

Afonso Batista das Neves

Geles Termorreversíveis na Veiculação de Fármacos

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde

Lisboa

2019

Afonso Batista das Neves

Geles Termorreversíveis na Veiculação de Fármacos

Dissertação defendida em prova pública na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 22 de Novembro de 2019, perante o júri, nomeado pelo Despacho nº 238/2019 de 30 de Setembro, como seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof^a. Doutora Ana Catarina Reis

Orientador: Prof^a Doutora Maria Lídia Palma

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde

Lisboa
2019

*«Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo»*

Tabacaria, Álvaro de Campos, Fernando Pessoa

Agradecimentos

Esta dissertação foi desenvolvida com base num projeto de investigação na área de Nanotecnologia, mais propriamente, no estudo inicial de um sistema de veiculação de fármacos recorrendo a hidrogéis termorreversíveis.

Quero agradecer inicialmente à minha orientadora, Professora Catarina Pinto Reis, a quem estarei eternamente grato por todo o apoio, especial motivação e principalmente pela oportunidade de me mostrar que entrar no mundo da ciência e investigação está ao alcance de todos; basta existir vontade e confiança em nós mesmos, para se cativar e desenvolver o interesse pessoal insaciável que até hoje se mantém. Agradeço toda a partilha de conhecimento e disposição permanente e incansável.

Quero agradecer também a todos os docentes que de forma direta ou indireta participaram neste projeto e contribuíram com os seus conhecimentos e meios tecnológicos, nomeadamente aos professores: Amílcar Roberto (ULHT), Manuel Minas da Piedade e seu assistente Carlos Bernardes (FCUL) e à Lia Ascensão (FCUL). Por me poder faltar nomear alguém, agradeço a todas as entidades e comunidade científica de docentes envolvidos na realização deste projeto e posterior dissertação.

Não podia deixar de reconhecer o apoio incansável e crucial de todos o que estão comigo nesta caminhada, nomeadamente família e amigos, entidade patronal e colegas de trabalho, incansáveis e onnipresentes em toda a minha formação pessoal e profissional pois a eles devo com gratidão grande parte do que sou.

Publicações

O desenvolvimento deste projeto na área da veiculação de fármacos deu origem à publicação de um poster (Anexo 1):

- Neves A, Rijo C, Nicolai M, Borralho T, Martins G e Reis C. “Production of Thermoreversible Gel for Dermatological Proposes”. V Congresso Nacional de Ciências Dermocosméticas, IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Dermocosméticas no dia 15 de maio de 2015 na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal.

Índice

Agradecimentos	2
Publicações.....	3
Índice de figuras	5
Índice tabelas	6
Resumo.....	7
Abstract	8
Abreviaturas	9
Introdução.....	10
Poloxamers.....	12
Polímeros complementares (biopolímeros).....	17
Materiais e Métodos de preparação dos geles.....	18
Materiais.....	18
Métodos.....	18
Resultados.....	24
Discussão de resultados	31
Conclusões / Perspetivas futuras	34
Referências bibliográficas	35
Anexo 1.....	42
Anexo 2.....	43

Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura química de Pluronic[®], F127 (**a**- porção de oxido etileno, **b** - porção de óxido propileno).

Figura 2 – Esquema ilustrativo do comportamento dos geles com o aumento da temperatura.

Figura 3 – Esquema ilustrativo do mecanismo físico de gelificação do P407 em água.

Figura 4 – Ilustração da concentração micelar crítica (cmc) e concentração crítica de gel (ccg) numa solução de copolímero em bloco.

Figura 5 – Viscosímetro Rotacional da Brookfield[®].

Figura 6 – Texturómetro *Stable Micro Systems TA- XT2i*.

Figura 7 – Aparelho DSC, NETZSCH 204F1 da Phoenix[®].

Figura 8 – Incubadora Heidolph Inkubator 1000 e Heidolph Unimax 1010.

Figura 9 – Esquemas ilustrativos da transição *sol-gel* dos diferentes geles em estudo.

Figura 10 – Imagem SEM referente ao Gel “Cold I”.

Figura 11 – Imagem SEM referente ao Gel “Cold II”.

Figura 12 – Imagem SEM referente ao Gel “Cold III”.

Figura 13 – Imagem SEM referente ao Gel “Cold IV”.

Figura 14 – Gel “Cold I”: Área do pico (média): 3,367; D.P.:0,21; “Onset” (média):13,9°C.

Figura 15 – Gel “Cold II”: Área do pico (média): 2,673; D.P.: 0,05 “Onset” (média): 16,2°C.

Figura 16 – Gel “Cold III”: Área do pico (média): 3,304; D.P.: 0,37; “Onset” (média): 13,7°C.

Figura 17 – Gel “Cold IV”: Área do pico (média): 3,045; D.P.: 0,21; “Onset” (média):15,4°C.

Índice tabelas

Tabela 1 - Classificação e descrição geral dos geles.

Tabela 2 - Dados referentes à medição da viscosidade (mPas) do Gel “Cold I” a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°C). Ensaio realizado em triplicado. Nota: D.P. - Desvio padrão.

Tabela 3 - Dados referentes à medição da viscosidade (mPas) do Gel “Cold II” a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°C). Ensaio realizado em triplicado. Nota: D.P. - Desvio padrão.

Tabela 4 - Dados referentes à medição da viscosidade (mPas) do Gel “Cold III” a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°C). Ensaio realizado em triplicado. Nota: D.P. - Desvio padrão.

Tabela 5 - Dados referentes à medição da viscosidade (mPas) do Gel “Cold IV” a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°C). Ensaio realizado em triplicado. Nota: D.P. - Desvio padrão.

Tabela 6 - Dados referentes à determinação da textura do Gel “Cold I”.

Tabela 7 - Resumo dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade geral.

Resumo

Geles termorreversíveis constituem um potencial sistema para a liberação controlada de fármacos. Estes geles gelificam a determinada temperatura, isto é, quando se encontram a baixas temperaturas comportam-se como soluções e a temperaturas específicas comportam-se como geles, aumentando o tempo de residência do fármaco no alvo. Apresentam-se, portanto, como uma aposta promissora para várias vias de administração de fármacos tais como oftálmica, rectal e aplicação tópica.

O objetivo deste trabalho de campo foi o desenvolvimento e caracterização de quatro hidrogeles termorreversíveis usando diferentes composições de polímeros: Poloxamer[®] F127; F127 com quitosano; F127 com carbómero[®] 940; F127 com goma xantana.

Os geles foram preparados com base no método “Cold” com algumas adaptações. Os geles depois foram caracterizados em termos de viscosidade, análise térmica e da citotoxicidade geral tendo como referência base o modelo de *Sacchamoryces Cerevisiae*.

Neste estudo observou-se um aumento de viscosidade proporcional ao aumento da temperatura. Todos os geles se comportaram como soluções a 4°C e como geles a 37°C. Os resultados da análise térmica evidenciaram a transição de estado através dos termogramas obtidos. As imagens obtidas com recurso ao SEM demonstraram a presença de cavidades/poros. Quanto ao estudo da citotoxicidade, este estudo sugere os geles não apresentam citotoxicidade no modelo utilizado.

