranjadas em cadeias na forma de tribloco. O poloxâmero 407 está comercialmente disponível como Pluronic® 127 ou Lutrol® 127. É descrito como um “ingrediente inativo” pela *Foods and Drugs Administration* (FDA) para uma variedade de medicamentos, tais como em: soluções orais, suspensões, formulações inalatórias, intravenosas, oftálmicas ou tópicas (FAKHARI; CORCORAN; SCHWARZ, 2017).

As soluções aquosas de poloxâmero 407 mostram-se com propriedades termorreversíveis, o que desperta grande interesse para a otimização de formulações. O fenômeno da termogeificação é perfeitamente reversível e é caracterizado por uma temperatura de transição sol-gel. Abaixo desta temperatura de transição, a amostra permanece fluida e acima desta temperatura, a solução torna-se semissólida (DUMORTIER et al., 2006).

As técnicas mais comumente empregadas para determinação da transição (Tsol / gel) são reometria e análise visual. Para formulações com 18% (p / p) de poloxâmero 407, os valores de T_{sol / gel} apresentam-se entre 25 °C e 32 °C quando obtidos por dados reológicos e, através de análise visual, esses valores se encontram entre 28 °C e 32 °C. Para formulações ternárias de hidrogéis baseados em poloxamer, estudos mostram que a T_{sol / gel} é dependente da natureza do terceiro componente, bem como sua porcentagem. Para formulações de poloxâmero / água / polietileno

(PEG 6000), um estudo de Edsman e colaboradores (1998), mostrou que, em comparação com uma binária de poloxâmero / água, a T_{sol} / gel aumentou com 2% de PEG e diminuiu com 5% e 7% de PEG. Em contraste, ao avaliar hidrogéis de poloxâmero / água / vancomicina, nenhuma mudança na T_{sol} / gel foi observada com a adição do terceiro componente, enquanto que para uma formulação de poloxâmero / água / carbopol 934, a T_{sol} / gel diminuiu com o aumento da concentração de carbopol 940 (PEREIRA; DIMER; GUTERRES, 2013).

E por essas propriedades, o poloxâmero 407 tem sido usado para formulações sublinguais ou preparações orais. Formulação sublingual de triancinolona acetonida contendo poloxâmero 407 (20% - p/p) e carbopol (1% - p/p) apresentou resultados promissores de acordo com a maior viscosidade e bioadesividade, por aumentar o tempo de permanência sublingual. E outro sistema de liberação bucal combinado contendo poloxamer 407 (20% - p/p) e desoxicolato de sódio apresentou melhoria da biodisponibilidade do fármaco, numa taxa de aumento de 1.74x (DUMORTIER et al., 2006).

Vários polímeros hidrofílicos, por exemplo, derivados de celulose hidrossolúveis, ácido poliacrílico e quitosana foram incorporados aos hidrogéis de poloxâmero como agentes auxiliares para liberação de fármacos e/ou melhora da sua capacidade mucoadesiva. Nestes sistemas, o poloxâmero atua como agente gelificante e o polímero secundário como um agente carreador (PEREIRA; DIMER; GUTERRES, 2013).

De modo que o poloxamer 407 em si, não possui propriedade mucoadesiva e a retenção local de um hidrogel *in situ* é curta devido ao forte mecanismo de auto-eliminação das cavidades corporais, as tentativas de melhorar as suas propriedades mucoadesivas envolvem a adição de outros ativos, como a quitosana e/ou carbopol por exemplo (CI et al., 2017).

3.2.2 Sistemas de liberação mucoadesivos

O termo mucoadesão é definido como o estado em que uma superfície biológica coberta por uma camada de muco e uma superfície sintética são mantidas juntas por um longo período de tempo para formarem ligações por meio de forças interfaciais. Essa interface criada entre a camada de muco e uma superfície sintética

é chamada de junção mucoadesiva e, normalmente envolve um polímero natural e/ou sintético (SANDRI et al., 2012).

Os sistemas de liberação mucoadesivos de fármacos oferecem benefícios em relação às formulações convencionais, pois possuem tempo de residência prolongado do fármaco no local de aplicação, permeabilidade relativamente maior nas membranas mucosas, o que permite rápida absorção do fármaco, e maior biodisponibilidade na circulação sistêmica. A mucoadesão, definida como a capacidade de aderir à camada de gel mucoso, é um elemento-chave na concepção desses sistemas de liberação de fármacos (KAUR, A.; KAUR, G., 2011).

No desenvolvimento de sistemas de administração mucoadesivos de fármacos, o tempo de contato no local de absorção da molécula pretendida é importante para a absorção seletiva e efetiva. O efeito mucoadesivo de um excipiente em uma formulação mucoadesiva deve diminuir a taxa de liberação e movimento da substância através da mucosa, permitindo assim maior tempo de contato com o epitélio absorvivo. Esta extensão de contato com o local de absorção pode ser benéfica especialmente para fármacos hidrofílicos ou de alto peso molecular, como peptídeos e proteínas (SNYMAN; HAMMAN; KOTZE, 2003).

Diversas classes de polímeros foram investigadas pelo uso potencial como mucoadesivos. Esses incluem polímeros sintéticos como o cianoacrilato monomérico; ácido poliacrílico como policarbofila e carbômeros; polímeros derivados da celulose como hidroxietilcelulose e carboximetilcelulose e derivados de polimetacrilato. Além da ocorrência dessa propriedade para polímeros naturais como ácido hialurônico, alginatos e quitosana e, mais recentemente, lecitina e seus derivados (VRIES et al., 1988; CARVALHO et al., 2010).

Várias teorias foram relatadas para explicar a propriedade de efeito mucoadesivo dos polímeros, algumas das quais enfatizam a importância da ocorrência de interações específicas entre macromoléculas e mucinas (SOGIAS; WILLIAMS; KHUTORYANSKIY, 2008).

3.2.3 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural catiônico derivado de quitina por desacetilação parcial de seus grupos acetamido em soluções alcalinas fortes. A quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, é

o principal constituinte do exoesqueleto dos crustáceos e insetos. Nas últimas duas décadas, a quitosana tem sido usada para várias aplicações farmacêuticas em sistemas de liberação de fármacos devido à um conjunto de propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, propriedades de absorção, capacidade de formar membranas, bioadesividade, entre outras (MOURA, 2012).

A carga positiva da quitosana é considerada o principal fator responsável por suas propriedades mucoadesivas; as interações eletrostáticas entre a camada de muco contendo mucina carregada negativamente e quitosana carregada positivamente é a provável razão para sua boa adesão nas superfícies mucosas. O uso de quitosana em sistemas de liberação de fármacos tem sido aplicado para usos sistêmico ou local, demonstrando ser um excipiente valioso em comprimidos, emulsões, pós e géis, fornecendo uma liberação controlada da substância encapsulada (ANDERSEN et al., 2015).

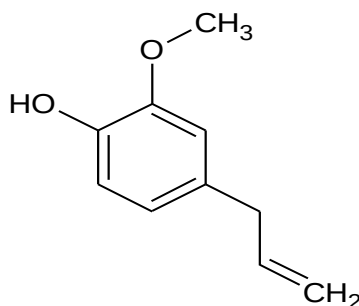
Snyman; Hamman; Kotze (2003), em seu estudo, avaliaram as interações da quitosana trimetilada com diferentes níveis de quaternização e demonstraram que a presença de grupos de amônio quaternário é prejudicial para a mucoadesão. Os autores relataram esse efeito adverso em detrimento das mudanças de conformação da quitosana trimetilada. Acredita-se que esse efeito também pode ser devido à natureza dos grupos amino quaternários, os quais podem interagir eletrostaticamente com as mucinas, mas deixariam de formar pontes de hidrogênio (SOGIAS; WILLIAMS; KHUTORYANSKIY, 2008).

A mucoadesão da quitosana também foi estudada por Lehr et al. (1992), o qual sugeriu que não somente ocorre a adesão por hidratação que atrai a água da camada mucosa, mas também por ligações de hidrogênio e interações iônicas entre as cargas positivas do grupamento amino do polímero e as partes negativamente carregadas que a camada mucosa está envolvida. As interações da quitosana com o muco e suas propriedades mucoadesivas são afetadas por ambos os fatores fisiológicos (como a espessura da camada de muco) e pelas propriedades físico-químicas da quitosana. A extensão da mucina adsorvida pela quitosana aumenta com o crescimento dos resíduos de ácido siálico. Como as quantidades de ácido siálico em secreções mucosas variam, a força de adesão da quitosana ao muco também pode variar dependendo da mucosa considerada (SANDRI et al., 2012).

3.3 EUGENOL EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NA CAVIDADE BUCAL

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) consiste em um composto aromático (Figura 4) e representa o principal constituinte de plantas como cravo, canela, sassafrás e mirra. É um membro dos fenilpropanoides, uma grande família de compostos orgânicos que contém um anel fenil e uma cadeia lateral C3. Os fenilpropanoides são sintetizados em plantas a partir da fenilalanina, aminoácido essencial, para conferir vários papéis importantes, como antibióticos, pesticidas naturais, agentes de proteção contra luz ultravioleta, componente essencial da parede celular e atrativo para polinizadores. Outros fenilpropanoides bioativos incluem carvacrol, timol, cinamaldeído, ácido salicílico, vanilina e cumarina. Enquanto o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* ou *Eugenia caryophyllata*) contém a maior porcentagem de eugenol em seu extrato de óleo, o eugenol também é encontrado na pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica*), manjerição (*Ocimum basilicum* e *tenuiflorum*), pimenta racemosa (*Pimenta racemosa*), craveiro (*Dianthus caryophyllus*), e canela (*Cinnamomum verum*) (CHUNG; OH, 2013).

Figura 4. Estrutura química do eugenol.



Fonte: A autora.

Em aplicações biológicas, o eugenol tem sido amplamente utilizado em Odontologia no ambiente bucal e também como agente aromatizante em produtos cosméticos e alimentares, isso decorre do seu reconhecimento como material seguro

pela FDA. Além disso, possui propriedade antioxidante devido à sua estrutura fenólica (JUNG; CHUNG; LEE, 2006).

O eugenol foi comumente utilizado em curativos após cirurgias periodontais na década de 1960. Passou a ser amplamente utilizado na Odontologia como princípio ativo de materiais de preenchimento, cimentos endodônticos e curativos periodontais. No entanto, o uso tradicional do eugenol não foi limitado a analgésicos e antissépticos, mas também pelas suas propriedades anestésicas, antiemética, antiespasmódica, antiparasitária e cicatrizante (CHUNG; OH, 2013).

O eugenol é uma substância lipofílica usada para tratar a hipersensibilidade dentária, uma condição caracterizada pela ocorrência de dor ou desconforto quando estímulos leves são aplicados à dentina exposta (POKHARKAR et al., 2011).

Por se tratar de um composto fenólico, mostra também atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima ciclooxygenase II; tem atividade analgésica pela ligação seletiva aos receptores de capsaicina; e ação antibacteriana (1mg / mL) contra bactérias gram positiva e gram negativa. O eugenol também inibe a função de macrófagos, portanto, promove influência sobre o sistema imunológico (JADHAV et al., 2004).

O eugenol demonstrou ser eficaz na anestesia de peixes, incluindo a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), o peixe bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) e ratos. Uma dose baixa de eugenol de 65 mg / L induziu anestesia bem-sucedida e segura em peixes tambaqui (*Colossoma macropomum*). O mecanismo anestésico do eugenol pode envolver sua capacidade de bloquear impulsos nervosos como demonstrado em nervo ciático da rã-touro. Outro estudo observou que o eugenol retardou a condução nervosa no lagostim e o tornou menos excitável. Registrou-se ainda, a inibição reversível do impulso nervoso e potenciais de ação compostos pelo eugenol no nervo pulpar de gatos adultos e no nervo frênico, ciático, e neurônios do gânglio cervical superior de ratos. Outro estudo, no nervo vago em ratos, sugeriu que o eugenol é mais eficaz que a lidocaína na inibição do potencial de ação nas fibras nervosas C. Estes resultados *in vivo* e *ex vivo* sugerem que o eugenol pode ter um efeito direto nos canais iônicos nas fibras nervosas sensoriais periféricas (CHUNG; OH, 2013).

Foi desenvolvida e estudada por Pokharkar et al., (2011) uma formulação de gel com carreadores lipídicos nanoestruturados contendo eugenol para liberação controlada e sustentada no ambiente periodontal. Como o tamanho da nanopartícula foi menor que 400 nm, houve retenção prolongada na cavidade periodontal. Assim, a

formulação de gel contendo os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo eugenol foram propostas como eficazes para a distribuição periodontal, proporcionando uma liberação rápida inicial, para ação rápida, com subsequente liberação prolongada de eugenol.

Um estudo de Rapp (2007), simples-cego randomizado, foi realizado em 73 indivíduos para avaliar a ação anestésica do óleo de cravo em comparação com a benzocaína. As escalas de dores entre o gel de cravo e os grupos de benzocaína não foram significativamente diferentes, mas foram significativamente inferiores ao grupo placebo. Assim, o estudo mostrou que o óleo de cravo é um anestésico tópico de baixo custo e facilmente disponível, que pode ser usado como alternativa ao gel de benzocaína.

Jadhav et al. (2004) relataram o desenvolvimento e avaliação de tabletes mucoadesivos de liberação controlada para aplicação gengival contendo eugenol, os quais foram preparados com carbopol e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). A liberação controlada da formulação mucoadesiva por um período de 8 h mostrou-se vantajosa em relação ao seu uso convencional com boa correlação nos testes *in vitro* e *in vivo*. Estes resultados indicaram o aumento no potencial do eugenol como antibacteriano, analgésico local e tratamento anestésico devido a sua veiculação em formulação mucoadesiva.

