

HEIDEGRID SIEBERT KOOP

**HIDROGÉIS BINÁRIOS DE XANTANA E
GALACTOMANANAS COM INCORPORAÇÃO DE
CURCUMINA VISANDO USO TÓPICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica

Orientação: Dra. Joana Lea Meira Silveira

Co-orientação: Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Koop, Heidegrid Siebert

Hidrogéis binários de xantana e galactomananas com incorporação de curcumina visando uso tópico. / Heidegrid Siebert Koop. – Curitiba, 2012. 142 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Joana Lea Meira Silveira

Co-orientador: Rilton Alves de Freitas

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Hidrogel 2. Curcumina I. Título II. Silveira, Joana Lea Meira III. Freitas, Rilton Alves de IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

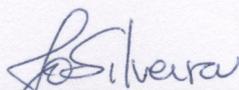
CDD (20. ed.) 615.1

TERMO DE APROVAÇÃO

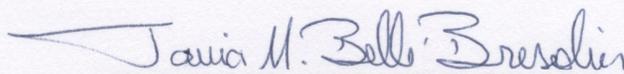
HEIDEGRID SIEBERT KOOP

**HIDROGÉIS BINÁRIOS DE XANTANA E GALACTOMANANAS COM
INCORPORAÇÃO DE CURCUMINA VISANDO USO TÓPICO**

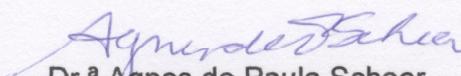
Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



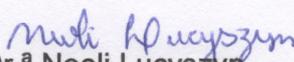
Dr.ª Joana Léa Meira Silveira – Orientadora
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



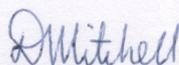
Prof.ª Dr.ª Tania Mari Belle Bresolin
Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas - UNIVALI - SC



Dr.ª Agnes de Paula Scheer
Departamento Engenharia Química - UFPR



Dr.ª Neoli Lucyszyn
Departamento de Licenciatura em Química - PUCPR



Dr. David Alexander Mitchell
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 28 de fevereiro de 2012.

Dedico este trabalho com imenso amor e
gratidão...

Aos meus amores...
meu marido, Walter Koop,
meus filhos Juliano e Maureen,
e ao meu pai Hermut Siebert.

Agradecimentos

À Deus, Pai amado, que me concedeu a vida e a oportunidade de realizar esta etapa, agradeço por sempre me abençoar e me guardar e pela misericórdia e paz oferecidas.

Ao meu marido, Walter, por ser tão especial em minha vida e estar ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e me incentivando. Sempre lembrando que a vida é feita de vitórias e derrotas, tempos de investir e tempos de colher. Agradeço pela paciência e compreensão pela minha ausência, e pelo carinho e pelo amor.

Ao meu pai, Hermut, e minha mãe Edith '*in memoriam*', pelo exemplo de vida e de responsabilidade, pela educação que me proporcionaram e, apesar de não entender os meus anseios de pesquisa 'sem fim', ter me apoiado e compreendido.

A família Koop e Siebert que sempre estiveram presentes, pelo carinho, preocupação e incentivo, sempre.

À minha orientadora, Prof.^a Joana, por ter me acolhido e confiado no meu potencial. Sou muito grata pela sua paciência, entusiasmo e disposição em orientar-me nestes sete anos. Sou grata pela amizade e carinho conquistados neste período.

Ao meu co-orientador, Prof. Rilton, um exemplo de pesquisador. Agradeço pela supervisão nos experimentos de cedência de fármacos e nos testes de irritação cutânea, pelos ensinamentos e discussões além das muitas conversas, conselhos e momentos que compartilhamos.

À Prof.^a Maria Rita e à Prof.^a Gláucia, pelas correções do projeto e relatórios, pelas sugestões e pelos conselhos.

Ao Prof. Diogo, pela correção desta tese na banca interna, pelas sugestões pontuais e valiosas.

Ao Prof. David, também pela correção criteriosa desta tese na banca interna e pela correção de textos e artigo. Agradeço pelas discussões, ensinamentos e conselhos de como compilar e discutir resultados.

À Prof.^a Célia Regina e ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, agradeço pela colaboração e supervisão na obtenção das imagens eletrônicas, e pelas conversas e conselhos.

À Prof.^a Márcia da UNIVALI, pela colaboração e orientação nos experimentos de atividade anti-inflamatória e pelas discussões.

Ao Grupo 'O Boticário', representado pela Sra. Ana Lúcia Pereira, Odivania Kruger e Marina Adami, pela colaboração e disponibilização do equipamento de células de Franz.

Ao Lauro, pela colaboração e uso do equipamento de UPLC, pelas análises de ESI-MS, pelas conversas e sugestões.

À Eneida J. Da Lozzo, que iniciou os estudos da incorporação da curcumina em géis hidrofílicos e me animou a dar sequência a esta pesquisa.

À Rosane e Elizangela pelas análises de GC-MS e HPSEC-MALLS.

Aos colegas que me acompanharam desde o mestrado, Amanda, Caroline, Francine, Luciana, Marco Aurélio, pelo companheirismo e incentivo na minha fase de retomada da vida acadêmica.

Aos colegas do laboratório de Química de Carboidratos, Ana Paula, Andréia, Augusto, Elizangela, João, Lúcia, Mariana, Marília, Marina, Rhayla, Roberto e a todos que estiveram presentes no laboratório durante a realização deste trabalho, pela companhia e pelas conversas e por compartilhar o trabalho em equipe.

Aos amigos Ana Helena, Andreia, Arquimedes, Elaine, Fernanda, Franciely, Larry, Lauro, Luciano, Nessana, Tatiane e Prof. Thales, pelas conversas descontraídas nos corredores, companhia nos almoços e pausas de café.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pela dedicação e ensinamentos.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, representada pelo Prof. Miguel, pela oportunidade de pesquisa e aprendizado, e às secretárias Marilza e Irene, pelos auxílios prestados.

À todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização desta tese e para meu amadurecimento científico, vocês fizeram a diferença!

À CAPES, ao PRONEX-Carboidratos e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

"A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade".

Carlos Drummond de Andrade.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades dos hidrogéis binários obtidos pela mistura de xantana e galactomanana comercial de alfarroba (*Ceratonia siliqua*) (XL) ou xantana e galactomanana de guapuruvu (*Schizolobium parahybae*) (XG). A galactomanana de guapuruvu apresenta características estruturais semelhantes à galactomanana de alfarroba, muito usada na indústria alimentícia e farmacêutica, entre outras aplicações. Os hidrogéis XG e XL foram usados como veículos para curcumina (CUR), um fármaco hidrofóbico. A CUR foi incorporada através de três formas diferentes: através de um sistema micelar, originando o hidrogel XLSC; através de uma microemulsão, originando os hidrogéis XLMC e XGMC; e por simples solubilização em etanol e posterior adição ao hidrogel, originando os hidrogéis XLEC e XGEC. Todos os hidrogéis apresentaram a estrutura reológica de gel, onde G' é maior do que G'' , em todas as frequências testadas. A CUR foi escolhida, como fármaco modelo, pela sua conhecida ação anti-inflamatória e efeito antioxidante e por apresentar baixa toxicidade. Pela via tópica produz resultados favoráveis no tratamento de psoríase, além de ser efetivo no tratamento de acne, rosácea e diminuição de rugas. Extratos de *Curcuma longa* possuem três diferentes curcuminóides, curcumina (CUR), demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina. Foi desenvolvida e validada com sucesso uma metodologia analítica dos curcuminóides incorporados nos hidrogéis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com linearidade da faixa de 1 – 100 ng/mL. Os limites de detecção e quantificação foram estimados em 0,21 e 0,63 ng/mL, respectivamente, para CUR. A precisão e exatidão foram adequadas (recuperação dos curcuminóides de 98,77%) e indicativas da estabilidade do fármaco, mantendo boa resolução entre o analito e os produtos de degradação formados nos testes de estresse. O teor de curcuminóides, recuperados e quantificados por CLAE, foi em média de 100,94% a partir dos hidrogéis binários XLEC, XLMC, XGEC e XGMC. Foi demonstrada a estabilidade dos hidrogéis, assim como a estabilidade química dos curcuminóides, por 45 dias a 45°C. A análise de permeação *in vitro* dos curcuminóides apresentou absorção dérmica em membranas de orelha de porco, a partir de XLEC, XLMC, XGEC e XGMC. O teor dos curcuminóides no estrato córneo, epiderme e derme foi entre 2,15 µg/mL a 2,50 µg/mL. A toxicidade dos hidrogéis binários foi testada pelo ensaio de agarose *overlay* e XG, XLEC, XLMC, XGEC e XGMC não apresentaram reatividade. A ação anti-inflamatória dos curcuminóides, veiculados nestes hidrogéis, foi investigada pelo ensaio *in vivo* de edema de orelha de camundongo e foi observado um perfil farmacológico semelhante ao da dexametasona (56,0%) para o hidrogel XGMC (63,2%). Os hidrogéis XGEC e XLEC tiveram um efeito antiedematogênico (76,8% e 83,6%, respectivamente), superior a dexametasona (56,0%), confirmando a ação anti-inflamatória dos curcuminóides. Através deste trabalho, foi demonstrado que os hidrogéis binários XG e XL são um veículo hidrofílico potencial para a administração tópica de fármacos hidrofóbicos, com liberação prolongada, e propiciando a estabilidade química dos curcuminóides. Sendo que XGMC e XLMC não possuem a adição de etanol na sua formulação para incorporação da curcumina (fármaco lipofílico), podendo ser aplicado sobre peles sensíveis, com é o caso de peles psoriáticas.

Palavras-chave: Hidrogel, xantana, galactomanana, *Schizolobium parahybae*, *Ceratonia siliqua*, curcumina, reologia, cromatografia líquida de alta eficiência, permeação transdérmica.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the properties of binary hydrogels made from xanthan and either locust bean galactomannan (*Ceratonia siliqua*) (XL) or guapuruvu galactomannan (*Schizolobium parahybae*) (XG). The guapuruvu galactomannan has structural features similar to locust bean galactomannan, which is used commercially in the food and pharmaceutical industries, among other applications. The hydrogels XG and XL were chosen as vehicles of a hydrophobic drug, curcumin (CUR). CUR was incorporated in three different ways: first, through a micellar system (XLSC); second, via a microemulsion (hydrogels XLMC and XGMC); and, third, by simple solubilization of CUR in ethanol and subsequent addition to the resulting hydrogel (XLEC and XGEC). All hydrogels showed gel structures in rheological analysis, with G' is greater than G'' , at all frequencies tested. CUR was chosen as the model drug due to its known anti-inflammatory action and antioxidant effects and its low toxicity. *Curcuma longa* extracts are composed of three different curcuminoids, curcumin (CUR), demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin. An analytical method for determining the curcuminoids by HPLC was successfully developed and validated to quantify curcuminoids incorporated into hydrogels, with linearity over the range of 1 to 100 ng/mL. The limits of detection and quantification estimated for CUR were 0.21 and 0.63 ng/mL, respectively. The precision and accuracy were adequate (recovery of 98.77% of curcuminoids) and indicative of drug stability while maintaining good resolution between the analyte and the degradation products formed in the stress tests. The content of curcuminoids, recovered and quantified by HPLC, was an average of 100.94% from the hydrogels formulations. The hydrogels and the curcuminoids that they contained were stable for 45 days at 45°C. Analyses of *in vitro* permeation of CUR from the hydrogels XLEC, XLMC, XGEC and XGMC demonstrated dermal absorption in pig ear membrane. The curcuminoids content in the stratum corneum, epidermis and dermis was between 2.15 µg/mL to 2.50 µg/mL. The toxicity of the binary hydrogels was tested by the agarose overlay assay; the hydrogels XG, XLEC, XLMC, XGEC and XGMC were not reactive. The anti-inflammatory effect of CUR in these hydrogels was investigated by an *in vivo* assay of mouse ear edema. The pharmacological profile observed with the hydrogels XGMC (63.2%), XGEC (76.8%) and XLEC (83.6%) was similar or greater than that of dexamethasone (56.0%), confirming the anti-inflammatory action of CUR. This work demonstrates that hydrophilic hydrogels of xanthan and galactomannan are a potential vehicle for topical administration of hydrophobic drugs with slow release, providing chemical stability of the curcuminoids. Since the XGMC and XLMC did not contain ethanol in the formulation for incorporation of CUR (lipophilic drug) and can be applied on sensitive skin, as in the case of psoriatic skin.

Keywords: Hydrogel, xanthan, galactomannan, *Schizolobium parahybae*, *Ceratonia siliqua*, curcumin, rheology, high performance liquid chromatography, transdermal permeation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	– ESQUEMA DE MÉTODOS DE FORMAÇÃO DE DOIS TIPOS DE HIDROGÉIS FÍSICOS	23
FIGURA 2	– SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE GALACTOMANANA DE ORIGEM VEGETAL	25
FIGURA 3	– ASPECTO GERAL DA ÁRVORE E DAS SEMENTES DE <i>Schizolobium parahybae</i>	27
FIGURA 4	– ESTRUTURA GENÉRICA DA XANTANA	28
FIGURA 5	– MODELOS DE INTERAÇÃO ENTRE CADEIAS DE XANTANA E GALACTOMANANA	30
FIGURA 6	– ESTRUTURA QUÍMICA DOS CURCUMINÓIDES	32
FIGURA 7	– ROTAS PARA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE COMPOSTOS	38
FIGURA 8	– DIAGRAMA DO EXPERIMENTO DE CEDÊNCIA <i>in vitro</i>	63
FIGURA 9	– ESQUEMA DA CÉLULA DE DIFUSÃO UTILIZADA PARA ESTUDOS DE PERMEAÇÃO <i>in vitro</i>	65
FIGURA 10	– PERFIL DE ELUIÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE GUAPURUVU POR HPSEC-MALLS/RI	75
FIGURA 11	– PERFIL DE ELUIÇÃO DA GALACTOMANANA COMERCIAL DE ALFARROBA POR HPSEC-MALLS/RI	76
FIGURA 12	– PERFIL DE ELUIÇÃO DA XANTANA POR HPSEC-MALLS/RI	77
FIGURA 13	– DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS DAS GOTÍCULAS DO SISTEMA MICELAR (A) E DA MICROEMULSÃO (B) OBTIDA POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO A 90°	79
FIGURA 14	– DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS GOTÍCULAS DO SISTEMA MICELAR OBTIDO POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO A 90° DURANTE AQUECIMENTO DE 25 A 60°C E RESFRIAMENTO	80
FIGURA 15	– DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS GOTÍCULAS DA MICROEMULSÃO OBTIDO POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO A 90° DURANTE AQUECIMENTO DE 25 A 60°C	80
FIGURA 16	– VARREDURA DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E ALFARROBA COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES	82
FIGURA 17	– CURVAS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E ALFARROBA COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES	82

FIGURA 18	– VARREDURA DOS MÓDULOS ELÁSTICO E VISCOSO DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, ENTRE 15°C E 95°C, DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E ALFARROBA COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES	85
FIGURA 19	– ENSAIO DE ESTABILIDADE NOS EXTREMOS DE TEMPERATURA DE -10 A 60°C DO HIDROGEL DE XANTANA E ALFARROBA COM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES	86
FIGURA 20	– FOTOMICROGRAFIAS DA SUPERFÍCIE DE HIDROGÉIS XL (A), XLEC (B) E XLSC (C), E FOTOMICROGRAFIA DE CRIOFRATURA DE HIDROGÉIS XL (A'), XLEC (B') E XLSC (C')	88
FIGURA 21	– CROMATOGRAMA DOS CURCUMINÓIDES NAS CONCENTRAÇÕES DE 100 ng/mL E ESPECTOMETRIA DE MASSA	90
FIGURA 22	– CURVAS ANALÍTICAS DOS CURCUMINÓIDES EM CLAE	94
FIGURA 23	– CROMATOGRAMA DOS CURCUMINÓIDES EM ESTUDO DE DEGRADAÇÃO ALCALINA	100
FIGURA 24	– CROMATOGRAMA DOS CURCUMINÓIDES EM ESTUDO DE FOTODEGRADAÇÃO	101
FIGURA 25	– CROMATOGRAMA DOS CURCUMINÓIDES NAS CONCENTRAÇÕES DE 6 E 25 µg/mL OBTIDO POR UPLC	102
FIGURA 26	– VARREDURA DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E ALFARROBA COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES, NO TEMPO ZERO (A) E APÓS 45 DIAS (B)	106
FIGURA 27	– VARREDURA DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E GUAPURUVU COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES, NO TEMPO ZERO (A) E APÓS 45 DIAS (B)	107
FIGURA 28	– FOTOGRAFIAS DOS HIDROGÉIS XL E XG (A) E DOS HIDROGÉIS XLMC E XGMC (B)	109
FIGURA 29	– PROPORÇÃO DE CURCUMINÓIDES DISSOLVIDOS PARA SOLUÇÃO RECEPTORA DURANTE ANÁLISE DE DISSOLUÇÃO	112
FIGURA 30	- CULTURA DE FIBROBLASTOS CORADOS COM VERMELHO NEUTRO EM ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM AGAROSE	117
FIGURA 31	– PLACA DE GEL DE AGAROSE CONTENDO AS AMOSTRAS DE HIDROGÉIS XLMC E XGMC E CONTROLE POSITIVO (DSS) E CONTROLE NEGATIVO	118
FIGURA 32	– ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS HIDROGÉIS CONTENDO CURCUMINÓIDES TESTADO PELO MÉTODO DE EDEMA DE ORELHA	120

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– ESTUDOS REALIZADOS COM DETECÇÃO DA CURCUMINA OU CURCUMINÓIDES	42
TABELA 2	– COMPOSIÇÃO DO SISTEMA MICELAR, DA MICROEMULSÃO E SOLUÇÃO ETANÓLICA	47
TABELA 3	– IDENTIFICAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE ACORDO COM SUA COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINA	49
TABELA 4	– PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ENSAIO DE EXATIDÃO	54
TABELA 5	– CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE REATIVIDADE CUTÂNEA	70
TABELA 6	– COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E RESPECTIVAS ANÁLISES QUÍMICAS DE GALACTOMANANA DE GUAPURUVU	74
TABELA 7	– PARÂMETROS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO DETERMINADOS PARA OS HIDROGÉIS XL, XLSC E XLEC	84
TABELA 8	– VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DA FASE MÓVEL PARA ANÁLISE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DOS CURCUMINÓIDES (10 ng/mL) POR CLAE	91
TABELA 9	– VARIAÇÃO DE FLUXO DA FASE MÓVEL PARA ANÁLISE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DOS CURCUMINÓIDES (10 ng/mL) POR CLAE	92
TABELA 10	– VALORES DE LD E LQ DOS CURCUMINÓIDES	94
TABELA 11	– RESULTADOS DE REPETIBILIDADE	95
TABELA 12	– RESULTADOS DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	96
TABELA 13	– ENSAIO DE EXATIDÃO PELA RECUPERAÇÃO DO PADRÃO DE CURCUMINA UTILIZANDO A MICROEMULSÃO	97
TABELA 14	– ENSAIO DO TEOR DOS CURCUMINÓIDES A PARTIR DOS HIDROGÉIS	98
TABELA 15	– AVALIAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CURCUMINÓIDES EM DIFERENTES CONDIÇÕES	99
TABELA 16	– VALORES DE pH DOS HIDROGÉIS XL, XLEC, XLMC E XG, XGEC, XGMC DURANTE AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE	104
TABELA 17	– CARACTERÍSTICAS ELÁSTICAS DOS HIDROGÉIS XL, XLEC, XLMC E XG, XGEC, XGMC DURANTE AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE	104

TABELA 18	– TEOR DE CURCUMINÓIDES TOTAIS NOS HIDROGÉIS XLEC, XLMC, XGEC, XGMC OBTIDO DURANTE ENSAIO DE ESTABILIDADE NA ESTUFA	110
TABELA 19	– CONSTANTES DE DISSOLUÇÃO E COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE CURCUMINÓIDES A PARTIR DOS HIDROGÉIS	113
TABELA 20	– CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINÓIDES TOTAIS DETERMINADOS POR UPLC NAS CAMADAS DA PELE DE PORCO	114

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

λ	- Comprimento de onda
$[\eta]_w$	- Viscosidade intrínseca
A/O	- Emulsão óleo em água
ACN	- Acetonitrila
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDM	- bis-demetoxicurcumina
Carbopol [®]	- poliacrilato
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CUR	- curcumina
CV%	- Coeficiente de variação
D_h	Diâmetro hidrodinâmico
DMC	- demetoxicurcumina
dn/dc	- Incremento de índice de refração específico
DPR	Desvio padrão relativo
EC	- estrato córneo
FM	- Fase móvel
G	- Galactomanana de guapuruvu
G''	- Módulo de cisalhamento dinâmico de perda ou viscoso
G'	- Módulo de cisalhamento dinâmico de estocagem ou elástico
HCl	- Ácido clorídrico
HPSEC-	- Cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão
J_0	Deformação instantânea no tempo zero
J_r	Recuperação elástica
J_r/J_{\max}	Recuperação do sistema
k	Constante de cedência
L	- Galactomanana de alfarroba
LD	- Limite de detecção
L_p	- Comprimento de persistência
LQ	- Limite de quantificação
m/m	Relação entre massa e massa
m/z	Relação massa e carga
MALLS	Detector por espalhamento de luz laser com multiângulos

Man:Gal	-	Relação manose:galactose
Mb	-	Microemulsão sem curcumina
MC	-	Microemulsão com 5 mg/mL de curcumina
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
M_w	-	Massa molar média
NaBH_4	-	Boroidreto de sódio
NaN_3	-	Azida de sódio
NaNO_2	-	Nitrito de sódio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
NNLS	-	Modelo matemático de Non-Negative Least Squares
O/A	-	Emulsão água em óleo
PBS		Tampão salino fosfato pH 7,4
PDA	-	Detector de <i>photodiode-array</i>
POP		1,2-propanediol com solubilização de 300 μg de curcuminóides
RI		Detector de índice de refração
SMb	-	Sistema micelar sem curcumina
SMC	-	Sistema micelar com 5 mg/mL de curcumina
$\tan \delta$		Tangente de perda
T_m	-	Temperatura de transição conformacional
UPLC	-	Ultra performance liquid chromatography
UV	-	Luz ultra violeta
X	-	Xantana
XG	-	Hidrogel binário de xantana e galactomanana de guapuruvu
XGEC	-	Hidrogel binário de xantana e galactomanana de guapuruvu com curcumina solubilizada em etanol
XGMC	-	Hidrogel binário de xantana e galactomanana de guapuruvu com curcumina incorporada em microemulsão
XL	-	Hidrogel binário de xantana e galactomanana de alfarroba
XLEC	-	Hidrogel binário de xantana e galactomanana de alfarroba com curcumina solubilizada em etanol
XLMC	-	Hidrogel binário de xantana e galactomanana de alfarroba com curcumina incorporada em microemulsão
XLSC	-	Hidrogel binário de xantana e galactomanana de alfarroba com curcumina incorporada em sistema micelar
σ_0		Tensão aplicada no tempo zero

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1	HIDROGÉIS.....	22
3.2	GALACTOMANANAS.....	25
3.3	XANTANA.....	27
3.4	HIDROGEL BINÁRIO XANTANA:GALACTOMANANA.....	29
3.5	CURCUMINA.....	31
3.6	MICROEMULSÕES.....	34
3.7	ESTRUTURA DA PELE.....	36
3.8	TESTES DE CEDÊNCIA DO FÁRMACO E PERMEAÇÃO TRANSDÉRMICA.....	39
3.9	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EMPREGADOS NA QUANTIFICAÇÃO DA CURCUMINA.....	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1	MATÉRIAS-PRIMAS, REAGENTES E SOLVENTES.....	43
4.2	EXTRAÇÃO DE GALACTOMANANA A PARTIR DE SEMENTES DE GUAPURUVU.....	43
4.2.1	Determinação de açúcar total.....	44
4.2.2	Determinação de proteínas.....	44
4.2.3	Determinação da composição monossacarídica.....	44
4.2.4	Análises cromatográficas de exclusão estérica de alta pressão acoplada a detecção por espalhamento de laser com multiângulos e índice de refração.....	45
4.3	OBTENÇÃO DOS SISTEMAS EMULSIONADOS.....	46
4.3.1	Sistema micelar.....	46
4.3.2	Microemulsão.....	46

4.3.3	Determinação do raio hidrodinâmico das gotículas da microemulsão por espalhamento de luz.....	47
4.4	OBTEÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	49
4.5	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DOS CURCUMINÓIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	50
4.5.1	Robustez.....	51
4.5.2	Linearidade.....	52
4.5.3	Limite de quantificação e limite de detecção.....	53
4.5.4	Precisão.....	53
4.5.5	Exatidão.....	54
4.5.6	Especificidade.....	55
4.6.1.1	Hidrólise ácida.....	55
4.6.1.2	Hidrólise alcalina.....	56
4.6.1.3	Fotodegradação.....	56
4.6	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (CLAE-MS).....	56
4.7	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC).....	57
4.8	ANÁLISES FÍSICAS DOS HIDROGÉIS.....	58
4.8.1	Varredura de tensão.....	58
4.8.2	Varredura de frequência.....	58
4.8.3	Rampa de temperatura.....	58
4.8.4	Fluência e recuperação.....	59
4.8.5	Análises de microscopia eletrônica por varredura.....	59
4.9	ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS.....	60
4.9.1	Características organolépticas.....	61
4.9.2	Determinação do pH.....	61
4.9.3	Resistência física.....	61
4.9.4	Característica reológica.....	61
4.9.5	Análise do teor de curcuminóides nos géis.....	62
4.10	ESTUDO DE DISSOLUÇÃO DOS CURCUMINÓIDES A PARTIR DOS HIDROGÉIS XLEC, XGEC, XLMC e XGMC.....	62

4.10.1	Estudo de solubilidade.....	62
4.10.2	Estudo de cedência por membrana sintética.....	63
4.11	ESTUDO DE PERMEAÇÃO <i>in vitro</i>	64
4.11.1	Obtenção da pele.....	65
4.11.2	Estudos de retenção e permeação <i>in vitro</i>	66
4.11.3	Quantificação da curcumina remanescente, na pele após permeação cutânea.....	66
4.12	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	67
4.12.1	Técnica para o preparo de meio de cultura com soro fetal bovino.....	67
4.12.2	Técnica para o preparo de meio de cultura com soro fetal bovino concentrado 2x.....	68
4.12.3	Controle de qualidade microbiológico do meio de cultura com soro fetal bovino.....	68
4.12.4	Manutenção celular e crescimento.....	68
4.12.5	Ensaio agarose <i>overlay</i>	69
4.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>in vivo</i>	70
4.13.1	Animais.....	70
4.13.2	Método de edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	70
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
5.	FLUXOGRAMA	72
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
6.1	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOMANANA DE GUAPURUVU.....	73
6.1.1	Caracterização química da galactomanana de guapuruvu.....	73
6.1.2	Análise por HPSEC-MALLS.....	74
6.2	OBTENÇÃO DOS SISTEMAS EMULSIONADOS.....	77
6.2.1	Sistema micelar.....	77
6.2.2	Microemulsão.....	78
6.3	DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS PARTÍCULAS DO SISTEMA MICELAR E DA MICROEMULSÃO POR ESPALHAMENTO DE LUZ.....	78
6.4	ANÁLISE FÍSICA DOS HIDROGÉIS COM INCORPORAÇÃO DOS CURCUMINÓIDES PELO SISTEMA MICELAR E POR ETANOL.....	81

6.4.1	Análises reológicas.....	81
6.4.2	Análise dos hidrogéis por Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)...	87
6.5	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DA CURCUMINA INCORPORADA NOS HIDROGÉIS POR CLAE.....	89
6.5.1	Robustez.....	91
6.5.2	Linearidade e Intervalo.....	93
6.5.3	Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).....	93
6.5.4	Precisão.....	95
6.5.5	Exatidão.....	96
6.5.6	Especificidade.....	99
6.6	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA...	102
6.7	ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS XLEC, XLMC, XGEC e XGMC DURANTE 45 DIAS A 45 °C.....	103
6.7.1	Caraterísticas organopépticas, resistência física e pH.....	104
6.7.2	Análises reológicas.....	105
6.7.3	Análise do teor de curcumina por CLAE.....	110
6.8	ESTUDO DA DISSOLUÇÃO DOS CURCUMINÓIDES A PARTIR DOS HIDROGÉIS.....	111
6.8.1	Estudos de solubilidade da solução de curcuminóides.....	111
6.8.2	Estudo de dissolução <i>in vitro</i>	111
6.9	ESTUDO DE PERMEAÇÃO <i>in vitro</i>	113
6.10	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	116
6.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>in vivo</i>	118
7.	CONCLUSÕES.....	121
	REFERÊNCIAS.....	123

INTRODUÇÃO

A tecnologia de liberação de fármacos representa uma das fronteiras da ciência e vem contribuindo muito para o avanço da saúde humana. De modo geral, os sistemas de liberação lenta para os fármacos podem ser usados para prolongar o tempo de ação. Existe um interesse crescente no desenvolvimento de sistemas de liberação lenta de fármacos baseado em polímeros (HOFFMAN, 2002; DRURY, MOONEY, 2003; LORENZO, CONCHEIRO, 2004; FREIBERG, ZHU, 2004).

Neste contexto, os hidrogéis são utilizados como formas farmacêuticas transdérmicas de liberação controlada, para proporcionar um efeito local ou exercer uma ação sistêmica após a liberação e passagem através da barreira da pele. A administração de fármacos pela via transdérmica apresenta inúmeras vantagens aos sistemas orais ou parenterais, pois os efeitos colaterais ou adversos são reduzidos, o tratamento é indolor, os efeitos de superdosagem são evitados e a eventual suspensão do tratamento é rápida.

Outras características importantes quanto ao emprego dos hidrogéis poliméricos são: biocompatibilidade (KUDELA, 1987; HE, CAO, LEE, 2004), reprodutibilidade de liberação de fármaco e possibilidade de cinética de liberação de ordem zero (MÖCKEL, LIPPOLD, 1993). A escolha de materiais poliméricos em sistemas de liberação controlada de fármacos é baseada em parâmetros relacionados tanto com o polímero quanto com o fármaco. Quanto ao polímero, as características de massa molar, a distribuição de massa e a cristalinidade necessitam ser conhecidos. Já os parâmetros relacionados ao fármaco incluem a solubilidade da substância em fluidos biológicos, a massa molar e as possíveis interações do fármaco com o polímero (JEONG *et al.*, 2004).

Como fármaco modelo para incorporação em hidrogéis, foi escolhida a curcumina, pois apresenta grande variedade de atividades biológicas, destacando-

se entre elas a atividade anti-inflamatória e ação antioxidante. Devido a sua ação antioxidante e sequestrante de radicais livres, retarda o envelhecimento celular (PRATT, 1994) e demonstra propriedades excelentes no tratamento da pele senescente, além de inibir a melanogênese, podendo ser usada em tratamentos de disfunções hiperpigmentárias (TU *et al.*, 2011). A indústria farmacêutica e cosmética tem investigado formas de incorporar a curcumina em produtos de tratamento da pele e cosméticos para reverter o estresse oxidativo causado por radicais livres na pele (DRAELOS, 2009).

No presente trabalho, a curcumina foi incorporada a um sistema micelar, a uma microemulsão e solubilizada em etanol. Estes sistemas foram adicionados a um hidrogel binário hidrofílico formado por polissacarídeos de xantana e galactomananas vegetais. O uso de polissacarídeos é vantajoso por existirem em abundância, uma vez que são obtidos a partir de fontes renováveis como algas, plantas e culturas microbianas.

As galactomananas procedentes de fontes brasileiras são investigadas na forma de pesquisa e, ainda não são utilizadas industrialmente, apesar da biodiversidade da flora local e do clima favorável ao desenvolvimento das espécies vegetais nativas. No Brasil, a importação de produtos mucilaginosos e espessantes, de alfarroba ou guar, supera a exportação, sendo a Índia, o Paquistão e os Estados Unidos os maiores exportadores (CUNHA, PAULA, FEITOSA, 2009).

O hidrogel binário composto de xantana e galactomanana de guar tem sido usado para a fabricação de matrizes de liberação de fármacos em formas farmacêuticas sólidas de uso oral (BAICHWALL, NEVILLE, 2002; SILVEIRA, BRESOLIN, 2011). A substituição das galactomananas comerciais por galactomananas nativas em comprimidos tem sido estudada e foram observadas cinéticas de liberação dos fármacos de ordem zero (UGHINI *et al.*, 2004; VENDRUSCOLO *et al.*, 2005). O hidrogel de xantana e galactomanana, adicionado de curcumina, foi avaliado por membrana corialantóica embrionária de galinha. Os resultados demonstraram biocompatibilidade do hidrogel e a manutenção de suas características reológicas após a adição da curcumina (DA-LOZZO *et al.*, 2012). A aplicação tópica de galactomananas nativas adicionadas à xantana foi aprimorada neste estudo, como alternativa para a indústria farmacêutica.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho é avaliar as propriedades do hidrogel xantana:galactomanana após incorporação de um fármaco hidrofóbico (curcumina) e avaliar a liberação transdérmica a partir do hidrogel e da microemulsão-hidrogel.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumprir a finalidade deste trabalho, o estudo apresenta os seguintes objetivos específicos:

- Extrair e caracterizar a galactomanana do endosperma das sementes de *Schizolobium parahybae* (Guapuruvu) e caracterizar a galactomanana de *Ceratonia siliqua* L. (alfarroba comercial);
- Obter microemulsões óleo em água (O/A) e sistemas micelares, com e sem incorporação de curcuminóides, e caracterizar o diâmetro das gotículas por espalhamento de luz dinâmico;
- Obter hidrogéis de xantana:galactomanana de *Schizolobium parahybae* (Guapuruvu) ou *Ceratonia siliqua* L. (alfarroba), contendo curcuminóides, incorporados na forma de microemulsão, sistema micelar ou dissolvido em etanol, e caracterizar suas propriedades reológicas;
- Analisar a estabilidade física dos hidrogéis contendo curcuminóides, incorporados na forma de microemulsão ou dissolvido em etanol, por 45 dias quanto às características organolépticas, pH, homogeneidade após centrifugação, comportamento reológico e teor de curcuminóides por CLAE;

- Desenvolver e validar um método para determinação do teor de curcuminóides nos hidrogéis, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), além de desenvolver a metodologia por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC);
- Analisar as propriedades reológicas dos hidrogéis, obtidos com alfarroba, com e sem adição de curcuminóides, incorporados no sistema micelar ou dissolvidos em etanol;
- Analisar a morfologia interna dos hidrogéis binários, obtidos com alfarroba, com e sem adição de curcuminóides, incorporados no sistema micelar ou dissolvidos em etanol, por microscopia eletrônica por varredura (MEV);
- Analisar a dissolução dos curcuminóides em solução receptora, a partir dos hidrogéis binários, obtidos com alfarroba ou guapuruvu, com adição de curcuminóides, incorporados na microemulsão ou dissolvidos em etanol, por CLAE, *in vitro*, empregando saco de diálise;
- Analisar a permeação dos curcuminóides, a partir dos hidrogéis binários, obtidos com alfarroba ou guapuruvu, com adição de curcuminóides, incorporados na microemulsão ou dissolvidos em etanol, *in vitro*, empregando pele de orelha de porco, em células de difusão de Franz, por UPLC;
- Analisar a citotoxicidade dos hidrogéis binários, obtidos com alfarroba ou guapuruvu, com adição de curcuminóides, incorporados na microemulsão ou dissolvidos em etanol, em cultura de fibroblastos L929;
- Analisar a atividade anti-inflamatória dos hidrogéis binários, obtidos com alfarroba ou guapuruvu, com adição de curcuminóides, incorporados na microemulsão ou dissolvidos em etanol, *in vivo*, usando modelo de edema de orelha, em camundongos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HIDROGÉIS

Os hidrogéis têm despertado grande interesse de cientistas desde o estudo pioneiro de Wichterle e Lim (1960) com hidrogéis de hidroxietil metacrilato, devido a sua hidrofiliçidade e potencial biocompatibilidade. Hidrogéis são redes poliméricas hidrofílicas que absorvem de 10-20% até 1000% de água em relação ao seu peso seco.

Os hidrogéis vêm sendo usados para mimetizar tecidos, agindo como matriz extracelular sintética ao organizar células numa arquitetura tridimensional e servir de estímulo que direcione o crescimento e a formação do tecido desejado (YANG *et al.*, 2001; EKICI *et al.*, 2011; TAMURA *et al.*, 2011). Os hidrogéis estudados em 1980 foram microcápsulas de alginato para encapsulação de células (LIM, SUN, 1980) seguidos por estudos de incorporação de polímeros naturais como o colágeno e cartilagem de tubarão em hidrogéis para uso em queimaduras (YANNA, LEE, ORGILL, 1989).

Os hidrogéis podem ser denominados de químicos ou físicos. Os géis químicos podem ser quimicamente estáveis ou degradar e dissolver-se. Os 'géis físicos' são chamados reversíveis quando a rede se mantém coesa por entrelaçamentos moleculares ou por forças secundárias incluindo iônicas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (FIGURA 1). Este trabalho é baseado no estudo de polissacarídeos que formam hidrogéis físicos.

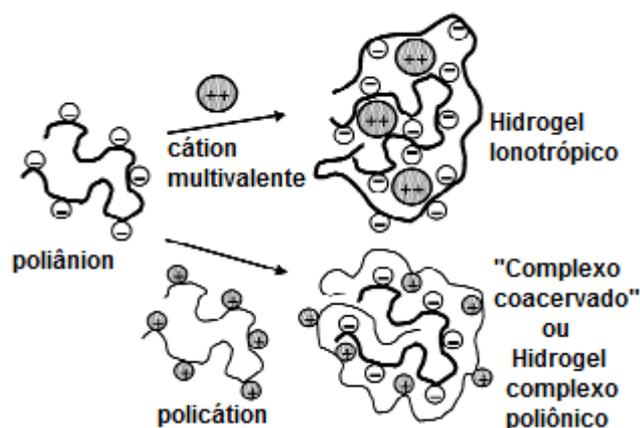


FIGURA 1 – ESQUEMA DE MÉTODOS DE FORMAÇÃO DE DOIS TIPOS DE HIDROGÉIS FÍSICOS

FONTES: HOFFMAN (2002)

Os hidrogéis podem ter formas físicas diversas, incluindo: (a) formas semissólidas maleáveis (lentes de contato gelatinosas); (b) matrizes em pó compactas (comprimidos de uso oral); (c) micropartículas (veículos para tratamentos tópicos); (d) revestimentos (usado em implantes ou cateter, em comprimidos ou cápsulas); (e) membranas (*patch* de liberação transdérmica); (f) sólidos encapsulados (bombas osmóticas); (g) líquidos (formadores de gel) (SIEPMANN, PEPPAS, 2001).

Os hidrogéis usados em tratamentos tópicos possuem flexibilidade similar a tecidos naturais devido ao alto conteúdo de água, o que minimiza a irritação das membranas ou dos tecidos vizinhos ao sítio de aplicação. Estes hidrogéis também podem ser aplicados como sistemas de liberação controlada de fármacos (PEPPAS, 1987; PARK, 1997; LOWMAN, PEPPAS, 1999; BYRNE, PARK, PEPPAS, 2002; LOPEZ, RAGHAVAN, SNOWDEN, 2004; WU *et al.*, 2010).

A fim de introduzir um fármaco ao hidrogel é necessário que haja equilíbrio entre a hidroflicidade e hidrofobicidade do fármaco e veículo. Esta característica pode ser alterada de acordo com as características de difusão do solvente empregado, o que influencia na difusão do fármaco contido na matriz do gel. Tal equilíbrio pode ser alterado de acordo com o pH, temperatura e força iônica do solvente ou em função da concentração do fármaco (PEPPAS, COLOMBO, 1997). No caso da adição de um fármaco hidrofóbico em um veículo hidrofílico é necessário que o equilíbrio exista para que o fármaco possa ser cedido da matriz.