Concluindo, este trabalho de campo reforça a possível aplicação de geles termorreversíveis como veículo de liberação controlada de fármacos. No futuro irão ser realizados novos passos, incluindo a preparação de nanopartículas e sistemas lipídicos e a sua incorporação nos diferentes geles termorreversíveis. Para corroborar estes resultados deverão ainda ser realizados estudos de permeação e adesão *in vitro* e *in vivo* bem como de citotoxicidade usando um modelo que inclua outros modelos celulares mais complexos.

Palavras-chave: Pluronic[®] F127, hidrogel, termorreversível,

Abstract

Thermo-reversible gels are a potential system for controlled drug delivery. These gels gel at a certain temperature, i.e. when at low temperatures behave as solutions and at specific temperatures behave as gels, increasing the residence time of the drug in the target. They are, therefore, presented as a promising bet for various routes of administration of drugs such as parenteral, ophthalmic, rectal and topical application.

The aim of this study, was the development and characterization of four thermoreversible hydrogels using different polymer compositions: Poloxamer[®] F127; F127 with chitosan; F127 with carbomer[®] 940; F127 with xanthan gum.

The gels were prepared based on the Cold method with some adaptations. The gels were then characterized in terms of viscosity, thermal analysis and general cytotoxicity with reference to the *Saccharomyces cerevisiae* model.

In this study it was observed that a proportional increase in viscosity was observed with the increase in temperature. All gels behaved as solutions at 4 ° C and as gels at 37 ° C. The results of the thermal analysis showed the state transition through the obtained thermograms. The images obtained using SEM showed the presence of cavities / pores. Regarding the study of cytotoxicity, this study suggests gels do not present cytotoxicity in the model used.

In conclusion, this experimental study reinforces the application of thermoreversible gels as a vehicle for controlled release of drugs, improving their efficacy. Further steps will be taken in the future, including the preparation of nanoparticles and lipid systems and their incorporation into the different thermoreversive gels. In order to corroborate these results, *in vitro* and *in vivo* permeation and adhesion studies as well as cytotoxicity should be performed using a model that includes other more complex cellular models.

Key words: Pluronic[®] F127, hydrogel, thermoreversible,

Abreviaturas

CCG - Concentração crítica de gel

CMC - Concentração micelar crítica

D.P. - Desvio Padrão

DSC - Calorimetria Diferencial de Varrimento (*Differential Scanning Calorimetry*)

OE - Óxido de etileno

F127 - Poloxamer[®] F127

P407 - Poloxamer[®] 407

PO - Óxido de polietileno

PX - Poloxamer

SEM - Microscópio eletrônico de varrimento (*Scanning Electron Microscope*)

TTS - Temperatura de transição solução-gel

YPD - Meio de cultura, extrato de levedura, peptona e glucose (*Yeast – Peptone – Dextrose*)

Introdução

A gelificação de soluções é atualmente um fenómeno de grande importância envolvido em diversas aplicações (Bercea, Darie, Nit, & Morariu, 2011). A produção de geles a partir de polímeros já vem desde os anos 70's mas o interesse pela gelificação física de polímeros tem recebido maior interesse nos últimos anos (Bercea et al., 2011; Moreno et al., 2014). De facto, os veículos de fármacos mais convencionais apresentam algumas preocupações tais como toxicidade e segurança. Os geles termoreversíveis *in-situ* são sistemas alternativos, o que constitui por si só uma vantagem (Dewan et al., 2017). Hidrogeles são biomateriais promissores devido às suas importantes qualidades tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofiliidade e por não serem tóxicos (Parhi, 2017). Tais qualidades tornam os hidrogeles sistemas adequados para aplicação no campo médico e farmacêutico (Parhi, 2017).

A Tabela 1 elucida a classificação geral dos geles:

Tabela 1- Classificação e descrição geral dos geles (Escobar-Chávez et al., 2006)

Classe	Descrição	Exemplos
Orgânicos	Sistemas monofásicos	Carbopol [®] , <i>tragacanth</i>
Hidrogeles	Hidrogeles orgânicos naturais & Hidrogeles inorgânicos com gomas sintéticas	CMC [®] , PF-127 [®] , Veegum [®] , pasta pectina, gel bentonite, pectina

Segundo a definição, um hidrogel é uma rede de co-polímero, tridimensional, homo hidrofílico ou que possui a capacidade de absorver água ou fluidos biológicos (compostos celulares) (Kyoung, Hyung, Kim, & Lee, 2014). A afinidade para absorver água é geralmente atribuída à presença de grupos hidrofílicos nos polímeros tais como -OH, -COOH, -NH₂, CONH e CONH₂, formando assim as estruturas próprias do hidrogel (Kyoung et al., 2014). Fisicamente, os hidrogeles são materiais viscoelásticos contendo uma rede de polímeros unidos por interações físicas e que “intumescem” na presença de água (Markus et al., 2017). A rede tridimensional pode ser formada por ligações covalente, interações de van der Waals, ligações por pontos de hidrogénio e ligações físicas desordenadas (Kyoung et al., 2014).

Segundo os livros mais clássicos da Tecnologia Farmacêutica, os geles são formas farmacêuticas semi-sólidas e usadas a nível tópico/local. Possuem a vantagem de ser facilmente manipulados, de ser usados a nível tópico, de não terem efeito sistémico e promoverem maior tempo de contacto entre o fármaco e o local de ação. No caso dos hidrogeles poliméricos biocompatíveis, estes são usados em diversas aplicações biomédicas/farmacêuticas tais como veículos de libertação controlada de fármacos, medicina regenerativa e engenharia de tecidos, no controlo da adesão celular como da matriz extracelular (Jagur-Grodzinski, 2010). Mais, já foi demonstrada a sua utilidade para libertação pulsátil de fármacos, reconstrução ou reparação de tecidos moles, biossensores e atenuadores e para muitas outras aplicações biomédicas (Jagur-Grodzinski, 2010).

Grande parte das formulações tópicas apresenta uma das maiores desvantagens que consiste no baixo tempo de residência/contacto do fármaco no alvo (a pele). Geles termorreversíveis apresentam-se portanto, como uma possível solução para contornar o problema, apresentando-se como um potencial veículo para libertação controlada de fármacos para diversas aplicações farmacêuticas tais como parenteral, oftálmica, rectal e aplicação tópica (Pereira et al., 2013). Possui ainda características atrativas para aplicação auricular (Wang et al., 2011).

Os hidrogeles quando se encontram a baixas temperaturas comportam-se como soluções, o que facilita o seu próprio manuseamento, contudo a temperaturas específicas (37°C) comportam-se como geles de carácter viscoso com propriedades que lhe conferem adesão ao tecido alvo e consequentemente aumento do tempo de residência (Pereira et al., 2013).

No caso específico deste trabalho experimental para futura aplicação trans-timpânica, especificamente, para a administração localizada de antibióticos na membrana timpânica, os hidrogeles não só podem aumentar a biodisponibilidade local do fármaco bem como reduzir o risco de resistência aos antibióticos, mantendo o antibiótico no local alvo durante mais tempo (Khoo et al., 2013).