Dessa forma, em busca de uma formulação que consiga entregar concentrações adequadas de eugenol na cavidade bucal para exercer as suas propriedades terapêuticas, propõe-se as formulações a base de hidrogéis de característica termossensível de transição de fase, que vem demonstrando efetividade na veiculação de substâncias. Tais formulações tem o intuito de otimizar o efeito do eugenol no local de aplicação pela promoção de liberação controlada e sustentada do fármaco, via mucosa, devido à adição de biopolímeros, como a quitosana, capazes de aumentar a capacidade mucoadesiva dos hidrogéis, sem comprometer suas características. Assim, hidrogéis termossensíveis com mucoadesividade para liberação controlada e localizada de eugenol apresentam-se como formulação promissora para o segmento odontológico para tratamento anestésico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético (Quimis, modelo Q241M, São Paulo, Brasil);
- Analisador de textura (Texturômetro TA-XT Plus, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica (LCD series, modelo EL-620AB-BI, Paraná, Brasil);
- Balança semi-analítica (Bel, modelo IT1300877, São Paulo, Brasil);
- Banho-maria (Kacil, modelo BM-02, Pernambuco, Brasil);
- Centrífuga (Centrilab, modelo CE80I);
- Deionizador de água (Gehaka, modelo OS10LX, São Paulo, Brasil);
- Espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis, MA, USA);
- Estufa (Quimis, São Paulo, Brasil);
- Geladeira (Electrolux, Paraná, Brasil);
- pHmetro (Quimis, São Paulo, Brasil);
- Reômetro (TA Instruments, modelo DRH2, DE, EUA);
- Ultrassom (Unique, São Paulo, Brasil);

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Eugenol ($\geq 99\%$ de pureza, Sigma-Aldrich, MO, EUA).

4.2.2 Polímeros

- Poloxamer 407- Lutrol® F127 [Poli (etileno glicol) – co – poli (propileno glicol) – co – poli (etileno glicol)], Sigma- Aldrich (Steinheim, Alemanha).
- Quitosana – Chitosan [β -(1,4) -2-acetamido – D-glicose e β -(1,4) -2-amino – D-glicose] (Fagron, São Paulo, Brasil).

4.2.3 Solventes e demais reagentes

- Ácido acético glacial P.A. (Dinâmica Química, São Paulo, Brasil);
- Água deionizada por osmose reversa (Gehaka, modelo OS10LX, São Paulo, Brasil).
- Etanol 96°GL (All Chemistry, São Paulo, Brasil);
- Sorbato de potássio (Embrafarma, São Paulo, Brasil).

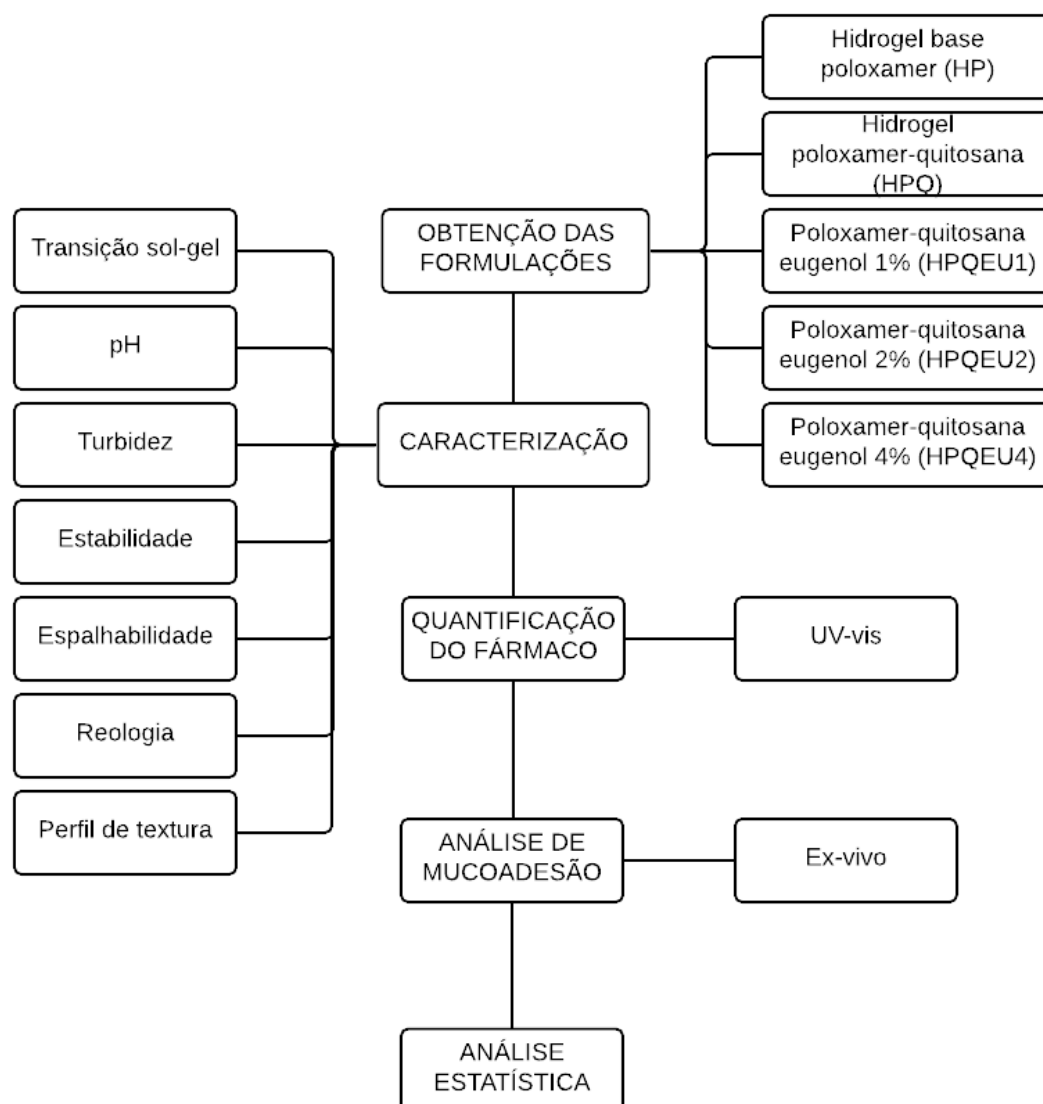
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram definidos para este estudo 5 grupos experimentais: hidrogel poloxamer (HP), hidrogel poloxamer-quitosana (HPQ), hidrogel poloxamer-quitosana com eugenol a 1% p/p (HPQEU1), hidrogel poloxamer-quitosana com eugenol a 2% p/p (HPQEU2), hidrogel poloxamer-quitosana eugenol a 4% p/p (HPQEU4).

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A pesquisa consistiu em diferentes etapas sequenciais. A etapa inicial correspondendo à obtenção das formulações de hidrogéis. Em seguida, procedeu-se as etapas de caracterização físico-química das formulações com determinação da transição sol - gel; determinação de pH e turbidez; estudo de estabilidade – centrifugação; determinação de pH e turbidez em diferentes temperaturas e tempos de armazenamento; determinação de espalhabilidade; análises das propriedades reológicas e perfil de textura; quantificação do fármaco; avaliação das propriedades mucoadesivas *in vitro*. As etapas constam esquematizadas a seguir (Figura 5):

Figura 5. Etapas experimentais do estudo.



Fonte: A autora.

4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.5.1 Preparo dos hidrogéis

Foram preparadas formulações, em triplicata, do hidrogel base compostas pelo co-polímero poloxamer 407 - Lutrol® F127 (óxido de etileno e blocos de óxido de propileno) 20% (p/p) e sorbato de potássio (0,2%, (p/p)) em água purificada por osmose reversa.

No preparo do hidrogel base (HP), a água purificada por osmose reversa previamente gelada foi pesada e, o sorbato de potássio dissolvido completamente. Em seguida, foi adicionado aos poucos o poloxamer 407. As misturas foram mantidas em recipientes fechados, ao abrigo da luz e em geladeira (4 °C) por 24h até formar uma solução límpida (ALVES, 2018).

Para o preparo do hidrogel poloxamer-quitosana (HPQ), inicialmente a quitosana (1% - p/p) foi dissolvida em uma solução de ácido acético glacial a 1% v/v. O ácido foi adicionado à metade da água a ser utilizada e a quitosana adicionada à água ácida e misturada lentamente. Após a dissolução da quitosana, o restante da água foi adicionado e misturado em agitador magnético a 500 rpm até que um gel homogêneo fosse obtido. Após, o poloxamer 407 foi adicionado à solução de quitosana e homogeneizado (TUGCU-DEMIROZ, 2017). A mistura foi mantida em recipiente fechado, ao abrigo da luz e em geladeira (4 °C) por 24h até a incorporação completa do poloxamer. Após 24 h, o eugenol foi incorporado às formulações HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4, conforme concentração previamente estabelecida. As formulações foram mantidas sob refrigeração, em frascos fechados, envolvidas em papel alumínio. As concentrações apresentam-se dispostas na Tabela 1:

Tabela 1 - Composição das formulações de hidrogel.

	HP	HPQ	HPQEU1	HPQEU2	HPQEU4
Componentes	Porcentagem				
Poloxamer 407	20%	20%	20%	20%	20%
Sorbato de potássio	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
Quitosana	-----	1%	1%	1%	1%
Ácido acético	-----	1%	1%	1%	1%
Água purificada	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g
Eugenol	-----	-----	1%	2%	4%

Fonte: Adaptado de Alves (2018).

4.5.2 Determinação da transição de fase Sol→Gel

A temperatura de transição da fase líquida (Sol) para a fase gel (Tsol / gel) é verificada nos sistemas termossensíveis. Abaixo desta temperatura, a solução aquosa de poloxamer 407 permanece líquida e acima desta temperatura a solução torna-se semissólida. A temperatura de transição para cada formulação foi determinada pelo

método de inversão de tubos. Amostras (10 g) foram coletadas em tubos de ensaio de diâmetro interno de cerca de 10 mm. As amostras em uma temperatura inicial de 4 °C, foram submetidas ao banho-maria, e a cada elevação de aproximadamente 2 °C, as amostras foram analisadas visualmente. A T_{sol} / gel foi determinada quando a amostra líquida no tubo se apresentou como fase sólida imóvel no fundo do tubo (SHARMA et al., 2017).

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.6.1 Determinação de pH

Os valores de pH dos hidrogéis foram determinados com um medidor potenciométrico de pH em temperatura ambiente após 24 horas da preparação. Após a calibração do aparelho com as soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, as amostras foram diluídas a 10% (p/p) conforme a orientação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para produtos semissólidos. A medida foi registrada após a estabilização do valor indicado. As medidas foram realizadas em triplicata e a média aritmética desses valores foi apresentada como resultado desta etapa.

4.6.2 Determinação turbidimétrica

Os hidrogéis devem ser soluções transparentes a baixa temperatura. Sendo assim, a transmitância (%T) determina se a solução é límpida ou não. A porcentagem de %T é inversamente proporcional a turbidez da formulação. As amostras, sem qualquer diluição, foram dispostas nas cubetas. O espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda 650 nm foi utilizado para a determinação de %T. As leituras da amostra foram determinadas ajustando a %T de água a 100% (branco) (SHARMA et al., 2016).

4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS

Os parâmetros a serem avaliados nas formulações submetidas a testes de estabilidade devem ser pré-definidos e dependem das características da formulação em estudo e dos componentes utilizados na formulação.

Seguindo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004) procedeu-se o teste de centrifugação dos hidrogéis. Cada amostra (10 g) à temperatura ambiente, foi disposta em tubos Falcon e submetida à centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos. O objetivo do teste é produzir estresse à formulação, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas. Nessa etapa, o produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Se aprovado nesse teste, o produto pode ser submetido aos demais testes de estabilidade.

Após a centrifugação, as formulações de hidrogel foram submetidas a estudos de estabilidade a diferentes temperaturas de armazenamento, 5 ± 2 °C, 25 ± 2 °C e 45 ± 2 °C por 30 dias em embalagens (bisnagas de plástico) seladas. O percentual de conteúdo do eugenol e a porcentagem de perda foram determinados nos tempos 1, 7, 15, 30 dias. A estabilidade físico-química dos hidrogéis também foi estudada por meio de limpidez e transparência das formulações pela determinação turbidimétrica, bem como foi realizada a verificação do pH, parâmetros que são importantes para pesquisar alterações na estrutura das formulações que eventualmente não são perceptíveis visualmente. Estas análises podem indicar problemas de estabilidade entre os princípios ativos ou decorrentes do processo de fabricação (ANVISA, 2004; SHARMA et al., 2017).

Também se procedeu a avaliação das características organolépticas, as quais determinam os parâmetros de aceitação. De um modo geral, avaliam-se a cor e o odor, que devem permanecer estáveis por, no mínimo, 15 dias à luz solar. Pequenas alterações são aceitáveis em temperaturas elevadas. Avaliam-se ainda, o aspecto da formulação, em que o produto deve se manter íntegro durante todo o teste, conservando seu aspecto inicial em todas as condições, exceto em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos em que pequenas alterações são aceitáveis (ANVISA, 2004).

4.8 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE

A avaliação da espalhabilidade dos hidrogéis procedeu-se em temperatura ambiente. Utilizou-se como base uma folha de papel milimetrado e sobre ela foram traçados os lados de uma lâmina de vidro para microscopia. Em seguida, traçaram-se as diagonais da lâmina de vidro, formando-se assim, um ponto central (Figura 6).

Aplicou-se aproximadamente 50 mg da amostra, no centro de uma lâmina, a qual foi posicionada sobre o desenho feito inicialmente na folha de papel milimetrado. Uma outra lâmina de vidro, de peso determinado (4,78 g), foi então suavemente posicionada sobre a primeira lâmina contendo a amostra em análise e, após 1 minuto, anotou-se o raio médio do círculo formado pelo espalhamento da amostra (GIAROLA, 2015). O mesmo procedimento foi seguido, sempre com intervalos de 1 minuto, adicionando-se pesos determinados de 4,745 g, 5,011g e 4,968, conforme Tabela 2.

Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado. A determinação da espalhabilidade foi designada pela equação:

$$E_i = (d^2 \times \pi) / 4$$

Em que:

E_i = espalhabilidade da amostra para peso i em mm^2

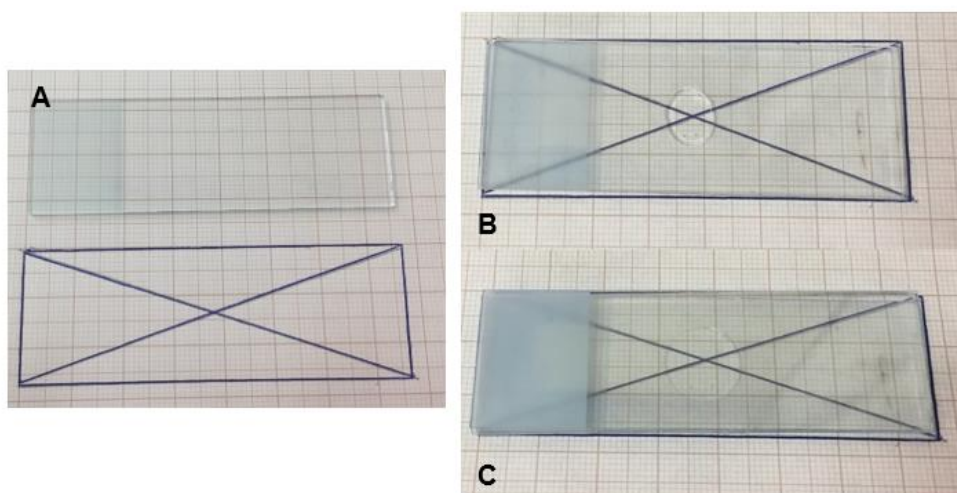
d = diâmetro médio (mm)

Tabela 2. Determinação da espalhabilidade e pesos utilizados.

