



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

RAYANNE MAIRA FELIX RIBEIRO ALVES

**PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE CARVACROL
VISANDO OBTENÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO *IN SITU***

**JOÃO PESSOA
2016**

RAYANNE MAIRA FELIX RIBEIRO ALVES

**PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE CARVACROL
VISANDO OBTENÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO *IN SITU***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada
ao Curso de Bacharelado em Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira.

**JOÃO PESSOA
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A474p Alves, Rayanne Maira Felix Ribeiro
Preparação de hidrogéis contendo nanocápsulas de carvacrol visando obtenção de Sistemas de Liberação In Situ. [manuscrito] / Rayanne Maira Felix Ribeiro Alves. - 2016.
60 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Nanocápsulas. 2. Carvacrol. 3. Hidrogéis. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

RAYANNE MAIRA FELIX RIBEIRO ALVES

PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE
CARVACROL VISANDO OBTENÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO *IN SITU*

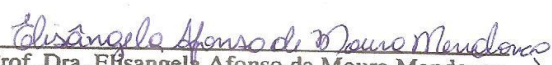
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

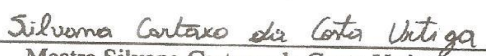
Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 20/05/2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dra. Elisângela Afonso de Moura Mendonça
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)


Mestre Silvana Cartaxo da Costa Urtiga
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

À minha mãe Lilian Alves, pela dedicação,
companheirismo e amizade, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A priori agradeço ao meu Pai Celestial por ter-me dado bons pais, os quais me ensinaram além dos valores morais, a importância do estudo e de perseverar em meus objetivos, também estendo este agradecimento aos meus familiares pelo imprescindível apoio.

A todos os professores da UEPB por terem ensinado tão bem suas respectivas disciplinas, também agradeço pela dedicação de cada um.

Ao meu orientador pelo conhecimento a qual me passou, assim como pelas professora doutora Elisângela Mendonça e mestre Silvana Urtiga.

Aos alunos do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas.

Sou grata a cada um que aqui foi mencionado, por meio dos senhores dou mais um passo nesta jornada profissional a qual tenho tanto apreço, mais uma vez, obrigada.

“O conhecimento afasta as trevas, o suspense, e a dúvida, porque essas coisas não podem existir onde houver conhecimento.” *Joseph Smith.*

RESUMO

Novas alternativas terapêuticas para melhorar a atividade biológica e diminuir os possíveis efeitos adversos de moléculas bioativas têm sido desenvolvidas. O uso de sistemas nanoparticulados como carreadores de fármacos é estratégico para se alcançar a acumulação seletiva no alvo biológico, visto que eles alteram a farmacocinética e biodistribuição da molécula encapsulada. A incorporação desse sistema em hidrogéis termorresponsivos vem ganhando interesse da comunidade científica uma vez que possibilita uma liberação seletiva *in situ* do fármaco, tendo em vista isto, neste trabalho hidrogéis com carvacrol inserido em nanocápsulas foram preparados para obtenção de um sistema de liberação *in situ*. As nanocápsulas foram formuladas pelo método de nanoprecipitação de polímeros pré-formados. Diferentes concentrações de Poloxamer 407 (10%, 20% e 30%) foram utilizadas para formular os hidrogéis, estes foram avaliados quanto às características de termossensibilidade, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta; análises microscópicas e macroscópicas também foram realizadas. O tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta também foi visto para hidrogéis formulados com 20% de Poloxamer 407 com nanocápsulas de carvacrol e sem nanocápsulas de carvacrol. Análise de pH, ensaio de toxicidade frente *Artemia salina* Leach e testes em camundongos foram realizados com hidrogéis de 20% da concentração do copolímero. Os resultados obtidos das análises macroscópicas mostraram que todas as formulações durante o decorrer do tempo eram incolores, sem odor e não foi visto presença de precipitado tanto macroscopicamente quanto microscopicamente; quanto aos resultados do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta de hidrogéis com 10%, 20% e 30% do copolímero foi visto que os hidrogéis com 20% apresentaram um sistema mais estável, sendo portanto, a concentração escolhida para inserção das nanocápsulas de carvacrol. A presença de nanocápsulas de carvacrol nos hidrogéis não alteraram sua propriedade termorreversível; as análises de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta mostraram que o sistema hidrogel com nanocápsulas de carvacrol apresenta estabilidade e boa homogeneidade. Quanto ao pH os valores alternaram com o decorrer do tempo, entretanto todos apresentaram pH de aproximadamente 7. O ensaio de toxicidade em *Artemia salina* mostrou que hidrogel com nanocápsulas de carvacrol apresentam toxicidade moderada. Os testes em camundongos demonstraram que nanopartículas com carvacrol apresentam liberação prolongada do fármaco, proporcionando efeito terapêutico por maior tempo, em contrapartida, hidrogéis com nanopartículas de carvacrol não obtiveram os resultados esperados. Este trabalho mostrou que hidrogéis termossensíveis podem ser utilizados para incorporar nanocápsulas de carvacrol vislumbrando um novo sistema de liberação *in situ* de fármacos.

Palavras- Chave: Nanocápsulas. Carvacrol. Hidrogéis. Poloxamer 407.

ABSTRACT

New therapies to improve the biological activity and decrease the possible adverse effects of bioactive molecules have been developed. The use of nanoparticulate systems as carriers of drugs is strategic to achieve selective accumulation in target biological since they alter the pharmacokinetics and biodistribution of the encapsulated molecule. The incorporation of this system in thermoresponsive hydrogels has gained interest in the scientific community since it enables a selective release *in situ* of the drug, given that, in this work hydrogels with carvacrol inserted into nanocapsules were prepared for obtaining a delivery system *in situ*. The nanocapsules were made by nanoprecipitation method of preformed polymers. Different concentrations of Poloxamer 407 (10%, 20% and 30%) were used to formulate hydrogels, they were evaluated as to characteristics of thermosensitivity, particle size, polydispersity and zeta potential; microscopic and macroscopic analyzes were also performed. The particle size, polydispersity and zeta potential were also seen for hydrogels formulated with 20% Poloxamer 407 with carvacrol nanocapsules and nanocapsules without carvacrol. pH analysis, toxicity test front *Artemia salina* Leach and tests in mice were performed with hydrogel copolymer of 20% concentration. The results of the macroscopic analysis showed that for all formulations over time were colorless, odorless and was not seen presence of precipitate both macroscopically and microscopically; on the results of particle size, polydispersity and zeta potential of hydrogels with 10%, 20% and 30% of the copolymer it has been seen that hydrogels with 20% showed a more stable system, and therefore was the concentration chosen for insertion of the nanocapsules carvacrol. The presence of carvacrol nanocapsules in hydrogels did not change its thermoreversible property; the analysis of particle size, polydispersity and zeta potential showed that the system hydrogel with carvacrol nanocapsules has good stability and homogeneity. Regarding pH the values alternated over time, though all had pH of approximately 7. The toxicity test showed that in *Artemia salina* hydrogel with carvacrol nanocapsules has moderate toxicity. Tests on mice have shown that carvacrol nanoparticles have prolonged drug release, providing therapeutic effect for a longer time, however, hydrogels with carvacrol nanoparticles have not obtained the desired results. This work showed that thermosensitive hydrogels may be used to incorporate carvacrol nanocapsules envisioning a new delivery system *in situ* drugs.

Keywords: Nanocapsules. Carvacrol. Hydrogels. Poloxamer 407.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura molecular do carvacrol	17
Figura 2: Concentração do fármaco no sítio terapêutico após a sua liberação em: A) controlada e B) convencional	17
Figura 3: Hidrogéis respondem a estímulos físicos e químicos	22
Figura 4: Hidrogéis obtidos por reticulação química e física	23
Figura 5: Representação da estrutura do hidrogel	24
Figura 6: Sistema de liberação controlada por difusão	25
Figura 7: Estrutura química do Pluronic F-127 (a letra a refere-se a porção composta por óxido de etileno e a letra b ao óxido de propileno)	26
Figura 8: Formação de micelas e unímeros sobre respectivamente o aumento e diminuição de temperatura do Pluronic	27
Figura 9: Representação da estrutura do hidrogel	28
Figura 10: Efeito Tyndall visualizado com o hidrogel com 4% de nanocápsulas de carvacrol	35
Figura 11: Hidrogel com 20% da concentração de Poloxamer 407 no estado intumescido	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de polímeros inteligentes que respondem a estímulos físicos e químicos	21
Tabela 2: Valores dos tamanhos de partícula, polidispersão e potencial zeta de hidrogéis com 10%, 20% e 30% da concentração de Poloxamer 407	37
Tabela 3: Valores dos tamanhos de partícula, polidispersão e potencial zeta dos hidrogéis sem nanocápsulas de carvacrol e com nanocápsulas de carvacrol	37
Tabela 4: Valores de pH em decorrer do tempo do hidrogel com 20% de Poloxamer 407 sem nanocápsulas de carvacrol	39
Tabela 5: Valores da Concentração Letal Média	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Resposta fisiológica dos camundongos de acordo com a intensidade do estímulo e ação dos sistemas testados	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CL50 Concentração Letal Média

HB Hidrogel sem nanocápsulas de carvacrol

HC4% Hidrogel com 4% de nanocápsulas de carvacrol

L Litros

µg Micrograma

mL Mililitros

nm Nanômetros

PdI Polidispersão

pH Potencial Hidrogeniônico

% Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Carvacrol	16
2.2 Sistemas de Liberação Controlada.....	17
2.3 Polímeros	18
2.4 Polímeros Inteligentes	19
2.5 Hidrogel	21
2.6 Poloxamer 407	25
2.7 Nanocápsulas	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. METODOLOGIA	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE – GRÁFICOS DE DISPERSÃO	58

1. INTRODUÇÃO

O carvacrol é um monoterpênico fenólico, o qual tem como nomenclatura 5-isopropil-2-metilfenol, que pode ser extraído de algumas plantas aromáticas como *Origanum dictamnus* conhecido popularmente como orégano. Este monoterpeno apresenta um amplo espectro de ação, sendo utilizado como vasorelaxante, antifúngico, antioxidante, antibacteriano (SUNTRES et al., 2014), anti-inflamatório (GUIMARÃES et al., 2012), e antitumoral (NOSTRO et al., 2007), dessa forma, este vem sendo aplicado na área farmacológica todavia, o carvacrol é pouco solúvel e requer materiais poliméricos para que sua ação seja eficaz (SUNTRES et al., 2014), dentre estes materiais poliméricos estão as nanopartículas e hidrogéis.

As nanopartículas são carreadores coloidais com tamanho variando entre 10 a 1000nm (RIEUX et al., 2006) as quais tem sido amplamente estudadas como carreadores de fármacos devido a capacidade de controlar a liberação, aumentar a solubilidade do fármaco e reduzir sua toxicidade (POLETTTO et al., 2008). Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais reticuladas que se tornam intumescidas quando entram em contato com soluções aquosas (LIN & METTERS, 2006; PEPPAS et al., 2000), eles podem ser formados por polímeros naturais como por exemplo o ácido hialurônico, ou por polímeros sintéticos, como o Poloxamer 407, o qual foi utilizado neste trabalho.

Hidrogéis têm sido utilizados para a liberação de fármacos devido a sua biocompatibilidade (X QU et al., 2000; HOARE & KOHANE, 2008) e sua propriedade de intumescimento (BAJPAI et al., 2008) já que podem intumescer sob condições fisiológicas (KLOUDA & MIKOS, 2008), além disso, são facilmente modificados e podem ser injetados (SINGH et al., 2010), entretanto devido ao tamanho de seus poros a maioria dos hidrogéis liberam o fármaco de forma relativamente rápida, dentro de um período de poucas horas a poucos dias (HOARE & KOHANE, 2008), alguns métodos tem sido utilizados para melhorar as interações entre os medicamentos e rede do hidrogel entre eles há a introdução de nanopartículas para evitar liberação brusca (HU & GONG, 2016).

A incorporação das nanocápsulas ao hidrogel, além de proteger o fármaco, evitando sua rápida degradação, também protege o paciente de uma possível toxicidade do medicamento; além disso, a utilização desses dois sistemas em conjunto promoverá a liberação do fármaco de forma mais lenta e gradual, desse modo, este trabalho teve como objetivo formular hidrogéis contendo carvacrol inserido em nanocápsulas, visando obtenção de sistemas de liberação *in situ*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um monoterpênico fenólico presente no óleo essencial da família *Lamiaceae* (LIMA et al., 2013), como o *Origanum dictamnus* por exemplo, conhecido vulgarmente como orégano. Este monoterpeno tem sido amplamente utilizado como aditivo alimentar na indústria alimentícia por longo tempo, entretanto, recentemente suas múltiplas funções foram bem estudadas em diferentes campos (YU et al., 2012).

Pesquisas apontam que o carvacrol apresenta propriedades que são de grande interesse na indústria farmacêutica, pois pode ser utilizado como anti-inflamatório (ARIGESAVAN & SUDHANDIRAN, 2015; LIMA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2012) antioxidante (ARIGESAVAN & SUDHANDIRAN, 2015) vasorelaxante (PEIXOTO-NEVES et al., 2009), antifúngico, (SUNTRES et al., 2014), anti-tumoral (ZEYTINOGLU et al., 2003; NOSTRO et al., 2007) anti-leishmaniose e também apresenta atividade antimicrobiana, onde esta tem sido sujeita a várias investigações *in vitro* e *in vivo* (NOSTRO et al., 2007).

O carvacrol, também conhecido como iso-timol (VINCENZI et al., 2004) possui fórmula molecular $C_6H_{14}O$ (Figura 1) e 150.22g/mol de peso molecular (ALMEIDA, 2015; SIGMA ALDRICH, 2016), quanto as suas propriedades físico-químicas, apresenta aspecto cor amarelo escuro; seu ponto de fusão está entre 3 a 4°C e o ponto de ebulição, 236 – 237°C (SIGMA ALDRICH, 2016), além disso é pouco solúvel em água, apresenta solubilidade de 0,04% (MENDES, 2012; CARVALHO et al., 2003).