Poloxamers

Os Poloxamers (PX) são uma família de copolímeros em tribloco, apresentando um bloco central de óxido de polipropileno hidrofóbico (PPO) com dois blocos de polietileno hidrofílico (PEO) nos flancos (Boonlai, Tantishaiyakul, Hirun, Phaisan, & Uma, 2017; Ćirin, Krstonošić, & Poša, 2017; Dumortier, Grossiord, Agnely, & Chaumeil, 2006; Fakhari, Corcoran, & Schwarz, 2017; Managa, Britton, Prinsloo, & Nyokong, 2018)

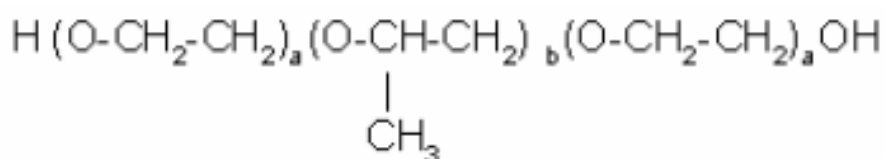


Figura 1 - Estrutura química de Pluronic[®] F127 (**a**- porção de óxido etileno, **b** - porção de óxido propileno) (Escobar-Chávez et al., 2006).

Entre esta família de copolímeros (Poloxamers), o Poloxamer[®] 407 foi registrado como marca comercial como Pluronic[®] F127 pelos Laboratórios BASF e como Synperonic PE/F127[®] pelos Laboratórios ICP. Trata-se de um agente emulsivo não iônico hidrofílico com uma vasta gama de aplicações (Fakhari et al., 2017; Kuroiwa, Higashi, Ueda, Yamamoto, & Moribe, 2018), que pode ser usado como estabilizador em formulações (Kuroiwa et al., 2018). Pluronic[®] F127 é um agente emulsivo não iônico, anfifílico, constituído por co-polímeros sintéticos: polioxietileno (POE) de carácter hidrófilo (Pereira et al., 2013) e polioxipropileno (POP) de carácter hidrófobo numa concentração variável (20 a 30%). O Poloxamer[®] F-127 é reconhecido como um “componente inativo” pela FDA para diversos produtos para saúde humana e animal, tais como soluções orais, suspensões, formulações por inalação, intravenosas, oftálmicas ou tópicas (Dumortier et al., 2006; Fakhari et al., 2017).

Uma das propriedades destes compostos relaciona-se com a sua capacidade de gelificação tal como ilustra a Figura 2.

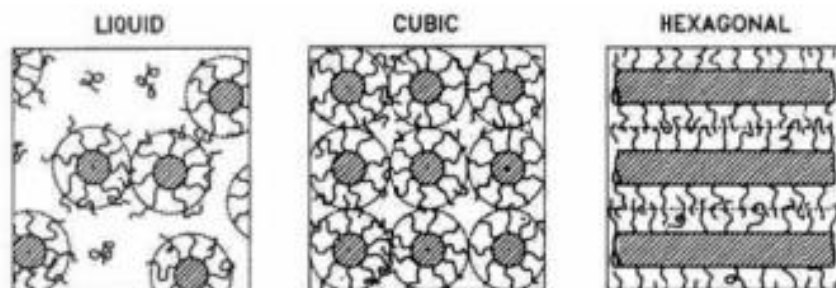


Figura 2 – Esquema ilustrativo do comportamento dos geles com o aumento da temperatura (Escobar-Chávez et al., 2006).

O mecanismo envolvido na conversão sol-gel e gel-sol do gel termorreversível é baseado na interação hidrofóbica. Os polímeros que apresentam interação hidrofóbica, devem ter um domínio hidrofílico e um hidrofóbico, chamados anfifílicos. Tais grupos são solúveis em água a baixas temperaturas, mas após o aumento da temperatura, os domínios hidrofóbicos (gelificadores) agregam-se para minimizar a área de superfície hidrofóbica em contacto com a água envolvente (Parhi, 2017). A gelificação do Poloxamer (PX) depende da temperatura concentração de polímero e o processo de gelificação total é tipicamente dividido em duas etapas segundo ilustra a Figura 3 (Parhi, 2017).

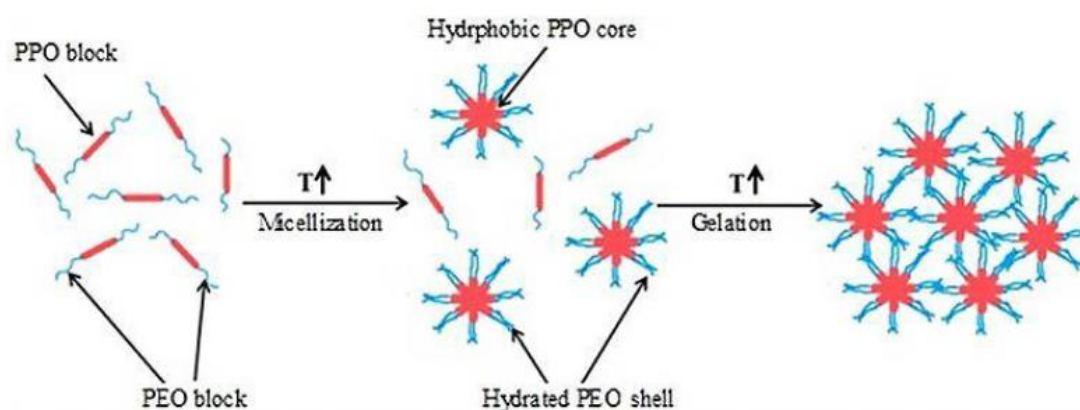


Figura 3 – Esquema ilustrativo do mecanismo físico de gelificação do PX 407 em água. (retirado de Parhi).

Em geral, os PX são compostos granulados, cerosos e de cor branca (Escobar-Chávez et al., 2006). Este composto apresenta uma massa molecular de, aproximadamente, 12,600 Da (70% POE) (Pereira et al., 2013).

Geralmente as soluções aquosas concentradas em PX F-127 sofrem gelificação, a qual faz deste polímero uma escolha interessante para otimização de formulações de fármacos bem como sistemas de liberação modificada de fármacos (Akash & Rehman, 2015; Boonlai et al., 2017; Branco & Schneider, 2009; Das, Madan, & Lin, 2012; Dumortier et al., 2006; Fakhari et al., 2017; Kabanov, Batrakova, & Alakhov, 2002; Kojarunchitt, Hook, Rizwan, Rades, & Baldursdottir, 2011; Pereira et al., 2013)(Pereira et al., 2013), (Fakhari et al., 2017), (Dumortier et al., 2006), (Branco & Schneider, 2009), (Kabanov et al., 2002), (Kojarunchitt et al., 2011), (Das et al., 2012), (Akash & Rehman, 2015), (Boonlai et al., 2017).

A aplicação do Poloxamer® F-127 para sistemas de liberação sustentada de fármacos foi observada em dois estudos anteriores (Ramon, 2015; Ricci, Lunardi, Nanclares, & Marchetti, 2005). Num desses estudos, Ricci e colaboradores demonstraram que a taxa de lidocaína libertada foi controlada pela variação de concentração de PX 407 (Ricci et al., 2005). Este estudo confirmou também que o uso de geles de PX 407 aumentou o tempo de residência do fármaco no local da injeção e que a liberação sustentada de fármaco resultou num aumento da eficácia terapêutica (Ricci et al., 2005). No segundo estudo, o PX 407 foi introduzido para administração intraperitoneal de lidocaína e dexametasona para o controle/manutenção da dor pós-operatória (Ramon, 2015). Akkari *et al.* demonstraram que a formulação constituída por PX 407/188 revelou-se um sistema de liberação infiltrativo local para anestesia aplicado no tratamento da dor pós-operativo *versus* a ropivacina como modelo de fármaco. Eles autores demonstraram que a formulação apresentou uma reduzida citotoxicidade *in-vitro* e um aumento do tempo de anestesia sem indução *in-vivo* de sinais de inflamação após a injeção local (Akkari et al., 2016).

