UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de sistemas precursores de fase cristalina para
administração intrabolsa periodontal**

Kariane Mendes Nunes

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de sistemas precursores de fase cristalina para
administração intrabolsa periodontal**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado(a): Kariane Mendes Nunes.

Orientador(a): Prof. Dr. Osvaldo de Freitas.

***Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 21/12/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nunes, Kariane Mendes.

Desenvolvimento de sistemas precursores de fase cristalina para administração intrabolsa periodontal. Ribeirão Preto, 2012.

128 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Freitas, Osvaldo de.

1. Sistema de liberação intrabolsa periodontal
2. Cristais líquidos.
3. Pseudoplasticidade
4. Viscoelasticidade.
5. Mucoadesão
6. Seringabilidade.

Foto da capa: autoria de Vanessa Brito.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kariane Mendes Nunes.

Desenvolvimento de sistemas precursores de fase cristalina para administração intrabolsa periodontal.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador (a): Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao professor Osvaldo de Freitas, pela
dedicação, gentileza e compromisso
com a formação acadêmica e cidadã,
sobretudo pelo respeito à
singularidade.

À minha linda vovó Zenaide Lopes,
pela sabedoria, cuidado e acima de tudo
pelo exemplo de ser humano que és.

Aos meus pais Ileny e Barbosa, pelo
carinho, educação e apoio incondicional a
todos os sonhos e empreitadas, sempre
juntos com... Karine e Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Osvaldo por me conduzir a construção do conhecimento com sabedoria e compromisso. Além disso, por ser um exemplo não só de pesquisador, educador e professor, mas, sobretudo do grande ser humano que és.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto pelo apoio e incentivos ilimitados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro

Ao Edson técnico do laboratório de materiais da Faculdade de Odontologia, por sua competência, colaboração e dedicação especial em construir novas possibilidades mesmo quando se trata de uma simples execução de técnica.

À Kerry do Brasil que gentilmente nos forneceu o Monolinoleato (Myverol® 18-92K).

Aos técnicos da oficina de precisão pelo bem que fazem transformando nossas pequenas arquiteturas de ideias em verdadeiras obras primas.

À dedicação e cuidado das funcionárias da pós-graduação, em especial a Rosana Florêncio e Eleni Angeli Passos.

À pesquisadora Renata Cristina Kaminski do Instituto de Química de Araraquara pelas colaborações, apoio, trocas e acima de tudo pelo carinho e amizade.

Ao professor Edemilson Cardoso pelo grande incentivo e apoio para realização desse trabalho.

À professora Mônica Freiman pelo apoio e amizade.

À professora Sandra Helena Pulcinelli por disponibilizar o laboratório de Físico-Química de Materiais.

Ao professor Vinícius Pedrazzi pelas contribuições científicas e amizade.

Aos meus queridos amigos de laboratórios cada um em sua singularidade e real importância, Andrea, Camila Cobayashi e Camila Areda, Cristiane, Flávia, Maíra, Mari, Paulinha, Renê, Roberto, e a todos que passaram pelo cotidiano das bancadas, cafés, conversas e vivências.

À grande parceria, apoio e carinho de Paulinha, Andrea e Maíra durante os momentos cruciais para concretização deste trabalho.

Ao Zé Maria, por cuidar tão bem de todos que passam por esse laboratório com carinho e respeito sempre.

Ao Zé pedreiro e Odilon pela amizade e carinho.

Ao Seu Antônio Luís, pelo sorriso de todos os dias na portaria sempre tão solícito, educado e acima de tudo disposto a viver bem pra si e pra todos que por ali percorrem todos os dias.

Às amigas que mudaram o percurso do meu dia a dia em Ribeirão Preto. Dando cor, ar, gargalhadas, pôr do sol, chuva, discussões, apoio, sobretudo pelo real sentido de viver com amor e cuidado. Obrigado Gabriela Bianchi e Vanessa Miller pela amizade.

À amiga Vanessa Brito por ceder sua arte para o trabalho e Verônica pelo apoio e amizade.

A toda minha família pelo apoio, carinho e incentivo demonstrados em todos os momentos.

À prima Paty pelos momentos que dividimos aqui em Ribeirão, apoio e carinho.

Ao tio Lulu, Consola e toda sua família pelos momentos, conversas e apoio durante todos esses anos.

[...] "as ciências permitiram que compreendêssemos muitas certezas. No entanto, elas também ajudaram a revelar as zonas de incertezas. Dessa forma, a política pedagógica precisa converter-se em um instrumento que conduza o estudante a um diálogo criativo com as dúvidas e interrogações do nosso tempo, condição necessária para uma formação cidadã. Não se pode mais ignorar a urgência de universalização da cidadania, que, por sua vez, requer uma nova ética e, por conseguinte, uma escola de educação e cidadania para todos"[...] (MORIN, 1999)

RESUMO

NUNES, K. M. **Desenvolvimento de sistemas precursores de fase cristalina para administração intrabolsa periodontal**. 2012. p.128. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A doença periodontal é uma patogenia que afeta as estruturas de suporte dos dentes com formação da bolsa periodontal, e caso não tratada, em estágios mais avançados o periodonto é destruído, ocasionando perda do dente. O tratamento concerne em duas etapas, à remoção mecânica do biofilme e cálculo dentário por raspagem e alisamento radicular e utilização de antimicrobianos. Ainda é comum a utilização de antimicrobiano de ação sistêmica, embora, tenha eficácia reduzida e frequentes efeitos adversos. Em face disto, justifica-se o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada de fármaco intrabolsa periodontal a fim de sanar os inconvenientes da terapia sistêmica. Contudo, aspectos como espaço anatomofisiológico e fluído gengival crevicular intrínsecos à bolsa, são limitações pertinentes durante o desenvolvimento. Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver sistemas e formulações precursoras de fase líquido cristalina baseados em monolinoleato de glicerila (MLG) e cremophor (CREM) com gelificação *in situ* em fase líquido cristalina. Por meio de planejamento fatorial 3^2 foram obtidos 9 sistemas sem adição de fármaco e 9 formulações contendo metronidazol com diferentes razões de MLG/CREM e %H₂O. Quando caracterizados por microscopia de luz polarizada e espalhamento de raios-X a baixo ângulo, os sistemas e formulações com menor razão MLG/CREM e conteúdos de água de 5, 10 e 15% apresentaram organização micelar isotrópica. Eles também apresentaram rápida erosão no ensaio de captação de água, inviabilizando sua transição para mesofase. Os sistemas e formulações com média e alta razão MLG/CREM e conteúdos de água de 5, 10 e 15% apresentaram coexistência de fases em transição líquido cristalina. Apresentaram rápida captação de água com transição para fase cúbica. Contudo, com exceção do sistema e formulação com alta razão MGL/CREM e 15% de água, os demais sistemas e formulações, apresentaram propriedades de fluxo ideais para fácil aplicação por seringa acoplada a agulha, e comportamento viscoelástico adequado para promover espalhabilidade e retenção no interior da bolsa. Os sistemas e formulações com média e alta razão de MLG/CREM apresentaram melhor mucoadesão. Dentre as formulações, apenas a com média razão de GML/CREM e 5% de água, apresentou perfil bi-modal de liberação mantendo concentrações de metronidazol acima do MIC por 6 dias, característica desejável para sistemas de liberação intrabolsa periodontal. Portanto, todos os resultados advogam a favor desta formulação como potencial candidata ao emprego clínico como sistema de liberação de fármaco intrabolsa periodontal.

Palavras-chave: Sistemas de liberação intrabolsa periodontal, Cristais líquidos, Pseudoplasticidade, Viscoelasticidade, Mucoadesão, Seringabilidade.

ABSTRACT

NUNES, K. M. **Development of precursors crystalline phase for intra pocket periodontal administration**. 2012. p.128. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Periodontal disease is a chronic infection that affects the structural supports of the tooth with periodontal pocket formation. If untreated, the periodontium may be destroyed, which can cause the tooth loss in the latest stages of the disease. The treatment for this infection comprises two stages, the mechanical removal of plaque and calculus by scaling and root planing and the use of antimicrobials. It is still common to use systemic antimicrobials, even though it has a reduced efficacy and frequent adverse effects. For the reason, justified the development of systems for sustained release of drug intra-pocket periodontal in order to solve the drawbacks of systemic therapy. The main limitations for the development of these systems are the anatomical and physiological aspects of the periodontal pocket, which includes the limited size and the depth area and the natural irrigate flow of the gingival crevice fluid (GCF). So, this study aimed to develop precursor liquid crystalline systems and formulations based on glyceryl monolinoleate (GML) and cremophor (CREM), with *in situ* gelation to liquid crystalline phases. Through a 3^2 factorial design 9 systems without drug and 9 formulations containing metronidazole were obtained. Different ratios of GML / CREM and water percentage were evaluated. When characterized by Small-Angle X-ray Scattering and Polarized Light Microscopy, lower ratio GML / CREM with 5, 10 and 15% H₂O produce isotropic micellar organization. They also showed high erosion during water uptake, thus, precluding *in situ* crystalline transition. Medium and high ratio GML / CREM with 5, 10 and 15% H₂O indicated the coexistence of regions in transition to the crystalline phase. They showed characteristic peaks of cubic phases, rapid water uptake, higher viscosity and increased mucoadhesion. Moreover, with the exception of the formulation containing high ratio and high water content, other systems and formulations with medium ratio GML / CREM and 5, 10, 15% of water and high ratio and 5 and 10% of water had flow properties ideal for easy application through needle fitted syringes, viscoelastic behavior appropriate to promote spreadability and might favor retention within the periodontal pocket. However, only the formulation with higher ratio and the lowest water content presented a bimodal release profile of metronidazole, maintaining concentrations above the MIC for 5 days, with the release of 100% of the drug added to the formulation. These are desirable features for delivery systems designed for periodontal pockets. Therefore, all results advocate in favor of the formulation with high ratio of GML / CREM and 5% of water as a potential candidate for clinical use as drug delivery system for the periodontal pocket.

Key words: Intra-pocket drug delivery systems, Liquid Crystals, Shear tinning, Viscoelasticity, Mucoadhesion, Syringeability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do periodonto sadio (lado esquerdo) e com periodontite (lado direito).....	3
Figura 2. Modelos de dispositivos intrabolsa periodontal. (A) fibras, (B) filmes e (C) sistemas injetáveis.....	5
Figura 3. Estrutura química do monolinoleato de glicerila.	10
Figura 4. Ilustração para o teste de seringabilidade.....	20
Figura 5. Representação esquemática do ensaio de mucoadesão (<i>ex vivo</i>). (1) Máquina Universal de Ensaio. (2) Banho termostático. (3) Acessório: suporte de alumínio com encaixe para placas de acrílico (a) superior e (b) inferior, e (c) placas de acrílico. (4) Fotos representativas do ensaio em modo de compressão e modo de tensão.....	21
Figura 6. Composição da saliva artificial (NAKAMOTO, et al., 1979).	22
Figura 7. Dispositivo mimetizador das condições da bolsa periodontal para estudo de dissolução <i>in vitro</i> . Constituído de: (a) reservatório de solução tampão; (b), banho termostático; (c), célula de liberação; (d), tubo coletor; (e), reservatório de água para o banho termostático; (f), painel de controle de temperatura e fluxo.	24
Figura 8. Fotomicrografia dos sistemas e formulação contendo 10% de água, quando observado ao microscópio de luz polarizada (20x). Painel A, sistema S2, razão MLG/CREM (0,25), Painel B, sistema S5, razão MLG/CREM (2,1), Painel C, sistema S8, razão MLG/CREM (4,0), Painel D, formulação F5, razão MLG/CREM (2,1).....	28
Figura 9. Fotomicrografia dos sistemas contendo 10% de água, quando observado ao microscópio de luz polarizada (20x). Painel A razão MLG/glicerina (2,1). Painel B, razão MLG/polietilenoglicol (2,1).	28
Figura 10. Curvas das intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS para sistemas e formulações com razão MLG/CREM (0,25) e conteúdos de água de 5% S1-F1 (A), 10% S2-F2 (B) e 15% de água S3-F3 (C). A seta indica o pico com valor de $q = 1,30\text{nm}^{-1}$	31
Figura 11. Curvas das intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS para sistemas e formulações com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água de 5% S4-F1 (A), 10% S5-F5 (B) e 15% de água S6-F6 (C). Curva de SAXS obtida para o monolinoleato de glicerila (Myverol® 18-92k) (D). A seta indica o pico com valor de $q = 1,30\text{nm}^{-1}$	32

- Figura 12. Curvas das intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS para sistemas e formulações com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água 5% S7-F7 (A), 10% S8-F8 (B) e 15% de água S9-F9 (C). A seta mostra o pico com valor de $q = 1,30\text{nm}^{-1}$ 33
- Figura 13. Curvas da intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS e fotomicrografias representativas (MLP) de sistemas e formulações após ensaio de captação de água a 25°C . Curvas de SAXS S4-F4 (A), S5-F5 (B), S6-F6 (C) e fotomicrografias de S4 e F4 no topo da figura. 34
- Figura 14. Curvas da intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS e fotomicrografias representativas (MLP) de sistemas e formulações após ensaio de captação de água a 25°C . Curvas de SAXS S7-F7 (A), S8-F8 (B), S9-F9 (C) e fotomicrografias de S7 e F7 no topo da figura. 35
- Figura 15. Curva analítica de metronidazol em tampão fosfato pH 7. 36
- Figura 16. Curva analítica do metronidazol em etanol. 37
- Figura 17. Percentual de captação de água dos sistemas em função do tempo (horas) em excesso de tampão fosfato (pH 7.0). Os dados representam a média $\pm$ D.P, $n = 3$. 38
- Figura 18. Cinética de captação de água dos sistemas. Os gráficos obtidos a partir da (Eq.4) de primeira ordem estão apresentados nos painéis (a) e (b). Os gráficos obtidos a partir da (Eq.5) de segunda ordem estão apresentados nos painéis (c) e (d) ($n = 3$, D.P $< 0,05$). 41
- Figura 19. Percentual de captação de água das formulações em função do tempo (horas) em excesso de tampão fosfato (pH 7.0). Os dados representam a média $\pm$ D.P, $n = 3$ 42
- Figura 20. Cinética de captação de água das formulações. Os gráficos obtidos a partir da equação (Eq. 4) de primeira ordem estão apresentados nos painéis A e B. Os gráficos obtidos a partir da equação (Eq. 5) de segunda ordem estão apresentados nos painéis B e C ($n = 3$, D.P $< 0,05$). 44
- Figura 21. Reogramas de fluxo dos sistemas S1(●), S2(■) e S3(▲) nas temperaturas de 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%. 47
- Figura 22. Reogramas de fluxo dos sistemas S4(●), S5 (■) e S6 (▲) a 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%. 49

Figura 23. Reogramas de fluxo dos sistemas S7(●), S8 (■), S9 (▲) a 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.	50
Figura 24. Reogramas de fluxo do monolinoleato de glicerila (■) Cremophor® (●) puros a 25°C. As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.	52
Figura 25. Superfície de resposta do índice de consistência (k) a 25°C dos sistemas.	54
Figura 26. Superfície de resposta do índice de fluxo (n) a 25°C dos sistemas.	55
Figura 27. Superfície de resposta do índice de consistência (k) a 37°C dos sistemas.	55
Figura 28. Superfície de resposta do índice de fluxo (n) a 37°C dos sistemas.	56
Figura 29. Reogramas de fluxo das formulações F1(●), F2(■) e F3(▲) nas temperaturas de 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.	57
Figura 30. Reogramas de fluxo das formulações F4(●), F5(■) e F6(▲) nas temperaturas de 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.	59
Figura 31. Reogramas de fluxo das formulações F7(●), F8(■) e F9(▲) nas temperaturas de 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.	61
Figura 32. Superfície de resposta do índice de consistência (k) a 25°C das formulações.	63
Figura 33. Superfície de resposta do índice de consistência (k) a 37°C das formulações.	63
Figura 34. Superfície de resposta do índice de fluxo (n) a 25°C das formulações.	64
Figura 35. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda em função da frequência para os sistemas S1, S2 e S3 com razão MLG/CREM (0,25) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).	66
Figura 36. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para os sistemas S4, S5 e S6 com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).	67

Figura 37. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para os sistemas S7, S8 e S9 com razão MLG/CREM (4,0) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).	69
Figura 38. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para os sistemas S1, S4 e S7 a 25 °C. Os módulos G' e G'' estão representados pelos símbolos fechados e abertos, respectivamente.	71
Figura 39. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda em função da frequência para as formulações F1, F2 e F3 com razão MLG/CREM (0,25) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).	73
Figura 40. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para as formulações F4, F5 e F6 com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).	74
Figura 41. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para as formulações F7, F8 e F9 com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).	75
Figura 42. Força mínima necessária para iniciar o movimento do êmbolo em seringa de plástico e seringa de vidro vazia. Cada valor representa a média de cinco réplicas, com coeficiente de variação menor que 10%.	77
Figura 43 Influencia da utilização da seringa acoplada com agulha sobre a força necessária para iniciar o fluxo de um sistema (S8) pela seringa. Cada valor representa a média de cinco réplicas, com coeficiente de variação menor que 10%.	77
Figura 44. Efeito do diâmetro da agulha sobre a força requerida para iniciar o fluxo (extrusão) do sistema (S7) pela seringa.	79
Figura 45. Superfície de resposta do trabalho de seringabilidade dos sistemas.	80
Figura 46. Efeito do diâmetro da agulha sobre a força requerida para iniciar o fluxo (extrusão) da formulação (F7) pela seringa.	81
Figura 47. Superfície de resposta do trabalho de seringabilidade das formulações.	83
Figura 48. Influencia de diferentes forças de contato, por tempo fixo, sobre a força de destacamento do sistema.	85
Figura 49. Forças de destacamento adquirida no ensaio mucoadesão (<i>ex vivo</i>) para formulação F8 sob duas condições: mucosa imersa (-) ou não imersa (-) em saliva artificial, mantida á 37°C.	85
Figura 50. Regiões onde a ruptura (falha) da ligação mucoadesiva pode ocorrer, adaptado de Smart, (2005).	88
Figura 51. Superfície de resposta da força de destacamento dos sistemas.	90
Figura 52. Superfície de resposta do trabalho de mucoadesão dos sistemas.	90

Figura 53. Esquema ilustrativo das inter-relações sugeridas no estudo <i>ex vivo</i> de mucoadesão. (A) Forças de destacamento das formulações, monolinoleato e mucosa-mucosa. (B). Perfil de captação de água das formulações (F4, F5, F6, F7, F8 e F9). (C) curvas de SAXS das formulações, F4 (-) F7 (-) após captação de água.	92
Figura 54. Superfície de resposta da força de destacamento das formulações.....	94
Figura 55. Superfície de resposta do trabalho de mucoadesão das formulações.....	94
Figura 56. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F1 (○) F2 (□), F3 (Δ) e Metronidazol (■). Os dados representam a média ± D.P., n = 3.	97
Figura 57. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F4 (□) F5 (Δ) e F6 (○). Os dados representam a média ± D.P., n = 3.	97
Figura 58. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F7 (□) F8 (○) e F9 (Δ). Os dados representam a média ± D.P., n = 3.	98
Figura 59. Efeito da viscosidade e transição para fase líquido cristalina sob o perfil de liberação <i>in vitro</i> (condição ‘sink’) do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C. (A) Perfil de liberação das formulações F1 (Δ), F4 (○) e F7 (◇). (B) Viscosidades aparentes e (C) curvas de SAXS das formulações F1 (-), F4 (-) e F7 (-), após captação de água.	99
Figura 60. Superfície de resposta do perfil de liberação <i>in vitro</i> do metronidazol (μg/mL) em 6 horas.	101
Figura 61. Superfície de resposta do perfil de liberação <i>in vitro</i> do metronidazol (μg/mL) em 24 horas.	101
Figura 62. Gráfico do log da quantidade de fármaco remanescente em função do tempo para formulações F1-F3 (a), F4-F6 (b) e F7-F9 (c). Gráficos da quantidade de fármaco liberada em função da raiz quadrada do tempo formulações F1-F3 (d), F4-F6 (e) e F7-F9 (f).	105
Figura 63. Gráficos da liberação fracional do metronidazol (M_t/M_∞) em função do tempo para as formulações segundo modelo de Ritger-Peppas (1987).	106
Figura 64. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F1 (■) F2 (▲) e F3 (●). Os dados representam a média ± D.P., n = 3.	107
Figura 65. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F4 (■) F5 (▲) e F6 (●). Os dados representam a média ± D.P., n = 3.	108

- Figura 66. Perfil de liberação *in vitro* do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F7 (■) F8 (▲) e F9 (●). Os dados representam a média $\pm$ D.P., n = 3. 109
- Figura 67. Concentração de metronidazol ($\mu\text{g/mL}$) liberado em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir da formulações em função do tempo (dias). Os dados representam a média $\pm$ D.P., n = 3. 109
- Figura 68. Superfície de resposta do ‘burst’ de metronidazol ($\mu\text{g/mL}$) em 24 horas a partir das formulações. 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal.....	5
Tabela 2. Planejamento fatorial completo $3^2 + 2$	15
Tabela 3. Especificações das agulhas hipodérmicas.	19
Tabela 4. Valores dos percentuais de captação de água obtidos para os sistemas em 24 horas.	39
Tabela 5 Parâmetros cinéticos do perfil de captação de água dos sistemas. Calculados por meio dos valores gerados pela adequação ao modelo cinético de segunda ordem (Eq. 5).....	40
Tabela 6. Valores dos percentuais de captação de água obtidos para as formulações em 24 horas.	43
Tabela 7. Parâmetros cinéticos do perfil de captação de água das formulações. Calculados por meio dos valores gerados pela adequação ao modelo cinético de segunda ordem (Eq. 5).	43
Tabela 8. Valores obtidos para o índice de consistência (k) e de fluxo (n) dos sistemas.....	48
Tabela 9. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o índice de consistência (k) dos sistemas a 25 e 37°C.....	53
Tabela 10. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o índice de fluxo (n) dos sistemas a 25 e 37°C.	53
Tabela 11. Valores obtidos para o índice de consistência (k) e de fluxo (n) das formulações.....	58
Tabela 12. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o índice de consistência (k) das formulações a 25 e 37°C.....	62
Tabela 13. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o índice de fluxo (n) das formulações a 25°C.	62
Tabela 14. .Efeito da razão MLG/CREM e conteúdo de água sobre o trabalho necessário para extrusão dos sistemas por meio de seringa acoplada com agulha (seringabilidade).....	79
Tabela 15. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para trabalho de seringabilidade dos sistemas.	80
Tabela 16. .Efeito da razão MLG/CREM e conteúdo de água sobre o trabalho necessário para extrusão das formulações por meio de seringa acoplada com agulha (seringabilidade).....	82

Tabela 17. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para trabalho de seringabilidade das formulações.	82
Tabela 18. Força de destacamento e trabalho de mucoadesão obtido para os sistemas.	87
Tabela 19. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para a força de destacamento e trabalho de mucoadesão dos sistemas.	89
Tabela 20. Força de destacamento e trabalho de mucoadesão obtido para as formulações.	91
Tabela 21. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para a força de destacamento e trabalho de mucoadesão das formulações.	93
Tabela 22. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para a liberação <i>in vitro</i> do metronidazol (%) em 6 horas a partir das formulações.	100
Tabela 23. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para a liberação <i>in vitro</i> do metronidazol (%) em 24 horas a partir das formulações.	100
Tabela 24. Coeficiente de correlação (r^2) obtido a partir dos dados de liberação das formulações no intervalo de 6 horas para diferentes modelos cinéticos.	103
Tabela 25. Expoente de liberação (n) obtido para as formulações no intervalo de 6 horas segundo modelo de Ritger-Peppas (1987).	104
Tabela 26. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o ‘burst’ do metronidazol ($\mu\text{g/mL}$) a partir das formulações.	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SLIBP -	Sistemas de liberação intrabolsa periodontal
MLG/CREM -	Monolinoleato de glicerila/ Cremophor EL [®]
G' -	O módulo elástico ou armazenamento
G'' -	Módulo de perda
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
EHL -	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
Tan δ -	Tangente de perda
SAXS -	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
MLP -	Microscopia de luz polarizada

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença periodontal.....	1
1.2 Sistemas de liberação intrabolsa periodontal.....	3
1.2.1 Fibras	6
1.2.2 Filmes	6
1.2.3 Sistemas seringáveis	7
1.2.4 Sistemas líquido cristalinos	8
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Material.....	14
3.2 Métodos	14
3.2.1 Planejamento experimental.....	14
3.2.2 Preparo dos sistemas e das formulações precursoras de fase cristalina	15
3.2.3 Microscopia de luz polarizada.....	16
3.2.4 Espalhamento de raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	16
3.2.5 Curva analítica e validação do método de quantificação do metronidazol	16
3.2.6 Teor de metronidazol.....	16
3.2.7 Estudo da captação de água	17
3.2.8 Análise reológica de cisalhamento contínuo	17
3.2.9 Análise reológica oscilatória	18
3.2.10 Estudo de Seringabilidade	18

3.2.10.1 Padronização do tipo de seringa e importância do uso da agulha no ensaio de seringabilidade.....	19
3.2.10.2 Determinação da força mínima e do trabalho requerido para extrusão dos sistemas e das formulações pela seringa (Seringabilidade)	19
3.2.11 Estudo de mucoadesão (<i>ex vivo</i>).....	20
3.2.12 Estudo de dissolução <i>in vitro</i> em condições ‘sink’ e não ‘sink’	22
3.2.12.1 Condições ‘sink’	22
3.2.12.2 Estudo da cinética de dissolução em condições ‘sink’	22
3.2.12.3 Condições não ‘sink’	24
3.3 Análise estatística	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Microscopia de luz polarizada.....	26
4.2 Espalhamento de raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	29
4.3 Validação do método de quantificação do metronidazol.....	36
4.4 Teor real de metronidazol.....	36
4.5 Estudo de captação de água	37
4.6 Análise reológica de cisalhamento contínuo.	45
4.7 Análise reológica oscilatória	64
4.8 Determinação do trabalho necessário para extrusão da formulação pela seringa (Seringabilidade)	76
4.9 Estudo ‘ex vivo’ de mucoadesão	83
4.10 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> do metronidazol	95
4.10.1 Perfil de dissolução <i>in vitro</i> do metronidazol em condição ‘sink’	95
4.10.2 Estudo do mecanismo de liberação	102
4.10.3 Perfil de dissolução <i>in vitro</i> do metronidazol em condição não ‘sink’	107
5 CONCLUSÕES.....	113
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de sistema de liberação modificada de fármaco (SLMF) é relativamente recente. Os primeiros protótipos surgiram em meados do século passado. Desde então, inúmeros sistemas de liberação modificada foram delineados. Os SLMF podem ser classificados em duas categorias; a) os de liberação imediata, geralmente de administração via sub-lingual, utilizados em quadros clínicos que necessitam de intervenção imediata tais como nos casos de crise de angina, de hipertensão, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral e, b) os de liberação lenta, nos quais é desejável que inicialmente seja liberado fármaco em quantidade suficiente para atingir a dose terapêutica e em seguida seja liberadas doses de manutenção em função dos eventos farmacocinéticos. Quando este objetivo é alcançado, modular a velocidade e extensão de liberação de acordo com a necessidade clínica, considerando os eventos farmacocinéticos é esperado que os níveis plasmáticos do fármaco se mantenham estáveis, e com isto, redução de efeitos colaterais/adversos, da dose ou frequência de administração. Este conjunto contribui com a maior aderência ao tratamento e consequentemente maior eficácia da farmacoterapia (ROBINSON; LEE, 1987) (KUMAR et al., 2010; CHIEN, 1992).