Embora o carvacrol apresente estas propriedades importantes, as quais foram mencionadas acima, este é conhecido por ser tóxico quando utilizado em altas concentrações em células de mamíferos (BIMCZOCK et al., 2008) e por ser um composto volátil, o qual se evapora facilmente e/ou se decompõe durante a produção de alimentos e formulações de fármacos e cosméticos devido a exposição de luz ou oxigênio, dessa forma o seu encapsulamento é uma forma de prolongar sua vida útil e manter suas propriedades funcionais (KEAWCHAOON & YOKSAN, 2011) além de reduzir sua toxicidade (SUNTRES et al., 2014).

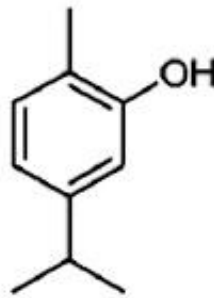


Figura 1: Estrutura molecular do carvacrol (MENDES, 2012).

2.2 Sistemas de Liberação Controlada

Medicamentos convencionais apresentam rápida liberação após sua administração sendo necessário frequentes repetições das dosagens para obter o efeito terapêutico desejado. Se os intervalos de tempo da administração forem excessivamente curtos, cada concentração máxima é mais elevada que a anterior e poderá ultrapassar o efeito terapêutico e atingir um nível tóxico (CARONI, 2009), levando a reações adversas (KIM et al., 2009), ao contrário, se as doses individuais forem excessivamente espaçadas, as concentrações mínimas são insuficientes para conseguir manter o nível terapêutico aceitável (CARONI, 2009) (Figura 2).

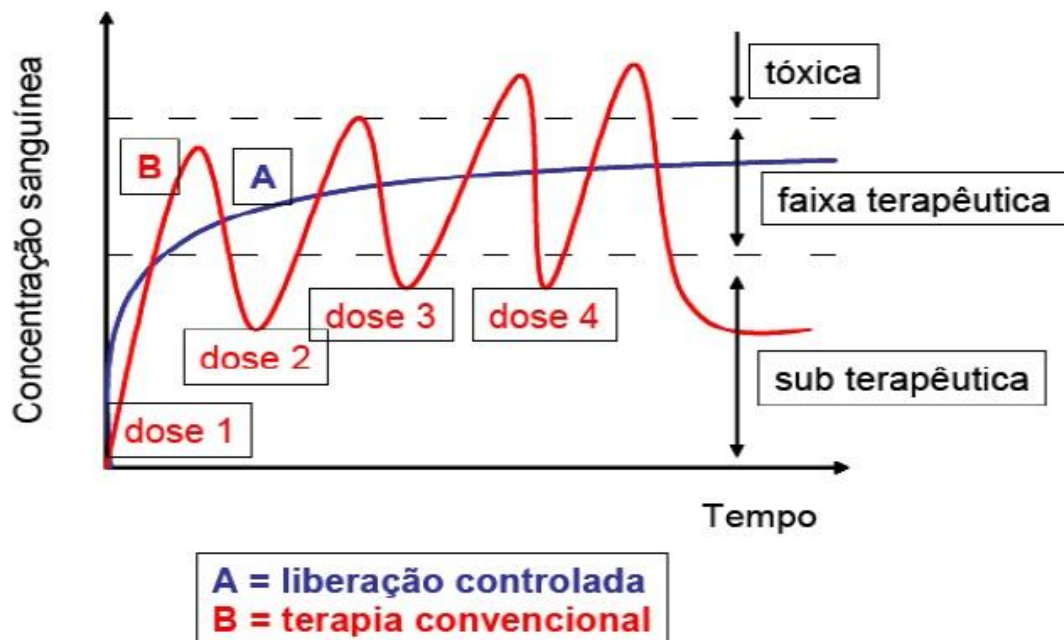


Figura 2: Concentração do fármaco no sítio terapêutico após a sua liberação em A) controlada e B) convencional (ALVES, 2011 – adaptado).

Tendo em vista as limitações presentes nas formas farmacêuticas convencionais, sistemas de liberação controlada tem sido estudados, estes, são dispositivos que tem efeito terapêutico prolongado por liberar continuamente o fármaco (ALVES, 2011), ou seja, apresentam a capacidade de manter o fármaco dentro da faixa terapêutica (BHOWMIK et al., 2012) por maior tempo (Figura 2), devido a isto, sistemas de liberação controlada podem atingir a terapias mais eficazes e reduzem a frequência de administração do fármaco, o que elimina a probabilidade de super dosagens ou dosagens não eficientes (GAVINI et al., 2009). Todavia nos sistemas de liberação controlada de fármacos pode ocorrer a não-biocompatibilidade dos materiais utilizados, degradação de produtos indesejáveis e o possível desconforto para o paciente a partir do dispositivo de entrega (BHOWMIK et al., 2012).

A melhoria no desenvolvimento de sistemas de liberação depende estritamente da seleção de um agente apropriado capaz de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e/ou liberar o fármaco ao nível de um determinado tecido ou órgão alvo, dentro das várias opções, os polímeros são agentes versáteis e promissores para exercer tal função (LOPES et al., 2005).

2.3 Polímeros

Os polímeros representam uma das classes de materiais mais versáteis (VILLANOVA et al., 2010) visto que apresentam comportamentos mecânicos e ligações químicas variadas, o que levam a classificá-los de diferentes formas como por exemplo plásticos, elastômeros e fibra (ALVES, 2011), conseqüentemente podem ser utilizados em diversas áreas.

Pesquisadores tem amplamente investido em polímeros, pois estes podem atuar de maneira eficaz tanto na formação de matriz na engenharia de tecidos (PAL et al., 2009) devido, em sua maioria, ser de fácil produção e manuseio, além de apresentar características mecânicas semelhantes aos materiais biológicos (BARBANTI et al., 2005) como também no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (PAL et al., 2009; OLIVEIRA & LIMA, 2006).

Em medicamentos convencionais os polímeros são utilizados como excipientes, ou seja, substância que após avaliada a sua segurança pode ser incluída na forma farmacêutica (VILLANOVA et al., 2010), estes polímeros são adicionados para solubilizar e estabilizar fármacos (KIM et al., 2009), entretanto no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, os polímeros tem relevante importância na formulação já que atuam diretamente na liberação dos fármacos (VILLANOVA et al., 2010) além de apresentarem, em grande

parte, uma melhor farmacocinética (SCHMALJOHANN, 2006) em comparação com medicamentos tradicionais.

Os polímeros podem ser de origem natural como, por exemplo, as proteínas, alginatos e quitosana (ALMEIDA, 2012) ou artificiais como poliésteres poli (ácido láctico) e poli (ácido glicólico) (OLIVEIRA & LIMA, 2006). Embora os polímeros naturais sejam abundantes e, em sua maioria biodegradáveis, estes podem veicular agentes patogênicos que acarretam respostas imunes ou inflamatórias (ALMEIDA, 2012) e exibem dificuldade para modificações químicas devido a baixa solubilidade (D'AYALA et al., 2008) desta forma os polímeros sintéticos tem atraído crescente interesse na administração de medicamentos como agente terapêutico (SCHMALJOHANN, 2006).

Tendo em vista a importância dos polímeros para a liberação de fármacos, a produção de novos polímeros tem aumentado, o que levou ao avanço na química dos polímeros, fazendo com que estes tenham propriedades únicas (KIM et al., 2009) e adequadas (LIU et al., 2009), entretanto muitos destes polímeros são insensíveis à alterações metabólicas do corpo e são incapazes de modular a liberação do fármaco e também direcioná-lo ao tecido alvo, essa falta de controle motivou a exploração de polímeros bioresponsivos como carreadores de fármacos (YOU et al., 2010).

2.4 Polímeros inteligentes

Nas últimas duas a três décadas tem se visto um crescimento explosivo sobre polímeros inteligentes (KUMAR et al., 2007) eles apresentam grande potencial em várias aplicações (JAMES et al., 2014).

Também conhecidos como *stimuli-responsive*, os polímeros inteligentes respondem a pequenas mudanças do ambiente com dramáticas mudanças em suas propriedades físicas (ROY & GUPTA, 2003) e químicas (YOU et al., 2007) de forma reversível (KUMAR et al., 2007), ou seja, o sistema é capaz de retornar ao seu estado inicial quando o estímulo é removido (BAWA et al., 2009). É devido a esta propriedade que eles tem sido amplamente utilizados no sistema de liberação de fármacos (JEONG & GUTOWSKA, 2002) além disso, eles também podem ser aplicados em órgãos artificiais pois “inteligentemente” interagem com células e órgãos (ROY & GUPTA, 2003).

Estes polímeros têm como principais características serem biocompatíveis, flexíveis, são bons transportadores de nutrientes para as células (MAHAJAN & AGGARWAL, 2011), apresentam facilidade de fabricação, administração, tem capacidade de alterar perfis de liberação dos agentes incorporados (AL-TAHAMI & SINGH, 2007), além de manter o

fármaco dentro do intervalo terapêutico desejado (BAWA et al., 2009), liberação prolongada do medicamento, reduz efeitos adversos da medicação, não apresenta propriedades deletérias como toxicidade sistêmica, imunogenicidade e tem excelente estabilidade (JAMES et al., 2014).

Os polímeros inteligentes podem ser classificados de duas formas:

- I. Classificados de acordo com os estímulos externos os quais respondem (JEONG & GUTOWSKA, 2002; AL-TAHAMI & SINGH, 2007), sendo portanto divididos em três grupos, ou seja, os que respondem a estímulos físicos como por exemplo temperatura, ultra-som e luz; os que respondem a estímulos químicos como pH e força iônica; e os que respondem a estímulos biológicos como por exemplo enzimas e biomoléculas (ALMEIDA, 2012). Exemplos de polímeros que respondem a estímulos físicos e químicos estão presentes na Tabela 1.

- II. Classificados de acordo com as propriedades físicas e químicas, os quais também são subdivididos em grupos que são: 1. Polímeros que apresentam cadeias lineares em solução, estes podem ser utilizados em bioseparação de proteínas e células, quando na presença de um estímulo externo sofre colapso reversível. (ALMEIDA, 2012); 2. Géis reversíveis de forma covalente e cruzada (o gel intumescer ou retrai quando na presença de um estímulo); e 3. Polímeros com cadeias enxertadas à superfície, a alteração na estrutura ocorre na superfície passando de hidrofílica para hidrofóbica, esta mudança é utilizada para a separação de substâncias que interagem de forma diferente como a matriz hidrofóbica. (ALMEIDA, 2012; BAWA et al., 2009).

Tabela 1: Exemplos de polímeros inteligentes que respondem a estímulos físicos e químicos. Tabela adaptada (extraída de JAMES et al., 2014).

Estímulos Ambientais	Material Responsivo
Temperatura	Poloxamers
	Quitosana
pH	Poli(ácido metacrílico)
	Poli(vinilpiridina)
Luz	Poli(acrilamida) modificada
Campo elétrico	Poliestirenos sulfonados
	Poli(tiofeno)
Ultra-som	Etileno vinil acetato

2.5 Hidrogel

Os hidrogéis ao longo dos anos vêm adquirindo vários conceitos, contudo o mais conhecido é que são materiais poliméricos que exibem a capacidade de intumescer e reter uma fração significativa de água no interior da sua estrutura, e não se dissolve na água (AHMED, 2013).

Estes sistemas poliméricos foram formulados pela primeira vez por Wichterle e Lim em 1960 através da polimerização de radicais livres de 2-hidroxetil metacrilato em solução aquosa e etileno dimetacrilato como agente de reticulação, os quais foram utilizados para lentes de contato (GUPTA et al., 2002), todavia por conta do transporte insuficiente e frágil mecânica novas sínteses foram realizadas (BUWALDA et al., 2014).

Os hidrogéis quando estão no estado intumescido são caracterizados como macios e emborrachados, o que os leva a semelhanças aos tecidos biológicos exibindo, portanto excelente biocompatibilidade (DAS et al., 2013). Estes sistemas podem ser formulados com polímeros naturais como a quitosana e o ácido hialurônico (FANG et al., 2008) e polímeros artificiais como por exemplo o carbopol[®]940 (ALVES et al., 2005; ALVES et al., 2007;

MILÃO, 2003) e o Poloxamer 407 (LEE & TAE, 2007; CHUNG et al., 2006), entretanto, devido aos hidrogéis formulados por polímeros sintéticos apresentarem maior capacidade de absorção de água e ter longa vida útil os hidrogéis formulados por polímeros naturais estão sendo substituídos pelos sintéticos (AHMED, 2013).

Atualmente os hidrogéis alteram sua estrutura física devido a estímulos físicos, por exemplo, temperatura, campo elétrico, campo magnético, luz, pressão e som; e também estímulos químicos como pH, força iônica, composição de solvente e espécies moleculares (Figura 3).