Além destes estudos surgiram formulações adicionais recorrendo ao PX, nomeadamente o desenvolvimento de uma formulação de gel PX para aplicação intranasal de hidrocloreto de naratriptano para o tratamento de enxaqueca (Majithiya, Ghosh, Umrethia, & Murthy, 2006). Este estudo demonstrou um perfil de liberação

controlada do fármaco sem sinais de quaisquer danos nas células do epitélio num modelo animal, sugerindo a natureza não-tóxica da formulação (Majithiya et al., 2006).

Em termos de patentes, observa-se que nos Estados Unidos existe um número considerável de patentes registadas contendo PX 407 na sua composição (Caló & Khutoryanskiy, 2015).

Em baixas concentrações (10^{-4} a 10^{-5} %) eles formam, geralmente, micelas monomoleculares mas, em altas concentrações formam agregados multimoleculares, constituídos por um núcleo central hidrofóbico com cadeias hidrofílicas de polioxietileno orientadas para o exterior (Escobar-Chávez et al., 2006; Nie, Hsiao, Pan, & Yang, 2011b)

A micelização ocorre em soluções diluídas, de solventes selecionados, em blocos de co-polímeros, acima da concentração micelar crítica (cmc) e a uma dada temperatura, acima da concentração crítica de gel (ccg) as micelas podem formar uma rede tal como ilustra a Figura 4 (Escobar-Chávez et al., 2006; Fakhari et al., 2017)

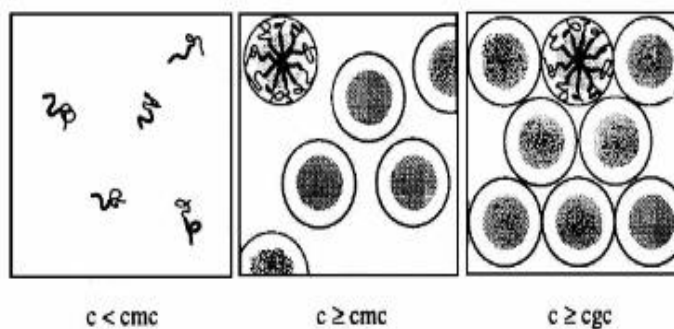


Figura 4 – Ilustração da **cmc** e **ccg** numa solução de co-polímero em bloco (retirado de (Escobar-Chávez et al., 2006).

O fato destes geles formarem soluções-geles termorreversíveis é um bom indicador de que quando aplicados na pele ou injetados no corpo, o gel formado vai criar uma barreira sólida e, por conseguinte, constituir um sistema de libertação sustentada de fármacos (Escobar-Chávez et al., 2006).

Para avaliar a estrutura do gel podem ser utilizadas diversas metodologias tais como a inspeção visual da formação de gel, a determinação da viscosidade a diferentes temperaturas, a determinação da textura, a análise de transição de fase solução-gel calorimetria diferencial de varrimento e a análise da morfologia por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) (Pli, Experimental, Lus, & Grande, 2005; Rijo et al., 2014; Roberto, 2007).

O objetivo proposto desta dissertação, tem como base o trabalho experimental, que é o desenvolvimento, para uma futura incorporação, de nanopartículas num hidrogel termorreversível contendo um antibiótico para aplicação a nível trans-timpânica no tratamento de otite média aguda a nível hospitalar, evitando assim a recidiva da patologia melhorando, significativamente, a eficácia do tratamento. Além do PX, esta dissertação recorre a outros polímeros com o objetivo de aumentar a mucoadesão da formulação no local-alvo, mas também aumentar a temperatura de gelificação.

Polímeros complementares (biopolímeros)

O quitosano é um biopoliaminosacárido natural linear, obtido através da deacetilação da quitina. Trata-se do segundo polissacárido mais abundante a seguir à celulose (Pereira et al., 2013). O quitosano bem como vários polímeros hidrofílicos têm sido incorporados em geles de PX F127 tanto para promover a libertação controlada de fármacos bem como para melhorar a sua capacidade mucoadesiva (Pereira et al., 2013).

A goma xantana é um heteropolissacarídeo produzido pela fermentação do microrganismo *Xanthomonas campestris*. Em soluções aquosas, sob alterações de temperatura, as macromoléculas de goma xantana sofrem alterações na sua conformação (Chimie, Bercea, Darie, & Morariu, 2013).

O Carbopol® 940 (cárbomero 940) é homo- um copolímero sintético do ácido acrílico e tem sido usado como agente de suspensão, estabilizante e espessante (Balakrishnan et al., 2015). Carbopol confere mucoadesividade à formulação, o que aumenta a viscosidade da mesma, forma ligação de hidrogénio com a mucosa e aumenta o tempo de residência no alvo (Majithiya et al., 2006; Singh, Kumar, & Pathak, 2013). É de referenciar que o Carbopol® tem sido usado para promover a mucoadesividade em soluções intra-nasais (Balakrishnan et al., 2015; Singh et al., 2013; Singh, Kumar, Pathak, Basu, & Bandyopadhyay, 2010).

Materiais e Métodos de preparação dos geles

Materiais

PX F127, Quitosano (LMW), Carbopol[®] 940, Goma Xantana (G1253) foram obtidos na empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

Todos os restantes reagentes usados foram de grau analítico.

Métodos

Todos os métodos de preparação dos geles em estudo foram baseados no método “Cold” descrito em diversas publicações científicas (Chimie et al., 2013; Cho et al., 2011; Nie, Hsiao, Pan, & Yang, 2011a; Shin et al., 2013) com algumas adaptações apropriadas aos estudos e pesquisas a realizar.

A. Resumidamente, a preparação do gel “**Cold I**” (Nie et al., 2011a; Soga et al., 2005) realizou-se da seguinte forma:

- Foram adicionadas 18 g de PX F127 a 100 mL de solução tampão fosfato (PBS a pH 7,4, USPXXX), num copo de precipitação de volume apropriado (250mL);
- A homogeneização da solução foi de seguida realizada com recurso a placa magnética (e respetivos agitadores), de forma suave e constante, a 4° C, durante aproximadamente 24h, até à obtenção de uma solução límpida;
- O gel obtido foi armazenado no frigorífico (4° C) devidamente acondicionado para as pesquisas posteriores (Nie et al., 2011).

B. Quanto à preparação do gel “**Cold II**” (Cho et al., 2011; Xi et al., 2014), pode resumir-se nos seguintes passos:

- Foram adicionadas 9 g de PX F127 a 50 mL de água destilada a 4° C, num copo de precipitação de volume apropriado (100 mL);
- A dissolução total de PX F127 foi feita com agitação suave e constante até à obtenção da solução límpida pretendida;

- Em paralelo foi preparada, uma solução de Quitosano a 0,6 % (m/v), pela adição de 0,6 g do mesmo a 50 mL de uma solução de ácido acético a 0,5 % (v/v) num copo de precipitação de volume apropriado (100 mL);
- Para finalizar, as duas soluções foram misturadas num copo de precipitação com agitação suave e constante, a 4° C, durante 24h, até a obtenção da solução límpida pretendida;
- Posteriormente, a solução foi armazenada e acondicionada para as pesquisas e estudos posteriores (Cho et al., 2011).