Os sistemas de liberação lenta podem ser administrados por várias vias e veicular, tanto fármacos destinados à ação sistêmica, quanto aqueles de ação tópica local. Dentre estes terá destaque os de administração via bucal, e mais especificamente intrabolsa periodontal (SLIBP).

1.1 Doença periodontal

Doença periodontal é causada pelo acúmulo de biofilme no periodonto (JONES et al 1996, MONBELLI, 2003), sendo o estágio inicial conhecido como gengivite. O biofilme acumulado induz resposta inflamatória tornando a gengiva avermelhada, edemaciada e pode sangrar quando levemente tocada (MEDLICOTT et al , 1994), A gengivite é bastante comum e facilmente tratada, porém se não tratada, evolui para periodontite (LISTGARTEN, 1986). Neste caso, a inflamação atinge outros tecidos de sustentação, como o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar. O epitélio juncional da gengiva se desprende do cemento e migra pela superfície do dente, resultado na formação da bolsa periodontal, cujo avanço provoca a

exposição da raiz, aumento da mobilidade do dente e sua perda, se não tratada (SOSKOLON; FRIEDAN, 1996; CARRANZA, 2004; PIHLSTROM et al., 2005).

Em regiões saudáveis, o espaço entre a gengiva e o dente é muito estreito, sendo denominado sulco gengival, cuja profundidade é de até 3 mm, Figura 1, à esquerda. Na doença periodontal, com a migração do epitélio juncional em direção à raiz, essa profundidade pode variar de 4 a 12mm, (MEDLICOTT et al., 1994), Figura 1, à direita. Tanto o sulco gengival quanto a bolsa periodontal são constantemente lavados pelo fluido gengival crevicular, que flui do tecido gengival, passa pelo sulco, ou pela bolsa, e cai na cavidade oral. Sua composição é semelhante à do plasma, mas seus constituintes estão em menor concentração. O volume de fluido crevicular no sulco gengival é 0,04uL e seu fluxo é de 0,03uL/min. Na bolsa periodontal, o volume e o fluxo aumentam para 0,5uL e 0,5 uL/min respectivamente (HATTING, HO, 1980), podendo chegar a 150uL/h (STEINBERG, FRIEDMAN, 1988).

Aproximadamente 40% da população mundial é portadora de doença periodontal, cuja prevalência é maior que a do câncer doenças cardiovasculares e artrite reumatoide, (Júnior et al., 2007; SABA-CHUJFI et al., 2007; SALLUM et al., 2007; ARAÚJO; SUKEKAVA, 2007). Além disso, tem sido associada à incidência de parto prematuro (JAIN et al., 2008). A incidência é de duas a três vezes maiores, em portadores de diabetes tipo I (SALVI et al., 1998; Stein et al., 1997). A periodontite severa (bolsa periodontal) é responsável por 5 a 15% da perda de dente na população mundial (WHO, 2003; PETERSEN, 2003).

Figura 1. Representação do periodonto sadio (lado esquerdo) e com periodontite (lado direito).

O tratamento tem como finalidade a cura do tecido inflamado, redução do número de bactérias patogênicas (biofilme) e eliminação da bolsa (Steingerb e Freidman, 1988). Tradicionalmente, consiste na remoção mecânica do biofilme e cálculo supra gengival por meio de procedimentos de raspagem e alisamento radicular associado ou não ao controle da microbiota por meio de terapias adjuvantes como higiene bucal e uso de agentes antimicrobianos de ação sistêmica ou local (BRUSCHI et al., 2006; FRIEDMAN, 1988; MEDLICOTT et al., 1994; STEINBERG; VYAS; SIHORKAR; MISHRA, 2000). Porém, antibioticoterapia sistêmica tem demonstrado eficácia reduzida, frequentes efeitos adverso, além de ocorrência de resistência bacteriana. A somatória desses eventos tende a reduzir a adesão do paciente ao tratamento, representando fator limitante (HERRERA, et al., 2012)

1.2 Sistemas de liberação intrabolsa periodontal

O interesse na pesquisa e desenvolvimento de sistemas/dispositivos de liberação tópico/local de antimicrobianos intrabolsa periodontal ocorreu em meados dos anos 1970,

motivado pelos inconvenientes da terapia sistêmica. Estes sistemas/dispositivos devem ter como características básicas controlar ou manter a concentração do fármaco, em quantidade igual ou superior ao CIM, no interior da bolsa durante período de tempo relativamente longo, considerando as restrições anatomofisiológica do local de administração (BRUSCHI et al., 2006; STEINBERG; FRIEDMAN, 2000).

A bolsa periodontal é um local definido circundado por tecidos mole e duro formando um reservatório natural que permite a inserção de um dispositivo de liberação. A presença de um fluxo crevicular gengival (FCG) proporciona contínua lavagem do dispositivo, contribuindo para disponibilização ou liberação do fármaco. Portanto, a localização, anatomia e fisiologia da bolsa periodontal são requisitos que a tornam local apropriado para o emprego de SLIBP com potenciais vantagens.

Os primeiros sistemas/dispositivos foram desenvolvidos a partir de polímeros não biodegradáveis, cujo racional era proporcionar liberação prolongada do fármaco (ADDY et al., 1982). Porém, com o inconveniente, entre outros, de dificultar a regeneração e adesão do tecido, requerer a retirada do dispositivo após o término do tratamento, reduzindo a adesão do paciente ao tratamento. Em seguida, uma nova geração de dispositivos intrabolsa periodontal começou a ser delineado e desenvolvido a partir de polímeros biodegradáveis (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996 STEINBERG; FRIEDMAN, 2000). Estes trouxeram uma série de vantagens em relação aos não biodegradáveis.

Dentre as vantagens, destaca-se a promoção da adesão do paciente ao tratamento, uma vez que, não há necessidade de retorno para retirada do dispositivo intrabolsa periodontal. Devido sua biodegradabilidade, não afetam a regeneração do tecido periodontal, permitindo a redução da profundidade da bolsa. Reduz e/ou elimina o risco de rejeição acompanhada de inflamação local, devido à resposta do sistema imune quando há o reconhecimento do próprio dispositivo como um corpo estranho. Além disso, a completa degradação da matriz do sistema de liberação garante a liberação integral do conteúdo de fármaco adicionado (BRUSCHI et al., 2006; MEDLICOTT et al., 1994; PRAGATI; ASHOK; KULDEEP, 2009; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996).

Dentro do grupo das categorias de dispositivos não biodegradáveis e biodegradáveis, inúmeros modelos de dispositivo têm sido pesquisados e desenvolvidos. Dentre os quais se destacam as fibras, filmes, e sistemas seringáveis. Na Tabela 1 são listados alguns desses dispositivos de liberação intrabolsa periodontal disponibilizados comercialmente. Suas

aplicações na bolsa periodontal podem ser visualizadas no esquema representativo da Figura 2. Maiores detalhes sobre os modelos de dispositivos supracitados serão detalhados a seguir.

Figura 2. Modelos de dispositivos intrabolsa periodontal. (A) fibras, (B) filmes e (C) sistemas injetáveis.

Tabela 1. Lista de sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal.

Nome Comercial	Forma Farmacêutica	Composição	Fármaco	Perfil de Biodegradabilidade / Período de liberação
Actisite [®] (Alza Corp. USA).	Fibras monolíticas	Copolímero etileno vinil acetato	Tetraciclina	Não-biodegradável, 9 dias
PerioChip [®] (Perio Products, Jerusalam, Israel)	Filme	Gelatina Hidrolisada / glicerina	Gluconato de clorexidina	Biodegradável, 6-9 dias
Atrigel [®] (Atrix Lab.USA)	Gel	HEC/ copolímero de aminoalquil metacrilato	Minociclina	Biodegradável 2 dias
Dentomycin [®] (Lederle Lab.USA)	Gel	PLA + NMP	Doxiciclina	Biodegradável 7 dias
Elyzol [®] (Dumex-Alpha Lab. USA)	Gel	Monoleína + óleo de sésamo	Benzoato de Metronidazol	Biodegradável 3 dias

1.2.1 Fibras

O primeiro sistema de liberação de fármaco intrabolsa periodontal foi desenvolvido por Goodson et al. (1979) a partir de tubos de diálise de acetato de celulose (diâmetro = 250 μ m) preenchidos com tetraciclina, cuja liberação do fármaco (95%) ocorreu em duas horas. Apesar de não proporcionar liberação lenta, este foi utilizado protótipo para o desenvolvimento de outros sistemas de liberação (ADDY et al., 1982; GOLOMB; FRIEDMAN, 1980; GOODSON et al., 1983). Posteriormente, Goodson avaliou a liberação de tetraciclina incorporada em fibras compostas por diferentes polímeros: polietileno, polipropileno, policaprolactona, poliuretano, acetato-propionato de celulose e etileno vinil acetato (GOODSON et al., 1983). Fibras de etileno vinil acetato mantiveram níveis de tetraciclina acima de 600 μ g/mL no fluido crevicular gengival por 10 dias, seguindo cinética de liberação de zero ordem (GOODSON et al., 1983; TONETTI; CUGINI; GOODSON, 1990). Em face disto, esse dispositivo teve sua comercialização pela Alza Corporation, Palo Alto, Califórnia, com o nome de Actisite®.

As principais desvantagens foram: o tempo relativamente longo (7-10 min) para a inserção da fibra; não biodegradabilidade das fibras e a necessidade de fechar a abertura da bolsa com cola (cianoacrilato) para manter a fibra na cavidade; retirada do dispositivo. Em tempo pré-determinado, reduzindo a adesão do paciente ao tratamento (GOODSON, 1994; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996).

1.2.2 Filmes

São sistemas de liberação em que o fármaco está distribuído por toda matriz do polímero, e a liberação do fármaco ocorre por difusão e/ou a dissolução ou erosão pela matriz (PRAGATI; ASHOK; KULDEEP, 2009; VYAS; SIHORKAR; MISHRA, 2000). Os filmes apresentam propriedades físicas que facilitam sua aplicabilidade. As dimensões e forma dos filmes podem ser facilmente manipuladas de acordo com as dimensões da bolsa a ser tratada. Sua inserção é simples e rápida, com mínimo desconforto para o paciente. Dependendo da espessura (< 400 μ m) e propriedades adesivas do filme, sua retenção não será prejudicada pelos hábitos de higiene e/ou funções mastigatórias da cavidade bucal (SOSKOLONE, FREIDMAN, 1996).

Os filmes podem ser obtidos a partir de polímeros degradáveis ou não. Estudos realizados por Addy et al. (1982) demonstraram que filmes obtidos a partir de

metilmetacrilato (não biodegradáveis) contendo diferentes concentrações de tetraciclina, metronidazol ou clorexidina, apresentaram níveis terapêuticos dos três fármacos que se estenderam por até 14 dias. Contudo, os perfis de liberação foram dependentes da solubilidade e concentração do fármaco.

Filmes de etilcelulose contendo clorhexidina, metronidazol, tetraciclina e minociclina, proporcionaram liberação sustentada dos fármacos que variaram entre 10 a 200 dias, em função do solvente utilizado, plastificantes e concentração do fármaco (JAIN et al., 2008; SOSKOLNE et al., 1983).

Entretanto, por se tratar de filmes não biodegradáveis apresentam limitação comum às fibras, que é a necessidade de remoção e substituição, em consultório, durante o tratamento. Além disso, estudos clínicos sugerem a associação da presença do dispositivo não biodegradável com redução da evolução dos parâmetros clínicos relacionados à bolsa periodontal (VYAS et al., 2000).

Devido às limitações dos filmes obtidos a partir de polímeros não biodegradáveis, maior ênfase tem sido dada aos biodegradáveis. Filmes obtidos a partir de proteína de peixe sustentaram a liberação de clorexidina pelo período de 04 a 80h (SEINBERG et al. (1990), sendo comercializado como Byco[®].

O Periochip, comercializado pela Perio Products Ltd, de Jerusalém, Israel, composto por gelatina hidrolisada e glicerina, demonstrou em ensaios clínicos liberação bimodal do fármaco, com efeito 'burst' (200µg/mL) no intervalo de duas horas após sua aplicação, em seguida com liberação sustentada de concentrações acima da concentração mínima inibitória de clorexidina (125µg/mL) por 6 a 9 dias (SOSKOLNE et al., 1998.; STANLEY et al., 1989)

1.2.3 Sistemas seringáveis

Sistemas intrabolsa periodontal seringáveis são potencialmente promissores quando comparado aos demais tipos de dispositivos. Devido à facilidade e rapidez da aplicação, no interior da bolsa, utilizando seringa, sem causar desconforto ou dor ao paciente. Requisitos fundamentais para a aplicabilidade clínica e sucesso de um dispositivo intrabolsa periodontal (BRUSCHI et al., 2006; JONES et al., 1997; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996). Estas características contribuem com a aceitação e possivelmente com a redução dos custos do tratamento (ABDELLAOUIA; CASTIONIB; GURNY, 2000; PRAGATI; ASHOK; KULDEEP, 2009).

Estas formulações devem ter propriedades de fluxo que possibilite o mínimo de esforço na aplicação e a distribuição por todo o interior da bolsa. Para sua retenção, a formulação pode possuir boa adesividade ou passar por mudança de fase após aplicação. A somatória desses eventos evita que a formulação seja lavada pelo fluido crevicular gengival (BRUSCHI et al., 2006; JONES et al., 1997; JONES et al., 2009; MALMSTEM, 2006; NEEDLEMAN; SMALES, 1995; VYAS; SIHORKAR; MISHRA, 2000).

O conhecimento do comportamento reológico destes sistemas é importante, visando prever seu comportamento em situações que ocorrem *in vivo*, como à resistência ao fluxo líquido crevicular, ao cisalhamento oscilatório (stress) durante a mastigação (GAVIN et al., 2006). Assim candidatos promissores devem apresentar comportamento de fluxo do tipo pseudoplástico com moderada tixotropia e cisalhamento oscilatório em torno de 5 Hz (JONES et al., 1997; BRUSCHI et al., 2006; ANDREWS et al., 2006). Essas características são necessárias para fácil extrusão, em seringa acoplada com agulha, rápida reestruturação após aplicação, a fim de reter a formulação dentro da bolsa (BRUSCHI; FREITAS, 2005). Propriedades viscoelásticas irão possibilita o espalhamento e retenção dos sistemas no local de aplicação. Além disso, essas propriedades tem forte influencia no perfil de liberação do fármaco (JONES et al., 1997) e mucoadesão (ANDREWS; JONES, 2009; JONES et al., 2000; WONG et al., 1999; NEEDLEMAN; SMALES, 1995) de sistemas semi-sólidos..

1.2.4 Sistemas líquido cristalinos

Fases líquido cristalinas podem ser empregadas como sistemas de liberação intrabolsa periodontal, pois, são capazes de incorporar grandes quantidades de fármacos de diferentes propriedades físico-químicas, além disso, podem ser modulados quanto suas propriedades de fluxo e viscoelásticas (PATEL; PATEL, 2010; GUO et al., 2010). Contudo, a alta viscosidade de mesofases pode dificultar o manuseio e administração desses sistemas, neste contexto, é que surge o interesse em se obter primeiramente precursores de fase cristalina com baixa viscosidade, de fácil preparo e administração, e quando *in situ* transitam para mesofases com alta viscosidade. Existem inúmeros fatores os quais podem ser usados para desencadear tais transições *in situ*, como temperatura, captação de água, força iônica, pH e concentrações de íons cálcio e outros específicos solutos e metabólitos (MALMSTEN, M., 2006).

Cristais líquidos são estados intermediários ou mesofases que combinam propriedades de líquido e sólido. O estado líquido está associado com a capacidade de fluxo, ao passo que o estado sólido é caracterizado por uma estrutura ordenada cristalina (LARSSOM, 1989).

Materiais que formam cristais líquidos por meio da adição de solventes são classificados como cristais líquidos liotrópicos, enquanto cristais líquidos termotrópicos têm sua estabilidade dependente da temperatura (HYDE, 2001).

Sistemas formados a partir de lipídeos anfifílicos, como o monolinoleato de glicerila (Figura 3), associados ou não a tensoativos quando em presença de água podem exibir uma grande variedade de fases liotrópicas ou mesofases, além de sistemas micelares. Dentre as mesofases mais importantes e comumente observadas são lamelar, hexagonal e cúbica (Figura 3). É crescente o interesse no comportamento e propriedades das mesofases formadas a partir de lipídeos e água, devido sua ampla aplicação em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e sistemas de encapsulação, devido à biocompatibilidade.

O emprego de fases líquido cristalinas como sistemas de liberação de fármaco, é promissor, devido as suas microestruturas e propriedades físico-químicas (CHANG, BODMEIER, 1997). Várias moléculas bioativas como fármacos com diferentes propriedades físico-químicas, peptídeos e proteínas podem ser solubilizados em larga quantidade na fase oleosa ou aquosa desses sistemas (GUO et al., 2010). Em geral, devido sua alta viscosidade, sistemas líquidos cristalinos são também utilizados quando o fármaco deve se localizar em sítios específicos como em cavidades do corpo, na pele, subcutâneo ou intramuscular e em diferentes superfícies de mucosa (CHANG; BODMEIER, 2005).

Dentre as fases líquido cristalinas, a fase cúbica tem destaque como sistema de liberação sustentado de fármacos devido a propriedades como alta viscosidade, complexa estrutura, equilíbrio em excesso de água, estabilidade físico-química de fármacos, além de propriedades bio/mucoadesivas. O único fator limitante para seu emprego é sua alta viscosidade que impossibilita seu uso por seringa, porém, esse inconveniente pode ser sanado com o desenvolvimento de sistemas ou fases menos viscosas e com gelificação *in situ* para fase cúbica.

A elucidação da estrutura interna de um sistema líquido cristalino pode ser realizada por inúmeras técnicas, dentre elas, o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Um cristal líquido é um arranjo periódico de idênticos elementos espalhados que diferem somente em sua posição dentro do cristal. O SAXS é realizado submetendo a amostra, que tem dimensões de milímetros ou menos, a um feixe de raios-X. A intensidade de espalhamento $I(q)$ é mensurada como uma função do ângulo do feixe de incidência. A posição da intensidade de espalhamento depende da orientação estrutural do cristal líquido em relação à

direção do feixe de raios-X incidente. Por meio da rotação do cristal, medidas dos ângulos e intensidades da radiação de espalhamento, um padrão de difração é obtido (DONG; BOYD, 2011; TINOCO et al, 2002) .

A microscopia de luz polarizada é técnica simples e bastante aplicada para identificar as mesofases. Sob um plano de luz polarizada, a amostra pode apresentar anisotropia se for capaz de desviar o plano de luz incidente, como é o caso dos arranjos hexagonal e lamelar, se não desviar a luz considera como isotrópica, a exemplo do arranjo cúbico, que só pode ser confirmado com associação a outras técnicas, como o SAXS (PATEL; PATEL, 2010).

O estado líquido está associado com a capacidade de fluxo, ao passo que o estado sólido é caracterizado por uma estrutura ordenada cristalina (LARSSOM, 1989). Materiais que formam cristais líquidos por meio da adição de solventes são classificados como cristais líquidos liotrópicos, enquanto cristais líquidos termotrópicos têm sua estabilidade dependente da temperatura (HYDE, 2001).

Figura 3. Estrutura química do monolinoleato de glicerila.

Alguns produtos baseados em sistemas cristalinos foram desenvolvidos e comercializados, Elyzol[®] (Dumex-Alpharma, Copenhagen, como precursor de fase líquido cristalino, baseado em monoleato de glicerol e óleo de sésamo, contendo 25% de metronidazol (NORLING et al., 1992). Em estudo clínico, foi demonstrado que a eficácia da raspagem e aplainamento foi similar a esta associada com o Elyzol (PEDRAZZOLI et al., 1992), sendo atribuído ao tempo de permanência no local entre 24 a 36 horas.

O uso de formulações ou dispositivos como adjuvante no tratamento da intrabolsa periodontal ainda é controverso, com autores advogando a favor e outros contra.

O tratamento adjuvante com o Periocline[®] (Sunstar Co. Ltd., Osaka, Japan), gel composto de hidroxietilcelulose, copolímero aminoalquilmetacrilato, triacetina, cloreto de magnésio e glicerina, contendo 2% minociclina, demonstrou resultados clínicos significativamente melhores quando comparados ao grupo controle, somente o tratamento convencional (NAKAGAWA et al., 1991). Gel similar comercializado com o nome de Dentomycin[®] (Lederle Laboratories, UK) apresentou vantagens como adjuvante do tratamento não-cirúrgico em termos de melhora no nível de inserção gengival e sangramento à sondagem, quando comparado ao Periocline[®] (GRAÇA et al., 1997).

Kinane e Radvar (1999) avaliaram a eficácia de três sistemas de liberação de antimicrobianos disponíveis para o tratamento da periodontite. Foram selecionados 79 pacientes, divididos em quatro grupos: raspagem e alisamento radicular apenas (20 pacientes); associados à aplicação de fibras de tetraciclina a 25% (19 pacientes); a um gel de minociclina a 2% (21 pacientes) ou a um gel de metronidazol a 25% (19 pacientes). Medidas clínicas foram realizadas no início do trabalho e após 6 semanas, 3 e 6 meses da aplicação dos sistemas. Apesar dos três sistemas terem demonstrado algum benefício sobre a raspagem e alisamento radicular isoladamente, a colocação de fibras de tetraciclina simultaneamente ao tratamento mecânico mostrou a maior redução na profundidade de sondagem, após 6 meses de tratamento.

Griffiths et al. (2000) relataram os resultados de estudo realizado em dois centros onde foram comparados os efeitos clínicos da raspagem subgengival e esta associada à aplicação do gel de metronidazol a 25% Elyzol[®]. Foram selecionados 88 pacientes no total (43 de um centro e 45 do outro), nos quais todos os quadrantes receberam raspagem subgengival e alisamento radicular, sendo em cada paciente dois quadrantes selecionados aleatoriamente para receber a aplicação do gel. Os parâmetros clínicos avaliados foram à profundidade e sangramento à sondagem e o nível de inserção gengival, registrados ao início do tratamento e após 1, 3, 6 e 9 meses da terapia. Concluíram que a associação da raspagem subgengival ao gel de metronidazol foi superior ao tratamento convencional isolado, sendo essa superioridade mantida por 9 meses.

Estes dados contrastam com os de outros autores, Needleman e Smales (1992) utilizaram um gel de metronidazol a 1% em áreas de furca, classe II e III. Após a terapia periodontal de manutenção a um grupo foi aplicado gel contendo metronidazol (grupo experimental) ou um gel placebo (grupo controle). Após 1 e 3 meses, os sítios foram

reexaminados, concluindo-se que o grupo experimental não diferiu de maneira significativa do controle, em um nível de significância de 5%.