Na obtenção de hidrogéis para fins biológicos, muitas vezes, são utilizados polímeros sintéticos, devido à reprodutibilidade e controle de suas propriedades químicas. Por exemplo, os polímeros sintéticos podem ser produzidos com massa molar específica e a densidade de ligações cruzadas entre os polímeros pode ser controlada. Estas propriedades determinam a dinâmica da formação do gel, e determinam também suas propriedades mecânicas e de degradação. Exemplos de polímeros sintéticos são: poli-óxido de etileno - PEO, poli-etilenoglicol - PEG, poli-álcool vinílico – PVOH e poliacrilato - Carbopol[®] (PARK, LAKES, 1992).

Em formulações farmacêuticas semissólidas, tais como suspensões, emulsões e géis, o Carbopol[®] (polímero sintético de alto peso molecular do ácido acrílico) tem sido muito utilizado (ISLAM *et al.*, 2004; A-SASUTJARIT, SIRIVAT, VAYUMHASUWAN, 2005; CHOW, CHAN, HENG, 2008). O Carbopol[®] é adicionado às formulações como espessante e agente para conferir viscosidade e modificar características de fluidez, além de conferir propriedades mucoadesivas. Normalmente, o Carbopol[®] é disperso em água, onde absorve até 1000 vezes o seu volume original e o gel é obtido pela neutralização dos grupos carboxílicos (BONACUCINA, MARTELLI, PALMIERI, 2004).

Além dos polímeros sintéticos, vários polissacarídeos são usados na obtenção de hidrogéis, pois possuem vantagens sobre os polímeros sintéticos. Uma vantagem é a facilidade de obtenção, pois são abundantes, prontamente disponíveis e podem ser obtidos a partir de fontes renováveis como algas, plantas e culturas microbianas (NISHINARI, TAKAHASHI, 2003; COVIELLO *et al.*, 2007). Outra vantagem é que tipicamente a viscosidade de uma solução de um polissacarídeo será maior quando comparada àquela de um polímero sintético de igual concentração e igual massa molar (RINAUDO, 2001).

A seleção do polímero apropriado para obtenção de um hidrogel é dirigida por suas propriedades físicas, pela capacidade de carrear fármacos e pela necessidade de compatibilidade biológica para cada aplicação (DRURY, MOONEY, 2003).

Este estudo tem como foco os hidrogéis obtidos por polímeros de fontes naturais, tais como a xantana e galactomanana. Estes polissacarídeos interagem de forma sinérgica em meio aquoso, formando uma estrutura geleificada com aumento significativo da viscosidade, em relação às soluções de cada polissacarídeo isolado. A sinergia se refere ao fato de que a propriedade geleificante macroscópica da

mistura torna-se maior quando os dois polissacarídeos são misturados (MILAS, RINAUDO, 1986; MANNION *et al.*, 1992).

3.2 GALACTOMANANAS

As galactomanana, obtidas a partir de fontes vegetais, apresentam uma estrutura genérica com cadeia principal de unidades D-manopiranosil unidas entre si por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, com substituições de unidades simples D-galactopiranosil ligadas $\alpha(1\rightarrow6)$ (FIGURA 2). Ocorrem como polissacarídeos de reserva de endosperma de sementes, particularmente em espécies das famílias Mimosaceae e Fabaceae (DEA; McKINNON; REES, 1972; DEA; MORRINSON, 1975). Apresentam altos rendimentos, que variam de 15 a 38% da massa seca da semente (ASPINALL, WHYTE, 1964).

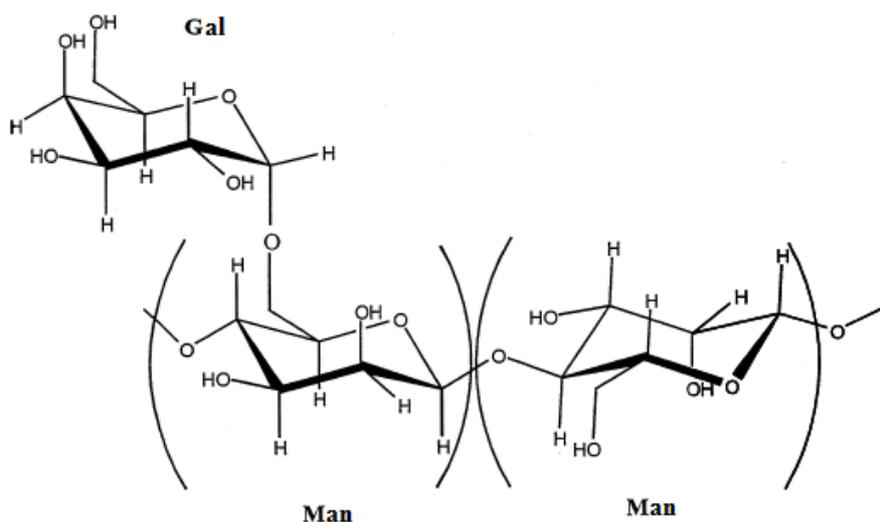


FIGURA 2 - SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE GALACTOMANANA DE ORIGEM VEGETAL

FONTE: GANTER *et al.*, 1995.

NOTA: Man: representação das unidades de manose da cadeia principal em ligação $\beta(1\rightarrow4)$. Gal: representação da substituição por unidade de galactose em $\alpha(1\rightarrow6)$.

Diferenças estruturais entre as galactomananas, como a relação manose:galactose (Man:Gal), por exemplo, afetam suas propriedades funcionais. As galactomananas de diferentes espécies apresentam diferentes relações Man:Gal. Tais variações dependem da fonte biológica, como por exemplo, a goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*) apresenta Man:Gal de 3,5:1 e a bracinga (*Mimosa*

scabrella) apresenta uma relação de 1,1:1 (GANTER *et al.*, 1995; WANG, ELLIS, ROSS-MURPHY, 2000; CHAUBEY, KAPOOR, 2001; FISHER *et al.*, 2001; LUCYSZYN *et al.*, 2006; PICOUT, ROSS-MURPHY, 2007; VIEIRA *et al.*, 2007; BENTO, 2008; SALVALAGGIO, 2010).

As galactomananas mais utilizadas comercialmente são as obtidas de sementes de alfarroba (*Ceratonia siliqua*) e guar (*Cyamopsis tetragonolobus*). Estas galactomananas apresentam relação Man:Gal de aproximadamente 3,5:1 e 1,5:1, respectivamente, e as cadeias laterais de galactose estão distribuídas de forma randômica. Também são utilizadas comercialmente outras fontes de galactomananas, o fenogrego (*Trigonella foenum-graecum*) e tara (*Caesalpinia spinosa*) (ERNANI, 1994; SITTIKIYOTHIN, TORRES, GONÇALVES, 2005; POLLARD *et al.*, 2007, 2010; KÖK, 2007).

A goma de alfarroba é muito usada na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética como agente espessante, devido a sua capacidade de aumentar a viscosidade em baixas concentrações. No período, entre 2006 e 2011, foram importados 14.000 ton de produtos mucilaginosos de sementes de alfarroba ou de sementes de guar, no valor de US\$ 19.000.000,00. Informações obtidas no sistema de análise das informações de comércio exterior via Internet, denominado AliceWeb.

Devido ao crescente interesse pelas galactomananas, em decorrência da hidrossolubilidade e propriedades espessantes, elas têm sido alvo de pesquisa do grupo de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR que tem investigado as características químicas e físicas de galactomananas de sementes de mais de 30 espécies nativas ao Brasil (REICHER *et al.*, 1992; LUCYSZYN, 1994; PETKOWICZ *et al.*, 1998; SIERAKOWSKI *et al.*, 2000). Entre os polissacarídeos estudados, destaca-se a galactomanana de *Schizolobium parahybae* (guapuruvu), que apresenta relação Man:Gal de 2,5:1 a 3:1 e viscosidade intrínseca $[\eta]_w \sim 670 - 850$ mL/g (GANTER *et al.*, 1995; PETKOWICZ *et al.*, 1998, SALVALAGGIO, 2010).

O *Schizolobium parahybae* (FIGURA 3) é vulgarmente conhecido como guapuruvu, ficheira, faveira ou birosca e pertence à subfamília Caesalpinoideae. É uma árvore de grande porte, atinge até 30 m de altura e caule com mais de 1 m de diâmetro, sendo uma das espécies de crescimento mais rápido na mata Atlântica. Possui caule reto, cilíndrico, de casca lisa e cor cinzenta (RIZZINI, 1987).



FIGURA 3 – ASPECTO GERAL DA ÁRVORE E DAS SEMENTES DE *Schizolobium parahybae*

FONTE: www.arvores.brasil.nom.br/florin/guapuruvu.htm. Acessado em 13/06/2011

As galactomananas, quando combinadas com outros polissacarídeos, tais como xantana, carragenana ou ágar, apresentam a capacidade de formar géis (GOYCOOLEA *et al.*, 1995; COPETTI *et al.*, 1997; PAI, SRINIVASARAO, KHAN, 2002; SANDOLO *et al.*, 2007).

3.3 XANTANA

A estrutura primária da xantana, originária da bactéria *Xanthomonas campestris*, está demonstrada na FIGURA 4. Consiste de uma cadeia celulósica principal de unidades D-glucopiranosil unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ e substituída em O-3, a cada unidade alternada de glucose, por um cadeia lateral composta de um trissacarídeo. Este trissacarídeo é formado por ácido glucurônico entre duas unidades D-manopiranosil. A unidade de manose terminal pode ser substituída em O-4 e O-6 por um grupo piruvato. Um grupo O-acetil está frequentemente presente em O-6 da unidade de manose interna (STANKOWSKI, MUELLER, ZELLER, 1993).

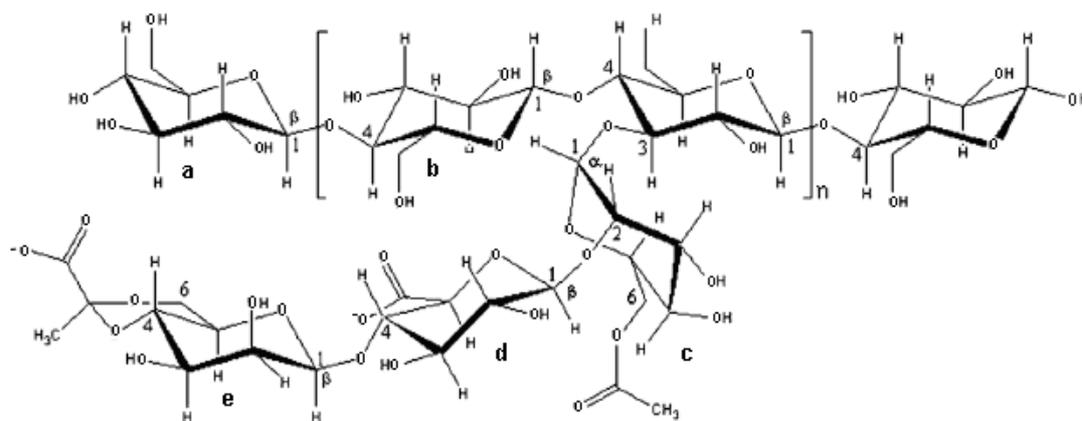


FIGURA 4 – ESTRUTURA GENÉRICA DA XANTANA

Unidades de: glucose não-substituída (a), glucose substituída (b), manose interna com substituinte acetato (c), ácido glucurônico (d) e manose externa com substituição por grupo piruvato (e).

FONTES: SECOUARD, GRISEL, MALHIAC, 2007.

Entre as gomas obtidas por fermentação microbiana, a xantana ocupa um espaço marcante tanto nos mercados farmacêutico e alimentício, assim como nas indústrias petrolífera e têxtil. Isto se deve a suas propriedades reológicas que são: alto grau de pseudoplasticidade, mesmo em baixas concentrações; alta viscosidade; estabilidade em soluções alcalinas e ácidas; resistência à degradação em altas temperaturas; e compatibilidade com muitos sais. É utilizado como espessante e estabilizante (MILLANE, WANG, 1990).

Devido à presença de grupos ionizáveis (o ácido glucurônico, o acetato e o piruvato) a xantana apresenta-se como um polieletrólito. Por causa desta característica, apresenta um microsistema iônico que favorece a estabilização, formando uma rede homogênea.

A goma xantana, em solução aquosa, apresenta uma temperatura de transição conformacional (*melting point temperature*, T_m) em aproximadamente 50°C. Acima desta temperatura, as cadeias laterais dobram-se e associam-se à cadeia principal, por meio de ligações não-covalentes, numa estrutura desordenada. Em temperaturas abaixo de 50°C, as cadeias laterais projetam-se para fora da cadeia principal e a molécula adota uma estrutura helicoidal. Esta transição depende da força iônica da solução, o conteúdo de acetal pirúvico (SMITH *et al.*, 1981), da natureza do eletrólito (MORRIS *et al.*, 1977; PARADOSSI, BRANT, 1982; BRESOLIN *et al.*, 1998) e do pH (MILAS; RINAUDO, 1986). Em água, sem adição

de sais, a xantana apresenta conformação desordenada independente da temperatura (BRESOLIN *et al.*, 1998).

A molécula de xantana, na conformação ordenada, tem comprimento hidrodinâmico que varia entre 600 e 2000 nm (ROSS-MURPHY, MORRIS, MORRIS, 1983) e um raio hidrodinâmico em torno de 2 nm (STOKKE, ELSGAETER, SMIDSROD, 1987). O comprimento de persistência (L_p) da molécula da xantana varia em torno de 70 nm a 130 nm. Estas variações nos valores de L_p acontecem de acordo com a fonte da xantana e a temperatura da solução usada na determinação (SATO, NORISUYE, FUJITA, 1984; TINLAND, MAZET, RINAUDO, 1988; RODD, DUNSTAN, BOGER, 2000).

Soluções de xantana possuem um comportamento Newtoniano em taxas de cisalhamento muito baixas e muito altas, e comportamento tixotrópico nas faixas intermediárias de cisalhamento (MILAS, RINAUDO, TINLAND, 1985).

3.4 HIDROGEL BINÁRIO XANTANA:GALACTOMANANA

A interação sinérgica da xantana com outros polissacarídeos tem despertado interesse de muitos pesquisadores (BRESOLIN *et al.*, 1997; 1999; GOYCOOLEA, MILAS, RINAUDO, 2001; SECOUARD, GRISEL, MALHIAC, 2007; KOBORI, MATSUMOTO, SUGIYAMA, 2009; KOOP *et al.*, 2009). A interação com as galactomananas tem sido estudada para obter melhora nas propriedades físico-químicas destes géis, visando o produto final na indústria farmacêutica (LUNDIN, HERMANSSON, 1995; KHOURYIEH *et al.*, 2007; SECOUARD, GRISEL, MALHIAC, 2007; SANDOLO *et al.*, 2010).

A interação sinérgica entre xantana e galactomanana foi apontada pela primeira vez por Rocks (1971). Morris e colaboradores (1980) analisaram o sistema xantana-galactomanana e notaram que havia formação de géis firmes quando formados com galactomanana de alfarroba (Man:Gal - 3,5:1). A interação entre a xantana e a galactomanana de alfarroba foi mais efetiva do que com as galactomananas de tara e de guar (Man:Gal - 3,0:1 e 1,5:1, respectivamente). Segundo estes autores, houve uma diminuição da interação com o aumento do conteúdo de galactose das galactomananas.

Os modelos de interação entre as cadeias da xantana e da galactomanana aceitos atualmente estão demonstrados na FIGURA 5. No primeiro modelo, é

sugerido que a xantana, em conformação ordenada (em hélice), forma uma rede polimérica interagindo com as regiões não-substituídas da cadeia principal de manose da galactomanana (a). O segundo modelo mostra que a cadeia da xantana na conformação desordenada interage com as unidades de manose da galactomanana (b). O terceiro modelo, proposto por Tako (1991), sugere que ligações de hidrogênio, entre as unidades OH-2 da manose da cadeia principal das galactomananas, e o oxigênio do hemiacetal, da manose interna da cadeia lateral da xantana, façam parte do mecanismo de associação. Estas interações específicas também foram apontadas por Cairns, Miles, Morris (1986) e Brownsey e colaboradores (1988) sugerem que estas ligações de hidrogênio são o efeito ‘chave’ da sinergia dos dois polissacarídeos (c).

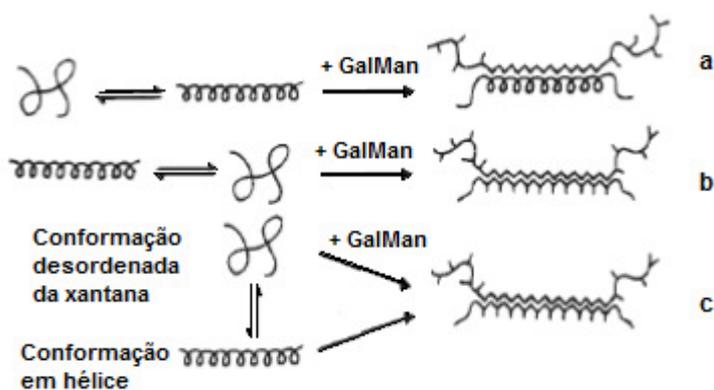


FIGURA 5 – MODELOS DE INTERAÇÃO ENTRE CADEIAS DE XANTANA E GALACTOMANANA

NOTA: GalMan – cadeias de galactomanana. a) modelo de interação com cadeia de xantana em conformação ordenada; b) modelo de interação com cadeia de xantana em conformação desordenada; c) proposta apresentada por Tako (1991).

FONTE: GOYCOOLEA *et al.*, 1995.

Hidrogel de xantana:galactomanana de bracinga (*Mimosa scabrella*) foi investigado, pela primeira vez, pelo grupo de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR, a mistura aquosa xantana:galactomanana 3:1, 2 g/L apresentou um acréscimo de 32% na viscosidade quando comparado ao valor teórico considerando ausência de interação, apesar do elevado conteúdo de galactose da galactomanana. Estes resultados demonstraram que os mecanismos de interação envolvidos são diferentes daqueles descritos por Dea e Morrison (1975), os quais envolvem a ligação de regiões não substituídas da galactomanana com a hélice ordenada da xantana (BRESOLIN *et al.*, 1997).

Morris (1995) analisou géis de xantana e galactomanana em meio salino e em água, sem adição de sais. O gel aquoso apresentou uma sinergia mais forte do que o gel preparado na presença de sais, esta diferença é decorrente do aumento das interações intramoleculares na presença de sais, o que diminui a interação intermolecular. As proteínas associadas à galactomanana de bracinga aumentam a força iônica do sistema, onde a conformação ordenada da xantana é mantida (BRESOLIN *et al.*, 1999).

Koop e colaboradores (2009) avaliaram o gel binário de xantana: galactomanana de bracinga, na concentração polimérica de 12,5 g/L, ao qual foi adicionado 1,2 propanodiol, ácido ascórbico e sais. Este sistema apresentou maior viscoelasticidade após a adição destes componentes, além de manter estabilidade durante os três meses analisados. Os pesquisadores demonstraram potencial como matriz de uso tópico.

3.5 CURCUMINA

A curcumina é um composto polifenólico com alta atividade anti-inflamatória e efeito anti-oxidante (MASUDA *et al.*, 1993). Tem sido usada há quatro milênios por algumas culturas orientais, e, recentemente, vem sendo estudada no combate a vários tipos de câncer, o mal de Parkinson e o de Alzheimer e para retardar o envelhecimento (SANDUR *et al.*, 2007; MAITI *et al.*, 2007; KUNNUMAKKARA, ANAND, AGGARWAL, 2008; MAZZARINO *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2010). Corante rotineiro na indústria alimentícia, ela está presente nos mais diversos produtos, de biscoitos a sorvetes, de sopas a margarinas. Também é a base de condimentos como o *curry*. Na Índia, a propósito, seguindo a dieta típica do país, as pessoas chegam a consumir aproximadamente dois gramas de curcumina por dia. Nos países ocidentais, onde a quantidade nos alimentos é bem menor, a expectativa de que a curcumina possa melhorar a qualidade de vida e prevenir doenças a transformou num suplemento alimentar (FRAIA, 2003).

Este composto fenólico possui baixa massa molecular, e foi caracterizado quimicamente em 1913 como [1,7-bis-(4-hidroxi-3metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] (LAMPE, MILOBEDZKA, 1913). A curcumina é encontrada no pó amarelo-alaranjado extraído da raiz da curcuma ou açafão-da-índia (*Curcuma longa*) (SHARMA, GESCHER, STEWARD, 2005). Extratos da planta possuem três

diferentes curcuminóides, curcumina (CUR) (diferuloilmetano), demetoxicurcumina (DMC) (*p*-hidroxicinamoil, feruloilmetano) e bis-demetoxicurcumina (BDM) (di-*p*-hidroxicinamoilmetano) (FIGURA 6). Amostras comerciais consistem de uma mistura dos três curcuminóides, dos quais a curcumina corresponde a uma faixa de 70 a 78% dos constituintes. Os três curcuminóides possuem atividade biológica (JAYAPRAKASHA, RAO, SAKARIAH, 2002; SUMIYOSHI, KIMURA, 2009; CHENG *et al.*, 2010).

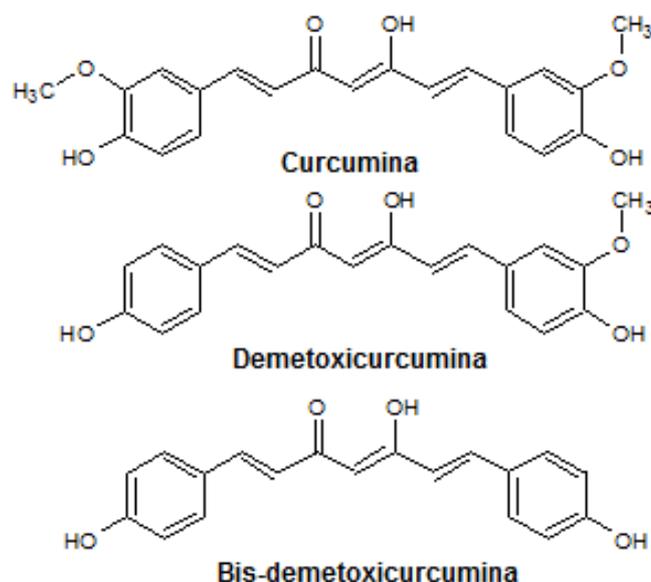


FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS CURCUMINÓIDES

Apesar da atividade biológica, o uso da curcumina em tratamentos pela via oral tem sido limitado, pois a biodisponibilidade é muito baixa (ASAI, MIYAZAWA, 2000; ANAND *et al.*, 2007). Isto se dá, provavelmente, devido a sua lipofilicidade. Ocorre uma limitação na taxa de dissolução no trato gastrointestinal, o que explica sua baixa absorção. Adicionalmente, o metabolismo da curcumina e a eliminação sistêmica da curcumina são rápidos.

Devido à baixa biodisponibilidade oral da curcumina, foi realizado um estudo farmacocinético avaliando os seus efeitos anti-inflamatórios em duas diferentes vias de administração em camundongos: lipossomas intravenosos e pomadas transdérmicas. Observou-se efeito anti-inflamatório nos dois sistemas de liberação de curcumina, nas administrações transdérmica e intravenosa, apesar de ambos levarem a níveis sistêmicos muito baixos (VISWANATH, JITHAN, REDDY, 2009).

Alguns estudos demonstraram que a administração tópica da curcumina exerce efeitos cicatrizantes no tratamento de ferimentos e tumores na pele (HUANG *et al.*, 1997; SANTIBÁÑEZ, QUINTANILLA, MARTINEZ, 2000). Em análises *in vitro* e *in vivo* em ratos foi observada a permeação transdérmica de curcumina (FANG *et al.*, 2003). Para aumentar a sua permeação, várias formas de administração vêm sendo investigadas: lipossomas (CHEN *et al.*, 2009; KUMAR DAS, KASOJU, BORA, 2010), dendrímeros de poli-(amidoamina) (MARKATOU *et al.*, 2007), nanocápsulas lipídicas (SOU *et al.*, 2008; MAZZARINO *et al.*, 2010) e nanopartículas de alginato-quitosana (DAI *et al.*, 2009).

A rota transdérmica pode ser apropriada para administração da curcumina, tanto para efeitos locais quanto em usos terapêuticos sistêmicos.

Um gel de *aloe vera*, acrescido de curcumina, existente no mercado e denominado Psoria Gold[®], possui potente ação antioxidante e foi desenvolvido por Heng (2010). Produz resultados favoráveis no tratamento de psoríase, além de ser efetivo no tratamento de acnes, rosácea e diminuição de rugas.

Pesquisas clínicas patrocinadas pela empresa Procter&Gamble Beauty demonstraram que a curcumina melhora a aparência da pele de mulheres entre 40 a 60 anos. Os cremes hidratantes para a pele com adição do fármaco foram aplicados em dois grupos étnicos distintos (caucasianas e asiáticas) por oito semanas. A curcumina foi modificada quimicamente, de forma que não apresenta a coloração amarela. Fotos tiradas após quatro e oito semanas foram comparadas com fotos do início do tratamento. As alterações nas linhas de expressão, rugas e manchas senis foram avaliadas e a redução de linhas de expressão e rugas foi observada em 15% no grupo teste em relação ao grupo controle ($p < 0,09$) (BRAUSER, 2010).

Outra formulação contendo curcumina incorporada em nanopartículas lipídicas foi estudada a partir da aplicação em meia face de voluntárias entre 30 e 55 anos, por oito semanas. A eficiência dos curcuminóides foi determinada por diversas metodologias e observaram-se resultados de melhora significativa após a terceira semana, na redução de rugas e manchas senis, além de aumentar o grau de hidratação da pele. Não observou-se sinais de irritação em relação à meia face controle (PLIANBANGCHANG, TUNGPRADIT, TIYABOONCHAI, 2007).

A capacidade de curcumina em reduzir manchas e rugas se deve, em grande parte, à atividade antioxidante (PLIANBANGCHANG, TUNGPRADIT, TIYABOONCHAI, 2007). A curcumina foi comparada com o *dl*- α -tocoferol (vitamina

E), quanto à ação antioxidante e atividade sequestrante de radicais livres destes compostos. A curcumina apresentou atividade antioxidante numa concentração de 42,8 µg/mL, sendo este valor próximo à concentração de *dl*- α -tocoferol para a mesma atividade (33,6 µg/mL) (KIM *et al.*, 1997).

A curcumina, solubilizada em etanol, foi adicionada a um hidrogel binário de xantana e galactomanana de alfarroba e a poli L-ácido láctico (PLLA), numa concentração de 0,5 mg/mL. O hidrogel demonstrou alta biocompatibilidade *in vivo*, num modelo de membrana corioalantóica, e eficiência na liberação de curcumina (DA LOZZO *et al.*, 2012).

3.6 MICROEMULSÕES

Carreadores coloidais de fármacos, incluindo as microemulsões e complexos lipídicos, têm atraído um interesse crescente nos últimos 20 anos por permitirem a otimização de liberação e do regime de dosagem das substâncias (VERMA *et al.*, 2003; SHIM *et al.*, 2004; CVEC, 2004). O interesse na aplicação das microemulsões como veículo de preparações farmacêuticas se deve à capacidade desses sistemas de solubilizar substâncias hidrofílicas e lipofílicas ao mesmo tempo e, também, de melhorar a estabilidade dos fármacos. Devido à estabilidade termodinâmica, suportam altas concentrações de fármacos nas fases aquosa e oleosa (TAKEO, 1999; BAROLI *et al.*, 2000).

Microemulsões são sistemas líquidos transparentes, isotrópicos e termodinamicamente estáveis de dois líquidos imiscíveis, estabilizados por um agente tensoativo e, quando necessário, um co-tensoativo (DANIELSSON, LINDMAN, 1981).

Quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato, existe a tendência para um deles tornar-se disperso no outro, na forma de glóbulos finitos, desde que haja alguma força mecânica atuando. A fase dispersa é chamada fase interna e a fase contínua é chamada fase externa. Quando a fase externa é água e a fase interna consiste de líquidos hidrofóbicos, os sistemas são referidos como óleo/água (O/A). O inverso é o sistema água/óleo (A/O). Frequentemente, é usada uma combinação de tensoativos, sendo um aniônico e outro neutro, de maneira que a concentração de tensoativos na interface é elevada e a tensão interfacial pequena. Os tensoativos têm ação emulsificante, são moléculas anfifílicas e promovem a

estabilidade da emulsão ao reduzir a tensão interfacial. O tamanho da gotícula interna varia de acordo com a combinação de tensoativos (LYSSANT, 1974).

Ao misturar o óleo, água e tensoativo (na presença ou ausência de co-tensoativo) a microemulsão é uma das estruturas que podem ser formadas. Também podem ser obtidas emulsões, estruturas em micelas, lamelas, estruturas cúbicas, hexagonais e géis. Esta variedade depende, principalmente, da composição química e concentração de cada componente.

A natureza e a estrutura do tensoativo, do co-tensoativo e do óleo são fatores essenciais que devem ser considerados na formulação de sistemas microemulsionados. Normalmente, os sistemas microemulsionados podem ser diferenciados visualmente dos outros sistemas. Uma vez que as emulsões líquidas e as emulsões géis se apresentam opacas com viscosidade elevada, ou ainda apresentam separação de fases. Já os sistemas microemulsionados são líquidos translúcidos ou opticamente transparentes (FORMARIZ *et al.*, 2004).

Entre as principais propriedades físicas das microemulsões, encontram-se a distribuição de tamanhos e o diâmetro médio das gotículas da fase interna. Microemulsões apresentam, geralmente, uma distribuição unimodal e diâmetro médio entre 100 e 300 nm (HASKELL *et al.*, 1998). A análise das microemulsões tem sido realizada por espectroscopia de correlação de fótons, também denominada de espalhamento de luz dinâmica (CHEN *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2009), e técnicas complementares de microscopia, como transmissão (CHEN *et al.*, 2007), varredura e criofatura (GHOSH, MURTY, 2006).

A escolha dos componentes em microemulsões farmacêuticas visa ao equilíbrio entre compostos capazes de formar microemulsão, que devem ser atóxicos e preencher requisitos de veículo que capacite a absorção dérmica. A interação dos componentes de uma formulação tópica com a pele é um dos fatores mais importantes para efetiva liberação da substância ativa do veículo ao qual está associada. O efeito pode ser aumentado por alterações na formulação, prevendo-se, desta forma, uma provável penetração dos solutos (CROSS *et al.*, 2001).

As emulsões lipídicas estabilizadas com fosfolipídeos têm propriedades adequadas como carreadoras de fármacos. A L- α -lecitina e L- α -fosfotidilcolina de dimiristoíla são fosfolipídeos e aumentam a permeação de vários fármacos (BHATTACHAR *et al.*, 1992; YOKOMIZO, 1996; KIM *et al.*, 1997). Lecitina é atóxica e promove a formação de microemulsão na presença de co-emulsionantes, como

álcoois de cadeia curta. Entre diferentes solventes orgânicos que podem ser usados para a fase oleosa em microemulsões com lecitina, ésteres de ácidos graxos (por exemplo, miristato de isopropila) são de particular interesse em aplicação farmacológica (TROTТА, PATTARINO, IGNONI, 2001; PAOLINO *et al.*, 2002; CHANGEZ *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007).

Além da vantagem de possibilitar a solubilização de fármacos lipofílicos e hidrofílicos, a microemulsão também melhora a permeação do fármaco através da pele (KREILGAARD, 2002). Chen e colaboradores (2007) adicionaram a microemulsão a um hidrogel de polímero polivinílico, o que propiciou o aumento de absorção transdérmica de um fármaco terpenóide (triptolide). A quantidade permeada do fármaco aumentou até 5,8 vezes comparadas ao hidrogel controle, onde o fármaco foi adicionado após solubilização em 1,2-propanediol.

Apesar da elevada superfície de contato da microemulsão sobre a pele, a penetração dos componentes se dá através de interações e ligações com filamentos de queratina, resultando em desorganização dos corneócitos e fluidização e consequente solubilização do estrato córneo (SHOKRI *et al.*, 2001; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004). Quando a microemulsão é adicionada a um gel, que propicia a aplicação sobre a pele, é possível obter uma melhor resposta terapêutica do fármaco aplicado, visto que sua absorção foi facilitada.

3.7 ESTRUTURA DA PELE

A pele é o órgão que reveste o corpo humano, limitando seu contato com o meio externo. Ela desempenha diversas funções vitais, como a prevenção da perda de água e como barreira de proteção frente a agressões químicas e microbiológicas do meio externo, deixando penetrar apenas algumas substâncias e em determinadas condições (HADGRAFT, 2001).

Caracteriza-se como uma membrana heterogênea, sendo que a principal camada que controla a absorção é a camada mais externa, o estrato córneo (EC). Este apresenta uma espessura de 15 a 20 μm e é composto por uma camada de células queratinizadas envoltas por um envelope protéico, que são denominadas de corneócitos. Os corneócitos estão ligados entre si através de desmossomas e limitados por diversos lipídios, tais como: ceramidas, colesterol, ácidos graxos e uma

pequena fração de outros lipídios. Os lipídios formadores do EC provêm dos corpos lamelares, e são secretados pelas células da camada granular da derme, juntamente com enzimas necessárias para provocar a lise dos fosfolipídios e converter glicosilceramidas em ceramidas (HADGRAFT, 2001; MADISON, 2003).

As células do EC são originadas na epiderme viável e sofrem muitas alterações morfológicas antes da descamação. Assim, a epiderme é constituída por várias camadas de células em diferentes níveis de diferenciação. As células da epiderme são originadas na lâmina basal entre a derme e epiderme viável. Nessa camada, há melanócitos, células de Langerhans, células de Merckel, e dois tipos de queratinócitos: aqueles que funcionarão como células-tronco com capacidade de se dividir e produzir novas células, e aqueles que servem de suporte para a epiderme da membrana basal (MORGANTI *et al.*, 2001).

A derme possui 0,1 a 0,5 cm de espessura e é constituída por 70% de fibras colágenas em uma matriz de mucopolissacarídeos, fornecendo um andaime de suporte, amortecimento e elasticidade. As principais células presentes na derme são os fibroblastos, que produzem os componentes do tecido conjuntivo de colágeno, laminina, fibronectina, os mastócitos, que estão envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias e os melanócitos, que estão envolvidos na produção de melanina (MOSEER *et al.*, 2001).

Junto da derme, encontra-se uma extensa rede vascular, que prevê a nutrição da pele e regulação térmica. Os vasos sanguíneos da pele derivam do tecido subcutâneo, com uma rede arterial suprindo os folículos pilosos, o suor e as glândulas apócrinas, a região subcutânea, bem como a própria derme (MOSEER *et al.*, 2001).

A composição e a disposição das células e lipídios no EC criam um caminho tortuoso e fazem dele uma importante barreira que controla a saída de compostos e água do organismo, assim como a entrada de compostos aplicados topicamente na pele. Cinco diferentes rotas podem ser utilizadas para a transposição do EC conforme demonstrado pela FIGURA 7. A rota transcelular (entre os lipídios do EC) e a intercelular (pelos lipídios do EC) acontecem sem a participação de apêndices foliculares ou glandulares, presentes em maior ou menor quantidade, dependendo da região do corpo em estudo,

As rotas transperpendiculares acontecem através dos folículos e das glândulas sebáceas e sudoríparas (FIGURA 7). Estes apêndices da pele representam apenas

0,1% da superfície cutânea, dessa forma, a transposição do EC é essencial para a penetração de compostos na pele (MOSER *et al.*, 2001).

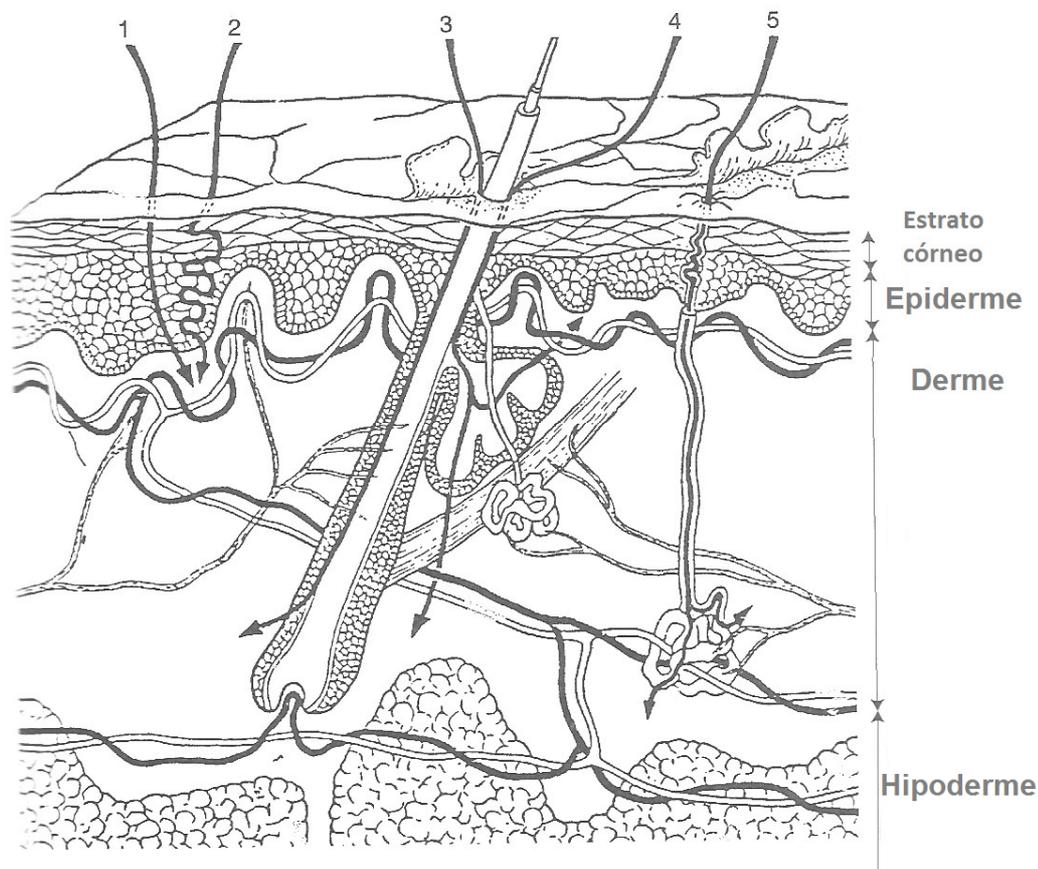


FIGURA 7 – ROTAS PARA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE COMPOSTOS

NOTA: 1- Rota transcelular, 2- Rota intercelular, 3- Rota folicular, 4- Rota sebácea, 5- Rota sudorípara.

FONTE: MARTINI, 2005

O inconveniente das rotas transcelular e intercelular está na alta seletividade em relação às substâncias que conseguem difundir passivamente pelo EC. A efetividade desta função do EC se verifica quando esta camada é retirada através da utilização de uma fita adesiva e percebe-se um forte aumento da permeabilidade de água e componentes hidrofílicos que anteriormente não apresentavam esta facilidade de difusão (ASBIL, MICHNIAK, 2000).

Uma vez que o transporte ocorre por difusão, a atuação do EC como barreira é limitada pelo seu grau de hidratação. Portanto, um aumento no conteúdo hídrico da pele leva a um aumento na permeabilidade de substâncias aplicadas topicamente (MORGANTI *et al.*, 2001; GUTERRES, ALVES, POHLMANN, 2007). O

coeficiente de permeabilidade é influenciado pela hidrofobicidade e tamanho das partículas penetrantes, pela presença ou ausência de cargas elétricas e a outros fatores relacionados às características da área de aplicação. Substâncias polares atravessam preferencialmente dentro do domínio intracelular, enquanto substâncias lipofílicas atravessam o EC principalmente pela rota intercelular (MORGANTI *et al.*, 2001).