Determinação	Pesos utilizados
1 ^a	Lâmina de vidro (4,780 g)
2 ^a	Lâmina de vidro (4,780 g) + peso 4,745 g
3 ^a	Lâmina de vidro (4,780 g) + peso 4,745 g + peso 5,011 g
4 ^a	Lâmina de vidro (4,780 g) + peso 4,745 g + peso 5,011 g + peso 4,968 g

Fonte: A autora.

Figura 6. Teste da espalhabilidade.



Legenda: Placa base sobre papel milimetrado. (A); Aplicação da lâmina de vidro sobre a amostra. (B); Aplicação das lâminas, onde atingiu-se o peso máximo de 19,504 g, ao final do procedimento. (C).

Fonte: A autora.

4.9 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

As análises oscilatórias dos hidrogéis, foram realizadas em triplicata, utilizando o reômetro. A geometria de eleição foi a cone-placa com as configurações de 40 mm de diâmetro, ângulo de inclinação do cone de 2° e *gap* de 57 μm (Figura 7). Os procedimentos foram calibrados através do software TRIOS®, utilizando a faixa de temperatura de 15 – 60 °C com taxa de aquecimento de 5 °C / min, conduzidos a uma taxa de estresse / tensão constante de 1%, para garantir que todas as formulações fossem testadas dentro de sua faixa viscoelástica linear, e varredura de frequência de 0,1 – 20 Hz.

Após a configuração dos parâmetros, amostras de cada formulação foram cuidadosamente posicionadas no centro da placa inferior “*peltier plate*”, aplicando-se o “*trim gap*”, para remoção dos excessos em torno da geometria, e em seguida “*zero gap*” para início da análise. Os valores do modo elástico ou de armazenamento (G' em Pa), viscoso ou de perda (G'' em Pa), foram obtidos ao longo do teste através do *software* (ALVES, 2018).

Figura 7. Reômetro oscilatório.



Fonte: A autora.

4.10 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA

As análises de dureza, compressibilidade, adesividade, coesividade e elasticidade das formulações de hidrogel *in situ* foram determinadas utilizando um analisador de textura (Figura 8). As amostras foram dispostas, todas em triplicata, em embalagens com diâmetro de 80 mm e 15 mm de altura e antes de proceder-se a análise, os hidrogéis foram submetidos a banho de ultrassom para remover as bolhas de ar a 37 °C. As análises do perfil de textura procederam-se com as amostras em temperatura ambiente.

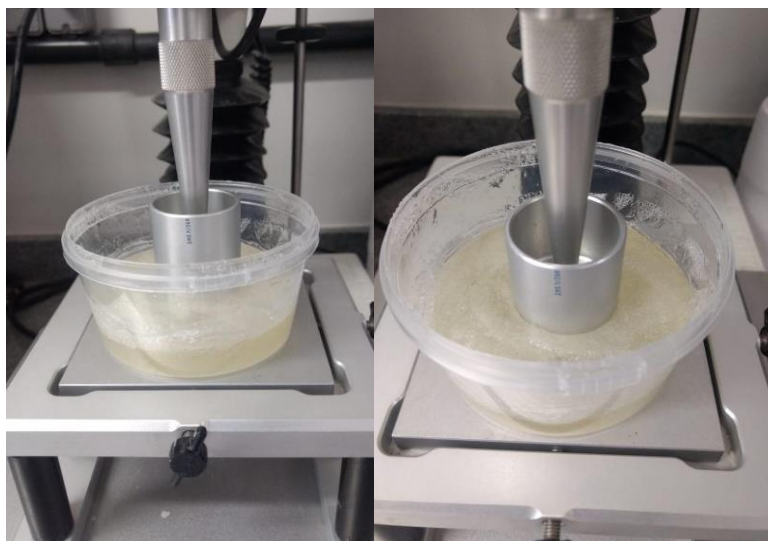
Uma probe analítico (36 mm de diâmetro) foi duas vezes comprimido em cada formulação de hidrogel até uma profundidade definida (15 mm) e taxa de 2 mm. s⁻¹, com um período de atraso definido (15 s), entre o começo da segunda e o fim da primeira compressão. Utilizando um gráfico força-tempo, foram determinados os parâmetros mecânicos de dureza, compressibilidade, adesividade, coesividade e elasticidade das formulações de hidrogel (TUGCU-DEMIROZ, 2017), conforme quadro abaixo:

Quadro 1. Parâmetros mecânicos de perfil de textura.

Parâmetro mecânico	Definição
Dureza	Força necessária para atingir uma dada deformação ou a força máxima de pico durante o primeiro ciclo de compressão. Mede a força necessária para produzir deformação dos géis.
Compressibilidade	Trabalho necessário para deformar o produto durante a primeira compressão da sonda.
Adesividade	É a área de força negativa para o primeiro ciclo de compressão e representa o trabalho necessário para superar as forças de atração entre a superfície do gel e a superfície da sonda.
Coesão	É a razão da área sob a curva força-tempo produzida no segundo ciclo de compressão para aquele produzido na primeira compressão, determina a capacidade de reconstrução do gel após a aplicação.
Elasticidade	Razão do tempo requerido para alcançar a máxima deformação estrutural no segundo ciclo de compressão àquele no primeiro ciclo. Direção da reconstrução do gel após sua deformação por compressão ao longo de um definido período de tempo.

Fonte: Adaptado de Tugcu-Demiroz (2017).

Figura 8. Análise de textura.



Fonte: A autora.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO

4.11.1 Varredura espectrofotométrica (UV-Vis)

Para identificar o comprimento de onda de absorção máxima do eugenol (λ máx) preparou-se uma solução de eugenol na concentração de 100 mg / mL. O solvente utilizado foi uma solução etanol / água na proporção de 60/40 (v/v), respectivamente. Após o preparo da solução de eugenol foi realizada uma varredura num comprimento de onda de 200 a 400 nm.

4.11.2 Curva analítica do eugenol

A linearidade foi determinada seguindo os parâmetros da RDC nº 166 de 2017 para validação de métodos analíticos. Para determinação da curva analítica, foram preparadas sete amostras, em duplicata, com concentrações crescentes de eugenol, 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 35 μ g / mL.

As diluições procederam-se a partir de uma solução mãe de eugenol, na concentração de 1 mg / mL, utilizando como solvente uma solução etanol / água (60 / 40, v / v). Pesou-se 100 mg do eugenol e dissolveu-se esta quantidade em 100 mL do solvente. Transferiu-se 5 mL desta solução para um balão volumétrico de 100 mL, e

completou-se o volume com o mesmo solvente. Homogeneizou-se esta solução padrão. Enumerou-se 7 balões volumétricos de 10 mL, e procedeu-se as diluições. As diluições transcorreram conforme a Tabela 3. O comprimento de onda utilizado foi estabelecido conforme obtido na varredura espectrométrica.

Tabela 3. Diluições da solução padrão.

TUBO	Volume de solução padrão (mL)	Volume de solvente (mL)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
Branco	0	10	0
1	1	9	5
2	2	8	10
3	3	7	15
4	4	6	20
5	5	5	25
6	6	4	30
7	7	3	35

Fonte: A autora.

4.11.3 Determinação do teor de eugenol nos hidrogéis

Para a determinação do teor de eugenol nas formulações, foram preparadas soluções das amostras HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4. Pesou-se 1 g da amostra e diluiu-se em 10 mL da solução solvente etanol/água (60/40). Transferiu-se 5 mL para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se com a solução solvente. Transferiu-se 1 mL para um balão de 10 mL e completou-se o volume com a solução solvente. Ao final das diluições, as três amostras apresentaram-se com as seguintes concentrações: HPQEU1 (5 $\mu\text{g} / \text{mL}$); HPQEU2 (10 $\mu\text{g} / \text{mL}$); HPQEU4 (20 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

Após as devidas diluições, seguiu-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis, utilizando como branco, uma solução preparada com o HPQ, seguindo as mesmas diluições realizadas para as amostras com eugenol. Aplicou-se o comprimento de onda de maior absorção encontrado na varredura. O teor de eugenol contido nas formulações foi determinado através do cálculo obtido pela equação da reta a partir da curva analítica. As análises procederam-se em triplicata.

4.12 ESTUDO DE MUCOADESÃO *EX VIVO*

O teste de mucoadesão *ex vivo* do hidrogel de poloxamer e poloxamer-quitosana *in situ* foi realizado utilizando um analisador de textura (Figura 9) com célula de carga de 5 Kg, com probe cilíndrico de alumínio de 32 mm com um suporte mucoadesivo. A mucosa bucal (amostras de 1,5 cm²) foi obtida de bochecha de porco

recém-abatido, após a retirada de toda a parte muscular e outros tecidos que não seriam de interesse. A mucosa bucal foi congelada a - 20 °C e embalada em plástico filme e papel alumínio. No momento do experimento, a mucosa bucal foi descongelada à temperatura ambiente em solução salina. A análise das amostras procedeu-se em triplicata.

A temperatura foi controlada a aproximadamente 37 °C, pela adaptação de um agitador magnético. Após, a mucosa foi fixada com cola de cianocrilato em um recipiente de vidro (pote Paladon) e posicionada sobre a placa aquecida, na extremidade inferior da sonda e, então, a mucosa foi umedecida com saliva artificial, espalhando por toda a superfície da mesma. A saliva artificial foi adquirida comercialmente em farmácia magistral, com composição química à base de carboximetilcelulose (CMC); sorbitol, cloretos de potássio, de sódio e magnésio. Após o preparo inicial, foram aplicadas sobre a mucosa os hidrogéis (HP, HPQ, HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4). Uma força constante de contato de 0,5 N foi mantida por 120 s sobre o sistema mucosa / mucoadesivo. Decorrido o tempo, o equipamento eleva a sonda em uma velocidade constante, até que ocorra a separação do sistema e obtenção das medidas de interesse (CESTO, 2018; TUGCU-DEMIROZ, 2017).

Figura 9 - Teste de mucoadesão. Adaptação do texturômetro para realização do teste.



Fonte: A autora.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

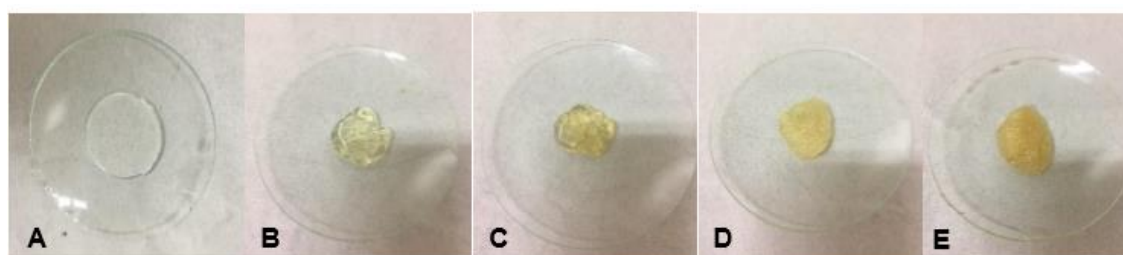
Os dados foram expressos em porcentagem ou média $\pm$ desvio padrão (DP) e analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido por teste *post hoc* de Newman Keuls. Significâncias estatísticas foram consideradas como $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DOS HIDROGÉIS

Os hidrogéis HP e HPQ apresentaram-se com aspecto semissólido, inodoro, translúcido e com estrutura homogênea à temperatura ambiente. As formulações HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4 se apresentaram com aspecto semissólido, cor levemente amarelada, odor característico (eugenol), e estrutura homogênea à temperatura ambiente. Dentre essas, as formulações HPQEU2 e HPQEU4 apresentaram notável aspecto opaco em comparação com as demais amostras (Figura 10).

Figura 10 - Formulações preparadas.



Legenda: HP (A); HPQ (B); HPQEU1 (C); HPQEU2 (D); HPQEU4 (E).
Fonte: A autora.

5.2 TRANSIÇÃO DE FASE SOL → GEL

A fase sol é definida como um fluido circulante, enquanto a fase gel não é fluida em uma escala de tempo experimental, mantendo sua integridade. Acima da concentração crítica (concentração crítica de gel - CCG) de um polímero, a fase gel ocorre. A CCG é na maioria das vezes inversamente relacionada ao peso molecular do polímero empregado. O teste simples do tubo invertido é empregado para determinar a transição de fase. Considerando o princípio de superposição tempo-temperatura na deformação do polímero, os parâmetros deste teste devem ser fixados antes de determinar o limite sol - gel (JEONG; KIM; BAE, 2012).

Para a formulação HP, a $T_{sol/gel}$ foi de $29,33 \pm 0,57$ °C, para a formulação HPQ, a $T_{sol/gel}$ foi de $29,66 \pm 0,7$ °C. Quando avaliadas as formulações contendo eugenol, os resultados apresentaram-se de forma que, a formulação HPQEU1 – contendo eugenol 1% - apresentou $T_{sol/gel}$ de $25,33 \pm 0,57$ °C, a formulação

HPQEU2 – eugenol a 2% - apresentou T_{sol} / gel de $19,33 \pm 0,57$ °C, já a formulação HPQEU4 – eugenol a 4% - apresentou aspecto semissólido em toda a faixa de temperatura pesquisada (4 a 50 °C).

A temperatura sol – gel considerada adequada deve estar na faixa de 25 °C e 37 °C. Se a temperatura de gelificação de uma formulação termossensível for inferior a 25 °C, o gel pode formar-se em temperatura ambiente, assim, pode haver prejuízo no preparo, na manipulação e na administração do mesmo. E se a temperatura de transição for superior a 37 °C, a formulação se manterá líquida à temperatura corporal, resultando na perda do princípio ativo utilizado neste sistema no local de aplicação (CHANG et al., 2002).