Awartani e Zulqarnain (1998) compararam os efeitos da aplicação do 25%, Elyzol[®], gel de metronidazol a 25%, com a raspagem subgengival. Foram selecionados 13 pacientes, sendo que cada um recebeu simultaneamente, em quadrantes selecionados aleatoriamente, todos os tipos de tratamento: 1) aplicação do gel de metronidazol somente, 2) raspagem subgengival, 3) uma combinação do tratamento mecânico com o gel e, 4) sem tratamento (controle). Os resultados obtidos demonstraram que, para o tratamento da periodontite de moderada a severa, a raspagem subgengival isolada foi tão eficiente quanto a combinação da raspagem com a terapia antibiótica. Este resultado pode ser devido à absorção e ação sistêmica do fármaco

Jansson et al. (2004) reportaram um estudo onde 20 pacientes receberam dois tipos de tratamento, ao mesmo tempo: enquanto uma bolsa periodontal recebia um gel de metronidazol a 25%, outro sítio selecionado aleatoriamente recebia um gel placebo. Os resultados demonstraram que o gel contendo metronidazol não foi capaz de reduzir a ocorrência dos microrganismos *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens* e *Actinomyces actinomycetemcomitans*, quando avaliados pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

A alta prevalência da periodontite associada às dificuldades relacionadas ao tratamento local e eficaz dessa doença justificam a pesquisa e desenvolvimento de sistemas de liberação sustentado de fármacos, que atendam às necessidades, considerando as restrições anatomofisiológicas do local de aplicação. Portanto, este estudo teve como propósito desenvolver sistemas precursores de fase cristalina fluídos com gelificação *in situ* em mesofase apropriados para promover liberação sustentada de fármacos intrabolsa periodontal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo

Desenvolver e avaliar sistemas e formulações precursoras de fase líquido cristalina baseados em monolinoleato de glicerila.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar sistemas e formulações com diferentes razões monolinoleato/cremofor e água;
- ✓ Avaliar se as condições experimentais possibilitam a formação de fase mesomórfica por microscopia de luz polarizada e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS);
- ✓ Validar método analítico para a quantificação do metronidazol;
- ✓ Avaliar o perfil de captação de água dos sistemas e das formulações;
- ✓ Avaliar o comportamento reológico em modo de fluxo e oscilatório dos sistemas e das formulações;
- ✓ Determinar a força mínima e o trabalho necessário para extrusão em seringa dos sistemas e das formulações (Seringabilidade);
- ✓ Avaliar a biomucoadesão (*ex vivo*) dos sistemas e das formulações;
- ✓ Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do metronidazol em dissolutor sob condição *sink* e em dispositivo mimetizador das condições da bolsa periodontal, sob condições não *sink*;
- ✓ Estudar a cinética de liberação envolvida no perfil de liberação das formulações sob condição *sink*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Monolinoleato de glicerila (Myverol[®] 18-92K) foi gentilmente fornecida pela Kerry do Brasil, Cremophor[®] EL adquirido da (Sigma Aldrich, Germany), e o metronidazol base foi adquirido da All Chemistry do Brasil Ltda.

3.2 Métodos

3.2.1 Planejamento experimental

O desenvolvimento dos sistemas precursores de fase cristalina baseados em monolinoleato foi realizado segundo o planejamento fatorial completo (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). Os fatores selecionados foram a razão monolinoleato /cremofores e concentração de água (%), resultando em planejamento de 3² com duas repetições do ponto central. Os fatores codificados e seus níveis são apresentados na Tabela 2.

Os resultados foram tratados por análise de variância usando a técnica de superfície de resposta, com o auxílio do módulo “Visual General Linear Model” (VGML) do software Statistica 99 (Statsoft, Inc. USA).

As variáveis estudadas foram decodificadas para a análise de superfície de resposta pela Equação 1. Os dados obtidos foram ajustados à equação linear múltipla de uma superfície de resposta, conforme a Equação 2.

Equação 1 :

$$\text{Valor codificado} = \frac{(\text{valor não codificado} - 0.5 \times (\text{nível alto} + \text{nível baixo}))}{0.5 \times (\text{nível alto} - \text{nível baixo})}$$

$$\text{Equação 2 : } Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

onde, Y é a resposta predita (variável dependente); β_0 é a constante do modelo; x_1 , e x_2 são as variáveis independentes; β_1 , e β_2 são os coeficientes lineares; β_{12} é o coeficiente de interação; β_{11} e β_{22} são coeficientes quadráticos.

Tabela 2. Planejamento fatorial completo $3^2 + 2$.

Experimento	X ₁ .MLG/CREM (m/m)	X ₂ . H ₂ O (%)
1	-1 (0,25)	-1 (5)
2	-1 (0,25)	0 (10)
3	-1 (0,25)	+ 1(15)
4	0 (2,1)	-1 (5)
5	0 (2,1)	0 (10)
6	0 (2,1)	+ 1(15)
7	+1 (4,0)	-1 (5)
8	+1 (4,0)	0 (10)
9	+1 (4,0)	+ 1(15)
10	0 (2,1)	0 (10)
11	0 (2,1)	0 (10)

Fatores : X₁- monolinoleato /cremofofor (m/m), X₂- H₂O (%); Níveis: baixo (-1), médio (0) e alto (+1), representam os neveis baixo, médio e alto, respectivamente e os valores entre parênteses, representam a razão Monolinoleato /Cremofofor ou conteúdo de água.

3.2.2 Preparo dos sistemas e das formulações precursoras de fase cristalina

Nos sistemas, monolinoleato de glicerila foi aquecida em banho termostatzado à temperatura entre 40 - 45 °C, em seguida foram acrescentados o cremofofor, e diferentes quantidades de água deionizada a mesma temperatura. A mistura foi homogeneizada manualmente com auxílio de um bastão de vidro, e deixado em repouso por 24 horas, em temperatura ambiente (25°C ± 1), para atingir o equilíbrio. As Formulações foram preparadas pela adição do metronidazol (15%) aos sistemas, antes da adição da água.

3.2.3 Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada (MLP) permite visualizar estruturas anisotrópicas e birrefringentes. Após 24 horas do preparo, os sistemas e formulações foram colocados sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e submetidas à microscopia de luz polarizada em microscópio Linkam THMSG600, para a identificação de fase mesomórfica.

3.2.4 Espalhamento de raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS obtidas para os sistemas e formulações foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-Brasil), na linha SAXS1. Esta linha é equipada com um monocromador ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$) e um detector vertical localizado cerca de 1.5 m da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento $I(q)$, em função do vetor de espalhamento, q . O espalhamento das micas e do ar foram subtraídos da intensidade total espalhada. Cada espectro foi coletado por 45 segundos.

3.2.5 Curva analítica e validação do método de quantificação do metronidazol

A partir de soluções estoque contendo 500 $\mu\text{g/mL}$ de metronidazol em etanol ou tampão fosfato pH 7,0, foram preparadas diluições com concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 0,2 $\mu\text{g/mL}$. Com a diluição contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de metronidazol foi realizada varredura entre os comprimentos de onda de 400 a 200nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter modelo DU 640), para determinar o pico de máxima absorção do fármaco. Paralelamente foram preparadas soluções etanólicas de monolinoleato de glicerila (20mg/mL) e de cremophor (40mg/mL) e realizado procedimento similar ao do fármaco, para avaliar possível interferência destes componentes na detecção do fármaco. As leituras subsequentes para a construção da curva analítica foram feitas em 320nm. A validação foi realizada segundo as diretrizes Guia para Validação de Métodos Analíticos da ANVISA (2003).

3.2.6 Teor de metronidazol

Quantidades específicas de cada formulação de fase cristalina foram pesadas e dissolvidas em etanol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 320nm. O resultado foi expresso como percentagem (%) do metronidazol em cada formulação.

3.2.7 Estudo da captação de água

Foi determinada por meio gravimétrico, utilizando dispositivo cilíndrico, contendo em uma das extremidades uma malha com abertura nominal de 138 x 75 µm. Massa de cada sistema e formulação, aproximadamente 160mg (M1), foi cuidadosamente pesada e colocada no dispositivo, e em seguida imersos em 10 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e colocados em recipiente vedado com parafilme a temperatura de 25°C. Em tempos pré-determinados (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24h) os dispositivos foram retirados, e o excesso de tampão eliminado com auxílio de papel de filtro e em seguida pesado (M2). Os experimentos foram realizados em triplicata e a percentagem de absorção de água foi calculada conforme equação 3 (PERIOLI et al., 2004).

$$\% \text{ Captação de água} = \frac{(M2-M1)}{M2} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

A cinética de captação de água foi determinada a partir do perfil de captação de água de acordo com os modelos de primeira (Eq4) e segunda (Eq. 5) ordem (SCHOTT, 1992).

$$\ln \frac{W_{\infty}}{W_{\infty}-W} = kt \quad \text{Equação (4)}$$

$$\frac{t}{W} = \frac{1}{kW_{\infty}^2} + \frac{t}{W_{\infty}} \quad \text{Equação (5)}$$

Assim, W_{∞} representa a máxima captação de água, W a captação de água no tempo (t), $(W_{\infty} - W)$ a massa de água passível de ser captada nos tempos subsequentes, e k é a constante de proporcionalidade. Portanto, no modelo de primeira ordem é encontrado uma relação linear quando plotados o $\ln W_{\infty}/(W_{\infty} - W)$ em função do tempo. No modelo de segunda ordem, a linearidade é alcançada quando são plotados t/W em função do tempo.

Para a equação da cinética de segunda ordem, a velocidade inicial de captação de água pode ser calculada através da recíproca do intercepto y , já a captação de água máxima pela recíproca da inclinação da reta.

3.2.8 Análise reológica de cisalhamento contínuo

As análises reológicas de fluxo foram realizada em Reômetro AR 2000ex (T.A Instruments, Surrey, England) com gradiente e tensão de cisalhamento controlado, em modo de fluxo, e equipado com geometria de placas paralelas de aço (40 mm, separadas por uma distância fixa de 1,0 mm). Os reogramas foram obtidos nas temperaturas de 25 e 37°C.

Amostras dos sistemas e formulações foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior utilizando espátula, de modo a evitar cisalhamento das amostras, e mantidas em repouso por 5 minutos. As curvas de fluxo ascendente foram obtidas com gradiente de cisalhamento, no intervalo de 0 a 2000 s⁻¹, no período de 150 s e mantido o cisalhamento máximo por 20 s. Após este período iniciou a curva descendente em condição inversa a ascendente (JONES et al., 2000; BRUSCHI et al., 2006). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As curvas ascendentes de fluxo foram analisadas segundo o modelo da equação de Oswald de Waele, Lei da Potência – *Power Law* segundo equação 6 (BRETAS; D'ÁVILA, 2010)

$$\sigma = k. \gamma^n \quad \text{Equação 6}$$

Onde σ = Tensão de Cisalhamento; k = índice de consistência γ = Gradiente de Cisalhamento; n = Índice de fluxo.

3.2.9 Análise reológica oscilatória

Foi realizada nas temperaturas de 25 e 37°C, utilizando um Reômetro AR 2000ex (T.A Instruments, Surrey, England) no modo oscilatório, com geometria de placas paralelas de aço (40 mm, separadas por uma distância fixa de 1,0 mm). Os reogramas foram obtidos em intervalo de frequência de 0,1 a 10 Hz. O módulo elástico ou armazenamento (G'), módulo de perda (G'') e a tangente de perda ($\tan \delta$) foram determinados utilizando o programa Rheology Advantage Control AR. Para cada amostra, a Região Viscoelástica Linear foi investigada aumentando a tensão oscilatória a uma frequência fixa. As amostras foram aplicadas conforme descrito no item 3.2.8.

3.2.10 Estudo de Seringabilidade

Todos os experimentos foram realizados em Máquina Universal de Ensaio (Modelo DL-2000. EMIC) com célula de carga de 10 Kg.F, equipada com dispositivo específico para acoplar a seringa. O êmbolo da seringa foi movimentando em módulo de compressão à velocidade de 2,0 mm.s⁻¹ percorrendo uma distância de 30 mm (JONES et al., 1996; KELLY et al., 2004). Foram utilizadas seringa com diâmetro interno de 9,8mm e altura de 97,8mm e volume total de 1mL. Foram registradas a força mínima para iniciar a movimentação do êmbolo e o trabalho necessário para percorrer 30mm pela seringa.

3.2.10.1 Padronização do tipo de seringa e importância do uso da agulha no ensaio de seringabilidade

Na padronização do tipo de seringa, foram utilizadas seringas, de plástico ou de vidro de dimensões semelhantes, vazias e sem agulha. Na influência da agulha sobre o trabalho de extrusão, foi utilizada seringa de vidro com e sem agulha, contendo a mesma formulação. A influência do calibre da agulha foi avaliada em experimento similar ao anterior, utilizando agulhas de mesmo tamanho e diferentes calibres (Tabela 3).

Tabela 3. Especificações das agulhas hipodérmicas.

Sistema inglês (polegada)	Comprimento (mm)	Calibre (mm)
23 G	20	0,6
21 G	20	0,8
18 G	20	1,2

* As agulhas foram adquiridas pela BD®.

3.2.10.2 Determinação da força mínima e do trabalho requerido para extrusão dos sistemas e das formulações pela seringa (Seringabilidade)

Os sistemas ou formulações foram transferidos cuidadosamente, para o interior da seringa de vidro, de modo a evitar a formação de bolhas de ar, até atingirem uma altura fixa de 30 mm. Para maiores detalhes, ver representação esquemática na Figura 4. A força mínima necessária para iniciar o fluxo foi obtida através do gráfico gerado pelo programa TESC 3.01, e o trabalho para a sua extrusão foi calculado através da área sob a curva (força versus distância) utilizando o programa Origin 6.1. Os experimentos foram realizados em quintuplicata, em temperatura de 25°C.

Figura 4. Ilustração para o teste de seringabilidade.

3.2.11 Estudo de mucoadesão (*ex vivo*)

Os experimentos foram realizados em Máquina Universal de Ensaios (Modelo DL-2000. EMIC), equipada com célula de carga de 10 Kg.F e acessório composto por suporte de alumínio (superior e inferior) com encaixe para placas de acrílico para fixação da mucosa (para maiores detalhes ver Figura 5). Bochechas de suínos, recém-abatidos, foram adquiridas em frigorífico, com a devida inspeção sanitária. As bochechas foram lavadas com água destilada, removido o excesso de tecido conjuntivo e preservando a membrana basal (mucosa) e, em seguida acondicionadas individualmente e mantidas sob refrigeração (-80°C) até uso (PEDRAZZOLI; KILIAN; KARRING, 1999).

Imediatamente antes do ensaio foram realizados cortes circulares da mucosa (1cm de diâmetro), com auxílio de vazador de aço inox, e mantidos em saliva artificial por 5 minutos. A composição da saliva artificial é apresentada na Figura 6. Composição da saliva artificial (NAKAMOTO, et al., 1979). Após este tempo a mucosa foi retirada e fixada em placas de acrílico com cola de cianoacrilato. Após este procedimento, as placas foram encaixadas aos suportes de alumínio (superior e inferior) e o conjunto inferior imerso em saliva artificial mantida a $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, com auxílio de banho termostatzado. Em seguida, o suporte superior foi fixado à Máquina

Universal e, sobre a mucosa da placa inferior foi depositada amostra dos sistemas e formulações, com auxílio de seringa de modo a obter uma camada uniforme com aproximadamente 0,100g do sistema e/ou formulação. Para maiores detalhes, ver representação esquemática na Figura 5.

O contato entre mucosa/ formulação /mucosa foi estabelecido com o deslocamento do acessório em modo de compressão com velocidade de 0,5 mm/s, e força de contato 0,5 N, mantida por 3 minutos (WONG; YUEN; PEH, 1999). Após o tempo, o acessório foi movido em modo de tensão com velocidade constante de 0,5 mm/s. A força requerida para o destacamento das placas foi obtida por meio do gráfico gerado pelo programa TESC 3.01 e considerada a força de mucoadesão. O trabalho de mucoadesão foi obtido pela área sob a curva (força versus distância) utilizando o programa Origin 6.1. Para cada amostra foram realizados cinco repetições.

Figura 5. Representação esquemática do ensaio de mucoadesão (*ex vivo*). (1) Máquina Universal de Ensaio. (2) Banho termostático. (3) Acessório: suporte de alumínio com

encaixe para placas de acrílico (a) superior e (b) inferior, e (c) placas de acrílico. (4) Fotos representativas do ensaio em modo de compressão e modo de tensão.

KCL	0,625g
NaCL.....	0,865g
MgCL ₂ 6H ₂ O.....	0,125g
CaCL ₂ 2H ₂ O.....	0,072g
K ₂ HPO ₄	0,802g
KH ₂ PO ₄	0,3626g
Sorbitol 70%.....	42,70g
Nipagin (1,8%).....	5mL
Nipazol (2,0%).....	5mL
Água deionizada (q.s.p).....	1000mL

Figura 6. Composição da saliva artificial (NAKAMOTO, et al., 1979).

3.2.12 Estudo de dissolução *in vitro* em condições ‘sink’ e não ‘sink’

3.2.12.1 Condições ‘sink’

A avaliação do perfil de dissolução do metronidazol a partir das formulações foi realizada em dissolutor (Sotax[®] AT-7), utilizando o aparato 1 (cesta) à temperatura de 37 °C e rotação de 50 rpm, e meio de dissolução, 300,0 mL de tampão fosfato pH 7.0. Foram utilizadas cerca de 0,5g de cada amostra em triplicata. Alíquotas de 3,0mL foram retiradas em intervalos de tempos pré-determinados (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e, 24 e 48 horas) com reposição do mesmo volume imediatamente após cada coleta. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 320 nm (item 3.2.5).

3.2.12.2 Estudo da cinética de dissolução em condições ‘sink’

Os perfis de liberação foram analisados frente a intervalos de tempo definidos e de acordo com as equações de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, e Rigter e Peppas (1987). No modelo de ordem zero, a dissolução ocorre a uma velocidade constante, independente da concentração de fármaco (CÁRCAMO, 1981).

$$\frac{dC}{dt} = k_0 \quad \text{Equação (7)}$$

Onde: C = concentração de fármaco liberado no meio de dissolução, no instante “t”;

t = tempo transcorrido até a determinação considerada;

k_0 = constante de velocidade de ordem zero.

No modelo de primeira ordem a curva é linearizada relacionando o logaritmo da porcentagem de fármaco retido em função do tempo (Cárcamo, 1981),

$$\log C = \log C_0 - \frac{k \cdot t}{2,303} \quad \text{Equação (8)}$$

Onde:

C = concentração de fármaco não dissolvida, no instante “t”;

C_0 = concentração de fármaco não dissolvida no tempo zero;

k = velocidade de liberação;

t = tempo transcorrido até a determinação considerada.

O modelo de Higuchi, é principalmente aplicado a difusão de substâncias contidas em sistemas matriciais, relacionando a quantidade de substância liberada em função da raiz quadrada do tempo transcorrido (HIGUCHI, 1963)

$$C_t = [D\varepsilon / \tau (2A - \varepsilon C_s) C_s \cdot t]^{1/2} \quad \text{Equação (9)}$$

Por simplificação a equação pode expressar-se:

$$Ct = k \cdot t^2$$

Onde:

C_t = concentração de fármaco liberado meio de dissolução, no instante “t”;

D = coeficiente de difusão do fármaco;

C_s = solubilidade do fármaco no meio de dissolução;

ε = porosidade da matriz;

τ = tortuosidade da matriz;

A = concentração do fármaco na matriz;

$t^{1/2}$ = raiz quadrada do tempo transcorrido até a determinação considerada;

k = velocidade de liberação.

Modelo de Rigter e Peppas (1987), o gráfico da relação exponencial da fração do fármaco liberado pelo tempo será linear, considerando apenas os primeiros 60% do fármaco liberado. Segundo a equação abaixo:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^n$$

Equação (10)

Onde Mt/M_{∞} é a fração do fármaco liberado no tempo t, k é uma constante cinética, n é o expoente que indica o mecanismo de liberação e t é o tempo de liberação.

3.2.12.3 Condições não 'sink'

Foi obtido em dispositivo especialmente desenhado para mimetizar o ambiente interno de uma bolsa periodontal, patenteado por Bruschi, Lara e Freitas (2008). Constituído de células de liberação (com área reduzida para acomodação das amostras), fluxo contínuo de acceptor, controlado por bomba peristáltica e banho termostático. Para maiores detalhes ver a ilustração na Figura 7.

Triplicatas da amostra de cada formulação (0,1g) foram colocadas no interior das células de liberação, e estas mantidas a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em banho termostatzado, o fluxo de líquido acceptor (tampão fosfato pH7,0) foi mantido constante ($180 \mu\text{L/h}$). O efluente das células foi coletado em tempos pré-determinados (24, 48, 72, 96, 120, 144, e 168 horas) e quantificado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 320 nm (REDIGUIERI, 2008).

Figura 7. Dispositivo mimetizador das condições da bolsa periodontal para estudo de dissolução *in vitro*. Constituído de: (a) reservatório de solução tampão; (b), banho

termostático; (c), célula de liberação; (d), tubo coletor; (e), reservatório de água para o banho termostático; (f), painel de controle de temperatura e fluxo.

3.3 Análise estatística

As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando Análise de Variância (ANOVA- de duas vias) e comparações post hoc das médias de cada grupo por meio do teste da Diferença Honestamente significativa de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes a $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O monolinoleato de glicerila é um lipídeo polar anfifílico capaz de formar cristais líquidos em presença de água, devido a organização molecular em regiões hidrofílicas e hidrofóbicas alternadas, e por isso, é classificado como liotrópico. Alterando a concentração de água, podem ser formadas diferentes estruturas líquido-cristalinas (lamelares, hexagonais e cúbicas) (BOYD et al., 2006; LARSON, 1989; LUTTON, 1965; KULKARNI et al., 2011). Essas fases podem ser identificadas por microscopia de luz polarizada. (GUO et al., 2010; LARA, 2001; ROSEVEAR, 1954).

Devido a estas características, vem sendo utilizado, com êxito, no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos, pois estruturas mais complexas e viscosas podem modular a velocidade de liberação de fármacos (CHANG; BOSMEIER, 1997b, 1998, 2005; COSTA-BLOGH et al., 2010; DUYNHOVEN et al., 2005; KUMAR et al., 2004; NIELSEN et al., 1998; RIZWAN et al., 2009; SALLAM, et al., 2002; SHAH; PARADKAR, 2005)

4.1 Microscopia de luz polarizada

No desenvolvimento de sistemas liberação baseados em monolinoleato de glicerila optamos por utilizar três razões monoleato/cremophor[®] (baixa, 0,25; média, 2,1 e alta 4,0) e moderado conteúdo de água (5, 10 e 15%), visando obter sistemas menos viscosos, passíveis de serem extrusados facilmente em seringa acoplada com agulha. Diante dessa estratégia foi necessário investigar as seguintes hipóteses: a) estas condições possibilitam ou não a obtenção de fases cristalinas (lamelar, hexagonal ou cúbica); b) em caso negativo, avaliar se com a captação de água ocorre ou não formação ou transição até fase cúbica e, c) avaliar o efeito da fase cristalina sobre o perfil de liberação do fármaco.

Após 24 horas do preparo, todos os sistemas e formulações baseados em monolinoleato foram submetidos à luz polarizada, e fotomicrografias representativas são mostradas na Figura 8 (painel A-D). Os sistemas (S1-S3) com razão MLG/CREM (0,25), independente dos conteúdos de água, mostram-se isotrópicos com característico campo escuro, visto que não desviam o plano da luz polarizada (Figura 8A). Com aumento da razão MLG/CREM (2,1 e 4,0), sistemas de S4 a S9 apresentaram anisotropia, portanto, desviando o plano da luz polarizada incidente, contudo não foi possível verificar a presença de fases mesomórficas definidas (Figura 8, B-C). A adição de

metronidazol (formulações) impossibilitou a passagem da luz, inviabilizando a visualização (Figura 8D). Portanto, através da caracterização microscópica foi possível sugerir apenas a formação de sistemas liotrópicos fluidos.

A temperatura e conteúdo de água (ou tampão fosfato) tem papel crucial na organização de moléculas anfifílicas, como o monolinoleato de glicerila, em estruturas líquido cristalinas. Esta organização visa reduzir a interface das porções hidrofóbicas da molécula com a água. (BOYD et al., 2006; KULKARNI et al., 2011).

Por conseguinte, um dos possíveis fatores que podem ter interferido na formação de mesofases tipo lamelar, hexagonal ou cúbica, foram os baixos conteúdos de água associados às características físico-químicas do tensoativo utilizado (Cremophor EL[®] EHL: 12-14), portanto com mais domínios hidrofílicos que hidrofóbico. Para avaliação dessa hipótese, foram preparados sistemas com os mesmos conteúdos de água, e razões de monoleato, sendo o Cremophor, substituído por glicerina ou polietilenoglicol. Estes quando submetidos à microscopia de luz polarizada e apresentaram birrefringência com texturas tipo estrias, características de fase hexagonal, corroborando com a hipótese sugerida (Figura 9, A-B).

Com intuito de confirmar ou não a presença de fases cristalinas definidas ou coexistência de mais de uma fase, assim como estados de transição, optou-se por utilizar difração de raios-X a baixo ângulo (SAXS), devido especificidade e sensibilidade desta na identificação estrutural.

Figura 8. Fotomicrografia dos sistemas e formulação contendo 10% de água, quando observado ao microscópio de luz polarizada (20x). Painel A, sistema S2, razão MLG/CREM (0,25), Painel B, sistema S5, razão MLG/CREM (2,1), Painel C, sistema S8, razão MLG/CREM (4,0), Painel D, formulação F5, razão MLG/CREM (2,1).

Figura 9. Fotomicrografia dos sistemas contendo 10% de água, quando observado ao microscópio de luz polarizada (20x). Painel A razão MLG/glicerina (2,1). Painel B, razão MLG/polietilenoglicol (2,1).

4.2 Espalhamento de raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

Esta técnica permite definir os limites internos da fase líquido cristalina, além de região com coexistência de diferentes fases (DONG; BOYD, 2011; MEZZENGA et al., 2005;). Dependendo da relação entre tensoativos e moléculas anfifílicas como monoleato, diferentes arranjos moleculares podem ser formados, como micelas de fase normal, reversa e mesofases cristalina, por subsequente hidratação (KULKARNI et al., 2011; MONTALVO et al., 1996; NAKANO et al., 2002).