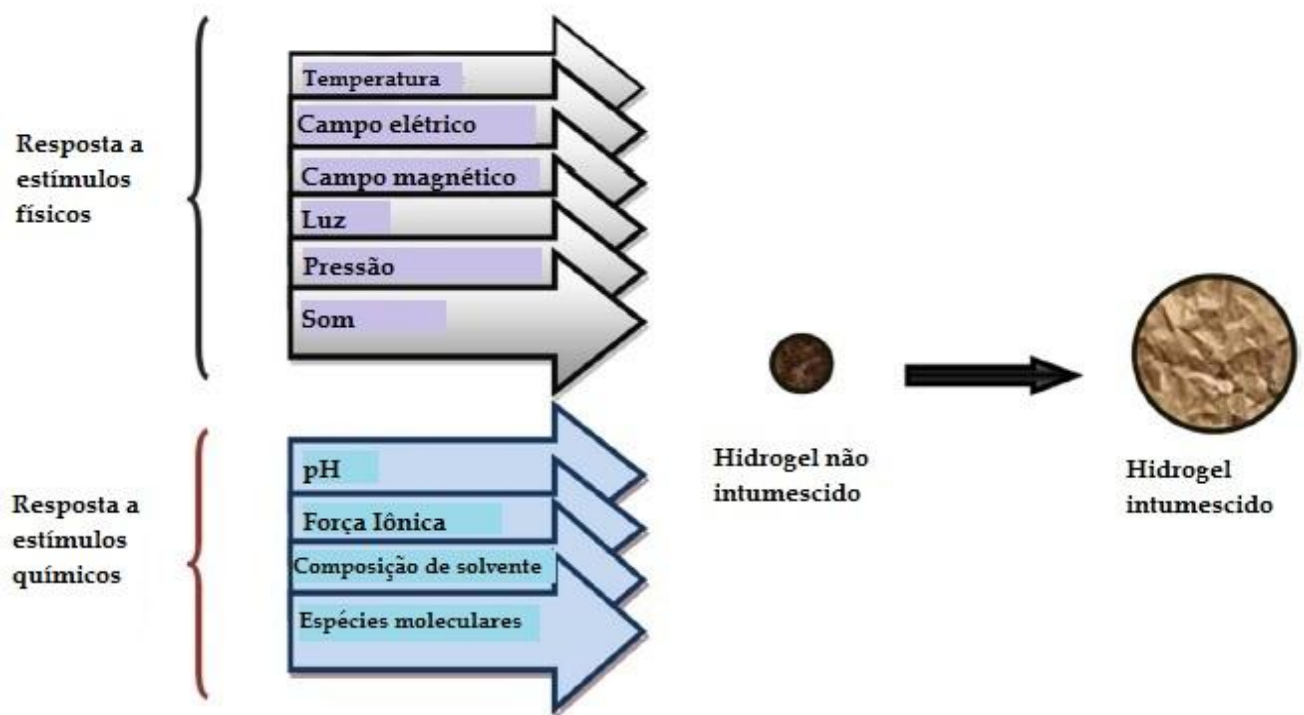


Figura 3: Hidrogéis respondem a estímulos físicos e químicos (AHMED, 2013).

Os hidrogéis podem ser classificados de diversas maneiras, que podem ser:

- I. Quanto à natureza: os hidrogéis podem ser classificados em naturais ou sintéticos.
- II. Quanto à composição do polímero:
 - a. Hidrogéis homopoliméricos: são constituídos de uma rede de polímeros derivados de uma única espécie de monômero.
 - b. Hidrogéis copoliméricos: são compostos de duas ou mais espécies diferentes de monômeros, no qual pelo menos um componente é hidrofílico.

c. Hidrogel multi polimérico de interpenetração (IPN): é composto de dois componentes de polímero natural e/ou sintético formuladas independentemente.

III. Quanto à reticulação: nesta classificação os hidrogéis podem ser divididos em duas categorias as quais vão de acordo com a natureza química ou física das junções de ligação cruzada (Figura 4). Quimicamente redes reticuladas apresentam junções permanentes, já as redes físicas têm junções transitórias que surgem a partir de qualquer envolvimento de cadeia polimérica ou interações físicas, tais como interações iônicas, pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas.

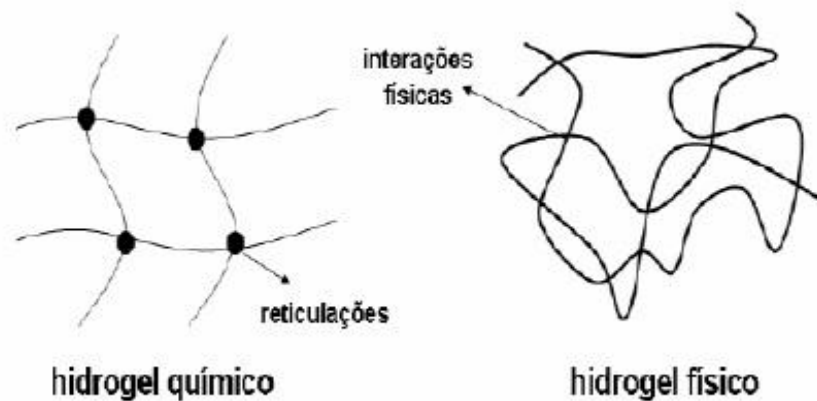


Figura 4: Hidrogéis obtidos por reticulação química e física (ALVES, 2012).

Hidrogéis tem atraído grande interesse na liberação de fármacos devido às suas propriedades físicas únicas, a sua estrutura porosa permite com que os fármacos sejam transportados e em seguida liberados, esta liberação ocorre de forma controlada, o que resulta na manutenção de uma concentração local elevada do fármaco por um longo período de tempo (CALÓ & KHUTORYANSKIY, 2015) (Figura 5).

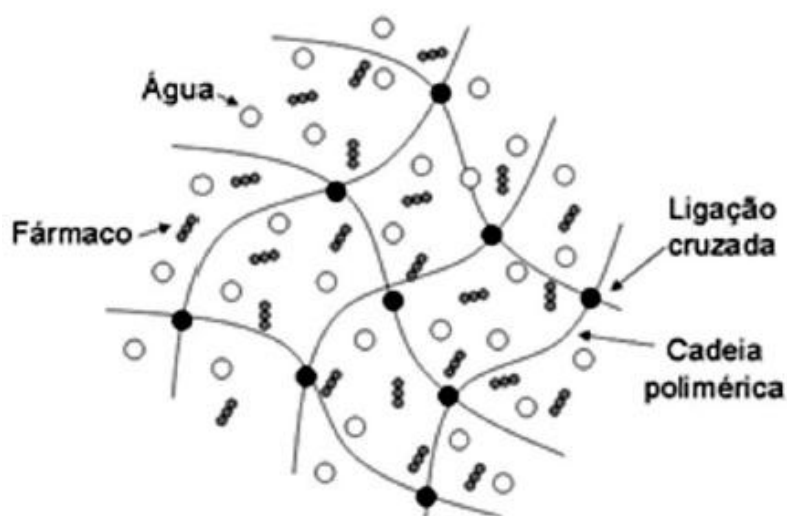


Figura 5: Representação da estrutura do hidrogel (MELO et al., 2012).

O modo de liberação do fármaco pode ser através de difusão por meio do sistema de matriz (Figura 6), onde o medicamento encontra-se disperso ou dissolvido uniformemente através da rede macromolecular ou poros e a taxa de liberação inicial é proporcional a raiz quadrada do tempo (CALÓ & KHUTORYANSKIY, 2015; BIERBRAUER., 2005). Além disso, os hidrogéis tem sido utilizados como biossensores de membrana e para engenharia de tecidos (PEPPAS et al., 2000; KASHYAP et al., 2005), geralmente apresentam estruturas bem definidas que podem ser modificadas (CHIEN-CHI & METTERS, 2006; BAJPAI et al., 2008); eles podem ser injetáveis devido a sua propriedade termorreversível onde a solução polimérica aquosa pode ser transferida para uma seringa no estado líquido, que se transforma em gel após a injeção devido às mudanças de temperatura (HU & GONG., 2016), dessa forma não é necessário o procedimento cirúrgico para implantação e vários medicamentos terapêuticos podem ser incorporados por uma simples mistura (LIANG et al., 2011). A biodegração ou dissolução desses sistemas ocorre por via enzimática, hidrolítica ou dependente das modificações do meio (LEE & YUK, 2007).

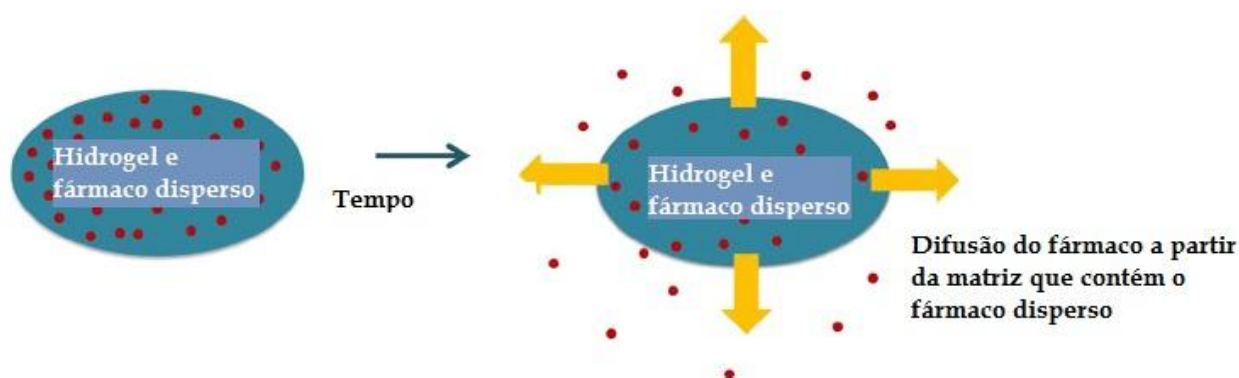


Figura 6: Sistema de liberação controlada por difusão (CALÓ & KHUTORYANSKIY, 2015).

Apesar destas propriedades vantajosas, os hidrogéis apresentam limitações, a quantidade e a homogeneidade do carregamento do fármaco nos hidrogéis pode ser limitada, particularmente no caso de fármacos hidrofóbicos. O elevado teor de água e poros com grandes tamanhos na maioria dos hidrogéis muitas vezes resulta na liberação relativamente rápida do fármaco, ao longo de algumas horas a alguns dias. Cada uma destas questões restringe significativamente a utilização de terapias de administração de fármacos à base de hidrogel na clínica (HOARE & KOHANE, 2008), desta forma é promissor associar o hidrogel a outro sistema polimérico, como por exemplo as nanopartículas. A incorporação de moléculas nanoencapsuladas em sistemas semissólidos apresentam vantagens frente a sua incorporação de forma livre como a possibilidade do aumento do tempo de permanência do fármaco ANDRADE, 2013; JUNG et al., 2013; GAO et al., 2013 e ABREGO et al., 2016 demonstram em seus trabalhos que a inserção de nanopartículas em hidrogéis promoveram liberação controlada do fármaco por maior tempo.

2.6 Poloxamer 407

Poloxamer 407 (Figura 7) também conhecido como Pluronic F-127 é um surfactante não iônico copolimérico (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006) que apresenta blocos de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO), organizados em uma estrutura de triblocos $EO_x-PO_y-EO_x$, tem como peso molecular de aproximadamente 12,600Da (DUMORTIER et al., 2015) e fórmula geral $E106 P70 E106$ (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006), além disso é um hidrogel termossensível comercial (GOU et al., 2008).

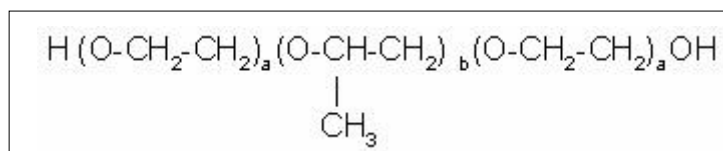


Figura 7: Estrutura química do Pluronic F-127 (a letra a refere-se a porção composta por óxido de etileno e a letra b ao óxido de propileno) (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006).

Os poloxamers são caracterizados como compostos brancos, cerosos, granuloso de fluxo livre que sejam praticamente inodoro e insípido, eles são estáveis na presença de ácidos, bases e íons metálicos (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006); além disso formam géis incolores e são pouco irritantes a pele e mucosa (KOFFI et al., 2006).

Este copolímero foi produzido no final de 1950 e desde então têm sido proposto para diversas aplicações farmacêuticas (DUMORTIER et al., 2015) devido as suas vantagens que são, melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, promover uma liberação prolongada do fármaco, não é irritante ao corpo pois apresenta citocompatibilidade com diversas células, não altera as funções fisiológicas, tem sua eliminação através das vias renais sob forma de unímero (AKASH et al., 2015), além disso, apresenta propriedades anfífilas e termorreversíveis (DUMORTIER et al., 2006); ele pode ser aplicado em várias vias como a intranasal, ocular e oral (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006) além de injeções subcutâneas, intraperitoneais e intramuscular (NIE et al., 2011).

O comportamento térmico reversível tem sido extensivamente estudado (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006), tendo em vista que sua propriedade pode ser utilizada no sistema de liberação controlada de fármacos. Em concentrações de 20% a 30% o Poloxamer 407 apresenta a gelificação térmica reversa, sendo líquidos a temperatura de 4° a 5° Celsius e tornando-se gel a temperatura do corpo humano (MIYAZAKI, 1984).

A capacidade de mudança de estado ocorre devido à micelização, ou seja, é em decorrência das micelas poliméricas que são formadas pelo Poloxamer 407 de acordo com a temperatura micelar crítica. Em temperaturas abaixo da temperatura micelar crítica as soluções de Poloxamer 407 apresentam cadeias individuais de copolímeros, ou seja, unímeros, que estão dissolvidos na solução, entretanto, a medida que a temperatura eleva, ficando acima da temperatura micelar crítica que varia entre 25° a 40°C (KABANOV et al., 2002), ocorre a desidratação dos blocos de óxido de propileno o que conseqüentemente acarreta na formação e agregação das micelas poliméricas, as quais tem em sua estrutura um núcleo hidrofóbico composto pelo óxido de propileno e em volta, para que não entre em contato com o meio externo há o óxido de etileno que tem natureza hidrofílica (Figura 8) (BONACUCINA et al., 2011; DUMORTIER et al., 2006; FAHAD, 2011).