C. O gel “Cold III” (Gibb A., 2016; Shin et al., 2013) foi preparado de forma sucinta, do seguinte modo:

- Adicionaram-se 18 g de PX F127 a 75 mL de solução tampão fosfato a pH 7,4, contendo 1% de Tween 20, num copo de precipitação de volume adequado (100 mL);
- O processo de dissolução total dos grânulos foi realizado com agitação constante e suave, a 4°C, até se encontrar totalmente dissolvido;
- Em paralelo foram adicionadas 0,1 g de Carbopol® 940 a 25 mL de solução tampão fosfato (pH 7,4) num copo de precipitação; a dissolução do Carbopol 940 foi realizada com recurso ao equipamento de ultrassons;
- Por fim, as duas soluções foram misturadas, nas mesmas condições de agitação e temperatura, a solução límpida pretendida foi obtida e devidamente armazenadas para as futuras pesquisas e estudos a realizar (Shin et al., 2013).

D. O gel “Cold IV” (Chimie et al., 2013) foi, resumidamente, realizado seguindo os passos seguintes:

- Foram adicionadas 18 g de PX F127 a 100 mL de água destilada num copo de precipitação de volume apropriado;
- A obtenção da solução límpida pretendida foi obtida com agitação suave e constante a 4 °C, durante algumas horas;
- Posteriormente foram adicionadas 0,1 g de Goma Xantana à mesma solução, mantendo as condições de dissolução anteriormente descritas;
- Finalmente, obteve-se a solução límpida pretendida que foi devidamente armazenada e acondicionada para os estudos e pesquisas seguintes (Chimie et al., 2013).

Inspeção Visual da formação de gel

O método realizado consistiu na introdução de 2 mL de cada solução-gel em tubos de ensaio, posteriormente armazenados a 4 °C até estarem equilibrados termicamente e de seguida feito o registo fotográfico.

Os tubos de ensaio foram de seguida colocados numa incubadora a 37°C até ao equilíbrio térmico e depois invertidos e fotograficamente registados.

O uso dos registos fotográficos permite, de acordo com a literatura, uma melhor elucidação do comportamento da sol-gel a diferentes temperaturas (4 e 37°C) (Dumortier et al., 2006; Hirani, Grover, Lee, Pathak, & Sutariya, 2014; Moreno et al., 2014).

Determinação da viscosidade

A viscosidade foi determinada em triplicado (n=3) a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°) com recurso ao Viscosímetro Rotacional da Brookfield® (Middleborough, EUA) (Fig. 5). A velocidade de rotação para todas as amostras foi de 100 RPM e usada agulha número três (Moreno et al., 2014; Pereira et al., 2013)



Figura 5 - Viscosímetro Rotacional da Brookfield®.
(Middleborough, EUA)

Análise morfológica

A análise morfológica dos geles em estudo foi avaliada com recurso à técnica de microscopia de varrimento eletrónica (SEM). Foram colocadas alíquotas de cada amostra em lamelas de vidro, secas num exsiccador e analisadas de seguida por SEM. As preparações foram então revestidas com uma camada fina de ouro (500 nm de espessura) e observadas no microscópio eletrónico JEOL 5200 LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) a uma voltagem de aceleração de 20 kV. As imagens recolhidas foram guardadas em formato digital. (Roque et al., 2017; Singh et al., 2013)

Análise da textura

A análise da textura (firmeza e adesividade) foi realizada com recurso ao equipamento Texturómetro *Stable Micro Systems TA- XT2i* (Godalming, Reino Unido), apenas para o Gel Cold I, sendo este o gel base de todas as formulações. Foi utilizada uma sonda de teste P/25P (25mm/s), com uma velocidade de teste 3 mm/s, a distância foi 5mm, célula de carga com 5k e *Trigger Force* de 0,049.



Figura 6 - Texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* (Godalming, Reino Unido).

Análise transição de fase (Sol-gel)

A análise por Calorimetria Diferencial de Varrimento (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC) foi realizada com recurso ao equipamento DSC NETZSCH 204F1 da Phoenix® (Selb, Alemanha). Foram realizadas corridas de 50 minutos para os quatro geles, com vários ciclos de aquecimento e



Figura 7 – Aparelho de DSC NETZSCH 204F1 da Phoenix® (Selb, Alemanha)

arrefecimento da amostra com uma taxa de varrimento de 10°C / min (Shin et al., 2013; Singh et al., 2013).

Estudo da citotoxicidade geral usando *Saccharomyces cerevisiae* L como modelo

O equipamento utilizado foi uma incubadora (Heidolph Inkubator 1000, Schwabach, Alemanha), placa agitadora (Heidolph Unimax 1010, Schwabach, Germany), misturador vortex (Velp Scientifica



Figura 8 - Incubadora Heidolph Inkubator 1000 e Heidolph Unimax 1010 (Schwabach, Alemanha)

ZX, cidade, país) e espectrofotómetro (Thermo Scientific evolution 300 UV-vis Loughborough, Reino Unido).

O método foi realizado com base em métodos descritos anteriormente por outros autores (Pli et al., 2005) Foram preparadas soluções do gel com diferentes concentrações para o gel Cold II e III. Foram introduzidos 100µL de cada solução em

cuvettes de 2mL juntamente com o meio YPD (ver Anexo 2) e 40µL de cultura líquida de *S. cerevisiae* L previamente preparada.

Posteriormente foi lida a absorvância a 525 nm, em quadruplicado, das cuvettes com amostra. Em paralelo foi feito um controlo também em quadruplicado (Thermo Scientific evolution 300 UV-vis, Loughborough, Reino Unido). Por fim os dados foram tratados matematicamente e calculadas as taxas de inibição respetivas (Pli et al., 2005; Rijo et al., 2014)

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente com recurso ao Software Excel da Microsoft[®], realizou-se o teste t, uma vez que as concentrações de PX serem iguais nos quatro géis procedemos à análise em duas amostras independentes e considerou-se a diferença estatisticamente significativa com $p > 0,05$.

Resultados

Inspeção visual da formação de gel

Os resultados que se seguem são referentes à inspeção visual da formação de gel.

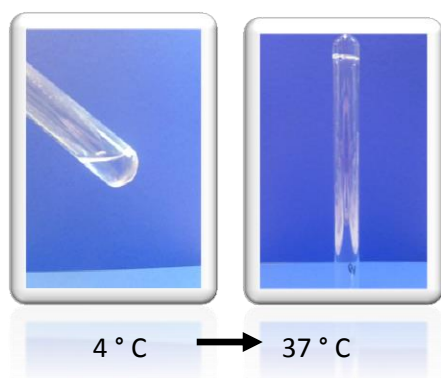


Figura 9.1. - Ilustração da transição de estado do gel “Cold I” a 4 e a 37°.