As diferenças na temperatura sol-gel das formulações HP e HPQ, as quais não contém eugenol, corroboram com Ur-rehman, Tavelin e Gröbner (2011) que relataram em seu estudo, que formulações contendo poloxâmero 407 na concentração a 20% e quitosana, causam, ainda que ligeiramente, um aumento na $T_{Sol/gel}$.

De modo geral, observa-se que as temperaturas sol → gel para as formulações HP, HPQ e HPQEU1 apresentaram valores adequados (29,33 °C, 29,66 °C e 25,33 °C, respectivamente), entretanto, as formulações HPQEU2 e HPQEU4 apresentaram valores inferiores à temperatura ambiente (25 °C).

Dumortier et al. (2006) destacou que a micelização do poloxâmero 407 pode sofrer interferências em formulações que foram incorporados fármacos ou demais ativos, tal interferência pode comprometer diretamente a temperatura de transição sol → gel. Pode-se observar esta ocorrência ao analisar as temperaturas de transição da formulação HP em comparação com as formulações HPQ, HPQEU1 e HPQEU2.

Em relação à análise de comportamento sol → gel da formulação HPQEU4, é possível notar a influência do eugenol em detrimento do processo de micelização do poloxâmero, de tal forma que se extinguiu a possibilidade de avaliação de transição de fase, uma vez que a formulação se apresentou semissólida independente da temperatura. Uma possibilidade futura de corrigir tal divergência nestas formulações com características termossensíveis consiste em diminuir a concentração do poloxamer 407, uma vez que o estudo de Dumortier et al. (2006) evidenciou que a temperatura de transição sol → gel aumenta quando a concentração do polímero diminui.

Os resultados da ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Newman Keuls indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais para transição sol/gel ($p < 0,001$).

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.3.1 Determinação de pH

Os valores de pH das formulações de hidrogel estão dispostas na Tabela 4. Os valores das formulações contendo eugenol (HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4) variaram entre 5,35 a 5,4 e foram considerados adequados para administração na mucosa bucal, uma vez que o pH da cavidade bucal, qual é continuamente banhada por saliva, apresenta-se entre 5,5 e 7,0. Uma alteração significativa no pH causaria fermento ou irritação ao tecido da mucosa subjacente, o que é um efeito indesejável (SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012; JOHNSTON, 2015).

Tabela 4. Valores de pH dos hidrogéis 24 h após o preparo.

Formulação	pH $\pm$ DP
HP	6,49 $\pm$ 0,04
HPQ	5,33 $\pm$ 0,02
HPQEU1	5,35 $\pm$ 0,02
HPQEU2	5,37 $\pm$ 0,02
HPQEU4	5,40 $\pm$ 0,01

Fonte: A autora.

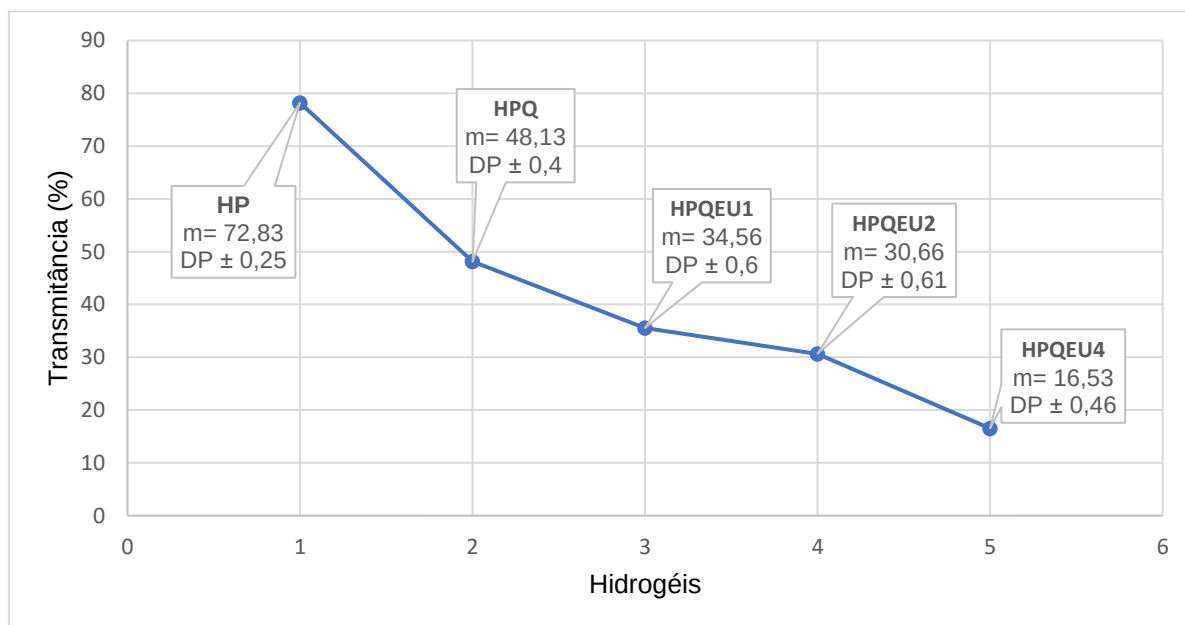
A taxa e extensão da absorção do fármaco são influenciadas pela permeabilidade da mucosa bucal e sublingual, propriedades físico-químicas – tanto do local de aplicação como da formulação empregada – e outros fatores ambientais. Outra característica relevante é o valor de pKa, que é indicativo do grau de ionização da molécula e afeta a permeabilidade, sendo que a fração ionizada é controlada tanto pelo pKa do fármaco quanto pelo pH do meio (SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012).

O eugenol apresenta valor de pKa = 10,19 que corresponde a uma baixa capacidade de ionização em pH bucal e no pH da formulação, dessa forma, tal propriedade físico-química intrínseca contribui como fator favorável à sua absorção no local de aplicação.

5.3.2 Determinação turbidimétrica

Quando analisadas as características turbidimétricas das formulações em temperatura ambiente, 24 h após seu preparo, avaliou-se que, nas formulações incorporadas com eugenol (HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4), houve aumento da turbidez, uma vez que esta é inversamente proporcional à transmitância, em relação às formulações base (HP e HPQ), que foi diretamente proporcional ao acréscimo da concentração de eugenol conforme pode-se observar na Figura 11 abaixo:

Figura 11 - Valores médios de transmitância e DP dos hidrogéis 24 h após o preparo.



Fonte: A autora.

Entretanto, observando-se apenas as diferenças turbidimétricas entre as formulações HP e HPQ, ficou evidente o decréscimo da capacidade de transmitância caracterizando o aumento da turbidez. Esse fato já foi discutido por Wu, Su e Ma (2006), qual atribuíram essa alteração turbidimétrica à tendência das moléculas de quitosana – incorporadas ao hidrogel – formarem domínios cristalinos que causariam dispersão de luz. Não constam relatos específicos na literatura acerca do motivo singular pelo qual as formulações contendo eugenol apresentaram-se com maior turbidez em comparação com as formulações bases, mas é fato que se observou que a presença do eugenol potencializou a dispersão de luz.

5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE

5.4.1 Teste de centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado como análise preliminar, com o objetivo de detectar características de instabilidade das formulações e indicativo da necessidade de reformulação (BRASIL, 2004). A instabilidade das formulações caracteriza-se pela separação dos componentes, facilmente observado macroscopicamente na forma de separação de fases, formação de *caking* (aglomerado) ou coalescência. Não foram observadas alterações no seu aspecto original, sendo assim, as formulações avaliadas apresentaram-se estáveis e ideais quando submetidas à situação de estresse, sendo assim, aptas a proceder-se os demais testes de estabilidade.

5.4.2 Avaliação organoléptica

Como parte do estudo da estabilidade dos hidrogéis, foram realizadas avaliações das características organolépticas ao longo dos dias avaliados relacionados à temperatura armazenada. Os parâmetros avaliados foram cor, odor e aspecto. Os resultados da avaliação organoléptica estão expressos nas Tabelas 5, 6 e 7 conforme as diferentes temperaturas submetidas.

Segundo Brasil (2004), quando se avalia o aspecto das formulações submetidas ao armazenamento em diferentes condições, o produto deve manter-se íntegro e manter o aspecto inicial em todas as condições, exceto em temperaturas elevadas, em que pequenas alterações são aceitáveis. Com relação à cor e ao odor, as formulações devem permanecer estáveis por, no mínimo, 15 dias, e pequenas alterações são aceitáveis em temperaturas elevadas.

Tabela 5 - Avaliação macroscópica dos hidrogéis armazenados à 5 °C durante 30 dias.

Fórmula	Geladeira (5 ± 2 °C)			
	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
HP	N	N	N	N
HPQ	N	N	N	N
HPQEU1	N	N	N	LA
HPQEU2	N	N	N	LA
HPQEU4	N	N	N	LA

Legenda: N = normal, sem alterações; LA = levemente alterado; IM = intensamente alterado.

Fonte: A autora.

Ao avaliar-se o comportamento das formulações quando submetidas ao armazenamento em geladeira, notou-se poucas modificações. As formulações HP e HPQ apresentaram-se estáveis durante os 30 dias de armazenamento a 5 °C. As formulações contendo eugenol, apresentaram-se estáveis nos 15 primeiros dias de armazenamento, entretanto, ao trigésimo dia, apresentaram leves alterações de cor e aspecto comparando ao seu aspecto inicial.

Tabela 6 - Avaliação macroscópica dos hidrogéis armazenados à 25 °C durante 30 dias.

Fórmula	Temperatura ambiente (25 ± 2 °C)			
	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
HP	N	N	N	N
HPQ	N	N	N	LA
HPQEU1	N	N	LA	LA
HPQEU2	N	N	LA	LA
HPQEU4	N	N	LA	LA

Legenda: N = normal, sem alterações; LA = levemente alterado; IM = intensamente alterado.

Fonte: A autora.

Quando avaliadas seu perfil de comportamento em temperatura ambiente por um determinado período, as formulações HPQ, HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4 apresentaram alterações nas suas características organolépticas a partir do 15º dia de armazenamento. As alterações de cor caracterizam-se pela intensificação da cor amarela característica do eugenol. Notou-se visivelmente um aumento da turbidez das formulações nesse período, fato que se correlaciona com a formação de glóbulos e gotículas.

Tabela 7 - Avaliação macroscópica dos hidrogéis armazenados à 45 °C durante 30 dias.

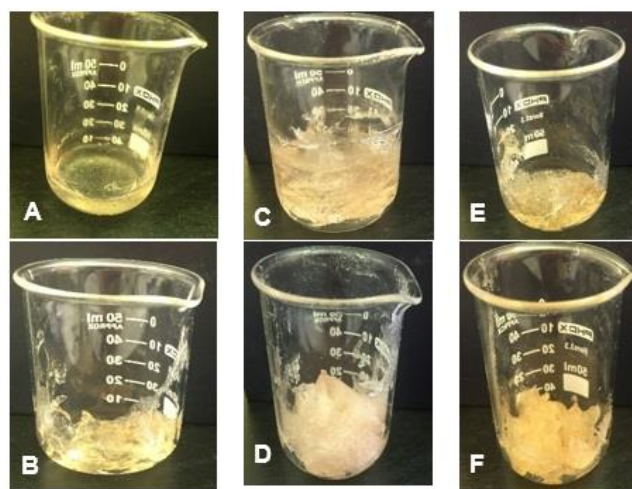
Fórmula	Estufa (45 ± 2 °C)			
	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
HP	N	N	LA	LA
HPQ	N	LA	LA	LA
HPQEU1	N	LA	LA	LA
HPQEU2	N	LA	LA	LA
HPQEU4	N	LA	LA	LA

Legenda: N = normal, sem alterações; LA = levemente alterado; IM = intensamente alterado.

Fonte: A autora.

A Figura 12 apresenta uma síntese acerca das principais alterações obtidas na avaliação de estabilidade organoléptica das amostras quando submetidas a diferentes condições e tempo de armazenamento: HPQEU1 após 30 dias em geladeira **(A)**; HPQEU1 após 30 dias em estufa **(B)**; HPQEU2 após 30 dias em temperatura ambiente **(C)**; HPQEU2 após 30 dias em estufa **(D)**; HPQEU4 após 7 dias em estufa **(E)** e HPQEU4 após 30 dias em estufa **(F)**.

Figura 12 - Principais alterações organolépticas na avaliação da estabilidade.



Fonte: A autora.

Giarola (2015) apontou em seu estudo que formulações semissólidas sofrem ação do calor, no sentido que temperaturas elevadas aceleram reações físico-químicas e químicas, ocasionando alterações na viscosidade, aspecto, cor e odor do produto. Esse fator corrobora com os resultados do presente estudo, uma vez que ficou evidente a contribuição da alta temperatura, em relação às alterações de cor, as quais se apresentaram mais acentuadas em comparação com as formulações armazenadas na geladeira, além do aspecto das formulações. Apesar de alteração visível em suas propriedades organolépticas, não houve alterações relacionadas ao seu odor, principalmente para as formulações HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4 que possuem odor característico de eugenol, que não sofre nenhuma interferência nas três temperaturas submetidas.

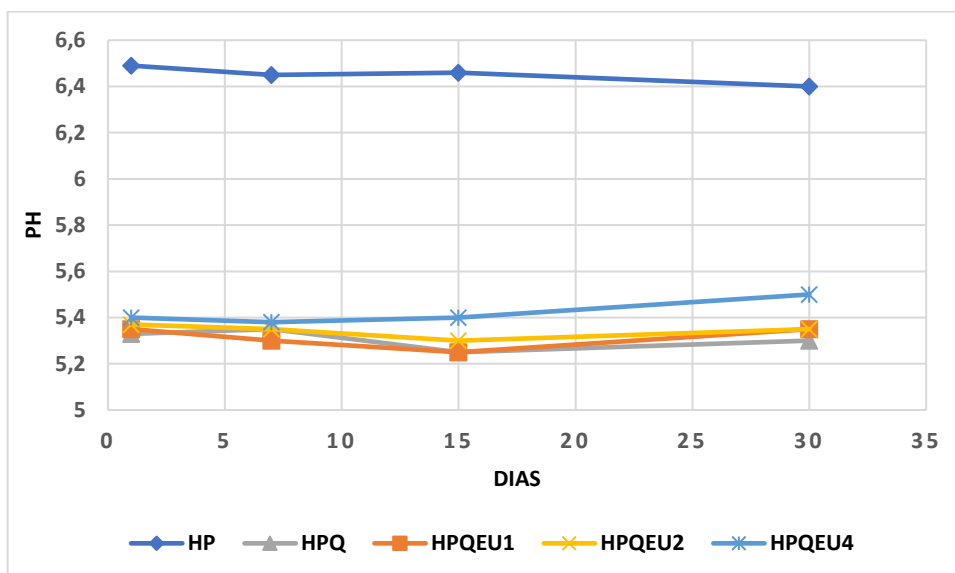
De modo geral, ao avaliar-se o comportamento das formulações diante do armazenamento nas três condições distintas, a melhor temperatura de armazenamento foi a de 5 ± 2 °C seguida da temperatura de 25 ± 2 °C. Assim, uma proposta futura como tentativa de minimizar variações consiste na escolha de

embalagem que ofereça menor interferência possível com o meio como a bisnaga de alumínio, por exemplo, e cuidados com armazenamento estrito ao abrigo da luz.