3.8 TESTES DE CEDÊNCIA DO FÁRMACO E PERMEAÇÃO TRANSDÉRMICA

A célula de difusão vertical de Franz é um aparato que avalia sistemas de permeação *in vitro*. O método de permeação tem sido empregado no desenvolvimento farmacotécnico, caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade. Essas células podem ser empregadas em sistema estático ou fluxo contínuo e podem ser usadas para avaliar formas farmacêuticas semi-sólidas e adesivos transdérmicos, assim como avaliar a permeação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos (BRONAUGH, STEWART, 1984; SHAH, ELKINS, WILLIAMS, 1998).

Os estudos de permeação normalmente fazem uso de uma membrana entre dois compartimentos, um desses compartimentos contém uma substância em estudo solubilizada no veículo e o outro compartimento contém uma solução receptora cuja concentração inicial da substância é zero (WILLIAMS, BARRY, 1992). O teste *in vitro* de liberação de fármacos é uma ferramenta muito importante na indústria farmacêutica, tanto no desenvolvimento de produtos, quanto no controle de qualidade de rotina. Existem vários métodos *in vitro* que mimetizam o processo de liberação e penetração transdérmicos *in vivo* (AKAZAWA *et al.*, 1989) com e sem membranas (artificiais ou biológicas) e diferentes tipos de células de difusão (AIACHE, 1992).

As membranas utilizadas na célula de difusão vertical de Franz, para investigação da permeação cutânea *in vitro*, podem ser sintéticas ou biológicas. Podem ser usados fragmentos de pele humana, sobras de cirurgias plásticas ou membranas animais. Nenhum modelo animal apresenta valor de absorção idêntico àquele obtido com a pele humana. A pele de animal é, geralmente, mais permeável que a pele humana, mas é usada para estudos preliminares. Os estudos de permeação cutânea *in vitro* podem ser realizados com peles dissecadas de ratos, camundongos, cães sem pêlos, cobras, macacos ou porcos e montadas em células

de difusão (BARRY, 1983). A pele de orelha de porco tem sido recomendada para os estudos de permeação cutânea *in vitro*, pois possui similaridades à pele humana. As características fisiológicas e histológicas (quanto à densidade de folículos pilosos), bem como bioquímicas são próximas nas duas peles (MARTI-MESTRES *et al.*, 2007; SARTORELLI *et al.*, 2000; HAIGH, SMITHEW, 1994).

Vários estudos enfocaram veículos para a aplicação transdérmica de curcumina (FANG *et al.*, 2003; SUWANTONG *et al.*, 2007; PATEL, PATEL, PATEL, 2009). Suwantong e colaboradores (2007) desenvolveram fibras de acetato de celulose ultra-finas contendo 20 mg% de curcumina e avaliaram o seu potencial como veículo de uso tópico, para tanto a permeação transdérmica foi investigada. A cedência da curcumina pelo veículo foi previamente investigada por imersão na solução receptora (tampão acetato contendo 0,5% de polisorbato 80 e 3,0% de metanol). A cedência da curcumina foi satisfatória, porém a permeação transdérmica na pele de orelha de porco foi 1,42% da curcumina contida nas fibras de acetato de celulose, apesar do amplo período avaliado de 48 h a 37°C.

Outro sistema foi desenvolvido para obter filmes contendo 20 mg% de curcumina. O sistema foi obtido pela mistura de hidroxipropilmetilcelulose (hidrofílico) e etilcelulose (lipofílico), a permeação transdérmica deste sistema foi avaliada por células de difusão de Franz, usando pele abdominal de rato, durante 12 h a 37°C. A solução receptora usada foi tampão fosfato com 20% de etanol. Observou-se um mecanismo de difusão da curcumina, seguindo modelo de Higuchi, com 99,8% de permeação a partir do sistema de hidroxipropilmetilcelulose com acréscimo de ácido oléico como acelerador de permeação (PATEL, PATEL, PATEL, 2009). Tanto no estudo com fibras de acetato de celulose, quanto no estudo com a mistura de hidroxipropilmetilcelulose e etilcelulose, a curcumina liberada na solução receptora foi detectada por espectrofotometria (SUWANTONG *et al.*, 2007; PATEL, PATEL, PATEL, 2009).

A duração da análise de permeação deve levar em conta a manutenção da integridade da membrana usada na célula de difusão. Frequentemente, uma membrana biológica exposta a 37°C durante um período maior que 18 h tende a sofrer ruptura da barreira cutânea (SARTORELLI *et al.*, 2000). A escolha da solução receptora deve seguir critérios que permitam a manutenção da condição *sink* do fármaco. Para obter esta condição *in vitro* é necessário o uso de grandes

quantidades de meio, de modo que a concentração de soluto não atinja mais do que 20 a 30% de sua solubilidade (ABDOU, 1995).

3.9 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EMPREGADOS NA QUANTIFICAÇÃO DA CURCUMINA

Nos últimos 14 anos, vários estudos foram realizados no intuito de identificar e quantificar a curcumina por CLAE em amostras de plasma e urina, em estudos de farmacocinética. Os enfoques foram variados e, na maioria dos estudos, as soluções nas quais os curcuminóides foram detectados eram fluidos biológicos. As detecções também variaram quanto aos limites de detecção e quantificação, conforme consta na TABELA 1.

Jadhav, Mahadik e Paradkar (2007) validaram um método de análise quantitativa dos curcuminóides. O estudo foi realizado por CLAE, em extratos turméricos e curcumina comercial, com limite de detecção (LD) de 28, 32 e 22 ng/mL para CUR, DMC e BDM, respectivamente. Os limites de quantificação (LQ) para os três curcuminóides foram 85, 97 e 66 ng/mL, respectivamente. Em outro estudo, foi aplicado um método analítico de CUR em plasma de rato com LQ de 1 ng/mL dentro das especificações de linearidade, exatidão e precisão, porém sem a detecção dos outros curcuminóides (Li *et al*, 2009). Cheng *et al*. (2010) desenvolveram um estudo por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) com LD e LQ dos três curcuminóides, CUR, DMC e BDM na faixa de pg e com precisão dentro das especificações do método, porém não foi realizada a etapa de especificidade para validação analítica. Portanto, permanecem lacunas na escolha de um método validado de quantificação analítica de curcumina.

Price e Buescher (1997) analisaram a degradação alcalina da CUR, DMC e BDM e observaram uma cinética de pseudo-1ª ordem. A velocidade de degradação aumenta rapidamente de pH 7,45 para um máximo em torno de pH 10,2. Os tempos de meia-vida de CUR, DMC e BDM em um pH de 10,2 foram de 0,4, 1 e 5 h, respectivamente. As análises foram realizadas por CLAE em modo isocrático, fase móvel tetrahidrofurano:água (40:60), fluxo de 1,5 mL/min, obtendo tempos de retenção de 15, 18 e 21 min para CUR, DMC e BDM, respectivamente.

TABELA 1 – ESTUDOS REALIZADOS COM DETECÇÃO DA CURCUMINA OU CURCUMINÓIDES

Analito detectado	Tempo de retenção (min)	Método	Condições de análise	Limite de Detecção, Limite de Quantificação Condições analisadas Faixa de linearidade	Referência
BDM, DMC, CUR	15, 18 e 21	CLAE	Coluna C ₁₈ , fluxo de 1,5 mL/min, loop = 10 µL, 22°C, FM = Tetrahidrofurano:água (40:60), λ = 420 nm	Degradação alcalina	PRICE, BUESCHER, 1997
BDM, DMC, CUR	12, 14 e 16	CLAE	Coluna C ₁₈ , fluxo de 1 mL/min, 40°C, λ = 425 nm FM = ácido fosfórico 50 mM:acetonitrila (48:52)	Análise de conjugados e metabólitos de CUR	ASAI, MIYAZAWA, 2000
BDM, DMC, CUR	6,1; 6,5 e 6,9	CLAE	Coluna C ₁₈ , fluxo 1 mL/min, loop = 20 µL, 20°C, λ = 425 nm FM = metanol:ácido acético 2%:acetonitrila	0,0625 – 2,0 µg/mL LQ = 0.05µg	JAYAPRAKASHA, RAO, SAKARIAH, 2002
CUR	5	CLAE	Coluna C ₁₈ , fluxo de 1 mL/min, λ = 430 nm, loop = 50 µL, 25°C FM = ácido cítrico 1%:tetrahidrofurano (50:50)	LQ = 2,5 ng/mL a partir de amostras de plasma	PAK, PATEK, MAYERSOHN, 2003
CUR	6,5	CLAE	Coluna C ₁₈ , fluxo 1 mL/min, loop = 20 µL, λ = 262 nm, FM = acetonitrila:metanol:água:ácido acético (41:23:36:1)	0,2 – 7,0 µg/mL LD(plasma) = 0,063 µg/mL, LD(urina) = 0,091 µg/mL	HEATH et al., 2003
CUR	-	HPTLC	FM = clorofórmio:metanol (9,25:0,75), taxa de aplicação 150 nL/s, comprimento de corrida = 65 mm		ANSARI et al., 2005
BDM, DMC,CUR	7,2; 8,1 e 9,0	CLAE	Coluna C ₁₈ , fluxo 1,5 mL/min, loop = 20 µL, acetonitrila:ácido trifluoracético pH 3 (50:50), λ = 420 nm	100 – 600 ng/mL LQ < 97 ng/mL LD < 32 ng/mL	JADHAV, MAHADIK, PARADKAR, 2007
BDM, DMC e CUR	11, 12 e 13,5	CLAE	Coluna C ₁₈ , λ = 410 nm, fluxo 1 mL/min FM = ácido acético 0,25%:acetonitrila	Não especifica	HOU et al., 2008
CUR	5,5 a 6,5	CLAE	Coluna C ₁₈ , fluxo 1 mL/min, loop = 1 µL, 30°C FM = Tetrahidrofurano:ácido cítrico 1% (40:60), λ = 420 nm e detector fluorimétrico λ = 512 nm (emissão)	Curcumina em lipossomas – aplicação em sangue, plasma e cel.	CHEN et al., 2009
CUR	1,9	CLAE	Coluna C ₁₈ , fluxo 1 mL/min, loop = 50 µL, acetonitrila:ácido acético 5% (75:25), λ = 420 nm	1 – 500 ng/mL LQ = 1 ng/mL (plasma)	LI et al., 2009
CUR, DMC, BDM	1,3; 1,4; 1,6	UPLC	Coluna C ₁₈ , fluxo 0,4 mL/min, loop = 1 µL, 30°C, λ = 420 nm FM = ácido fosfórico 0,05%:acetonitrila (34:66)	3,28 – 46,08 µg/mL LD < 49 pg, LQ < 164 pg	CHENG et al., 2010

NOTA: FM – fase móvel, λ - comprimento de onda de detecção pelo detector de UV, BDM – bis-demetoxicurcumina, DMC - demetoxicurcumina, CUR – curcumina.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS, REAGENTES E SOLVENTES

As matérias-primas, reagentes e solventes foram utilizados com padrão Sigma e quando se fez necessário com grau CLAE.

4.2 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GALACTOMANANAS A PARTIR DE SEMENTES DE GUAPURUVU

As sementes de guapuruvu (*Shizolobium parahybae*) foram obtidas pelo Viveiro Mata Atlântica (São Paulo, Brasil). Inicialmente, estas sementes foram submetidas à fervura em água por aproximadamente 30 min, para inativação das enzimas endógenas. As sementes permaneceram imersas em água por 24 h e, após esse período, o endosperma foi separado do tegumento e do embrião e seco em estufa a vácuo. Para obtenção das galactomananas, os endospermas isolados, secos e moídos (Moinho tipo Willye TE-650 - TECNAL) foram submetidos à extração aquosa durante 1 h, a 25 °C. O extrato originado foi centrifugado a 10000 rpm por 30 min (Centrífuga HITACHI HIMAC CR 21E) e o sobrenadante precipitado com a adição de dois volumes de etanol absoluto (BRESOLIN et al., 1999; SALVALAGGIO, 2010).

O precipitado foi lavado três vezes com solução etanólica crescente de 70 a 99 % e seco em estufa a vácuo (EDGCON 5P).

4.2.1 Determinação de açúcar total

O conteúdo de carboidratos totais da amostra de galactomanana de guapuruvu (G) foi determinado pelo método de Dubois e colaboradores (1956), utilizando-se uma mistura de padrões de D-manose e D-galactose (Sigma) na mesma proporção da relação Man:Gal da galactomanana em estudo. A curva-padrão foi construída com cinco concentrações (20-100 µg/mL) e os valores de absorbância foram lidos em espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys, no comprimento de onda de 490 nm.

4.2.2 Determinação de proteínas

A quantidade de proteínas presentes na amostra de galactomanana G foi determinada através do método de Bradford modificado (KRESZE, 1983), usando soro albumina bovina (Sigma) como padrão de referência. A sensibilidade do método foi na faixa de 10-100 µg/mL. A leitura foi realizada a 650 nm em espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys. As amostras e a curva-padrão foram medidas em triplicata.

4.2.3 Determinação da composição monossacarídica

A galactomanana G foi hidrolisada com ácido trifluoracético 1 M por 4 h, em estufa, em tubos hermeticamente fechados (ADAMS, 1965; BIERMAN, 1989). O hidrolisado foi evaporado em vidro de relógio, na capela. Os produtos da hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH₄), em meio aquoso, a 25°C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Em seguida, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica Lewatit S-100 para remoção do sódio (Na⁺) e para decompor o excesso de agente redutor. A seguir, o material foi filtrado, evaporado até securo e lavado sucessivamente com metanol para a remoção do ácido bórico remanescente, na forma de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v) durante 16 h à temperatura ambiente (WOLFROM, THOMPSON, 1963b). O processo foi interrompido com adição de gelo moído e o material acetilado foi extraído com clorofórmio. A piridina residual, presente na fração clorofórmica, foi removida por

sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% (m/v) e água de forma intercalada. A fase clorofórmica foi transferida a um tubo de hemólise, evaporada a temperatura ambiente e analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC). Usou-se cromatógrafo Hewlett Packard 5890 A II, equipado com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2,0 mL/min, coluna capilar (0,25 mm x 30 m) DB-225, com espessura de filme de 0,25 µm, sendo a temperatura do detector 300 °C e do injetor 250 °C (SLONEKER, 1972).

4.2.4 Análises cromatográficas de exclusão estérica de alta pressão acoplada a detecção por espalhamento de luz laser com multiângulos e índice de refração

As análises cromatográficas de exclusão estérica de alta pressão acoplada a detecção por espalhamento de luz laser com multiângulos e índice de refração (HPSEC-MALLS/RI) foram realizadas com as amostras de galactomananas de guapuruvu (G) e alfarroba (L) (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, ALE) e com a amostra de xantana (X) (Merck, Darmstadt, ALE). Essas amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol/L contendo azida de sódio (NaN_3) 0,2 g/L para uma concentração final de 1 mg/mL, sendo filtradas através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22 µm. Em seguida, foram injetadas no cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), cuja fase móvel foi uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 0,2 g/L, com fluxo de 0,6 mL/min, controlado através de bomba peristáltica WATERS 515.

O cromatógrafo foi equipado com detector de índice de refração diferencial (RI), modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz laser com multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação ultrahidrogel WATERS em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 g/mol.

Análises de homogeneidade foram realizadas e obtiveram-se a determinação de massa molar média (M_w), a distribuição das massas e a determinação do incremento de índice de refração específico (dn/dc) (AKCELRUD, 2007).

Foi utilizado o software ASTRA versão 450 para a obtenção e interpretação dos resultados.

4.3 INCORPORAÇÃO DA CURCUMINA NOS SISTEMAS

Neste trabalho, foram obtidos dois sistemas distintos para a incorporação da curcumina, além da simples solubilização em etanol.

4.3.1 Sistema micelar

Este sistema foi obtido de acordo com o método de Saint Ruth e colaboradores (1995), no qual a lecitina de ovo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (7,5 g) foi dissolvida por agitação magnética (~400 rpm) por 14 h na solução etanólica 80% (Etanol, Merck, Darmstadt, ALE) (40 mL). Após a dissolução, o miristato de isopropila (pureza de 90%, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (2,5 g) foi adicionado lentamente à mistura em agitação à temperatura ambiente.

Foram obtidos SMC (sistema micelar com 5 mg/mL de curcumina) e SMb (sistema micelar sem curcumina). Em SMC a curcumina (0,25 g) foi adicionada após prévia solubilização em etanol no início do processo.

4.3.2 Microemulsão

A microemulsão foi obtida de acordo com Lin e colaboradores (2009), usando água milliQ (15 g), L- α -fosfatidilcolina de ovo (tipo X-E, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,765 g) e polisorbato 80 (Synth, São Paulo, Brasil) (1,785 g) como tensoativos e miristato de isopropila na fase oleosa (pureza de 90%, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (0,6 g).

As fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente a 80-90 °C, em seguida, sob agitação magnética constante (~400 rpm), a fase aquosa foi adicionada gota a gota à fase oleosa. Após resfriamento da mistura, foi efetuada sonicação (Sonicator Ultrasonic Processor XL – Heat Systems Inc), onde a emulsão turva tornou-se translúcida após inversão para sistema microemulsionado O/A isotrópico. A curcumina foi adicionada numa concentração de 0,49 g%, por solubilização na fase oleosa no início do processo.

Foram obtidos MC - microemulsão com 5 mg/mL de curcumina e Mb – microemulsão sem curcumina.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO SISTEMA MICELAR, DA MICROEMULSÃO E SOLUÇÃO ETANÓLICA

	Sistema micelar (SMC)	Microemulsão (MC)	Etanol (EC)
Água milliQ (mL)	4,0	20,555	-
Etanol (mL)	16,0	-	24,875
Lecitina de ovo (g)	3,75	-	-
L- α -fosfatidilcolina de ovo (g)	-	1,05	-
Polisorbato 80 (g)	-	2,45	-
Miristato de isopropila (g)	1,125	0,83	-
Curcumina (g)	0,125	0,125	0,125

4.3.3 Determinação do raio hidrodinâmico das gotículas da microemulsão e do sistema micelar por espalhamento de luz

A caracterização das gotículas do sistema micelar com (SMC) e sem curcuminóides (SMb) e das microemulsões com (MC) e sem curcuminóides (Mb) foi realizada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) também denominada espectroscopia de fotocorrelação (PCS) ou espalhamento de luz quase elástico (CHU, 1991).

As amostras foram submetidas ao analisador de partículas BROOKHAVEN, após filtração em membranas com poros com diâmetro de 0,45 μm . O frasco receptor da amostra foi colocado na câmara de análise, a 24 °C, de modo que o feixe de laser pudesse atravessar a dispersão em toda a sua extensão. A luz espalhada de 632,8 nm, obtida por laser de He-Ne de 15 mW, foi captada por um fotomultiplicador posicionado a 90° do feixe de laser que enviou o sinal para um sistema correlador, onde os dados foram processados e enviados ao computador. O modelo matemático de Non-Negative Least Squares (NNLS) foi aplicado para caracterizar a distribuição das partículas.

A medida da intensidade da função de autocorrelação com o tempo da intensidade da luz espalhada foi dada por:

$$g^{(2)}(t) = 1 + \varphi |g^{(1)}(t)|^2 \quad (1)$$

onde φ é fator de coerência espacial, que está relacionado à razão entre a intensidade espalhada pelo polímero e a espalhada pelo solvente. $g^{(1)}$ pode ser expresso pela distribuição de decaimentos:

$$g^{(1)}(t) = \int A(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma \quad (2)$$

onde $g^{(1)}(t)$ é a transformada de Laplace da função de distribuição da taxa de decaimento $A(\Gamma)$. $A(\Gamma)$ fornece a intensidade relativa de luz espalhada, com decaimento constante Γ e é função do número e tamanho das partículas espalhantes (PROVENCHER, 1979; PROVENCHER, 1982). Dessa forma, o coeficiente de difusão aparente D pode ser calculado por:

$$\Gamma = Dq^2 \quad (3)$$

onde q é o vetor de onda calculado por $q = 4\pi n_R \sin(\theta/2)/\lambda_0$, sendo n_R o índice de refração do meio, θ o ângulo de espalhamento e λ_0 o comprimento de onda da radiação. Para partículas esféricas em dispersões diluídas (microemulsão), a relação de Stokes-Einstein relaciona o coeficiente de difusão D com o raio da partícula e a partir do coeficiente de difusão é possível obter o raio hidrodinâmico R_h equivalente pela equação de Stokes-Einstein:

$$R_h = k_B T / 6\pi\eta D \quad (4)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta e η a viscosidade do solvente.

Foram realizadas três determinações do diâmetro das gotículas com duração de cinco minutos, período de medida da intensidade da função de autocorrelação em relação à intensidade da luz espalhada.

Também foi realizado um teste de estabilidade dos sistemas em função da temperatura. O sistema micelar foi analisado numa diluição de 1:50 em etanol e a microemulsão diluído (1:50) em água purificada (sistema milliQ[®]). As amostras foram aquecidas e esfriadas numa faixa de temperatura de 25 a 60 °C e analisadas através do equipamento Nano DLS – Dynamic Light Scattering (Brookhaven, Holtsville, USA).

4.4 OBTENÇÃO DOS HIDROGÉIS

Foram preparados dispersões de goma xantana (X) e galactomananas de alfarroba (L) ou de guapuruvu (G), sob agitação magnética (300 rpm) por 16 h, em água destilada e na concentração de 12,5 g/L. Após este período, foi acrescentado 0,05% (m/m) de álcool benzílico (Merck, Darmstadt, ALE) e 0,06% (p/p) de etilhexil-glicerina (Merck, Darmstadt, ALE) à xantana, também foram acrescentadas a microemulsão ou sistema micelar com curcumina ou a curcumina solubilizada em etanol, de acordo com as proporções descritas nas TABELAS 2 e 3. Em seguida, a galactomanana foi adicionada à mistura. As dispersões foram misturadas à temperatura ambiente, de forma que a dispersão resultante permaneceu com 12,5 g/L de polissacarídeo, sendo 6,25 g/L de xantana e 6,25 g/L de galactomanana. Os hidrogéis XL e XG foram obtidos pela mistura de dispersão de X adicionado dos conservantes e a dispersão de L ou G, originando XL e XG.

TABELA 3 – IDENTIFICAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE ACORDO COM SUA COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINA

	xantana + alfarroba	concentração curcumina*	xantana + guapuruvu	concentração curcumina ^a
-	XL ^b	-	XG ^c	-
Sistema micelar com curcumina*	XLSC ^d	30 mg%	-	30 mg%
Microemulsão com curcumina*	XLMC ^e	60 mg%	XGMC ^f	60 mg%
Etanol com curcumina*	XLEC ^g	30 mg%	XGEC ^h	30 mg%

^a concentração de curcuminóides total

^b XL – hidrogel xantana e alfarroba; ^c XG - hidrogel xantana e guapuruvu; ^d XLSC – hidrogel xantana e alfarroba com sistema micelar + curcumina; ^e XLMC - hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcumina; ^f XGMC - hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcumina; ^g XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcumina solubilizada em etanol; ^h XGEC - hidrogel xantana e guapuruvu com curcumina solubilizada em etanol.

A microemulsão adicionada aos hidrogéis XLMC e XGMC não possui etanol na sua formulação. O etanol é um agente que pode causar sensibilização tópica ou, nos casos de peles que apresentam eczemas, o efeito irritante do etanol sobre a pele é evidenciado, mesmo quando presente em pequenas quantidades (LACHENMEIER, 2008). Estes hidrogéis foram obtidos e analisados quanto à sua estabilidade, cedência e permeação dos curcuminóides *in vitro*, citotoxicidade *in vitro* e a atividade anti-inflamatória *in vivo*. Para comparação dos resultados os hidrogéis XLEC, XGEC, XL e XG também foram avaliados.

A concentração de curcuminóides totais foi maior nos hidrogéis XLMC e XGMC por estes sistemas permitirem uma adição maior de microemulsão. Isto não foi possível em XLEC e XGEC devido ao fato de que o etanol precipita os polissacarídeos, sendo adicionada a quantidade máxima possível. Este limite foi determinado experimentalmente, por observação visual da precipitação dos polissacarídeos após adição de quantidades crescentes de etanol ao sistema. A adição de uma concentração maior de curcuminóides nos hidrogéis foi considerada vantajosa para os estudos de liberação *in vitro*.

4.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DOS CURCUMINÓIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para quantificação do teor dos curcuminóides nos hidrogéis foi usado o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu®, equipado com detector tipo arranjo de diodos (PDA-*Photo Diode Array*) (Shimadzu®, SPD-M10A), forno (Shimadzu®, CTO-10AS), sistema de bomba (Shimadzu®, LC-10AD), software (Shimadzu® LC Solution, versão 2.1) e sistema de injeção manual (SIL-20AC) (loop de 200 µL). A coluna usada foi tipo Symmetry® C₁₈ 5 µm (250 X 4,6 mm) (Waters, MA, USA) e a pré-coluna usada foi Waters Sentry™, 4.0 × 3.0 mm (Waters, MA, USA). O tempo de corrida foi de 26 min, a 25°C, com fluxo de 1 mL/min, usando método isocrático e em fase reversa. A fase móvel usada foi acetonitrila (ACN) e ácido fosfórico 5 mM, na proporção 45:55 (v/v). A fase móvel foi filtrada por membranas Vertipure™ de acetato de celulose (Bangkok, Tailândia), porosidade de 0,22 µm. A análise foi monitorada por detector tipo PDA, sendo que o máximo de absorção dos curcuminóides foi no comprimento de onda de 425 nm.

A solução padrão de curcumina (pureza de 70%, Sigma-Aldrich Co., Steinheim (ALE), usada neste estudo, contém a mistura dos três curcuminóides, curcumina (CUR), demetoxicurcumina (DMC) e bis-demetoxicurcumina (BDM), com 70 a 80% de CUR.

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente, é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (no caso o nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado – categoria II). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicado às amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003).

4.5.1 Robustez

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se avaliar a robustez, constatando-se a suscetibilidade do método às variações dos parâmetros analíticos que podem ocorrer sem o controle do operador nas condições analíticas (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, bem como o tempo de extração e agitação (RIBANI *et al.*, 2004).

Foi preparada uma solução de curcuminóides com concentração final de 100 ng/mL. A robustez do método foi avaliada variando-se a composição da fase móvel e o fluxo da fase móvel. Também foi avaliada por meio do estudo da estabilidade das soluções analíticas em função do tempo.

Para avaliar a robustez do método a variações na concentração da fase móvel, foram preparadas três diferentes concentrações de fase móvel ACN:ácido fosfórico 5 mM, nas proporções 45:55, 41:59 e 49:51, sendo a primeira a condição normal de trabalho. Nestas três condições, foi realizada a análise da solução padrão, injetada três vezes, em um fluxo de 1,0 mL/min a 25 °C.

Para avaliação da resistência do método a variações no fluxo, foi analisada a solução, injetada três vezes, a 25 °C, usando ACN:ácido fosfórico 5 mM, na

proporção 45:55 como fase móvel, em três diferentes fluxos, de 0,8, 1,0 e 1,2 mL/min.

Para avaliar a estabilidade da solução analítica, preparou-se triplicata de uma solução amostra de curcuminóides na concentração de 100 ng/mL, a qual foi injetada no cromatógrafo, nas condições normais de análise, logo após o preparo (tempo zero), após 3 h e após 6 h, calculando-se o teor em cada análise.

Os resultados do tempo de retenção, a variação da área e assimetria do pico do analito foram comparados nas diferentes situações, realizando-se análise do desvio padrão.

4.5.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para a avaliação da linearidade, recomenda-se a análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos de 80% a 120% da concentração teórica do teste (BRASIL, 2003).

Se houver relação linear aparente, após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma mínima dos quadrados dos resíduos da regressão linear e desvio padrão relativo. Para ser aceitável, o coeficiente de correlação (R) deve ser igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

A linearidade foi determinada através da construção da curva analítica. Foi preparada uma solução metanólica estoque de curcuminóides, pesando-se exatamente 10 mg de curcuminóides em um balão volumétrico de 200 mL contendo metanol. Obteve-se uma solução padrão com concentração final de 50 µg/mL, onde CUR, DMC e BDM correspondem a 78,2; 18,3 e 3,5 % do total de curcuminóides. A partir desta solução, foram feitas diluições usando a fase móvel (ACN:Ácido fosfórico 5 mM, 45:55 (v/v)), para obter soluções com diferentes concentrações totais: 1; 2,5; 5; 10; 40; 60; 80 e 100 ng/mL. As diluições foram feitas em triplicata em balões volumétricos. Cada solução, previamente filtrada com filtro de 0,22 µm, foi injetada (200 µL) em triplicata no sistema CLAE. Os valores de área obtidos das respectivas

concentrações foram inseridos em gráficos e foi calculada a equação da reta através de regressão linear.

4.5.3 Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) foram calculados a partir do desvio padrão do coeficiente linear, da equação obtida das respostas das soluções de 1 a 100 ng/mL (σ) e a média do coeficiente angular, desta mesma equação (s), através das equações 5 e 6, para cada curcuminóide:

$$LQ = 10 \sigma / s \quad (5)$$

$$LD = 3,3 \sigma / s \quad (6)$$

4.5.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea. Esta é considerada em três níveis. Um dos níveis avaliados é o da repetibilidade, que é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método pode ser verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão do presente método foi avaliada em dois níveis, a repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dia). O desvio padrão relativo (DPR) das determinações foi avaliado em três diferentes concentrações de curcuminóides (10, 60 e 80 ng/mL), em triplicatas no mesmo dia, e em três dias diferentes, também em triplicatas. Verificou-se se os resultados se encontram dentro da diferença máxima aceitável. Foram calculados o desvio padrão relativo (DPR) e o coeficiente de variação (CV%) de acordo com as seguintes equações:

$$DPR = s/M \quad (7)$$

$$CV\% = s/M \times 100 \quad (8)$$

onde s é o desvio padrão das recuperações (média das recuperações/ $n-1$) e M é a média das recuperações.

4.5.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico indica a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. As metodologias para a determinação da exatidão disponíveis são: i) comparar os resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida (padrão de referência); ii) analisar uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado). Se as amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, é aceitável a análise pelo método de adição de padrão. Neste método, quantidades conhecidas do analito são adicionadas (padrão de referência) ao medicamento (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão do método foi determinada através do ensaio de adição de padrão, onde uma concentração conhecida de solução estoque de curcuminóides foi adicionada em soluções amostra da microemulsão de acordo com a TABELA 4.

A extração dos curcuminóides, a partir da microemulsão, foi de acordo com o seguinte protocolo: foi pesado 0,02 g de MC em balão volumétrico de 100 mL, sobre a amostra foi adicionado 10 mL tetrahidrofurano e agitado vigorosamente por 5 min, em vórtex. Em seguida o volume do balão volumétrico foi completado com metanol. 1 mL desta solução foi diluído na fase móvel (ACN:ácido fosfórico 5mM), num balão de 25 mL.

A extração dos curcuminóides, a partir dos hidrogéis XGEC, XGMC, XLEC e XLMC, seguiu o mesmo protocolo de MC, porém a tomada de amostra foi de 0,13 g.

TABELA 4 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ENSAIO DE EXATIDÃO

Balão (25 mL)	Volume da amostra (mL)	Volume do padrão (mL) 1 µg/mL	Conc. Teórica (ng/mL)	Conc. Total (ng/mL)
1	1	0,3	12	42
2	1	0,6	24	54
3	1	1,2	48	78
4	1	-	-	30
5	-	0,6	24	24

O cálculo da % de recuperação nos balões 1, 2 e 3 foi realizado pela % de recuperação (%Rec):

$$\%Rec = (\text{Conc. prática adicionada} / \text{Conc. teórica adicionada}) \times 100 \quad (9)$$

onde a conc. prática adicionada = conc. total – conc. prática do balão 4

4.5.6 Especificidade

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes com resultados obtidos de amostras não contaminadas. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiver disponível, comparam-se os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação. Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por exemplo: luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica ou oxidação) (BRASIL, 2003). O resultado do cálculo da resolução do pico do analito, em relação aos picos adjacentes do cromatograma, indica a especificidade do método. A comparação da análise de amostras, com análise de placebos, complementa avaliação do método, a fim de verificar a coincidência no tempo de retenção de algum contaminante, com o tempo de retenção do analito (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997).

A fim de verificar se o método de obtenção da solução padrão de curcuminóides não apresenta interferência dos produtos de degradação do fármaco, o método foi submetido a diferentes situações de estresse para comprovar que o método é indicativo de estabilidade e específico para o analito em questão, mesmo na presença de substâncias relacionadas. Todas as amostras submetidas às condições de estresse foram comparadas com uma solução padrão, preparada no dia da análise.

4.5.6.1 Hidrólise ácida

Foram pesados 5 mg de curcuminóides, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e solubilizados em 20 mL de metanol. À solução foram acrescentados

80 mL de solução HCl 4 M e a mistura foi mantida por 24 h a 37°C no escuro. Uma alíquota de 0,1 mL da solução resultante foi diluída em balão de 50 mL com a fase móvel (ACN:ácido fosfórico 5 mM - 45:55) nos tempos 0 e 24 h.

4.5.6.2 Hidrólise alcalina

Foram pesados 5 mg de curcuminóides, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e solubilizados em 20 mL de metanol. À solução foram acrescentados 80 mL solução NaOH 1 M e a mistura foi mantida por 24 h a 37°C no escuro. Uma alíquota de 0,1 mL da solução resultante foi diluída em balão de 50 mL com a fase móvel (ACN:ácido fosfórico 5 mM - 45:55) no tempo 0 e 0,3 mL no tempo 24 h.

4.5.6.3 Fotodegradação

A solução metanólica de curcuminóides a 100 ng/mL foi vertida numa placa de Petri que foi acondicionada sob uma luz ultra violeta (UV) de 30 W /G30T8, a uma distância de 50 cm. Alíquotas desta solução foram analisadas nos tempos 0, 1 e 2 h.

4.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-MS)

A solução de extrato de curcuminóides foi submetida à eluição em CLAE-PDA Shimadzu Prominence, sendo que as condições de análise cromatográfica são as mesmas já descritas no item 4.5 para análise dos curcuminóides em fase reversa. Em sequência, na saída da coluna, foi desviado um volume suficiente para defragmentação, numa vazão de ~50 µL/min de efluente, para o espectrômetro de massas Quattro LC, triplo quadrupolo (Waters). N₂ foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação. A detecção foi feita em modo positivo e negativo de ionização em pressão atmosférica (API). A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 3.5, e as análises foram obtidas em modo de *scan* de *m/z* 300 a 400. As energias de ionização para os íons negativos foram 60 V no cone e 2,5 kV no capilar, íons positivos foram obtidos com energia de 2,94 kV no capilar e 85 V no cone.

4.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC)

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography) é uma tecnologia ainda recente (CHENG *et al.*, 2010) que combina a utilização de colunas cromatográficas preenchidas com fase estacionária com partículas de diâmetro menor do que 2,5 μm e com instrumentação que permite operar com altas pressões da fase móvel (6.000 – 15.000 psi). Isso possibilita diminuição significativa do tempo de análise em comparação com a CLAE convencional. Principalmente, devido a esta vantagem de diminuição do tempo, a UPLC também foi usada para quantificação de curcuminóides nos hidrogéis durante e após o teste de estabilidade dos hidrogéis e a realização dos experimentos de permeação.

A fim de, também, usar a cromatografia em fase reversa e condições de eluição semelhantes às aquelas usadas na CLAE, foram testadas diferentes proporções de ACN:ácido fosfórico 8,6 mM, de 40:60 a 50:50, monitorando-se a corrida com detector tipo PDA, em 425 nm, no modo isocrático. A cromatografia foi realizada em um sistema Acquity-UPLCTM (Waters, MA, USA), composto por uma bomba binária, amostrador automático e forno de coluna. A detecção foi realizada por PDA e coluna usada foi Phenomenex Luna[®] 2,5 μm C18(2) HST (2,0 x 50 mm).

Foi preparada uma solução estoque de curcuminóides 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em etanol 99%, a partir da qual foi preparada uma curva de calibração, diluindo a solução estoque em solução etanólica 1:1, nas concentrações de 0,1 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O volume injetado foi de 5 μL , o tempo de corrida foi de 1,0 min, a 60°C, com fluxo de 0,7 mL/min, usando método isocrático. A fase móvel usada foi acetonitrila (ACN) e ácido fosfórico 8,6 mM, na proporção 47:53 (v/v). Essa fase foi filtrada por membranas VertipureTM de acetato de celulose (Bangkok, Tailândia), com tamanho de poro de 0,22 μm . A linearidade do método foi obtida na faixa de concentração entre 0,2 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e não houve interferência dos adjuvantes das alíquotas dos estudos de permeação na quantificação da curcumina. Os limites de detecção e quantificação foram determinados.

4.8 ANÁLISES FÍSICAS DOS HIDROGÉIS

Inicialmente foram analisados os hidrogéis obtidos com xantana e galactomanana de alfarroba (XL), adicionados de sistema micelar (XLSC) ou etanol (XLEC). As medidas reológicas foram realizadas em Reômetro Haake Rheostress 75, acoplado a um banho termoestabilizado HAAKE K15, a um termocirculador de água DC5, e a um controlador térmico TC 81 (Peltier), utilizando os sensores cone-placa (C60/2 °Ti, diâmetro de 60 mm e cone com ângulo 2°) com fenda de 0,105 mm. As análises foram realizadas a 25°C.

4.8.1 Varredura de tensão

Os ensaios oscilatórios dos hidrogéis foram realizados numa varredura de tensão a 1 Hz, para a escolha da tensão que se encontra na faixa viscoelástica linear. A tensão foi usada nas análises de varredura de frequência e rampas de temperatura, de modo a preservar a estrutura do gel em análise.

4.8.2 Varredura de frequência

As varreduras de frequência foram conduzidas na tensão pré-selecionada, na faixa de 0,01- 50 Hz e os valores de módulos elástico e viscoso foram obtidos. O módulo de estocagem (G'), também denominado módulo de cisalhamento elástico, indica que a energia de tensão é armazenada temporariamente durante o teste e pode ser recuperada mais tarde. O módulo de perda (G''), também denominado módulo de cisalhamento viscoso, indica que a energia usada para iniciar o fluxo é irreversivelmente dissipada ou perdida, sendo transformada em calor de cisalhamento (MORRIS, 1995; SCHRAMM, 2006). Através de G' e G'' é possível calcular a tangente de perda ($\tan \delta$) que é a medida de energia de estocagem perdida numa deformação ($\tan \delta = G''/G'$) (TAMBURIC, CRAIG, 1995).

4.8.3 Rampa de temperatura

O comportamento dos hidrogéis foi avaliado frente as variações de temperatura, utilizando um programa de aquecimento de 2°C/min, de 15-95°C,

seguida de resfriamento de 95-15°C, em frequência fixa de 1 Hz e tensão de 1 Pa. As faixas de temperatura onde ocorreram a transição de fusão e a transição de geleificação dos hidrogéis foram determinadas pela primeira derivada (dG'/dT). A estabilidade do sistema micelar em XLSC foi analisada através de três ciclos consecutivos de aquecimento e resfriamento, de -10°C a 60°C, realizado numa taxa de 3°C/min e numa frequência constante de 1 Hz. Para prevenir a evaporação do solvente, aplicou-se uma camada de óleo mineral ao redor da placa de análise.