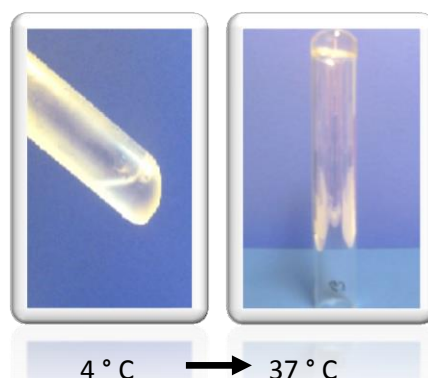


Figura 9.2. - Ilustração da transição de estado do gel “Cold II” a 4 e a 37°.

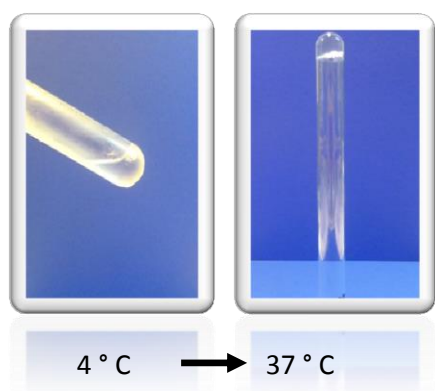


Figura 9.3. - Ilustração da transição de estado do gel “Cold III” a 4 e a 37°.

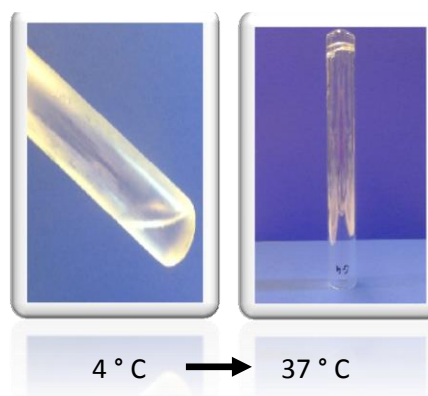


Figura 9.4. - Ilustração da transição de estado do gel “Cold IV” a 4 e a 37°.

Figura 9 – Esquemas ilustrativos da transição *sol-gel* dos diferentes geles em estudo.

Viscosidade

Os resultados que se seguem, nas Tabelas 2-5, são referentes à determinação da viscosidade nos diferentes geles, em triplicado (n=3) e a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°C).

Tabela 2 – Valores médios referentes à medição da viscosidade (mPas) em triplicado do Gel “Cold I” a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°C). Nota: D.P. - Desvio padrão.

Gel Cold I (mPas)			
min/T°C	4	25	37
10	76	360	7320
20	76	380	7360
30	75,2	360	7320
Média	75,7	366,7	7333,3
D.P.	0,46	11,55	23,09

Tabela 3 – Valores médios referentes à medição da viscosidade (mPas) em triplicado do Gel “Cold II” a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°C). Nota: D.P. - Desvio padrão.

Gel Cold II (mPas)			
min/T°C	4	25	37
10	170	268	7600
20	170	270	7640
30	170,4	272	7600
Média	170,13	270	7613,33
D.P.	0,23	2,00	23,09

Tabela 4 - Valores médios referentes à medição da viscosidade (mPas) em triplicado do Gel “Cold III” a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°C). Nota: D.P. - Desvio padrão.

Gel Cold III (mPas)			
min/T°C	4	25	37
10	69,2	286	6080
20	69,2	288	6080
30	69,6	290	6080
Média	69,33	288,00	6080,00
D.P.	0,23	2,00	0,00

Tabela 5 - Valores médios referentes à medição da viscosidade (mPas) em triplicado do Gel “Cold IV” a diferentes temperaturas (4, 25 e 37°C). Nota: D.P. - Desvio padrão.

Gel Cold IV (mPas)			
min/T°C	4	25	37
10	66	384	6060
20	66	382	7000
30	67	384	7000
Média	66,3	382,7	6993,3
D.P.	0,58	1,15	11,55

Análise da textura

A Tabela 6 descreve os resultados referentes à determinação da textura do Gel Cold I (PX F127, 18% (m/v)).

Tabela 6 - Dados referentes à determinação da textura do Gel Cold I.

Ensaio	F_{máx.} (N)	Área Negativa (N/mm²)
1	0,6	-3,3
2	0,6	-3,1
3	0,6	-3,5
Média	0,6	-3,3
D.P.	0	0,2

Análise morfológica (SEM)

Imagens (Figuras 10-13) que se seguem foram obtidas com recurso à técnica de microscopia SEM.

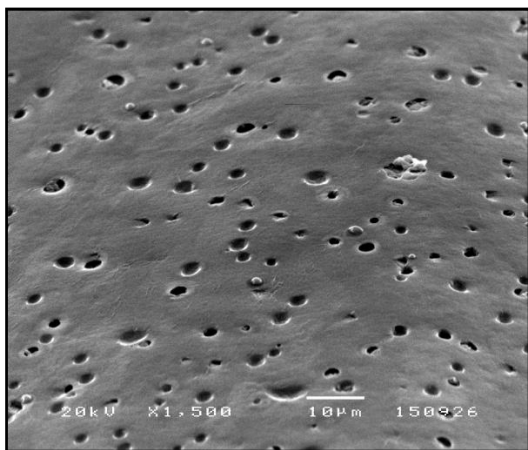


Figura 10 - Imagem SEM referente ao Gel "Cold I".

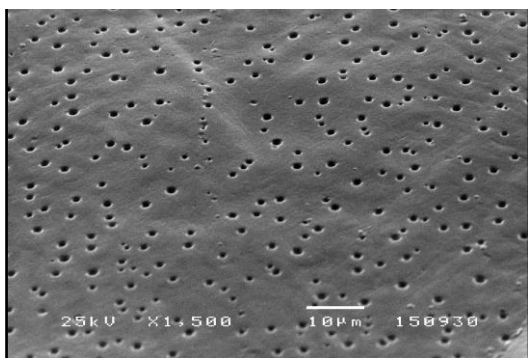


Figura 12 - Imagem SEM referente ao Gel "Cold III".

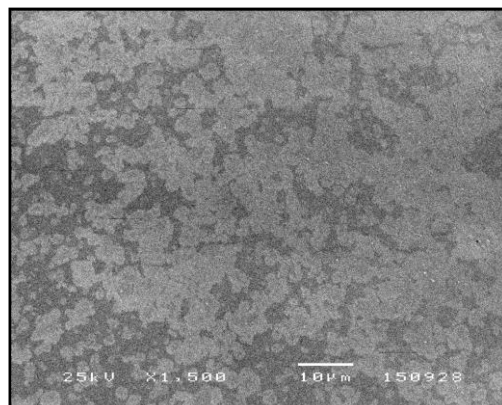


Figura 11 - Imagem SEM referente ao Gel "Cold II".

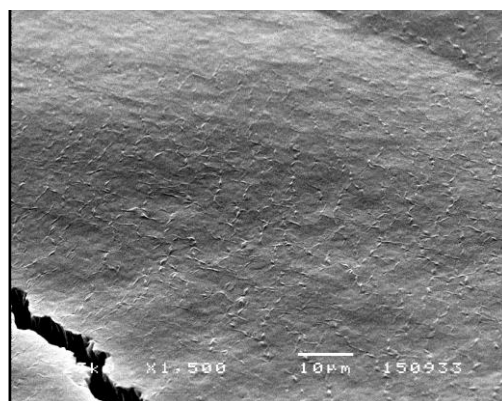


Figura 13 - Imagem SEM referente ao Gel "Cold IV".