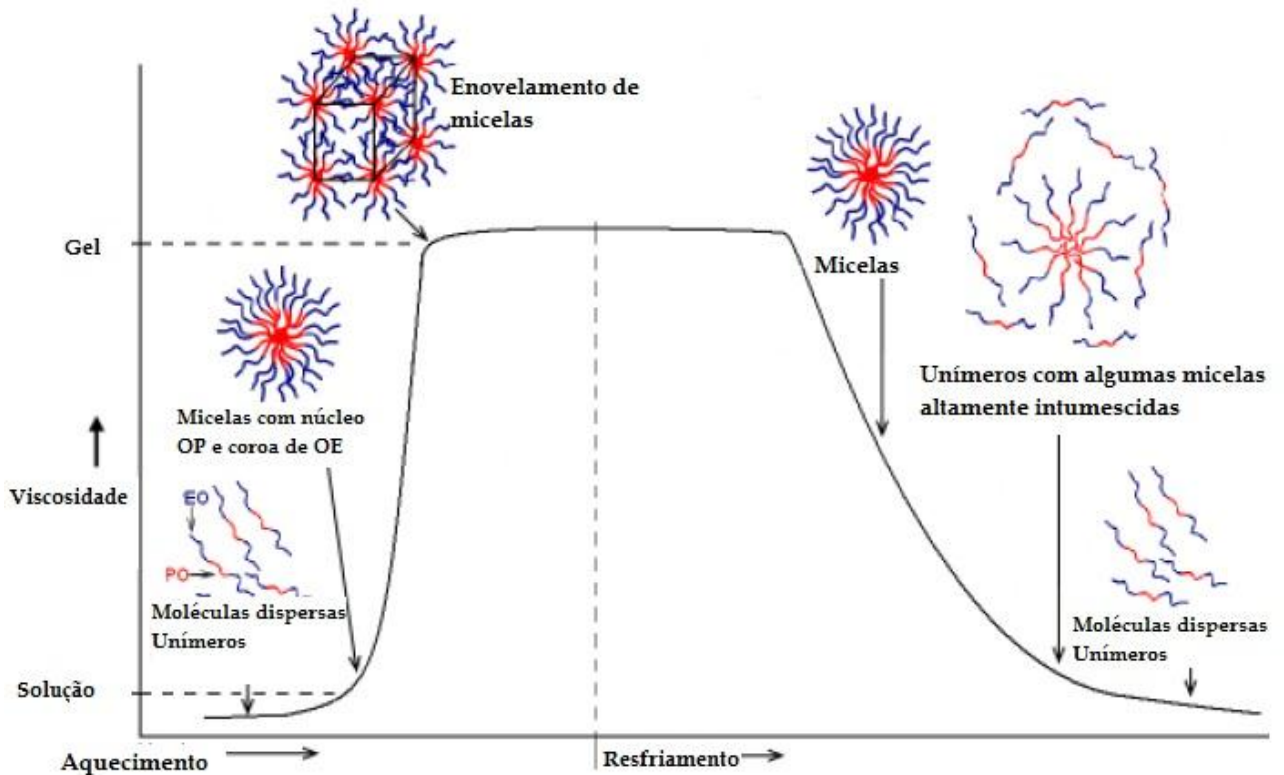


Figura 8: Formação de micelas e unímeros sobre respectivamente o aumento e diminuição de temperatura do Pluronic (Adaptado de FAHAD, 2011).

2.7 Nanocápsulas

Nanopartículas poliméricas tem atraído muita atenção especialmente na indústria farmacêutica, biomédica, cosméticos e indústrias de alimentos devido as suas características funcionais (KEAWCHAOON et al., 2011), além disso, são divididas em duas categorias: nanocápsulas e nanoesferas (RIEUX et al., 2006) a diferença entre estes dois tipos de nanopartícula é a composição e organização estrutural (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

Nanocápsulas são consideradas semelhantes a sistemas vesiculares, visto que, o fármaco encapsulado estará em um núcleo oleoso, onde este tem ao seu redor um invólucro polimérico (LEITE et al.; 2007; LETCHFORD & BURT, 2007), já as nanoesferas é uma matriz de partícula coloidal sólida onde fármacos são dissolvidos, aprisionados, adsorvidos ou quimicamente ligados à matriz do polímero constituinte (LETCHFORD & BURT, 2007) (Figura 9).

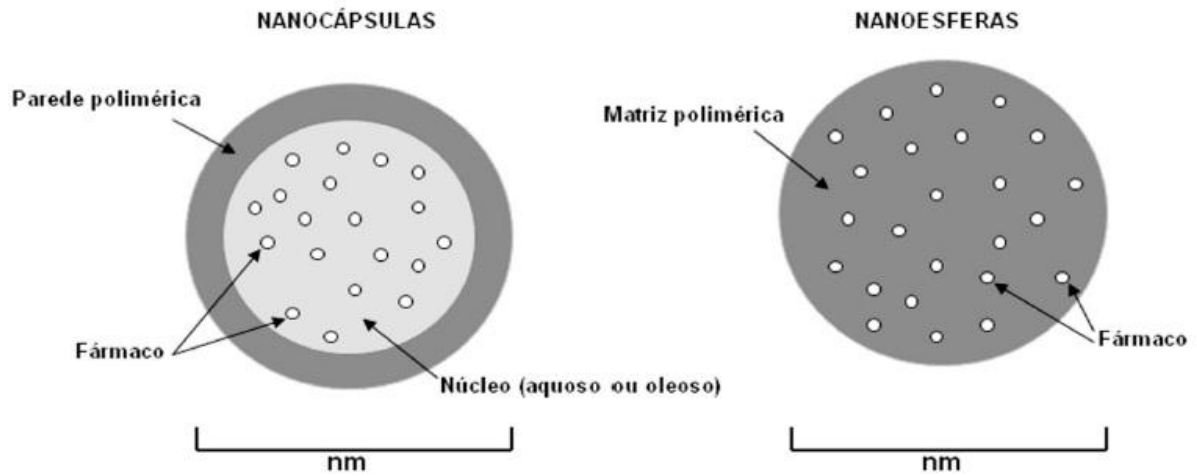


Figura 9: Representação de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas (MELO et al., 2012).

As nanocápsulas estão sendo cada vez mais investigadas para a liberação controlada e entrega do fármaco no local específico (MILÃO et al., 2003) porque apresentam diversas vantagens como o aumento da estabilidade das substâncias que a elas são incorporadas (GUINEBRETIE`RE et al., 2002), biocompatibilidade a células e tecidos desde que estas nanocápsulas sejam produzidas com compostos biodegradáveis e biocompatíveis (MORA-HUERTAS et al., 2009), eficiência na encapsulação do fármaco devido a solubilidade deste no núcleo e também promove proteção ao fármaco contra degradação (ANTON et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Preparação de hidrogéis contendo carvacrol inserido em nanocápsulas visando obtenção de sistemas de liberação *in situ*.

3.2 Objetivos Específicos

- Formular hidrogéis;
- Incorporar nanocápsulas contendo carvacrol nos hidrogéis preparados;
- Realizar a caracterização físico-química e visual dos sistemas desenvolvidos.

4. METODOLOGIA

Preparação dos hidrogéis

Para a formulação dos hidrogéis diferentes quantidades do polímero Poloxamer 407 (Pluronic F-127 Sigma-Aldrich) (2,5g, 5g e 7,5g o que equivale a 10%, 20% e 30% respectivamente) foram pesados em balança analítica e em seguida foram adicionados 25mL de água destilada sob agitação magnética. Os hidrogéis foram armazenados no refrigerador à 4°C (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006).

Preparação das nanocápsulas de carvacrol

As nanocápsulas foram preparadas através do método de nanoprecipitação de polímeros pré-formados (FESSI et al., 1989). A formulação das nanocápsulas consiste em fase oleosa e fase aquosa, onde foram utilizados o Policaprolactona (Sigma-Aldrich), Span 80 (Sigma-Aldrich), Mygliol 810 e o Carvacrol (Sigma-Aldrich) para a fase oleosa e o Tween 80 – Polissorbato (Sol-Tech) para a fase aquosa, o qual a posteriori houve a mistura destas duas fases no agitador magnético e logo após foi utilizado o Rotaevaporador (IKA® RV 10 digital) para finalizar o processo.

Adição das nanocápsulas contendo carvacrol ao hidrogel

Foram adicionadas 4% das nanocápsulas contendo carvacrol em 5mL de hidrogel formulado com 20% da concentração do Poloxamer 407 com auxílio de uma pipeta micrométrica. O sistema foi armazenado à 4°C.

Viabilidade do Sistema

Após a formulação de hidrogel com 20% da concentração do copolímero, este foi colocado em uma seringa com agulha de 1,00 x 25 mm para verificar a viabilidade do sistema, visto que, há a pretensão de injetar o composto via intramuscular.

Caracterização físico-química do hidrogel

Para a caracterização físico-química foram analisados os hidrogéis preparados com 20% de Poloxamer 407 para os seguintes aspectos:

Macroscópicos: Cor, odor, precipitação, efeito Tyndall

Microscópicos: Os hidrogéis foram analisados no microscópio óptico Olympus CX31 sob aumentos de 40, 100, 400 e 1000 vezes para visualizar uma possível presença de precipitação.

Além disso, os hidrogéis contendo 10%, 20% e 30% do copolímero foram submetidos ao teste com choque térmico para visualizar a propriedade de termoreversibilidade na transição líquido-gel. Para isto os hidrogéis à 4°C foram colocados em tubos de ensaio que posteriormente estes tubos contendo os respectivos hidrogéis foram colocados em beakers contendo água ou solução tampão variando com 30°C inicialmente de temperatura até 38°C.

Análise do tamanho de partícula e índice de polidispersão

Os resultados das análises do tamanho de partícula e índice de polidispersão foram obtidos através do espalhamento dinâmico de luz do programa Zetazizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), sob temperatura de 25°C com os hidrogéis contendo 10%, 20% e 30% de Poloxamer 407, assim como de hidrogéis com 20% do copolímero sem nanocápsulas de carvacrol e com nanocápsulas de carvacrol. As análises foram feitas em triplicata e o resultado foi obtido por meio da média de suas respectivas repetições.

Avaliação da estabilidade do sistema

Análise do pH

Para a obtenção dos valores de pH a priori o potenciômetro foi calibrado com solução tampão de pH 4,0 e 7,0. As análises foram realizadas com hidrogéis de 20% do Poloxamer 407 através do medidor de pH de bancada Lucadema.

Avaliação Biológica

Ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

O teste de letalidade utilizando *Artemia salina* Leach foi realizado através do método descrito por MEYER et al., 1982 com modificações.

Preparação de aparato e eclosão dos cistos de *Artemia salina*

Para a realização do experimento foi preparado um aquário retangular (20cm comprimento x 11cm largura x 13cm altura), contendo uma tela divisória com poros de 2 mm, um dos lados desse aquário foi coberto e protegido da luz. Nesse recipiente foi adicionado solução salina sintética (marca Real Sea[®]), sendo 33,3g de sal marinho para 1 litro de água destilada. Esse sistema foi abundantemente oxigenado com auxílio de uma bomba de ar, para acelerar o processo de eclosão dos cistos e submetido à temperatura ambiente (25°C) até o período de eclosão das larvas. Para eclosão dos cistos, uma quantidade em gramas, cerca de uma colher

de chá, de cistos de *Artemia salina* Leach (adquiridos comercialmente) foi adicionada no lado protegido da luz do aquário. Sob um sistema aerado, os cistos desenvolveram-se em 48h, e eclodiram, passando para a fase de náuplio. Após esse período, os náuplios por apresentarem fototropismo, atravessaram a tela, sendo atraídos pelo lado iluminado do aquário. Os náuplios foram retirados do aquário e levados para realização imediata dos ensaios de toxicidade.

Avaliação da atividade biológica

Para a realização dos bioensaios, foram separados dez náuplios de *Artemia salina* recém eclodidos, com o auxílio de pipeta Pasteur e estes foram adicionados à tubos de ensaio. Foram realizados seis testes com *Artemia salina*, sendo estes: carvacrol, nanocápsulas de carvacrol, nanocápsulas sem carvacrol, hidrogel, hidrogel com nanocápsulas sem carvacrol e hidrogel com nanocápsulas de carvacrol. Os tubos de ensaio apresentaram concentrações padrões, sendo estas 5 µg/mL; 10 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 250 µg/mL sendo todos completados com solução salina para obter solução total de 5mL. Também foi utilizado um tubo controle negativo, contendo apenas solução salina. O controle foi usado para certificarmos que a mortalidade dos náuplios é resultante da toxicidade dos compostos e não devido à falta de alimentação ou outros fatores (CARBALLO et al., 2002). Todos os testes (tubos), com cada uma das doses testadas foram realizados em triplicata e após o período de observação de 24 horas foram contabilizados o número de náuplios mortos e vivos em cada tubo.

Posteriormente estes dados foram processados no programa de análises simples para estimar os valores de LC₅₀ (MCLAUGHLIN et al., 1998), ou seja, a concentração letal média, portanto tabelas para cada teste realizado foram criadas no *Microsoft Excel* 2010 de acordo com o método estatístico *Probit Analysis*.

Testes em Camundongos

Animais

Foram utilizados camundongos machos *Swiss*, albinos, pesando de 28-32 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Todos os animais foram mantidos até o dia dos experimentos em gaiolas de polipropileno, com temperatura ambiente de 23 ± 2 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo que a fase de luz teve início às 6:00 e término às 18:00 h. Os animais tiveram livre acesso a alimentação do tipo pellets (Labina[®]) e água, disponível em frascos de vidro com bicos apropriados, até 60 minutos antes dos experimentos.

Considerações éticas

Todos os protocolos experimentais propostos respeitaram os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), a Lei 11.794 de 08/10/2008, que trata do uso de animais de experimentação, e os procedimentos e cuidados para o manuseio de animais foram realizados de acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (Protocolo: CEPA/UFS # 43/09).

Indução da Dor Muscular Crônica

Inicialmente, os camundongos foram avaliados quanto ao limiar mecânico de retirada da pata (através de analgesímetro digital, von Frey digital) para avaliar a condição basal desses animais. Imediatamente após a mensuração desses parâmetros basais, os animais foram anestesiados com isoflurano (2-5%) e um volume de 100 µL de salina estéril com pH 4,0, calibrada em pHmetro, foi injetado no músculo gastrocnêmio esquerdo no dia 0 (injeção 1) e, novamente, no dia 5 (injeção 2). Esse procedimento produziu hiperalgesia mecânica persistente no músculo e na pata, bilateralmente, por um período de até 4 semanas (SLUKA et al., 2001).