4.8.4 Fluência e recuperação

O teste de fluência foi dividido em duas fases: deformação e recuperação (*creep and recovery*). O método consiste na aplicação de tensão e uma subsequente remoção da força para avaliar a recuperação dos hidrogéis e os parâmetros característicos que representam este comportamento. As curvas foram determinadas aplicando tensão de 11 Pa, dentro do intervalo da região viscoelástica linear, durante um período de 300 s e a recuperação foi determinada quando a tensão foi removida. A análise de fluência e recuperação permite a determinação da estrutura intramolecular com precisão sem um distúrbio significativo na estrutura do hidrogel. A medida de compliança (J) em função do tempo mostra a resposta elástica e viscosa da amostra em análise (RAYMENT, ROSS-MURPHY, ELLIS, 1998). Ao aplicar a tensão, σ_0 , há uma reação imediata, considerada o tempo zero para a fase de fluência, assim como no período de recuperação, quando a tensão é cessada, o momento da resposta é considerado o tempo zero desta fase. J_0 é a resposta elástica, imediatamente após a aplicação da tensão, quanto menor for o valor de J_0 maior é a elasticidade do material. J_r representa a recuperação elástica que acontece a partir do momento em que a tensão é retirada (SCHRAMM, 2006).

Os programas RheoWin 3 Data Manager e ORIGIN 7.5 foram usados para obtenção dos gráficos e visualização dos dados.

4.8.5 Análises de microscopia eletrônica por varredura

As análises por microscopia eletrônica por varredura (MEV) foram realizadas para observar a superfície e a estrutura interna dos hidrogéis XL, XLEC e XLSC. Para isto, fragmentos dos hidrogéis foram gentilmente lavados em soluções de

gradiente de glicerol de 15, 30 e 50% em tampão cacodilato 0,8 M (pH 5,7) por 15 min cada. Estes fragmentos foram transferidos para um recipiente contendo nitrogênio líquido (-196°C), permitindo seu rápido congelamento, em seguida foram fraturados com golpe de martelo de inox (FU *et al.*, 2007). Os fragmentos foram lavados novamente em tampão cacodilato 0,8 M (pH 5,7) por mais 15 min, para serem desidratados em soluções etanólicas de concentrações crescentes (20 a 99%). O corte do plano de fratura evidencia o interior da estrutura do gel.

No aparelho de ponto crítico BAL-TEC CPD 030, o fragmento é totalmente desidratado sem perder sua forma. Os fragmentos desidratados foram montados sobre uma fita adesiva de cobre usando como instrumento um estilete, com auxílio de uma lupa estereoscópica e recoberta de ouro e paládio pelo processo de *sputtering*, num equipamento SCD 030 – Balzers Union FL 9496. O conjunto foi observado num campo de emissão de eletrodos a 15 kV em microscópio JEOL JSM-6360LV.

4.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS

Os estudos de estabilidade são uma parte importante no desenvolvimento de um produto e os testes aplicados para avaliar a estabilidade podem ser um fator crítico no desenvolvimento de produtos farmacêuticos (ALSANTE, MARTIN, BAERTSCHI, 2003).

Para o estudo de estabilidade relacionada ao fármaco, este deve ser submetido a diferentes situações de estresse de acordo com a tendência de degradação da substância, que podem ser calor seco e úmido, luz UV, hidrólise ácida e alcalina e oxidação (BAKSHI, SINGH, 2000; 2003).

Os hidrogéis XLMC, XGMC, XLEC, XGEC, XL e XG foram submetidos a testes prévios de estabilidade. Foi empregada temperatura de 45°C, durante 45 dias, com o objetivo de acelerar possíveis reações de degradação. Os hidrogéis foram acondicionados em frascos de vidro âmbar, com tampa rosqueada. As seguintes características foram analisadas nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias:

4.9.1 Características organolépticas

As características organolépticas avaliadas foram homogeneidade, cor, odor, brilho e a ausência de grumos. Estes testes foram realizados visualmente e pela percepção direta (PROENÇA *et al.*, 2006).

4.9.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada pelo método potenciométrico. Procedeu-se à medida do pH em triplicata para cada amostra. O potenciômetro digital Quimis foi previamente calibrado com soluções tampão de biftalato de potássio pH 4,0 e tampão fosfato pH 7,0.

4.9.3 Resistência física

As amostras foram colocadas em frascos de vidro e submetidas às condições de estresse mecânico, através da centrifugação em uma velocidade de 3000 rpm, por 30 min. Estas foram avaliadas visualmente quanto à presença de precipitação, coalescência e separação ou não de fases das preparações semi-sólidas (MONTAGNER; CORRÊA, 2004).

4.9.4 Característica reológica

As medidas reológicas foram realizadas em Reômetro Haake MARS, acoplado a um banho termoestatizado HAAKE K15, a um termocirculador de água DC5 e a Thermo Haake UTM (Peltier), utilizando os sensores cone-placa (C60/2°Ti) e as análises foram realizadas a 25°C. Foram realizadas varreduras de tensão na frequência de 1 Hz para verificação da faixa viscoelástica linear e seleção da tensão usada nas varreduras de frequência. As varreduras de frequência foram realizadas na faixa de 0,02 – 10 Hz, para obtenção dos valores de módulos elástico e viscoso dos sistemas. Os programas RheoWin 3 Data Manager e ORIGIN 7.5 foram usados para processamento dos dados.

4.9.5 Análise do teor de curcuminóides nos géis

O teor dos curcuminóides nos hidrogéis foi avaliado pelo método quantitativo de UPLC desenvolvido no presente trabalho. Foram pesados em torno de 0,13 g de hidrogel e solubilizados em 5 mL de tetrahidrofurano e 45 mL de metanol. Esta solução foi agitada num balão volumétrico por 10 min, uma alíquota de 1 mL foi diluída em balão volumétrico de 50 mL de fase móvel (ACN:ácido fosfórico 5 mM, 45:55). Após filtração por membrana de 0,22 μm , a amostra foi injetada no cromatógrafo.

4.10 ESTUDO DE DISSOLUÇÃO DOS CURCUMINÓIDES A PARTIR DOS HIDROGÉIS XLEC, XGEC, XLMC E XGMC

Foram realizados estudos de cedência do fármaco contido nos hidrogéis através de membrana sintética com retenção de moléculas com massa molar de 6000 a 8000 g/mol, a fim de avaliar a influência da estrutura do hidrogel e microemulsão sobre a liberação do fármaco (YALLAPU *et al.*, 2010). Os detalhes constam nas seguintes subseções.

4.10.1 Estudo de solubilidade

Uma alíquota de 1,0 mg de curcuminóides foi adicionado a 100 mL solução receptora e a mistura foi submetida a agitação magnética por 24 h, a temperatura ambiente. A suspensão foi alíquotada (10 μL) e após filtração por membrana de 0,22 μm foi analisada pelo método quantitativo de CLAE, validado no presente trabalho.

A opção por usar uma solução receptora aquosa tamponada em pH fisiológico adicionada de tensoativos e álcoois foi para propiciar a extrapolação do uso desta solução receptora para o estudo de permeação *in vitro* usando membranas biológicas (YALLAPU *et al.*, 2010).

4.10.2 Estudo de dissolução dos curcuminóides por membrana sintética

Realizaram-se estudos de cedência do fármaco contido nos hidrogéis através de membrana sintética, a fim de avaliar a influência da estrutura do hidrogel e microemulsão sobre a liberação do fármaco.

Foi utilizado saco de diálise de 6000-8000 MWCO Spectra/Por Dialysis Membrane (Rancho Dominguez, CA). Em quatro sacos foram introduzidos 0,5 g de XGMC e XLMC e 1,0 g de XLEC e XGEC, a quantidade de curcuminóides total foi de 300 µg. Para comparar o perfil de liberação dos curcuminóides foi colocado em outro saco 0,5 g de 1,2-propanediol com solubilização direta de 300 µg de curcuminóides (POP). As cinco amostras nos sacos de diálise foram suspensas em erlenmeyer de 125 mL, imersas em 75 mL de solução receptora e vedadas com parafilme. Os conjuntos foram mantidos a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por 24 h, com agitação constante de 150 rpm em *shaker* orbital, conforme diagrama representado na FIGURA 8. Alíquotas de 1 mL da solução receptora foram coletadas nos tempos de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 22 e 24 h. As alíquotas foram analisadas por UPLC para quantificar a curcumina cedida à solução receptora. A quantidade de solução receptora foi reposta após cada tomada de amostra, a fim de manter o volume dispersante constante.

FIGURA 8 – DIAGRAMA DO EXPERIMENTO DE CEDÊNCIA *in vitro*



As quantidades dos curcuminóides liberados foram analisadas considerando que a massa de curcuminóides cedida por POP foi a quantidade máxima liberada no tempo de 10 h, de acordo com a fórmula:

$$\text{Fração de curcuminóides liberada} = M_i/M_t, \quad (10)$$

onde M_i é a massa de curcuminóides liberada, a partir do hidrogel, e M_t é o total da massa de curcuminóides liberada a partir POP. Uma equação de 1ª ordem (eq. 11) foi ajustada aos dados de liberação de curcumina para cálculo da constante de cedência.

$$y = y_0 (1 - \exp (-k t)), \quad (11)$$

onde y é a fração de curcuminóides liberada ao longo do tempo, y_0 é a fração liberada no tempo 0, k é a constante de cedência (h^{-1}) e t o tempo (h).

4.11 ESTUDO DE PERMEAÇÃO *in vitro*

O aparato da célula de difusão, em sistema estático, consiste numa célula de vidro termoaquecida, cuba com meio receptor, coletor automático e suporte para oclusão da célula de difusão, a qual minimiza efeitos de evaporação da amostra (Microette Plus – Sistema Automático, HANSON RESEARCH Co., Chatsworth, USA). A célula consiste de um líquido receptor e uma fase doadora, separadas por membrana sintética ou pele (FIGURA 9). O volume do compartimento receptor (7 mL) é relativamente grande para garantir solução homogênea e diluição da substância permeada. Quando solutos lipofílicos são investigados, modificadores de solubilidade são utilizados com o fluido receptor para promover uma adequada solubilidade e garantir as condições de penetração (FRANZ, 1975; BRONAUGH, STEWART, 1984).

A temperatura do sistema é controlada e mantida por um banho termostatizado (Termocirculador de Água DC5), circulando água através de uma jaqueta que envolve a câmara receptora. A temperatura é mantida uniforme na solução receptora pelo emprego de barras magnéticas controladas por agitadores magnéticos externos.

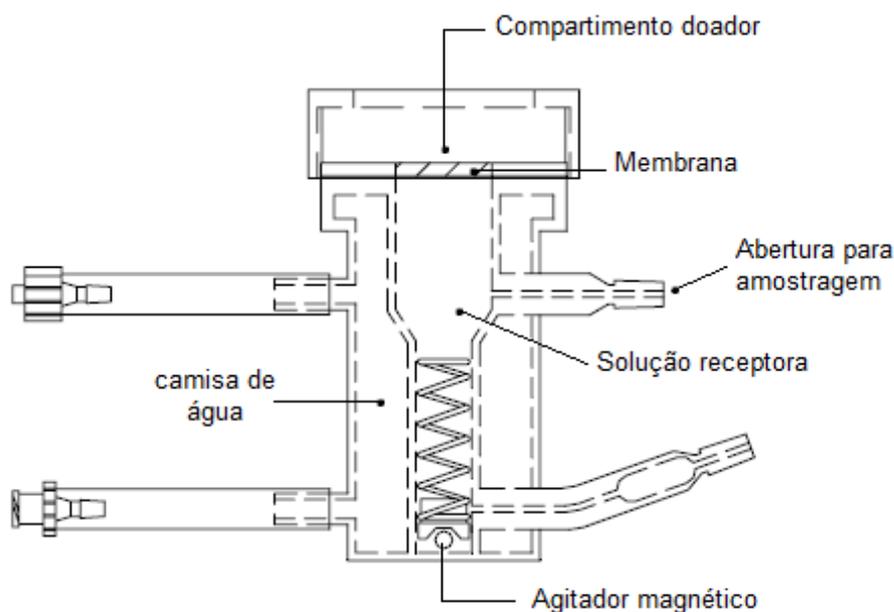


FIGURA 9 – ESQUEMA DA CÉLULA DE DIFUSÃO UTILIZADA PARA ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *in vitro*

FONTE: HANSON, 2010.

4.11.1 Obtenção da pele

A pele da orelha de porco, utilizada como modelo nos estudos de permeação *in vitro*, foi adquirida em frigorífico comercial (Frigomug), tendo o cuidado da orelha ter sido retirada antes da fase de limpeza do animal que é por escaldamento, para manter a integridade da pele. Para tal, a pele da parte externa das orelhas, proveniente de animais recentemente sacrificados, foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi. As secções de pele foram congeladas a -20°C por até um mês antes de serem utilizadas nos ensaios.

É de extrema importância que, durante o preparo da pele, a barreira cutânea não seja danificada, o que pode levar a uma superestimação da absorção. A integridade da amostra de pele foi determinada antes dos experimentos de permeação por determinação da perda de água transepidérmica (JAKASA, KEZIC, 2008).

4.11.2 Estudos de retenção e permeação *in vitro*

O estudo foi realizado utilizando seis células de difusão de Franz interligadas a um banho termostaticado (FIGURA 10), estabilizado a 37°C, dispostas nos respectivos pontos de uma placa magnética (que promoveu agitação constante do meio receptor). Foram feitos cortes circulares das peles de orelha de porco e estes foram dispostos sobre as células de difusão com a derme em contato com o compartimento receptor. A área difusional do compartimento doador correspondeu a 2,01 cm², e o volume do compartimento receptor correspondeu a aproximadamente 7 mL. Uma quantidade de 1 g do gel foi colocada no compartimento doador, o que proporciona um regime de dose infinita ao experimento, pela relação entre massa e área. Estas condições foram escolhidas visando à absorção máxima do fármaco contido no gel. O meio receptor utilizado foi tampão fosfato pH 7,4, 1,2-propanediol, etanol e polisorbato 80, nas proporções 79:15:5:1, respectivamente. O conjunto foi firmado com uma pinça e o compartimento recoberto a fim de que as formulações não sofressem ação da umidade relativa do ar. A quantidade de curcuminóides que permeou a pele foi analisada por alíquotas de 1,5 mL da solução receptora, retiradas em intervalos de tempos pré-determinados (0, 3, 6, 9, 12, 14 e 16 h), esta quantidade foi reabastecida, imediatamente, com o próprio líquido receptor na mesma temperatura.

Após o período de 16 h do experimento, o material excedente sob a membrana foi lavado com cotonete embebido em metanol, em seguida as peles foram retiradas da célula de Franz. Os curcuminóides foram doseados por CLAE e UPLC.

4.11.3 Quantificação da curcumina remanescente na pele, após permeação cutânea

Para quantificar os curcuminóides remanescentes na pele suína, foi realizado *tape-stripping*. Este procedimento permite determinar a concentração de fármaco retido nas camadas da pele (EC, epiderme e derme). Para isso, foram utilizados vinte pedaços de fita adesiva (3M[®], São Paulo, BRA). Estes foram, sucessivamente, pressionados sobre a pele, retirados por uma pinça e colocados num frasco, sendo o primeiro pedaço de fita desprezado, pois contém resíduos remanescentes do gel. Sobre a face adesiva de cada pedaço, foi vertido 1 mL de

metanol para extração do fármaco e os pedaços de fita adesiva e o metanol foram coletados num frasco de forma a obter a camada referente ao EC. Outros 20 pedaços de fita adesiva (3M[®]) foram pressionados sobre a pele e são referentes à camada da epiderme. O restante da pele foi picotada e colocada num frasco contendo 5 mL metanol, para extração dos curcuminóides retidos na derme.

Os frascos contendo as fitas referentes ao EC, a epiderme e derme foram agitados vigorosamente por 2 min e o conteúdo dos frascos foi sonicado por 15 min. O metanol foi totalmente evaporado à temperatura ambiente, em seguida, 1 mL de metanol foi vertido sobre o material, após agitação e sonicação do conteúdo, o volume total foi filtrado e analisado por UPLC.

4.12 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Foi realizado teste de irritação cutânea *in vitro* nas preparações semi-sólidas contendo curcuminóides: XGEC, XLEC, XGMC e XLMC, em uma concentração de 30 mg/g (m/m) através do teste de agarose *overlay* (INVITTOX, 1990). Como controle positivo utilizou-se uma solução de dodecilsulfato de sódio (DSS) a 1% em água e como controle negativo foi utilizada solução salina. Este teste foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia *in vitro*, da Universidade UNIVALI, sob a orientação do Prof. Rilton A. de Freitas.

4.12.1 Técnica para o preparo de meio de cultura com soro fetal bovino

Foi pesado 4,803 g de meio MEM (*minimum essential medium*) contendo L-glutamina (2 mM) e aminoácidos não essenciais (1%) e, em seguida, 1,85 g de bicarbonato de sódio, ambos foram transferidos para um erlenmeyer de 1000 mL. Adicionou-se 445 mL de água purificada sob agitação constante. O pH foi corrigido para 7,3-7,4 com solução de HCl 0,1 mol/L e adicionou-se 50 mL de soro fetal bovino estéril, inativado e isento de micoplasma. Foi, também, adicionado 5 mL de mistura de antibiótico (penicilina G de potássio) e antifúngico (fungizona). A solução foi mantida sob agitação por meia hora. Após a agitação, corrigiu-se novamente o pH para 7,3-7,4. O meio de cultura foi filtrado em sistema MILLIPORE[®] com filtração seqüencial em membranas de 0,45 µm e 0,22 µm. Transferiu-se o meio para frasco

estéril e manteve-se sob refrigeração por até 30 dias. Toda a operação foi realizada em fluxo laminar.

4.12.2 Técnica para o preparo de meio de cultura com soro fetal bovino concentrado 2×

O procedimento para o preparo do meio de cultura com soro fetal bovino concentrado 2× segue a mesma técnica descrita no item 4.12.1, dobrando todas as quantidades dos sais usados anteriormente. 200 mL deste meio de cultura foram preparados.

4.12.3 Controle de qualidade microbiológico do meio de cultura com soro fetal bovino

Para realização dos testes de controle de qualidade microbiológico dos meios de cultura com soro fetal bovino e soro fetal bovino concentrado 2×, foi retirado 1 mL de cada meio e transferido para um tubo de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura com soro fetal bovino e 1 mL para um tubo de ensaio contendo 15 mL de meio MEM adicionado de glutamina. Todos os tubos de ensaios foram mantidos em estufa a 37°C durante 48 h por 14 dias, sendo que a presença ou não de turbidez (como indicador do crescimento de bactérias ou fungos) foi analisada visualmente a cada 24 h.

4.12.4 Manutenção celular e crescimento

Acrescentou-se meio de cultura a uma garrafa contendo células de fibroblasto L929, previamente descongeladas. O conteúdo desta garrafa foi visualizado ao microscópio, para verificação do crescimento das células. Após ter sido observado o crescimento das células com 80-90% de confluência o meio de cultura foi retirado, a monocamada lavada 3× com tampão salino fosfato pH 7,4 (PBS) e acrescentado 1,5 mL de tripsina (250 mg%). Agitou-se a mistura, com posterior incubação a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, até descolamento da monocamada. Posteriormente, a suspensão celular foi diluída com meio MEM e centrifugada a 1000×g por 10 min a 10°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, então as células foram ressuspendidas em meio de cultura e

transferidas para garrafas T25 (25 cm²). As garrafas foram colocadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ e as células foram observadas no microscópio a cada 24 h. A substituição do meio de cultura se deu a cada 48 h.

4.12.5. Ensaio agarose *overlay*

As células foram tripsinizadas e desta suspensão celular (L929) foi transferido 3 mL em cada poço (placas de 6 poços), a concentração da suspensão foi de 300.000 células/mL. Após 24 h, o meio de cultura foi substituído por MEM contendo 0,01% de vermelho neutro como corante vital. As células foram mantidas por 15 min no escuro. Posteriormente, o excesso de corante vital foi removido e adicionou-se 3 mL de meio MEM, em cada poço. A placa foi incubada por 1 h até aparecimento de coloração vermelha celular. O meio de cultura foi, novamente, removido e substituído por uma mistura de 1:1,2 de meio agarose:meio MEM (mistura *overlay*), mantida em aquecimento (45°C) a fim de evitar a solidificação dos meios. Foram adicionados 3 mL de mistura *overlay* a cada poço e a placa foi mantida na estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 2 h.

As amostras de hidrogéis XLEC, XLMC, XGEC e XGMC e curcuminóides solubilizados em 1,2-propanediol foram incorporadas em discos de papel filtro Whatman[®] nº1 (diâmetro de 0,54 cm), previamente lavados com PBS e secos, com posterior autoclavação (121°C/20 min). Como controle positivo utilizou-se uma solução de dodecilsulfato de sódio (DSS) a 1% em água e como controle negativo foi utilizada solução salina. As placas foram incubadas por 24 h na estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Avaliou-se o grau de irritação pela zona de lise (ausência de incorporação do corante vital) através do uso de paquímetro e avaliação microscópica, segundo a classificação descrita pela Farmacopéia Americana (USP, 2006) (TABELA 5).

TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE REATIVIDADE CUTÂNEA

Classificação	Reatividade	Descrição da zona de reatividade
0	Nenhum	Nenhuma reatividade ao redor da amostra
1	Leve	Alguma má-formação ou degeneração ao redor da amostra
2	Médio	Zona limitou a área ao redor da amostra
3	Moderado	Zona estende 0,5 a 1,0 cm além da amostra
4	Severo	Zona estende maior que 1,0 cm além da amostra

4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *in vivo*

Os hidrogéis contendo curcumina (30 mg%) foram avaliados quanto à ação anti-inflamatória em camundongos através do edema de orelha induzido por óleo de cróton (CALIXTO *et al.*, 1991; ZANINI *et al.*, 1992; OTUKI *et al.*, 2005). O hidrogel XG foi usado como controle branco do ensaio. O protocolo da avaliação da atividade anti-inflamatória pelo edema de orelha é robusto na detecção de alérgenos, indicando poucos falsos-negativos ou falsos-positivos (ROBINSON, CRUZE, 1996).

Submeteu-se o trabalho ao comitê de ética em pesquisa da UNIVALI e aprovado conforme parecer n° 018/2009 e desenvolvido no Laboratório de Farmacologia *in vivo* da UNIVALI, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Márcia M. de Souza.

4.13.1 Animais

Foram usados camundongos machos pesando de 25 a 35 g, provindos do Biotério Central da UNIVALI. Os camundongos, alojados em gaiolas plásticas, permaneceram em sala com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ com ciclo de luz 12/12 h controlados, recebendo água e ração *ad libitum*, exceto durante a vigência dos experimentos.

4.13.2 Método de edema de orelha induzido por óleo de cróton

Os animais foram divididos em seis grupos diferentes (n=10) e anestesiados com éter. O experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por

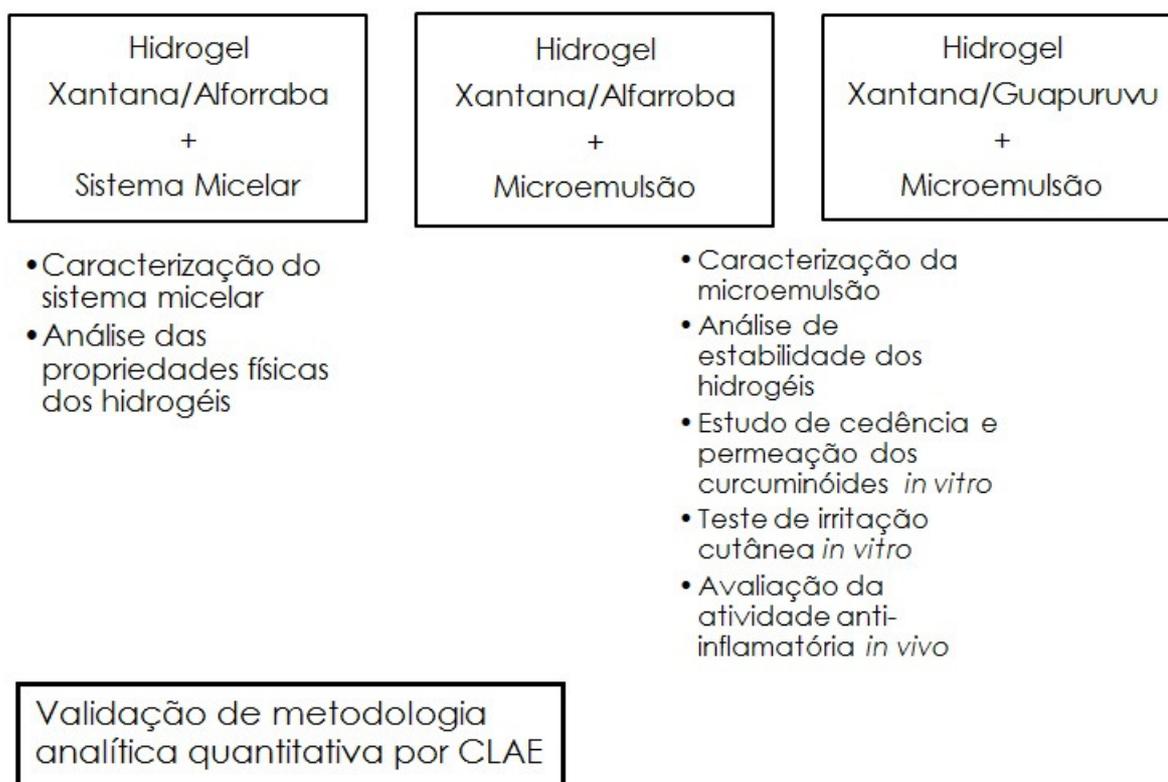
CALIXTO e colaboradores (1991), ZANINI e colaboradores (1992) e OTUKI e colaboradores (2005). A espessura da orelha direita dos animais foi medida com o auxílio de um micrômetro digital (medida basal). A cada grupo de dez animais, foi aplicado o óleo de cróton 2,5% (v/v) dissolvido em acetona, como agente irritante, na superfície externa da orelha direita. Após 30 min de ação do agente irritante, aplicaram-se na superfície interna da orelha direita, 100 mg de cada hidrogel e os respectivos controles, como segue: XG (controle negativo), dexametasona 0,5% (p/p) (controle positivo), XGEC, XLEC, XGMC e XLMC. De quatro a seis horas após a aplicação dos hidrogéis, a espessura das orelhas foi medida novamente e o edema de orelha foi avaliado através da diferença entre a medida basal e a medida realizada após aplicação do óleo de cróton. A medida do edema foi expressa em mm.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata, as médias foram submetidas à análise pelo teste de Tukey e foram consideradas diferentes num nível de significância de $p < 0,05$.

As médias dos resultados foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao teste de múltipla comparação utilizando o método de Dunnet, considerando o valor de $p < 0,05$ como indicativo de significância. Analisaram-se os dados utilizando o programa Graph-3[®].

FLUXOGRAMA



RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOMANANA DE GUAPURUVU

Na primeira etapa do trabalho, a galactomanana foi extraída do endosperma das sementes de *Schizolobium parahybae*. O rendimento da extração de galactomanana de guapuruvu (G) foi de 9%, quando calculado com base na semente inteira, e de 42,1% quando calculado com base somente no endosperma, está de acordo com os valores obtidos por outros pesquisadores (ZAWADZKI-BAGGIO, 1994; GANTER *et al.*, 1995; BRESOLIN *et al.*, 1999; VIANNA-FILHO, 2009; SALVALAGGIO, 2010). A extração de galactomanana das sementes de guapuruvu, realizada pelo Grupo de Química de Carboidratos da UFPR, apresenta um rendimento que varia de 25 a 50%, conforme a TABELA 5. O rendimento varia, principalmente, de acordo com o tempo de extração e também pode variar de acordo com o grau de maturação da semente (DEA, MORRISON, 1975).

6.1.1 Caracterização química da galactomanana de guapuruvu

Os teores de açúcares totais e de proteínas da galactomanana de guapuruvu foram 93,7% e 3,3%, respectivamente e são similares aos valores obtidos por Vianna Filho (2009) (TABELA 6).

Após hidrólise, redução e acetilação da amostra a relação manose:galactose (Man:Gal) foi 2,5:1. A literatura (KAPOOR, 1972; BENTO, 2008; SOUZA *et al.*, 2009; SALVALAGGIO, 2010) relata uma variação na relação Man:Gal de 2,5:1 a 3,2:1 para *Schizolobium parahybae* (TABELA 6). Bento (2008) avaliou extrações aquosas sequenciais de galactomananas de *S. parahybae* e verificou que em diferentes

tempos de extração obtinha relações de Man:Gal diferentes. Este fato também é observado em galactomananas extraídas de endosperma de sementes de outras espécies da subfamília Caesalpinoideae, à qual o guapuruvu pertence (BENTO, 2008; SCIARINI *et al.*, 2009).

TABELA 6 – COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E RESPECTIVAS ANÁLISES QUÍMICAS DE GALACTOMANANA DE GUAPURUVU

	Tempo de Extração (h)	% ^a (m/m)	Açúcares Totais (%) ^b	Proteínas (%) ^c	Relação Man:Gal ^d
Presente trabalho	1	42,1	93,7	3,3	2,5:1
GANTER <i>et al.</i> , 1995	4	50,0	-	-	3:1
BRESOLIN <i>et al.</i> , 1999	4	25,0	-	1,5	3:1
VIANNA FILHO, 2009	1	27,5	90,7	2,8	3:1
SALVALAGGIO, 2010	1	32,0	-	-	2,5:1

^a Rendimento calculado em relação ao peso do endosperma

^b Análise pelo método de DUBOIS *et al.* (1956);

^c Análise pelo método de Bradford modificado (KRESZE, 1983);

^d A relação Man:Gal foi determinada por GLC.

6.1.2 Análise por HPSEC-MALLS

Na Figura 10, está representado o perfil de eluição de G, obtido por HPSEC (detector de índice de refração - RI e espalhamento de luz laser a 90° - MALLS). O índice de refração fornece um sinal proporcional à concentração, enquanto que a resposta do espalhamento de luz depende, principalmente, da massa molar.

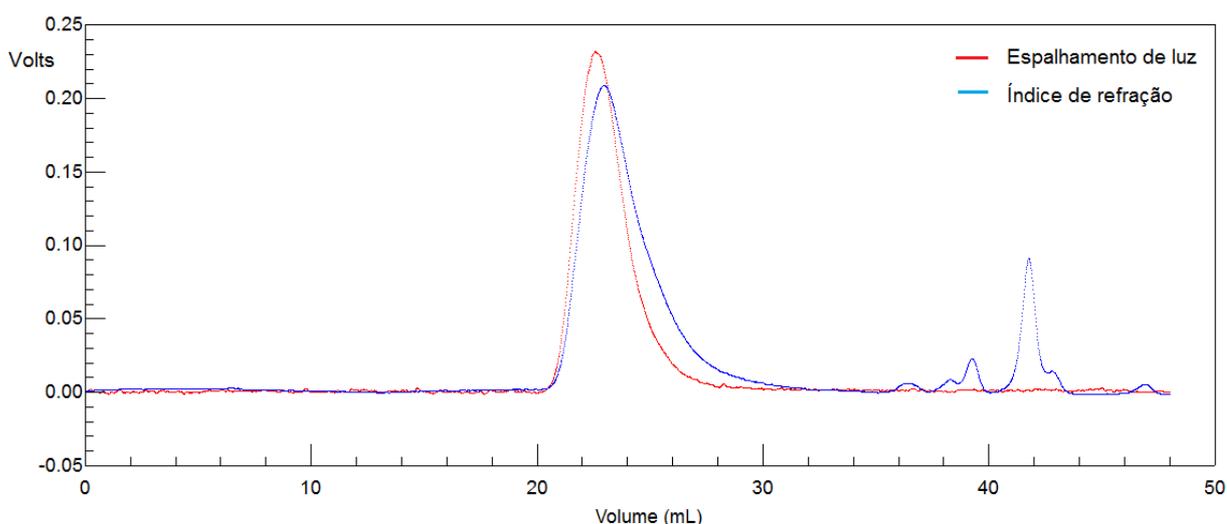


FIGURA 10 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE GUAPURUVU POR HPSEC-MALLS-RI

NOTA: eluição da solução de galactomanana de guapuruvu a 1 mg/mL obtida em fluxo de 0,6 mL/min, utilizando, como fase móvel, nitrito de sódio 0,1 mol/L contendo azida de sódio 0,2 g/L, analisada a 25°C, por espalhamento de luz laser a 90° e detector de índice de refração representada em Volts.

A galactomanana mostra, a partir do detector RI, a presença de um pico eluindo entre 23 mL, coincidente com o pico detectado pelo MALLS. O perfil obtido pelo MALLS indica uma amostra unimodal e de alta massa molar. O perfil do RI apresenta alguns picos entre os volumes de eluição de 36 a 44 mL, que, provavelmente, sejam devidos à presença de arabinoxilanas proveniente das cascas dos legumes de G. O dn/dc determinado para G foi de 0,113 mL/g, com este dado foi possível obter a massa molar ponderal média de $7,73 \times 10^5$ g/mol. A taxa de recuperação da massa injetada de G foi de 91,5%, o que revelou boa solubilização do polissacarídeo no solvente.

O gráfico obtido por HPSEC da galactomanana comercial de alfarroba (L) apresenta um perfil de eluição demonstrado na FIGURA 11 (detector de RI e MALLS). O perfil apresentado pelo RI é heterogêneo, observa-se a presença do pico majoritário eluindo em torno de 23 mL, coincidindo com o pico detectado pelo MALLS, que se refere a galactomanana. Os picos entre 29 e 40 mL e em 47 mL de eluição, provavelmente, são devidos à presença de arabinoxilanas provenientes das cascas dos legumes de alfarroba. O dn/dc determinado para esta amostra foi de 0,155 mL/g, com este dado foi possível obter a massa molar ponderal média de

$8,16 \times 10^5$ g/mol. A taxa de recuperação da massa injetada da galactomanana foi de 81,6%, o que evidencia solubilização satisfatória do polissacarídeo no solvente.

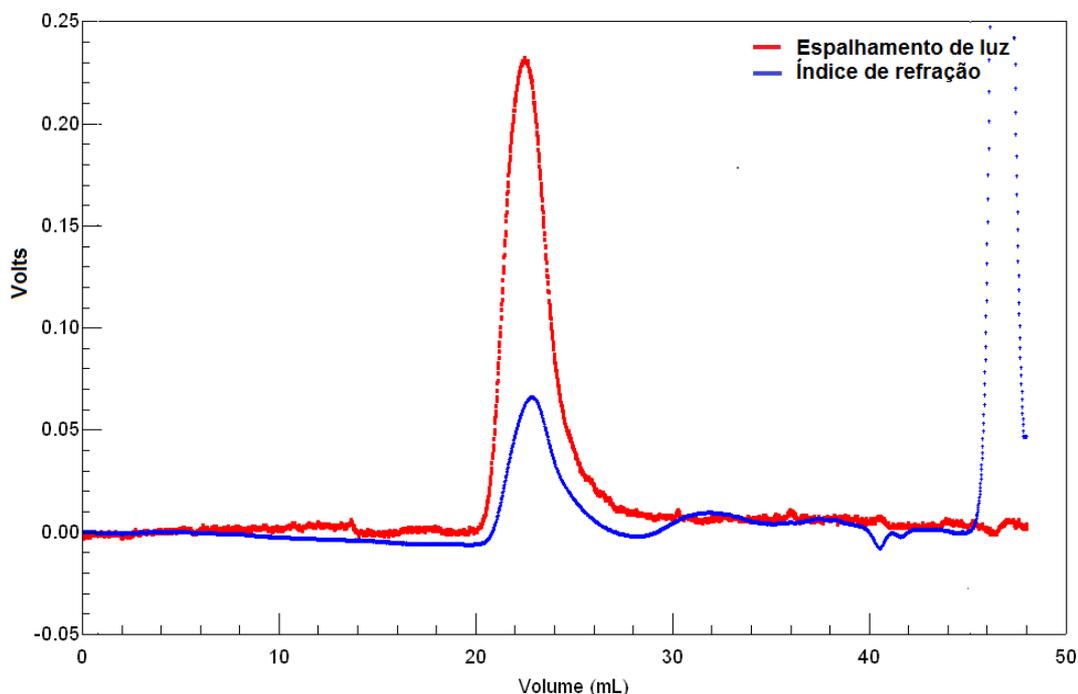


FIGURA 11 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA GALACTOMANANA COMERCIAL DE ALFARROBA POR HPSEC-MALLS-RI

NOTA: eluição da solução de galactomanana de alfarroba a 1 mg/mL obtida em fluxo de 0,6 mL/min, utilizando, como fase móvel, nitrato de sódio 0,1 mol/L contendo azida de sódio 0,2 g/L, analisada a 25 °C, por espalhamento de luz laser a 90° e detector de índice de refração representada em Volts.

Para concluir o estudo da avaliação de homogeneidade dos polissacarídeos empregados neste trabalho, a amostra comercial de xantana (Merck) foi analisada. Uma solução de 1 mg/mL de xantana foi eluída pelo HPSEC (RI e MALLS) (FIGURA 12). O perfil detectado por RI é heterogêneo, com um pico majoritário eluindo em torno de 23 mL; a alta intensidade no RI coincide com o perfil detectado pelo MALLS, que corresponde à xantana. No volume de eluição de 38 mL, mostra-se um pico no perfil de RI, mas nenhum pico correspondente no perfil de MALLS, que, provavelmente, seja devido a impurezas ou polissacarídeos obtidos pelo processo de extração deste exopolissacarídeo comercial (BERTH *et al.*, 1996). O pico após 40 mL no perfil do RI deve-se à eluição de moléculas de baixa massa molar. O dn/dc determinado para a xantana é de 0,125 mL/g, com este dado é possível obter a massa molar ponderal média de $1,06 \times 10^6$ g/mol. A taxa de recuperação da massa injetada da xantana foi de 84,2%.

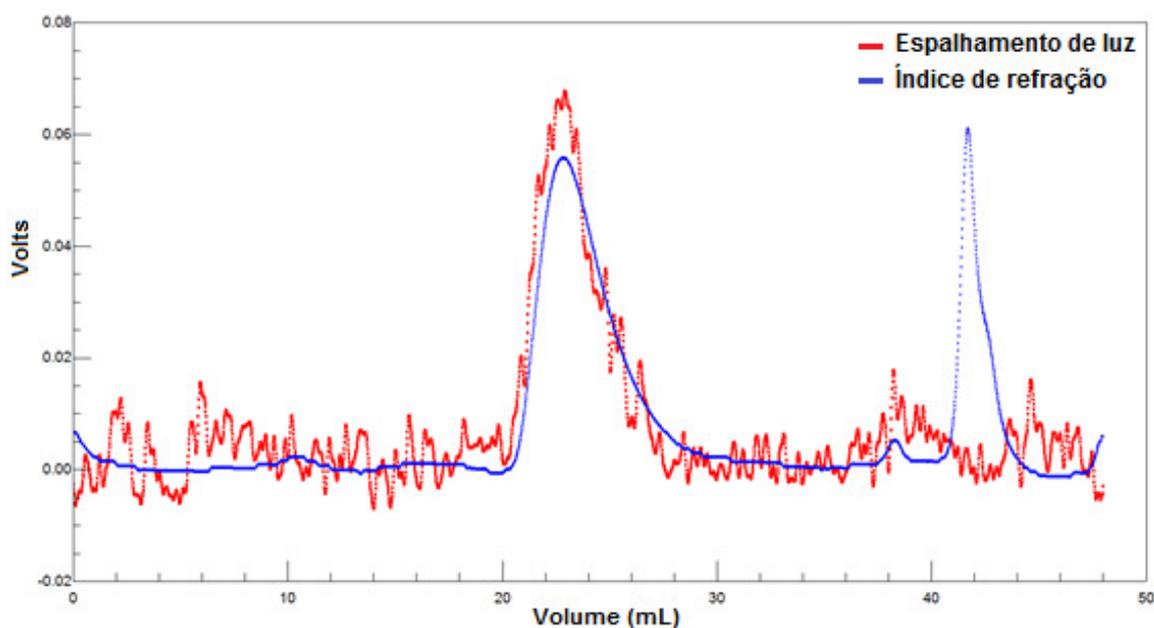


FIGURA 12 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA XANTANA POR HPSEC-MALLS-RI

NOTA: eluição da solução de xantana a 1 mg/mL obtida em fluxo de 0,6 mL/min, utilizando, como fase móvel, nitrito de sódio 0,1 mol/L contendo azida de sódio 0,2 g/L, analisada a 25°C, por espalhamento de luz laser a 90° e detector de índice de refração representada em Volts.