As figuras 10, 11 e 12 ilustram os gráficos da intensidade versus vetor de espalhamento (q), obtido para todos os sistemas e formulações. Os sistemas (S1-S3) com razão MLG/CREM (0.25) apresentaram apenas um pico largo e pouco intenso na região que compreende baixos valores de q , o que corrobora com a isotropia apresentada por esses sistemas por microscopia de luz polarizada. Este resultado está associado com agregados ou partículas grande, característico de fase micelar (POLIZELLI et al., 2006). Com o aumento dos conteúdos de água S1 (5%), S2 (10%) e S3(15%) há deslocamento da posição máxima do pico ($q_{\text{máx}}$) para baixos valores de q (1,0; 0,92 e 0,82nm⁻¹, respectivamente) (Fig. 10, A-C). Esta variação indica que os sistemas tornam-se menos estruturados (ZHENG et al., 2011). A adição do metronidazol aos sistemas (Formulações F1, F2 e F3), provocou afilamento do pico e seu deslocamento para regiões de maiores e repetidos valores de q (1,30nm⁻¹), como apresentado na figura 10, A-C.

Nos sistemas S4, S5 e S6 (razão MLG/CREM, 2.1) S7, S8 e S9 (razão MLG/CREM, 4.0) ambos com 5, 10 e 15% de água, apresentou o mesmo pico em $q = 1,30\text{nm}^{-1}$, porém, houve o surgimento de um segundo pico largo e difuso localizado em maiores valores de q (Figuras 11 e 12, A-C, respectivamente). Com adição do fármaco (Formulações F4-F9), houve discreto deslocamento do segundo pico para região de maiores valores de q para as formulações (F4-F9), e este efeito foi mais pronunciado com o aumento do conteúdo inicial de água. Á exemplo disto, formulação com 15% de água como formulação F6 que teve o segundo pico mais afilado e menos difuso, e formulação F9 apresentando 8 picos com periodicidade que sugerem a coexistência das fases hexagonal e cúbica cristalina (CAMPO et al., 2004).

De maneira geral, houve deslocamento de picos para regiões de maiores valores de q , consequentemente diminuindo as distâncias entre eles, seja pelo aumento da razão MLG/CREM de 0,25 para 2,1 e 4,0 que confere mais domínios hidrofóbicos passíveis de

interação com a água, somados a adição do fármaco para os sistemas. Estas mudanças conferiram maior ordenação da estrutura interna das matrizes, típico de formação de fase líquido cristalina (ANGELOV et al., 2009; MEZZENGA et al., 2005). Sugerido que os sistemas de S4 a S9 e formulações de F4 a F9 estejam em estados intermediários ou de transição para fase líquido cristalina (ANGELOV et al., 2009; ANGELOV et al., 2012).

Além disso, a presença do fármaco não prejudicou a auto-organização das matrizes, mas melhorou a ordenação de algumas formulações. A fim de esclarecer a presença de um pico com valor de q-distancia similar ($1,30\text{nm}^{-1}$), a curva de SAXS para o monolinoleato puro está representada na figura 10 (D), onde é possível observar o mesmo pico com mesma relação de espaçamento ($q = 1,30\text{nm}^{-1}$).

Estudos realizados por Shah e Paradkar (2007), demonstraram que, em matrizes de monoleato, a presença e aditivos hidrofílicos (EHL entre 7 e 11) dificulta a auto-organização em mesofases, quando comparado a aditivos lipofílicos (EHL entre 1,5 e 5), provavelmente devido redução na disponibilidade de água. Cremophor[®] é um tensoativo de caráter hidrofílico com EHL entre 12 a 14, este pode ter contribuído para ordem de organização dos sistemas.

Quando há a existência de vários picos, de acordo com a equação de Bragg, a partir da relação entre as distâncias dos picos sobre vetor de espalhamento (q) é possível determinar a fase líquido cristalina (ZHENG, et al., 2011, SEDDON; TEMPLE, 1995) . Para calcular repetidas distancias (d) referentes à estrutura cúbica cristalina foi utilizado a seguinte equação de Bragg:

$$d = \frac{2\pi}{q_{\max}} \quad \text{Equação 11}$$

Onde $q_{\max}$ é o valor do vetor de espalhamento do pico de primeira ordem.

Portanto, após captação de água foram obtidas as curvas de SAXS para os sistemas (S4-S9) e formulações (F4-F9), como mostrado nas Figuras 13 e 14 (A, B e C). As setas indicam os picos que correspondem à razão de espaçamento de $1:\sqrt{2}:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{5}:\sqrt{6}:\sqrt{7}$. Estas, indicam a estrutura de fase cúbica bicontínua de face centrada (Pn3m, identificada pela razão de espaçamento de picos de $\sqrt{2}:\sqrt{3}:\sqrt{4}$), como em acordo com Seddon e Templer (1995) e Warren e colaboradores (2011). No topo das figuras 10 e 11, são apresentadas as fotomicrografias representativas dos sistemas e formulações S4-F4 e S7-F7 após captação de água, demonstrando campo escuro, como em fase isotrópica típico de fase cúbica quando visualizado por microscopia de luz polarizada.

Figura 10. Curvas das intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS para sistemas e formulações com razão MLG/CREM (0,25) e conteúdos de água de 5% S1-F1 (A), 10% S2-F2 (B) e 15% de água S3-F3 (C). A seta indica o pico com valor de $q = 1,30 \text{ nm}^{-1}$.

Figura 11. Curvas das intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS para sistemas e formulações com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água de 5% S4-F1 (A), 10% S5-F5 (B) e 15% de água S6-F6 (C). Curva de SAXS obtida para o monolinoleato de glicerila (Myverol[®] 18-92k) (D). A seta indica o pico com valor de $q = 1,30 \text{ nm}^{-1}$.

Figura 12. Curvas das intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS para sistemas e formulações com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água 5% S7-F7 (A), 10% S8-F8 (B) e 15% de água S9-F9 (C). A seta mostra o pico com valor de $q = 1,30\text{nm}^{-1}$.

Figura 13. Curvas da intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS e fotomicrografias representativas (MLP) de sistemas e formulações após ensaio de captação de água á 25°C. Curvas de SAXS S4-F4 (A), S5-F5 (B), S6-F6 (C) e fotomicrografias de S4 e F4 no topo da figura.

Figura 14. Curvas da intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) obtidos pelas análises de SAXS e fotomicrografias representativas (MLP) de sistemas e formulações após ensaio de captação de água à 25°C . Curvas de SAXS S7-F7 (A), S8-F8 (B), S9-F9 (C) e fotomicrografias de S7 e F7 no topo da figura.

4.3 Validação do método de quantificação do metronidazol

As Figuras 15 e 16 ilustram a curva analítica do metronidazol em tampão fosfato (pH 7,0) e etanol, respectivamente. A curva analítica do metronidazol em tampão fosfato ilustrada na figura 15 mostra linearidade entre as concentrações de 0,2 e 25 µg/mL com um R^2 de 0,9996 e equação da reta representada por $y = 0,0388x - 0,0022$, onde y corresponde à absorbância em 320 nm e x corresponde à concentração do fármaco. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,06 e 0,21 µg/mL, respectivamente. O método foi preciso, apresentando desvio padrão relativo de 3% para precisão intra-dia e valor de 1,7% para precisão inter-dia. Esta foi utilizada na determinação do perfil de liberação do fármaco.

A curva analítica do metronidazol em etanol (Figura 16) mostra linearidade de 0,2 e 25 µg/mL com um R^2 de 0,9992 e equação da reta representada por $y = 0,0422x - 0,0123$. Esta foi utilizada na determinação do teor real de metronidazol nas formulações.

Figura 15. Curva analítica de metronidazol em tampão fosfato pH 7.

4.4 Teor real de metronidazol

Os valores obtidos na determinação do teor real de metronidazol das formulações foram expressos por meio da percentagem (%) de recuperação do metronidazol, que variaram de 99 a 116% (DPR < 5).

Figura 16. Curva analítica do metronidazol em etanol.

4.5 Estudo de captação de água

A velocidade e a extensão de captação de água é um importante parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em monolinoleato de glicerila, pois pode afetar transição para fases líquido cristalinas *in situ*, com subsequente interferência na cinética de liberação do fármaco (CHANG; BODMEIER, 1997b; RIZWAN et al., 2009). Além de fornecer a quantidade de água necessária para estruturação em fases líquido cristalinas.

Os sistemas S1, S2 e S3 (razão MLG/CREM de 0,25), e diferentes conteúdos de água, erodiram em menos de uma hora. Esta erosão pode ser atribuída à dispersão do monolinoleato de glicerila em água, devido à elevada proporção de Cremophor EL[®] (tensoativo hidrofílico), impedindo a organização molecular do monolinoleato em mesofases cristalinas.

Os perfis de captação de água dos sistemas (S4 a S9) são apresentados na Figura 17. Na primeira hora houve rápida captação de água, cujos valores foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Entre 1^o e 5^o hora, o sistema S4 apresentou velocidade estatisticamente inferior aos outros ($p < 0,05$). Após este período os sistemas (S5, S8 e S9) mantiveram curvas ascendentes até 24 horas, porém, menos pronunciadas, enquanto que, os sistemas (S4, S6 e S7) tiveram redução de massa, provavelmente, devido à erosão. A Tabela 4 mostra os respectivos valores numéricos. Após ensaio de captação de água todos os sistemas foram submetidos à

microscopia de luz polarizada e apresentaram fase isotrópica e viscosa, característica de fase cúbica (HYDE, 2001) a qual foi confirmado por SAXS (Figuras 12 e 13, A-B).

Figura 17. Percentual de captação de água dos sistemas em função do tempo (horas) em excesso de tampão fosfato (pH 7.0). Os dados representam a média $\pm$ D.P, $n = 3$

Em geral os sistemas com 10 a 15% de água tiveram maior velocidade de captação de água quando comparados com sistemas com apenas 5% de água. Portanto, os percentuais de captação de água não foram inversamente proporcionais aos conteúdos iniciais de água dos sistemas, como descrito por Lee et al., (2003), quando avaliaram o perfil de captação de água para matrizes de monolinoleato com diferentes conteúdos de água.

Com aumento da razão MLG/CREM (0,25, 2,1 e 4,0), provocou redução da velocidade de captação. Este fato pode ser atribuído a transição de fase líquido cristalina de alguns sistemas (S4-S9) e consequente aumento da viscosidade, o que dificulta a difusão da água para o interior da matriz (KUMAR et al., 2004).

Tabela 4. Valores dos percentuais de captação de água obtidos para os sistemas em 24 horas.

Sistemas	MLG/ crem	% H ₂ O	% Captação (H ₂ O) 24h
S4	2,1	5%	14,10 ± 1,0
S5	2,1	10%	30,41 ± 1,60
S6	2,1	15%	14,17 ± 3,1
S7	4,0	5%	17,57 ± 0,29
S8	4,0	10%	29,50 ± 1,40
S9	4,0	15%	27,27 ± 1,79

* Cada valor representa a média (± desvio padrão) de três replicatas.

A maioria dos sistemas apresentou rápida velocidade de captação durante as primeiras 6 horas e atingiu o equilíbrio com captação de água de aproximadamente 40% da massa inicial (m/m), independente dos conteúdos iniciais de água. Esses perfis foram semelhantes àqueles relatados por Chang e Bodmeier (1997b), utilizando monolinoleato de glicerila (Myverol 18-92) e monoleato (Myverol 18-99).

O desenvolvimento de formulações precursoras de fase cristalina visando gelificação *in situ* deve ser norteado por dois importantes fenômenos, rápida captação de água em fluídos biológicos e capacidade de formar fases cristalinas mais estruturadas, pois estes fatores somados podem afetar a cinética de liberação do fármaco (RIZWAN et al., 2009).

Os resultados de captação de água para os sistemas foram aplicados aos modelos cinéticos de primeira e segunda ordem de acordo com as equações 4 e 5 sugeridas por Schott (1992), Figura 18. Quando os valores de captação de água dos sistemas foram aplicados a Eq. (4). [$\ln(W_{\infty}/(W_{\infty}-W))$ versus t] para cinética de primeira ordem (Fig. 18 a-b) apresentaram baixa linearidade com valores de coeficiente de correlação que variaram entre 0,82 a 0,95. Entretanto, quando aplicados a equação 5 (t/W versus tempo), modelo cinético de segunda ordem, os sistemas apresentaram boa linearidade ($R^2 > 0,98$) (Fig. 18, b-c). Estes resultados estão em acordo com aqueles descritos por (CHANG; BODMEIER, 1997b; LEE, et al., 2003), em experimentos similares.

A velocidade de captação de água de sistemas baseados em monolinoleato que seguem cinética de segunda ordem pode ser influenciada por dois fatores. A massa de água passível

de ser captada nos tempos subsequentes, e pelos sítios da matriz ainda não hidratados (SCHOTT, 1992). Os coeficientes de correlação e velocidade inicial de captação de água dos sistemas, são sumarizadas na tabela 5, as velocidades iniciais para os sistemas (S4-S9) foram entre (0,03 e 0,04 g/g.h). Rizwan et al, (2009) investigaram a cinética de captação e água de matrizes de monoleato de glicerila com diferentes conteúdos iniciais de água (0 – 30%), e demonstraram que a captação de água segue modelo de segunda ordem, com velocidades iniciais segundo equação (5), entre 0,04 a 0,12 g/g.h.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos do perfil de captação de água dos sistemas. Calculados por meio dos valores gerados pela adequação ao modelo cinético de segunda ordem (Eq. 5).

Sistemas	Velocidade inicial - captação de H ₂ O (g/g.h)	R ²
S4	$0,03 \pm 0,9 \times 10^{-3}$	0,98
S5	$0,04 \pm 0,8 \times 10^{-3}$	0,99
S6	$0,04 \pm 0,8 \times 10^{-3}$	0,99
S7	$0,03 \pm 0,9 \times 10^{-3}$	0,98
S8	$0,04 \pm 0,8 \times 10^{-3}$	0,99
S9	$0,03 \pm 0,9 \times 10^{-3}$	0,99

* Cada valor representa a média ($\pm$ desvio padrão) de três replicatas.

Figura 18. Cinética de captação de água dos sistemas. Os gráficos obtidos a partir da (Eq. 4) de primeira ordem estão apresentados nos painéis (a) e (b). Os gráficos obtidos a partir da (Eq. 5) de segunda ordem estão apresentados nos painéis (c) e (d) ($n=3$, D.P < 0,05).

Com adição do fármaco (metronidazol), formulações F1, F2 e F3 erodiram em menos de uma hora. Os perfis de captação de água das formulações (F4-F9) são apresentados na Figura 19. Percentual de captação de água das formulações em função do tempo (horas) em excesso de tampão fosfato (pH 7.0). Os dados representam a média $\pm$ D.P, $n = 3$. Somente a formulação (F6) diferiu das demais, com valores estatisticamente inferiores ($p < 0,001$).

Os percentuais de captação de água em 24 horas obtidos a partir das formulações F4 a F9 (Tabela 6), foram inversamente proporcionais aos conteúdos iniciais de água, como descrito por Lara et al., (2005) e Rizwan et al., (2009) em estudos similares. Embora os sistemas S4 e S7 com 5% de água tenham apresentado baixas velocidades e percentuais de captação de água, com a adição do fármaco (formulações F4 e F7) aconteceu o inverso. Formulações (F4-F9) não sofreram erosão ou perda de massa durante as 24 horas de ensaio, sugerindo que a adição do fármaco tornou os sistemas mais estáveis. Após captação de água, todas as formulações apresentaram transição para fase cúbica (Figuras 12 e 13, A-B).

Figura 19. Percentual de captação de água das formulações em função do tempo (horas) em excesso de tampão fosfato (pH 7.0). Os dados representam a média $\pm$ D.P, $n = 3$.

A cinética de captação de água para as formulações (F4-F9) são apresentados na Figura 20. Como os sistemas, os dados das formulações (F4-F9) se adequam ao modelo

cinético de segunda ordem ($R^2 > 0,98$), como ilustrado na figura 20 (c-d). Estes resultados estão de acordo com os reportados na literatura (CHANG; BODMEIER, 1997b; LARA et al., 2005; LEE, et al., 2003; RIZWAN et al, 2009). A velocidade inicial de captação de água foi semelhante ($p > 0,05$) para as formulações F4, F5, F7, F8 e F9, independente do conteúdo inicial de água. Contudo, a formulação F6 (conteúdo de água de 15%) apresentou menor velocidade ($p < 0,001$) quando comparada as demais (Tabela 7).

Tabela 6. Valores dos percentuais de captação de água obtidos para as formulações em 24 horas.

Formulações	MLG/ crem	% H ₂ O	% Captação (H ₂ O) 24h
F4	2,1	5%	29,90 ± 1,12
F5	2,1	10%	29,84 ± 4,02
F6	2,1	15%	19,71 ± 1,41
F7	4,0	5%	26,35 ± 0,92
F8	4,0	10%	26,43 ± 1,40
F9	4,0	15%	23,66 ± 0,56

* Cada valor representa a média (± desvio padrão) de três replicatas

Tabela 7. Parâmetros cinéticos do perfil de captação de água das formulações. Calculados por meio dos valores gerados pela adequação ao modelo cinético de segunda ordem (Eq. 5).

Formulações	Velocidade inicial - captação de H ₂ O (g/g.h)	R ²
S4	0,03 ± 0,9 x10 ⁻³	0,99
S5	0,03 ± 0,9 x10 ⁻³	0,99
S6	0,01 ± 8 x 10 ⁻⁵	0,99
S7	0,03 ± 0,9 x10 ⁻³	0,98
S8	0,03 ± 0,9 x10 ⁻³	0,98
S9	0,03 ± 0,9 x10 ⁻³	0,99

* Cada valor representa a média (± desvio padrão) de três replicatas.

Figura 20. Cinética de captação de água das formulações. Os gráficos obtidos a partir da equação (Eq. 4) de primeira ordem estão apresentados nos painéis A e B. Os gráficos obtidos a partir da equação (Eq. 5) de segunda ordem estão apresentados nos painéis B e C ($n=3$, D.P < 0,05).

O estudo de análise de variância não foi realizado para o ensaio de captação de água, uma vez que, para gerar o gráfico da área de superfície é necessário obter os dados de captação de água para todos os sistemas e formulações.

4.6 Análise reológica de cisalhamento contínuo.

Formulações desenvolvidas para a liberação sustentada de fármacos intrabolsa periodontal devem apresentar características físicas específicas, entre outras, a) propriedade de fluxo do tipo pseudoplástico com viscosidade adequada que possibilite a fácil extrusão em seringa acoplada com agulha; b) moderado grau de tixotropia a fim de obter rápida reestruturação pós-extrusão pela seringa, o que pode propiciar a retenção da formulação no interior da bolsa (BRUSCHI; FREITAS, 2005). Portanto, conhecimento acerca destes parâmetros é requisito indispensável (ANDREWS et al., 2009; ANDREWS; JONES, 2006; JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997; LEE; MOTUR; LEE, 2009).

Os experimentos foram realizados a 25 e 37°C, simulando condições armazenamento e aplicação no interior da bolsa periodontal, respectivamente (PERIOLI et al., 2008), visando avaliar a influência da razão MLG/CREM e conteúdo de água sobre as propriedades reológicas de fluxo.

As curvas de fluxo e viscosidade dos sistemas a 25 e 37°C são ilustradas nas figuras 21, 22 e 23. Todos os sistemas apresentaram uma relação não linear entre a tensão de cisalhamento e gradiente de cisalhamento, caracterizando-os como fluídos não-Newtoniano, seguido da redução da viscosidade com o aumento do gradiente de cisalhamento sob fluxo de cisalhamento constante, típico de fluídos pseudoplásticos (BARNES et al., 1993). Assim podem ser considerados fluídos não-Newtonianos do tipo pseudoplástico. Esse comportamento de fluxo é atribuído ao alinhamento das partículas assimétricas provocado pelo aumento da tensão ou velocidade de cisalhamento, por isso, denominado ‘shear thinning’ relacionado ao ‘afinamento’ dos sistemas sob gradiente de cisalhamento (BARNES, 1997; BRETAS; D’ÁVILA, 2010).

Adicionalmente, a recuperação das viscosidades aparentes dos sistemas após remoção do gradiente de cisalhamento foi tempo independente (sem tixotropia), e tempo dependente (com tixotropia). Quando tixotrópicos, os sistemas apresentaram diferentes graus de tixotropia, o qual foi estimado pela área de histerese formada entre as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas de fluxo.

Sistemas S1, S2, e S3 com razão MLG/CREM (0,25), independente do conteúdo de água (5, 10 e 15%, respectivamente), exibiram comportamento pseudoplástico pouco acentuado e sem tixotropia a 25 e 37°C (Fig. 21, a-b), devido à recuperação das propriedades de fluxo originais instantaneamente após cessar a tensão ou gradiente de cisalhamento (LEE; MOTUR; LEE, 2009). As viscosidades foram baixas e discretamente influenciadas pelos conteúdos iniciais de água, tanto a 25 quanto a 37°C (Fig. 21c). Com aumento da temperatura 37°C este efeito é menos pronunciado, uma vez que, o ponto de fusão do monolinoleato é de 36°C, o que causa maior movimentação das moléculas e consequente flexibilidade e rearranjo das caudas lipídicas hidrofóbicas (GANEM-QUITANAR; GUERRERO; BURI, 2000; MEZZENGA et al., 2005). A ausência de tixotropia e baixa viscosidade desses sistemas se devem ao fácil alinhamento das micelas (ver curvas SAXS Figura 10) em direção ao fluxo. Pois estes sistemas são mantidos por interações fracas do tipo Van der Waals e hidrofóbicas que são facilmente rompidas pela tensão de cisalhamento (SANTANA et al., 2012; YUE; GUO; GUO, 2009).

A fim de quantificar o comportamento pseudoplástico, foi utilizado o modelo matemático de Power law (Oswald-de Waele). Os índices de consistência (k) e de fluxo (n) são apresentados na tabela 8. A baixa pseudoplasticidade apresentada pelos sistemas (S1-S3) está em acordo com seus valores de índice de fluxo que foram próximos de 1 ($R^2 > 99$). Portanto, muito semelhante a um fluido Newtoniano. Além disso, apresentaram baixos valores de índice de consistência (k), tal como suas viscosidades aparentes sob gradiente de cisalhamento zero (η_0) (STEFFE, 1992).

Os sistemas S4, S5 e S6 razão MLG/CREM (2,1), independente dos conteúdos iniciais de água (5 10 e 15%, respectivamente) apresentaram comportamento de fluxo do tipo pseudoplástico com moderado grau de tixotropia á 25°C (Fig. 22a), com relativa diminuição dos valores de n. A 37°C os sistemas com 5% e 10% de água exibiram comportamento pseudoplástico sem tixotropia, portanto com mudança da viscosidade independente do tempo. Enquanto que o sistema S6 com 15% de água apresentou pequeno grau de tixotropia (Fig. 22b). Os valores de viscosidade aparente no ponto zero foram baixos (0,88 a 0,89 Pa.s) e semelhantes entre si ($p > 0,05$) independente do conteúdo de água á 25°C. Com aumento da temperatura (37°C) as viscosidades aparentes diminuíram drasticamente, com discreta influência dos conteúdos de água (Fig. 22c).

Figura 21. Reogramas de fluxo dos sistemas S1(●), S2(■) e S3(▲) nas temperaturas de 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

Tabela 8. Valores obtidos para o índice de consistência (k) e de fluxo (n) dos sistemas.

Sistemas	Índice de consistência k (Pa.s) ^a		Índice de fluxo n (adimensional) ^a	
	25°C	37°C	25 °C	37 °C
S1	0,72 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,98 ± 0,004	0,98 ± 0,001
S2	0,77 ± 0,02	0,41 ± 0,004	0,99 ± 0,001	0,97 ± 0,002
S3	0,96 ± 0,43	0,44 ± 0,20	0,97 ± 0,0002	0,97 ± 0,005
S4	2,28 ± 1,03	0,17 ± 0,07	0,75 ± 0,01	0,98 ± 0,01
S5	2,37 ± 0,78	0,16 ± 0,07	0,77 ± 0,003	0,98 ± 0,01
S6	1,58 ± 0,79	0,23 ± 0,11	0,84 ± 0,01	0,96 ± 0,004
S7	13,51 ± 6,79	0,25 ± 0,12	0,51 ± 0,02	0,90 ± 0,04
S8	15,08 ± 7,67	0,25 ± 0,13	0,52 ± 0,01	0,91 ± 0,001
S9	530,50 ± 268,60	0,47 ± 0,22	2.10 ⁻⁸ ± 1.10 ⁻⁸	0,92 ± 0,06

^a Cada valor representa a média (± desvio padrão) de três replicatas.

Os sistemas S7 e S8 com razão de MLG/CREM (4,0), contendo 5 e 10% de água, respectivamente, apresentaram comportamento similar aos sistemas anteriores a 25°C, porem com maior tixotropia (Fig 23a). Á 37°C a tixotropia foi reduzida (Fig 23b). O sistema S9 contendo 15% de água apresentou á 25°C (Fig. 23a), valor de ponto de escoamento (σ_0), caracterizado por comportamento plástico de Bingham (STEFFE, 1992).