Mensuração da Hiperalgesia Mecânica

Para a avaliação do limiar mecânico de retirada da pata, foi utilizado o analgesímetro digital von Frey (Modelo: EFF 301, Insight®). No dia da mensuração da hiperalgesia, os camundongos foram aclimatados em suas caixas por 30 minutos na sala de comportamento. Na sequência, os animais foram colocados em cubículos transparentes sobre uma superfície de metal vazada e aclimatados novamente por 30 minutos antes de iniciar o teste comportamental. O filamento do analgesímetro foi aplicado de forma perpendicular à face plantar da pata traseira dos animais, onde foi aplicada uma pressão constante e crescente até que o animal manifestasse o comportamento de retirar a pata mediante o estímulo mecânico (SLUKA et al., 2001). A força na qual o animal retirou a pata foi registrada como limiar mecânico de retirada da pata, e interpretada como hiperalgesia mecânica secundária (cutânea). Esse método tem demonstrado extrema confiabilidade estatística (SLUKA et al., 2001).

Tratamento Farmacológico

Os animais foram divididos em grupos, sendo seis animais por grupo e tratados uma única vez através de injeção subcutânea no dorso superior, em um volume de 0,2 mL a cada 10 g de peso dos camundongos, com hidrogel (grupo controle) e, nos grupos experimentais, o tratamento seguiu da seguinte forma: hidrogel com nanopartículas; hidrogel com carvacrol (CARV); e nanopartículas com carvacrol (CARV). Os animais foram avaliados quanto à hiperalgesia secundária uma vez ao dia durante seis dias consecutivos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química do hidrogel

Aspectos macroscópicos e microscópicos

Os hidrogéis formulados se apresentaram incolores, sem odor e sem presença de precipitado quando observados macroscopicamente e microscopicamente. Quanto ao efeito Tyndall, este teste apresentou os resultados previstos, visto que em soluções coloidais o efeito Tyndall é observado por meio da dispersão de partículas quando expostas à luz, no trabalho este efeito foi analisado com o raio laser o qual pôde ser visto o trajeto da luz devido a dispersão de partículas presentes no hidrogel com as nanocápsulas de carvacrol (Figura 10).

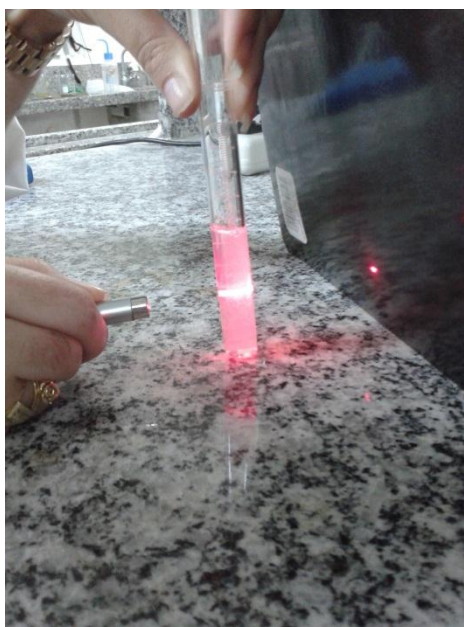


Figura 10: Efeito Tyndall visualizado com o hidrogel com 4% de nanocápsulas de carvacrol.

Quanto às análises das propriedades de termorreversibilidade os hidrogéis de 10%, 20% e 30% da concentração de Poloxamer 407 armazenados à 4°C, foram submetidos ao choque térmico com água em temperatura inicial de 30°C chegando até 38°C, o que remete a temperaturas acima da temperatura micelar crítica (KABANOV et al., 2002), e conseqüentemente torna propício a formação de gel, além de também referir-se a temperatura do corpo humano que apresenta variações de 36° C a 38° C.

O mesmo resultado foi visto nos trabalhos de ESCOBAR- CHÁVEZ et al., 2006; CHUNG et al., 2006 e DUMORTIER et al., 2006. Eles observaram que o Poloxamer 407 a partir de 20% de sua concentração apresenta a capacidade de tornar-se gel (Figura 11). Com a diminuição da temperatura o hidrogel volta ao seu estado líquido, conferindo portando a sua

termorreversibilidade. Já em baixas concentrações, no caso 10% da concentração do copolímero, o hidrogel permanece no estado líquido mesmo com a temperatura elevada.

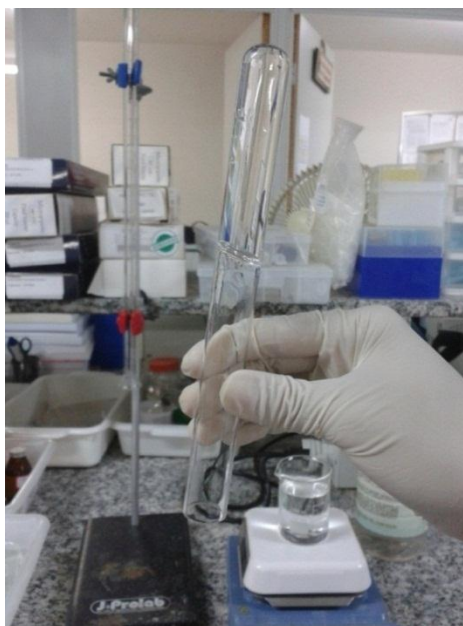


Figura 11: Hidrogel com 20% da concentração de Poloxamer 407 no estado intumescido.

Tamanho de partícula e índice de polidispersão

O tamanho de partícula e polidispersão são uma das caracterizações físico-químicas mais importantes de suspensões coloidais, a priori, o tamanho de partícula é o diâmetro da esfera que se difunde com a mesma velocidade da partícula que será medida (MANUAL – ZETASIZER NANO SERIES), este tamanho de partícula é obtido através do movimento browniano, onde de acordo com a velocidade que as partículas se movimentam e colidem umas nas outras é possível determinar seu valor, com base nisto, quanto maior a velocidade das partículas, menor é o seu tamanho, em contrapartida, quanto menor a velocidade, maior é o tamanho das partículas (SILVA, 2013).

A polidispersão é a relação entre a massa molar numérica média e a massa molar ponderada (MANUAL– ZETASIZER NANO SERIES), esta pode ser relacionada com o tamanho de partícula, pois, dependendo da variação do tamanho haverá uma maior ou menor polidispersão, ou seja, quanto mais variado for o tamanho das partículas, maior será a polidispersão, todavia quando estas apresentam tamanhos semelhantes haverá menor polidispersão.

Nas análises do tamanho de partícula e polidispersão de hidrogéis com 10%, 20% e 30% da concentração de Poloxamer 407 foram obtidos os seguintes resultados: as médias do tamanho de partícula e polidispersão dos hidrogéis com 10% e 30% da concentração do

Poloxamer 407 foram mais elevadas em comparação com o hidrogel formulado com 20% do copolímero (Tabela 2), evidenciando que possivelmente ocorreu maior variação na população de partículas dentro da formulação dos hidrogéis com 10% e 30% do copolímero e conseqüentemente houve um aumento no tamanho de partículas, ocasionando portanto na agregação das mesmas.

Tabela 2: Valores dos tamanhos de partícula, polidispersão e potencial zeta de hidrogéis com 10%, 20% e 30% da concentração de Poloxamer 407.

Concentração do polímero (%)	Tamanho (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
10	319,1 ± 35,34	0,48 ± 0,06	-11,73 ± 2,75
20	227,93 ± 30,18	0,35 ± 0,03	-13,15 ± 4,88
30	326,06 ± 53	0,56 ± 0,07	-9,12 ± 1,92

Deste modo, vemos que os hidrogéis mais viáveis para serem utilizados em conjunto com as nanocápsulas de carvacrol são os que foram formulados com 20% da concentração de Poloxamer 407, pois ao contrário da elevada média do tamanho de partícula e polidispersão das outras formulações, os hidrogéis com 20% de Poloxamer 407 não apresentaram agregação de partículas e seu valor de polidispersabilidade foi menor, portanto, a análise seguinte foi o efeito da incorporação das nanopartículas de carvacrol no hidrogel.

Para esta análise foi realizado a incorporação de nanopartículas na concentração de 4% em hidrogéis formulados com 20% de Poloxamer 407, tendo em vista os resultados discutidos anteriormente. Foi observado que a inserção das nanocápsulas de carvacrol nos hidrogéis levou a uma diminuição no tamanho de partícula (Tabela 3), este resultado está de acordo com BOCHI, 2010, o qual citou que pode haver alterações em bases semissólidas a partir da adição de nanopartículas.

Tabela 3: Valores dos tamanhos de partícula, polidispersão e potencial zeta dos hidrogéis sem nanocápsulas de carvacrol e com nanocápsulas de carvacrol.

Formulação	Tamanho (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
HB	227,93 ± 30,18	0,20 ± 0,005	-13,15 ± 4,88
HC4%	195,46 ± 1,60	0,28 ± 0,04	-7,71 ± 1,55

Ainda de acordo com o trabalho de BOCHI., 2010 este também obteve em seus resultados uma diminuição do tamanho de partícula, neste caso ocorreu após a adição de nanocápsulas de meloxicam, tendo inicialmente um tamanho de partícula de 334nm para 286nm. Outros pesquisadores também observaram em seus trabalhos a redução na média do tamanho de partícula devido a adição de nanopartículas, como FERRONY, 2009 onde de início apresentou 278,8nm e posteriormente 270,33nm, e BOOTZ et al., 2004, onde obteve em sua análise um tamanho de partícula inicial 199nm e depois reduziu por conta da adição para 184nm.

Quanto à polidispersão foi visto que ocorreu um aumento com a adição das nanocápsulas de carvacrol ao hidrogel (Tabela 3), entretanto este aumento não foi relevante tendo em vista que as médias de polidispersão permaneceram em torno de 0,2, não tendo portanto grandes variações, o que mostra que não ocorreu agregação, dessa forma, o sistema apresenta boa homogeneidade e estabilidade. Resultados semelhantes a estes também foram vistos nos trabalhos de BOCHI, 2010 e NEMEN & LEMOS-SENNA, 2011, onde embora tenha sido acrescentado as nanocápsulas, os valores do índice de polidispersão foram próximos.

Potencial Zeta

O potencial zeta também faz parte da análise de estabilidade de suspensões coloidais, este, é conhecido como o potencial presente entre a superfície da partícula e do meio dispersante (MANUAL– ZETASIZER NANO SERIES).

Os valores do potencial zeta proporcionam observações minuciosas sobre possíveis agregações além de ter a capacidade de aprimorar a formulação de suspensões, dispersões e emulsões (MALVERN), entretanto esta medida pode ser influenciada pela concentração de componentes da formulação, condutividade e pH.

Pôde-se perceber que com a adição de nanocápsulas de carvacrol ao hidrogel houve uma mudança no valor do potencial zeta (Tabela 3), tendo uma redução das cargas negativas, entretanto, ainda há estabilidade no sistema. As cargas negativas são caracterizadas como um fator positivo visto que seus valores são em grande parte favoráveis para que haja um sistema estável, sem agregação e precipitação de partículas em suspensões poliméricas (FRANCO & BOCHI, 2013).

Quanto ao potencial zeta dos hidrogéis com 10%, 20% e 30% da concentração de Poloxamer 407, temos que os hidrogéis com 20% do copolímero apresentaram maiores valores de potencial zeta (Tabela 2), o que leva a ser a melhor formulação para adicionar as nanocápsulas de carvacrol e também ser a formulação mais estável, pois, quanto maior o valor

das cargas, o sistema apresenta maior probabilidade de ser mais estável (FRANCO & BOCHI, 2013), isto pode ser explicado pelo fato de que quando há maiores valores do potencial zeta significa que as partículas presentes se repelem com mais força o que conseqüentemente evita a agregação de partículas (BOCHI, 2010; SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003), tornando-se portanto, estável.

Avaliação da estabilidade do sistema

pH

O potencial hidrogeniônico é uma medida importante para análises de hidrogel uma vez que alterações nos seus valores podem acarretar em mudanças nas propriedades e aparência dos hidrogéis (DELMAR & BIANCO-PELED, 2015), além disso, a análise do pH indica se está havendo degradação do polímero ou de outro componente do composto da formulação através das alterações de seu valor em decorrer do tempo, o que torna uma informação relevante pois disponibiliza informações sobre o comportamento do produto farmacêutico.

Neste trabalho os valores de pH do hidrogel com 20% de Poloxamer 407 foram analisados em 7, 29 e 74 dias, onde é notório que os valores variaram com o decorrer do tempo (Tabela 4), entretanto os valores permaneceram em torno de pH 7, o que é de acordo com os valores do pH humano.

Tabela 4: Valores de pH em decorrer do tempo do hidrogel com 20% de Poloxamer 407 sem nanocápsulas de carvacrol.

Dias	pH
7	7,3
29	7,2
74	7,6

Viabilidade do Sistema

A viabilidade do sistema para administração do mesmo pela via intramuscular foi avaliada. Utilizando seringas de insulina foi observado que o hidrogel formulado com 20% do Poloxamer 407 conseguiu passar sem dificuldades pela seringa, sendo portanto um composto viável para utilização por essa via de administração.

Avaliação Biológica

Ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

Artemia salina é um microcrustáceo encontrado em ecossistemas marinhos, a qual é comumente comercializada como alimento para peixes. Este microcrustáceo tem sido utilizado em bioensaios de laboratórios para determinar a toxicidade por meio da estimativa da concentração letal média (CL₅₀). Este método vem sendo utilizado em pesquisas, para avaliar a toxicidade principalmente para produtos de origem vegetal (COSTA et al., 2009), além disso é considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade (AMARANTE et al., 2011).

Devido a sua capacidade de formar cistos dormentes, fornecendo deste modo, material biológico que pode ser armazenado durante longo período de tempo sem perdas de viabilidade e sem a necessidade de manterem culturas contínuas, além de ser uma espécie de fácil manipulação em laboratórios e baixo custo econômico (SILVA et al., 2015), os testes realizados com estes animais demonstram boa correlação com atividade antitumoral (ARCANJO et al., 2012), portanto a *Artemia salina* vem sendo utilizada para testes de toxicidade.