6.2 OBTENÇÃO DOS SISTEMAS EMULSIONADOS

Neste trabalho, foram utilizados dois sistemas distintos para a incorporação da curcumina, ambos foram obtidos com lecitina como tensoativo e miristato de isopropila como fase oleosa.

6.2.1 Sistema micelar

A característica química da lecitina não permite a formação espontânea de camadas lipídicas com curvatura necessária para a obtenção de microemulsões. Portanto, é necessário adicionar álcoois de cadeia curta (por exemplo, etanol) como co-tensoativo, a fim de diminuir a tensão interfacial ao redor das microgotículas. O sistema micelar O/A empregado neste trabalho baseou-se na formulação proposta por Saint Ruth e colaboradores (1995). Este sistema formou-se espontaneamente sem a necessidade de etapas mecânicas, tais como sonicação ou microfluidização. A distribuição do álcool entre a interface das gotas oleosas e a fase aquosa contínua

depende de sua hidrofiliçidade, o que explica a necessidade da solução etanol e água.

Este sistema O/A foi escolhido por viabilizar a incorporação da curcumina (composto hidrofóbico) no hidrogel. A curcumina foi adicionada ao sistema micelar numa concentração de 5 mg/mL e confirmado por CLAE, com recuperação de 95%.

6.2.2 Microemulsão

Um segundo sistema baseado na microemulsão desenvolvida por Lin e colaboradores (2009) foi aplicado para incorporação da curcumina. A formulação desta microemulsão contém polisorbato 80 (co-tensoativo) e fosfatidilcolina (tensoativo e principal componente da lecitina). Incorporou-se a curcumina nesta microemulsão numa concentração de 5 mg/mL. A quantidade de curcumina foi confirmada por CLAE, com recuperação de 99,5%.

Este sistema em comparação com o sistema micelar (item 5.2.1) tem a vantagem de ser isento de etanol e demonstrou estabilidade por no mìnimo 30 dias.

6.3 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS PARTÍCULAS DO SISTEMA MICELAR E DA MICROEMULSÃO POR ESPALHAMENTO DE LUZ

As distribuções das famílias das gotículas de SMC e SMb são monomodais, sendo que os diâmetros hidrodinâmicos aparentes médios (D_h), obtidos pelo modelo matemático de NNLS, foram de 354 nm e 241 nm, respectivamente (FIGURA 13A). Os D_h das gotículas da microemulsão obtidos por Saint-Ruth e colaboradores (1995) foram de, aproximadamente, 60 nm, através de caracterização por um equipamento de espalhamento de luz Malvern K7027. Estas leituras foram realizadas após dupla filtração em membrana de poro 0,22 μm , a 37 °C, e, eventualmente, o tamanho do poro da membrana poderia provocar a remoção de agregados de gotículas, através do cisalhamento do sistema.

As distribuções das famílias de MC e Mb são monomodais, porém numa faixa de D_h mais estendida que as de SMC e SMb (FIGURA 13B). Os D_h aparentes médios para MC e Mb foram de 355 nm e 296 nm, respectivamente. Lin e colaboradores (2009) determinaram D_h de 73 nm para uma microemulsão obtida com oleato de etila como fase oleosa. A diferençã no D_h pode ser explicada pelo uso

de miristato de isopropila como fase oleosa no presente trabalho, ao invés do oleato de etila usado por Lin e colaboradores (2009). Conforme observado por Lin e colaboradores (2009), a solubilização da curcumina foi maior em oleato de etila do que em miristato de isopropila. Para fins comparativos entre SMC e MC, foi mantida a mesma fase oleosa nos dois sistemas, que é o miristato de isopropila, pois a curcumina apresenta níveis de solubilidade semelhantes nos dois ésteres.

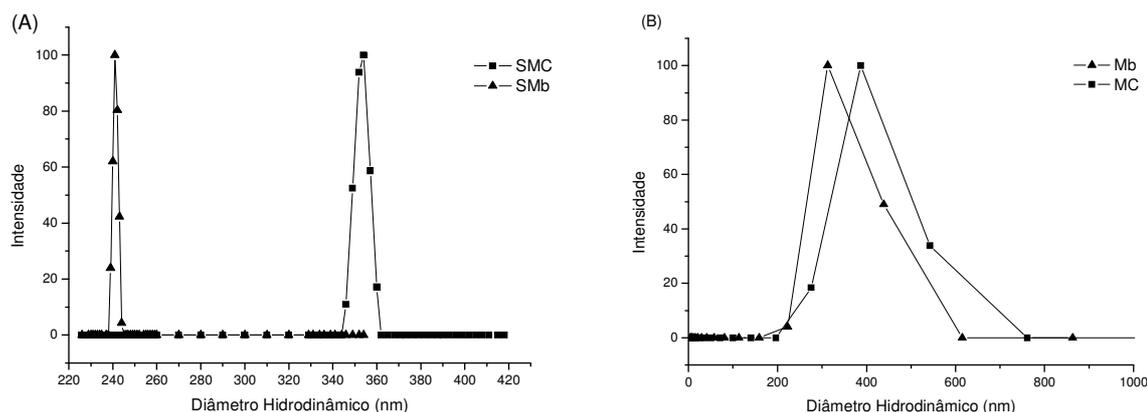


FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS DAS GOTÍCULAS DO SISTEMA MICELAR (A) E DA MICROEMULSÃO (B) OBTIDA POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO A 90°

O sistema micelar (SMC) mostrou instabilidade a 60°C, quando submetido a um ciclo de aquecimento e resfriamento (entre 25°C e 60°C) (FIGURA 14). Durante o aquecimento, em torno de 30°C, observou-se um aumento do tamanho das gotículas do sistema, indicando coalescência dessas. Durante o resfriamento, o sistema foi completamente desestabilizado, causando um baixo espalhamento de luz e uma diminuição drástica do D_h , proveniente do sistema micelar.

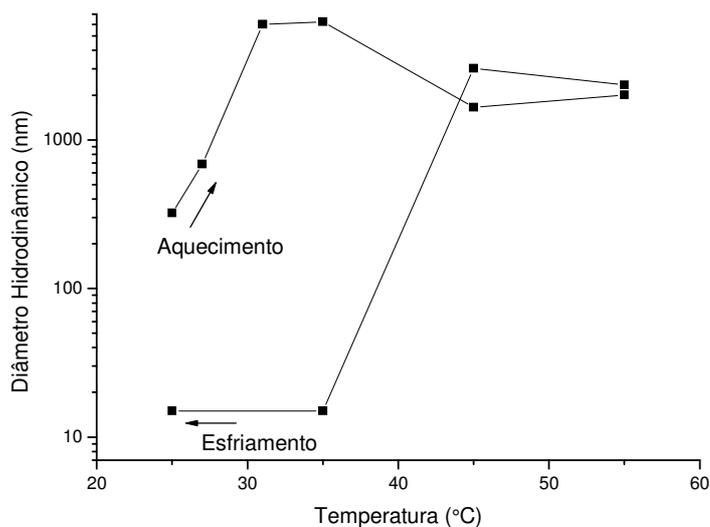


FIGURA 14 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS GOTÍCULAS DO SISTEMA MICELAR OBTIDO POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO A 90° DURANTE AQUECIMENTO DE 25 A 60 °C E RESFRIAMENTO

O D_h da microemulsão (MC) aumentou com o aumento da temperatura, indicando fusão ou agregação das partículas, de acordo com a FIGURA 15. Durante o resfriamento da amostra ocorreu a reestruturação da microemulsão, com D_h de 370 nm e nível de espalhamento de luz similar ao início do experimento.

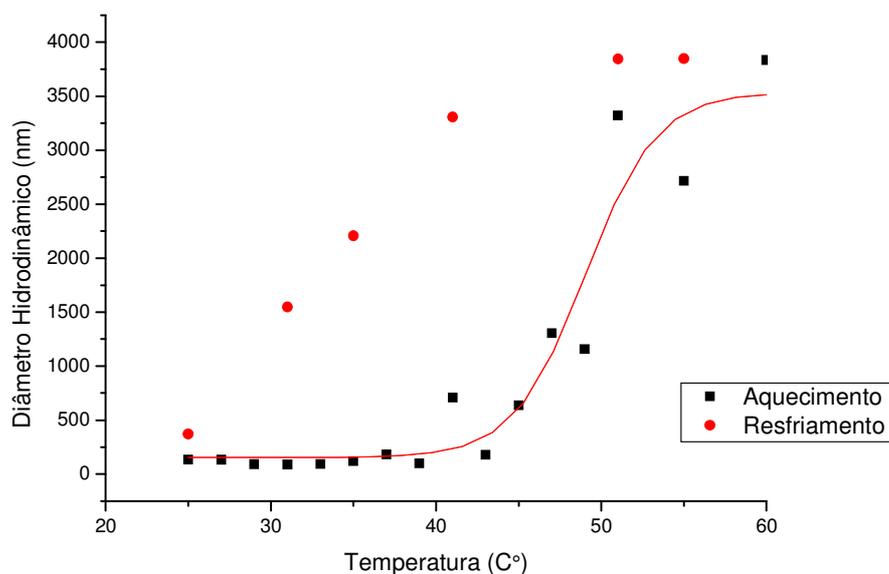


FIGURA 15 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS GOTÍCULAS DA MICROEMULSÃO OBTIDO POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO A 90° DURANTE AQUECIMENTO DE 25 A 60 °C

Em função da estabilidade de MC após aquecimento a 60 °C e a ausência de etanol na formulação, os estudos de estabilidade dos hidrogéis a 45 °C por 45 dias, a avaliação de dissolução *in vitro* dos curcuminóides a partir dos hidrogéis, a permeação *in vitro* dos curcuminóides em membrana de orelha de porco, a avaliação de citotoxicidade e a confirmação da atividade anti-inflamatória *in vivo* dos curcuminóides incorporados nos hidrogéis foram realizadas com os hidrogéis XGMC, XLMC, XGEC e XLEC.

6.4 ANÁLISE FÍSICA DOS HIDROGÉIS COM INCORPORAÇÃO DOS CURCUMINÓIDES PELO SISTEMA MICELAR E POR ETANOL

6.4.1 Análises reológicas

O efeito da adição de curcumina foi avaliado nos hidrogéis binários, obtidos pela mistura de xantana (Sigma) (X) e galactomanana de alfarroba (Sigma) (L), pelas análises reológicas oscilatórias. A adição de curcumina aos hidrogéis foi por solubilização em etanol ou incorporação em sistema micelar e obtiveram-se os géis: XLEC e XLSC, além de XL que é a mistura de X e L (FIGURA 16). Todas as misturas testadas mantiveram a característica de gel, pois G' (módulo elástico) e G'' (módulo viscoso) apresentaram pequena dependência da frequência, e G' foi maior que G'' em toda a faixa de frequência testada (CLARK, ROSS-MURPHY, 1987). Nas análises reológicas que se seguem, é possível observar um comportamento distinto para o hidrogel XLSC, de forma que foi comparado G' a 1 Hz de XLSC (438,7 Pa) em relação a G' de XL (257,1 Pa) nesta mesma frequência. G' de XLSC foi significativamente maior ($p < 0,05$). Esta viscoelasticidade maior indica um entrelaçamento maior das cadeias poliméricas do hidrogel XLSC.

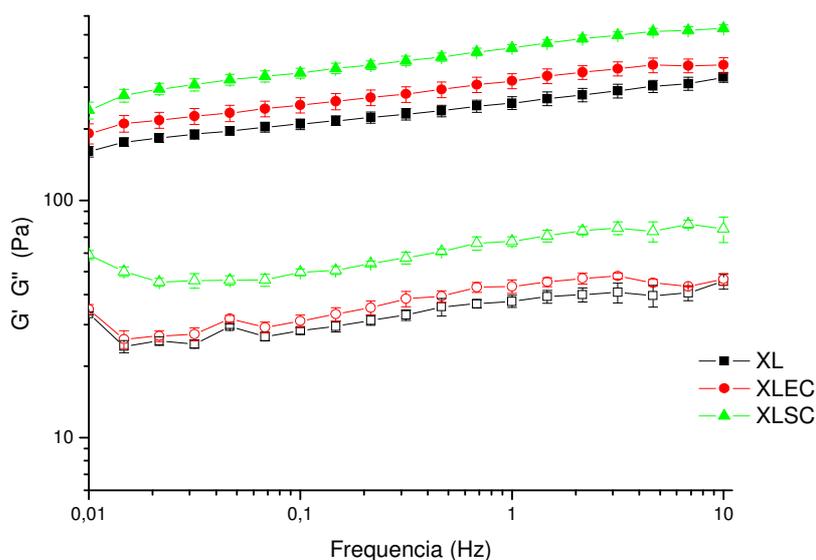


FIGURA 16 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E ALFARROBA COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES

NOTA: frequência analisada de 0,01 a 10 Hz, tensão de 1 Pa, a 25 °C. Símbolos fechados e abertos representam G' e G'' , respectivamente. XL – hidrogel xantana e alfarroba; XLSC – hidrogel xantana e alfarroba com sistema micelar + curcumina; XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcumina solubilizada em etanol.

Para finalidade de uso tópico, um produto deve apresentar características elásticas e viscosas. O produto deve ter boa espalhabilidade, porém após a aplicação deve permanecer sobre o local de aplicação. Este comportamento viscoelástico pode ser avaliado através do ensaio de fluência e recuperação. Estas análises também permitem a observação de interações entre as cadeias poliméricas ou a presença de redes sólidas com pouca contribuição viscosa (NORMAND, RAVEY, 1997, BONACUCINA *et al.*, 2006).

As curvas de fluência e recuperação para os três hidrogéis (XL, XLEC e XLSC) apresentam características de géis viscoelásticos (FIGURA 17). Para cada caso, a fase de fluência apresenta uma resposta elástica instantânea, indicada pelo aumento na compliança, imediatamente após tempo zero. O hidrogel XL apresentou uma resposta maior comparado a XLSC e XLEC. Após a resposta instantânea, acontece a deformação gradual, onde os componentes elásticos do gel passam a se alinhar, a fim de permitir a fluência entre os componentes do gel.

Na fase de recuperação, os componentes, que conferem característica elástica ao hidrogel, rearranjaram-se em uma compliança de 0,8 e 1,1 mPa⁻¹ para XLEC e XLSC, respectivamente.

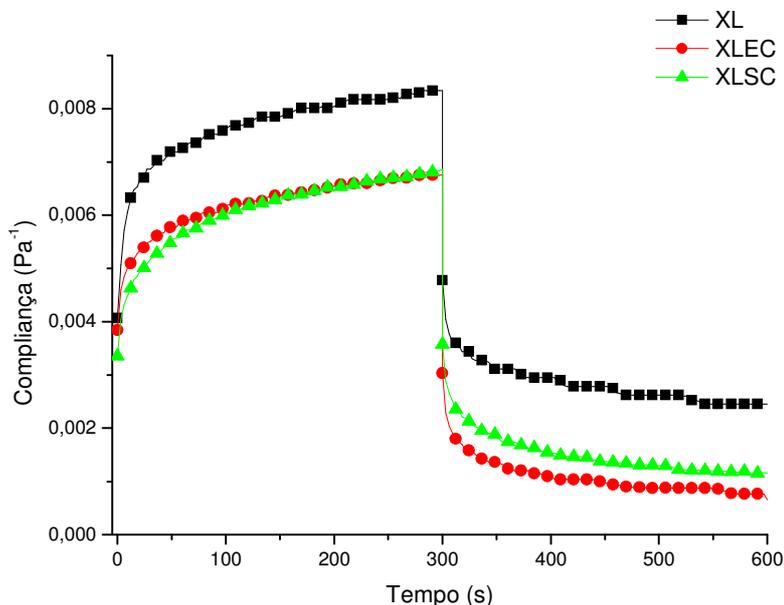


FIGURA 17 – CURVAS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E ALFARROBA COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES

NOTA: As medidas de fluência e recuperação foram realizadas a 25°C numa tensão constante de 11 Pa na fase de fluência. XL – hidrogel xantana e alfarroba; XLSC – hidrogel xantana e alfarroba com sistema micelar + curcumina; XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcumina solubilizados em etanol

Os parâmetros que podem ser extraídos da análise de fluência e recuperação (TABELA 7) indicam que:

- o valor de J_0 de XL (8,1 mPa⁻¹) foi maior que o de XLSC (5,8 mPa⁻¹), este valor maior significa que o componente elástico do gel ofereceu maior resistência à tensão aplicada. Esta resistência pode ser uma característica não desejável do gel, se a tensão representar a força necessária para aplicação do gel sobre a pele;
- o hidrogel XLSC apresenta J_r (5,7 mPa⁻¹) semelhante a J_0 (5,9 mPa⁻¹). Estes valores indicam que a característica elástica do sistema XLSC, observada na fase de fluência, é totalmente recuperada na fase seguinte, o que indica estabilidade do sistema frente a deformações por cisalhamento;

c) XL tem recuperação significativamente menor que XLSC (XL - $J_r/J_{max} = 65,0\%$ e XLSC - $J_r/J_{max} = 83,2\%$) ($p < 0,05$). A menor recuperação é decorrente da menor viscoelasticidade e do menor entrelaçamento do sistema polimérico.

TABELA 7 – PARÂMETROS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO DETERMINADOS PARA OS HIDROGÉIS XL, XLSC E XLEC

	J_o (mPa ⁻¹) ^a	J_r (mPa ⁻¹) ^b	J_r/J_{max} (%) ^c
XL	8,1	6,4	65,0
XLSC	5,8	5,7	83,2
XLEC	6,8	5,9	88,7

^a J_o é a deformação instantânea no $t = 0$.

^b J_r é a recuperação elástica.

^c J_r/J_{max} é a recuperação do sistema.

As análises foram realizadas a 25°C. Os valores das médias de J_o e J_r/J_{max} de XL e XLSC são significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com teste t de Student. XL - hidrogel xantana e alfarroba; XLSC - hidrogel xantana e alfarroba com sistema micelar + curcuminóides; XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcuminóides solubilizados em etanol.

As características de XLSC permitem inferir que o hidrogel terá fluência ao sofrer a tensão de cisalhamento durante o espalhamento sobre a pele, e recuperará sua estrutura quando é desejável que o hidrogel permaneça sobre o sítio de ação.

A molécula de X em solução aquosa a temperatura ambiente apresenta-se em conformação desordenada e interage principalmente com as moléculas de galactomanana via suas cadeias principais (RICHTER, BRAND, BERGER, 2005). Esta interação poderia ser complementada por interações via ligações de hidrogênio das hidroxilas e os componentes polares presentes nos componentes do sistema micelar, que são a lecitina, o etanol e miristato de isopropila. A soma destas interações no hidrogel poderia contribuir no mecanismo de associação viscoelástico do gel XLSC (FIGURA 16).

Para demonstrar a estabilidade térmica do hidrogel XLSC, os ensaios de viscoelasticidade foram realizados numa rampa de temperatura, de 15 a 95°C, em frequência constante de 1 Hz. A FIGURA 18 mostra a dependência do módulo elástico (G') em função da temperatura. Durante o aquecimento, XL, XLSC e XLEC apresentaram transição de fusão (que corresponde a uma redução sigmoide de G') no intervalo de 38°C a 58°C. Nas temperaturas de 60°C a 90°C, XL e XLSC

demonstraram valores de G' menores e valores de $\tan \delta$ maiores, o que significa que a característica elástica do hidrogel foi menor, pois a energia de estocagem perdida na deformação foi maior a altas temperaturas.

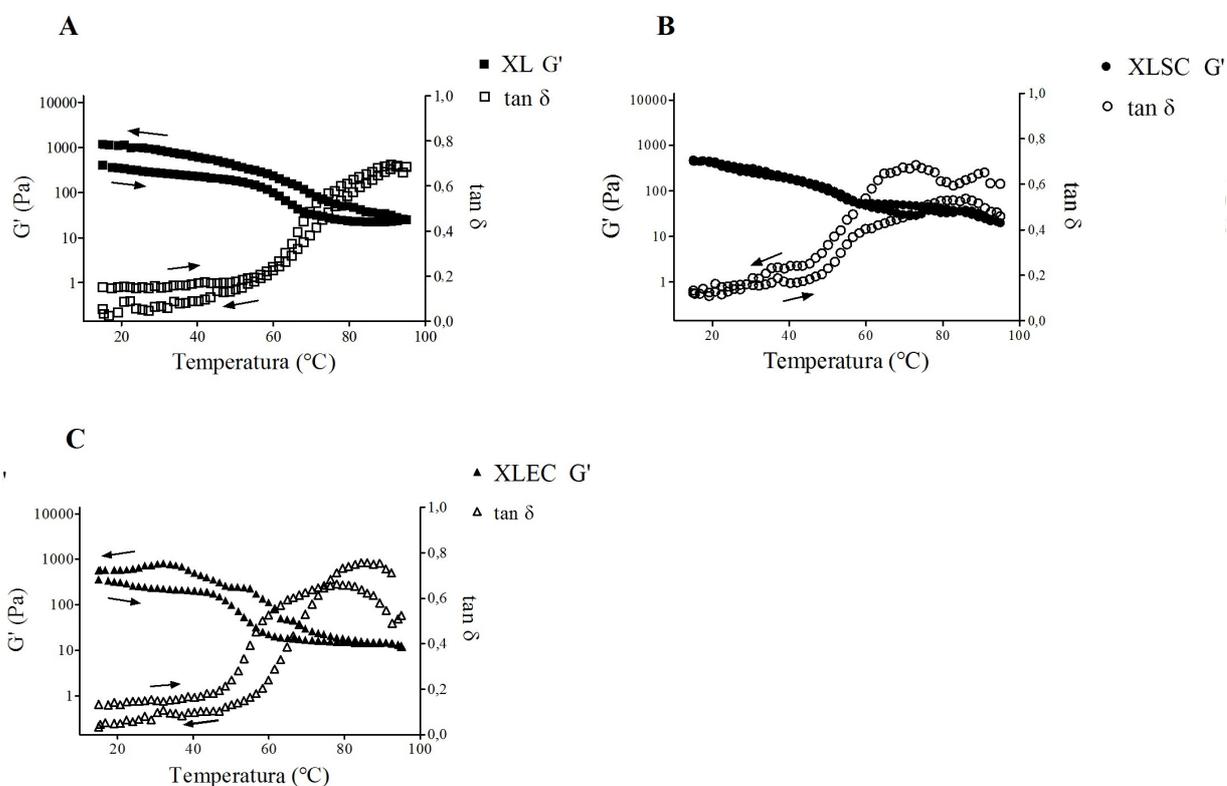


FIGURA 18 – VARREDURA DO MÓDULO ELÁSTICO DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, ENTRE 15°C E 95°C, DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E ALFARROBA COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES

NOTA: Taxa de aquecimento de 2°C min^{-1} , a 1 Hz e tensão de 1 Pa. Símbolos fechados representam G' e símbolos abertos representam $\tan \delta$. As setas indicam as etapas de aquecimento e de resfriamento. XL – hidrogel xantana e alfarroba; XLSC – hidrogel xantana e alfarroba com sistema micelar + curcuminóides; XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcuminóides solubilizados em etanol.

Durante o ciclo de resfriamento, as energias de tensão armazenadas nos três hidrogéis, XL, XLSC e XLEC, foram recuperadas quando a tensão foi removida. A recuperação apresentou variação para o hidrogel XL, pois o módulo elástico foi maior após o resfriamento (G' inicial = 404 Pa, G' final = 1160 Pa). O hidrogel XLSC apresentou G' inicial igual ao G' final = 468 Pa e $\tan \delta$ foi igual nos dois ciclos a 25°C (0,16 tanto na fase de aquecimento quanto na fase de resfriamento) (FIGURA 18B). O hidrogel XL apresentou $\tan \delta$ de 0,15 na fase de aquecimento e de 0,06 na fase

de resfriamento (FIGURA 18A), o que demonstrou que a característica elástica foi maior após o resfriamento. O hidrogel XLEC apresentou comportamento semelhante, $\tan \delta$ de 0,13 na fase de aquecimento e de 0,04 na fase de resfriamento (FIGURA 18C). Este comportamento mecânico indica que XL e XLEC sofreram alterações na interação entre os polissacarídeos após o aquecimento,

A manutenção dos valores inicial e final de $\tan \delta$ e os valores de G' , que retornaram aos mesmos valores iniciais na rampa de temperatura, são consistentes com os resultados observados na análise de fluência e recuperação, onde a estabilidade da estrutura de XLSC demonstrou-se pelos parâmetros de J_r e J_o (5,7 e 5,8 mPa^{-1} , respectivamente) (TABELA 7).

No ensaio de ciclos consecutivos de aquecimento e resfriamento do hidrogel, no intervalo de temperatura avaliada, analisaram-se as tensões às quais o produto é submetido durante a variação de temperatura. Um gel é classificado estável quando G' e G'' deste gel mantiverem o mesmo comportamento, ao longo de todos os ciclos, em frequência e tensão constantes (1 Hz e 1 Pa), dentro da região viscoelástica linear (FIGURA 19).

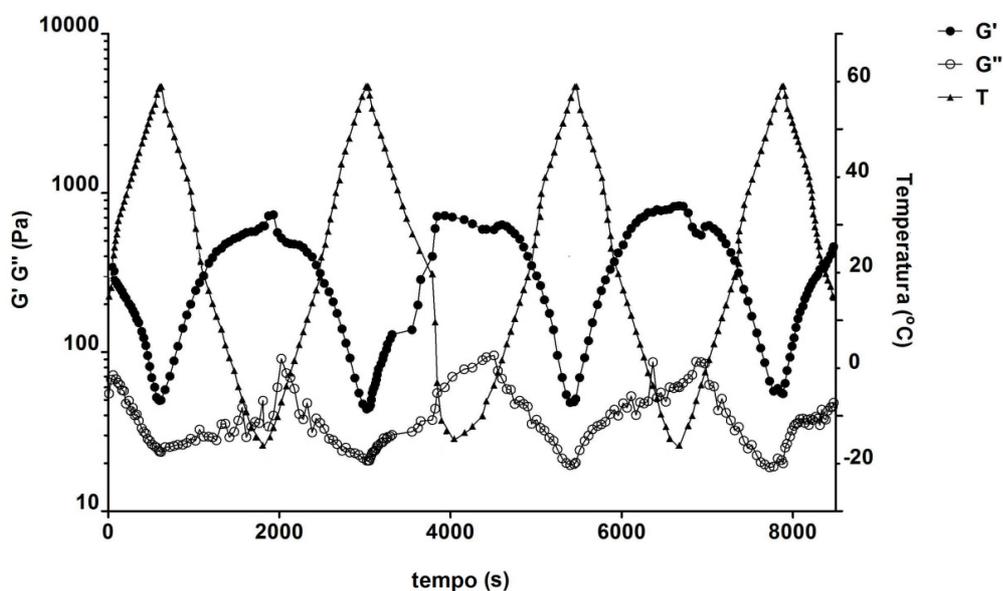


FIGURA 19 – ENSAIO DE ESTABILIDADE NOS EXTREMOS DE TEMPERATURA DE -10 A 60°C DO HIDROGEL DE XANTANA E ALFARROBA COM ACRÉSCIMO DE SISTEMA MICELAR ADICIONADO DE CURCUMINÓIDES

NOTA: Ensaio realizado a 1 Hz e tensão de 1 Pa, o aquecimento e resfriamento foi realizado numa taxa de $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$. XLSC – hidrogel xantana e alfarroba com sistema micelar + curcuminóides.

Neste ensaio, XLSC manteve característica de gel, onde G' foi maior que G'' durante mais que um ciclo de aquecimento e resfriamento. Durante o experimento, o valor de G' foi de 449 ± 21 Pa na temperatura de 25°C , em todos os ciclos. Isto significa que o hidrogel permanecerá com suas características elásticas inalteradas após sofrer aquecimento ou resfriamento.

Pela análise reológica do hidrogel XLSC, é possível inferir que, após o resfriamento, o hidrogel recupera a sua propriedade elástica inicial, e se estas condições forem extrapoladas para a condição de uso, de transporte e de estocagem em prateleira, onde as temperaturas podem variar de 0 a 60°C , o hidrogel XLSC apresenta a estabilidade necessária.

6.4.2 Análise dos hidrogéis por Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)

Para complementar os estudos reológicos, os hidrogéis XL, XLEC e XLSC foram preparados pela técnica de criofratura e depois analisados por MEV. Esta técnica permite a observação da estrutura interna da rede polimérica no estado hidratado.

Os resultados das análises de microscopia de varredura da superfície de XL, XLEC e XLSC demonstraram uma textura homogênea e compacta. Não foram observados grumos ou aglomerados de curcumina sobre a superfície dos hidrogéis, indicando a incorporação total da curcumina no hidrogel (FIGURA 20A, B e C). Em uma magnificação de $5000\times$ a superfície de XL não apresentou fissuras ou porosidades superficiais (FIGURA 20A, *inset*). XL apresentou menos dobras superficiais que XLEC (FIGURA 20B, seta 1) e que XLSC (FIGURA 20C, seta 3).

Na microestrutura do hidrogel XL, há um entrelaçamento uniforme entre as cadeias poliméricas que confere ao hidrogel um aspecto lamelar (FIGURA 20A'). Com a adição de curcumina dissolvida em etanol ao hidrogel XLEC, observaram-se espaços distribuídos no interior da rede polimérica (seta 2), além das regiões lamelares (FIGURA 20B', seta 5). No hidrogel XLSC, também foram observados espaços, porém com bordas mais suaves do que observado nos outros hidrogéis (FIGURA 20C', seta 4).

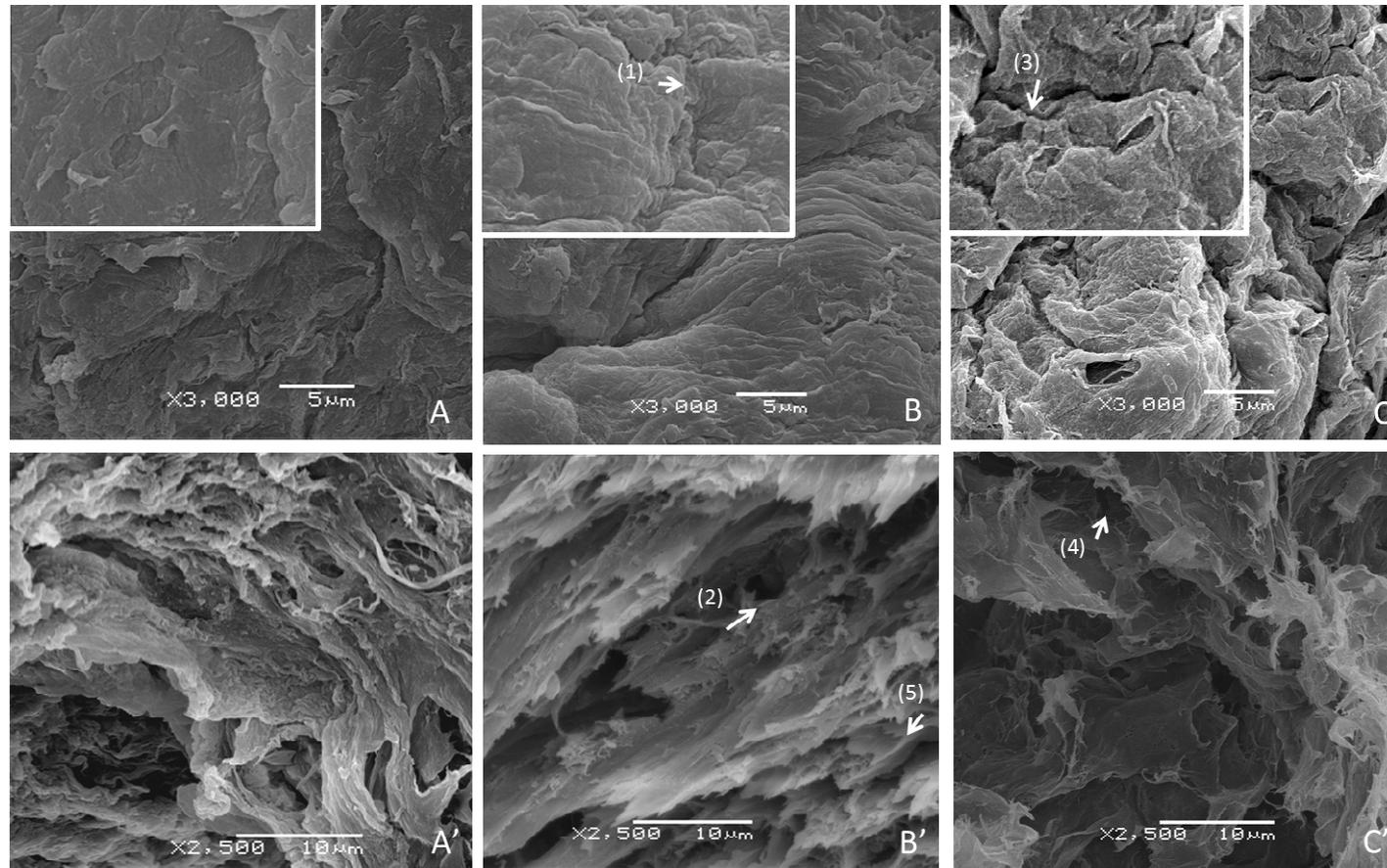


FIGURA 20 – FOTOMICROGRAFIAS DA SUPERFÍCIE DE HIDROGÉIS XL (A), XLEC (B) E XLSC (C), E FOTOMICROGRAFIA DE CRIOFRACTURA DE HIDROGÉIS XL (A'), XLEC (B') e XLSC (C')

NOTA: Fotomicrografias de superfície foram tomadas numa magnificação de 3000x, A, B e C correspondem aos hidrogéis XL, XLEC e XLSC, respectivamente. Os *insets* mostram a superfície numa magnificação de 5000x e enfatizam a homogeneidade e compactação dos hidrogéis (barra = 5 μm). As fotomicrografias de criofractura A', B' e C' correspondem aos hidrogéis XL, XLEC e XLSC, respectivamente, numa magnificação de 2500x (barra = 10 μm). As setas 1 e 3, na micrografia B e C, indicam as dobras da superfície dos hidrogéis. Na micrografia B' e C', as setas 2 e 4 indicam os poros e seta 5

evidencia a região lamelar. XL – hidrogel xantana e alfarroba; XLSC – hidrogel xantana e alfarroba com sistema micelar + curcumina; XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcumina solubilizada em etanol.

6.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DA CURCUMINA INCORPORADA AOS HIDROGÉIS POR CLAE

A curcumina (CUR) foi analisada e quantificada, a partir de amostras de plasma sanguíneo e urina, em vários estudos através de CLAE (WANG *et al.*, 1997; ASAI, MIYAZAWA, 2000; HEATH *et al.*, 2003; PAK, PATEK, MAYERSOHN, 2003), CLAE acoplada à espectrometria de massa (ASAI, MIYAZAWA, 2000; YANG, HUANG, LIN, 2007), cromatografia em camada delgada de alto desempenho (ANSARI *et al.*, 2005) e CLAE com detector por varredura de fluorescência (CHEN *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que os curcuminóides que estão naturalmente presentes juntamente com a CUR, bis-demetoxicurcumina (BDM) e demetoxicurcumina (DMC), também apresentam atividade antioxidante (JAYAPRAKASHA, RAO, SAKARIAH, 2002). A partir desta constatação, a detecção e quantificação dos três curcuminóides é importante, além dos itens necessários para validação do método analítico.

A fim de assegurar a confiabilidade dos métodos analíticos empregados na análise da eficiência de incorporação de fármacos em sistemas de liberação modificada, é imprescindível a validação do método. Os estudos de estabilidade do fármaco e a análise do seu perfil de liberação, a partir dos sistemas, também são atendidos pela validação do método analítico. A validação consiste em garantir e fornecer evidências documentais de que o processo é capaz de detectar, de forma consistente, o fármaco em análise por meio de estudos experimentais. O método deve atender às exigências das aplicações analíticas e assegurar a confiabilidade dos resultados.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2003), os métodos analíticos podem ser classificados em diferentes categorias, sendo que no presente trabalho será focada a categoria II, que se refere a testes quantitativos para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.

Para o método analítico de categoria II, é necessária a determinação dos seguintes aspectos para a validação do método: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, limite de quantificação (LQ) e robustez. A metodologia será aplicada no estudo do teor de fármaco modelo (curcumina) incorporado em

sistemas geleificados (X:G) e nos estudos de cedência e de permeação cutânea *in vitro*.

Obteve-se a partir de CLAE um cromatograma com três picos simétricos, que correspondem à BDM, DMC e CUR com tempos de eluição de 15,5; 17,0 e 18,6 min, respectivamente (FIGURA 21).

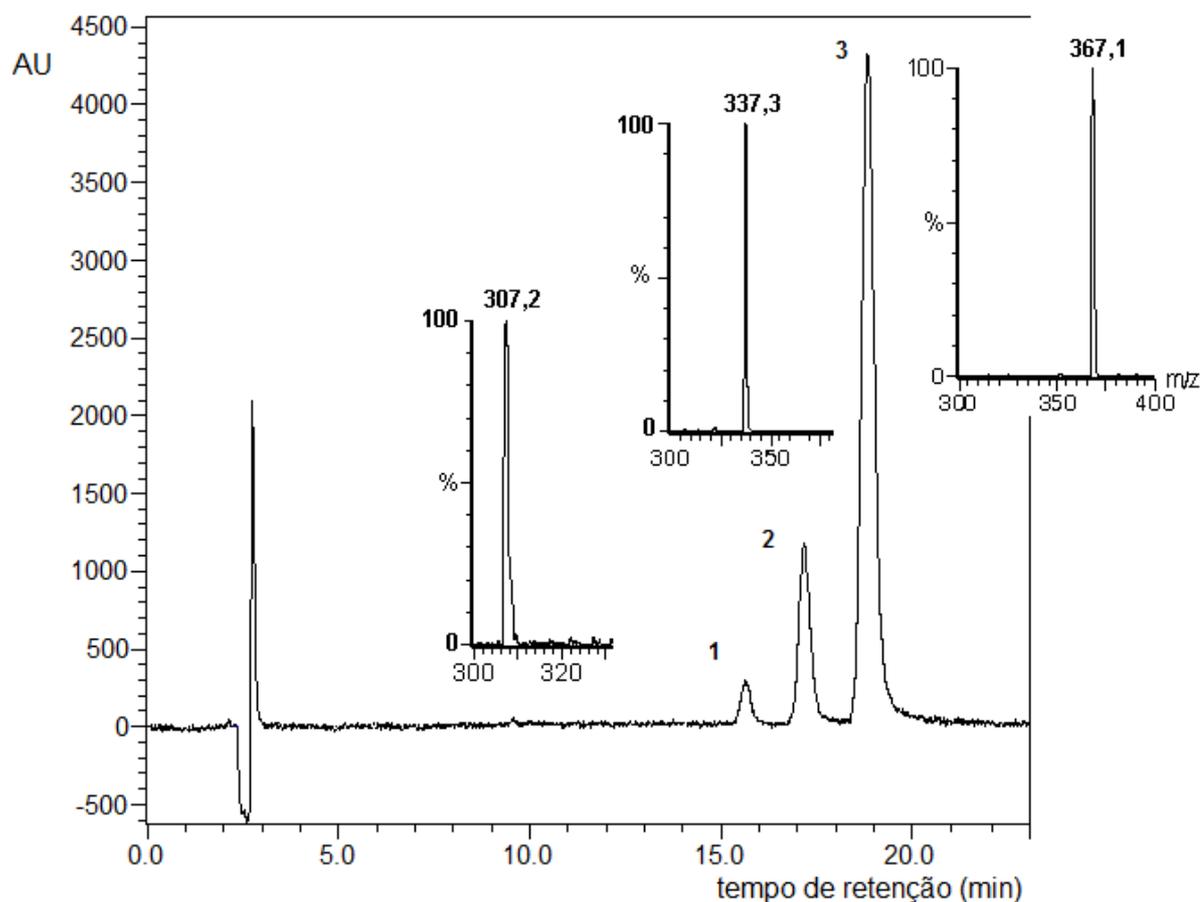


FIGURA 21 – CROMATOGRAMA DOS CURCUMINÓIDES NAS CONCENTRAÇÕES DE 100 ng/mL E ESPECTOMETRIA DE MASSA

NOTA: alíquota obtida a partir de uma solução mãe de 500 ng/mL de curcuminóides em metanol e diluída para 100 ng/mL na fase móvel, ACN:ácido fosfórico 5 mM (45:55), pH 3, fluxo de 1 mL/min, 25°C, com detecção em 425 nm, coluna analítica de fase reversa (5 µm, 4,6 mm x 250 mm). Pico 1: Bisdemetoxicurcumina, pico 2: demetoxicurcumina, pico 3: curcumina. No detalhe, as detecções por espectrometria de massa com ionização em modo negativo.