Segundo Barnes e colaboradores (1999) o comportamento plástico também conhecido como ‘soft solid’ é a capacidade do material de ser moldado, porém necessita de uma força mínima para iniciar o escoamento denominado de ponto de escoamento. Esse fenômeno tem sido atribuído à formação de rede tridimensional (LEE; MOTUR; LEE, 2009). Portanto, materiais com comportamento de fluxo tipo plástico são inadequados para administração por meio de seringa. Á 37°C (Fig. 23b) esse sistema (S9) não apresentou ponto de escoamento, porém apresentou comportamento pseudoplástico com baixa tixotropia, o que pode ser atribuído a proximidade da temperatura de fusão do monolinoleato de glicerila (36°C), e consequente fluidez (GANEM-QUITANAR; GUERRERO; BURI, 2000; KULKARNI et al., 2011; MEZZENGA et al., 2005)

Figura 22. Reogramas de fluxo dos sistemas S4(●), S5 (■) e S6 (▲) a 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 23. Reogramas de fluxo dos sistemas S7(●), S8 (■), S9 (▲) a 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

Os sistemas S7-S9 apresentaram valores de viscosidade aparente superior aos sistemas (S1-S6) à 25°C (Fig 23c), com destaque para o sistema S9, que apresentou maior valor de viscosidade aparente no ponto zero (35Pa.s), atribuído ao seu comportamento plástico. A 37°C (Fig 23c) todas as viscosidades reduziram a valores próximos de zero. Além disso, foram influenciadas pelo aumento do gradiente de cisalhamento a 25°C, confirmando aumento do comportamento pseudoplástico quando comparado aos demais sistemas.

As propriedades reológicas de sistemas líquidos cristalinos é função da organização molecular das cadeias lipídicas e tensoativo quando em contato com água, a qual pode ser modificada em diferentes temperaturas (MEZZENGA, et al., 2005; QIU; CAFFREY, 2000). Assim, a pseudoplasticidade de sistemas capazes de formar fase líquido cristalina tem sido relacionado com estruturas ordenadas em bicamadas alinhadas em direção ao fluxo (MONTALVO et al., 1998). O gradativo aumento da razão MLG/CREM e conteúdo de água para cada sistema provocou a diminuição do valor de n para valores próximos de zero (0.98 a 2.10^{-8}) à 25°C (tabela 8). Isto é, a pseudoplasticidade dos sistemas tornou-se mais evidente principalmente com o aumento da razão de monolinoleato de glicerila, consequentemente, o índice de consistência e a viscosidade aparente aumentaram, ficando mais sensível ao gradiente de cisalhamento. Esse fenômeno é perfeitamente compreendido devido a maior estruturação dos sistemas (CORDOBÉS; FRANCO; GALLEGOS, 2005). Em um primeiro momento os sistemas são isotrópicos com organização micelar (S1-S3) até formarem estruturas anisotrópicas em transição para fase líquido cristalina (S4-S9), como demonstrado pela MLP e SAXS, respectivamente.

De modo geral, a gradual auto-organização estrutural dos sistemas, causou maior resistência ao fluxo, o que pode ser comprovado pelos diferentes valores de índice de fluxo ($p < 0.0001$). À 37°C o índice e consistência diminuiu drasticamente e o de fluxo foi discretamente influenciado pelo aumento da razão MLG/CREM, com valores de n que se mantiveram próximos de 1, referente ao comportamento pseudoplástico menos acentuado e sem tixotropia. Presume-se que este efeito ocorra devido ao rompimento das interações de Van der Waals e hidrofóbicas na porção apolar e das ligações de hidrogênio na porção polar da matriz do monolinoleato /água, devido à proximidade ao ponto de fusão do monolinoleato de glicerila (36°C) (KULKARNI et al., 2011).

Os diferentes comportamentos de fluxo apresentados pelos sistemas a 25°C podem ser atribuídos a dois fatores dentre eles à proximidade da região de transição de fluido micelar

isotrópico (S1-S3) para região em transição de fase líquido cristalina anisotrópica (S4-S9), que pode induzir defeitos estruturais capaz de prover diferentes graus de pseudoplasticidade e surgimento de ponto de escoamento (FRANCO et al., 1995). O segundo fator pode ser atribuído ao comportamento de fluxo não-Newtoniano do tipo plástico apresentados pelo monolinoleato de glicerila e Newtoniano apresentado pelo Cremophor® (Figura 24).

Figura 24. Reogramas de fluxo do monolinoleato de glicerila (■) Cremophor® (●) puros a 25°C. As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

Os dados referentes à análise de variância para o índice de consistência (k) e índice de fluxo (n) dos sistemas a 25 e 37°C são apresentados nas tabelas 9 e 10, respectivamente. Apenas o fator MLG/CREM demonstrou interação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) a 25°C tanto para valores de k quanto para valores de n.

Tabela 9. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o índice de consistência (k) dos sistemas a 25 e 37°C.

Coeficientes	Índice de consistência (k)	
	25°C	37°C
Intercepto	0,4346	0,1594***
MLG/CREM	11,8716***	-0,0433*
(MLG/CREM) ²	9,7487	0,1763***
H ₂ O	5,1878	0,0566**
(H ₂ O) ²	3,7572	0,04631
MLG/CREM* H ₂ O	7,8350	0,0400
F calculado	8,4061	21,6341
F tabelado	0,1980	0,1980
F calculado/tabelado	42,4537	109,2595
R ²	0,94	0,95

Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

Tabela 10. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o índice de fluxo (n) dos sistemas a 25 e 37°C.

Coeficientes	Índice de fluxo (n)	
	25°C	37°C
Intercepto	0,8063	0,9747***
MLG/CREM	-0,3154**	0,0316***
(MLG/CREM) ²	-0,1007	0,0318**
H ₂ O	-0,0689	0,0016
(H ₂ O) ²	-0,0613	0,0018
MLG/CREM* H ₂ O	-0,1223	0,0075
F calculado	9,0885	27,1047
F tabelado	0,1980	0,1980
F calculado/tabelado	45,9001	136,8888
R ²	0,9008	0,96

Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

O gráfico de superfície de resposta obtido para o índice de consistência (k) a 25°C ilustra o efeito positivo do fator MLG/CREM sobre o k (Figura 25). Os valores de n sofreram efeito negativo do fator MLG/CREM (Figura 26). A 37°C os fatores MLG/CREM, % H₂O e (MLG/CREM)² foram estatisticamente significativos sobre a resposta de k e n . Por meio do gráfico da superfície de resposta para os valores de k e n a 37°C, observa-se o efeito positivo do MLG/CREM e discretamente positivo da % H₂O (Figura 27e 28, respectivamente).

Figura 25. Superfície de resposta do índice de consistência (k) a 25°C dos sistemas.

Figura 26. Superfície de resposta do índice de fluxo (n) a 25°C dos sistemas.

Figura 27. Superfície de resposta do índice de consistência (k) a 37°C dos sistemas.

Figura 28. Superfície de resposta do índice de fluxo (n) a 37°C dos sistemas.

Com a adição do fármaco (metronidazol) aos sistemas (Formulações, F1 a F9) o comportamento de fluxo não foi alterado, quando comparado aos sistemas, tanto a 25°C quanto a 37°C. Porém houve discreto aumento das viscosidades e dos graus de tixotropia, o que era esperado devido à adição de um componente sólido, como apresentado nas figuras 29, 30 e 31.

As formulações F1, F2 e F3, como nos sistemas (S1-S3), também apresentaram comportamento pseudoplástico pouco acentuado e sem tixotropia a 25 e 37°C (Fig. 29, a-b). Contudo, em contraponto aos sistemas (S1-S3), é possível observar claramente o efeito do conteúdo de água sobre a viscosidade, tanto pelas curvas de fluxo quanto pelas curvas da viscosidade aparente a 25 e 37°C (Fig. 29c). Além disso, as viscosidades aparentes tiveram discreto aumento no ponto zero do gradiente de cisalhamento em ambas as temperaturas. O índice de consistência (k) sofreu discreto aumento, porém, os valores de índice de fluxo (n) permaneceram próximo de 1, característico da pseudoplasticidade pouco acentuada (Tabela 11).

Figura 29. Reogramas de fluxo das formulações F1(●), F2(■) e F3(▲) nas temperaturas de 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

As curvas de fluxo para as formulações F4, F5 e F6 apresentaram pseudoplasticidade com moderada tixotropia a 25°C (Fig. 30a) e sem tixotropia a 37°C (Fig. 30b). O efeito do conteúdo de água sobre a viscosidade aparente foi mais acentuado quando comparado com os respectivos sistemas sem fármaco a 25°C (Fig. 30c). Com destaque para a formulação F6 com 15% de água que apresentou maior viscosidade aparente e grau de tixotropia. Independente do conteúdo de água, a 37°C todas as formulações (F4-F6) tiveram suas viscosidades reduzidas como discutido para os sistemas (Fig. 30c).

Tabela 11. Valores obtidos para o índice de consistência (k) e de fluxo (n) das formulações.

Formulações	k (Pa.s) ^a		n (adimensional) ^a	
	25°C	37°C	25°C	37°C
F1	0,95 ± 0,07	0,46 ± 0,02	0,97 ± 0,005	0,97 ± 0,003
F2	1,10 ± 0,07	0,50 ± 0,02	0,96 ± 0,006	0,97 ± 0,001
F3	1,45 ± 0,09	0,55 ± 0,01	0,94 ± 0,003	0,97 ± 0,002
F4	3,04 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,75 ± 0,09	0,96 ± 0,006
F5	4,0 ± 0,01	0,26 ± 0,005	0,71 ± 0,002	0,98 ± 0,009
F6	6,0 ± 0,004	0,25 ± 0,004	0,60 ± 0,007	0,96 ± 0,003
F7	4,59 ± 0,25	0,21 ± 0,01	0,69 ± 0,004	0,97 ± 0,004
F8	6,50 ± 0,06	0,16 ± 0,004	0,64 ± 0,003	0,99 ± 0,001
F9	407,05 ± 13,45	0,53 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,90 ± 0,001

^a Cada valor representa a média (± desvio padrão) de três replicatas.

Por meio dos reogramas apresentados para as formulações F7 e F8 (Figura 31) é possível detectar comportamento tipo pseudoplástico com tixotropia moderada a 25°C (Fig. 31^a) e baixa tixotropia a 37°C (Fig. 31b) como nos sistemas (S7-S8). Não foi possível detectar o efeito do conteúdo de água sobre as viscosidades aparentes, porém, apresentaram discreto aumento nas viscosidades aparentes quando comparadas aos sistemas respectivos.

Figura 30. Reogramas de fluxo das formulações F4(●), F5(■) e F6(▲) nas temperaturas de 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

A formulação F9 também apresentou comportamento plástico como descrito para o sistema S9, contudo, apresentou maior valor de cedência ($\sigma_o = 1400\text{Pa}$). Diferente dos sistemas (S7-S9), as formulações F7-F9 apresentaram valores de k inferiores, o que pode estar relacionado com a presença do fármaco nas matrizes com razão MLG/CREM (4,0). Contudo, os valores de k foram influenciados tanto pela razão MLG/CREM quanto pelo conteúdo de água para todas as formulações (F1-F9). O índice de pseudoplasticidade (n) foi menor para as formulações (F1-F6), quando comparados aos seus sistemas. Para as formulações F7-F9 aconteceu o inverso (Tabela 11).

Perioli e colaboradores (2008) investigaram a influencia dos componentes de emulsões gelificadas contendo fluibuprofeno, sobre as propriedades de fluxo. Os resultados sugeriram que o aumento da viscosidade e do ponto de cedência (comportamento plástico) foi influenciado principalmente pela quantidade da fase oleosa interna dos emulgéis. Desta forma, apenas as formulações com baixo conteúdo de fase oleosa apresentaram propriedades de fluxos adequadas para extrusão por meio de seringa.

A análise de variância para o índice de consistência (k) das formulações a 25°C demonstrou interação positiva, com significância ($p < 0,01$) entre os fatores, MLG/CREM e conteúdo de água, e ($p < 0,05$) para o termo quadrático (Tabela 12 e Figura 32). Enquanto que nos sistemas só houve interação positiva e significativa para o fator MLG/CREM. A 37°C apenas o fator MLG/CREM teve interação positiva significativa ($p > 0,05$) sobre os valores de k das formulações (Tabela 12 e Figura 33). Para o índice de fluxo (n) das formulações, a análise de variância demonstrou influência positiva e significativa do fator MLG/CREM ($p < 0,01$) apenas na temperatura de 25°C (Tabela 13 e Figura 34). A 37°C nenhum fator apresentou influência significativa ($p > 0,05$).

Figura 31. Reogramas de fluxo das formulações F7(●), F8(■) e F9(▲) nas temperaturas de 25 (a) e 37°C (b). As curvas de ida estão representadas pelos símbolos fechados, as curvas de volta pelos símbolos abertos. Curva ascendente da viscosidade aparente vs gradiente de cisalhamento a 25 e 37°C (c). Cada valor é a média de três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

Tabela 12. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o índice de consistência (k) das formulações a 25 e 37°C.

Coeficientes	Índice de consistência (k)	
	25°C	37°C
Intercepto	3,7334*	0,2332*
MLG/CREM	3,4150**	- 0,1016*
(MLG/CREM) ²	0,2209	0,1310
H ₂ O	1,9616*	0,0666
(H ₂ O) ²	0,9409	0,0560
MLG/CREM* H ₂ O	1,9525*	0,0575
F calculado	15,2274	4,5326
F tabelado	0,1980	0,1980
F calculado/tabelado	76,9036	22,8914
R ²	0,93	0,81

Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

Tabela 13. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o índice de fluxo (n) das formulações a 25°C.

Coeficientes	Índice de fluxo (n)
	25°C
Intercepto	3,7334*
MLG/CREM	3,4150**
(MLG/CREM) ²	0,2209
H ₂ O	1,9616*
(H ₂ O) ²	0,9409
MLG/CREM* H ₂ O	1,9525*
F calculado	15,2274
F tabelado	0,1980
F calculado/tabelado	76,9036
R ²	0,93

Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

Figura 32. Superfície de resposta do índice de consistência (k) a 25°C das formulações.

Figura 33. Superfície de resposta do índice de consistência (k) a 37°C das formulações.

Figura 34. Superfície de resposta do índice de fluxo (n) a 25°C das formulações.

4.7 Análise reológica oscilatória

Foi realizado a fim de obter informações sobre a rede da estrutura interna, além de avaliar o efeito da transição e/ou ordenação estrutural dos sistemas de fase cristalina (ZHENG et al., 2011). Estas poderão contribuir para adequada espalhabilidade, retenção e liberação sustentada do fármaco no site de aplicação (ANDREWS et al., 2009; JONES et al., 1997; JONES et al., 2000; NEEDLEMAN; SMALES, 1995). Os principais parâmetros responsáveis por fornecer informações a cerca das propriedades viscoelásticas de um sistema é o módulos de armazenamento ou elástico (G'), o módulo de perda ou viscoso (G'') e ângulo de defasagem ($\tan \delta$). Portanto, as propriedades viscoelásticas dos sistemas foram avaliadas á 25 e 37°C, pelo monitoramento dos módulos G' , G'' (módulo) e $\tan \delta$ sob varredura de frequência.

Dependendo do grau de pseudoplasticidade, a evolução das propriedades viscoelásticos foi peculiar a cada sistema, conseqüentemente, a razão MLG/CREM e conteúdo de água foram fatores determinantes para essas diferenças. Em vista disso, os sistemas apresentaram comportamento fluído viscoso, gel elástico e viscoelástico.

Os sistemas S1, S2 e S3 com razão MLG/CREM (0.25) e diferentes conteúdos de água apresentaram comportamento predominantemente de líquido viscoso (módulo de perda sempre superior ao módulo de armazenagem ($G' < G''$), tanto a 25 quanto a 37°C durante a

varredura de frequência. Além disso, as propriedades viscoelásticas desses sistemas foram independentes do conteúdo de água e dependentes da frequência (Fig. 35, a-b). Os valores correspondentes a $\tan \delta$ (G''/G') evidenciam um comportamento mais viscoso ($\tan \delta > 1$), sugerindo maior habilidade em dissipar energia, devido à pequena ordem de estruturação. Estes dados corroboram com a organização micelar observada nas curvas de SAXS (Item 4.2, Figura 10).

Portanto, características como baixa viscosidade aparente, comportamento predominantemente líquido e erosão em menos de uma hora no ensaio de captação de água inviabilizando a transição para fase líquido cristalina. Estes fatores somados os tornam inapropriados ao emprego como sistemas de liberação sustentada de fármaco intrabolsa periodontal.

Com aumento da razão MLG/CREM para 2,1 os sistemas (S4, S5 e S6) tiveram suas propriedades viscoelásticas fortemente influenciadas pelo conteúdo de água e temperatura (Fig. 36, a-b). O sistema S4 com menor conteúdo de água (5%) apresentou módulo de armazenamento (G') e perda (G'') dependentes da frequência tanto a 25 quanto a 37°C. Sob varredura de frequência prevaleceu o comportamento líquido viscoso ($G' < G''$) com valores de ângulo de defasagem ($\tan \delta$) que variaram entre 85 a 90Pa. Embora o sistema S4 tenha apresentado comportamento de fluido viscoso, a magnitude dos módulos G' e G'' aumentam com o aumento da frequência tendendo a convergência das curvas, típico de mudança estrutural como em transição de um fluido micelar (S1-S3) para o início de organização líquido cristalina, fenômeno comprovado pelas análises de SAXS (Item 4.2, Figura 11).

Figura 35. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda em função da frequência para os sistemas S1, S2 e S3 com razão MLG/CREM (0,25) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).

Figura 36. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para os sistemas S4, S5 e S6 com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).

Porém, os sistemas S5 e S6 com 10 e 15% de água apresentaram valores de módulo elástico superiores ao módulo viscoso ($G' > G''$) durante toda varredura de frequência, caracterizando um comportamento tipo gel a 25°C. Este comportamento corrobora com a presença de uma rede de estrutura mais resistente em relação aos sistemas supracitados (S1-S4), fenômeno que pode ser atribuído ao aumento do conteúdo de água (VERECKEN, et al., 2010) e razão de MLG/CREM, que favoreceu a ordenação para região de transição líquido cristalina como demonstrado pelas curvas de SAXS. Apesar do sistema S6 ter o maior conteúdo de água, apresentou menores valores da componente elástica (G') quando comparado ao sistema S5 com 10% de água. Este resultado está em concordância com o baixo valor de índice de consistência (k) conferido ao sistema S6.

A 37°C, independente do conteúdo de água, todos os sistemas exibiram módulo de perda superior ao módulo de armazenamento ($G' < G''$) caracterizando-os como líquido viscoso, devidamente compreendido pelo o ponto de fusão do monolinoleato de glicerila discutidos na sessão anterior de fluxo.

As curvas dos módulos G' e G'' para os sistemas S7, S8 e S9 com razão MLG/CREM (4,0) a 25 e 37°C são apresentados na Figura 37. A 25°C o sistema S7 (5% de água), quando submetido à baixa frequência apresentou, módulo viscoso maior que o elástico ($G' < G''$), característico de líquido viscoso. Porém, com o aumento da frequência angular a curva G' interceptou a curva G'' (frequência de 0,4 Hz, $G' = G'' = 103\text{Pa}$). A $\tan \delta$ foi reduzida de 65,19 para 15,95Pa durante o ciclo de frequência. Portanto, essa região de transição indica que após crossover a energia estocada na estrutura do sistemas prevalece sobre a energia que foi dissipada por forças viscosas, adquirindo comportamento elástico tipo gel ($G' > G''$) (KO Ojijo et al., 2004; MEZZENGA et al., 2005).

O comportamento viscoelástico apresentado pelo sistema S7 é caracterizado por um tempo de relaxamento específico ou tempo máximo de relaxamento $\tau_{\text{máx}}$ necessário para estrutura fluida relaxar e assumir um comportamento elástico. (MEZZENGA et al., 2005; LISBSTER et al., 2007). O $\tau_{\text{máx}}$ pode ser calculado pelo inverso da frequência referente ao ponto de crossover ($1/\omega_{\text{crossover}}$), cujo tempo necessário para a transição foi de 0,4s. Os sistemas S8 e S9 apresentaram predominância do módulo de armazenamento $G' > G''$ com valores de ângulo de defasagem que diminuíram de 45 para 12Pa, característicos de sistemas tipo gel a 25°C. Porém, o sistema S9 com maior conteúdo de água (15%) apresentou módulos G' e G'' constantes, independente da frequência durante todo o ciclo, o que corrobora com maior estruturação, uma vez que esse sistema apresentou comportamento de fluxo plástico.

Figura 37. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para os sistemas S7, S8 e S9 com razão MLG/CREM (4,0) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).

É importante ressaltar, que todos os sistemas apresentaram propriedades viscoelásticas que foram dependentes da temperatura e frequência. Assim, com o aumento da temperatura (37°C) tanto os sistemas caracterizados por uma organização tipo micelar (S1, S2 e S3), quanto os sistemas em transição para fase líquido cristalina (S4, S5, S6, S7 e S8) adquirem comportamento de líquidos viscosos. Exceto o sistema S9 com maior conteúdo de água (15%) apresentou comportamento viscoelástico a 37°C. Este foi caracterizado como líquido viscoso ($G' < G''$) quando em baixa frequência, e com o aumento da frequência as curvas de G' e G'' convergem, em seguida, após ponto de crossover o sistema apresenta comportamento elástico tipo gel ($G' > G''$) com tempo máximo de relaxamento $\tau_{\text{máx}}$ de 0,3s.

Em varredura de frequência, à medida que a razão de MLG/CREM e conteúdo de água aumentam, ambos os módulos G' e G'' aumentaram significativamente e a $\tan \delta$ diminuiu a 25°C. Sob altas frequências os valores de G' se tornam constantes e sempre superiores ao módulo G'' independentes da frequência com tendência a formação de um platô denominado de região de viscoelasticidade (JONES et al., 2001), esta tem sido associada com a formação de um rede de ligação estrutural elástica devido a interações entre domínios líquido cristalinos (CORDOBÉS; FRANCO; GALLEGOS, 2005). Segundo Clark AH e Ross-Murphy a existência dessa região platô sobre severas taxas de frequências é um critério importante para qualificação de rede estrutural tipo gel.

Inúmeros pesquisadores têm empregado o ensaio de reologia oscilatória em associação com MLP e SAXS com intuito de obter completa informação sobre a auto-organização estrutural de fase líquido cristalina, além da coexistência de transições de fase (ALAM; ARAMAKI, 2009; LISBSTER et al., 2007; MEZZENGA et al., 2005; NÉMETH et al., 1998; PRUD'HOMME; GUANGWEI; SCHNEIDE, 1996; RODRIGUEZ-ABREU et al., 2005; SIDDIG et al., 2006; ZHENG et al., 2011;). Neste estudo, a associação dessas técnicas foi de grande valia para compreender e caracterizar as propriedades viscoelásticas inerentes aos sistemas desenvolvidos. Em suma, foi possível acompanhar as mudanças estruturais e viscoelásticas configuradas na transição de sistemas viscosos tipo líquido (S1-S3) com organização micelar (Item 4.2, Figura 10) para sistemas (S4-S9) que tenderam a um comportamento elástico tipo gel durante a varredura de frequência, caracterizados como sistemas em transição para fase cristalina (Item 4.2 Figura 11 e 12).

Na Figura 38 são mostrados os gráficos dos módulos G' e G'' para os sistemas S1, S4 e S7, onde é possível observar que apenas o sistema com maior razão MLG/CREM (4,0)

apresenta comportamento viscoelástico, característico de estrutura tipo gel após ponto de crossover. Portanto, os sistemas mais promissores, são aqueles capazes de armazenar energia ($G' > G''$), ou seja, a partir da razão MLG/CREM de 2,1 e conteúdo de água igual ou acima de 10%.

Figura 38. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para os sistemas S1, S4 e S7 a 25 °C. Os módulos G' e G'' estão representados pelos símbolos fechados e abertos, respectivamente.

Nas figuras 39, 40 e 41 são apresentados a evolução dos módulos G' e G'' em função da frequência para as formulações a 25 e 37°C. A adição do fármaco aos sistemas provocou aumento das componentes elásticas e viscosas, o que evidenciou, para maioria das formulações maior estruturação.

Formulações F1, F2 e F3 com razão MLG/CREM (0,25), como seus respectivos sistemas, apresentaram comportamento líquido viscoso ($G' < G''$) a 25 e 37°C (Fig. 39, a-b). Entretanto, houve considerável aumento dos valores do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') em relação aos sistemas (S1-S3), o que provocou aumento do comportamento

líquido viscoso dessas formulações, prova disso, foi o aumento dos valores de ângulo de defasagem (89-91Pa).

Entre as formulações (F4-F6) com razão MLG/CREM (2,1), a formulação F4 apresentou comportamento tipo líquido viscoso ($G' < G''$) a 25 e 37°C, com módulos de armazenamento e perda dependentes da frequência (Fig. 40, a-b). Porém, a adição do fármaco provocou o aumento dos módulo G' , sugerindo o aumento da resposta elástica que alcança valores muito próximos do G'' . Provavelmente, conferindo maior estruturação, o que corrobora com as análises de SAXS que confirmaram região em transição de fase cristalina. As formulações F5 e F6 apresentaram comportamento predominantemente elástico tipo gel a 25°C e líquido viscoso a 37°C. Além disso, a adição de fármaco não provocou efeito sobre suas propriedades viscoelásticas (Fig 40, a-b).