Análise da transição de estado (Sol- Gel)

As imagens que se seguem são referentes aos termogramas obtidos da análise dos geles, representados graficamente com DSC/(mW/mg) versus Temperatura (°C).

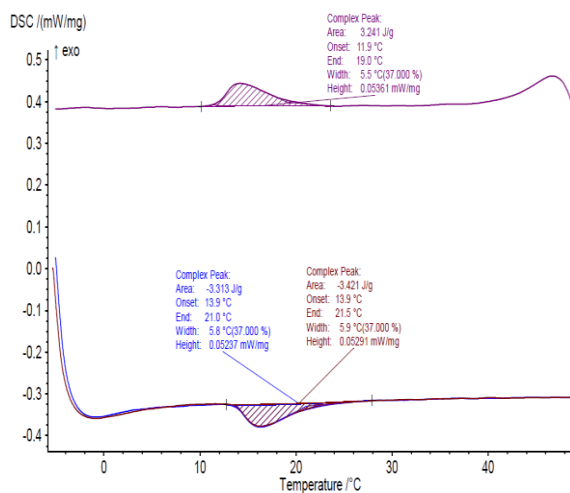


Figura 14 - Gel “Cold I”: Área do pico (média): 3,367; D.P.:0,21; “Onset” (média):13,9°C.

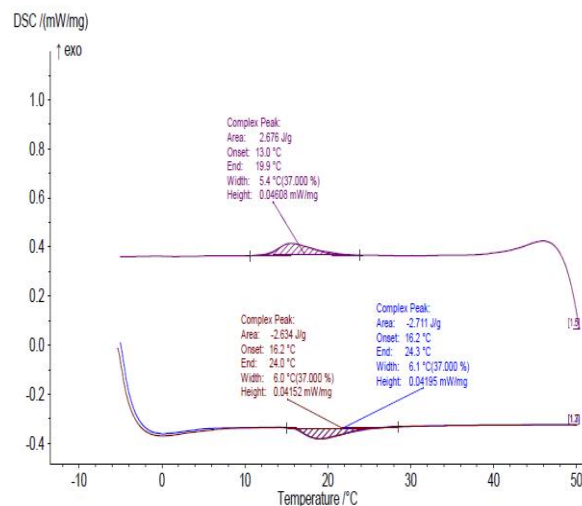


Figura 15 – Gel “Cold II”: Área do pico (média): 2,673; D.P.: 0,05 “Onset” (média): 16,2°C.

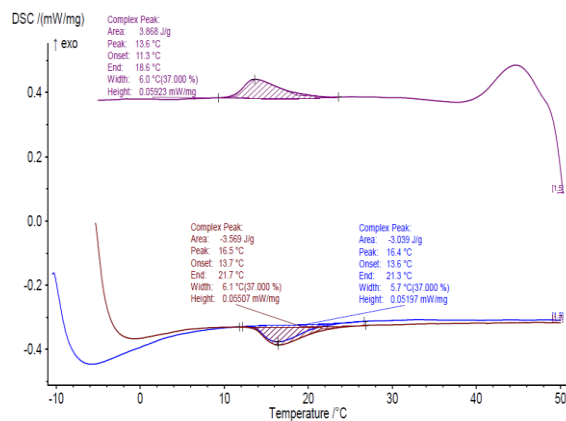


Figura 16 - Gel “Cold III”: Área do pico (média): 3,304; D.P.: 0,37; “Onset” (média): 13,7°C.

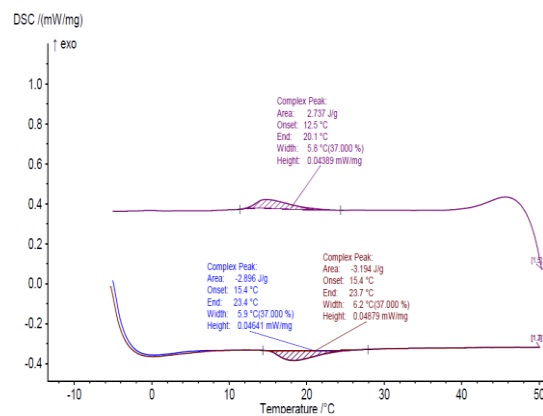


Figura 17 – Gel “Cold IV”: Área do pico (média): 3,045; D.P.: 0,21; “Onset” (média):15,4°C.

Estudo da citotoxicidade

A Tabela 7 descreve os resultados da análise de citotoxicidade geral utilizando *Saccharomyces Cerevisiae* como modelo de estudo.

Tabela 7 - Resumo dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade geral.

Gel “Cold II”		Gel “Cold III”
Tested Concentrations		
Quitosano	Quitosano	Carbopol ® 940
50 µg/mL	x10 (50 µg/mL)	x20 (50µg/mL)
250 µg/mL	x15 (250 µg/mL)	x15 (250 µg/mL)
500 µg/mL	x20 (500 µg/mL)	x10 (500 µg/mL)
Viabilidade Celular (%) e respectivos D.P.		
95,92 %; 0,004	92,33 %; 0,002	92,04 %; 0,001

Verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas (com $p > 0,01$) entre as diferentes concentrações testadas.

Discussão de resultados

Foi possível observar o comportamento das amostras a diferentes temperaturas com a inspeção visual do comportamento da solução a 4 e a 37°C. A 4°C, todas as amostras se comportaram como soluções líquidas e muito pouco viscosas. Porém, após aumento de temperatura, especificamente a 37°C, todas as soluções se transformaram num gel de carácter viscoso, aparentemente estático quando invertido ou sob agitação manual. O aspeto macroscópico destes geles é concordante com estudos anteriores (Dumortier et al., 2006; Hirani et al., 2014; Moreno et al., 2014).

Durante a determinação da viscosidade observou-se uma relação inversamente proporcional entre a viscosidade e a temperatura. Todas as soluções apresentaram um valor de viscosidade muito semelhante, muito provavelmente devido ao composto maioritário usado nas quatro formulações ser o mesmo e à mesma concentração. No entanto é de salientar que o Gel II apresenta uma maior viscosidade a 4°C em relação às outras amostras. Por este facto, poderá ser o mais indicado para aplicação em mucosas. Além disso, este gel contém quitosano o que também melhora a sua capacidade mucoadesiva (Moreno et al., 2014; Pereira et al., 2013). Outra observação detetada neste estudo relaciona-se com a perda de termorreversibilidade do gel com goma xantana, facto que já se encontra descrito na literatura (Chimie et al., 2013). Neste estudo verificou-se que na presença de longas cadeias de xantana, os geles PX F127 perdem sua termorreversibilidade, no entanto, as propriedades elásticas são melhoradas e a tensão de cisalhamento aumenta consideravelmente.

Por uma questão de limitação do número das amostras para análise da textura, a determinação da textura foi realizada apenas com o Gel Cold I. Os valores obtidos (Tabela 6) estão de acordo com a literatura (Singh et al., 2010).

As imagens obtidas com recurso à tecnologia SEM permitem-nos evidenciar o potencial destes geles como veículo para fármacos. As imagens referentes ao Gel I e III (Figura 10 e 12) mostram a existência de poros na matriz do gel, provavelmente, úteis para uma futura inclusão de fármacos. As imagens do Gel II e IV (Figura 11 e 13) apresentam um aspeto de filme contínuo (Singh et al., 2013).