As massas dos compostos referentes a estes picos foram confirmadas por espectrometria de massa. A ionização em modo negativo apresentou melhores resultados que em modo positivo. Os íons desprotonados $[M-H]^-$ obtidos foram: pico

1 com m/z 307 (15,5 min), pico 2 m/z 337 (17,0 min), pico 3 m/z 367 (18,8 min), confirmando BDM, DMC e CUR, respectivamente (FIGURA 21).

6.5.1 Robustez

Como parte da validação do método, determinou-se a sua robustez, frente a alterações deliberadas nas condições de análise.

As tabelas 6 e 7 demonstram a variação dos parâmetros de análise (fluxo e composição da fase móvel) em relação à condição normal de trabalho (fluxo 1,0 mL/min), temperatura de 25°C e fase móvel na proporção ACN:ácido fosfórico 5 mM (45:55), e o seu efeito nos parâmetros cromatográficos da análise.

TABELA 8 - VARIACÃO DE CONCENTRAÇÃO DA FASE MÓVEL PARA ANÁLISE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DOS CURCUMINÓIDES (10 ng/mL) POR CLAE

Dados analíticos dos picos dos curcuminóides			Área (DPR)	Tempo de retenção (min)	Pratos teóricos (DPR)
Proporção Fase Móvel - ACN: ácido fosfórico 5 mM	49:51	CUR	11300 (2,53)	13,0	3392 (11)
		DMC	2597 (4,98)	11,8	5339 (14)
		BDM	677 (16,1)	10,7	6714 (18)
	45:55	CUR	10342 (5,91)	18,6	3844 (0)
		DMC	2531 (7,57)	17	5347 (9,56)
		BDM	520 (14,84)	15,5	6006 (0)
	41:59	CUR	8917 (8,57)	30,9	4926 (5,50)
		DMC	2648 (9,00)	23,0	8711 (0)
		BDM	416 (2,76)	25,2	5184 (0)

DPR – desvio padrão relativo.

CUR – curcumina, DMC – demetoxicurcumina, BDM – bisdemetoxicurcumina.

Quanto à composição da fase móvel, percebeu-se que uma variação de $\pm 10\%$ na proporção da fase orgânica influencia o tempo de retenção do analito (13 a 30,9 min para CUR) e nos pratos teóricos e área do pico (TABELA 8).

Na condição onde a proporção de solvente orgânico foi maior (ACN:ácido fosfórico 5 mM, 49:51), o tempo de corrida foi menor. Embora um tempo de corrida menor seja desejável, a resolução dos picos dos curcuminóides diminuiu. Por outro lado, a menor proporção de solvente orgânico (ACN:ácido fosfórico 5 mM, 41:59)

aumentou, excessivamente, o tempo de retenção dos analitos, sem um aumento na eficiência e na simetria do pico. Portanto, a composição da fase móvel ACN:ácido fosfórico 5 mM, 45:55 mostrou-se a mais adequada.

A variação no fluxo da fase móvel ($\pm 20\%$) causou uma leve alteração nos parâmetros cromatográficos, conforme demonstrado na TABELA 9. O fluxo menor, de 0,8 mL/min, seria desejável, pois diminuiria o volume de solventes necessário para análise. Porém, resultou em um aumento de cerca de 4,6 min no tempo de retenção dos analitos, com aumento no número de pratos teóricos. Por outro lado, o fluxo maior da fase móvel (1,2 mL/min) diminuiu o tempo de retenção em aproximadamente 2,7 min, mas isto não é vantajoso porque foi associado com uma diminuição do número de pratos teóricos (TABELA 9). A assimetria do pico não sofreu alteração significativa nas três condições testadas. Portanto, o fluxo de 1,0 mL/min mostrou-se mais adequado.

Quanto à estabilidade da solução de curcuminóides em função do tempo, não se verificou alteração significativa na área dos picos das amostras, durante as 6 h de análise, pois o teor ao final da análise foi de $95,0 \pm 4,8\%$ para a CUR, $100,8 \pm 2,3\%$ para DMC e $100,2 \pm 3,5\%$ para BDM.

TABELA 9 - VARIÇÃO DE FLUXO DA FASE MÓVEL PARA ANÁLISE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DOS CURCUMINÓIDES (10 ng/mL) POR CLAE

Dados analíticos dos picos dos curcuminóides			Área (DPR)	Tempo de retenção (min)	Pratos teóricos (DPR)
Fluxo da Fase Móvel	0,8 mL/min	CUR	12774 (2,92)	23,1	5052 (0)
		DMC	2743 (5,62)	21,1	5574 (9,7)
		BDM	640 (14,31)	19,3	5960 (0)
	1,0 mL/min	CUR	10475 (4,06)	18,6	3844 (0)
		DMC	2531 (7,57)	17	5347 (9,5)
		BDM	520 (14,84)	15,5	6006 (0)
	1,2 mL/min	CUR	8613 (4,55)	15,9	2868 (23,4)
		DMC	2125 (7,27)	14,6	3198 (22,1)
		BDM	630 (22,06)	13,2	4592 (33,8)

DPR – desvio padrão relativo

CUR – curcumina, DMC – demetoxicurcumina, BDM – bisdemetoxicurcumina.

6.5.2 Linearidade e Intervalo

Com as condições selecionadas durante o desenvolvimento do método, testou-se a linearidade no intervalo de concentração de 1 a 100 ng/mL da solução de curcuminóides, levando em conta que a CUR representa 78,2 % da solução e DMC e BDM representam 18,3 e 3,5 %, respectivamente. Esta faixa foi selecionada visando um método com elevada sensibilidade, a fim de permitir a quantificação dos curcuminóides em pequenas concentrações, necessária durante o estudo de liberação a partir dos sistemas poliméricos e nos estudos de permeação cutânea. Na faixa testada na concentração de cada curcuminóide, os coeficientes de correlação (R) foram de 0,9989, 0,9981 e 0,9934 para CUR, DMC e BDM, respectivamente (FIGURA 22), apresentando-se acima do critério mínimo aceitável de 0,99 (BRASIL, 2003).

6.5.3 Limite de quantificação e limite de detecção

Os valores calculados para LQ e LD dos três curcuminóides, apresentados na TABELA 10, indicam a elevada sensibilidade do método. A faixa de concentração utilizada para a quantificação dos curcuminóides foi de 1 - 100 ng/mL, portanto conclui-se que o fármaco é seguramente quantificável na faixa selecionada. Estes resultados estão num limite de sensibilidade maior do que aqueles obtidos por Jadhav, Mahadik e Paradkar (2007), que foram LD de 28, 32 e 22 ng/mL para CUR, DMC e BDM, respectivamente, e os valores de LQ foram 85, 97 e 66 ng/mL, respectivamente.

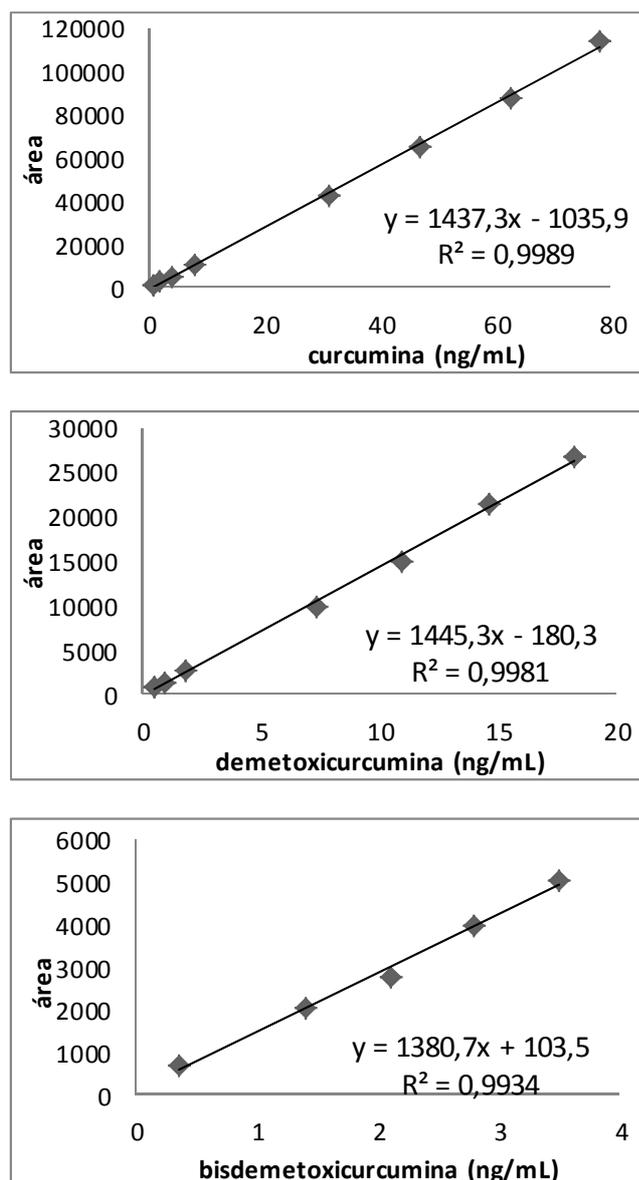


FIGURA 22 – CURVAS ANALÍTICAS DOS CURCUMINÓIDES EM CLAE

NOTA: Fase móvel - ACN:ácido fosfórico 5 mM (45:55), fluxo 1,0 mL/min, 25°C.

TABELA 10 – VALORES DE LD E LQ DOS CURCUMINÓIDES

CURCUMINÓIDES	presente trabalho		Jadhav, Mahadik e Paradkar (2007)	
	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
CUR	0,21	0,63	28,00	85,00
DMC	0,20	0,61	32,00	97,00
BDM	0,51	1,56	22,00	66,00

CUR – curcumina, DMC – demetoxicurcumina, BDM – bisdemetoxicurcumina.

LD – limite de detecção, LQ – limite de quantificação.

6.5.4 Precisão

O ensaio ocorreu em triplicata para cada concentração durante o mesmo dia, pelo mesmo analista e os resultados obtidos encontram-se na TABELA 11.

TABELA 11 – RESULTADOS DE REPETIBILIDADE

Conc teórica (ng/mL)		10,00	60,00	80,00	Teor e CV médio (%)
Conc prática (ng/mL)	CUR	7,82	46,92	62,56	
	DMC	1,83	10,98	14,64	
	BDM	0,35	2,10	2,80	
Recuperação Média (%)	CUR	94,47	99,41	100,44	98,11
	DMC	91,39	101,10	101,82	98,11
	BDM	69,06	92,52	104,01	88,53
CV%	CUR	2,23	0,73	0,27	1,08
	DMC	4,40	1,10	2,31	2,60
	BDM	11,70	4,88	4,18	6,92

CV = coeficiente de variação

CUR – curcumina, DMC – demetoxicurcumina, BDM – bisdemetoxicurcumina.

Os coeficientes de variação (CV%) do ensaio de repetibilidade encontraram-se dentro do valor máximo aceitável de 5%, com exceção da determinação de quantidade de BDM a 10 ng/mL (RE n°899, de 29 de maio de 2003, BRASIL, 2003). A CUR e DMC somam 96,5% na mistura dos três curcuminóides, portanto, o fato de CUR e DMC somados apresentarem precisão intra-dia na média de 1,3% demonstra que o método é preciso.

TABELA 12 – RESULTADOS DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Conc teórica (ng/mL)		60,00	80,00	100,00	Recuperação e CV médio (%)
Conc prática (ng/mL)	CUR	46,92	62,56	78,20	
	DMC	10,98	14,64	18,00	
	BDM	2,10	2,80	3,50	
Recuperação (%)	CUR	96,69	97,23	98,51	97,48
	DMC	98,09	100,06	100,91	99,69
	BDM	99,14	103,58	105,36	102,69
CV%	CUR	2,88	2,47	1,06	2,14
	DMC	3,65	1,27	0,53	1,82
	BDM	7,53	1,04	3,18	3,92

CV - coeficiente de variação.

CUR – curcumina, DMC – demetoxicurcumina, BDM – bisdemetoxicurcumina.

Os coeficientes de variação (CV%) do ensaio de precisão intermediária encontraram-se dentro do valor máximo aceitável de 5% (RE n°899, de 29 de maio de 2003).

6.5.5 Exatidão

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra, entre outros. O método mostrou-se exato, como mostra o percentual de recuperação total dos curcuminóides de 98,77% na microemulsão testada na faixa da concentração alvo (TABELA 13). Esta recuperação dos curcuminóides, a partir da microemulsão, está dentro da especificação que é de 95 a 105%, para forma farmacêutica com concentração final do analito maior ou igual a 0,1 mg% (GONZÁLEZ, HERRADOR, ASUERO, 1999).

TABELA 13 – ENSAIO DE EXATIDÃO PELA RECUPERAÇÃO DO PADRÃO DE CURCUMINA UTILIZANDO A MICROEMULSÃO

Nível de concentração		Baixa	Média	Alta	
Conc. padrão adicionado (ng/mL)		12,00	24,00	48,00	
Conc. teórica (ng/mL)	CUR	44,57	53,96	72,73	Recuperação média (%)
	DMC	10,43	12,63	17,02	
	BDM	1,99	2,41	3,25	
Conc. padrão recuperada média (ng/mL)	CUR	40,24	51,52	70,89	
	DMC	11,43	14,36	19,61	
	BDM	2,37	2,91	4,19	
Recuperação (%) ± (DP)	CUR	90,28 (0,04)	95,48 (0,31)	97,48 (0,10)	94,52
	DMC	109,58 (0,05)	113,72 (0,16)	115,24 (0,23)	113,47
	BDM	110,18 (0,19)	119,28 (0,13)	122,81 (0,13)	117,42
Recuperação Total (%)		94,81	99,70	101,82	98,77

DP – desvio padrão.

CUR – curcumina, DMC – demetoxicurcumina, BDM – bisdemetoxicurcumina.

O método também foi adotado para recuperação dos curcuminóides a partir dos hidrogéis XLEC, XGEC, XLMC e XGMC. Os resultados obtidos constam na TABELA 14, a recuperação de curcuminóides nos hidrogéis foi de 96,89 a 105,41%. Estes valores estão dentro da faixa especificada para formas farmacêuticas nesta concentração de fármaco (95 a 105%) (GONZÁLEZ, HERRADOR, ASUERO, 1999).

TABELA 14 – ENSAIO DO TEOR DOS CURCUMINÓIDES A PARTIR DOS HIDROGÉIS

		XLEC	XGEC	XLMC	XGMC	
Conc.teórica	CUR	23,46	23,46	46,92	46,92	
curcumina	DMC	5,49	5,49	10,90	10,90	
total (mg%)	BDM	1,05	1,05	2,10	2,10	Teor médio
Conc. média	CUR	73,75	73,22	80,27	75,49	
recuperada	DMC	19,58	19,66	20,94	23,07	
(%)	BDM	4,47	4,01	4,20	5,42	
Média	CUR	94,40	93,22	102,27	96,16	96,51
recuperação		(0,004)	(0,002)	(0,0)	(0,01)	
(%)	DMC	108,79	93,57	112,78	127,8	110,73
± (DP)		(0,05)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	
	BDM	118,49	101,86	122,84	120,61	116,05
		(0,06)	(0,01)	(0,01)	(0,01)	
Teor Total (%)		97,60	96,89	105,41	103,98	100,94

DP – desvio padrão.

CUR – curcumina, DMC – demetoxicurcumina, BDM – bisdemetoxicurcumina

Chen e colaboradores (2009) desenvolveram lipossomas para administração intravenosa contendo curcumina e analisaram esta formulação quanto à estabilidade. A quantificação e a confirmação de incorporação de curcumina foram realizadas por CLAE com detector de fluorescência e observou-se que a curcumina manteve quantidades constantes quando incubada em cultivo de células. Suwantong e colaboradores (2007) incorporaram a curcumina em fibras de acetato de celulose com finalidade de liberação tópica e a quantificação da curcumina foi realizada por espectrofotometria e recuperou-se até $94,9 \pm 0,3\%$ da curcumina incorporada no sistema. A curcumina também foi incorporada em nanopartículas de copolímero de ácido lático e glicólico para aumentar a eficácia da curcumina em tratamentos anti-câncer, a eficiência de encapsulação de curcumina foi de $89,5 \pm 3,3\%$, a quantificação foi por espectrofotometria (YALLAPU *et al.*, 2010). Baseada nestes dados a recuperação de curcuminóides obtida nos hidrogéis (96,89 a 105,41%) foi satisfatória.

6.5.6 Especificidade

O estudo de especificidade deu-se a partir das soluções metanólicas de curcuminóides, onde há a melhor solubilização do analito. Tais soluções foram submetidas a testes de degradação ácida, alcalina e fotodegradação forçada, a fim de determinar se o método analítico detecta produtos de degradação do fármaco.

A solução metanólica de curcuminóides demonstrou estabilidade durante a hidrólise ácida (HCl 4 M, 37 °C, 24 h) e a análise por CLAE, da solução a 100 ng/mL, não apresentou degradação dos curcuminóides.

Realizou-se a análise da estabilidade da solução de curcuminóides em meio alcalino. No momento em que a solução alcalina foi adicionada, a cor da solução metanólica se alterou, indicando hidrólise. A condição de degradação alcalina escolhida neste trabalho foi excessiva, pois estudos demonstram degradação dos curcuminóides ainda em condições neutras, em pH 7,2 (WANG *et al.*, 1997). Apesar de não terem sido observados picos de produtos de degradação na eluição dos curcuminóides após hidrólise alcalina, houve redução significativa dos teores de CUR, DMC e BDM, conforme observado na FIGURA 23. Os teores dos três curcuminóides reduziram em 95,8, 78,5 e 62,0%, para CUR, DMC e BDM, respectivamente (TABELA 15). É indicado promover a degradação de 5 a 15% do analito estudado para obter os produtos de degradação, que, eventualmente, poderiam ser formados durante o período de uso do hidrogel, como produto tópico (KLICK *et al.*, 2005).

TABELA 15 – AVALIAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CURCUMINÓIDES EM DIFERENTES CONDIÇÕES

Condição de estresse	Teor degradado (%)		
	CUR	DMC	BDM
Hidrólise ácida	1,5	0	0
Hidrólise alcalina ^b	95,8	78,5	62,0
Fotodegradação ^c	75,0	68,9	55,7

^a a amostra foi analisada após 24 h de hidrólise ácida, pH 1;

^b a amostra foi analisada após 24 h de hidrólise alcalina, pH 13;

^c a amostra foi analisada após 2 h de fotodegradação.

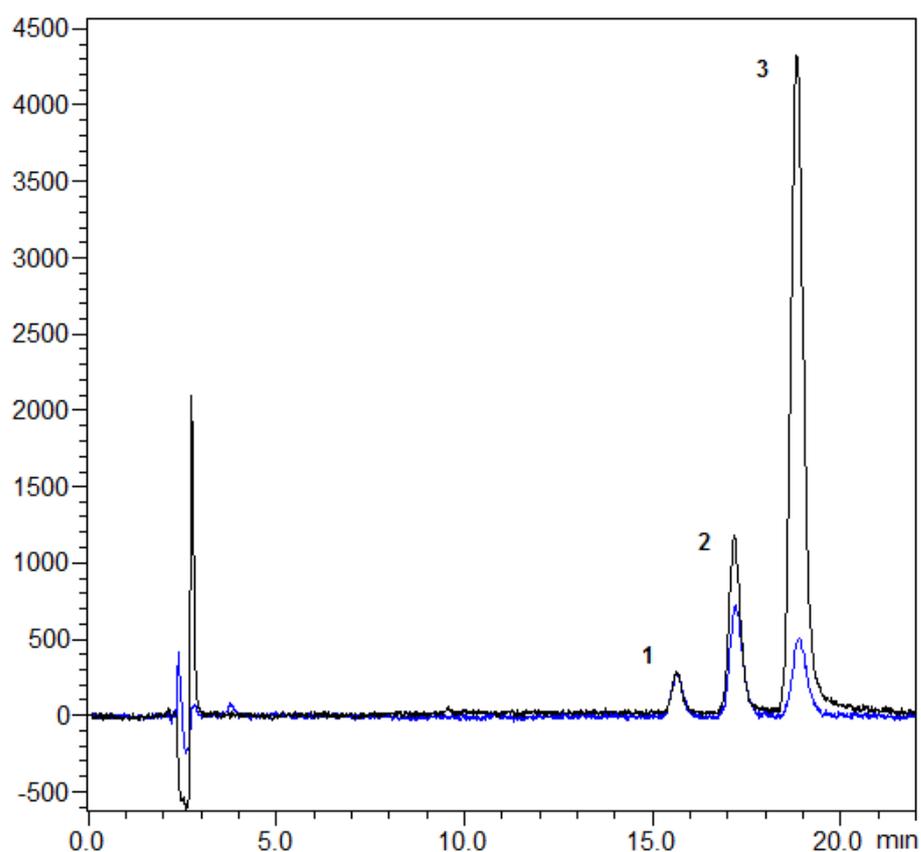


FIGURA 23 – CROMATOGRAMA DOS CURCUMINÓIDES EM ESTUDO DE DEGRADAÇÃO ALCALINA

NOTA: Eluição na concentração de 100 ng/mL no tempo 0 e 300 ng/mL após 1 h de degradação alcalina em solução de NaOH 1 M a 37°C no escuro. A fase móvel foi ACN:ácido fosfórico 5 mM (45:55), fluxo de 1 mL/min, 25°C, com detecção em 425 nm, coluna analítica de fase reversa (5 µm, 4,6 mm x 250 mm). Preto: tempo 0 e azul: tempo 24 h. Pico 1: Bisdemetoxicurcumina, pico 2: demetoxicurcumina, pico 3: curcumina.

O estudo de degradação por luz ultravioleta da solução de curcuminóides foi realizado durante 2 h de exposição à lâmpada de UV de 30 W, a 50 cm de distância. Este tratamento provocou a degradação dos três curcuminóides e consequente redução dos três picos, de forma gradual (FIGURA 24). Não houve o aparecimento de picos decorrentes de produtos de degradação, nas condições de eluição adotados e que absorvam luz no comprimento de onda utilizado (425 nm) e também não foram observados interferentes no espectro analisado pelo *photo diode array* do equipamento. Os teores dos três curcuminóides reduziram em 75,0, 68,9 e 55,7% para CUR, DMC e BDM, respectivamente (TABELA 15).

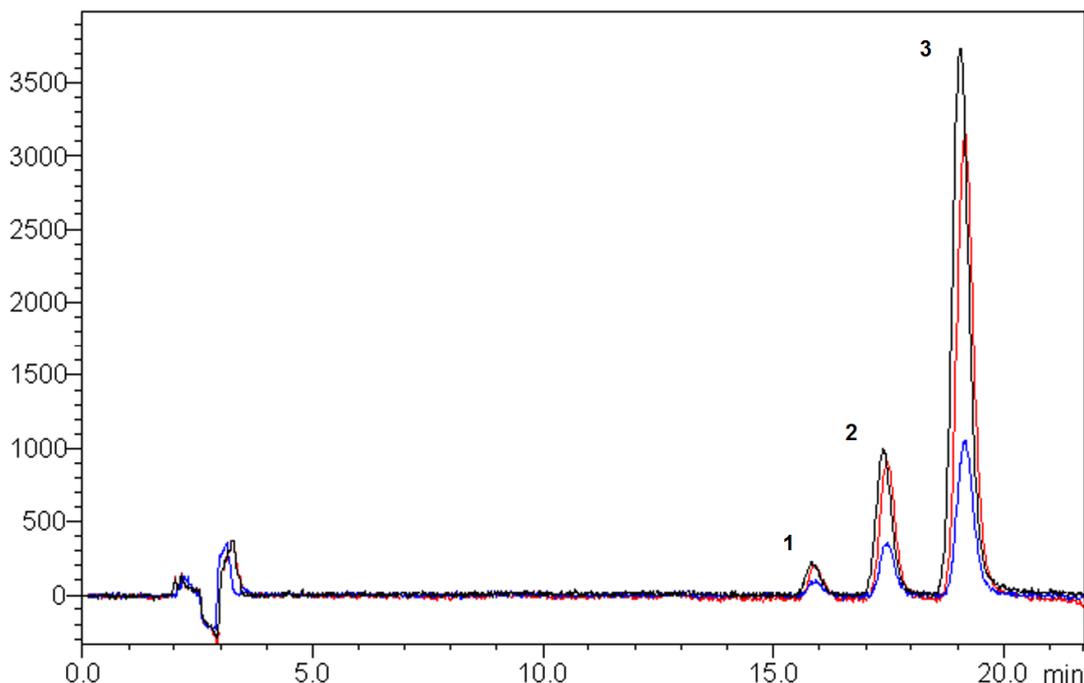


FIGURA 24 – CROMATOGRAMA DOS CURCUMINÓIDES EM ESTUDO DE FOTODEGRADAÇÃO

NOTA: Eluição nas concentrações de 100 ng/mL obtidas no tempo 0, 1 e 2 h de fotodegradação sob lâmpada UV a 20 °C, a 50 cm de distância. A fase móvel foi ACN:ácido fosfórico 5 mM (45:55), fluxo de 1 mL/min, 25 °C, com detecção em 425 nm, coluna analítica de fase reversa (5 µm, 4,6 mm x 250 mm). Preto: tempo 0, vermelho: tempo 1 h e azul: tempo 2 h. Pico 1: Bisdemetoxicurcumina, pico 2: demetoxicurcumina, pico 3: curcumina.

Como observa-se nas FIGURAS 23 e 24, o método analítico pode ser usado no estudo de estabilidade das formulações, uma vez que os produtos de degradação dos curcuminóides não interferem na eluição dos curcuminóides, no comprimento de onda de 425 nm (WANG *et al.*, 1997).

Um estudo de cinética de degradação da curcumina foi realizado por Wang e colaboradores (1997) em soluções tampão de diversos valores de pH, na faixa de 3 a 10. Os resultados, por espectrometria de massa, demonstraram decomposição em pHs alcalinos. O produto majoritário da degradação foi trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexenal, enquanto os produtos minoritários foram vanilina, ácido ferúlico e feruloil metano. Estes produtos foram comparados com padrões por GC/MS e espectrometria de massa, após separação dos produtos de degradação em outra fase móvel (12% tetrahidrofurano, 5% acetonitrila e 2% ácido acético) por CLAE.

6.6 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

Para diminuir o tempo de eluição usou-se o equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). Foram utilizados os mesmos solventes do método de CLAE. Testaram-se diferentes proporções de ACN:ácido fosfórico 8,6 mM, monitorando-se a corrida com detector tipo PDA (*photo diode array*), em 425 nm, no modo isocrático. Obteve-se um cromatograma com três picos simétricos, que correspondem à BDM, DMC e CUR, em 0,64; 0,72 e 0,82 min de eluição, respectivamente (FIGURA 25). O uso do equipamento de UPLC permitiu maior rapidez na análise das amostras (tempo de eluição em 1,5 min) e com LD e LQ menores.

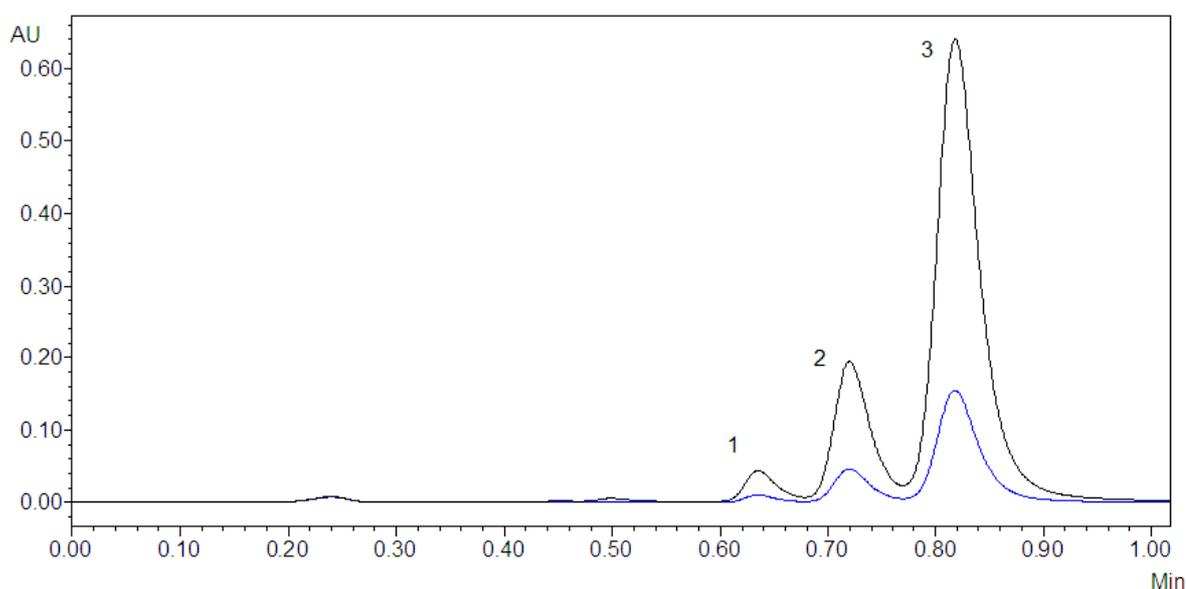


FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DOS CURCUMINÓIDES NAS CONCENTRAÇÕES DE 6 E 25 $\mu\text{g/mL}$ OBTIDO POR UPLC

NOTA: alíquotas obtidas a partir de uma solução mãe de 50 $\mu\text{g/mL}$ de curcuminóides e diluída na solução etanólica 50%, fluxo de 0,6 mL/min, 60°C, com detecção em 425 nm, coluna analítica de fase reversa 2,5 μm C18(2) HST (2,0 x 50 mm). Preto: solução de curcuminóides a 6 $\mu\text{g/mL}$ e azul: solução de curcuminóides a 25 $\mu\text{g/mL}$. Pico 1: Bisdemetoxicurcumina, pico 2: demetoxicurcumina, pico 3: curcumina.

No estudo de quantificação de CUR por Cheng e colaboradores (2010), através de UPLC, foram obtidos um LQ de 0,134 ng e um LD de 0,040 ng. A fim de comparar estes resultados às quantidades de CUR detectadas no presente trabalho, calcularam-se os LD e LQ de acordo com o *loop* usado, que foi de 5 μL . Os valores

obtidos para o presente trabalho foram um LQ de 2,89 ng e um LD de 0,95 ng. Estes limites são maiores que àqueles obtidos por Cheng e colaboradores (2010), porém estes pesquisadores não determinaram a linearidade, sensibilidade e precisão do método analítico quantitativo dos curcuminóides, ou seja, o método não foi validado por UPLC.

6.7 ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS XLEC, XLMC, XGEC e XGMC DURANTE 45 DIAS A 45°C

Para que a estabilidade química de um produto seja mantida, cada componente ativo deve manter: a) a integridade química; b) concentração dentro dos limites especificados; c) concentração constante no período de armazenagem e de uso; d) as propriedades e características que possuía quando foi manipulado (MONTAGNER; CORRÊA, 2004).

Os hidrogéis obtidos com a mistura de xantana e a galactomanana de L (XL, XLEC e XLMC) e com a galactomanana de G (XG, XGEC e XGMC) foram desenvolvidos como veículo para a curcumina. Em função da diferença de interação entre os polissacarídeos que compõem o hidrogel, foram realizados estudos de estabilidade acelerada destes hidrogéis. Apesar da semelhança estrutural destas galactomananas, as interações que ocorrem com a X nos hidrogéis formados apresentaram peculiaridades. A galactomanana de G (Man:Gal – 2,5:1) possui mais unidades de galactose ligadas à cadeia principal que a galactomanana de L (Man:Gal – 3,5:1), o que acarreta em uma alteração na interação com a cadeia principal da X.

Nesta etapa, preparou-se o hidrogel usando a X comercial (Merck), por esta apresentar uma taxa de recuperação maior na análise de homogeneidade por HPSEC/MALLS-RI: a X Merck apresentou uma taxa de recuperação de 84,2%, e a X Sigma apresentou uma recuperação de 37,4%.

Nestes hidrogéis, foi incorporada a microemulsão na concentração final de 60 mg% de curcuminóides e a solução etanólica de curcuminóides na concentração final de 30 mg%.

O estudo de estabilidade acelerada destas preparações deu-se em 45 dias, avaliando-se durante armazenamento em estufa 45°C nos tempos de 0, 15, 30 e 45 dias. Foi verificada a estabilidade física e físico-química através dos caracteres

organolépticos, pH, centrifugação, aspectos reológicos e concentração de curcuminóides por CLAE (ASAI, MIYAZAWA, 2000; ZANIN *et al.*, 2001; BAKSHI, SINGH, 2003; PROENÇA *et al.*, 2006).

6.7.1 Características organolépticas, resistência física e pH

As características organolépticas avaliadas foram homogeneidade, cor, odor, brilho e ausência de grumos ou precipitados. Estas avaliações foram realizadas visualmente e pela percepção direta. Em todos os tempos de avaliação dos hidrogéis, os resultados indicam que não houve degradação das matérias-primas utilizadas. Os hidrogéis mostraram-se estáveis com relação às características organolépticas e após estresse mecânico. O valor de pH é um dos fatores mais importantes, pois proporciona informações que podem refletir a estabilidade química da preparação, principalmente, quanto a reações de degradação do princípio ativo ou adjuvantes da formulação (MORAES, 2006). O pH ficou constante no período analisado (TABELA 16).

TABELA 16 – VALORES DE pH DOS HIDROGÉIS XL, XLEC, XLMC E XG, XGEC, XGMC DURANTE AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE

Hidrogéis	pH			
	Tempo zero	15 dias	30 dias	45 dias
XL	5,3	5,2	5,3	5,2
XLEC	5,4	5,2	5,3	5,2
XLMC	5,3	5,3	5,3	5,3
XG	5,2	5,2	5,0	5,2
XGEC	5,2	4,9	4,9	5,0
XGMC	5,3	5,2	5,3	5,1

NOTA: amostras armazenadas a 45°C por até 45 dias e analisadas a 20 - 25°C. XL – hidrogel xantana e alfarroba; XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcumina solubilizada em etanol; XLMC – hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcumina; XG – hidrogel xantana e guapuruvu; XGEC - hidrogel xantana e guapuruvu com curcumina solubilizada em etanol XGMC – hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcumina.

Centrifugaram-se todas as amostras a 3000 rpm, por 30 min. Estas foram avaliadas visualmente, não sendo observado precipitação, coalescência ou sinerese (liberação de água do gel).

6.7.2 Análises reológicas

Avaliou-se a estabilidade dos géis nos tempos zero, 15, 30 e 45 dias a partir das varreduras de frequência. O módulo elástico e Tan δ , na frequência de 1 Hz, estão apresentados na TABELA 17.

TABELA 17 – CARACTERÍSTICAS ELÁSTICAS DOS HIDROGÉIS XL, XLEC, XLMC E XG, XGEC, XGMC DURANTE AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE

Hidrogéis	Parâmetros							
	G' (Pa) a 1 Hz (erro padrão)				Tan δ a 1 Hz			
	Tempo zero	15 dias	30 dias	45 dias	Tempo zero	15 dias	30 dias	45 dias
XL	103,7	113,2	112,9	98,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	(2,4)	(3,2)	(5,3)	(3,0)				
XLEC	108,7	167,3	158,3	170,2	0,1	0,1	0,1	0,1
	(0,2)	(2,3)	(13,6)	(4,1)				
XLMC	93,9	104,7	109,3	123,5	0,1	0,1	0,1	0,1
	(0,1)	(2,7)	(10,8)	(12,9)				
XG	11,5	2,8	2,3	1,9	0,4	0,9	1,1	1,7
	(0,3)	(0,1)	(0,1)	(0,1)				
XGEC	14,7	10,7	14,2	10,4	0,3	0,4	0,4	0,4
	(0,2)	(0,2)	(0,3)	(0,3)				
XGMC	9,8	5,4	6,2	4,8	0,5	0,5	0,5	0,6
	(0,2)	(0,5)	(0,8)	(0,3)				

G' - módulo elástico, Tan δ – tangente de perda. XL – hidrogel xantana e alfarroba; XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcuminóides solubilizados em etanol; XLMC – hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcuminóides; XG – hidrogel xantana e guapuruvu; XGEC - hidrogel xantana e guapuruvu com curcuminóides solubilizados em etanol; XGMC – hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcuminóides.

Na FIGURA 26 estão representadas as varreduras de frequência dos géis de XL, XLEC e XLMC, nos tempos zero e 45 dias. Os três géis obtidos pela mistura de

X e L apresentaram G' maior que G'' para todo o intervalo de frequências (FIGURA 26A), demonstrando característica de gel (CLARK, ROSS-MURPHY, 1987). Isto foi observado durante todo o período de verificação da estabilidade de 45 dias. Neste período, observou-se um aumento do caráter elástico de 61,5 Pa no hidrogel XLEC e de 29,6 Pa para o hidrogel de XLMC. No hidrogel XL, ocorreu uma leve diminuição do caráter elástico de 5,6 Pa (FIGURA 26B). Este aumento do caráter viscoelástico dos hidrogéis XLEC e XLMC indica que as interações entre as cadeias poliméricas acontecem através de ligações mais intensas, provavelmente, um maior número de ligações de hidrogênio. Isto é confirmado pela estabilidade de $\tan \delta$ nos hidrogéis XL, XLEC e XLSC (TABELA 17), que se manteve em 0,1 durante todo o período de avaliação de 45 dias. Valores de $\tan \delta$ próximos de 1 caracterizam um gel firme.

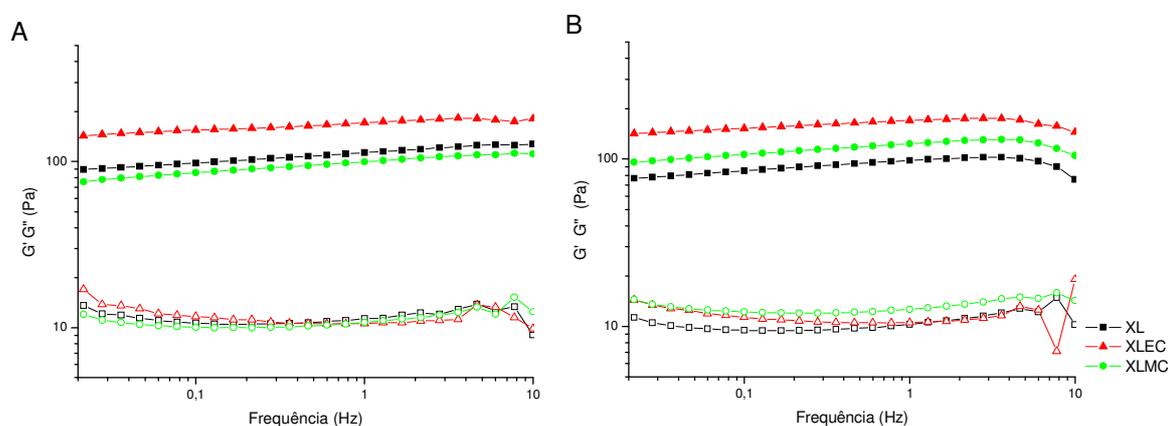


FIGURA 26 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E ALFARROBA COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES, NO TEMPO ZERO (A) E APÓS 45 DIAS (B)

NOTA: frequência analisada de 0,01 a 10 Hz, tensão de 1 Pa, a 25 °C. Símbolos fechados e abertos representam G' e G'' , respectivamente. Amostras armazenadas a 45 °C, até 45 dias. XL – hidrogel xantana e alfarroba; XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcumina solubilizada em etanol; XLMC – hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcumina.