As formulações F7 e F8 a 25°C apresentaram comportamento típico de líquido viscoso ($G' < G''$), a baixa frequência, com aumento da frequência adquirem propriedades elásticas tipo gel ($G' > G''$) com valores de ponto de crossover de 0,5Hz (3,14rad/s) e 0,25Hz (1,57rads) e tempos de relaxamento $\tau_{\text{máx}}$ de 0,3s e 0,6s, respectivamente (Fig. 41a). Neste caso, a adição do fármaco provocou aumento de ambos os módulos G' e G'' , porém, com maior relevância para o módulo de perda, o que provocou a diminuição do tempo de relaxamento para formulação F7, quando comparado ao sistema S7 ($\tau_{\text{máx}} = 0,4\text{s}$) sem fármaco. A formulação F8 com adição do fármaco passou de um comportamento predominantemente elástico (S8) para comportamento viscoelástico. Estes resultados são coerentes com os baixos índices de consistência (k) apresentados por essas formulações. A 37°C o comportamento é predominante líquido viscoso com valores de módulo de perda sempre excedendo os de módulo de armazenamento ($G' < G''$) com discreto aumento da resposta viscosa em relação aos sistemas (S7 e S8) sem fármaco (Fig. 41b).

A formulação F9 também apresentou discreta diminuição dos módulos de armazenamento e perda, contudo, o comportamento continuou predominantemente elástico tipo gel ($G' > G''$) a 25°C, e comportamento viscoelástico a 37°C com tempo de relaxamento de 0,6s.

Figura 39. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda em função da frequência para as formulações F1, F2 e F3 com razão MLG/CREM (0,25) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).

Figura 40. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para as formulações F4, F5 e F6 com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).

Figura 41. Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência para as formulações F7, F8 e F9 com razão MLG/CREM (2,1) e conteúdos de água de 5, 10 e 15%, respectivamente, a 25 (a) e 37°C (b).

4.8 Determinação do trabalho necessário para extrusão da formulação pela seringa (Seringabilidade)

A força mínima para iniciar o fluxo e o trabalho necessário para a extrusão de sistemas de liberação destinados a aplicação em locais específicos, como a bolsa periodontal, são parâmetros importantes durante o desenvolvimento dos mesmos, uma vez que estes parâmetros são função da viscosidade ou fluidez (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997; KELLY et al., 2004; BRUSCHI et al., 2007). Este tipo de ensaio pode ser realizado com seringa de vidro, ou de plástico, sendo a constituída de plástico, sem agulha, a mais utilizada (BRUSCHI et al., 2007; GAUR; RUCH; AWANI, 2010; JONES et al., 1996; JONES et al., 1999;). Em face disto, visando padronizar as condições do ensaio optamos por avaliar a força mínima necessária para iniciar a movimento do êmbolo em seringa de plástico e de vidro, vazias e sem agulha. Como pode ser observado na figura 42, a seringa de plástico requer força de 5,1N, sendo estatisticamente maior ($p < 0,001$) que a necessária para a de vidro 0.85 N. Em face disto optamos por utilizar seringa de vidro.

A aplicação prática de sistemas semi-sólidos em bolsa periodontal é realizado com seringa acoplada a agulha, devido as características anatômicas da bolsa periodontal, cujo profundidade varia entre 04 a 12mm (MEDLICOTT et al., 1994). Por outro lado, a força inicial e o trabalho de extrusão, considerando um semi-sólido com mesma viscosidade, podem ser afetados pelo diâmetro da agulha (BURGESS, 2005; BURCKBUCHLER et al., 2010). Por isso, avaliamos a força mínima e o trabalho necessário para extrusão de um sistema (S8) em seringa de vidro com e sem agulha. Como pode ser verificada na figura 43, a força necessária para iniciar o fluxo do sistema (S8) foi maior na seringa acoplada com agulha, foi maior (aproximadamente 11N) quando comparado a seringa sem agulha (0,5N), correspondendo ao trabalho de extrusão de 293N.mm e 11,18N.mm, respectivamente.

Figura 42. Força mínima necessária para iniciar o movimento do êmbolo em seringa de plástico e seringa de vidro vazia. Cada valor representa a média de cinco réplicas, com coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 43 Influência da utilização da seringa acoplada com agulha sobre a força necessária para iniciar o fluxo de um sistema (S8) pela seringa. Cada valor representa a média de cinco réplicas, com coeficiente de variação menor que 10%.

Para avaliar a influência do diâmetro da agulha, foi realizado o ensaio de seringabilidade com o sistema (S7) utilizando seringa de vidro acoplada com agulha de mesmo comprimento 20 mm e diferentes diâmetros 0,6; 0,8 e 1,2mm (Figura 44). A força necessária para iniciar o fluxo (extrusão) reduz com o aumento do diâmetro da agulha, sendo estatisticamente diferentes ($p < 0,001$) em relação a cada diâmetro (25,3; 8,3 e 2,03N, respectivamente). Considerando o diâmetro da agulha e as dimensões da bolsa, a mais apropriada seria a de 23G (0,6mm), no entanto foi descartada face ao trabalho de extrusão (491,56Nmm). A 18G (1,2mm) requer o menor trabalho para extrusão (57,43N.mm), porém devido ao maior diâmetro dificultaria a inserção na bolsa periodontal. Assim os resultados advogam a favor do uso de seringa de vidro acoplada com agulha com diâmetro de 0,8mm devido à facilidade de extrusão e inserção da mesma na bolsa periodontal.

Portanto, por meio de todos dos parâmetros obtidos no ensaio seringabilidade, foi possível ressaltar a importância do uso da seringa acoplada a agulha de maneira que simule a condição da administração *in vivo* e, além disso, sobre a necessidade de padronizar o diâmetro interno da agulha, já que a força e trabalho de seringabilidade é afetado tanto pelas propriedades de fluxo do material quanto pelas características da agulha. BURCKBUCHLER et al. (2010) avaliaram as propriedades de seringabilidade de soluções de imunoglobulinas policlonais com diferentes concentrações, e concluiu que a força necessária para iniciar o fluxo na seringa foi afetada por 3 parâmetros, viscosidade da solução, taxa de fluxo e diâmetro interno da agulha.

Os trabalhos de seringabilidade obtidos para os sistemas foram proporcionais à razão MLG/CREM, teor de água, e viscosidades aparentes (Tabela 14). Este fato pode ser atribuído à estruturação dos sistemas com aumento gradual da razão MLG/CREM e conteúdo de água. Estes transitam de micelas viscosas (S1-S3) para organização em transição de fase cristalina com características viscoelásticas (S4-S9). O valor máximo de trabalho foi apresentado pelo sistema S9, o que era esperado devido ao comportamento de fluxo tipo plástico com elevado valor de ponto de escoamento (800Pa).

Figura 44. Efeito do diâmetro da agulha sobre a força requerida para iniciar o fluxo (extrusão) do sistema (S7) pela seringa.

Tabela 14. Efeito da razão MLG/CREM e conteúdo de água sobre o trabalho necessário para extrusão dos sistemas por meio de seringa acoplada com agulha (seringabilidade).

Sistemas	MLG/CREM (m/m)	Água (%)	Média dos Trabalhos de seringabilidade (N.mm)
S1	0,25	5	152,17 ± 5,12
S2	0,25	10	187,79 ± 3,07
S3	0,25	15	187,25 ± 8,10
S4	2,1	5	103,54 ± 5,85
S5	2,1	10	111,49 ± 2,74
S6	2,1	15	156,06 ± 4,08
S7	4,0	5	182,82 ± 6,17
S8	4,0	10	192,96 ± 3,45
S9	4,0	15	484,26 ± 18,38

*Cada valor representa a média (± desvio padrão) de no mínimo cinco réplicas.

O fator quadrático $(\text{MLG/CREM})^2$ e $\% \text{H}_2\text{O}$ apresentou efeito positivo sobre o trabalho de seringabilidade ($p < 0,05$) (Tabela 15 e Figura 45).

Tabela 15. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para trabalho de seringabilidade dos sistemas.

Coefficientes	Trabalho de seringabilidade
Intercepto	117,1978*
MLG/CREM	24,4950
$(\text{MLG/CREM})^2$	74,1150**
H_2O	34,4124***
$(\text{H}_2\text{O})^2$	13,9611
MLG/CREM* H_2O	20,4676
F calculado	6,3510
F tabelado	0,1980
F calculado/tabelado	32,0750
R^2	0,92
Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

Figura 45. Superfície de resposta do trabalho de seringabilidade dos sistemas.

A influência do diâmetro da agulha sobre a força necessária para iniciar o fluxo das formulações, foi avaliado nas mesmas condições utilizadas para os sistemas, utilizando a formulação F7, sendo os resultados similares, porém, como esperado com valores maiores (Figura 46).

Os valores de trabalho de extrusão das formulações foram maiores que os obtidos para os sistemas (Tabela 16), isto pode ser atribuído à estabilização proporcionada pelo fármaco dissolvido ou a presença de cristais do fármaco que apresenta maior resistência ao fluxo. Porém este aumento não inviabiliza a extrusão, uma vez que a literatura recomenda valores entre 12 a 600 N.mm (BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 1996; JONES et al., 1999; JONES et al., 2000). É conveniente ressaltar que os valores foram obtidos utilizando seringa de plástico sem agulha.

Figura 46. Efeito do diâmetro da agulha sobre a força requerida para iniciar o fluxo (extrusão) da formulação (F7) pela seringa.

A análise de variância dos dados relativos ao trabalho de seringabilidade das formulações demonstraram, interação positiva e significativa ($p < 0,05$) entre os fatores (MLG/CREM e água), e termos quadrático $(\text{MLG/CREM})^2$ e $(\text{H}_2\text{O})^2$ com significância ($p < 0,01$) (Tabela 17 e Figura 47). Contudo, formulações com razão MLG/CREM 4,0 ou maior, e

conteúdo de água de 15%, apresenta valor de trabalho de seringabilidade inadequado para fácil extrusão, como exemplo a formulação F9.

Tabela 16. Efeito da razão MLG/CREM e conteúdo de água sobre o trabalho necessário para extrusão das formulações por meio de seringa acoplada com agulha (seringabilidade).

Formulações	MLG/CREM (m/m)	Água (%)	Média dos Trabalhos de seringabilidade (N.mm)
F1	0,25	5	160,34 ± 5,28
F2	0,25	10	175,96 ± 2,67
F3	0,25	15	193,17 ± 7,60
F4	2,1	5	132,96 ± 5,80
F5	2,1	10	193,94 ± 2,74
F6	2,1	15	194,54 ± 5,0
F7	4,0	5	222,5 ± 4,27
F8	4,0	10	301,63 ± 8,09
F9	4,0	15	606,86 ± 8,40

*Cada valor representa a média (± desvio padrão) de no mínimo cinco réplicas.

Tabela 17. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para trabalho de seringabilidade das formulações.

Coefficientes	Trabalho de seringabilidade
Intercepto	126,3377 **
MLG/CREM	91,5750 **
(MLG/CREM) ²	124,1777 **
H ₂ O	68,8360 **
(H ₂ O) ²	36,1852
MLG/CREM* H ₂ O	77,8961 **
F calculado	15,22745
F tabelado	0,1980
F calculado/tabelado	76,9036
R ²	0,9383

Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

Figura 47. Superfície de resposta do trabalho de seringabilidade das formulações.

4.9 Estudo “ex vivo” de mucoadesão

A bioadesão é definida como a interação entre macromoléculas sintéticas ou naturais e uma superfície biológica, por período de tempo variável. Quando a interação ocorre com o muco é denominado de mucoadesão (ANDREWS et al, 2009.; WOODLEY, 2001). De forma simplificada, pode ser definida como a interação entre a forma farmacêutica e o muco (KHUTORYANSKIY, 2011). Várias teorias, isoladas ou associadas, são utilizadas para explicar os mecanismos de mucoadesão (CHICKERING; MATHIOWITZ, 1999; KHUTORYANSKAYA et al., 2009; SMART, 2005; WOODLEY, 2001), no entanto podemos considerar ainda não completamente elucidado.

Sistemas mucoadesivos apresentam como principal vantagem o aumento do tempo da forma farmacêutica no local de aplicação, quando associada liberação lenta e contínua do fármaco, possibilita redução da frequência de administração e quase sempre maior eficácia terapêutica (BONACUCINA et al., 2004; SUDHAKAR et al., 2006; ANDREWS et al., 2009). No caso específico de formas farmacêuticas de aplicação na cavidade bucal, vários desafios devem ser vencidos entre outros, a força de cisalhamento provocada pela fala, mastigação e higiene bucal, além do fluxo salivar contínuo (RATHBONE et al., 1994;

SALAMAT-MILLER et al., 2005). Sendo este último uma das principais causas de insucesso relacionadas ao uso de polímeros hidrofílicos (PONCHEL et al., 1987; SMART, 2004; ZAMAN et al., 2008) Por isso, o crescente interesse em materiais e mucoadesivos não aquosos e/ou estáveis em meio aquoso, preferencialmente aqueles que em presença de água passam por estruturação de fases, como o monolinoleato de glicerila.

No presente estudo os parâmetros utilizados para avaliar a mucoadesão foram a força requerida para destacar os sistemas da superfície da mucosa suína (força de destacamento) e a área sob a curva, o trabalho de mucoadesão.

A fim de padronizar as condições experimentais foi realizado um ensaio com 3 diferentes forças de contato, mantendo tempo constante de 3 minutos (Figura 48). Para o mesmo sistema, as forças de destacamento aumentaram em função da força de contato, em face disto optou-se pela utilização de força de contato de 0,5N.

Com intuito de investigar a influencia ou não da transição de fases, que ocorre com a captação de água, sobre a força de destacamento e trabalho de mucoadesão (Figura 49). O ensaio foi realizado utilizando a formulação (F8) com mucosa imersa e não imersa em saliva artificial a 37°C. Quando imersa a força de destacamento (0,18N) e o trabalho (0,89N.mm), foram maiores que aqueles obtidos quando não imerso (0,14N e 0,65N.mm, respectivamente). Como o interior da bolsa é banhado pelo líquido gengival crevicular, optou-se por realizar os ensaios com a mucosa imersa em saliva artificial.

Figura 48. Influencia de diferentes forças de contato, por tempo fixo, sobre a força de destacamento do sistema.

Figura 49. Forças de destacamento adquirida no ensaio mucoadesão (*ex vivo*) para formulação F8 sob duas condições: mucosa imersa (-) ou não imersa (-) em saliva artificial, mantida á 37°C.

As forças de destacamento e trabalhos mucoadesivos obtidos partir dos sistemas são apresentados na tabela 18. As forças de destacamento entre os sistemas variaram de 0,09 a 0,19N e foram similares as relatadas por Geraghty e colaboradores (1997) que obtiveram forças de destacamento de 0,06 a 0,18N, utilizando monoleato de glicerila. No entanto, se comparada a sistemas bioadesivos poliméricos, cujos valores força de destacamento variaram de 0,20 a 0,59N (BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 2009; JONES et al., 1997), podem ser consideradas com baixa mucoadesão.

A força de destacamento dos S1, S2 e S3 com menor razão MLG/CREM (0,25) e diferentes conteúdos de água, foram menores ($P < 0,005$) quando comparado ao outros. Provavelmente, devido à baixa viscosidade, e captação de água insuficiente para a transição em fase cristalina, durante o tempo de contato com a saliva. Os sistemas (S4 a S9) com maiores razão de MLG/CREM (2,1; 4,0) apresentaram maiores ($p < 0,05$) valores de força e consequentemente trabalho mucoadesivo quando em excesso de saliva, o que corrobora com a transição de estrutura micelar para fase cúbica cristalina desses sistemas, como demonstrada por MLP e SAXS após ensaio de captação de água. A transição aumenta a propriedade elástica dos sistemas que se comportam como géis, com efeito positivo na propriedade mucoadesiva (LEE; YOUNG; KELLAWAY, 2001; SMART, 2005; ZAMAN; MARTIN; RESS, 2008).

Com base neste resultado é possível sugerir dois mecanismos: no primeiro à mucoadesão ocorreria por interações fracas e inespecífica entre o sistema e o muco, tais como, ligação de hidrogênio, forças de van der Waals e ligações hidrofóbicas, facilitadas pela estrutura molecular anfifílica do monolinoleato de glicerila (ANDREWS et al., 2009; GERAGHTY et al., 1997; KINLOCH, 1980).

O segundo está relacionado com a teoria da desidratação, ou seja, o movimento de água da mucosa para o sistema cria um fluxo capilar que mantém as duas superfícies unidas (MORTAZAVI e SMART, 1993; MORTAZAVI e SMART, 1994).

A literatura relata resultados conflitantes. Nielsen e colaboradores (1998) sugerem que o mecanismo de mucoadesão, a partir de matrizes de monoleato seja inespecífico, pois em matrizes não hidratadas e hidratadas com 15 ou 30% de água as forças de destacamento foram similares, independente do substrato.

Tabela 18. Força de destacamento e trabalho de mucoadesão obtido para os sistemas.

Sistemas	MLG/C REM (m/m)	H ₂ O (%)	Força de destacamento (N)	Trabalho de mucoadesão (N.mm)
S1	0,25	5	0,14 ± 0,033	0,593 ± 0,172
S2	0,25	10	0,09 ± 0,009	0,360 ± 0,039
S3	0,25	15	0,13 ± 0,031	0,662 ± 0,147
S4	2,1	5	0,17 ± 0,048	1,005 ± 0,363
S5	2,1	10	0,18 ± 0,013	0,912 ± 0,256
S6	2,1	15	0,16 ± 0,025	0,915 ± 0,283
S7	4,0	5	0,17 ± 0,012	0,830 ± 0,054
S8	4,0	10	0,19 ± 0,036	1,169 ± 0,73
S9	4,0	15	0,15 ± 0,014	0,942 ± 0,17

*Cada valor representa à média (± desvio padrão) de no mínimo cinco réplicas.

Geraghty e colaboradores (1997) demonstraram, utilizando sistemas baseados em monoleato de glicerila (Myverol 18-99[®]) e água, que a interação foi mais forte em substrato de Perpex não hidratado, quando comparado a mucosa hidratada, independente do tempo de contato. Porém aumenta com o aumento da força de contato. Sugerindo que o mecanismo envolvido na bioadesão possivelmente ocorreu por ligações químicas secundárias como forças de van der Waals, e não através da interpenetração.

À variabilidade dos métodos e condições experimentais empregadas para avaliação de bio e/ou mucoadesão de sistemas de liberação tem gerado resultados conflitantes na literatura (PEPPAS; BURI, 1985; WONG et al., 1999; MORTAZAVI; SMART, 1995; KHARENKO; LARIONOVA; DEMINA et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). Alguns exemplos de diferentes métodos e condições são exemplificados a seguir.

Wong e colaboradores (1999) avaliaram um método de tensão (Analisador de textura, TA-XT₂) para o estudo *in vitro* de sistemas bucais adesivos e demonstraram que os parâmetros como força de contato, tempo de contato e velocidade de remoção do acessório pela mucosa tecidual, afetam a força de destacamento e o trabalho de adesão.

O método de mucoadesão (*ex vivo*) adotado neste estudo foi desenvolvido e padronizado com intuito de obter o máximo de similaridades com um modelo *in vivo* de mucoadesão. Em face disto, foram utilizadas mucosas suínas bucais com tamanhos similares e imersas em saliva artificial a 37°C. Além disso, parâmetros como tempo de contato e velocidade de destacamento foram fixados.

Para sistemas semi-sólidos a ruptura ou falha da ligação mucoadesiva pode ocorrer em três regiões como demonstrado na (Figura 50). Em sistemas com ligações mucoadesivas fortes a ruptura acontece dentro do muco, para ligações fracas na superfície entre o sistema e o muco, e muito fraca na parte hidratada do próprio sistema. Com base nessas informações, mesmo com os ajustes empregados ao modelo experimental de mucoadesão (*ex vivo*), o método foi sensível para detectar apenas a força de ruptura (destacamento) na interface entre o sistema /formulação e a mucosa.

Figura 50. Regiões onde a ruptura (falha) da ligação mucoadesiva pode ocorrer, adaptado de Smart, (2005).

A análise de variância relacionada à força e trabalho mucoadesivo dos sistemas demonstrou, interação positiva e significativa ($p < 0,05$) entre os fatores MLG/CREM e termo quadrático $(\text{MLG/CREM})^2$, ou seja, quanto maior a razão MLG/CREM maior a mucoadesão (Tabela 19, Figuras 51 e 52, respectivamente).

De maneira geral, a força de destacamento e o trabalho de mucoadesão, foram menores para as formulações, quando comparado aos respectivos sistemas (Tabela 20). As formulações F1, F2 e F3 apresentaram menor força e trabalho mucoadesivo quando

comparadas as outras ($p < 0,05$). Contudo, ao compararmos as médias das forças de mucoadesão das formulações (F4-F6, razão MLG/CREM: 2,1) com os valores apresentados pelas formulações (F7-F9, razão MLG/CREM: 4,0) não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Diante dessas análises, é possível sugerir que o aumento da biomucoadesão das formulações também se deu com o aumento do monolinoleato de glicerila.

Tabela 19. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para a força de destacamento e trabalho de mucoadesão dos sistemas.

Coefficientes	Força de destacamento (N)	Trabalho de mucoadesão (N.mm)
Intercepto	0,1663*	0,9202*
MLG/CREM	0,0233*	0,2210**
(MLG/CREM) ²	-0,0257	-0,1741
H ₂ O	-0,0066	0,0155
(H ₂ O) ²	0,0042	0,0203
MLG/CREM* H ₂ O	-0,0025	0,0105
F calculado	2,9073	3,256792
F tabelado	0,1980	0,1980
Fcalculado/tabelado	14,6833	16,4478
R ²	0,86	0,87
Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

Figura 51. Superfície de resposta da força de destacamento dos sistemas.

Figura 52. Superfície de resposta do trabalho de mucoadesão dos sistemas.

Tabela 20. Força de destacamento e trabalho de mucoadesão obtido para as formulações.

Formulações	MLG/CREM (m/m)	H ₂ O (%)	Força de destacamento (N)	Trabalho de mucoadesão (N.mm)
F1	0,25	5	0,09 ± 0,01	0,502 ± 0,07
F2	0,25	10	0,09 ± 0,01	0,555 ± 0,12
F3	0,25	15	0,08 ± 0,01	0,479 ± 0,17
F4	2,1	5	0,15 ± 0,02	0,842 ± 0,15
F5	2,1	10	0,15 ± 0,02	0,972 ± 0,24
F6	2,1	15	0,16 ± 0,02	1,00 ± 0,29
F7	4,0	5	0,15 ± 0,01	1,00 ± 0,09
F8	4,0	10	0,15 ± 0,01	0,905 ± 0,18
F9	4,0	15	0,15 ± 0,01	0,827 ± 0,12

***Cada valor representa à média (± desvio padrão) de no mínimo cinco réplicas.**

A Figura 53 resume as inter-relações sugeridas para a mucoadesão das formulações. No gráfico (A) dentre as forças de destacamento a do monolinoleato de glicerila (puro) se destaca quando comparada à força de destacamento entre mucosa-mucosa de bochecha suína. Contudo, as formulações apresentaram forças condizentes com a razão de MLG/CREM em sua composição, visto que as propriedades físico-químicas do material que compõe um sistema mucoadesivo é o principal fator responsável pelo tipo de força mucoadesiva formada (KELLAWAY; WARREN, 1996). Formulações (F4-F9) que apresentaram rápida captação de água (B), porém sem erosão, com transição para fase cúbica (C) após captação de água mostraram maiores valores de força de destacamento.

Figura 53. Esquema ilustrativo das inter-relações sugeridas no estudo *ex vivo* de mucoadesão. (A) Forças de destacamento das formulações, monolinoleato e mucosa-mucosa. (B). Perfil de captação de água das formulações (F4, F5, F6, F7, F8 e F9). (C) curvas de SAXS das formulações, F4 (-) F7 (-) após captação de água.

A análise de variância, considerando a força e trabalho mucoadesivo das formulações demonstrou, interação positiva e significativa entre os fatores MLG/CREM e termo quadrático (MLG/CREM)² ($p < 0,05$), ou seja, a mucoadesão aumenta com o aumento da razão MLG/CREM (Tabela 21, Figuras 54 e 55, respectivamente).

Tabela 21. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para a força de destacamento e trabalho de mucoadesão das formulações.

Coefficientes	Força de destacamento (N)	Trabalho de mucoadesão (N.mm)
Intercepto	0,1566	0,9781***
MLG/CREM	0,0303*	0,1998**
(MLG/CREM) ²	-0,0402**	-0,2713**
H ₂ O	0,0006	0,0226
(H ₂ O) ²	0,0047	0,0081
MLG/CREM* H ₂ O	0,0010	-0,0380
F calculado	13,7847	6,4479
F tabelado	0,1980	0,1980
Fcalculado/tabelado	69,6175	32,5640
R ²	0,93	0,86

Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

Figura 54. Superfície de resposta da força de destacamento das formulações.

Figura 55. Superfície de resposta do trabalho de mucoadesão das formulações.

4.10 Estudo do perfil de liberação *in vitro* do metronidazol

O desenvolvimento e avaliação de sistemas de liberação intrabolsa periodontal, tem como principal desafio mantê-lo no sítio de aplicação pelo tempo desejado liberando o fármaco em concentração superior ou equivalente a concentração inibitória mínima (CIM). Para tanto é necessário considerar a técnica ou método de avaliação *in vitro* que possibilite boa correlação *in vitro/in vivo*, características físico-químicas da formulação, e restrições anatomofisiologia do local de aplicação.