As análises foram realizadas pelo método estatístico *Probit Analysis*, através do software *Microsoft Excel* 2010. Com base nos valores obtidos das equações de regressão linear presentes nos gráficos de dispersão (Apêndice – Gráficos de Dispersão) foi possível determinar a concentração letal média (CL₅₀) para cada teste realizado (Tabela 5) os quais foram analisados segundo os valores de toxicidade avaliados por MEYER et al., 1982, deste modo, é notório que o carvacrol apresentou maior toxicidade (CL₅₀ entre 0,1 e 100 µg/mL). As nanocápsulas de carvacrol e o hidrogel com nanocápsulas de carvacrol apresentaram moderada toxicidade (CL₅₀ entre 100 e 800 µg/mL); enquanto que as nanocápsulas brancas, hidrogel e hidrogel com nanocápsulas brancas, baixa toxicidade (CL₅₀ > 1000µg/mL) (MEYER et al., 1982).

Tendo em vista que o hidrogel apresenta baixa toxicidade, pôde-se perceber que com a adição do carvacrol, o qual contém alta toxicidade segundo os resultados obtidos, o valor da concentração letal média reduziu, conseqüentemente, o hidrogel com nanocápsulas de carvacrol apresentou toxicidade moderada, o mesmo fato também pode ser visualizado nas nanocápsulas brancas, ou seja, nanocápsulas sem carvacrol. Estes dois sistemas analisados individualmente apresentaram baixa toxicidade, isto não se alterou após a junção dos mesmos, ou seja, nanocápsulas brancas inseridas no hidrogel, a concentração letal média foi maior que 1000µg/mL (Tabela 5), tendo portanto baixa toxicidade, todavia ao incorporar o carvacrol a

toxicidade aumenta. Nos testes para o controle, onde havia apenas solução salina, não houve mortes.

Tabela 5: Valores da Concentração Letal Média.

	CL₅₀µg/ml
Carvacrol	18,44 ± 12,14
Nanocápsulas de Carvacrol	713,11 ± 502,22
Nanocápsulas Brancas	1082,53 ± 763,31
Hidrogel	5760,54 ± 4070,65
Hidrogel com Nanocápsulas de Brancas	3449,26 ± 2436,49
Hidrogel com Nanocápsulas de Carvacrol	648,28 ± 456,41

Testes em Camundongos

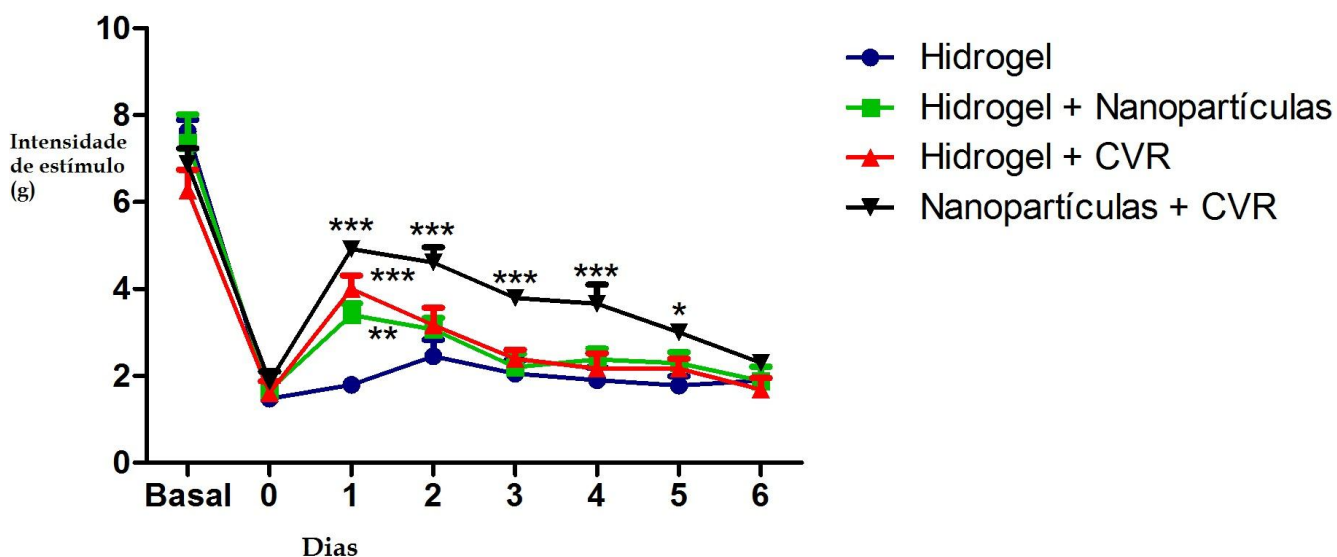


Gráfico 1: Resposta fisiológica dos camundongos de acordo com a intensidade do estímulo e ação dos sistemas testados.

De acordo com o Gráfico 1 podemos perceber que o hidrogel apresentou pouca eficiência nos camundongos, visto que os mesmos não suportaram intensidade de estímulos maiores que 3, isto se deve ao fato de que o hidrogel não é um fármaco, mas sim um

carreador, o qual tem a função de melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água assim como promover uma liberação prolongada (AKASH et al., 2015). No teste com hidrogel e nanopartículas de carvacrol (Hidrogel + Nanopartículas) foi visto que os camundongos suportaram intensidade até o nível 3, posteriormente com o decorrer dos dias houve redução na intensidade do estímulo, possivelmente a união destes dois sistemas ocasionou em uma liberação demasiadamente lenta do fármaco a ponto de limitar a ação terapêutica.

Quanto ao hidrogel com carvacrol (Hidrogel + CVR), pôde-se perceber que os animais suportaram intensidade de estímulo até o nível 4, entretanto, com o decorrer dos dias o efeito do medicamento diminuiu, o que conseqüentemente fez com que os camundongos reagissem retirando a pata, em intensidade de estímulos menores, isto ocorre devido a estrutura do hidrogel, embora este seja utilizado em sistemas de liberação controlada e sua ação seja promissora, este apresenta limitações, seu elevado teor de água e poros com grandes tamanhos muitas vezes resulta na liberação relativamente rápida do fármaco, ao longo de algumas horas a alguns dias (HOARE & KOHANE, 2008; LI et al., 2014), portanto presume-se que o resultado obtido neste teste, hidrogel com carvacrol, teve sua eficácia reduzida com o passar dos dias devido a rápida liberação do carvacrol após o intumescimento do hidrogel, logo, será necessário realizar cinética para confirmar este resultado. Para as nanopartículas e carvacrol (Nanopartículas + CVR) este apresentou maior eficácia, os camundongos conseguiram suportar intensidade de estímulos maiores que 4, além disso, também pode ser visto que a redução do nível de intensidade com o decorrer dos dias foi menor em comparação com os outros sistemas testados, isto mostra que a liberação do fármaco foi lenta, conseqüentemente, teve o efeito terapêutico prolongado do fármaco (ALVES, 2011).

CONCLUSÃO

- Este trabalho avaliou a preparação de hidrogéis termossensíveis para aplicação *in situ* utilizando Poloxamer 407, foi verificada a estabilidade preliminar do sistema e a incorporação de nanopartículas contendo carvacrol nos hidrogéis vislumbrando preparar um sistema de liberação lenta, gradual e local.
- No estudo de formação e avaliação das propriedades de termorreversibilidade do hidrogel apenas as formulações contendo 20% e 30% do copolímero tiveram as características desejadas. As formulações de hidrogéis analisadas permaneceram com as mesmas características que podem ser vistas macroscopicamente (incolor, sem odor e sem precipitado) até o término do estudo. O estudo de avaliação de tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta demonstraram que hidrogéis com concentrações de 20% de Poloxamer 407 mostraram-se mais adequados para continuar os ensaios e incorporar as nanocápsulas contendo carvacrol.
- Após a incorporação de nanocápsulas contendo carvacrol nos hidrogéis não foram observadas mudanças significativas com relação ao diâmetro das partículas, as mesmas permaneceram com tamanho nanométrico. Porém, foi observada uma alteração no potencial zeta, o que se justifica mediante o polímero utilizado na preparação das nanocápsulas modificar esse potencial, demonstrando que o mesmo encontra-se incorporado no sistema. Diante do exposto, é notório que a incorporação de nanopartículas no sistema pode ser realizada sem modificação nas propriedades de formação dos hidrogéis.
- As análises de toxicidade frente *Artemia salina* demonstrou que hidrogéis com nanocápsulas de carvacrol apresentam toxicidade moderada. Quanto aos testes em camundongos foi visto que o hidrogel com nanocápsulas de carvacrol não apresentou a ação terapêutica esperada. Ainda serão realizados novos testes em camundongos.

- Esse sistema de liberação *in situ*, especificamente, os hidrogéis termossensíveis provou ser viável e exequível, podendo ser utilizados como carreadores contendo carvacrol encapsulado em nanopartículas biodegradáveis.

REFERÊNCIAS

ABREGO G.; ALVARADO H.; SOUTO E. B.; GUEVERA B.; BELLOWA L. H.; GARDUÑO M. L.; GARCIA M. L.; CALPENA A. C. Biopharmaceutical profile of hydrogels containing pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles for skin administration: In vitro, ex vivo and in vivo characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 501, n. 1 – 2, p. 350 – 361, 2016.

AHMED E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105 – 121, 2013.

ALMEIDA H. E. P. P. J. **Polímeros inteligentes: classificação e aplicação em sistemas de liberação modificada de fármacos**. 2012. 66 p. Seminário do Programa Doutoral em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2012.

ALMEIDA R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. 22 p. Monografia de Conclusão de Curso – Grau Acadêmico Bacharelado em Química, Universidade Federal de São João del –Rei, 2015.

ALVES P. M.; POHLMANN A. R.; GUTERRES S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, n. 12, p.900 – 904, 2005.

ALVES M. P.; SCARRONE A. L.; SANTOS M.; POHLMANN A. R.; GUTERRES S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1 - 2, p. 215 – 220, 2007.

ALVES T. V. G. **Obtenção E Caracterização De Hidrogéis De Poliacrilamida-Co-Metilcelulose Como Sistemas Carreadores De Cloridrato De Propranolol**. 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Belém, 2011.

AL-TAHAMI K.; SINGH J. Smart polymer based delivery systems for peptides and proteins. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v.1, n1, p.65 – 71, 2007.

AMARANTE C. B.; MÜLLER A. H.; PÓVOA M. M.; DOLABELA M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, v.41, n. 3, p. 431 – 434, 2011.

ANDRADE D. F. **Nanocápsulas de Núcleo Lipídico: Estudos de penetração cutânea e proposição de estratégias para a avaliação *in vivo***. 2013. 158 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, 2013.

ANTON N.; BENOIT J-P.; SAULNIER P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n.3, p. 185 – 199, 2008.

AKASH M. S. H.; REHMAN K.; CHEN S. Natural and synthetic polymers as drug carriers for delivery of therapeutic proteins. **Polymer Reviews**, v. 55, n. 3, p. 1 – 36, 2015.

ARCANJO D. D. R.; ALBUQUERQUE A. C. M.; MELO N. B.; SANTANA L. C. L. R.; MEDEIROS M. G. F.; CITÓ A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal Biology**, v. 72, n. 3, p. 505 – 509, 2012.

ARIGESAVAN K.; SUDHANDIRAN G. Carvacrol exhibits anti-oxidant and anti-inflammatory effects against 1, 2-dimethyl hydrazine plus dextran sodium sulfate induced inflammation associated carcinogenicity in the colon of fischer 344 rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 2, p. 314 – 320, 2015.

BAJPAI A. K.; SHUKLA S. K.; BHANU S.; KANKANE S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v.33, n.11, p.1088 – 1118 , 2008.

BARBANTI S. H.; ZAVAGLIA C. A. C.; DUEK E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BAWA P.; PILLAY V.; CHOONARA Y. E.; TOIT L. C. D. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. **Biomedical Materials**, v.4, n.2, p. 1 - 15, 2009.

BHOWMIK D.; GOPINATH H.; KUMAR B. P; DURAIVEL S.; KUMAR K. P. S. Controlled release drug delivery systems. **The Pharma Innovation**, v. 1, n. 10, p. 24 – 32, 2012.

BIERBRAUER F. **Hydrogel Drug Delivery: Diffusion Models**. 2005. 31p.School of Mathematics and Applied Statistics, University of Wollongong.

BIMCZOK D.; RAU H.; SEWEKOW E.; JANCZYK P.; SOUFFRANT W. B.; ROTHKOTTER H-J. Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 652 – 658, 2008.

BOCHI L. D. C. S. **Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação da Atividade Antinociceptiva de uma Formulação Tópica Semissólida contendo Nanocápsulas de Meloxicam**. 2010. 147 p. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Nanociências do Centro Universitário Franciscano - UNIFRA, Santa Maria, RS.

BONACUCINA G.; CESPI M.; MENCARELLI G.; GIORGIONI G.; PALMIERI G. F. Thermosensitive self-assembling block copolymers as drug delivery systems. **Polymers — Open Access Polymer Science Journal**, v. 3, n. 2, p. 779 – 811, 2011.

BOOTZ A.; VITALI. V; SCHUBERT D.; KREUTER J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, n. 2, p. 369 – 375, 2004.

BUWALDA S. J.; BOERE K. W. M.; DIJKSTRA P. J.; FEIJEN J.; VERMONDEN T.; HENNINK W. E. Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials. **Journal of Controlled Release**, v. 190, n. 30, p. 254 – 273, 2014.

CALÓ E, KHUTORYANSKIY V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252 – 267, 2015.

CARVALHO A. F. U.; MELO V. M. M.; CRAVEIRO A. A.; MACHADO M. I. L.; BANTIM M. B.; RABELO E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* cham. against *Aedes aegypti* linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569 – 571, 2003.