As medidas oscilatórias dos hidrogéis XG, XGEC e XGMC apresentaram característica de gel, no tempo zero, com aumento de G' à medida que a frequência aumentou (FIGURA 27A). Os valores de $\tan \delta$ a 1 Hz foram de 0,35; 0,33 e 0,49 para XG, XGEC e XGMC, respectivamente (TABELA 17). O valor observado para $\tan \delta$ indica um menor grau de elasticidade, portanto, XGEC é menos viscoelástico que os hidrogéis XL, XLEC e XLSC. Porém é mais viscoelástico que XGMC.

Durante o estudo de estabilidade, o caráter elástico dos hidrogéis diminuiu (FIGURA 27B). Ao analisar o comportamento viscoelástico do hidrogel XG no período de 15 dias, foi observado uma modificação do caráter gel. Foi observado que G'' é maior que G' em frequências baixas e que em frequências acima de 1 Hz acontece o *cross-over*, momento em que os módulos dinâmicos se invertem e G' passa a ser maior que G'' . Neste caso, $\tan \delta$ a 1 Hz é próximo ou maior que 1 (TABELA 17) e a característica da mistura passa a ser de solução viscosa.

A instabilidade da estrutura polimérica do hidrogel XG foi observada. Observou-se o *cross-over* no hidrogel XG nas seguintes faixas de frequência: dia 15 = 7,74 Hz; dia 30 = 2,15. No dia 45, a mistura apresentou G'' maior que G' nas frequências de 0,02 Hz a 4,64 Hz, quando ocorreu um *cross-over*.

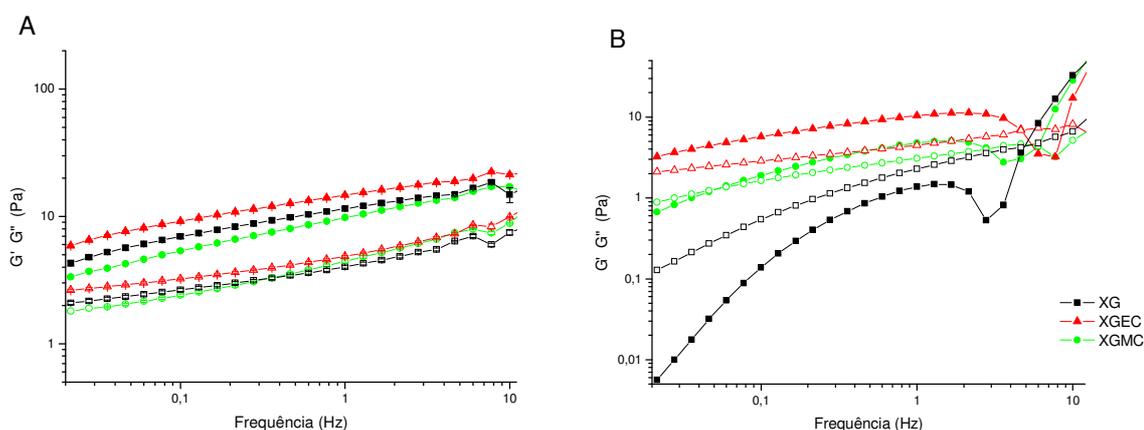


FIGURA 27 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGÉIS DE XANTANA E GUAPURUVU COM E SEM ACRÉSCIMO DE CURCUMINÓIDES, NO TEMPO ZERO (A) E APÓS 45 DIAS (B)

NOTA: frequência analisada de 0,01 a 10 Hz, tensão de 1 Pa, a 25°C. Símbolos fechados e abertos representam G' e G'' , respectivamente. Amostras armazenadas a 45°C, até 45 dias. XG – hidrogel xantana e guapuruvu; XGEC - hidrogel xantana e guapuruvu com curcumina solubilizada em etanol; XGMC – hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcumina.

No caso do hidrogel XGEC, os módulos elástico e viscoso apresentaram *cross-over* apenas no tempo de 45 dias, em frequências de 4,64 Hz, o que significa que a característica de gel foi perturbada apenas em frequências maiores que 4 Hz. O hidrogel XGMC também apresentou característica de solução viscosa, após 45 dias de armazenamento a 45°C, G'' foi maior que G' nas frequências abaixo de 0,05 Hz e acima de 2,78 Hz (FIGURA 27B). Estes valores indicam que as interações

entre as cadeias de X e G são mais fracas que as interações que acontecem entre a X e L.

Morris e colaboradores (1980) avaliaram a interação de X e galactomananas e observaram a diminuição da interação entre os polímeros com o aumento do conteúdo de galactose da galactomanana. Segundo estes pesquisadores, a interação entre X e galactomanana de L foi mais efetiva do que a interação entre X e galactomanana de tara (Man:Gal - 3,0:1). Ao comparar os resultados obtidos nestes estudos com as análises reológicas dos hidrogéis de X e L e de X e G, é possível confirmar que galactomananas mais substituídas (G - Man:Gal - 2,5:1) interagem mais fracamente com a X do que galactomananas menos substituídas (L - Man:Gal - 3,5:1).

A literatura demonstra que a X em solução aquosa, à temperatura ambiente, encontra-se em conformação desordenada. Mannion e colaboradores (1992) propuseram um mecanismo de interação entre X e galactomanana à temperatura ambiente, no qual o gel obtido pelos autores, nestas condições, apresentou características de gel fraco, com propriedades independentes da relação Man:Gal. Os géis estudados por Mannion e colaboradores (1992) também foram obtidos em solução aquosa e a temperatura ambiente, de forma que era esperado que os géis teriam uma característica elástica menos predominante.

No presente trabalho, obteve-se o hidrogel pela adição dos curcuminóides (microemulsionados ou solubilizados em etanol) sobre a dispersão de X, a 25°C. Após a homogeneização destes componentes, a galactomanana foi acrescentada e os hidrogéis (XGMC e XGEC) foram homogeneizados novamente. De acordo com Khouryieh e colaboradores (2006), a conformação desordenada de X, antes da mistura com a galactomanana, é ponto crucial na interação de X e galactomananas com maior grau de substituição. Esta afirmação pode indicar que a X, na conformação desordenada a 20°C, primeiramente estabeleceu interações via ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas com os agentes presentes na microemulsão e com os curcuminóides. Após a adição de G, as interações foram fortalecidas por estas ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Na análise de G' e G'' dos hidrogéis XGMC e XGEC, o valor de $\tan \delta$ é menor do que XG após 15 dias de armazenamento a 45°C (TABELA 17).

A FIGURA 28A demonstra a consistência dos hidrogéis XG e XL. É visível pelas bordas espreiadas de XG (esquerda), comparado ao hidrogel XL que se

mantém firme (FIGURA 28A - direita). Na FIGURA 28B, é possível observar que a consistência do hidrogel XGMC (FIGURA 28B - esquerda) é menor que a do hidrogel XLMC (FIGURA 28B - direita), porém comparando o hidrogel XGMC com as bordas do hidrogel XG (FIGURA 28A - esquerda), observa-se um espreadimento menor.

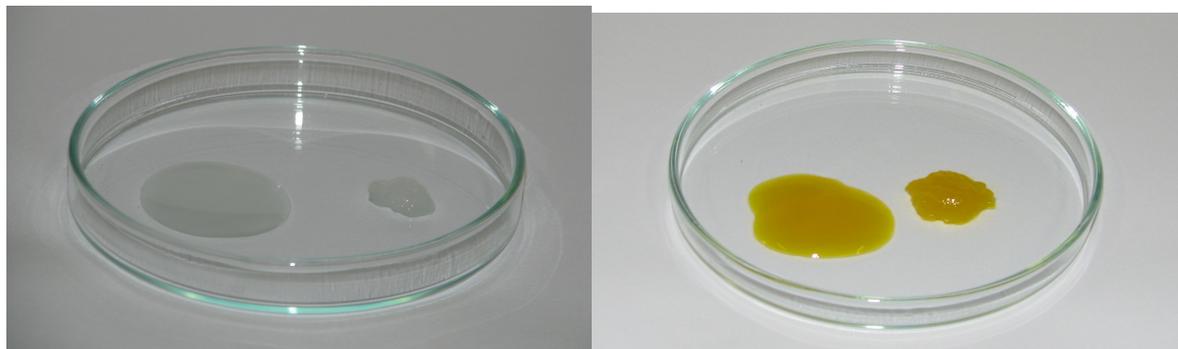


FIGURA 28 – FOTOGRAFIAS DOS HIDROGÉIS XL E XG (A) E DOS HIDROGÉIS XLMC E XGMC (B)

NOTA: (A) Hidrogel XG (esquerda) e XL (direita). XL – hidrogel xantana e alfarroba; XG - hidrogel xantana e guapuruvu. (B) Hidrogel XGMC (esquerda) e XLMC (direita). XLMC – hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcuminóides. XGMC - hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcuminóides.

O módulo elástico está relacionado à conectividade da rede polimérica do sistema, quantitativamente G' está diretamente relacionado ao número de conexões existentes no sistema que podem suportar tensão (ROSS-MURPHY, McEVOY, 1986). Em baixas frequências, as macromoléculas se movem muito pouco num sistema polimérico entrelaçado, resultando em caráter elástico constante. As frequências altas provocam o rompimento de algumas conexões e o movimento das cadeias poliméricas. Este movimento acontece devido ao cisalhamento, à medida que a frequência aumenta. Neste momento acontece o alinhamento das cadeias uma sobre as outras, de forma que a energia de tensão é armazenada temporariamente durante o teste. Este fenômeno é medido pelo reômetro na forma de diminuição do caráter elástico. Quanto mais conexões cruzadas existirem entre as cadeias em um sistema, os valores de G' e G'' serão influenciados em menor grau pela oscilação da frequência (MORTAZAWI, 1995).

De acordo com estes princípios, os hidrogéis XGMC e XGEC apresentam mais conexões entre suas cadeias poliméricas que XG. Os hidrogéis obtidos com X

e L apresentam mais conexões que X e G, o que resulta numa maior estabilidade nestes hidrogéis.

6.7.3 Análise do teor de curcumina por CLAE

Analisou-se a concentração de curcuminóides durante o período de análise de estabilidade. Esta análise foi de acordo com o método quantitativo por UPLC desenvolvido no presente trabalho (TABELA 18). O hidrogel XGEC apresentou maior estabilidade do teor dos curcuminóides com um teor residual de 100% em relação ao tempo zero. O teor residual observado no hidrogel XLEC foi de 99,9%. Os hidrogéis XLMC e XGMC apresentaram teores residuais de 93,3 e 94,8%, respectivamente. Esta variação do teor de curcuminóides totais (CUR, DMC e BDM), observado para os hidrogéis, está de acordo com a especificação de 90 a 107% da concentração final do analito na forma farmacêutica quando a concentração do analito é maior ou igual que 10 mg% (GONZÁLEZ, HERRADOR, ASUERO, 1999).

TABELA 18 – TEOR DE CURCUMINÓIDES TOTAIS NOS HIDROGÉIS XLEC, XLMC, XGEC, XGMC OBTIDO DURANTE ENSAIO DE ESTABILIDADE NA ESTUFA

	Conc.teórica curcumina total (mg%)	Teor médio recuperado (%)				Teor Residual (%)
		Tempo zero	15 dias	30 dias	45 dias	
XLEC	30	97,6	100,3	98,3	97,5	99,9
XGEC	30	96,9	97,5	98,0	96,9	100,0
XLMC	60	105,4	94,6	97,0	98,4	93,3
XGMC	60	104,0	100,9	93,6	98,6	94,8

NOTA: XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcuminóides solubilizados em etanol; XLMC – hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcuminóides; XGEC - hidrogel xantana e guapuruvu com curcuminóides solubilizados em etanol; XGMC – hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcuminóides. Teor residual = (valor de 45 dias/ valor de tempo zero) × 100%

Os curcuminóides mantiveram estabilidade nas formulações testadas neste trabalho numa média de 97%, durante 45 dias a 45°C. Pan e colaboradores (1998) solubilizaram curcumina em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, e observaram 90% de

degradação após 4 h, a 37°C. Wang e colaboradores (1997) analisaram solução de curcumina em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0 e tiveram como resultado 50% de degradação da curcumina após 3,3 h, a 37°C. A melhor estabilidade no presente trabalho, quando comparado a estes resultados da literatura, demonstra que a incorporação de curcuminóides nos hidrogéis de X e galactomananas favoreceu a estabilidade deste fármaco.

6.8 ESTUDO DE DISSOLUÇÃO DOS CURCUMINÓIDES A PARTIR DOS HIDROGÉIS

6.8.1 Estudos de solubilidade da solução de curcuminóides

Previamente ao estudo de cedência, realizou-se uma avaliação da solubilidade da solução de curcuminóides em diversas soluções receptoras, pois os ensaios de cedência devem ser executados em condições apropriadas de solubilização do fármaco (PASTRANA *et al.*, 2000). Um excesso de curcumina foi adicionado à várias soluções receptoras (300 ng/mL) e as alíquotas, retiradas após o período de solubilização de 24 h, foram analisadas por CLAE. Verificou-se uma solubilização de 99% da solução de curcuminóides totais na solução receptora composta por tampão PBS 0,14 M pH 7,4, etanol 5%, 1,2-propanediol 15% e polisorbato 80 1%. A solubilidade dos curcuminóides nesta solução receptora foi confirmada ao dissolver três níveis de concentração de curcuminóides (60 ng/mL, 140 ng/mL e 270 ng/mL).

6.8.2 Estudo de dissolução *in vitro*

Para que uma formulação farmacêutica possa propiciar uma resposta terapêutica, o fármaco tem que ser liberado ou dissolvido da formulação. Os ensaios permitem avaliar a dissolução dos fármacos em função do tempo e também permitem selecionar os excipientes adequados para a formulação.

Na tentativa de garantir a manutenção da condição *sink*, a dissolução de curcumina a partir de hidrogéis de X e galactomanana G ou L foi analisada com a solução receptora composta por tampão PBS 0,14 M, pH 7,4 com adição de 15% 1,2-propanediol, 5% etanol e 1% polisorbato 80, a 37°C e durante 24 h. Para obter

esta condição *in vitro* é necessário o uso de grandes quantidades de meio, de modo que a concentração de soluto não atinja mais do que 20 a 30% de sua solubilidade (ABDOU, 1995).

Os perfis de dissolução de curcuminóides através do saco de diálise, a partir dos géis XGEC, XLEC, XGMC e XLMC, foram plotados em função do tempo. A quantidade de curcuminóides livres cedidos a partir de POP foi tomada como quantidade máxima no período analisado (255,3 μg) (FIGURA 29). Em todos os casos, a liberação seguiu uma cinética de primeira ordem, conforme a equação (11) (item 4.10.2). Os valores de k (h^{-1}) que deram as curvas de melhor ajuste são mostrados na TABELA 19. O modelo o modelo foi aproximado aos valores experimentais com um valor de R relativamente aceitável.

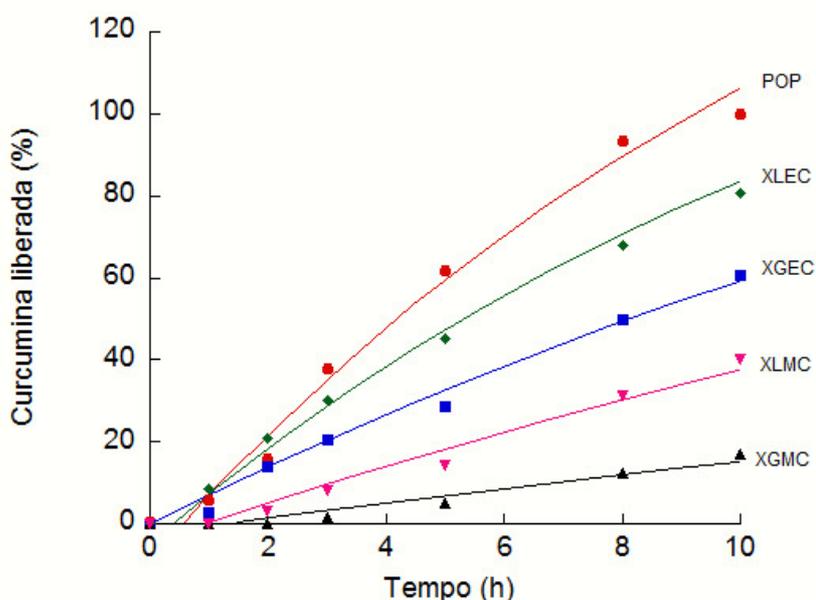


FIGURA 29 – PROPORÇÃO DE CURCUMINÓIDES DISSOLVIDOS PARA SOLUÇÃO RECEPTORA DURANTE ANÁLISE DE DISSOLUÇÃO

NOTA: Experimento realizado durante 10 h, a 37°C, agitação orbital de 150 rpm em solução receptora contendo tampão PBS 0,14 M, pH 7,4 com adição de 5% etanol, 15% 1,2 propanediol e 1% Tween 80, usando membrana de diálise com retenção de moléculas de massa molar de 6000 a 8000 g/mol. POP - curcuminóides solubilizados em 1,2-propanediol, XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcuminóides solubilizados em etanol; XLMC – hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcuminóides; XGEC - hidrogel xantana e guapuruvu com curcuminóides solubilizados em etanol; XGMC – hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcuminóides.

Os hidrogéis XGMC e XLMC apresentaram constantes de dissolução de curcuminóides de 0,0245 e 0,0298 h^{-1} , respectivamente. Estas foram menores que

as constantes observadas para os hidrogéis XGEC e XLEC, onde os curcuminóides adicionados aos hidrogéis foram previamente solubilizados em etanol. As constantes de dissolução de XGEC e XLEC foram 0,0601 e 0,0602 h⁻¹, respectivamente. Os valores destas constantes representam comportamentos de dissolução de curcuminóides que tendem à um comportamento próximo à dissolução dos curcuminóides solubilizados em POP (0,069 h⁻¹).

Dado que o trabalho visa a aplicação tópica de curcuminóides em hidrogéis, a característica de dissolução mais lenta dos curcuminóides microemulsionados é positiva, comparada a dissolução dos curcuminóides incorporados no hidrogel após solubilização em etanol. A dissolução lenta e prolongada dos curcuminóides a partir dos hidrogéis XGMC e XLMC produz efeitos terapêuticos prolongados, pois as características viscoelásticas permitem a manutenção de quantidades expressivas por um período prolongado sobre a pele.

TABELA 19 – CONSTANTES DE DISSOLUÇÃO E COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE CURCUMINÓIDES A PARTIR DOS HIDROGÉIS

Hidrogéis	Experimento	
	k (h ⁻¹)	R
POP	0,0690	0,992
XLEC	0,0602	0,991
XGEC	0,0601	0,998
XGMC	0,0245	0,983
XLMC	0,0298	0,990

NOTA: POP - curcuminóides solubilizados em 1,2-propanediol, XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcuminóides solubilizados em etanol; XLMC – hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcuminóides; XGEC - hidrogel xantana e guapuruvu com curcuminóides solubilizados em etanol; XGMC – hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcuminóides; k – constantes de dissolução dos curcuminóides.

6.9 ESTUDO DE PERMEAÇÃO *in vitro*

Os estudos de permeação *in vitro* são importantes para a avaliação de formulações propostas no desenvolvimento de medicamentos para uso tópico, seja

para efeito local ou para efeito sistêmico. Estes estudos envolvem o uso de células de difusão projetadas para examinar a permeação do princípio ativo através de uma membrana para a solução receptora em condição *sink*. O princípio ativo penetrante deve atravessar a membrana (EI-KATTAN *et al.*, 2001; BARRY, 2001; AMNUAIKIT *et al.*, 2005). Visto que nos estudos de dissolução (item 5.8) os curcuminóides foram cedidos a partir de todos os hidrogéis, estes foram avaliados quanto à permeação por membrana biológica.

Nos estudos de permeação dos curcuminóides, a partir dos géis XGEC, XGMC, XLEC e XLMC, após 16 h de experimento, foram detectadas concentrações de 2,15 a 2,50 µg/mL de curcuminóides, solubilizadas no líquido extrator (metanol), nas porções de estrato córneo, epiderme e derme da membrana de orelha de porco (TABELA 20).

TABELA 20 – CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINÓIDES TOTAIS DETERMINADOS POR UPLC NAS CAMADAS DA PELE DE PORCO

Hidrogéis	Estrato córneo (µg/mL)	Epiderme (µg/mL)	Derme (µg/mL)
XLEC	2,45	2,27	2,50
	(0,05)	(0,05)	(0,0)
XGEC	2,30	2,15	2,20
	(0,28)	(0,07)	(0,0)
XLMC	2,47	2,27	2,37
	(0,05)	(0,24)	(0,12)
XGMC	2,45	2,17	2,47
	(0,25)	(0,05)	(0,09)

NOTA: A estratificação da pele de orelha de porco foi realizada por *tape-stripping* e os curcuminóides foram extraídos com metanol. XLEC - hidrogel xantana e alfarroba com curcuminóides solubilizados em etanol; XLMC – hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcuminóides; XGEC - hidrogel xantana e guapuruvu com curcuminóides solubilizados em etanol; XGMC – hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcuminóides.

Durante o experimento, os curcuminóides não foram detectados na solução receptora. Teichmann e colaboradores (2007) observaram uma maior afinidade dos curcuminóides pelas camadas superficiais da pele. A curcumina incorporada em

microemulsão foi aplicada sobre a pele de voluntários (antebraço), e, posteriormente, o estrato córneo e a epiderme foram removidos por meio de fitas adesivas. Observou-se uma concentração maior de curcumina ao redor dos corneócitos, indicando distribuição e acúmulo de curcumina nas camadas lipídicas. Estes resultados são consistentes com os resultados obtidos na membrana de porco, onde foi observado o acúmulo dos curcuminóides nas camadas lipídicas da pele.

De acordo com Wester e Maibach (2000), os compostos hidrofóbicos são absorvidos mais facilmente pelo estrato córneo, portanto a variação de taxas de absorção dérmica é grande, dependendo da composição química do fármaco. A rota de permeação pelos lipídios intercelulares é dominante para compostos hidrofóbicos (MORGANTI *et al.*, 2001).

O experimento em células de difusão de Franz com solução receptora com 20% teor alcoólico foi realizado para evitar que o etanol presente na solução receptora prejudicasse a integridade da membrana biológica e desta forma alterasse o resultado. Fang e colaboradores (2003) utilizaram solução etanólica 50% como solução receptora para avaliar a permeação de curcumina em pele de abdomen de rato, a partir de um sistema obtido de etil-celulose (polímero lipofílico) em forma de filmes contendo 20 mg% de curcumina. A análise ocorreu a 37°C utilizando monoterpenos cíclicos como aceleradores de permeação de fármacos adicionados ao veículo de hidrogéis obtidos com carboxi-metil-celulose. Este estudo apresentou um fluxo de curcumina de 6,83 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \text{ h})$, que contrapõe a preocupação em diminuir a concentração de solventes na solução receptora que podem prejudicar a integridade da membrana e reduzir a função de barreira do estrato córneo (BRONAUGH, STEWART, 1984). Em estudos preliminares para elaboração do protocolo do experimento de permeação dos curcuminóides, a partir de hidrogéis XLMC e XLEC, realizou-se uma análise de permeação usando solução etanólica a 50%. Neste experimento, foi observado um perfil que sugere o rompimento da barreira cutânea em uma das quadruplicatas, portanto foi evitado o uso de concentrações alcoólicas superiores a 20% no compartimento receptor.

Os resultados obtidos a partir dos experimentos de permeação sugerem que existe uma maior afinidade dos curcuminóides pelas camadas superficiais da pele do que pela hipoderme. Esse resultado indica que a ação anti-inflamatória e

antioxidante dos curcuminóides sobre as células da derme poderia ser estendida em função da liberação lenta do fármaco a partir dos hidrogéis.

6.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE *in vitro*

A biocompatibilidade é o requisito principal para utilização farmacológica de sistemas poliméricos. A compatibilidade local cutânea é um dos parâmetros para aplicações clínicas. A “*International Organization for Standardization*” ISO 10993 apresenta um guia para avaliação da biocompatibilidade de materiais para aplicação médica, com prioridade dada a estudos *in vitro* baseados em cultivo celular, através de contato direto e indireto.

O ensaio de citotoxicidade (também chamado de ensaio de reatividade) usando corante vermelho neutro é um ensaio quimiosensível de viabilidade celular, baseado na capacidade de células viáveis incorporarem e ligarem o corante supravital, vermelho neutro. Vermelho neutro é um corante catiônico fraco capaz de penetrar pelas membranas celulares por difusão não-iônica, sendo acumulado intracelularmente em lisossomos, onde se liga a sítios aniônicos na matriz lisossômica (MOSMANN, 1983) (FIGURA 30A). Alterações na superfície celular ou do lisossoma conduzem à fragilidade lisossomal e a outras mudanças que, gradualmente, tornam-se irreversíveis. Estas alterações conduzem a uma diminuição da retenção do corante vermelho neutro no retículo endoplasmático e lisossomos. Desta forma, é possível distinguir entre as células viáveis, danificadas e mortas.

Discos de papel autoclavados foram embebidos nas amostras de hidrogéis com curcumina, XLEC, XGEC, XGMC e XLMC, assim como o gel XG sem adição de curcumina e uma solução de curcuminóides em 1,2-propanediol. Tais discos, envoltos pelos géis, foram aplicados em placas sobre uma superfície de gel de agarose em contato com células de fibroblastos L929. As substâncias cedíveis tais como os curcuminóides, conservantes ou outras substâncias presentes no gel, poderiam permear a camada de gel de agarose e atingir as células.

A citotoxicidade foi avaliada pela zona de lise, que é observada pela ausência do corante vital vermelho neutro. Como controle negativo, foi usada uma solução salina e como controle positivo uma solução aquosa de DSS (dodecilsulfato de sódio) a 1% (FIGURA 30B). O halo de irritação, causado pela morte das células, foi medido com um paquímetro e confirmado através de avaliação microscópica.

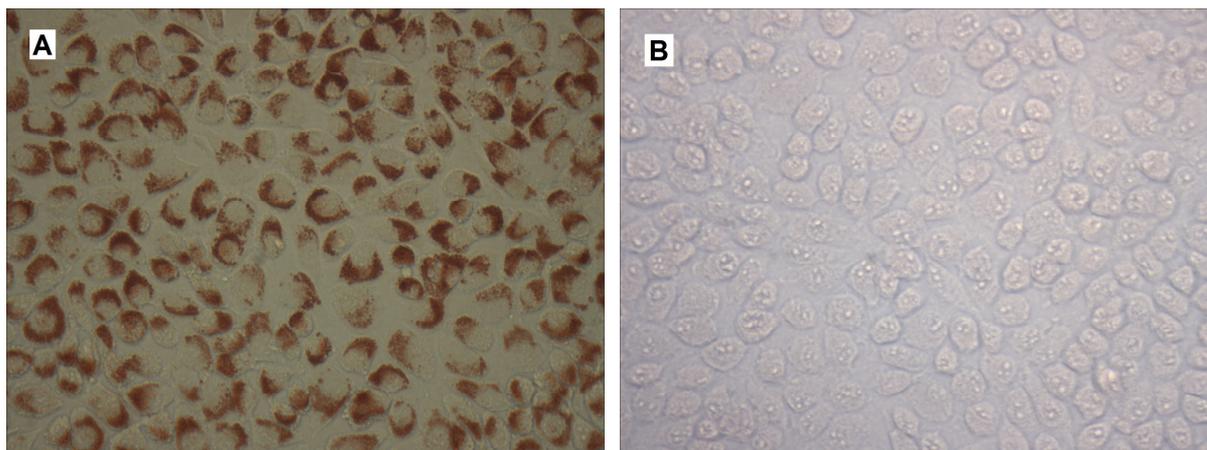


FIGURA 30 - CULTURA DE FIBROBLASTOS CORADOS COM VERMELHO NEUTRO EM ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM AGAROSE

NOTA: (A) Fotomicrografia de fibroblastos preparados para ensaio de citotoxicidade com camada de agarose, (B) Fotomicrografia de fibroblastos em ensaio de citotoxicidade submetidos ao controle positivo DSS. Aumento de 400 ×.

A FIGURA 31 mostra o poço nº 3 com halo de inibição ao redor do disco embebido pelo controle positivo DSS. Os poços nº 1 e 4, que possuem discos embebidos por XGMC, não possuem halo ao redor dos discos. Os poços nº 2 e 5 que possuem discos embebidos por XLMC também não possuem halo ao redor dos discos, assim como o poço nº 6, onde o disco embebido pelo controle negativo não apresentou halo ao redor do disco. O diâmetro médio dos halos de inibição observados no controle positivo foi de $1,17 \pm 0,08$ cm, sendo classificado como grau 4, ou seja, reatividade severa. As amostras dos hidrogéis XGEC e XLEC e a solução de curcuminóides também não apresentaram halo de inibição. Os hidrogéis avaliados foram classificados como tendo nenhuma reatividade.

A ausência de reatividade e os efeitos terapêuticos, que a curcumina exerce pela via transdérmica, foram demonstrados no tratamento de ferimentos e tumores na pele através da administração de curcumina pela via tópica (HUANG *et al.*, 1997; SANTIBÁÑEZ, QUINTANILLA, MARTINEZ, 2000).

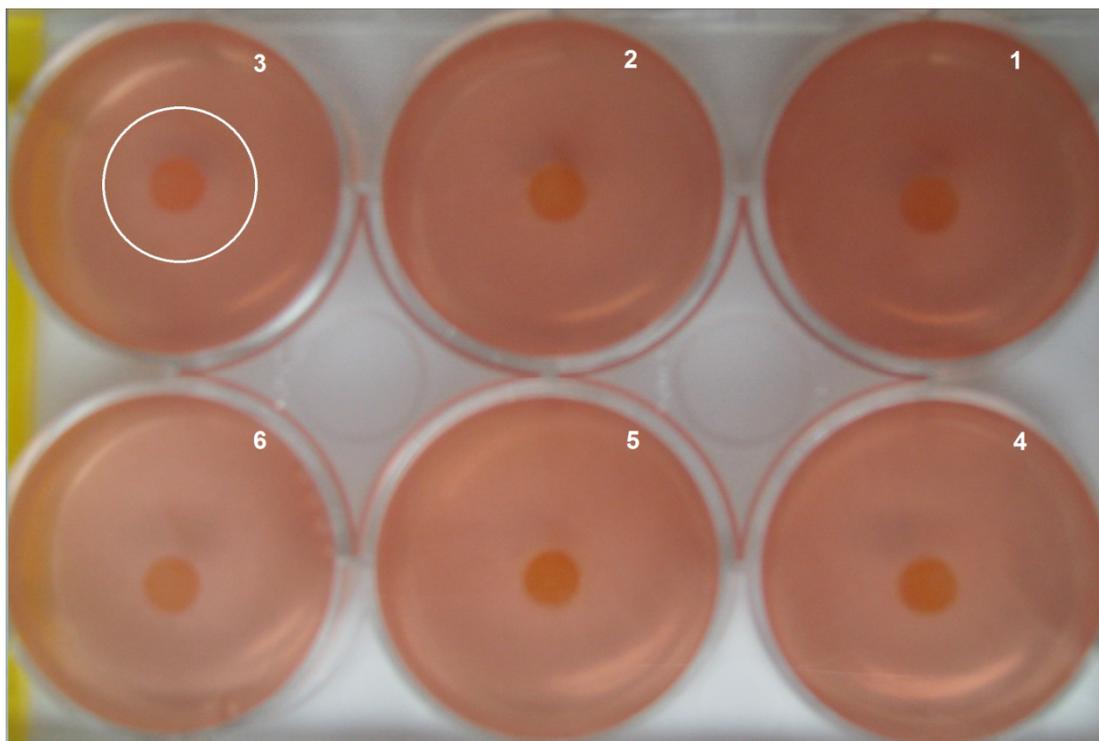


FIGURA 31 – PLACA DE GEL DE AGAROSE CONTENDO AS AMOSTRAS DE HIDROGÉIS XLMC E XGMC E CONTROLE POSITIVO (DSS) E CONTROLE NEGATIVO

NOTA: XGMC (hidrogel xantana e guapuruvu com microemulsão + curcuminóides) – poços 1 e 4; XLMC (hidrogel xantana e alfarroba com microemulsão + curcuminóides) – poços 2 e 5; controle positivo – poço 3; controle negativo – poço 6.

No presente trabalho, investigou-se se o veículo (hidrogéis XG e XL, a microemulsão, e o etanol) apresenta reatividade *in vitro*, visto que a curcumina, além de não reativa, tem efeito anti-inflamatório e sua ação na cicatrização é conhecida (FANG *et al.*, 2003; GOPINATH *et al.*, 2007). Pela avaliação de reatividade, os veículos não agregaram fator irritante, pois o disco embebido na dispersão de curcuminóides em 1,2-propanediol também não apresentou reatividade.

6.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *in vivo*

A substância utilizada como controle positivo na avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*, o óleo de cróton (2,5%, v/v), é altamente irritante e promove um edema (aumento de espessura da orelha) e eritema (vermelhidão) em relação à medida antes do desafio (GAD *et al.*, 1986). Através de testes *in vivo*, é possível

observar a reação do metabolismo cutâneo e da presença da circulação sanguínea, que influenciam o transporte de fármacos até a derme (MOSER *et al.*, 2001). O metabolismo cutâneo e o transporte de fármacos nas células dérmicas não puderam ser observados nos testes de permeação *in vitro*, porém a avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* reforça estes resultados.

O tratamento tópico dos animais com os hidrogéis contendo curcuminóides foi realizado em experimentos de 4 h e 6 h.

Os hidrogéis XLEC e XGEC no experimento de 4 h inibiram parcialmente o edema de orelha provocado pelo óleo de cróton (FIGURA 32A), esta inibição não foi estatisticamente significativa. A inibição do edema se confirmou no experimento de 6 h (FIGURA 32B). A ação inibitória, produzida por estes hidrogéis, foi maior que a do fármaco padrão (dexametasona). O hidrogel XGMC teve um perfil farmacológico semelhante ao da dexametasona. As inibições máximas foram XGEC - 76,8%, XLEC - 83,6%, XGMC - 63,2% e dexametasona - 56,0%. Portanto, os hidrogéis XGEC e XLEC apresentaram uma inibição com diferença significativamente maior que a dexametasona ($p < 0,001$). No estudo de dissolução as constantes de dissolução observadas para estes hidrogéis foram maiores do que os observados para XGMC e XLMC (TABELA 19), o que explica a ação inibitória, em 6 h, da inflamação provocada pelo óleo de cróton. XGMC também apresentou inibição significativamente maior que a dexametasona ($p < 0,01$).

Estes resultados também foram observados por Gopinath e colaboradores (2007), que realizaram análises histológicas para confirmar a ação anti-inflamatória e cicatrizante da curcumina, em ratos tratados com filmes de colágeno com curcumina incorporada. Estes cortes histológicos revelaram aumento da cicatrização das feridas e evidenciaram proliferação celular.

A ausência de ação anti-inflamatória de XLMC, no experimento realizado durante 6 h, pode ser decorrente devido à maior elasticidade do gel XLMC em relação ao XGMC (FIGURA - 28B). Houve uma menor adesividade do gel na orelha do camundongo, prejudicando a liberação da curcumina do veículo para a pele, como consequência teve menor absorção.

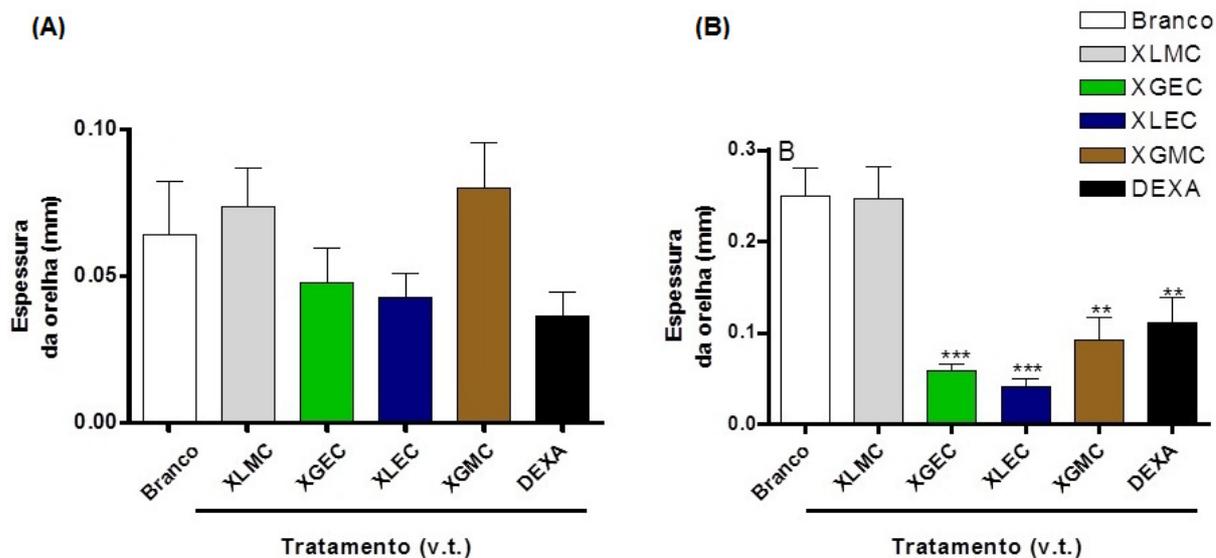


FIGURA 32 – ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS HIDROGÉIS CONTENDO CURCUMINÓIDES TESTADO PELO MÉTODO DE EDEMA DE ORELHA

NOTA: (A) experimento realizado em 4 h; (B) experimento realizado em 6h. Branco - hidrogel XG (sem curcuminóides), XLMC - hidrogel xantana e alfarroba contendo curcuminóides incorporados em microemulsão, XGEC - hidrogel xantana e guapuruvu contendo curcuminóides solubilizados em etanol, XLEC - hidrogel xantana e alfarroba contendo curcuminóides solubilizados em etanol, XGMC - hidrogel xantana e guapuruvu contendo curcuminóides incorporados em microemulsão, DEXA - controle positivo (creme contendo 0,5% de dexametasona). ** - diferença significativa do controle negativo com $p < 0,01$, *** - diferença significativa do controle negativo com $p < 0,001$

CONCLUSÃO

A galactomanana empregada no hidrogel binário foi extraída do endosperma de sementes de guapuruvu (*Schizolobium parahybae*) com rendimento de 9%, o teor de açúcares totais e de proteínas foi de 93,7 e 3,3%, respectivamente. A relação manose:galactose foi de 2,5:1 e, pela análise por HPSEC-MALLS foi determinado dn/dc de 0,113 mL/g e massa molar ponderal média de $7,73 \times 10^5$ g/mol.

Foi obtido um sistema micelar e uma microemulsão, nas quais os curcuminóides foram incorporados numa concentração de 5 mg/mL, confirmada por CLAE, com recuperação de 95 e 99,5%, respectivamente.

A curcumina (fármaco lipofílico) foi incorporada com sucesso em hidrogéis XGMC e XLMC (hidrofílicos), sem a adição de etanol, que é um agente irritante. Desta forma, este hidrogel pode ser aplicado sobre peles sensíveis e irritadas, por exemplo, no tratamento de psoríase e eczemas.