Neste sentido, vários métodos e equipamentos têm sido propostos, visando maior simulação das condições *in vivo*. NASTRUZZI et al., (1994) e ESPOSITO et al., (1996), utilizaram tubos de diálise. Gabarra (2002) um dispositivo com cavidade e fluxo de líquido similar ao que ocorre na bolsa, contudo o controle do fluxo não foi preciso. Bruschi (2006) aprimorou o controle do fluxo e avaliou com sucesso o perfil de liberação de sistemas semi-sólidos. Bruschi, Lara e Freitas (2008) desenvolveram um dispositivo (célula de liberação) para acomodação de amostras, com entrada e saída do líquido acceptor, o qual é mantido em fluxo contínuo, controlado por bomba peristáltica. Este dispositivo foi utilizado na avaliação do perfil de liberação em condições não ‘sink’.

Sistema baseado em monolinoleato tem como principal vantagem a auto-organização molecular e formação de diferentes estruturas cristalinas, em função da quantidade de água captada, possibilitando modular a velocidade de liberação do fármaco. Esta pode ser ajustada em função da razão monoleato/tensoativo, disponibilidade de água e consequentemente a transição de fase cristalina, além das características físico-químicas do fármaco (CHANG; BODMEIER, 1998; SHAH, M.H; PARADKAR, A, 2005; CHANG; BODMEIER, 2005; COSTA-BALOGH et al., 2010).

4.10.1 Perfil de dissolução *in vitro* do metronidazol em condição ‘sink’

A dissolução completa do metronidazol livre ocorreu em cerca de duas horas e meia. Os perfis liberação das formulações, F1, F2 e F3 com razão MLG/CREM (0,25) foram similares, cuja extensão variou entre 60 a 100% em 6 horas, sendo proporcional ao conteúdo inicial de água, porém, só houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as velocidades de liberação das formulações F1(5% de água) e F3 (15% de água), figura 56.

Esta baixa retenção do fármaco, pode ser atribuída ao domínio do cremofor, cujo balanço lipófilo-hidrófilo (EHL – 12 a 14), como já discutido no item (4.5) captação de água.

Estas formulações não atendem aos requisitos para sistemas de liberação sustentada de fármaco intrabolsa periodontal.

As formulações F4, F5 e F6 (razão MLG/CREM: 2,1) apresentaram perfis semelhantes ($p > 0,05$), independente do conteúdo de água, e liberação completa em 24h (Figura 57). Comparado ao perfil de liberação das formulações F1, F2 e F3 (MLG/CREM: 0,25) no mesmo período de tempo houve maior retenção do fármaco ($p < 0,05$). A maior retenção do fármaco pode ser atribuída à formação de fase cúbica, mais viscosa, devido à captação de água do meio de dissolução, como demonstrado por microscopia de luz polarizada e SAXS (Item 4.2, Figuras 13 e 14).

Vários estudos têm relacionado à liberação sustentada de fármacos a partir de matrizes de monoleato e monolinoleato de glicerila com a transição de fases cristalinas que ocorre durante o ensaio de dissolução, entre outros (CHANG; BODMEIER, 1998; COSTA-BALOGH et al., 2010; LARA et al., 2005; OKONOGI et al., 2004;). Costa-Balogh e colaboradores (2010) e (AHMED et al., 2010) demonstraram que a velocidade de liberação do fármaco é modulada pela viscosidade e comportamento das diferentes fases líquidas cristalinas.

As formulações F7, F8 e F9 com maior razão de MLG/CREM (4,0) apresentaram taxas de liberação do metronidazol semelhantes ($p > 0,05$) quando comparadas entre si (Figura 58), e com as formulações F4-F6, independente dos conteúdos iniciais de água. Este comportamento pode ser atribuído à partição dos canais aquosos e a resistência oferecida pela mesofase cúbica formadas *in situ* durante a dissolução, conferindo alta viscosidade e estruturação aos sistemas, promovendo a liberação sustentada do metronidazol (AHMED et al., 2010 ; COSTA-BALOGH et al., 2010; KUMAR, et al., 2004).

Em 1992, foi desenvolvido um gel biodegradável, seringável, à base de monooleato de glicerila e óleo de sésamo, contendo 25% de metronidazol e comercializado com o nome de Elyzol[®] (Dumex-Alpha, Copenhagen, Denmark). A liberação total do fármaco ocorreu em 24h, portanto não alcançando o objetivo de liberação prolongada (NORLING et al., 1992).

Figura 56. Perfil de liberação *in vitro* do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F1 (○) F2 (□), F3 (△) e Metronidazol (■). Os dados representam a média ± D.P., n = 3.

Figura 57. Perfil de liberação *in vitro* do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F4 (□) F5 (△) e F6 (○). Os dados representam a média ± D.P., n = 3.

Bansal et al. (2009) desenvolveram e compararam o perfil de liberação, mantendo condição 'sink', de géis mucoadesivos contendo metronidazol, com um gel disponível comercialmente (Metrogyl[®]). Todos liberam, entre 90 e 100% do fármaco em 08h.

Figura 58. Perfil de liberação *in vitro* do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F7 (□) F8 (○) e F9 (△). Os dados representam a média ± D.P., n= 3.

Para facilitar a visualização dos fatores que influenciaram os perfis de liberação, ver figura 59. A velocidade de liberação do fármaco reduz à medida que a razão de MLG/CREM aumenta (painel A), obtendo a seguinte ordem F1 > F4 > F7. Esta redução é devido a maior organização estrutural e transição para a fase cúbica cristalina após captação de água durante o ensaio de dissolução (painel C), esta transição de fase é acompanhada pelo aumento de viscosidade (painel B). Estes eventos em conjunto, contribuem para a liberação sustentada do fármaco.

Em contraponto, estudos realizados por Burrows et al. (1994) concluíram que a liberação *in vitro* de fármacos com ampla faixa de solubilidade a partir de matrizes formadas por monoleato/água, não sofreram influencia significativa, quando houve variação da proporção de monoleato/água de 4:1 a 1:1 (BURROWS et al., 1994).

Em suma, para as formulações com transição para a fase cúbica (F4, F5, F6, F7, F8 e F9) houve sempre uma correlação inversa da viscosidade com a liberação. Isto, possivelmente, se deve ao fato dessas formulações seguirem uma ordem maior de viscosidade, o que permite manter a forma e tortuosidade dos canais aquosos diminuindo a difusão de metronidazol e água na matriz (COSTA-BALOGH et al., 2010).

Figura 59. Efeito da viscosidade e transição para fase líquido cristalina sob o perfil de liberação *in vitro* (condição 'sink') do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C. (A) Perfil de liberação das formulações F1 (Δ), F4 ($\circ$) e F7 ($\diamond$). (B) Viscosidades aparentes e (C) curvas de SAXS das formulações F1 (-), F4 (-) e F7 (-), após captação de água.

A análise de variância aplicada à velocidade de liberação no período de 0 a 6 horas, demonstrou interação negativa e positiva significativa ($p < 0,05$) entre os fatores MLG/CREM (m/m) e pelo H₂O (%), respectivamente (Tabela 22 e Figura 60). Portanto, as formulações mais promissoras são as com maior razão MLG/CREM (2,1 e 4) e conteúdos iniciais de H₂O entre 5 e 10. No período de 24h somente o fator MLG/CREM demonstrou interação negativa estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Assim, quanto maior a razão MLG/CREM, menor foi a velocidade de liberação do fármaco (Tabela 23 e Figura 61).

Tabela 22. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para a liberação *in vitro* do metronidazol (%) em 6 horas a partir das formulações.

Coefficientes	Metronidazol liberado (%) – 6 horas
Intercepto	43,2621***
MLG/CREM	-22,1933***
(MLG/CREM) ²	11,4945**
H ₂ O	9,4942***
(H ₂ O) ²	6,4168
MLG/CREM* H ₂ O	-6,6157*
F calculado	34,4784
F tabelado	0,1980
F calculado/tabelado	174,1274
R ²	0,97181

Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

Tabela 23. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para a liberação *in vitro* do metronidazol (%) em 24 horas a partir das formulações.

Coefficientes	Metronidazol liberado (%) – 24 horas
Intercepto	92,3931
MLG/CREM	-9,7667*
(MLG/CREM) ²	6,1256
H ₂ O	-0,3198
(H ₂ O) ²	-2,4524
MLG/CREM* H ₂ O	0,8824
F calculado	2,7651
F tabelado	0,1980
F calculado/tabelado	13,9650
R ²	0,7344

Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%.

Figura 60. Superfície de resposta do perfil de liberação *in vitro* do metronidazol ($\mu\text{g/mL}$) em 6 horas.

Figura 61. Superfície de resposta do perfil de liberação *in vitro* do metronidazol ($\mu\text{g/mL}$) em 24 horas.

4.10.2 Estudo do mecanismo de liberação

Os resultados obtidos na liberação *in vitro* foram aplicados aos modelos matemáticos, de ordem zero, primeira ordem e Higuchi (HIGUCHI, 1963;). O critério utilizado para a escolha do modelo cinético mais adequado foi à determinação do coeficiente de correlação (r^2), tabela 24 (FREDENBERG, et al., 2011).

A figura 62 mostra os gráficos obtidos pela aplicação do modelo de primeira ordem e Higuchi, para as formulações (F1-F9), onde, no intervalo de 0 a 6 horas, todas as curvas foram linearizadas tanto pela aplicação do modelo de primeira ordem (Fig. 62, a-c), quanto pelo modelo Higuchi (Fig. 62, d-f). Resultados similares foram apresentados por Burrows et al. (1994), que mostraram que a cinética de liberação a partir de sistemas baseados em monoleato de glicerila, pode ser descrita por ambos os modelos de primeira ordem e Higuchi para diversos fármacos.

A avaliação estatística da linearidade das retas foi realizada utilizando o Teste F, considerando que quanto maior o valor de F maior a linearidade. Todos os valores de $F_{\text{calculado}}$ para o modelo de Higuchi foram superiores aos valores obtidos para o modelo de primeira ordem. Portanto, o mecanismo predominante foi à difusão. Esse resultado é consistente com os relatado por BOYD et al., (2006); BURROWS et al., (1994); CHANG;BODMEIER, (1997b); LARA et al., (2005); NORLING et al., (1992); RIZWAN et al., (2009), para sistemas líquidos cristalinos a base de monolinoleato e monoleato de glicerila.

No entanto, em se tratando de sistemas que, com a captação de água podem intumescer, erodir ou formar estrutura líquido cristalina, foi considerado necessário avaliar outro modelo (SHAH; PARADKAE, 2007). O modelo de Ritger-Peppas (1987) considera a relação exponencial da fração do fármaco liberado até 60% em função do tempo, sendo o expoente 'n' da equação (Eq.10) o parâmetro utilizado para determinar o mecanismo. Quando $n = 0,5$ o mecanismo de liberação é por difusão fickiana. Quando n ($0,5 < n < 1,0$) o mecanismo é por difusão não fickiana ou anômala e quando $n = 1$ a liberação ocorre por relaxamento, denominado Transporte Caso II.

Tabela 24. Coeficiente de correlação (r^2) obtido a partir dos dados de liberação das formulações no intervalo de 6 horas para diferentes modelos cinéticos.

Formulações	Modelos Cinéticos r^2 ($\pm$ D.P)		
	Ordem Zero	Primeira Ordem	Modelo de Higuchi
F1	0,90 $\pm$ 0,009	0,99 $\pm$ 0,003	0,99 $\pm$ 0,004
F2	0,88 $\pm$ 0,029	0,98 $\pm$ 0,011	0,99 $\pm$ 0,007
F3	0,88 $\pm$ 0,042	0,92 $\pm$ 0,061	0,98 $\pm$ 0,003
F4	0,98 $\pm$ 0,004	0,98 $\pm$ 0,003	0,99 $\pm$ 0,006
F5	0,92 $\pm$ 0,016	0,97 $\pm$ 0,027	0,99 $\pm$ 0,021
F6	0,86 $\pm$ 0,017	0,98 $\pm$ 0,034	0,99 $\pm$ 0,019
F7	0,95 $\pm$ 0,041	0,98 $\pm$ 0,032	0,99 $\pm$ 0,019
F8	0,95 $\pm$ 0,008	0,96 $\pm$ 0,013	0,99 $\pm$ 0,016
F9	0,96 $\pm$ 0,004	0,97 $\pm$ 0,006	0,99 $\pm$ 0,002

*Cada valor representa à média ($\pm$ desvio padrão) de três réplicas.

Os dados relativos a este mecanismo estão apresentados na tabela 25 e figura 63. As formulações F1 e F2 com razão MLG/CREM (0,25) independente do conteúdo inicial de água, apresentaram valores de n superiores a 0,5, típico de difusão anômala (não-fickiana), onde tanto o processo de relaxamento, relacionado com a transição estrutural, pós-captção de água, quanto à difusão influenciam de maneira simultânea liberação do fármaco (COSTA; LOBO, 2001; LOPES et al., 2005; RITGER; PEPPAS, 1987). A formulação F3 liberou mais de 60% do fármaco em 6 horas, impossibilitando a aplicação do modelo (RITGER; PEPPAS, 1987).

Com o aumento da razão MLG/CREM (2,1), houve redução do valor de n da formulação F4 para F6. Nas formulações F4 e F5 a liberação ocorreu por mecanismo de difusão, não fickiano, enquanto que a F6 foi por fickiano. Isto pode ser atribuído à baixa velocidade de captação de água apresentada pela formulação F6 (Item 4.5, Figura 19). Na formulação F7, a liberação ocorreu por mecanismo de difusão anômalo (não-fickiana), enquanto que na F8 e F9 o valor de n foi próximo de 1, e, portanto, tendendo ao mecanismo de relaxamento e/ou erosão - Caso transporte II.

Divergências a cerca da cinética e mecanismos envolvidos na liberação de fármacos a partir de sistemas baseados em monolinoleato de glicerila, se devem a influência de diversos

fatores dentre eles, velocidade de captação água e transição para fase líquido cristalina (CHANG; BODMEIER, 1997b; KUMAR et al., 2004), característica físico-química de aditivos (OKONOGI et al., 2004; KUMAR et al., 2004; BOYD et al., 2006; SHAH; PARADKAR, 2007), propriedades físico-químicas e quantidade incorporada do fármaco, e a influência deste na transição da fase líquido cristalina (CHANG;BODMEIER, 1997a; CHANG;BODMEIER, 1997b; CHANG;BODMEIER, 1998).

Tabela 25. Expoente de liberação (n) obtido para as formulações no intervalo de 6 horas segundo modelo de Ritger-Peppas (1987).

Formulações	Expoente de liberação (n)	r ²
F1	0,60 ± 0,01	0,99 ± 0,01
F2	0,58 ± 0,04	0,98 ± 0,07
F3	—	—
F4	0,75 ± 0,104	0,99 ± 0,03
F5	0,65 ± 0,03	0,99 ± 0,01
F6	0,48 ± 0,01	0,98 ± 0,08
F7	0,60 ± 0,01	0,99 ± 0,02
F8	0,97 ± 0,04	0,98 ± 0,002
F9	0,94 ± 0,001	0,98 ± 0,002

*Cada valor representa à média (± desvio padrão) de três réplicas.

Figura 62. Gráfico do log da quantidade de fármaco remanescente em função do tempo para formulações F1-F3 (a), F4-F6 (b) e F7-F9 (c). Gráficos da quantidade de fármaco liberada em função da raiz quadrada do tempo formulações F1-F3 (d), F4-F6 (e) e F7-F9 (f).

Figura 63. Gráficos da liberação fracional do metronidazol (M_t/M_∞) em função do tempo para as formulações segundo modelo de Ritger-Peppas (1987).

4.10.3 Perfil de dissolução *in vitro* do metronidazol em condição não ‘sink’

Na figura 64 são apresentados os perfis de liberação das formulações F1, F2 e F3 com razão MLG/CREM (0,25). Em 24 horas de ensaio a formulação F1 com 5% de água apresentou menor ‘burst’ do fármaco ($p < 0,05$) quando comparada as formulações F2 e F3. Em seguida, até às 48 horas a velocidade de liberação é menor para F1 quando comparada a F2 e F3, que apresentaram velocidade de liberação do fármaco similares ($p > 0,05$) no decorrer das 168 horas. Até 96h houve percentuais de liberação do metronidazol de 70% para F1 e cerca de 80% para F2 e F3, sugerindo possível retenção do fármaco na matriz do monoleato.

Dentre as formulações F4, F5 e F6 com razão de MLG/CREM (2,1), a F4 com 5% de água apresentou maior ($p < 0,05$) ‘burst’ em 24h (Figura 65). Em seguida, a formulação F5 segue com maior ($p < 0,05$) velocidade de liberação até alcançar o platô em 72h. Com destaque para formulação F6 com 15% de água que apresentou menor ($p < 0,05$) velocidade de liberação do fármaco durante as 168h, quando comparada as formulações F4 e F5. As velocidades de liberação total do fármaco se estenderam até às 96h para F4 e F6 e até 72h para F5, com percentuais de 85, 67% e 95, respectivamente. A baixa velocidade de fármaco liberado pela formulação F6 corrobora com a sua baixa captação de água (item 4.5, Figura 19), o que deve ter contribuído para baixa difusão do metronidazol (CHANG; BODMEIER, 1997b; CHANG; BODMEIER, 1998; DUYNHOVEN et al., 2005; KUMAR et al., 2003;).

Figura 64. Perfil de liberação *in vitro* do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F1 (■) F2 (▲) e F3 (●). Os dados representam a média ± D.P., n = 3.

Figura 65. Perfil de liberação *in vitro* do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F4 (■) F5 (▲) e F6 (●). Os dados representam a média ± D.P., n = 3.

Formulações F7-F9 com maior razão de MLG/CREM (4,0) liberam cerca de 60% do metronidazol em 48 horas de ensaio (Figura 66). Além disso, o perfil de liberação dessas formulações não seguiu a ordem de influencia do conteúdo inicial de água. Como pode ser observada, a formulação F7 com menor conteúdo de água liberou aproximadamente 100% do fármaco total durante 144 horas, em contraponto com as formulações F8 (10% de água) e F9 (15% de água) que liberaram aproximadamente 80% do fármaco durante todo o ensaio.

A Figura 67 ilustra a liberação específica do metronidazol em µg/mL/dia, considerando como liberação diária uma concentração igual o maior que a concentração inibitória mínima (CIM) 100µg/mL (EICK et al., 2004; SATO et al., 2008). Nestas condições destaca-se a formulação F4 e F7 com liberação acima do MIC até o quinto dia.

Figura 66. Perfil de liberação *in vitro* do metronidazol em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações F7 (■) F8 (▲) e F9 (●). Os dados representam a média $\pm$ D.P., $n = 3$.

Figura 67. Concentração de metronidazol ($\mu\text{g/mL}$) liberado em tampão fosfato pH 7,0 á 37°C a partir das formulações em função do tempo (dias). Os dados representam a média $\pm$ D.P., $n = 3$.

Na análise de variância, relativa liberação do fármaco nas primeiras 24 horas ('burst'), para todas as formulações, apenas o termo quadrático do fator MLG/CREM influenciou de forma positiva e significativa ($p < 0,05$) (Tabela 26 e Figura 68). Portanto, o aumento do fator MLG/CREM promoveu o aumento do burst nas formulações em 24 horas.

Tabela 26. Resumo da análise de variância do método de superfície de resposta para o 'burst' do metronidazol ($\mu\text{g/mL}$) a partir das formulações.

Coeficientes	'Burst' do metronidazol
	($\mu\text{g/mL}$) – 24h
Intercepto	1919,335
MLG/CREM	150,0190
(MLG/CREM) ²	-426,892*
H ₂ O	87,5860
(H ₂ O) ²	-214,483
MLG/CREM* H ₂ O	-138,682
F calculado	3,4265
F tabelado	0,1980
F calculado/tabelado	17,3052
R ²	0,7740

Significante a: * 5%, ** 1%, ***0,1%

Figura 68. Superfície de resposta do 'burst' de metronidazol ($\mu\text{g/mL}$) em 24 horas a partir das formulações.

O perfil de liberação *in vitro* foi distinto quando realizado em condição ‘sink’ e não ‘sink’. Em condições ‘sink’ todas as formulações liberaram cerca de 100% do metronidazol entre 24 e 48 horas, sendo, a velocidade influenciada pela razão MLG/CREM e conteúdo inicial de água. Contrapondo esses resultados, em condição não ‘sink’ as formulações apresentaram menores taxas de liberação, consequentemente, liberação mais sustentada do fármaco (até 120 horas), porém, independente do conteúdo inicial de água. Além disso, no período, em média a liberação foi de 70%, portanto houve retenção do fármaco na matriz do monolinoleato de glicerila, com destaque para formulação F6 que teve cerca de 30% do metronidazol retido. Estas diferenças foram atribuídas as diferentes condições do ensaio.

Todas as formulações apresentaram ‘burst’ do metronidazol nas primeiras 24 horas, com taxas de liberação do metronidazol que se estenderam de 3 a 5 dias, com concentração acima do CIM específico. Entretanto, características como erosão no ensaio de captação de água (apresentado pelas formulações F1 e F2) e comportamento de fluxo inadequado para extrusão por meio de seringa (apresentado pela formulação F9), foram fatores limitantes para a escolha dessas formulações como sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal.

Considerando o ensaio de liberação em condição não ‘sink’, a formulação F7 se destacar por apresentar perfil bimodal de liberação do fármaco com maior liberação nas primeiras 24 horas, como recomendado (STEINBERG; FRIEDMAN, 1998) e manutenção da liberação por cinco dias com concentração acima do CIM. Além disso, foi a única formulação que liberou cerca de 100% do fármaco. Características desejáveis para sistemas de liberação intrabolsa periodontal.

Em 1996 Esposito e colaboradores investigaram e compararam perfis de liberação *in vitro* de géis de poloxamer e monoleato de glicerila contendo tetraciclina. Os perfis de liberação do fármaco foram adquiridos através de um método específico de diálise capaz de reproduzir algumas condições do ambiente da bolsa periodontal (sem garantir a condição ‘sink’). Em 7 horas de ensaio 18% e 65% de tetraciclina tinha sido liberado pelos géis de monolinoleato e poloxamer, respectivamente. Diante dos dados, os autores relataram que o gel baseado em monolinoleato apresentou menor taxa de liberação do fármaco quando comparo ao gel de poloxamer. Concluíram que o gel de monolinoleato teve melhor desempenho como sistemas de liberação sustentada de fármaco intrabolsa periodontal (ESPOSITO et al., 1996).

Em estudos realizados por Okonogi, et al. (2004), foram avaliados géis seringáveis intrabolsa periodontal a base de monoleato de glicerila contendo tetraciclina. Todos os géis apresentaram maior velocidade de liberação até 5 horas, em seguida, houve diminuição na velocidade de liberação com difusão do fármaco até término das 24 horas de ensaio.

5. CONCLUSÕES

1. A razão MLG/CREM e conteúdo de água proporcionaram sistemas com diferentes características físico-químicas.

2. Os sistemas (S1-S3) com menor razão MLG/CREM (0.25) apresentaram-se como fluidos isotrópicos, típico de fase micelar, com comportamento de fluxo tipo pseudoplástico sem tixotropia e rápida erosão, em presença de água.

3. Com o aumento da razão MLG/CREM para 2,1, sistemas S4-S6 e 4,0 sistemas S7-S9, apresentaram anisotropia caracterizada por maior organização estrutural, confirmado por SAXS, estruturas em transição para fase líquido cristalina, com rápida captação de água, e transição para fase cúbica cristalina *in situ*. Os sistemas S4 a S8 apresentaram comportamento do tipo pseudoplástico com moderada tixotropia á 25°C, com valores de trabalho de seringabilidade desejáveis para fácil aplicação com seringa acoplada a agulha. Propriedades viscoelásticas adequadas e melhor biomucoesão, poderão promover boa espalhabilidade e retenção no interior da bolsa da periodontal. Portanto, com propriedades físicas e estruturais desejáveis para de sistemas de liberação administrado por seringa. Apenas o sistema S9 apresentou comportamento plástico caracterizado por alto valor de ponto de escoamento, inviabilizando sua aplicação por seringa.

4. Com a adição do metronidazol, as formulações (F1-F3) apresentaram propriedades similares aos sistemas (S1-S3).

5. As formulações F4-F8, também apresentaram alta velocidade de captação de água, porém sem erosão, e com transição para fase cúbica após captação de água. O comportamento de fluxo foi similar aos sistemas, entretanto, houve um pequeno aumento da viscosidade aparente com adição do fármaco, porém, não afetou a fácil extrusão das formulações F4-F8 via seringa. Por fim, no ensaio de liberação *in vitro* do metronidazol somente a formulação F7 apresentou perfil de liberação bi-modal do fármaco, caracterizada por 'burst' seguido de liberação lenta que se estenderam por 144 horas (6 dias), em concentrações acima do CIM específico. Por isso, somado a suas propriedades físicas e estruturais requeridas para esse tipo de sistema, a formulação F7 foi eleita como candidata ao emprego clínico como sistema de liberação de antimicrobianos intrabolsa periodontal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELLAOUIA, K. S.; CASTIONIB, N.V.; GURNY, R. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 50 , p. 83 – 99, 2000.

ADDY, M. et al. The development and in vitro evaluation of acrylic resin strips and dialysis tubing for local drug delivery. **J. Periodont**. v. 53, p. 693-699, 1982.

AHMED, A.R.; DASHEVSKY, A.; BODMEIER, R. Drug release from and sterilization of *in situ* cubic phase forming monoglyceride drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. n. 75, v. 375-380, 2010.

ALAM, M.M. ARAMAKI, K. Glycerol effects on the formation and rheology of hexagonal phase and related gel emulsion. **J. Colloid Interface Sci**. v. 336, p. 820–826, 2009.