CARONI A. L. P. F. **Estudos de Adsorção de Tetraciclina em Partículas de Quitosana**. 2009. 145 p. Defesa de Tese de Doutorado apresentado ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

CHIEN-CHIN L.; METTERS A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n.12 – 13, p.1379- 1408, 2006.

CHUNG Y-IL.; LEE S-Y.; TAE G. The effect of heparin on the gelation of pluronic F-127 hydrogel. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 284 – 285, p. 480 – 484, 2006.

COSTA D. A.; MATIAS W. N.; LIMA I. O.; XAVIER A. L.; COSTA V. B. M.; DINIZ M. F. F. M.; AGRA M. F.; BATISTA L. M.; SOUZA M. F. V. First secondary metabolites from *Herissantia crispa* L(Brizicky) and the toxicity activity against *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 48 – 50, 2009.

D'AYALA G. G.; MALINCONICO M.; LAURIENZO P. Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches. **Molecules**, v. 13, n. 9, p. 2069 – 2106, 2008.

DAS N*. Preparation methods and properties of hydrogel: a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 112 – 117, 2013.

DELMAR K.; BIANCO-PELED. H. The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 28 – 37, 2015.

DUMORTIER G.; GROSSIORD J. L.; AGNELY F.; CHAUMEIL J. C. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709 – 2728, 2006.

ESCOBAR-CHÁVEZ J. J.; LÓPEZ-CERVANTES M.; NAIK A.; KALIA Y. N.; QUINTANAR-GUERRERO D.; GANEM-QUINTANAR A. Applications of thermoreversible pluronic f-127 gels in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 339- 358, 2006.

FAHAD, M. **Novel support materials for jetting based additive manufacturing processes**. 2011. 179 f. Thesis (Ph. D. thesis) - Leicestershire: Loughborough University, 2011.

FANG J-Y.; CHEN J-P.; LEU Y-L.; HU J-W. Temperature – sensitive hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid as injectable carriers for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 626 – 636, 2008.

FERRONY D. A. **Desenvolvimento de uma formulação semi-sólida contendo nanocápsulas de dexametasona: estudo de estabilidade e avaliação da liberação “in vitro”**. 2009. 102 p. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Nanociências do Centro Universitário Franciscano - UNIFRA, Santa Maria, RS.

FESSI H.; PUISIEUX F.; DEVISSAGUET J. Ph.; AMMOURY N.; BENITA S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International of Journal of Pharmaceutics**, v.55, n.1, p. 1 – 4,1989.

FRANCO L. T.; BOCHI L. D. C. S. Produção e caracterização de diferentes formulações tópicas semissólidas contendo meloxicam na forma nanoestruturada. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 9, n. 16, p. 209 – 231, 2013.

GAO C.; CAI Y.; KONG X.; HAN G.; YAO J. Development and characterization of injectable chitosan-based hydrogels containing dexamethasone/rhBMP-2 loaded hydroxyapatite nanoparticles. **Materials Letters**, v. 93, p. 312 – 315, 2013.

GAVINI E.; MARIANI A.; RASSU G.; BIDALI S.; SPADA G.; BONFERONI M. C.; GIUNCHEDI P. Frontal polymerization as a new method for developing drug controlled release systems (DCRS) based on polyacrylamide. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 3, p. 690 – 699, 2009.

GOU M.; LI X.; DAI M.; GONG C.; WANG X.; XIE Y.; DENG H.; CHEN L.; ZHAO X.; QIAN Z.; WEI Y. A novel injectable local hydrophobic drug delivery system: biodegradable nanoparticles in thermo-sensitive hydrogel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, n. 1 – 2, p. 228 – 233, 2008.

GUIMARÃES A. G.; XAVIER M. A.; SANTANA M. T.; CAMARGO E. A.; SANTOS C. A.; BRITO F. A.; BARRETO E. O.; CAVALCANTI S. C. H.; ANTONIOLLI A. R.; OLIVEIRA R. C. M.; QUINTANS-JÚNIOR L. J. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 385, n.3, p. 253 – 263, 2012.

GUPTA P.; VERMANI K.; GARG S. Hydrogels: from controlled release to pH responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 10, p. 569 – 579, 2002.

GUINEBRETIE`RE S.; BRIANCON S.; FESSI H.; TEODORESCU V.S.; BLANCHIN M.G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 21, n. 1-2, p. 137 – 142, 2002.

HOARE T. R.; KOHANE D. S. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. **Polymer**, v.49, n.8, p.1993 – 2007, 2008 .

HU B.; ROGER A. E.; WRIGHT S. J; HENN D. M.; ZHAO B. Hybrid micellar network hydrogels of thermosensitive ABA triblock copolymer and polymer brush-grafted nanoparticles: effect of LCST transition of polymer brushes on gel property. **Polymer**, v. 82, p. 206 – 216, 2006.

HU X.; GONG X. A new route to fabricate biocompatible hydrogels with controlled drug delivery behavior. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 470, p. 62 – 70, 2016.

JAMES H. P.; JOHN R.; ALEX A.; ANOOP K. R. Smart polymers for the controlled delivery of drugs - a concise overview. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 2, p.120-127, 2014.

JEONG B.; GUTOWSKA A. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. **TRENDS in Biotechnology**, v.20, n. 7, p. 305 – 311, 2002.

JUNG H. J.; ABOU – JAOUDE M.; CARBIA B. E.; PLUMMER C.; CHAUHAN A. Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone-hydrogel contact lenses. **Journal of Controlled Release**, v. 165, n.1, p. 82-89, 2013.

KABANOV. A. V.; BATRAKOVA E. V.; ALAKHOV V. Y. Pluronic[®] block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 2-3, p. 189 – 212, 2002.

KASHYAP N.; KUMAR N.; KUMAR M. N. V. R. Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n. 2, p. 107 -149, 2005.

KEAWCHAOON L.; YOKSAN R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163 – 171, 2011.

KIM S.; KIM J-H.; JEON O.; KWON I. C.; PARK K. Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n.3, p. 420 – 430, 2009.

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

KOFFI A. A.; AGNELY F.; PONCHEL G.; GROSSIORD J. L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 328 – 335, 2006.

KUMAR A.; SRIVASTAVA A.; GALAEV I. Y.; MATTIASSON B.; Smart polymers: physical forms and bioengineering applications. **Progress In Polymer Science**, v. 32, n.10, p.1205 – 1237, 2007.

LEE K. Y.; YUK S. H. Polymeric protein delivery systems. **Progress In Polymer Science**, v. 37, p. 669 – 697, 2007.

LEE S-Y.; TAE G. Formulation and in vitro characterization of an in situ gelable, photo-polymerizable Pluronic hydrogel suitable for injection. **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 3, p. 313 – 319, 2007.

LEITE E. A.; GRABE- GUIMARÃES A.; GUIMARÃES H. N.; MACHADO-COELHO G. L. L.; BARRATT G.; MOSQUEIRA V. C. F. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life Sciences**, v. 80, n. 14, p. 1327 – 1334, 2007.

LETCHFORD K.; BURT H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n.3, p. 259 – 269, 2007.

LI C.; LI C.; LIU Z.; LI Q.; YAN X.; LIU Y.; LU W. Enhancement in bioavailability of ketorolac tromethamine via intranasal in situ hydrogel based on poloxamer 407 and carrageenan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 474, n. 1 -2, p. 123 – 133, 2014.

LIANG Y.; DENG L.; CHEN C.; ZHANG J.; ZHOU R.; LI X.; HU R.; DONG A. Preparation and properties of thermoreversible hydrogels based on methoxy poly(ethylene glycol)-grafted chitosan nanoparticles for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1828 – 1833, 2011.

LIMA M. S; QUINTANS-JÚNIOR L. J.; SANTANA W. A.; KANETO C. M.; SOARES M. B. P.; VILLARREAL C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1 - 3, p. 112 -117, 2013.

LIN C-C.; METTERS A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 12 – 13, p. 1379 – 1408, 2006.

LIU A.; MAHESHWARI.; KIICK K. L. Polymer-Based therapeutics. **Macromolecules**, v. 42, n. 1, p. 1 – 25, 2009.

LOPES C. M.; LOBO J. M. S.; COSTA P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143 – 154, 2005.

MAHAJAN A.; AGGARWAL G. Smart polymers: innovations in novel drug delivery. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 3, n. 3, p. 16 – 30, 2011.

MALVERN – zeta potential – Disponível em: <

<http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/zeta-potential/default.aspx> > Acesso em: 18/08/2015.

MANUAL – zetasizer nano series user manual – Disponível em: <

http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf > Acesso em: 06/05/2015.

MCLAUGHLIN J. L.; ROGERS L. L.; ANDERSON J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513 – 524, 1998.

MENDES Y. C. **Ação do óleo essencial de *Lippia sidoides*, e seus constituintes timol, catvacrol e p- cimeno sobre os parâmetros eletrofisiológicos do nervo ciático de ratos.** 2012. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2012.

MEYER B. N.; FERRIGN N. R.; PUTNAM J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS. D. E.; MCLAUGHLIN J. L. Brineshrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p. 31-34, 1982.

MILÃO D.; KNORST M. T.; RICHTER W.; GUTERRES S. S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, n.5, p. 325 – 329, 2003.

MIYAZAKI S.; TAKEUCHI S.; YOKOUCHI C.; TAKADA M. Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical administration of anticancer agents. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 10, p. 4205 – 4208, 1984.

MORA-HUERTAS C. E.; FESSI. H.; ELAISSARI A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1 – 2, 113 – 142, 2010.

NEMEN D.; LEMOS-SENNA. E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408 – 413, 2011.

NIE S.; HSIAO W. L. W.; PAN W.; YANG Z. Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release,

cell cytotoxicity, and uptake studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 151 – 166, 2011.

NOSTRO A.; ROCCARO A. S.; BISIGNANO G.; MARINO A.; CANNATELLI M. A.; PIZZIMENTI F. C.; CIONI P. L.; PROCOPIO F.; BLANCO A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus Mepidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519 – 523, 2007.

OLIVEIRA R. B.; LIMA E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 29 – 15, 2006.

PAL. K.; BANTHIA A. K.; MAJUMDAR D. K. Polymeric hydrogels: characterization and biomedical applications –A mini review. **Designed Monomers and Polymers**, v. 12, n. 3, p. 197 – 220, 2009.

PEIXOTO-NEVES D.; SILVA - ALVES. S. K.; GOMES M. D. M.; LIMA C. F.; LAHLOU S.; MAGALHÃES P. J. C.; CECCATTO V. M.; COELHO – DE – SOUZA A. N.; LEAL-CARDOSO. J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.24, n. 3, p. 341 – 350, 2009.

PEPPAS N. A.; BURES P.; LEOBANDUNG W.; ICHIKAWA H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27 – 46, 2000.

POLETTO F. S., JÄGER E.; CRUZ L.; POHLMANN A. R.; GUTERRES S.S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**. v. 28, n. 4, p.472 – 478, 2008.

QU X.; WIRSE´N A.; ALBERTSSON A.-C. Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. **Polymer**, v. 41, n.12, 2000.

RIEUX A.; FIEVEZ V.; GARINOT M.; SCHNEIDER Y.-J.; PRÉAT V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1-27, 2006.

ROY I.; GUPTA M. N.; Smart polymeric materials: emerging biochemical applications. **Chemistry & Biology**, v. 10, n.12, p.1161 – 117, 2003.

SCHAFFAZICK S. R.; GUTERRES S. S.; FREITAS L. L.; POHLMANN A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726 – 737, 2003.

SCHMALJOHANN D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, n. 15, p. 1655 – 1670, 2006.

SILVA L. A. S. D. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas de liberação para complexos metálicos baseado em hidrogel termossensível**. 2013. 103 p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia.

SILVA E. M. F.; NASCIMENTO R. B. C.; BARRETO.; BARRETO F. S.; FILHO M. O. M.; GRIZ S. A. S.; SANTOS A. F.; MOUSINHO K. C. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 277 – 283, 2015.

SIGMA – ALDRICH - Ficha de informações de segurança de produtos químicos – Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=W224502&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2Fw224502%3Flang%3Dpt>>
Acesso em: 27/04/2016.

SINGH A.; SHARMA P. K.; GARG V. K.; GARG G. Hydrogels: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 4, n. 2, p. 97 – 105, 2010.

SLUKA K. A.; KALRA A.; MOORE S. A. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. **Muscle Nerve**, v. 24, n. 1, p. 37 - 46, 2001.

SUNTRES Z. E.; COCCIMIGLIO J.; ALIPOUR M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55. n. 3, p. 304 -318, 2014.

VILLANOVA J. C. O.; ORÉFICE R. L.; CUNHA. A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51 – 64, 2010.

VINCENZI M.; STAMMATI A.; VINCENZI A.; SILANO M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v.75, n.7 – 8, p.801 – 804, 2004.

YOU J-O.; ALMEDA D.; YE G. J.; AUGUSTE D. T. Bioresponsive matrices in drug delivery. **Journal of Biological Engineering**, v. 4, n. 15, p. 1 – 12, 2010.

YU H.; ZHANG Z-L.; CHEN J.; PEI A.; HUA F.; XUANCHEN Q.; HE J.; LIU C-F.; XU X. Carvacrol, a food-Additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. **Plos One**, v. 7, n.3, p. 1 - 8, 2012.

ZEYTINOGLU H., INCESU Z.; BASER K. H. C. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human *N-RAS* oncogene. **Phytomedicine**, v. 10, n. 4, p. 292 – 299, 2003.