5.4.3 Avaliação de valores de pH

Conjuntamente com a avaliação organoléptica, procederam-se as análises de pH das formulações, em relação ao tempo e condições de armazenamento. Alterações consideráveis de valores de pH são indicativos de comprometimento da integridade, bem como afetam a eficácia da formulação. Os gráficos apresentados nas Figuras 13, 14 e 15 expressam um comparativo acerca da variação de pH no período avaliado.

Figura 13 - Valores de pH das formulações armazenadas a 5 °C durante 30 dias.



Fonte: A autora.

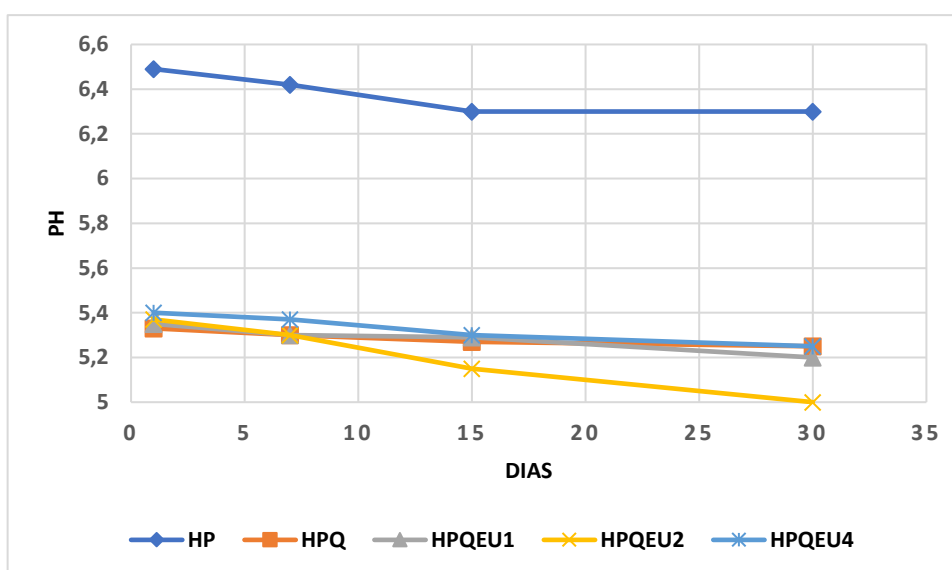
Observando os valores de pH das formulações quando armazenados a 5 °C, notou-se que houve pequenas alterações, exprimindo uma característica estável às formulações. A análise estatística não demonstrou diferença significativa para os valores de pH do hidrogel HP nos diferentes tempos de armazenamento. Os hidrogéis HPQ, HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4 apresentaram valores de ($p < 0,001$) para os valores de pH de cada formulação armazenada nos diferentes tempos.

Levando-se em conta os maiores e menores valores de pH ao longo dos dias observados, para cada condição de armazenamento foi calculada a porcentagem do pH para as amostras. Foram obtidas variações para o HPQ de 0,56% para HPQEU1

de 1,86%, para HPQEU2 de 0,37% e para HPQEU4 de 1,85% (Figura 13). Uma vez que se observou pequenas variações nos valores de pH, praticamente irrelevantes, não foi considerada inadequada nenhuma formulação armazenada em geladeira.

Os resultados da ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Newman Keuls indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de pH de todas as formulações de hidrogel nos diferentes tempos de armazenamento em geladeira ($p < 0,001$).

Figura 14 - Valores de pH das formulações armazenadas a 25 °C durante 30 dias.

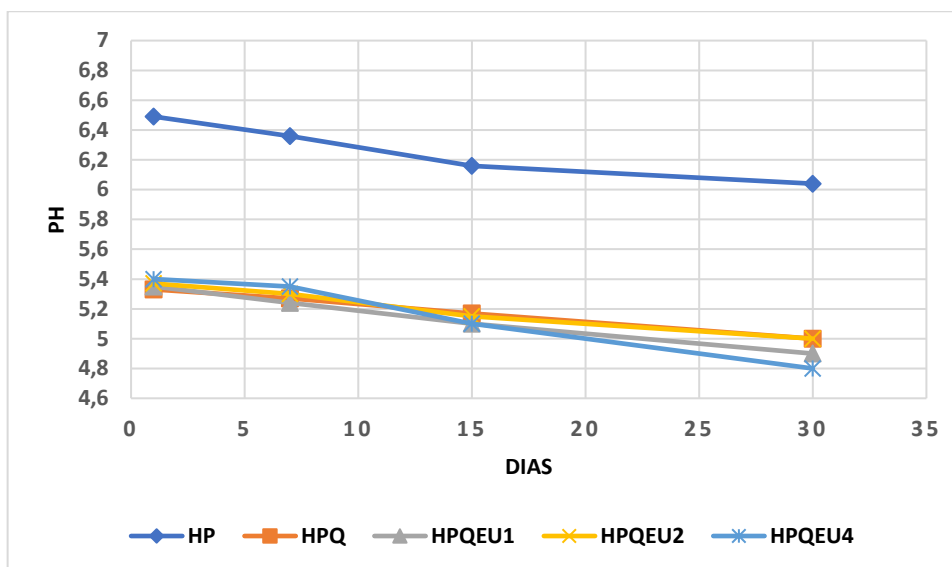


Fonte: A autora.

As variações obtidas entre as formulações armazenadas em temperatura ambiente foram para HP de 2,92%, para HPQ de 1,5%, para HPQEU1 de 2,8%, para HPQEU2 de 1,3% e para HPQEU4 de 2,7% (Figura 14).

Segundo Brasil (2004) variações de valores de pH acima de 10% são consideradas inapropriadas, sendo esse o limite e um critério para exclusão de formulações. Dessa forma, todas as oscilações de pH encontradas nas formulações armazenadas à temperatura ambiente estão dentro dos valores preconizados como adequados.

Figura 15 - Valores de pH das formulações armazenadas a 45 °C durante 30 dias.



Fonte: A autora.

Uma vez determinadas as variações de pH para as formulações armazenadas em estufa, notou-se valores mais expressivos daqueles obtidos nas outras condições de armazenamento. Sendo para HP, uma variação de 6,9%, para HPQ de 6,19%, para HPQEU1 de 8,4%, para HPQEU2 6,89% e para HPQEU4 de 11,11% (Figura 15). Essa maior oscilação de pH nessa modalidade de armazenamento pode ser fundamentada por Akhtar et al., (2011) que afirmaram que uma redução de pH em diferentes condições de armazenamento pode ser decorrente da produção de algum metabólito ácido ou decomposição de um dos excipientes durante o processo de aquecimento. Dentro das oscilações de pH, a formulação HPQEU4 apresentou-se como inadequada pela sua variação acima de 10%.

Os resultados da ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Newman Keuls indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de pH das formulações de hidrogel nos diferentes tempos de armazenamento ($p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença estatística significativa quando comparado os valores de pH entre as formulações.

5.4.4 Avaliação turbidimétrica

A avaliação turbidimétrica dos hidrogéis submetidos a diferentes condições de armazenamento determinou a oscilação da capacidade de transmitância das mesmas, de modo a caracterizar alterações de turbidez nas formulações em relação ao tempo

e condição de armazenamento. Os valores para a avaliação turbidimétrica, encontram-se dispostos nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8 - Avaliação turbidimétrica das formulações armazenadas a 5 °C durante 30 dias.

Geladeira (5 ± 2 °C) - %T ± DP				
Fórmula	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
HP	75,71 ± 0,38	74,19 ± 0,29	72,71 ± 0,35	70,53 ± 0,13
HPQ	49,57 ± 0,71	48,58 ± 0,35	47,85 ± 0,35	46,89 ± 0,21
HPQEU1	36,56 ± 0,47	36,24 ± 0,66	35,87 ± 0,62	34,79 ± 0,62
HPQEU2	31,57 ± 0,10	30,94 ± 0,57	30,32 ± 0,59	29,72 ± 0,42
HPQEU4	16,44 ± 0,14	16,11 ± 0,65	15,79 ± 0,50	15,48 ± 0,36

Fonte: A autora.

Como já discutido anteriormente no item 6.3.2, apesar dos hidrogéis apresentarem aspecto límpido a temperaturas mais baixas, a adição de polímeros auxiliares como a quitosana, bem como o princípio ativo eugenol, alteraram essa característica nas formulações. Foi possível observar que todas as formulações armazenadas em geladeira, sofreram um decréscimo dos valores de transmitância, caracterizando o aumento da turbidez. Entretanto, não houve diferença expressiva para todo o período de armazenamento avaliando cada formulação de forma individualizada. Os resultados para análise estatística mostraram diferenças significantes para a análise turbidimétrica entre as formulações armazenadas a 5°C pelo período de 30 dias ($p < 0,001$).

Tabela 9 - Avaliação turbidimétrica das formulações armazenadas a 25 °C durante 30 dias.

Temperatura ambiente (25 ± 2 °C)				
%T ± DP				
Fórmula	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
HP	72,80 ± 0,59	69,16 ± 0,31	66,39 ± 0,43	64,40 ± 0,47
HPQ	48,13 ± 0,30	46,20 ± 0,36	44,81 ± 0,49	43,47 ± 0,43
HPQEU1	35,56 ± 0,44	34,13 ± 0,60	33,61 ± 0,09	32,12 ± 0,64
HPQEU2	30,66 ± 0,37	29,74 ± 0,26	28,84 ± 0,16	28,28 ± 0,62
HPQEU4	16,53 ± 0,11	15,86 ± 0,43	15,55 ± 0,14	15,08 ± 0,49

Fonte: A autora.

Quando armazenadas e mantidas à temperatura ambiente, as formulações mantiveram o mesmo comportamento daquelas armazenadas em geladeira. Ao decorrer dos dias, as formulações foram perdendo linearmente seu poder de transmitância. Os resultados da ANOVA de uma via indicaram diferenças

estatisticamente significantes para os valores turbidimétricos entre as formulações de hidrogéis armazenados a 25°C nos diferentes tempos de armazenamento ($p < 0,001$).

Tabela 10 - Avaliação turbidimétrica das formulações armazenadas à 45 °C durante 30 dias.

Fórmula	Estufa (45 ± 2 °C)			
	%T ± DP			
	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
HP	71,34 ± 0,35	69,20 ± 0,14	67,12 ± 0,25	65,11 ± 0,27
HPQ	46,85 ± 0,60	45,91 ± 0,51	44,99 ± 0,62	44,09 ± 0,33
HPQEU1	34,49 ± 0,43	33,80 ± 0,36	33,12 ± 0,44	32,46 ± 0,42
HPQEU2	30,05 ± 0,56	29,29 ± 0,59	28,71 ± 0,60	27,85 ± 0,28
HPQEU4	16,06 ± 0,35	15,55 ± 0,35	15,24 ± 0,09	14,70 ± 0,65

Fonte: A autora.

Da mesma forma que as formulações anteriormente pesquisadas, as formulações submetidas ao armazenamento em estufa apresentaram característica de aumento de turbidez no decorrer do tempo, e também, foram observadas oscilações de transmitância mais acentuadas nas formulações armazenadas em estufa do que nas outras formas de armazenamento. A análise estatística indica valores turbidimétricos estatisticamente significantes entre as formulações de hidrogéis armazenados a 45°C nos diferentes tempos de armazenamento ($p < 0,001$).

De modo geral, os dados encontrados no presente estudo acerca das formulações a base de poloxamer-quitosana contendo eugenol, divergem dos dados encontrados por Sharma (2016) quando trabalhou com hidrogel de poloxâmero com lidocaína e prilocaína, uma vez que, em seu estudo acerca da turbidez das formulações, houve um aumento da transmitância das formulações quando elevadas as temperaturas. É fato que não se deve tomar essa comparação no sentido estrito, uma vez que se tratam de diferentes matérias-primas incorporadas à base de hidrogel de poloxâmero. Entretanto, enfatiza-se a característica específica de cada substância dentro de uma formulação, de concentrar ou dispersar a passagem da luz.

Faz-se pertinente ressaltar que os hidrogéis contendo eugenol apresentam-se como emulsões, estas sendo definida como um sistema bifásico constituído por dois líquidos imiscíveis, um dos quais (a fase dispersa) é uniformemente distribuída em finos glóbulos ao longo da segunda fase (fase contínua) (KHAN, 2011).

No contexto da farmacotécnica das emulsões, um agente tensoativo deve estar presente a fim de conferir estabilidade à formulação, sendo este, nos hidrogéis contendo eugenol, o poloxamer 407. Sendo assim, a tendência da fase interna de uma

emulsão em formar gotículas esféricas, explicaria esse evento do aumento da turbidez em detrimento da concentração de eugenol na formulação.

5.4.5 Quantificação de eugenol

As formulações HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4 foram submetidas a quantificação de eugenol para análise de comportamento de acordo com as diferentes condições armazenadas. Os valores de quantificação estão expressos nas Tabelas 11, 12 e 13, conforme cada formulação. De acordo com as diretrizes do ICH (2003), uma mudança significativa na quantificação pode ser definida pela perda de 5% do valor inicial.

Tabela 11 - Quantificação de eugenol em HPQEU1* armazenados em diferentes condições durante 30 dias.

Condição de armazenamento	Concentração experimental (%)			
	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
Geladeira (5 °C)	0,8 %	0,8 %	0,8 %	0,6 %
Ambiente (25°C)	0,8 %	0,8 %	0,6 %	0,4 %
Estufa (45 °C)	0,8 %	0,6 %	0,4 %	0,2 %

*Concentração teórica de eugenol em HPQEU1 – 1%.