As análises reológicas demonstraram que os hidrogéis de xantana e galactomanana de alfarroba (XL) ou galactomanana de guapuruvu (XG) com incorporação dos curcuminóides (CUR, DMC e BDM) apresentaram característica de gel. A análise de fluência e recuperação permitiu demonstrar que XLSC apresenta viscoelasticidade suficiente para permanecer sobre a pele e manteve-se estável com G' maior que G'' durante o período de ciclos consecutivos de aquecimento e resfriamento.

Os hidrogéis XL, XLEC e XLMC apresentaram um caráter elástico constante e independente da frequência durante o período do teste de estabilidade de 45 dias a 45°C. Os hidrogéis XG, XGEC e XGMC apresentaram diminuição do caráter elástico

ao longo do período do teste de estabilidade. Apesar disso, todos os sistemas mostraram-se estáveis quanto às características organolépticas, o pH e resistência a estresse mecânico. O teor dos curcuminóides totais, determinada por CLAE, foi de 96,89 a 105,41%, o que demonstra que as formulações permanecem estáveis durante o período analisado.

Validou-se uma metodologia analítica por CLAE, no modo isocrático, com linearidade da faixa de 1 – 100 ng/mL. A precisão e exatidão da quantificação dos curcuminóides totais foram adequadas, desta forma, foi possível determinar a recuperação de curcuminóides a partir dos hidrogéis por CLAE. Devido à precisão obtida, também foi possível assegurar os teores de curcuminóides durante análises sucessivas e repetidas.

Desenvolveu-se uma metodologia analítica por UPLC, no modo isocrático, com linearidade da faixa de 0,1- 25,0 g/mL. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,95 e 2,89 ng, respectivamente, e permitiram a determinação das concentrações de curcuminóides presentes na membrana de orelha de porco.

Nos ensaios de permeação *in vitro*, os curcuminóides foram liberados pelos hidrogéis e encontrados nas três primeiras camadas da pele: no estrato córneo, epiderme e derme. Este resultado mostra que os hidrogéis possibilitaram a absorção dos curcuminóides até a camada dérmica da pele.

Os resultados da avaliação farmacológica demonstraram que os hidrogéis XLEC, XGEC e XGMC possuem atividade anti-inflamatória significativamente maior que a apresentada pelo creme com 0,5% de dexametasona.

A avaliação de reatividade dos hidrogéis XG, XLEC, XGEC, XLMC e XGMC, por método *in vitro*, demonstrou que todos os hidrogéis de X e galactomanana de L e G não são reativos e podem ser usados para uso tópico. Esse resultado é importante, uma vez que a liberação dos curcuminóides é lenta, tornando necessário um contato prolongado do veículo com o sítio de aplicação.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, H.M. Dissolution. In: MISCHER, A. (Ed.). Remington: **The Science and Practice of Pharmacy**. 19th ed. Easton: Mack Publishing Company, 1995. v.1. cap.34, p.593-604.
- ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. **Methods of Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 269-276, 1965.
- AIACHE, J.M., New gelification method for vegetable oils. I: Cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 14, p. 228–232, 1992.
- AKAZAWA, M.; ITOH, T.; MASAKI, K.; NGHIEM, B.T.; SUZUKI, N.T.; KONISHI, R.; HIGUCHI, T. An automated method for continuously monitoring diffusion cells in skin penetration studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 50, p. 53–60, 1989.
- AKCELRUD, L. Fundamentos da ciência dos polímeros. In: Propriedades de Soluções Poliméricas. Ed. Manole, São Paulo. p. 221-269, 2007.
- AliceWeb, <http://www.aliceweb2.mdic.gov.br>, acessada em Março, 2012.
- ALSANTE, K. M.; MARTIN, L.; BAERTSCHI, S. W. A stress testing benchmarking study. **Pharmaceutical Technology**, p. 60-72, 2003.
- AMNUAIKIT, C.; IKEUCHI, I.; OGAWARA, K.; HIGAKIA, K.; KIMURA, T. Skin permeation of propranolol from polymeric film containing terpene enhancers for transdermal use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 167-178, 2005.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises, Review. **Molecular Pharmaceutics**, v.4, p.807-818, 2007.
- ANSARI, M.J.; AHMAD, S.; KOHLI, K.; ALI, J.; KHAR, R.K. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, p.132-138, 2005.
- ÁRVORES DO BRASIL. Lista de árvores. www.arvores.brasil.nom.br/florin/quapuruvu.htm. Acessado em 13/06/2011.
- ASAI, A.; MIYAZAWA, T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. **Life Sciences**, v. 67, p. 2785-2793, 2000.
- A-SASUTJARIT, R.; SIRIVAT, A.; VAYUMHASUWAN, P. Viscoelastic Properties of Carbopol 940 Gels and Their Relationships to Piroxicam Diffusion Coefficients in Gel Bases. **Pharmaceutical Research**, v. 22, p. 2134-2140, 2005.

ASBIL, C.S.; MACHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Research Focus**, v.3, p.35-40, 2000.

ASPINALL, G.O.; WHYTE, J.N.C., Polysaccharides of soy-beans. Part I: Galactomannans from the hulls. **Journal of the Chemical Society**, p.5058, 1964.

BAICHWALL, A., NEVILLE, D.A., Culturing innovation and enhancing medications using oral drug delivery. **Drug Delivery Technology**, v.2, p.65-68, 2002.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Stress tests determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology**, p. 01-14, 2000.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Stress degradation studies on Metronidazole and development of a validated Stability-Indicating HPLC assay method. **Pharmaceutical Technology**, p. 148-160, 2003.

BAROLI, B., LOPEZ-QUINTELA, M.A., DELGADO-CHARRO, M.B., FADDA, A. M., BLANCO-M'ENDEZ, J., Microemulsions for topical delivery of 8- methoxsalen. **Journal of Controlled Release** v. 69, p.209-218, 2000.

BARRY, B.W. Dermatological formulation. Percutaneous absorption. **Drug and Pharmaceutical Science**. New York: Marcel Dekker, v. 50, p. 480, 1983.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, p. 101-114, 2001.

BENTO, J.F. **Aspectos taxonômicos de polissacarídeos de endosperma de leguminosas**. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica e Biologia Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BERTH, G.; DAUTZENBERG, H.; BJØRN, E.C.; HARDING, S.E.; ROTHER, G.; SMIDSRØD, O. Static Light Scattering Studies on Xanthan in Aqueous Solutions. **Macromolecules**, v. 29, p. 3491-3498, 1996.

BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A.; LIEB, L.M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharmaceutical Technology**, v. 3, p. 46-54, 1987.

BHATTACHAR, S.N., RYTTING, J.H., ITOH, T., NISHIHATA, T., The effects of compensation with hydrogenated phospholipids on transport of salicylic acid, diclofenac and indomethacin across snake stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v.79, p.263-271, 1992.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and the other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989. p. 27-41.

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G.F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 115-130, 2004.

BONACUCINA, G.; CESPI, M.; MISICI-FALZI, M.; PALMIERI, G.F. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p.129-140, 2006.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Publicado no D.O.U. - **Diário Oficial da União**; 02 de junho de 2003.

BRAUSER, D. Turmeric Cream Decreases Signs of Aging. *Medscape Medical News*. [Online] March 16, 2010. <http://www.medscape.com/viewarticle/718563>.

BRESOLIN, T.M.B.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; GANTER, J.L.M.S. Viscometric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 131-138, 1997.

BRESOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.23, p. 263, 1998.

BRESOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 225-231, 1999.

BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F. Methods for in vitro percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 1255-1258, 1984.

BROWNSEY, G. J., CAIRNS, P., MILES, M. J., MORRIS, V. J. Evidence for intermolecular binding between xanthan and the glucomannan konjac mannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 2329-2334, 1988.

BYRNE, M.E.; PARK, K.; PEPPAS, N.A. Molecular imprinting within hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.149-161, 2002.

CAIRNS, P., MILES, M. J., MORRIS, V. J. Intermolecular binding of xanthan gum and carob gum. **Nature**, v. 322, p. 89-90, 1986.

CALIXTO, J.; ZANINE, J. C.JR.; CRUZ, A.; YUNES, R.A.; MEDEIROS, Y. Extract and compounds obtained from *Mandevilla velutina* inhibit arachidonic acid-induced oedema in mice, but not rat stomach contraction. **Prostaglandins**, v. 41, p. 515-526, 1991.

CHANGEZ, M.; VARSHNEY, M.; CHANDER, J.; DINDA, A.K. Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: *In vitro*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.50 p.18-25, 2006.

CHAUBEY, M.; KAPOOR, V.P. Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. **Carbohydrate Research**, v. 332, p.439, 2001.

CHEN, H.; CHANG, X.; WENG, T.; ZHAO, X.; GAO, Z.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled Release**, v. 98, p. 427-436, 2004.

CHEN, H.; MOU, D.; DU, D.; CHANG, X.; ZHU, D.; LIU, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened microemulsion for topical administration of drug molecule at an extremely low concentration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 78-84, 2007.

CHEN, C.; JOHNSTON, T.D.; JEON, H.; GEDALY, R.; MCHUGH, P.P.; BURKE, T.G.; RANJAN, D. An *in vitro* study of liposomal curcumin: Stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 133-139, 2009.

CHENG, J.; WEIJUN, K.; YUN, L.; JIABO, W.; HAITAO, W.; QINGMIAO, L.; XIAOHE, X. Development and validation of UPLC method for quality control of *Curcuma longa* Linn.: Fast simultaneous quantitation of three curcuminoids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 43-49, 2010.

CHOW, K.T.; CHAN, L.W.; HENG, P.W.S. Formulation of Hydrophilic Non-Aqueous Gel: Drug Stability in Different Solvents and Rheological Behavior of Gel Matrices. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 207-217, 2008.

CHU, B. **Laser light Scattering – Basic principles and practice**. 2 ed. San Diego Academic Press Inc., 1991.

CLARK, A.H.; ROSS-MURPHY, S.B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Advances in Polymer Science**, v. 83 p. 82-142, 1987.

COPETTI, J.; GRASSI, M.; LAPASIN, R.; PRICL, S. Synergistic gelation of xanthan gum with locust bean gum: a rheological investigation. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, p. 951-961, 1997.

COVIELLO T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 5-24, 2007.

CROSS, S.E., PUGH, W.J., HADGRAFT, J., ROBERTS, M.S. Probing the effect of vehicles on topical delivery: understanding the basic relationship between solvent and solute penetration using silicone membranes. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 999-1005, 2001.

CUNHA, P.L.R.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n.3, 2009.

CVEC, G. Lipid vesicles and other colloid as drug carriers on the skin. **Advances Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 675-711, 2004.

DAI, M.; ZHENG, X.; XU, X.; KONG, X.; LI, X.; GUO, G.; LUO, F.; ZHAO, X.; QUANWEI, Y.; QIAN, Z. Chitosan-Alginate Sponge: Preparation and Application in Curcumin Delivery for Dermal Wound Healing in Rat. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. ID 595126, p. 1-8, 2009.

DA LOZZO, E.J.; MOLEDO, R.C.A.; FARACO, C.D.; ORTOLANI-MACHADO, C.F.; BRESOLIN, T.M.B.; SILVEIRA, J.L.M. Curcumin/xanthan-galactomannan hydrogels: Rheological analysis and biocompatibility. **Carbohydrate Polymers**, *in press*, 2012.

DANIELSSON, I., LINDMAN, B., The definition of microemulsion. **Colloids and Surfaces**, v. 3, p. 391-395, 1981.

DEA, I.C.; McKINNON, A.A.; REES, D. A. Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which cell wall cohesion: reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans. **Journal of Molecular Biology**, v. 14, p. 153, 1972.

DEA, I.C.M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, p. 241, 1975.

DRAELOS, Z. D. Dermatology: Cosmetics. *WebMD: eMedicine Specialties*. [Online] April 30, 2009. <http://emedicine.medscape.com/article/1066966-overview>.

DRURY, J.L.; MOONEY, D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v.24, p. 4337-4351, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K., REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars end related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350, 1956.

EKICI, S.; ILGIN, P.; BUTUN, S.; SAHINE, N. Hyaluronic acid hydrogel particles with tunable charges as potential drug delivery devices. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1306-1313, 2011.

EL-KATTAN, A.F.; ASBILL, C.S.; KIM, N.; MICHNIAK, B.B. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 229-240, 2001.

ERNANI, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras**. Colombo, ed. Embrapa-SPI, p. 47 e 475, 1994.

FANG, J.Y.; HUNG, C.F.; CHIU, H.C.; WANG, J.J.; CHAN, T.F. Efficacy and irritancy of enhancers on the in-vitro and in-vivo percutaneous absorption of curcumin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p. 593-601, 2003.

FISCHER, M.; REIMANN, S.; TROVATO, V.; REDGWELL, R.J. Polysaccharides of green arabica and robusta coffee beans. **Carbohydrate Research**, v. 330, p. 93, 2001

FORMARIZ, T.P.; WANCZINSKI, B.J.; JÚNIOR-SILVA, A.A.; SCARPA, M.V.; OLIVEIRA, A.G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 16, p. 44-57, 2004.

FRAIA, R. Cúrcuma – ativo curcumina (açafrão e curry) <http://www.saudecomciencia.com/2009/03/curcuma-no-combate-ao-cancer.html>, 2003. Acesso em: 03/05/2011.

FRANZ, J.T. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, p. 190-195, 1975.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v.10, p. 1-18, 2004.

FU, X.; CHEN, X.; WEN, R.; HE, X.; SHANG, X.; LIAO, Z.; YANG, L. Polyethyleneoctene elastomer/starch blends: miscibility, morphology and mechanical properties. **Journal of Polymer Research**, v. 14, p. 297-304, 2007.

GAD, S.; DUNN, B.; DOBBS, D.; REILLY, C.; WALSH, R. Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 84, p. 93-114, 1986.

GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, p. 13-19, 1995.

GHOSH, P.K.; MURTHY, R.S.R. Microemulsions: A Potential Drug Delivery System. **Current Drug Delivery**, v. 3, p. 167-180, 2006.

GONZÁLEZ, A.; HERRADOR, M.A.; ASUERO, A.G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1999.

GOPINATH, D.; AHMED, M.R.; GOMATHI, K.; CHITRA, K.; SEHGAL, P.K.; JAYAKUMAR, R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. **Biomaterials**, v. 25, p. 1911-1917, 2007.

GOYCOOLEA, F.M.; RICHARDSON, R.K.; MORRIS, E.R.; GIDLEY, M.J. Stoichiometry and conformation of xanthan in synergistic gelation with locust bean gum or konjac glucomannan: evidence for heterotypic binding. **Macromolecules**, v. 28, p. 8308-8320, 1995.

GOYCOOLEA, F.M.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, p. 191-192, 2001.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v.2, p. 147-157, 2007.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HAIGH, J.M.; SMITHEW, E.W. The selection of natural and sthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 311-330, 1994.

HANSON, R. **A Primer on Release-Rate Testing of Semisolids**. Chatsworth, CA, 2010. Dissolution Technologies. www.hansonresearch.com, Acesso em: 14/6/2011

HASKELL, R.J.; SHIFFLETT, J.R.; ELZINGA, P.A. **Particle-sizing technologies for submicron emulsions**. In: S. Benita (ed), Submicron emulsions in drug targeting and delivery, Vol. 9, Harwood academic publishers, Amsterdam, (1998), pp. 21-98.

HE, H.; CAO, X.; LEE, L. J. Design of a novel hydrogel-based intelligent system for controlled drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 391-402, 2004.

HEATH, D.D.; PRUITT, M.A.; BRENNER, D.E.; ROCK, C.L. Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 287-295, 2003.

HENG, M.C.Y. Curcumin targeted signaling pathways: basis for anti-photoaging and anti-carcinogenic therapy. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 608-622, 2010.

HOFFMAN, A.S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 3-12, 2002.

HOU, X.L.; TAKAHASHI, K.; TANAKA, K.; TOUGOU, K.; QIU, F.; KOMATSU, K.; TAKAHASHI, K.; AZUMA, J. Curcuma drugs and curcumin regulate the expression and function of P-gp in Caco-2 cells in completely opposite ways. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 224-229, 2008.

HUANG, M. T.; MA, W.; YEN, P.; XIE, J.G.; HAN, J.; FRENKEL, K.; GRUNBERGER, D.; CONNEY, A. H. Inhibitory effects of topical application of low doses of curcumin on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and oxidized DNA bases in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 83-88, 1997.

INVITOX; ERGATT-FRAME. Agarose Overlay Assay, Protocolo 31, 1990.

ISLAM, M.T.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N.; CIOTTI, S.; ACKERMANN, C. Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH.

Pharmaceutical Research, v. 21, p. 1192-1199, 2004.

JADHAV, B.-K.; MAHADIK, K.-R.; PARADKAR, A.-R. Development and Validation of Improved Reversed Phase-HPLC Method for Simultaneous Determination of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bis-Demethoxycurcumin. **Chromatographia**, v. 65, p. 483-488, 2007.

JAKASA, I.; KEZIC, S. Evaluation of in-vivo animal and in-vitro models for prediction of dermal absorption in man. **Human & Experimental Toxicology**, v. 27, p. 281, 2008.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, M.; SAKARIAH, K. K. Improved HPLC Method for the Determination of Curcumin, Demethoxycurcumin, and Bisdemethoxycurcumin **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3668-3672, 2002.

JEONG, S. I.; KIM, S. H.; KIM, Y. H.; JUNG, Y.; KWON, J. H.; KIM, B. S.; LEE Y. M. **Journal of Biomaterial Sciences and Polymers**, v. 15, p. 645, 2004.

KAPOOR, V.P.A. A galactomannan from the seeds of *Delonix regia*. **Phytochemistry**, v.11, p.1129-1132, 1972.

KHOURYIEH, H. A.; HERALD, T. J.; ARAMOUNI, F.; ALAVI, S. Influence of mixing temperature on xanthan conformation and interaction of xanthan-guar gum in dilute aqueous solutions. **Food Research International**, v. 39, p. 964-973, 2006.

KHOURYIEH, H. A.; HERALD, T.J.; ARAMOUNI, F.; ALAVI, S. Intrinsic viscosity and viscoelastic properties of xanthan/guar mixtures in dilute solutions: Effect of salt concentration on the polymer interactions. **Food Research International**, v. 40, p. 883-893, 2007.

KIM, M.K., CHUNG, S.J., LEE, M.H., CHO, A.R., SHIM, C.K., Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel. **Journal of Controlled Release**, v.40, p.243-251, 1997.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; GRIEND, C.S.; BELD, C.; SOMSEN, G.W.; JONG, G.J. Stress testing of substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, p.48-66, 2005.

KOBORI, T.; MATSUMOTO, A.; SUGIYAMA, S. pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 719-723, 2009.

KÖK, M.S. A comparative study on the compositions of crude and refined locust bean gum: In relation to rheological properties **Carbohydrate Polymers**, v. 70 p. 68-76, 2007.

KOOP, H.S., PRAES, C.E.O.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C.L.O.; SILVEIRA, J.L.M. Rheological Behavior of Gel of Xanthan with Seed Galactomannan: Effect of

Hydroalcoholic-Ascorbic Acid. **Materials Science & Engineering C**, v. 29, p. 559-563, 2009.

KREILGAARD, M., Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. s77–s98, 2002.

KRESZE, G.B. Methods for protein determination. In: BERGMEYER, J.; GRASSL, M. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed., Weinheim: Verlag Chemie. v.III, p.92, 1983.

KUDELA, V. Hydrogels. In: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 7 ed. Wiley, New York, p.783-807, 1987.

KUMAR DAS, R.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 153–160, 2010.

KUNNUMAKKARA, A.B.; ANAND, P.; AGGARWAL, B.B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. **Cancer Letters**, v. 269, p. 199–225, 2008.

LACHENMEIER, D.W. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 3, p. 26-42, 2008.

LAMPE, V.; MILOBEDZKA, J. Studien über Curcumin **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 46, p. 2235-2237, 1913.

LAWRENCE, M.J; REES, D.G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 89-121, 2000.

LI, J.; JIANG, Y.; WEN, J.; FAN, G.; WU, Y.; ZHANG, C. A rapid and simple HPLC method for the determination of curcumin in rat plasma: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study of curcumin liposome. **Biomedical Chromatography**, v. 23, p. 1201-1207, 2009.

LIM, F.; SUN, A.M. Microencapsulated islets as bioartificial pancreas, **Science** v. 210, p. 908-910, 1980.

LIN, C.-C.; LIN, H.-Y.; CHEN, H.-C.; YU, M.-W.; LEE, M.-H. Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. **Food Chemistry**, v. 116, p. 923-928, 2009.

LOPEZ, V.C.; RAGHAVAN, S.L.; SNOWDEN, M.J. Colloidal microgels as transdermal delivery systems. **Reactive & Functional Polymers**, v. 58, p. 175-185, 2004.

LORENZO, C. A.; CONCHEIRO, A. Molecularly imprinted polymers for drugs delivery. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 804, n.1, p. 231-245, 2004.

LOWMAN, L.M.; PEPPAS, N.A. Hydrogels, in: MATHIOWITZ, E. (Ed.). **Encyclopedia of Controlled Drug Delivery**, Wiley, New York, 1999, p. 397-418.

LUCYSZYN, N. **Galactomananas: Novas Fontes do Biopolímero e Aplicações na Indústria Alimentícia**. Curitiba, 1994. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química - Departamento de Tecnologia Química, UFPR.

LUCYSZYN, N.; QUOIRIN, M.; KOEHLER, H.S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa Duchesne*) cv. Pelican micropropagation. **Scientia Horticulturae** v. 107, p. 358–364, 2006.

LUNDIN, L.; HERMANSSON, A.M. Supermolecular aspects of xanthan-locust bean gum gels based on rheology and electron microscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 129-140, 1995.

LYSSANT, Kenneth. Emulsions and Emulsions Technology; **Surfactant Science Series**. v. 6, New York, 1974, cap. 1, 2 e 13.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: “La Raison d’etre” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 121, p. 231-241, 2003.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; SAHA, B.P.; MUKHERJE, P.K. Curcumin–phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 330, p. 155-163, 2007.

MANNION, R.O.; MELIA, C.D.; LAUNAY, B.; CUVELIER, G.; HILL, S.E.; HARDING, S.E.; MITCHELL, J.R. Xanthan/locust bean gum interactions at room temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, p. 91, 1992.

MARKATOU, E.; GIONIS, V.; CHRYSSEIKOS, G. D.; HATZIANTONIOU, S.; GEORGOPOULOS, A.; DEMETZOS, C. Molecular interactions between dimethoxycurcumin and Pamam dendrimer carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 339, p. 231-236, 2007.

MARTI-MESTRES, G.; MESTRES, J.-P.; BRES, J.; MARTIN, S.; RAMOS, J.; VIAN, L. The *in vitro* percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, p. 139-144, 2007.

MARTINI, M.C. **Introducción a la dermofarmacia y la cosmetología**. Editorial Acribia: Zaragoza, 2005.

MASUDA, T, JITOE, A., ISOBE, J., NAKATANI, N., YONEMORI, S. Anti-oxidative and anti-inflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *Curcuma domestica*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1557-1560, 1993.

MAZZARINO, L.; BELLETTINI, I.C.; MINATTI, E., LEMOS-SENNA, E. Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric

nanocapsule suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 219-226, 2010.

McCLEARY, B.V. Enzymic hydrolysis fine structure and gelling interaction of legume seed D-galactose-D-mannans. **Carbohydrate Research**, v. 71, p. 205, 1979.

MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. **Polymer Bulletin**, v.14, p. 157-164, 1985.

MILAS, M.; RINAUDO, M. Properties of Xanthan gum in aqueous solutions: Role of the conformational transition. **Carbohydrate Research**, v. 158, p. 191-204, 1986.

MILLANE, R. P.; WANG, B. A cellulose-like conformation accessible to the xanthan backbone and implications for xanthan synergism. **Carbohydrate Polymers**, v. 13, p. 57-68, 1990.

MÖCKEL, J.E., LIPPOLD, B.C. Zero-order release from hydrocolloid matrices. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 1066-1070, 1993

MONTAGNER, D.; CORRÊA, G. M. Avaliação da estabilidade de cremes com uréia em diferentes pHs. **Revista Brasileira Farmacêutica**, v. 85, n. 3, p. 69-72, 2004.

MORAES, G. G., **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 181 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 489-501, 2001.

MORRIS, E. R. Bacterial Polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995.p. 517-546.

MORRIS, E. R., REES; D. A.; YOUNG, G.; WALKINSHAW, M. D.; DARKE, A. Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between Xanthomonas pathogen and its plant host. **Journal of Molecular Biology**, v. 110, p. 1-16, 1977.

MORRIS, E. R.; REES; D. A.; ROBINSON, G.; YOUNG, G. Competitive inhibition of interchain interactions in polysaccharide systems. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 363, 1980.

MORTAZAWI, S.A. An *in vitro* assessment of mucus/mucoadhesive interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, p. 173-182, 1995.

MOSER, K.; KRIWET, K.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, p. 103-112, 2001.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NISHINARI, K.; TAKAHASHI, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, p. 396, 2003.

NORMAND, V.; RAVEY, J.-C. Dynamic study of gelatin gels by creep measurements. **Rheologica Acta**, v. 36, p. 610-617, 1997.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.

PAI, V.; SRINIVASARAO, M.; KHAN, S.A. Evolution of Microstructure and Rheology in Mixed Polysaccharide Systems. **Macromolecules**, v. 35, p. 1699-1707, 2002.

PAK, Y.; PATEK, R.; MAYERSOHN, M. Sensitive and rapid isocratic liquid chromatography method for the quantitation of curcumin in plasma. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 796, p. 339-346, 2003.

PAN, M.-H.; HUANG, T.-M.; LIN, J.-K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, p. 486-494, 1998.

PAOLINO, D., VENTURA, C.A., NISTICÒ, S., PUGLISI, G., FRESTA, M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous absorption through human skin and *in vivo* human skin tolerability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, p. 21-31, 2002.

PARADOSSI, G.; BRANT, D.A. Light Scattering Study of a Series of Xanthan Fractions in Aqueous Solution. **Macromolecules**, v. 15, p. 874-879, 1982.

PARK, K. **Controlled Drug Delivery: Challenges and Strategies**. ACS, Washington, D.C, 1997.

PARK, J.B.; LAKES, R.S. **Biomaterials: an introduction**, 2nd ed. New York: Plenum Press; 1992.

PASTRANA, Y. de la C.; RIVERA, A.B.; ENRIQUE, T.E.; CARABALLO, I. Pharmacokinetic characterization of oral sustained release formulations: factors that influence pharmacokinetic profiles. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, p. 25-34, 2000.

PATEL, N.A.; PATEL, N.J.; PATEL, R.P. Design and Evaluation of Transdermal Drug Delivery System for Curcumin as an Anti-Inflammatory Drug. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, p. 234-242, 2009.

PEPPAS, N.A. **Hydrogels in Medicine and Pharmacy**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.

PEPPAS, N.A.; COLOMBO, P. Analysis of drug release behavior from swellable polymer carriers, **Journal of Controlled Release**, v. 45, p. 35-40, 1997.

PETKOWICZ, C.L.O.; SIERAKOWSKI, M.R.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpiniaceae. **Phytochemistry**, v. 49, p. 737-743, 1998.

PICOUT, D.R.; ROSS-MURPHY, S.B. On the Mark–Houwink parameters for galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 145-148, 2007.

PLIANBANGCHANG, P.; TUNGPRADIT, W.; TIYABOONCHAI, W. Efficacy and Safety of Curcuminoids Loaded Solid Lipid Nanoparticles Facial Cream as an Anti-Aging Agent. **Naresuan University Journal**, v. 15, n. 2, 2007.

POLLARD, M.A.; EDER, B.; FISCHER, P.; WINDHAB, E.J. Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of Caesalpinoideae and Faboideae sibfamilies by multidetection aqueous SEC. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 70-84, 2010.

POLLARD, M.A.; KELLY, R.; FISCHER, P.; WINDHAB, E.J. EDER, B.; AMADÓ, R. Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomanna. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 683-692, 2007.

PRATT, D.E. **Natural anti-oxidants from plant material**. In: Phenolic compounds and their effects on Health II, ACS symposium series 547, p. 54-71. American Chemical Society, Washington, DC, 1994.

PRICE, L.C.; BUESCHER, R.W. Kinetics of Alkaline Degradation of the Food Pigments Curcumin and Curcuminoids. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 267-269, 1997.

PROENÇA, K.S.; ROMA, R.M.; OLIVEIRA, R.V.M.; GONÇALVES, M.M.; VILA, M.M.D.C. Avaliação da estabilidade de cremes empregando diferentes agentes de consistência. **Revista Brasileira Farmacêutica**, v. 87, p. 74-77, 2006.

PROVENCHER, S.W. **Makromolekulare Chemie**, v. 180, p. 201-209, 1979.

PROVENCHER, S.W. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. **Computer Physics Communications**, v. 27, p. 213-227, 1982.

RAYMENT, P.; ROSS-MURPHY, S.B.; ELLIS, P.R. Rheological properties of guar galactomannan and rice starch mixtures II. Creep measurements. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 55-63, 1998.

REICHER, F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; FONTANA, J.D.; CORREA, J.B.C. Properties of the Seed Gum of *Stryphnodendron barbatirnan* (barbatimão). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24/25, p. 342-357, 1992.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. C.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RICHTER, S.; BRAND, T.; BERGER, S. Comparative Monitoring of the Gelation Process of a Thermoreversible Gelling System Made of Xanthan Gum and Locust Bean Gum by Dynamic Light Scattering and ^1H NMR Spectroscopy. **Makromolekulare Chemie, Rapid Communication**, v. 26, p. 548-553, 2005.

RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 433-440, 2001.

RIZZINI, C.T. **Árvores e Madeiras Úteis do Brasil**. São Paulo: Edgar Blucher, 1987. p. 133-134.

ROBINSON, M. K.; CRUZE, C. A. Preclinical skin sensitization testing of antihistamines: guinea pig and local lymph node assay responses. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 495-506, 1996.

ROCKS, J.K. Xanthan gum. **Food Technology**, v. 25, 1971.

RODD, A.B.; DUNSTAN, D.E.; BOGER, D.V. Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 159-174, 2000.

ROSS-MURPHY, S.B.; MORRIS, V.J.; MORRIS, E.R. Molecular viscoelasticity of xanthan polysaccharide. **Faraday Symposia of the Chemical Society**, v. 18, p. 115-129, 1983.

ROSS-MURPHY, S.B.; McEVOY, H. Fundamentals of hydrogels and gelation. **British Polymer Journal**, v. 18, p. 2-7, 1986.

SAINT RUTH, H.; ATTWOOD, D.; KTISTIS, G.; TAYLOR, C.J. Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, p. 253-261, 1995.

SALVALAGGIO, M. de O. **Galactomananas de sementes de espécies brasileiras: Otimização da extração, caracterização físico-química e por espalhamento de luz**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica e Biologia Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SANDOLO, C.; COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; ALHAIQUE, F. Characterization of polysaccharide hydrogels for modified drug delivery. **European Biophysics Journal**, v. 36, p. 693-700, 2007.

SANDOLO, C.; BULONE, D.; MANGIONE, M.R.; MARGHERITELLI, S.; MEO, C.D.; ALHAIQUE, F.; MATRICARDI, P.; COVIELLO, T. Synergistic interaction of Locust Bean Gum and Xanthan investigated by rheology and light scattering. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 733-741, 2010.

SANDUR, S.K.; ICHIKAWA, H.; PANDEY, M.K.; KUNNUMAKKARA, A.B.; SUNG, B.; SETHI, G.; AGGARWAL, B.B. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 568-580, 2007.

SANTIBÁÑEZ, J. F.; QUINTANILLA, M.; MARTINEZ, J. Genistein and curcumin block TGF- β_1 -induced u-PA expression and migratory and invasive phenotype in mouse epidermal keratinocytes. **Nutrition and Cancer**, v. 37, p. 49-54, 2000.

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H.R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GOEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S.A.M.; LARESE, F.; MONTOMOLI, L.; PERKINS, J.; SCHMELZ, M.; VAN de SANDT, J.; WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 133-152, 2000.

SATO, T.; NORISUYE, T.; FUJITA, H. Double-stranded helix of xanthan: dimensional and hydrodynamic properties in 0.1 M aqueous sodium chloride. **Macromolecules**, v. 17, p. 2696-2700, 1984.

SCHRAMM, G. Medidas do comportamento elástico de fluidos viscoelásticos, in: Reologia e reometria - Fundamentos teóricos e práticos, São Paulo, Artliber, 2006, pp. 115-180.

SCIARINI, L.S.; MALDONADO, F.; RIBOTTA, P.D.; PÉREZ, G.T.; LEÓN, A.E. Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 306-313, 2009.

SECOUARD, S.; GRISEL, M.; MALHIAC, C. Flavour release study as a way to explain xanthan-galactomannan interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p.1237-1244, 2007.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.S.; WILLIAMS, R.L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs from topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, p. 377-385, 1998.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J. STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1955-1968, 2005.

SHIM, J.; KANG, H.S.; PARK, W.; HAN, S.; KIM, J.; CHANG, I. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-84, 2004.

SHOKRI, J.; NOKHODCHI, A.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; JALALI, M. B. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, p. 99-107, 2001.

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

SIERAKOWSKI, M.R.; MILAS, M.; DESBRIÉRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 51-57, 2000.

SILVEIRA, J.L.M.; BRESOLIN, T.M.B. Pharmaceutical use of galactomannans **Química Nova**, v. 34, p. 292-299, 2011.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M.P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 339-350, 2005.

SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 20-24, 1972.

SMITH, I.H.; SYMES, K.C.; LAWSON, C.J.; MORRIS, E.R. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 3, p. 129-134, 1981.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, 2^a ed. New York: Wiley, 1997, p. 765.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsion: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 145-149, 2004.

SOU, K.; INENAGA, S.; TAKEOKA S.; TSUCHIDA, E. Loading of curcumin into macrophages using lipid-based nanoparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 287-293, 2008.

SOUZA, C.F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F.A.; SIERAKOWSKI, M.R. Oxidação e N-alquilação de galactomanana de sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *férrea*. Anais do 10^o Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR–Outubro/2009.

STANKOWSKI, J.D.; MUELLER, B.E.; ZELLER, S.G. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydrate Research**, v. 241, p. 321, 1993.

STOKKE, B.T.; ELSGAETER, A.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. The molecular size and shape of xanthan, xylinan, bronchial mucin, alginate, and amylose as revealed by electron microscopy. **Carbohydrate Research**, v. 160, p. 13-28, 1987.

SUMIYOSHI, M.; KIMURA, Y. Effects of a turmeric extract (*Curcuma longa*) on chronic ultraviolet B irradiation-induced skin damage in melanin-possessing hairless mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1137-1143, 2009.

SUWANTONG, O.; OPANASOPIT, P.; RUKTANONCHAI, U.; SUPAPHOL, P. Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance. **Polymer**, v. 48, p. 7546-7557, 2007.

TAKEO, M. **Disperse systems**. Willey-VCH: New York, 1999.

TAKO, M. Synergistic interaction between deacetylated xanthan and galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 10, p. 619, 1991.

TAMBURIC, S.; CRAIG, D.Q.M. The effects of ageing on the rheological, dielectric and mucoadhesive properties of poly(acrylic acid) gel systems. **Pharmaceutical Science**, v. 1, p. 107-109, 1995.

TAMURA, H. FURUIKE, T.; NAIR, S.V.; JAYAKUMA, R. Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 820-824, 2011.

TEICHMANN, A.; HEUSCHKEL, S.; JACOBI, U.; PRESSE, G.; NEUBERT, R.H.H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 699-706, 2007.

TINLAND, B.; MAZET, J.; RINAUDO, M. Characterization of water-soluble polymers by multidetection size-exclusion chromatography. **Makromolekular Chemie**, v. 9, p. 69-73, 1988.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 203-208, 2001.

TU, C-X.; LIN, M.; LU, S.-S.; QI, X.-Y.; ZHANG, R.-X.; ZHAN, Y.-Y. Curcumin Inhibits Melanogenesis in Human Melanocytes. **Phytotherapy Research**, v. 25, 2011.

UGHINI, F., ANDREAZZA, F.I., GANTER, J.L.M.S., BRESOLIN, T.M.B. Evaluation of xanthan and highly substituted galactomannan from *M. scabrella* as a sustained release matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, p. 197-205, 2004.

USP 29, Biological Reactivity tests, *in vitro*, v. 87, p. 2525, 2006.

VENDRUSCOLO, C.W.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 1-11, 2005.

VENDRUSCOLO, C.W.; FERRERO, C.; PINEDA, E.A.G.; SILVEIRA, J.L.M.; FREITAS, R.A.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, M.R.; BRESOLIN, T.M.B. Physico chemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: Effect of drying method. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 86-93, 2009.

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, G. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, p. 141-151, 2003.

VIANNA FILHO, R.P. **Aplicação de polissacarídeos em emulsão cosmética: Análises reológicas**, 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

VIEIRA, Í.G.P.; MENDES F.N.P.; GALLÃO, M.I.B.; BRITO, E.S. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC) **Food Chemistry** v. 101, p. 70-7, 2007.

VISWANATH, G.; JITHAN, A.; REDDY, V.M. Development of New Delivery Strategies to Increase Bioavailability of Curcumin. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 1, p. 335-340, 2009.

WANG, Y.-J.; PAN, M.-H.; CHENG, A.-L.; LIN, L.-I.; HO, Y.-S.; HSIEH, C.-Y.; LIN, J.-K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 1867-1876, 1997.

WANG, Q.; ELLIS, P.R.; ROSS-MURPHY, S.B. The stability of guar gum in an aqueous system under acidic conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 129, 2000.

WESTER, R.C., MAIBACH, H.I. Understanding percutaneous absorption for occupational health and safety. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 6, p. 86-92, 2000.

WICHTERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. **Nature**, v. 185, p. 117-118, 1960.

WILLIAMS, A.C., BARRY, B.W. Skin Absorption Enhancers. **Critical reviews in therapeutic drug carriers systems**, v. 9, p. 305-353, 1992.

WOLFROM, M.L., THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods of Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M.L., THOMPSON, A. Acetylation. **Methods of Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WU, J.; LIANG, S.; DAI, H.; ZHANG, X.; YU, X.; CAI, Y.; ZHANG, L.; WEN, N.; JIANG, B.; XU, J. Structure and properties of cellulose/chitin blended hydrogel membranes fabricated via a solution pre-gelation technique. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 677-680, 2010.

YALLAPU, M.M.; MOHAN, M.; GUPTA, M.J.; CHAUHAN, S.C. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, p. 19-25, 2010.

YANG, S.; LEONG, K.-F.; DU, Z.; CHUA, C.-K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Engineering**, v. 7; p. 679-689, 2001.

YANG, C. H.; HUANG, K. S.; LIN, Y. C. Using a cross-flow microfluidic chip and external crosslinking reaction for monodisperse TPP-chitosan microparticle. **Sensors and actuators B: Chemical**, v. 124, p. 510-516, 2007.

YANNA, I.V.; LEE, E.; ORGILL, D.P. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 86, p. 933-937, 1989.

YOKOMIZO, Y., Effect of phosphatidylcholine on the percutaneous penetration of drugs through the dorsal skin of guinea pigs in vitro and analysis of the molecular mechanism using ATR-FTIR spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 42, p. 249-262, 1996.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A.C. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, p. 47-58, 2001.

ZANINI JR., J.C.; MEDEIROS, Y.S.; CRUZ, A.B.; YUNEST, R.R.A.; CALIXTO, J.B. Action of Compounds from *Mandevilla velutina* on Croton Oil-induced Ear Oedema in Mice. A Comparative Study with Steroidal and Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs **Phytotherapy Research**, v. 6, p. 1-5, 1992.

ZAWADZKI-BAGGIO, S. F. **Arabinana e Galactomanana de *Schizolobium parahybum*; Estudo de Biossíntese de Galactomananas**. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.