APÊNDICE – GRÁFICOS DE DISPERSÃO

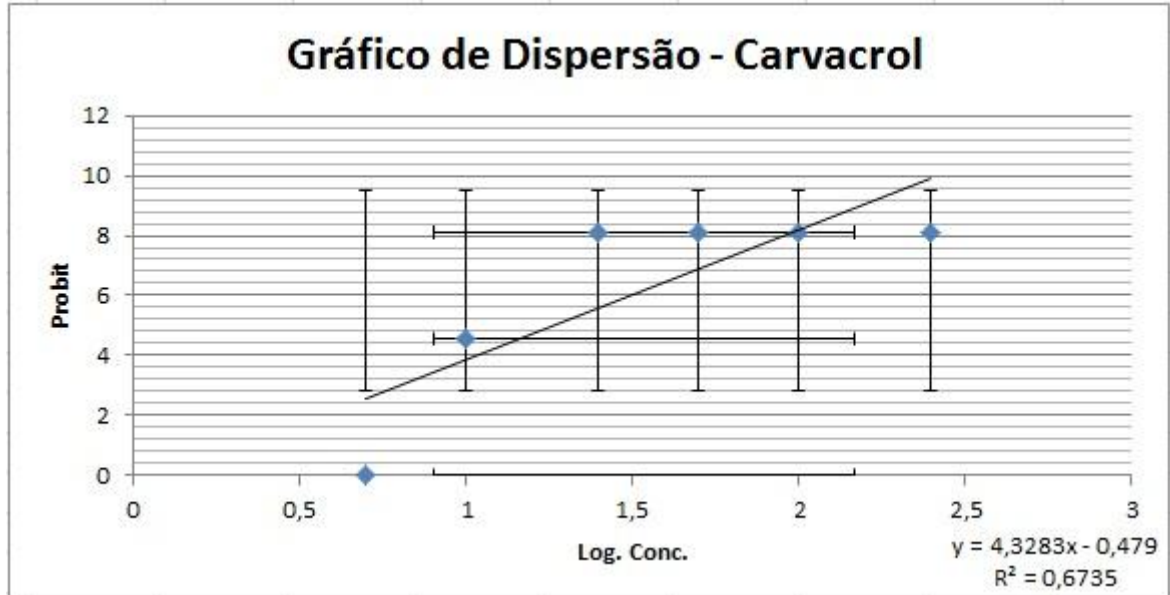


Gráfico 1: Gráfico de dispersão – Carvacrol.

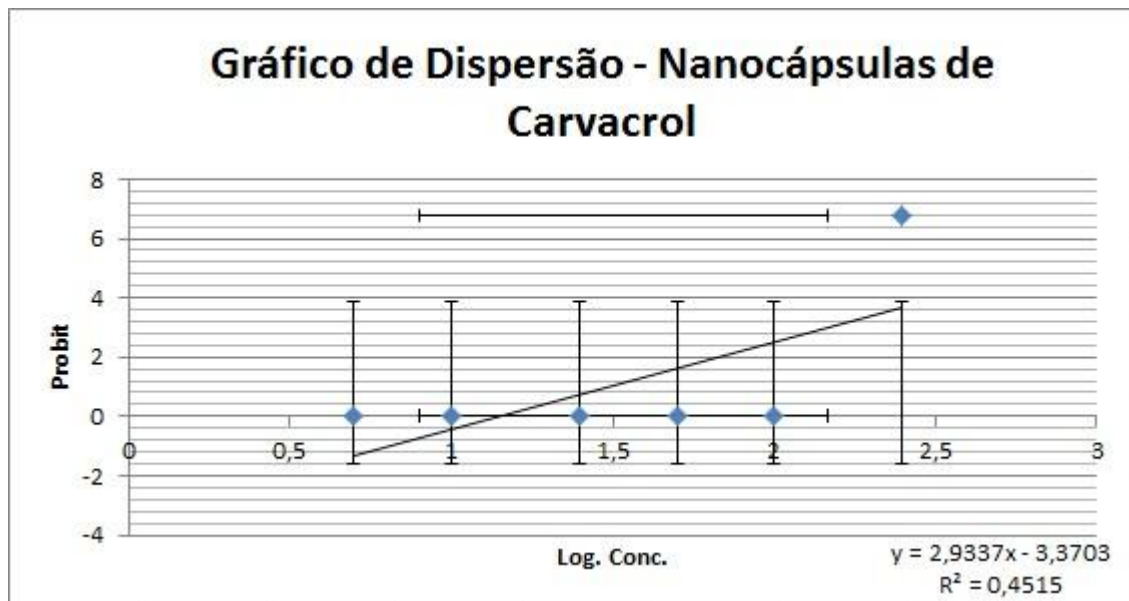


Gráfico 2: Gráfico de dispersão – Nanocápsulas de Carvacrol.

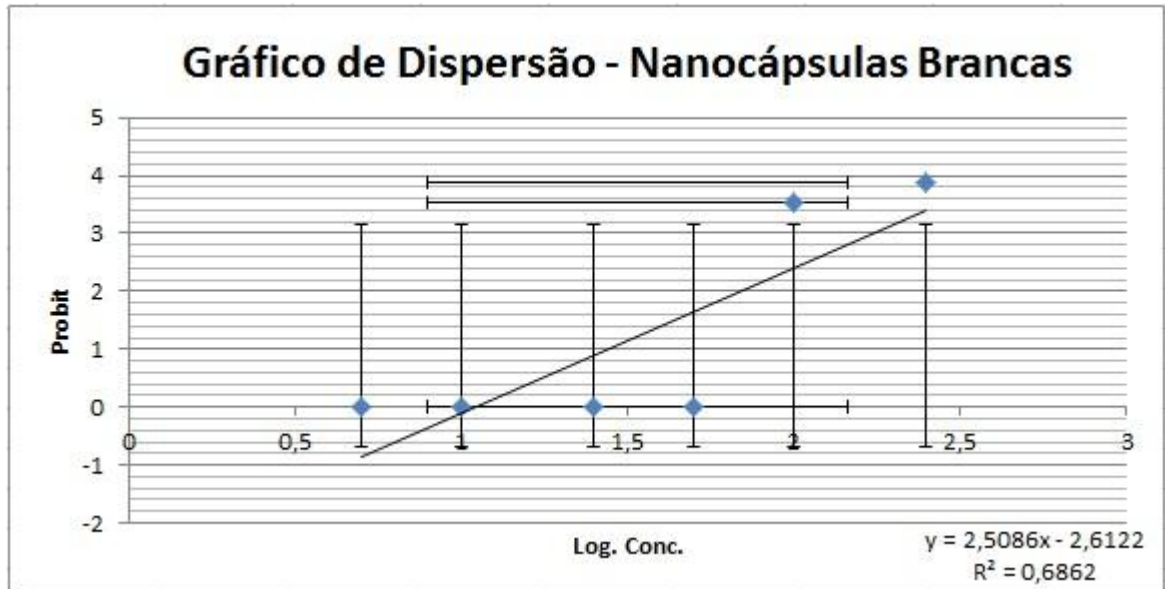


Gráfico 3: Gráfico de dispersão – Nanocápsulas Brancas.

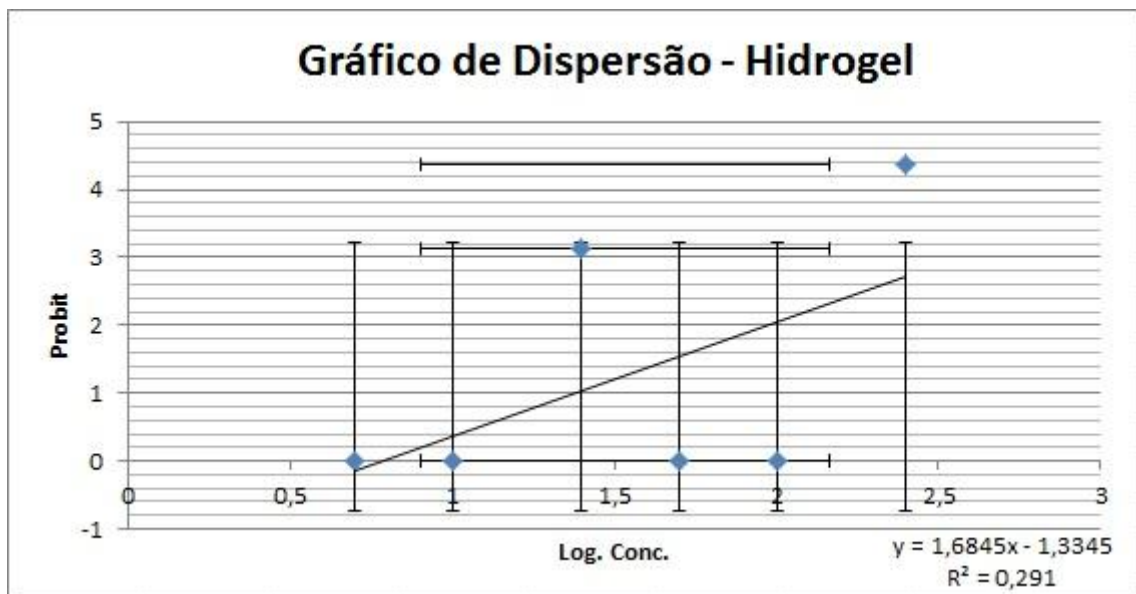


Gráfico 4: Gráfico de dispersão – Hidrogel.

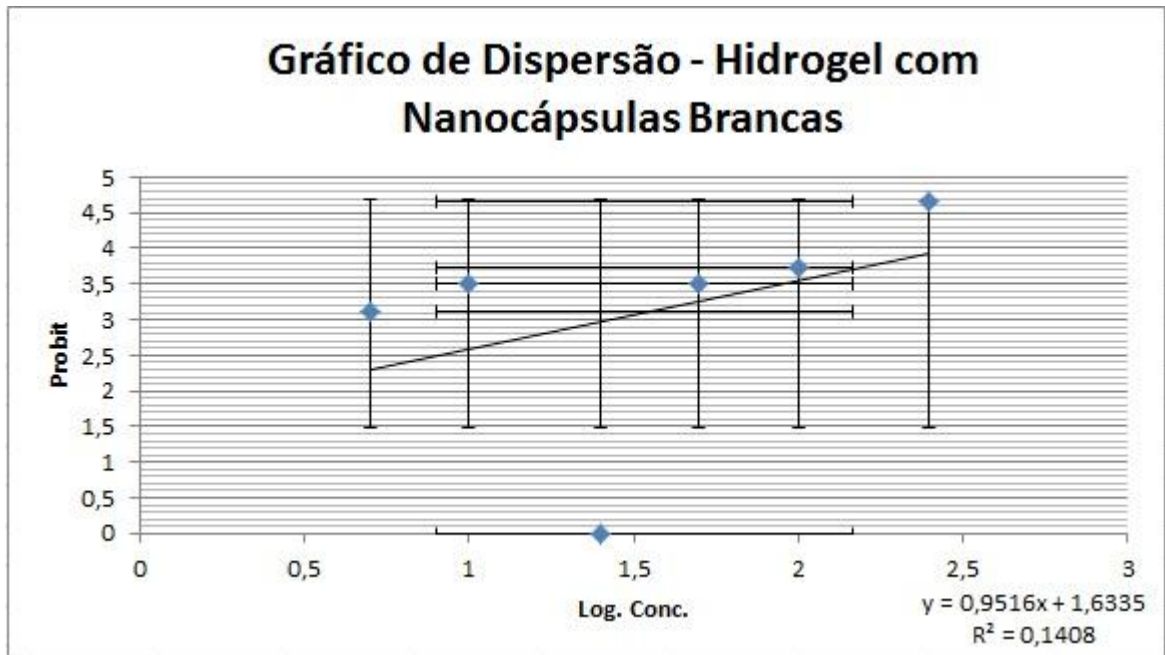


Gráfico 5: Gráfico de dispersão – Hidrogel com Nanocápsulas Brancas.

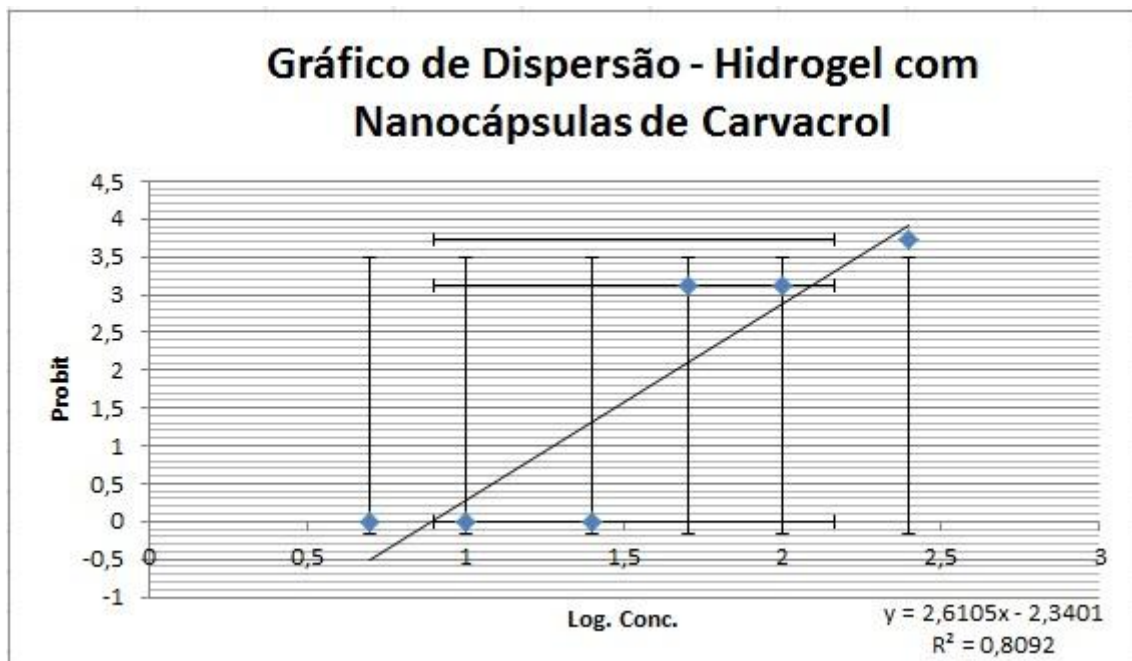


Gráfico 6: Gráfico de dispersão – Hidrogel com Nanocápsulas de Carvacrol.