Fonte: A autora.

Na formulação HPQEU1, obteve-se uma perda de teor acima de 5% após 30 dias de armazenamento em geladeira, quando comparados os valores de perda para armazenamento em temperatura ambiente e estufa. Esse valor apresentou-se expressivo a partir do 15º dia para armazenamento em temperatura ambiente e a partir do 7º dia para o armazenamento em estufa.

Tabela 12 - Quantificação de eugenol em HPQEU2* armazenados em diferentes condições durante 30 dias.

Condição de armazenamento	Concentração experimental (%)			
	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
Geladeira (5 °C)	2 %	2 %	1,8 %	1,6 %
Ambiente (25°C)	2 %	2 %	1,6 %	1,5 %
Estufa (45 °C)	2 %	1,4 %	1 %	0,6 %

*Concentração teórica de eugenol em HPQEU2 – 2%.

Fonte: A autora.

Para a formulação HPQEU2, obteve-se uma perda ainda maior se comparada com a formulação anteriormente avaliada, tendo perda superior a 5% ocorrido a partir do 15º dia de armazenamento em geladeira, e em temperatura ambiente. Para o armazenamento em estufa, a maior variação de perda ocorreu a partir do 7º dia.

Tabela 13 - Quantificação de eugenol em HPQEU4* armazenados em diferentes condições durante 30 dias.

Condição de armazenamento	Concentração experimental (%)			
	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias
Geladeira (5 °C)	3,6 %	3,6 %	3,5 %	3,2 %
Ambiente (25°C)	3,6 %	3,2 %	3,2 %	3,1 %
Estufa (45 °C)	3,6 %	3,2 %	2,8 %	2,2 %

*Concentração teórica de eugenol em HPQEU4 – 4%.

Fonte: A autora.

O hidrogel HPQEU4 foi a formulação que melhor apresentou valores dentro do preconizado, sendo que as perdas durante armazenamento em geladeira e temperatura ambiente ficaram na faixa dos 5%. Faz-se importante observar que o intervalo de variação se ampliou pela maior concentração de eugenol em comparação com as demais formulações. Valores de perda para armazenamento em estufa mantiveram-se acima do valor aceitável a partir do 15º dia de armazenamento.

De modo geral, algumas providências seriam favoráveis para minimizar perdas e variações de concentração, uma vez que alteraria de forma significativa a ação terapêutica proposta. Tais providências devem abranger desde a mudança de embalagem com protocolo de armazenamento à reformulação com adjuvantes como antioxidantes e quelantes que potencializem a conservação do produto, considerando as características físico-químicas do eugenol, enquanto composto orgânico com oxigênio e insaturação.

5.5 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE

A avaliação da espalhabilidade das formulações com relação à adição de sucessivos pesos foi observada através do espalhamento dos hidrogéis de acordo com o cálculo da área conforme apresentação na Tabela 14. A partir dos valores de raios médios obtidos foram calculadas as áreas de superfícies correspondentes, e

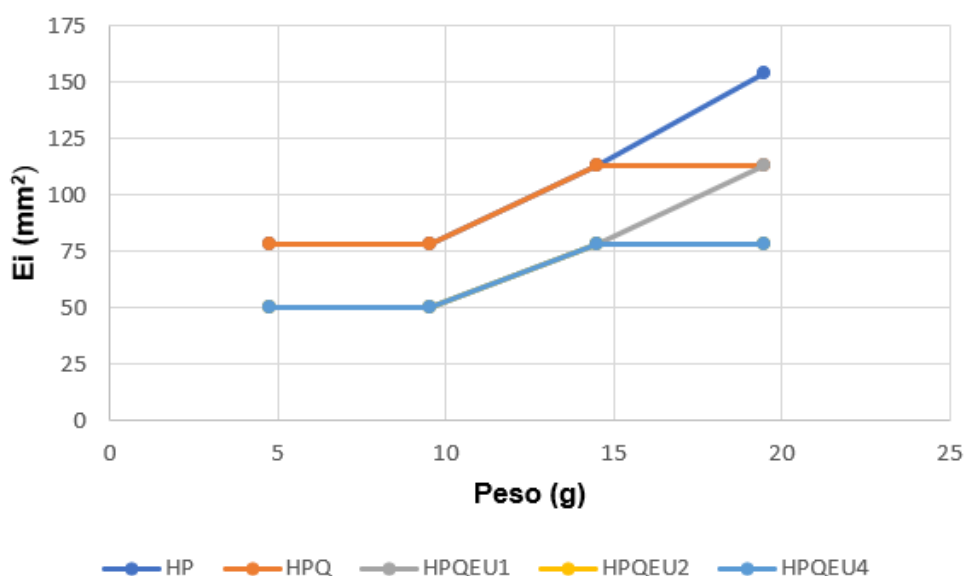
construído um gráfico (Figura 16) de espalhabilidade (Ei). Por esta análise, pôde-se observar significativa diferença entre as formulações.

Tabela 14 - Valores médios $\pm$ DP de espalhabilidade das formulações.

	HP	HPQ	HPQEU1	HPQEU2	HPQEU4
Peso (g)	Área média (mm ²) $\pm$ DP				
4,780	78,50 $\pm$ 9,51	78,50 $\pm$ 9,51	50,24 $\pm$ 6,8	50,24 $\pm$ 0	50,24 $\pm$ 0
9,525	78,50 $\pm$ 9,51	78,50 $\pm$ 0	50,24 $\pm$ 0	50,24 $\pm$ 6,8	50,24 $\pm$ 6,8
14,536	113,04 $\pm$ 10,4	113,04 $\pm$ 0	78,50 $\pm$ 9,51	78,50 $\pm$ 0	78,50 $\pm$ 9,51
19,504	153,86 $\pm$ 12,23	113,04 $\pm$ 10,42	113,04 $\pm$ 0	78,50 $\pm$ 9,51	78,50 $\pm$ 9,51

Fonte: A autora.

Figura 16 - Espalhabilidade das formulações em relação ao peso adicionado



Fonte: A autora.

Ao se comparar os valores entre as formulações base – HP e HPQ e as formulações contendo eugenol – HPQEU 1, 2 e 4, observou-se uma diminuição da capacidade de espalhabilidade das mesmas, em que as formulações base com ausência de eugenol apresentaram maior capacidade de espalhamento. As formulações HPQEU2 e HPQEU4 exibiram os mesmos valores para o teste, dessa forma, apresentaram-se como as formulações com menor espalhabilidade, o que pode estar relacionado com os aspectos organoléptico e reológico, uma vez que a espalhabilidade está diretamente relacionada à viscosidade das formulações. Ainda,

o eugenol, de característica lipofílica, está encapsulado nas micelas poliméricas do hidrogel, o que altera a mobilidade aquosa destas micelas e, portanto, diminui a espalhabilidade da formulação.

Para Giarola (2015), a espalhabilidade é uma característica importante para o tipo de formulação proposta, sendo responsável pela transferência correta da dose do fármaco no local de aplicação. Uma menor espalhabilidade da formulação pode ser considerada uma característica positiva, visto que diminui a possibilidade de movimentação da formulação no local de aplicação e oferece possibilidade de aumento da concentração da substância veiculada pela formulação do hidrogel no local de aplicação.

Correlacionando os valores de espalhabilidade obtidos com os encontrados para a determinação de T_{sol} / gel , percebeu-se que as formulações seguem um padrão, uma vez que valores de temperatura menores de transição para as formulações HPQEU2 ($19,33 \pm 0,57$ °C) e HPQEU4 (sem valor de transição), dentre todas avaliadas, foram as formulações que apresentaram menores valores para espalhabilidade. Deve-se levar em consideração ainda, que a análise da espalhabilidade ocorreu em temperatura acima da T_{sol} / gel para todas as formulações. As diferenças entre valores de T_{sol} / gel , bem como valores de espalhabilidade entre as formulações base HP e HPQ, pode estar relacionado com a adição da quitosana com carga positiva, fato que possivelmente alterou a espalhabilidade por conta da mudança de carga de superfície das micelas poliméricas.

Sendo assim, levando-se em consideração as características de espalhabilidade de todas as formulações, vinculados aos resultados da análise de transição sol / gel, a formulação HPQEU1 (T_{sol} / gel $25,33 \pm 0,57$ °C) demonstrou ser a formulação mais favorável, incluindo a atribuição de capacidade de retenção no local de aplicação sem perda de material.

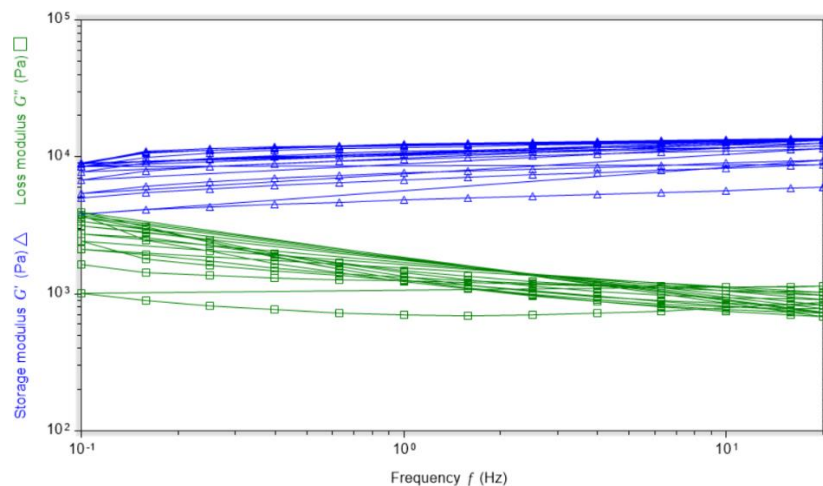
Os resultados para análise estatística mostraram diferenças significativas quando comparados os valores de espalhabilidade em detrimento do peso aplicado de cada formulação ($p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença estatística significativa quando realizadas a comparação dos valores de espalhabilidade entre os hidrogéis que continham eugenol.

5.6 PROPRIEDADES REOLÓGICAS

A fim de obter informações abrangentes sobre o comportamento reológico dos hidrogéis, medidas oscilatórias forneceram informações sobre as propriedades viscosa e elástica dos mesmos. O teste de frequência oscilatória mede a resposta de um sistema em função de frequência em amplitude de tensão constante. Revela o módulo elástico ou de armazenamento G' (resposta elástica) que é uma medida de energia e o módulo viscoso ou de perda G'' (resposta viscosa) que reflete a energia perdida (POKHARKAR et al., 2011).

O comportamento reológico dos hidrogéis é expresso nas Figuras 17, 18, 19, 20 e 21.

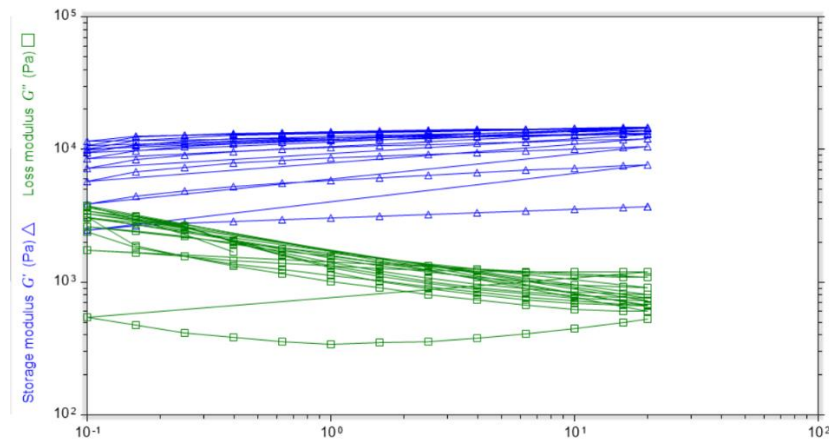
Figura 17 – Resultado da análise das propriedades reológicas do hidrogel HP.



Legenda: G' (storage modulus): módulo elástico; G'' (loss modulus): módulo viscoso ou de perda.

Fonte: A autora.

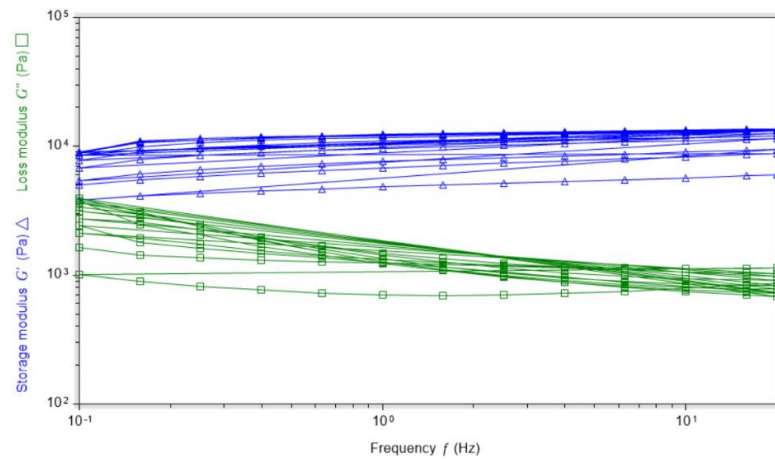
Figura 18 – Resultado da análise das propriedades reológicas do hidrogel HPQ.



Legenda: G' (storage modulus): módulo elástico; G'' (loss modulus): módulo viscoso ou de perda.

Fonte: A autora.

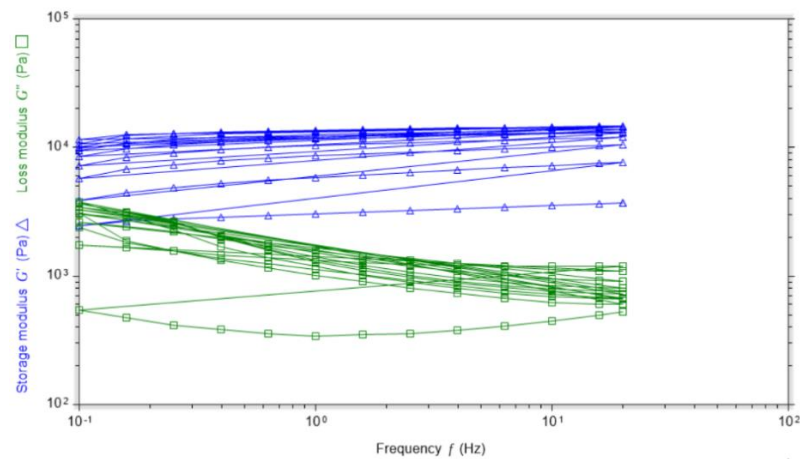
Figura 19 – Resultado da análise das propriedades reológicas do hidrogel HPQEU1.