ANDREWS, G. P. et al. Characterization of the Rheological, Mucoadhesive, and Drug Release Properties of Highly Structured Gel Platforms for Intravaginal Drug Delivery **Biomacromolecules**. v. 10, p. 2427–2435 2009.

ANDREWS, G.P; JONES, D.S. Rheological Characterization of Bioadhesive Binary Polymeric Systems Designed as Platforms for Drug Delivery Implants. **Biomacromolecules**. v. 7, n. 3, p. 899-906, 2006.

ANGELOV, A. et al. Small-Angle X-ray Scattering Investigations of Biomolecular Confinement, Loading, and Release from Liquid-Crystalline Nanochannel Assemblies. **J. Phys. Chem. Lett**. v. 3, p. 445 – 457, 2012.

ANGELOV, B. et al. Long-Living Intermediates during a Lamellar to a Diamond-Cubic Lipid Phase Transition: A Small-Angle X-Ray Scattering Investigation, **Langmuir**. v.

ANVISA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos**. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ARAÚJO, M.G; SUKEKAVA, F. Epidemiologia da doença periodontal na América Latina. **Revista Periodontia**, v. 17, p. 07-13, 2007.

AWARTANI, F.A.; ZULQARNAIN, B.J. Comparison of the clinical effects of subgingival application of metronidazol 25% gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. **Quint. Int**. 29:41-48, 1998.

BANSAL, K. et al. Development of Satranidazole Mucoadhesive Gel for the Treatment of Periodontitis. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, p. 716-723, 2009.

BARNES, H. A. The yield stress — a review. **J. Non-Newtonian Fluid Mech**, v. 81, p. 133 – 178, 1999.

BARNES, H. A. A Reviews of the rheology of filled viscoelastic systems. **The British Society of Rheology**, p. 1-36, 2003.

BARNES, H. A. Thixotropy: a review. **J. Non-Newtonian Fluid Mech**. v. 70, p. 1-33, 1997.

BARNES, H.A et al. **An Introduction to Rheology**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 1993, 185 p.

BONACUCINA, G.; PALMIERI, G.F.; CRAIG, D.Q.M. Rheological and Dielectric Characterization of Monoolein/Water Mesophases in the Presence of a Peptide Drug. **J. Pharm. Sci**. v. 94, p. 2452-2462, 2005.

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., AND HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building**. Canada: John Wiley and Sons. 1978, 645p.

BOYD, et al. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 309, p. 218–226, 2006.

BRETAS, R.; E.S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2 ed. São Carlos: EdUFSCAR, 2010, 257 p.

BRUSCHI, et al. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **J.Pharmaceutical Sciences**. v. 96, p. 2074-2088, 2007.

BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O. Oral bioadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 31, p. 293-310, 2005.

BRUSCHI, M.L. Desenvolvimento e Caracterização de Sistemas de Liberação Intrabolsa Periodontal. 2006. 318 f. **Tese de Doutorado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2006.

BRUSCHI, M.L. et al. Sistemas de Liberação de Fármaco Intrabolsa Periodontal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, 29-47, 2006.

BURCKBUCHLER, V. et al. Rheological and Syringeability Properties of Highly Concentrated Human Polyclonal Immunoglobulin Solutions. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 76, p. 351-356, 2010.

BURGESS, D.J. **Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing and Performance**. New York: Taylor & Francis Group. 2005, 688p.

BURROWS, R. et al. The release of drugs from monoglyceride-water liquid crystalline phases. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 111, p. 283-293, 1994.

CAMPOS, L. et al. Reversible Phase Transitions in Emulsified Nanostructured Lipid Systems. **Langmuir**. v. 20, p. 5254-5261, 2004.

CÁRCAMO, E. C. **Cinética de disolución de medicamentos**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1981. 103p.

CARVALHO, F.C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, p. 1-17, 2010.

CHANG, C., BODMEIER, R. Application of Monoglyceride-Based Liquid Crystals as Extended-Release Drug Delivery Systems. **Taylor & Francis Group**, p. 321-351, 2005.

CHANG, C., BODMEIER, R. Effect of dissolution media and additives on the drug release from cubic phase delivery systems. **J. Control. Rel.** 46, 215–222, 1997b.

CHANG, C., BODMEIER, R. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 173, p. 51 – 60, 1998.

CHANG, C., BODMEIER, R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. **J. Pham. Sci.** v. 86, n.6, p.747-752, 1997a.

CHIEN, Y.W. Novel Drug Delivery Systems In: Chien, Y.W. (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1992, p.797.

CIANCIO, S.G. Medication as risk factors for periodontal disease. **J. Periodontol.** v. 67, p. 1055-1059, 1996.

CLOGSTON, J. et al. Controlling release from the lipidic cubic phase by selective alkylation. **Journal of Controlled Release**. v. 102, p. 441 – 461, 2005.

CORDOBÉS, F.; FRANCO, J.M.; GALLEGOS, C. Rheology of the lamellar liquid-crystalline phase in polyethoxylated alcohol/water/heptane systems, **Grasas y Aceites**. v. 56, p. 96 -105, 2005.

COSTA-BALOGH, F. O. et al. Drug release from lipid liquid crystalline phases: relation with phase behavior. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 36 (4), p. 470–481, 2010.

DARVEAU, R.P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature**. v. 8, p. 481-490, 2010.

DONG, Y-D.; BOYD, B.J. Application of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 417, p. 101-111, 2011.

DUYNHOVEN, J. P. M. V. et al. Microstructural Investigation of Monoglyceride–Water Coagel Systems by NMR and CryoSEM. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, p. 703–710, 2005.

EICK S, SELTMANN T, PFISTER W. Efficacy of Antibiotics to Strains of Periodontopathogenic Bacteria within a Single Species Biofilm an *In Vitro* Study. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 5, p. 376-83, 2004.

ESPOSITO E. et al. Comparative analysis of tetracycline-containing dental gels: poloxamer and monoglyceride-based formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 142, p. 9 -23, 1996.

FEHÉR, A. et al. Lyotropic liquid crystal preconcentrates for the treatment of periodontal disease. **I.J. Pharmaceutics**. v. 358, p. 23-26, 2008.

FORMARIZ, T.P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, p. 301-313, 2005.

FRANCO, J.M. et al. Transient and Steady Flow of a Lamellar Liquid Crystalline Surfactant /Water System. **Langmuir**, v. 11, p. 669-673, 1995.

FREDENBERG, S. et al. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 415, p. 34-52, 2011.

GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; BURI, P. Monolein: A review of the pharmaceutical applications. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 26, p. 809-820, 2000.

GAURAV, T.; RUCHI, T.; AWANI, R. Studies on development of controlled delivery of combination drug(s) to periodontal pocket. **Indian Journal of Dental Research.** v. 21, p.72-83, 2010.

GERAGHTY, P.B., et al. An investigation of the parameters influencing the bioadhesive properties of Myverol 18-99/water gels. **Biomaterials.** v. 16, n. 1, p. 63-67, 1997.

GOODSON, J.M et al. Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pocket. **Journal of Periodontology**, v. 54, p. 575-579, 1983.

GOODSON, J.M.; HAFFAJEE, A.; SOCRANSKY, S.S. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. **J. Clin. Periodontol.** v. 6, p. 83-92, 1979.

GRAÇA, M.A. et al, A randomized controlled trial of a 2% minocycline gel as an adjunct to non-surgical periodontal treatment, using a design with multiple matching criteria, **J. Clin. Periodontol.** v. 24, p. 249 – 253, 1997.

GUO, C. et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today.** v. 15, p. 1032-1040, 2010.

HATTING, J.; HO, E. The concentration of proteins in human gingival crevicular fluid. **J. Periodont. Res.** 15: 90-95, 1980.

HERRERA, D. et al. Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. **Jornal of Evidence-Based Dental Practice.** v. 2, p. 50-60, 2012.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. in: K. Holmberg (Ed.), Handbook of applied surface and colloid chemistry, John Wiley & Sons, New York, 2001, pp. 299 - 332.

JAIN, N.L. et al. Recent approaches for the treatment of periodontitis. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 21/22, p. 932-943, 2008.

JONES, D. S. et al Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 372, p. 49-58, 2009.

JONES, D. S. et al. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. **J. Control. Rel.** v. 67, p. 357-368, 2000.

JONES, D. S. et al. Development and mechanical characterization of bioadhesive semi-solid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. **Pharmaceutical Research**. v. 13, p. 1734-1738, 1996.

JONES, D. S. et al. Physicochemical Characterization and Preliminary in Vivo Efficacy of Bioadhesive, Semisolid Formulations Containing Flurbiprofen for the Treatment of Gingivitis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v, 88, p. 592-598, n. 6, 1999.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural Analysis and Flow Rheometry of Novel, Bioadhesive Antimicrobial Oral Gels. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 450-457, 1997.

JONES, D.S.; BROWN, A.F.; WOOLFSON, A.D. Rheological Characterization of Bioadhesive, Antimicrobial, Semisolids Designed for the treatment of Periodontal Diseases: Transient and Dynamic Viscoelastic and Continuous Shear Analysis. **J. Pharm. Sci.** v.. 90, p. 1978-1990, 2001.

JOUSIMIES-SOMER, H, et al. Activity of metronidazole and its hydroxyl metabolite against clinical isolates of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 3, p. 32-34, 1988.

JUNIOR, A.B.N.; MACEDO, G.O.; ANDRADE, P.F. Inter-relação doença periodontal e diabetes *mellitus*. **Revista Periodontia**. v. 17, p. 39-44, 2007.

KELLAWAY, I.W.; WARREN, S.J, **Mucoadhesive hydrogels for buccal delivery**, in: Oral Mucosal Drug Delivery, RATHBONE, M. J (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1996, p. 221–239.

KELLY, H.M. et al. Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. **Int. J. Pharm.** v. 274, p.167–183, 2004.

KHARENKO, E.A.; LARIONOVA, N. I.; DEMINA, N.B. Mucoadhesive Drug Delivery Systems. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 43, p. 200-208, 2009.

KHUTORYANSKAYA, O.V. et al. Multilayered hydrogel coatings covalently-linked to glass surfaces showing a potencial to mimic mucosal tissues. **Soft Matter**. v. 6, p. 551-557, 2009.

KHUTORYANSKI, V.V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. **Macromol. Biosci**. v. 11, p.748–76, 2011.

KINANE, D.F.; RADVAR, M.A. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pochet, **J. Periodontol**. 70: 1-7, 1999.

KINLOCH, A.J. The science of adhesion: I. Surface and interfacial aspects. **J. Mater. Sci**. v. 15, p. 2141, 1980.

KO Ojijo, N. et al. Effects of monoglyceride content, cooling rate and shear on the rheological properties of olive oil/monoglyceride gel networks. **J. Sci. Food. Agric**. v.84, p. 1585 – 1593, 2004.

KULKARNI, C. V, et al. Monoolein: a magic lipid?. **Phys. Chem. Chem. Phys**. v. 13, p. 3004–3021, 2011.

KUMAR, K. M. et al. Effect of Drug Solubility and Different Excipients on Floating Behaviour and Release from Glyceryl Monooleate Matrices. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 151-160, 2004.

KUMAR, K.P.S, et al. Innovations in Sustained Release Drug Delivery System and Its Market Opportunities. **J. Chem. Pharm. Res**. v. 2, p. 349-360, 2010.

LARA, M. G. Sistemas Líquido-Cristalinos Monolinoleato /Água para Liberação de Fármaco : Cinética de Liberação e Permeação Cutânea '*in vitro*'. 2001. 144 f. **Tese de Doutorado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2001

LARA, M.G. et al. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 293, p. 241–250, 2005.

LARSSON, K. Cubic Llipid-Water Phases: Structures and Biomembrane Aspects. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 93, p. 7304-7314, 1989.

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

LEE, J. et al. Kinetic characterization of swelling of liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **Arch. Pharm. Res**. v. 26, p. 880–885, 2003

LEE, J.; YOUNG, S. A.; KELLAWAY, I. W. Water quantitatively induces the mucoadhesion of liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 53, p. 629–636, 2001.

LIBSTER, D. et al. An H_{II} liquid crystal-based delivery system for cyclosporin A: Physical characterization. **J. Colloid Interface Sci.** v. 308, p. 514–524, 2007.

LOPES, C.M. et al. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 41, n. 2, 2005.

LUTTON, E.S. Phase Behavior of Aqueous Systems of Monoglycerides. **The Journal of the American Oil Chemists Society**. v. 42, p. 1068-1070, 1965.

MALMSTEN, M. Soft delivery systems. **Soft Matter**. v. 2, p. 760-769, 2006.

MATHIOWITZ, E.; CHICKERING, D.E. **Definitions, mechanisms and theories of bioadhesion**, in: E. MATHIOWITZ, D.E. CHICKERING, C.-M. LEHR (Eds.). *Bioadhesive Drug Delivery Systems: Fundamentals, Novel Approaches and Development*, Marcel Decker, New York, 1999, pp. 1 – 10.

MEDLICOTT, N.J. et al. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket, **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 13, p. 181–203, 1994.

MEZZENGA, R. et al. Polysaccharide-Induced Order-to-Order Transitions in Lyotropic Liquid Crystals. **Langmuir**. v. 21, p. 6165-6169, 2005.

MIYAZAKI, S. et al. In-situ gelling formulations as vehicles for oral drug delivery. **J Control Release**. v. 60, p. 287-295, 1999.

MONTALVO, C. et al. Phase and Rheological Behavior of the Dodecyl Tetraethylene Glycol / Benzyl Alcohol / Water System at Low Surfactant and Alcohol Concentrations, **J. Colloid Interf. Sci.** v. 202, p. 232 – 237, 1998.

MONTALVO, G.; VALIENTE, M.; RODENAS, E. Rheological Properties of the L Phase and the Hexagonal, Lamellar, and Cubic Liquid Crystals of the CTAB/ Benzyl Alcohol /Water System, **Langmuir**. v. 12, p. 5202- 5208, 1996.

MORTAZAVI, S.A.; SMART JD. Factors influencing gel-strengthening at the mucoadhesive–mucus interface. **J Pharm Pharmacol**. v. 46, p. 86–90, 1994.

MORTAZAVI, S.A.; SMART, J.D. An investigation into the role of water movement and mucus gel dehydration in mucoadhesion. **J. Control. Release.** v. 25, p.197-203, 1993.

MORTAZAVI, S.A.; SMART, J.D. An investigation of some factors influencing the in-vitro assessment of mucoadhesion, **Int. J. Pharm.** v. 116, p. 223 – 230, 1995.

NAKAGAWA, T. et al. Clinical and microbiological study of local minocycline delivery (Perioline[®]) following scaling and root planning in recurrent periodontal pockets. **Bull. Tokyo Dent. Coll.** v.32, p. 63-70, 1991.

NAKANO, M. et al. Dispersions of Liquid Crystalline Phases of the Monoolein/Oleic Acid/Pluronic F127 System. **Langmuir.** v. 18, p. 9283-92, 2002.

NASTRUZZI, C. et al. Kinetics of bromocriptine release from microspheres: comparative analysis between different in vitro models. **J. Microencapsulation.** v. 11, p. 565-574, 1994.

NEEDLEMAN, I.G.; SMALES, F.C. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery, **Biomaterials.** v.16, 617- 624, 1995.

NÉMETH, Zs. Rheological behavior of a lamellar liquid crystalline surfactant – water system. **Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 145, p. 107-119, 1998.

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 6, p. 231–239, 1998.

NORLING, T. et al. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.** v. 19, p. 687-692, 1992.

OKONOGI, S. et al. Development of Local Injectable Dental Gel: The Influence of Certain Additives on Physicochemical Properties of Glycerylmonooleate-Based Formulation. **Drug Development and Industrial Pharmacy.** v. 30, p. 347-357, 2004.

PAQUETTE, D.W. et al. Inhibition of experimental gingivitis in beagle dogs with topical salivary histatins, **J. Clin. Periodontol.** v. 24, p. 216 – 222, 1997.

PATEL, R.; PATEL, T. N. Liquid crystals and their application in the field of drug Delivery . **Colloids in Drug Delivery.** chapter 13. p. 311-336, 2010.

PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M.; KARRING, T. Comparative clinical and microbiological effects of topical subgingival application of metronidazole 25% dental gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.** 19: 715-722, 1992.

PEPPAS, N.A.; BURI, P.A. Surface, Interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. **Journal of Controlled Release.** v. 2, p. 257-275, 1985.

PERIOLI, L., et al. Rheological and functional characterization of new antiinflammatory delivery systems designed for buccal administration. **Int. J. Pharm** 356, p.19-28, 2008.

PERIOLI, L. et al. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 3, p. 521-533, 2004.

PETERSEN, P.E. OGAWA, H., Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach, **J. Periodontol.** v.76, p. 2187- 2193, 2005.

PIHLSTROM, B.S. MICHALOWICZ, N.W. JOHNSON, Periodontal diseases, **Lancet.** v. 366, p. 1809 -1820, 2005. .

POLIZELLI, M.A. et al. Formation and characterization of soy bean oil/surfactant/water microemulsions, **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 281, p. 230–236, 2006.

PONCHEL G.; TOUCHARD, F.; DUCHENE, D.; PEPPAS, N. A. Bioadhesive analysis of controlled release systems. I. Fracture and interpenetration analysis in poly (acrylic acid)-contained systems. **Journal of Controlled Release.** v. 5, p. 129–41, 1987.

PRAGATI, S.; ASHOK S.; KULDEEP S. Recent advances in periodontal drug delivery systems. **International Journal of Drug Delivery.** v. 1, p. 1-14, 2009.

PRUD'HOMME, R. K.; GUANGWEI, W.; SCHNEIDE, D. K. Structure and Rheology Studies of Poly (oxyethylene–oxypropylene–oxyethylene) Aqueous Solution. **Langmuir.** v. 12, p. 4651–4659, 1996.

QIU, H. CAFFREY, M. The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects, **Biomaterials.** v. 21, p. 223-234, 2000 .

RATHBONE, M. J. et al. The oral cavity as a site for systemic drug delivery **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 13, p. 1-22, 1994.

REDIGUIERI, C. F. Misturas aquosas de pectina/caseína: estudo físico-químico e potencial de uso no tratamento da doença periodontal. 2008. 147 f. **Tese de Doutorado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2008.

RIGTER, P.L., PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **J. Control. Release.** v. 5, p. 37–42, 1987.

RIZWAN, S.B. et al. Liquid Crystalline Systems of Phytantriol and Glyceryl Monooleate Containing a Hydrophilic Protein: Characterisation, Swelling and Release Kinetics. **Journal of Pharmaceutical Science.** vol. 98, n. 11, p. 4191-4204, 2009.

ROBINSON, J.R.; LEE, V.H.L. Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications. Marcel Dekker, New York, 1987, 715p.

RODRIGUEZ-ABREU, C. et al. Structure and rheology of direct and reverse liquid-crystal phases in a block copolymer/water/oil system, **Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 269, p. 59–66, 2005.

ROSEVEAR, F. B. The Microscopy of the Liquid Crystalline Neat and Middle Phases of Soaps and Synthetic Detergents. The Journal of the American Oil Chemists' Society . v. 31, p. 628-639. 1954.

SABA-CHUJFI, E. et al. Inter-relação das doenças periodontais com as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares isquêmicas.. **Revista Peridontia. Sociedade Brasileira de Periodontologia**, v. 17, p. 21-31, 2007.

SALAMAT-MILLER, N. et al. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 57, p. 1666 – 1691, 2005.

SALLAM, A.S. et al. Formulation of an oral dosage form utilizing the properties of cubic liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v.53, p. 343–352, 2002.

SALLUM, A.W.; NETO, J.B.C.; SALLUM, E.J. Tabagismo e a doença periodontal. **Revista Periodontia.** v. 17, p. 45-53, 2007.

SANTANA, R.C. et al. Effects of a cosurfactant on the shear-dependent structures of systems composed of biocompatible ingredients. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 398, p. 54 – 63, 2012.

SATO, S. et al. Metronidazole-containing gel for the treatment of periodontitis: an in vivo evaluation. **Braz Oral Res.** v. 22, n. 2, p. 145-50, 2008.

SCHOTT, H. Kinetics of swelling of polymers and their gels. **J. Pharm. Sci.** v. 81, p. 467–470, 1992.

SCHWACH-ABDELLAOUI, K.; MONTI, A.; BARR, J.; HELLER, J.; GURNY, R. Optimization of a novel bioerodible device based on auto-catalyzed poly(ortho esters) for controlled delivery of tetracycline to periodontal pocket. **Biomaterials**, v. 22, p. 1659-1666, 2001.

SEDDON, J. M, TEMPLER, R.H. **Polymorphism of Lipid-Water Systems**. In Handbook of Biological Physics in: R. Lipowsky, E. Sackmann, (Eds).; Elsevier Science, 1 (1995) 97-160.

SEYMOUR, R.A.; HEASMAN, P.A. Dental plaque and calculus. In: SEYMOUR, R.A.; HEASMAN, P.A. **Drugs, Diseases, and the Periodontium**. New York: Oxford University Press, 1992. Cap.2, p.11-18.

SHAH, M. H.; PARADKAR, A. Cubic Liquid Crystalline Glyceryl Monooleate Matrices for Oral Delivery of Enzyme. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 294, p. 161–171, 2005.

SHAH, M. H.; PARADKAR. Effect of HLB of additives on the properties and drug release from the glyceryl monooleate matrices. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 67, p. 166–174, 2007.

SHAH. M. H.; PARADKAR. A. Cubic Liquid Crystalline Glyceryl Monooleate Matrices for Oral Delivery of Enzyme. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 294. p. 161–171. 2005

SIDDIG, M.A. Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucopone (APG) surfactant. **Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 276, 15 -21, 2006.

SMART J. D. Recent developments in the use of bioadhesive systems for delivery of drugs to the oral cavity. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Delivery Systems**. v. 21, p. 319–44, 2004.

SMART, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.57, p.1556-1568, 2005.

SOSKOLNE WA, CHAJEK T, FLASHNER M, LANDAU I, STABHOLTZ A, KOLATCH B, LERNER EI. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. **J Clin Periodontol** v. 25, p. 1017–1021, 1998.

SOSKOLONE, W. A.; FREIDMAN, M. F. **Intra-periodontal pocket drug delivery systems.** In: RATHBONE, M. J. (Ed.). Oral mucosal drug delivery. New York: Marcel Dekker, 1996. cap. 14, p. 359-379.

SOUTHARD, G.L.; GODOWSKI, K.C. Subgingival controlled release of antimicrobial agents in the treatment of periodontal disease. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 9, p. 239-253, 1998.

STABHOLZ, A. et al. Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCl or chlorhexidine. An in vitro study. **J. Clin. Periodontol.** v. 20, p. 557-562, 1993.

STANLEY, A.; WILSON, M.; NEWMAN, H.N. The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. **J. Clin. Periodontol.** 16: 259-264, 1989.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering.** 2. Ed. USA: Freeman Press, 1996. 412 p.

STEINBERG, D. et al. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease. In vitro release study. **J. Periodontol.**, v. 61, p.393-398, 1990.

STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M. **Sustained release drug delivery devices for local treatment of dental disease.** In: TYLE, P. (ed). Drug delivery devices. New York: Marcel Dekker, p. 491-515, 1988.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A.K. Review: Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. **J. Control. Release.** v. 114, p. 15-40, 2006.

TINOCO, E.M.B, et al., Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. **J. Periodontol.** v. 69, 1355-1363, 1998.

TIWARI G.; TIWARI R.; RAI A. K. Studies on development of controlled delivery of combination drug(s) to periodontal pocket. **Indian J. Dent Res.** v. 21, p. 72-83, 2010.

TOMASI, C.; WENNSTROM, J. L. Locally Delivered Doxycycline as an Adjunct to Mechanical Debridement at Retreatment of Periodontal Pockets: Outcome at Furcation. **J Periodontol.** v. 82, p. 210-218, 2011.

TONETTI, M.; CUGINI, M.A.; GOODSON, J.M. Zero-order delivery with periodontal placement of tetracycline-loaded ethylene vinyl acetate fibers. **Journal of Periodontal Research**. v. 25, p. 243-249, 1990.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. BRUSCHI, M.L.; LARA, E.H.G.; FREITAS, O. **Dispositivo mimetizador de bolsa periodontal**. I.N.P.I/SP, P.I. 0.700.932-1.2008.

VEREECKEN, J. et al. Effect of water and monoglyceride concentration on the behaviour of monoglyceride containing fat systems. *Food Research International*, v. 43 p. 872–881, 2010.

VYAS, S. P.; SIHORKAR, V.; MISHRA, V. Controlled and targeted drug delivery strategies towards intraperiodontal pocket disease. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v. 25, p.21-42, 2000.

WONG, C. F.; YUEN, K. H.; PEH, K. K. An in-vitro method for buccal adhesion studies: importance of instrument variables. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 180, p. 47 – 57 1999.

WOODLEY, J. Bioadhesion: New Possibilities for Drug Administration? **Clin. Pharmacokinet**. v. 40, p. 77-84, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Oral Health Report 2003. Geneva: WHO, 2003.

YUE, H.; GUO, P.; GUO, R. Phase Behavior and Structure Properties of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)/Brij 30/Water system. **J. Chem. Eng. Data**. v. 54, p. 2923 – 2929, 2009.

ZAMAN, M. A.; MARTIN, G. P.; REES G. D. Mucoadhesion, hydration and rheological properties of non-aqueous delivery systems (NADS) for the oral cavity. **Journal of Dentistry**. v. 36, p. 351–359, 2008.

ZHENG, M. Study on the microstructure and rheological property of fish oil lyotropic liquid crystal. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 385, p. 47–54, 2011.