Legenda: G' (storage modulus): módulo elástico; G'' (loss modulus): módulo viscoso ou de perda.

Fonte: A autora.

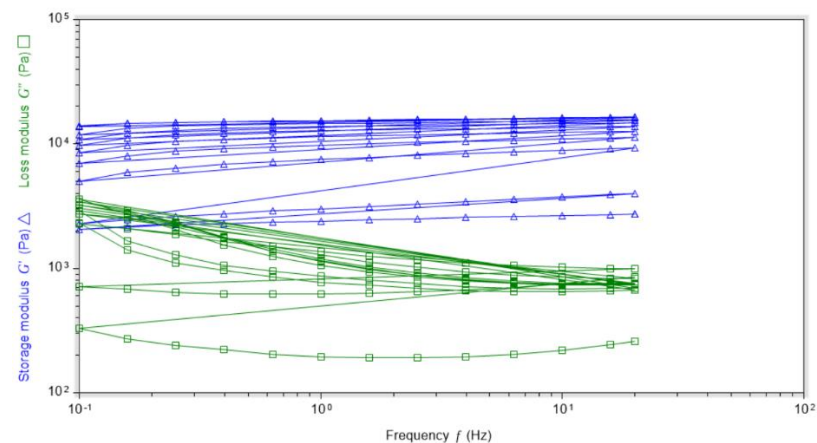
Figura 20 – Resultado da análise das propriedades reológicas do hidrogel HPQEU2.



Legenda: G' (storage modulus): módulo elástico; G'' (loss modulus): módulo viscoso ou de perda.

Fonte: A autora.

Figura 21 – Resultado da análise das propriedades reológicas do hidrogel HPQEU4.



Legenda: G' (storage modulus): módulo elástico; G'' (loss modulus): módulo viscoso ou de perda.

Fonte: A autora.

O módulo elástico é maior do que o módulo de perda em toda a frequência aplicada para todas as formulações testadas, indicando a presença de uma estrutura semelhante a gel. Quanto maiores os valores do módulo elástico para os sistemas investigados, evidencia-se que é mais elástico do que viscoso na faixa de frequência investigada. Portanto, levando em consideração tais propriedades reológicas, os hidrogéis apresentaram-se estáveis e apropriados para aplicação na mucosa bucal.

O aumento no comportamento elástico é sugerido para aumentar a retenção no local de aplicação e contribuir para a liberação prolongada do princípio ativo. Após a administração dos géis termossensíveis, estima-se que o sistema gelifique ($G' > G''$), apresentando comportamento predominantemente elástico, e assim, resista às forças de cisalhamento intra-orais (ALVES, 2018).

5.7 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA

A análise do perfil de textura tem sido utilizada para determinar as propriedades mecânicas de semissólidos, particularmente dos hidrogéis. O perfil de textura pode fornecer alguns parâmetros importantes como a dureza, compressibilidade e adesividade de uma preparação farmacêutica. As formulações semissólidas bucais devem ter propriedades mecânicas apropriadas para o benefício máximo da formulação. Para comparar as propriedades mecânicas do perfil de textura dos hidrogéis, as análises foram empregadas em temperatura ambiente. Os resultados estão expressos na Tabela 15.

Tabela 15 - Propriedades mecânicas médias $\pm$ DP das formulações de hidrogel.

Fórmula	Dureza (N)	Compressibilidade (N. s⁻¹)	Adesividade (N.s⁻¹)	Coesividade	Elasticidade
HP	3,87 $\pm$ 0,05	26,05 $\pm$ 0,06	29,56 $\pm$ 0,35	1,044 $\pm$ 0,004	0,981 $\pm$ 0,001
HPQ	4,30 $\pm$ 0,015	30,62 $\pm$ 0,04	30,79 $\pm$ 0,99	0,983 $\pm$ 0,004	0,977 $\pm$ 0,002
HPQEU1	4,46 $\pm$ 0,01	34,93 $\pm$ 0,03	31,53 $\pm$ 0,11	0,955 $\pm$ 0,001	0,973 $\pm$ 0,001
HPQEU2	4,97 $\pm$ 0,02	35,33 $\pm$ 0,02	31,90 $\pm$ 0,1	0,930 $\pm$ 0,004	0,969 $\pm$ 0,001
HPQEU4	5,75 $\pm$ 0,01	40,87 $\pm$ 0,015	38,55 $\pm$ 0,55	0,919 $\pm$ 0,003	0,960 $\pm$ 0,001

Fonte: A autora.

Os resultados da ANOVA de uma via indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais para cada propriedade mecânica da análise do perfil de textura ($p < 0,001$). O teste de dureza foi realizado para medir a

força necessária para produzir deformação nos hidrogéis, expressando assim, a aplicabilidade do gel para o local desejado. Os géis devem apresentar baixos valores de dureza para serem administrados mais facilmente à mucosa bucal (JONES et al., 1999). Dentre as formulações contendo eugenol, o HPQEU1 apresentou o menor valor de dureza e o HPQEU4 apresentou o maior valor.

A compressibilidade determina o trabalho necessário para deformar o produto durante a primeira compressão da sonda. Um baixo valor de compressibilidade é necessário para permitir a facilidade de remoção do gel do recipiente e facilitar a propagabilidade do mesmo no local de aplicação (BALOGLU et al., 2010). Neste estudo, dentre as formulações contendo eugenol, o HPQEU1 apresentou menor valor para compressibilidade. Essa característica vem ao encontro dos resultados obtidos na determinação da espalhabilidade (item 6.5), em que a mesma apresentou maiores valores para espalhabilidade em relação às demais formulações contendo eugenol. É apropriado afirmar que estas duas características – compressibilidade e espalhabilidade – apresentam-se inversamente proporcionais, e verificou-se esse padrão nas formulações contendo eugenol.

A adesividade é uma propriedade relacionada à mucoadesão, é definida como o trabalho necessário para separar a sonda da amostra. Quando a adesividade das formulações de hidrogel foram avaliadas, a adição da quitosana e o aumento da concentração de eugenol expandiram a adesividade dos géis. A maior adesividade foi determinada na formulação HPQEU4. Os hidrogéis de poloxamer-quitosana como formulação para aplicação nas mucosas devem, convenientemente, ter alta adesividade (TUĞCU-DEMİRÖZ, 2017).

A coesividade aumenta o desempenho do produto no local de aplicação, um valor alto de coesão indica recuperação completa estrutural após a aplicação do gel (JONES et al., 1997). Ao avaliar as formulações contendo eugenol, o HPQEU1 apresentou maior coesividade em comparação ao HPQEU2 e HPQEU4.

A elasticidade do produto representa a taxa na qual a amostra deformada retorna à sua condição indeformada. Valores numéricos mais baixos (sem dimensão), conforme determinado na análise de textura, indicam maior elasticidade do produto (JONES; WOOLFSON; DJOKIC, 1996). Quando comparadas as formulações acerca da elasticidade, as formulações apresentaram-se na ordem HP > HPQ > HPQEU1 > HPQEU2 > HPQEU4.

Idealmente, os hidrogéis de poloxamer-quitosana como formulação para aplicação na mucosa bucal, devem ter alta adesividade e elasticidade apropriadas. A formulação de hidrogel HPQEU1 seguida da formulação HPQEU2, foram as formulações que apresentaram melhores propriedades mecânicas, esses resultados sugerem que ambas as formulações se apresentaram com as propriedades mecânicas mais adequadas para o sistema de liberação de fármacos na mucosa bucal.

5.8 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO

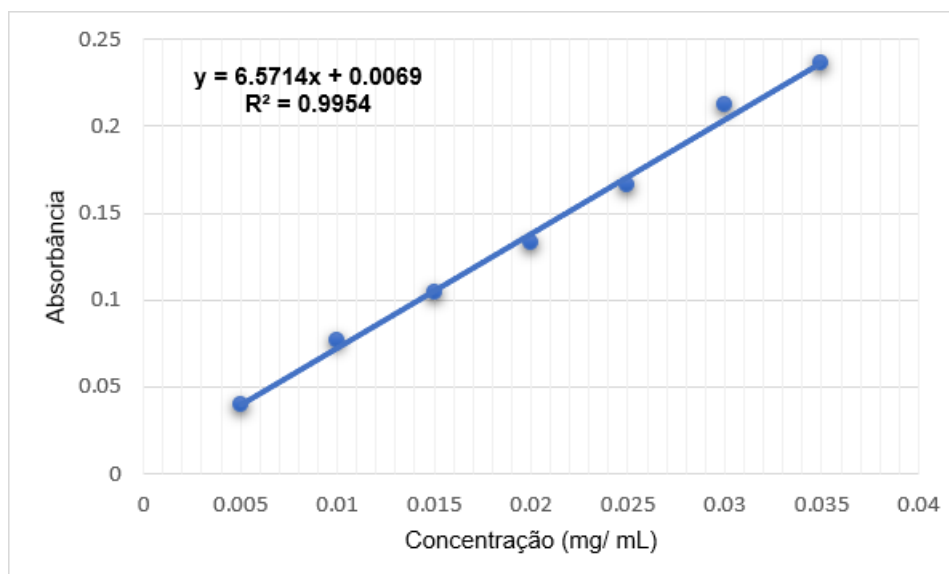
5.8.1 Varredura espectrofotométrica (UV-Vis)

A quantificação do fármaco iniciou-se pela obtenção do espectro de varredura do eugenol. Observou-se que o comprimento de onda absorção máxima foi de 261 nm. Sendo assim, utilizou-se este comprimento de onda para a determinação da curva analítica e demais análises requeridas acerca da quantificação do eugenol nas formulações. Este valor de pico máximo de absorção encontrado assemelha-se com o estudo de Higuera-Barraza et al. (2015), qual trabalhou com eugenol com absorção na faixa UV-Vis a 261 a 300 nm.

5.8.2 Curva analítica do eugenol

A construção da curva analítica (Figura 22) apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,005 a 0,035 mg/mL. A linearidade está expressa pelo coeficiente de correlação da curva com $r = 0,9976$. Dessa forma, é possível utilizar esse método para as análises quantitativas do eugenol, uma vez que apresentou boa correlação entre a concentração e a absorbância conforme preconizado pela RDC nº 166 de 2017.

Figura 22 - Curva analítica do eugenol.



Fonte: A autora.

5.8.3 Determinação do teor de eugenol nos hidrogéis

O teor de eugenol (Tabela 16) quantificado nas formulações foi determinado através do cálculo obtido pela equação da reta (Figura 23).

Tabela 16 - Quantificação de eugenol nas formulações 24 h após o preparo.

Fórmula	Concentração teórica (%)	Concentração experimental (%) ± DP
HPQEU1	1 %	0,8 % ± 0,001
HPQEU2	2 %	2 % ± 0,001
HPQEU4	4 %	3,6 % ± 0,001

Fonte: A autora.

Ao observar-se os valores obtidos na quantificação do eugenol nas formulações, entende-se que a variação relacionada a concentração teórica pode ser oriunda de algum equívoco farmacotécnico causando deficiência na efetividade de incorporação do eugenol no hidrogel, ou ainda uma imprecisão do método escolhido para quantificação do fármaco.

5.9 ESTUDO DE MUCOADESÃO *EX VIVO*

As características mucoadesivas de uma formulação são importantes quando se procura sistemas de liberação que prolonguem a retenção e assim, diminuam a perda da formulação no local de aplicação. Sendo assim, é pertinente avaliar a interação entre a formulação e a mucosa para que se desenvolvam sistemas de liberação mucoadesivos adequados (BONACUCINA et al., 2006).

O teste de mucoadesão foi avaliado por meio de ensaio de tração, com adaptações baseados em testes descritos na literatura e foi realizado para avaliar a força máxima e o trabalho de adesão para separar a mucosa da formulação bioadesiva. Os parâmetros de força máxima e trabalho de adesão são diretamente proporcionais (ALVES, 2018).

A tabela 17 apresenta os resultados médios e desvio padrão da análise de mucoadesividade dos hidrogéis avaliados:

Tabela 17 - Resultados médios $\pm$ DP das propriedades mucoadesivas dos hidrogéis.

	Trabalho de adesão (N.s)	F max (N)
HP	0,554 $\pm$ 0,62	0,231 $\pm$ 0,69
HPQ	0,672 $\pm$ 0,52	0,249 $\pm$ 0,62
HPQEU1	1,55 $\pm$ 0,56	0,308 $\pm$ 0,50
HPQEU2	1,795 $\pm$ 0,25	0,366 $\pm$ 0,58
HPQEU4	1,895 $\pm$ 0,38	0,381 $\pm$ 0,62

Fonte: A autora.

O hidrogel HPQEU4 apresentou valores de trabalho de adesão superiores às demais formulações, valores intermediários foram observados para os demais hidrogéis testados e o HP apresentou o valor mais baixo de trabalho de adesão. Avaliando-se a força máxima, o hidrogel HPQEU4 apresentou valor superior aos demais, e o HP apresentou os valores mais baixos. A adição do eugenol resultou em valores superiores para o trabalho de adesão, bem como força máxima em comparação com as formulações base HP e HPQ.

De acordo com Jones et al. (2009), hidrogéis formulados por sistemas binários constituídos por diferentes polímeros, sendo estes, bioadesivos e termossensíveis,

promovem uma combinação de vantagens. Dessa forma, há um melhoramento na adesão e no desempenho da administração desses sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Os resultados da ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Newman Keuls indicaram diferenças estatisticamente significantes para os valores de trabalhos de adesão e valores para força máxima entre todas as formulações de hidrogéis ($p < 0,001$).

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento dos hidrogéis a base de poloxamer-quitosana contendo diferentes concentrações de eugenol foram realizados com sucesso, apresentando características organolépticas apropriadas, valores de pH e turbidez aceitáveis. Os valores de transição sol / gel apresentaram-se adequados para a formulação com concentração de eugenol a 1%. O perfil de textura e análise de espalhabilidade apresentaram valores apropriados para as diferentes formulações estudadas. O estudo da estabilidade permitiu estabelecer critérios mais adequados de armazenamento e forneceu previsões sobre possíveis instabilidades físico-químicas, sendo mais favorável, o armazenamento em temperatura de $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

O perfil reológico das formulações demonstrou valores adequados para o comportamento elástico, ideal para manter-se retido no local de aplicação bem como contribuir na liberação do eugenol na mucosa bucal a partir dos hidrogéis estudados.

O teste de mucoadesão demonstrou que as formulações HPQEU1, HPQEU2 e HPQEU4 apresentaram valores adequados referentes à capacidade de aderir-se a mucosa, sendo que o hidrogel HPQEU4 apresentou os melhores valores.

Dessa forma, analisando os hidrogéis poloxamer-quitosana contendo eugenol, observa-se que nenhuma das formulações pesquisadas abrangeu todas as propriedades de maneira satisfatória, entretanto, as formulações que reuniram as características mais próximas das estimadas para aplicação, com intermediária propriedade mucoadesiva e perfil reológico com característico componente elástico, foi o hidrogel HPQEU1, seguido do hidrogel HPQEU2.

Portanto, assume-se os hidrogéis contendo eugenol como formulações de natureza termorresponsível para mucosa bucal com capacidade de liberação sustentada de eugenol para serem utilizadas com aplicação odontológica.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Igor Pena et al. Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microrganismos da cavidade oral. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, Vitória, v. 3, n. 13, p.10-16, jan. 2011.
- AKHTAR, N.; ANWAR, M.; KHAN, B.A.; MAHMOOD, T.; ZAMAN, S.U. Formulation development and pharmaceutical evaluation of a w/o emulsion of Coleus extract. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, n. 3, p. 236-241, Apr.-Jun. 2011.
- ALVES, Fernanda Maria Cesto. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas mucoadesivos fitoterápicos de camomila (*matricaria recutita* L.) para aplicação local durante a erupção dentária**. 2018. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.
- ANDERSEN, T. *et al.* Chitosan in Mucoadhesive Drug Delivery: Focus on Local Vaginal Therapy. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 222-236, 7 Jan. 2015. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/md13010222>. Acesso em: 10 set 2018.
- BALOGU, E. *et al.* Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development And Technology**, [s.l.], v. 16, n. 6, p. 627-636, 17 ago. 2010. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2010.508074>. Acesso em: 18 ago 2018.
- BATHEJA, P.; THAKUR, R.; MICHNIAK, B. Basic Biopharmaceutics of Buccal and Sublingual Absorption. In: TOUITOU, E.; BARRY, B. W. **Enhancement in Drug Delivery**. Flórida: Crc Press, 2006. p. 175-202.
- BONACUCINA, G. *et al.* Rheological, adhesive and release characterisation of semisolid Carbopol/tetraglycol systems. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 307, n. 2, p. 129-140, jan. 2006. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.09.034>. Acesso em: 29 dez 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1 ed. Brasília: Anvisa, 2004.
- CARVALHO, F. C. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 01-17, jan. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/bjps/v46n1/02.pdf>. Acesso em: 15 nov 2018.
- CHUNG, G.; OH, S. B. Eugenol as Local Anesthetic. In: RAMAWAT, K. G.; ME"RILLON, J. M. **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. London: Springer, 2013. p. 4001-4015.
- CI, L. *et al.* Amino-functionalized poloxamer 407 with both mucoadhesive and thermosensitive properties: preparation, characterization and application in a vaginal drug delivery system. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 593-602, set.

2017. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2017.03.002>. Acesso em: 15 jan 2019.

CUBAYACHI, Camila. **Desenvolvimento de sistemas semi-sólidos mucoadesivos para liberação de anestésico e aplicação de iontoforese na cavidade bucal**. 2014. 16 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

DOCK, L. Lotte; FLOROS, John D.; LINTON, Richard H.. Heat Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in Apple Cider Containing Malic Acid, Sodium Benzoate, and Potassium Sorbate. **Journal Of Food Protection, West Lafayette**, v. 63, n. 8, p.1026-1031, jan. 2000.

DUMORTIER, G. *et al.* A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 11 nov. 2006. Springer Nature. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-006-9104-4>. Acesso em: 18 dez 2018.

FAKHARI, A.; CORCORAN, M.; SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. **Heliyon**, [s.l.], v. 3, n. 8, p. 390, ago. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00390>. Acesso em: 25 nov 2018.

GIAROLA, L. R. **Explorando a biodiversidade brasileira e os conhecimentos populares: desenvolvimento de formulação para uso tópico com extrato de *Pterodon pubescens benth.* (sucupira)**. 2015. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

GIOFFREDI, Emilia *et al.* Pluronic F127 Hydrogel Characterization and Biofabrication in Cellularized Constructs for Tissue Engineering Applications. **Procedia Cirp**, [s.l.], v. 49, p.125-132, 2016. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procir.2015.11.001>. Acesso em: 15 dez 2018.

HIGUERA-BARRAZA, O. A. *et al.* Fabrication of an antimicrobial active packaging and its effect on the growth of Pseudomonas and aerobic mesophilic bacteria in chicken. **Revista Vitae**, [s.l.], v. 22, n. 2, p. 111-120, 4 nov. 2015. Universidad de Antioquia. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.vitae.v22n2a05>. Acesso em: 13 set 2018.

HOFFMAN, Allan S.. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 64, p.18-23, dez. 2012. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>. Acesso em: 10 set 2018.

INAM, Farhin; DEO, Sujata; NARKHEDE, Neha. HPLC –UV Method Development and Quantification of Eugenol from Methanolic Extracts of Some Spices. **International Journal Of Chemical And Physical Sciences**, Nagpur, v. 3, n. 6, p.96-102, dez. 2014.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Q1A (R2). (2003). Stability testing of new drug substances and products. London: European Medicines Agency. Disponível em:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf. Acesso em: jan - 2019.

JADHAV, B. K. *et al.* Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Tablets Containing Eugenol for the Treatment of Periodontal Diseases. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 195-203, jan. 2004. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1081/ddc-120028715>. Acesso em: 20 ago 2018.

JEONG, Byeongmoon; KIM, Sung Wan; BAE, You Han. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 64, p.154-162, dez. 2012. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.012>. Acesso em: 20 set 2018.

JOHNSTON, T. P. Anatomy and Physiology of the Oral Mucosa. In: RATHBONE, M. J.; ŞENEL, S.; PATHER, I. **Oral Mucosal Drug Delivery and Therapy**. London: Springer, 2015. p. 1-15.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: Mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. **Journal Of Applied Polymer Science**, [s.l.], v. 61, n. 12, p. 2229-2234, 19 set. 1996. Wiley. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4628\(19960919\)61:123.0.co;2-0](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-4628(19960919)61:123.0.co;2-0). Acesso em: 05 out 2018.

JONES, D. S. *et al.* Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: In vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 49, n. 1, p. 71-79, nov. 1997. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659\(97\)00060-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(97)00060-6). Acesso em: 10 jan 2019.

JONES, David S. *et al.* Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 88, n. 6, p.592-598, jun. 1999. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/js9803095>. Acesso em: 15 jan 2019.

JONES, D. S. *et al.* Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 372, n. 1-2, p. 49-58, 8 maio 2009. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.01.006>. Acesso em: 29 dez 2018.

JUG, Mario *et al.* An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 147, p.350-366, jan. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.072>. Acesso em: 29 jan 2019.

JUNG, Byung-ok; CHUNG, Suk-jin; LEE, Sang Bong. Preparation and Characterization of Eugenol-Grafted Chitosan Hydrogels and Their Antioxidant Activities. **Journal Of Applied Polymer Science**, Seoul, v. 99, n. 1, p.3500-3506, jan. 2006.

KAUR, Amanpreet; KAUR, Gurpreet. Mucoadhesive buccal patches based on interpolymer complexes of chitosan–pectin for delivery of carvedilol. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.21-27, jan. 2012. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.04.005>. Acesso em: 20 jan 2019.

KHAN, Barkat Ali. Basics of pharmaceutical emulsions: A review. **African Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [s.l.], v. 5, n. 25, p.2715-2725, 30 dez. 2011. Academic Journals. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5897/ajpp11.698>. Acesso em: 05 mar 2019.

KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 68, n. 1, p. 34-45, jan. 2008. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.02.025>. Acesso em: 10 set 2018.

LAM, Jenny K.w. et al. Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 73, p.50-62, jun. 2014. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.011>. Acesso em: 15 jan 2019.

MALUF, Daniela Florencio et al. Cytoprotection of antioxidant biocompounds from winery waste: application as an active ingredient for cosmetic products. **Author Manuscript**, Curitiba, v. 1, n. 1, p.1-15, jan. 2018.

MARCHESE, Anna et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews In Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.668-689, 27 mar. 2017. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/1040841x.2017.1295225>. Acesso em: 20 fev 2019.

MELO, Cristiane da Silva; CUNHA JUNIOR, Armando da Silva; FIALHO, Sílvia Ligório. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p.469-477, maio 2012.

MOLOUGHNEY, Joseph G.; WEISLEDER, Noah. Poloxamer 188 (P188) as a Membrane Resealing Reagent in Biomedical Applications. **Recent Pat Biotechnol. Author Manuscript**, Columbus, v. 6, n. 3, p.200-2011, jun. 2013.

MOURA, Maria José. Aplicações do quitosano em libertação controlada de fármacos: algumas considerações. **Enciclopédia Biosfera**, Coimbra, v. 8, n. 14, p.1489-1509, jun. 2012.

NAGAI, Tsuneji; MACHIDA, Yoshiharu. Buccal delivery systems using hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Tokyo, v. 11, n. 1, p.179-191, jan. 1993.

PARK, C. k. *et al.* Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. **Pain**, [s.l.], v. 144, n. 1, p. 84-94, jul. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2009.03.016>. Acesso em: 10 jul 2018.

PEREIRA, Gabriela Garrastazu; DIMER, Frantiescoli Anversa; GUTERRES, Sílvia Stanisçuaki. Formulation and characterization of Poloxamer 407®: Thermoreversible 72 gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Química Nova**, Porto Alegre, v. 36, n. 8, p.1121-1125, 02 ago. 2013.

POKHARKAR, V. B. *et al.* Development and optimization of eugenol loaded nanostructured lipid carriers for periodontal delivery. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, Pune, v. 3, n. 4, p. 138-143, jun. 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/288966883>. Acesso em: 28 dez 2018.

QI, Hongyi *et al.* Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 337, n. 1-2, p.178-187, jun. 2007. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.038>. Acesso em: 15 jan 2019.

RAPP, C. **Clove oil as effective as topical anesthetic**. Herbal Gram 2007; 74: 26.

RATHBONE, Michael John; PATHER, Indiran; ŞENEL, Sevda. Overview of Oral Mucosal Delivery. In: RATHBONE, Michael J.; ŞENEL, Sevda; PATHER, Indiran. **Oral Mucosal Drug Delivery and Therapy**. London: Springer, 2015. p. 17-29.

SANDRI, S. Rossi G. *et al.* The role of chitosan as a mucoadhesive agent in mucosal drug delivery. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.275-284, 2012. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1773-2247\(12\)50046-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1773-2247(12)50046-8). Acesso em: 10 fev 2019.

SANTOS, Adriana de Jesus. **Nanocompósitos contendo óleo essencial de Syzygium aromaticum**: Obtenção, caracterização e atividade larvícida contra o *Aedes aegypti*. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2012.

SHARMA, Gajanand; KAMBOJ, Shelly; THAKUR, Kanika; NEGI, Poonam; RAZA, Kaiser; KATARE, O. P.. Delivery of Thermoresponsive-Tailored Mixed Micellar Nanogel of Lidocaine and Prilocaine with Improved Dermatokinetic Profile and Therapeutic Efficacy in Topical Anaesthesia. **Aaps Pharmscitech**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.790-802, 17 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-016-0561-8>. Acesso em 10 dez 2018.

SHASTRY, Shilpa Padar *et al.* Topical drug delivery: An essential aid in the management of oral diseases. **Journal Of Advanced Clinical & Research Insights**, [s.l.], v. 2, p.269-275, 2015. Incessant Nature Science Publishers Pvt Ltd.. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15713/ins.jcri.92>. Acesso em 23 nov 2018.

SHINKAR, D. M.; DHAKE, A. S.; SETTY, C. M. Drug Delivery from the Oral Cavity: A Focus on Mucoadhesive Buccal Drug Delivery Systems. **Pda Journal Of Pharmaceutical Science And Technology**, [s.l.], v. 66, n. 5, p. 466-500, 1 set. 2012. Parenteral Drug Association, Inc.. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5731/pdajpst.2012.00877>. Acesso em: 17 jul 2019.

SNYMAN, Dewald; HAMMAN, Josias H.; KOTZE, Awie F.. Evaluation of the Mucoadhesive Properties of N-Trimethyl Chitosan Chloride. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.61-69, jan. 2003. Informa UK Limited. Disponível em :<http://dx.doi.org/10.1081/ddc-120016684>. Acesso em 30 nov 2018.

SOGIAS, Ioannis A.; WILLIAMS, Adrian C.; KHUTORYANSKIY, Vitaliy V.. Why is Chitosan Mucoadhesive? **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.1837-1842, jul. 2008. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/bm800276d>. Acesso em: 05 jan 2019.

TEIXEIRA, A J. **Ação antimicrobiana in vitro de derivados da quitina sobre bactérias orais organizadas em biofilme**. 2002. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2002.

TUĞCU-DEMİRÖZ, F. Development of in situ poloxamer-chitosan hydrogels for vaginal drug delivery of benzydamine hydrochloride: Textural, mucoadhesive and in vitro release properties. **Marmara Pharmaceutical Journal**, Ankara, v. 21, n. 4, p. 762-770, jan. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/320199353>. Acesso em: 10 jan 2019.

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GRÖBNER, G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 409, n. 1-2, p. 19-29, mai. 2011. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.017>. Acesso em: 28 nov 2018.

VIEIRA, Liza Barreto. **Eficácia do bochecho de quitosana a 0,4% sobre o biofilme e bactérias orais**. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

VRIES, M. E. de et al. Hydrogels for buccal drug delivery: properties relevant for mucoadhesion. **Journal Of Biomedical Materials Research**, Leiden, v. 22, n. 1, p.1023- 1032, jan. 1988.

WASHINGTON, Neena; WASHINGTON, Clive; G.WILSON, Clive. **Physiological Pharmaceutics: Barriers to drug absorption**. 2. ed. Londres: Taylor e Francis Group, 2001. 327 p.

WU, J.; SU, Z. G.; MA, G. H. A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 315, n. 1-2, p. 1-11, jun. 2006. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.045>. Acesso em: 15 jan 2019.