Todos os termogramas obtidos através da análise DSC evidenciaram a transição de estado solução-gel (Tsol-Tgel). No entanto, a temperatura à qual ocorre a transição

em causa, em todos os termogramas, é abaixo do que está descrito na literatura aproximadamente 29,2°C (Nie et al., 2011). Uma possível justificação para esta diferença pode estar relacionada com o registo do início (“Onset”) da formação de gel. O “onset” de todos os geles não difere, significativamente, ainda assim é de referir que o que apresentou uma temperatura de gelificação superior foi o Gel III (Figura 16).

Um dos problemas que nos deparámos na realização da análise por DSC dos geles foi o facto da temperatura de gelificação ser inferior ao descrito na literatura, com uma diferença de cerca de 3°C. Tal facto pode ser justificado pelo facto de todos os geles preparados terem como soluto base, uma solução tampão de fosfato a pH 7,4, a qual introduz iões em solução (Engleder et al., 2014). A água possui mais afinidade para estes iões do que para PX F127, o que facilita a formação de gel, diminuindo assim a temperatura de gelificação das formulações (*Tsol-Tgel*) (Engleder et al., 2014). A preparação destas formulações em água desionizada poderia contornar este problema. Porém, é descrito na literatura que a presença dos iões poderá conferir maior rigidez e bioadesão às formulações, o que constitui por si só uma vantagem (Engleder et al., 2014).

Em muitos estudos, o efeito de solutos em pequenas quantidades (sais, co-solventes) no comportamento da transformação de fase tem sido discutido em diversas publicações (Cabana, Aït-Kadi, & Juhász, 1997; Desai, Jain, Sharma, & Bahadur, 2001). Contudo, a propriedade de termogelificação do sistema PX F-127 ainda não se encontra totalmente esclarecida (Adeli, 2016; Nascimento et al., 2018; Nie et al., 2011). Neste estudo, a análise térmica por DSC permitiu obter informações gerais sobre ambos os processos de transição, tanto de micelização como de Sol-Gel que são sempre acompanhados pelo comportamento termoreversível de F-127. Sabe-se que quando o F-127 é introduzido numa solução aquosa acima da concentração micelar crítica (cmc), a sua estrutura sofre alteração de blocos de copolímeros individuais (unímeros) para micelas auto-organizadas. Este processo, envolvendo agregação, é definido como “micelização”. Ao mesmo tempo, os copolímeros em bloco, a uma determinada concentração, também são caracterizados por uma temperatura específica na qual se formam micelas (temperatura micelar crítica, tmc). A temperaturas elevadas, esses sistemas mostram uma transformação de fase devido à completa desidratação dos blocos PO (óxido de propileno) e EO (óxido de etileno) (Bonacucina et al., 2007; Goldstein, 2017). Assim, os geles são, em geral, líquidos a baixa temperatura, mas dão

origem a um gel forte a uma dada temperatura superior. Este processo envolvendo a transformação de fase é definido como “transição Sol-Gel”.

Com a análise dos resultados obtidos, parece que o DSC é menos sensível à ocorrência de transição de Sol-Gel, mas mais sensível ao início (onset) rápido da formação de micelas. A transição Sol-Gel medida pela análise térmica corroborou os resultados obtidos com o método do tubo invertido (Fig. 9).

Os benefícios destes sistemas são muitos, mas, um dos principais reside na inocuidade dos geles. No presente estudo observámos uma inibição de crescimento praticamente nula. Quanto ao quitosano em si, existem estudos anteriores que corroboram os resultados obtidos, demonstrado a inexistência de toxicidade e genotoxicidade associada ao polímero (Abdel-Gawad, Khalil, El-Kady, Waly, & Abdel-Wahhab, 2016; De Lima et al., 2010; Hu et al., 2013).

O Carbopol[®] 940, por ser um polímero de elevado peso molecular, está associado a baixo risco de toxicidade e o seu comportamento vastamente descrito em livros compendiais (Ordoñez, Ordoñez, Zampini, & Isla, 2009; Pli et al., 2005; Rijo et al., 2014). No modelo utilizado, os geles não apresentam toxicidade.

Mas, para inferir de forma mais aprofundada sobre possível toxicidade os geles em estudo, deveriam ser feitos estudos em modelos mais complexos, como por exemplo, queratinócitos humanos.

Conclusões / Perspetivas futuras

Com base nos resultados obtidos, no trabalho experimental, sugerem que este tipo gel, de carácter termorreversível, merece especial atenção por representar uma aposta atrativa como sistema de veiculação de fármacos devido às características apresentadas tais como a termogelificação reversível, o seu fácil manuseamento quando se encontra em solução (baixas temperaturas) e o seu poder bioadesivo/mucoadesivo com consequente aumento do tempo de contacto no tecido alvo. Tendo em conta as características vantajosas, este tipo de formulação poderá ter diversas aplicações como sistema de libertação controlada, tanto para uso humano como veterinário.

O trabalho experimental realizado sugere que o Gel III poderá ser mais promissor para inclusão de fármacos, pelo que os próximos passos incluirão a preparação de nanopartículas e a sua inclusão neste gel. Esta dissertação sugere ainda que deverão ainda ser realizados estudos de permeação e adesão *in vitro* e *ex vivo* com o produto final (Gel Cold + Nanopartículas) bem com estudada a sua citotoxicidade num modelo celular.

Referências bibliográficas

- Abdel-Gawad, F. K., Khalil, W. K. B., El-Kady, A. A., Waly, A. I., & Abdel-Wahhab, M. A. (2016). Carboxymethyl chitosan modulates the genotoxic risk and oxidative stress of perfluorooctanoic acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(1), 57–66.
- Adeli, E. (2016). The use of supercritical anti-solvent (SAS) technique for preparation of Irbesartan-Pluronic® F-127 nanoparticles to improve the drug dissolution. *Powder Technology*, 298, 65–72.
- Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2015). Recent progress in biomedical applications of pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. *Journal of Controlled Release*, 209, 120–138.
- Akkari, A. C. S., Papini, J. Z. B., Garcia, G. K., Franco, M. K. K. D., Cavalcanti, L. P., Gasperini, A., ... De Araujo, D. R. (2016). Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. *Materials Science and Engineering C*, 68, 299–307.
- Balakrishnan, P., Park, E.-K., Song, C.-K., Ko, H.-J., Hahn, T.-W., Song, K.-W., & Cho, H.-J. (2015). Carbopol-Incorporated Thermoreversible Gel for Intranasal Drug Delivery. *Molecules*, 20(3), 4124–4135.
- Bercea, M., Darie, R. N., Nit, L. E., & Morariu, S. (2011). Temperature Responsive Gels Based on Pluronic F127 and Poly (vinyl alcohol), 4199–4206.
- Bonacucina, G., Spina, M., Misici-Falzi, M., Cespi, M., Pucciarelli, S., Angeletti, M., & Palmieri, G. F. (2007). Effect of hydroxypropyl β -cyclodextrin on the self-assembling and thermogelation properties of Poloxamer 407. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(2), 115–122.
- Boonlai, W., Tantishaiyakul, V., Hirun, N., Phaisan, S., & Uma, T. (2017). The effect of the preservative methylparaben on the thermoresponsive gelation behavior of aqueous solutions of poloxamer 407. *Journal of Molecular Liquids*, 240, 622–629.

- Branco, M. C., & Schneider, J. P. (2009). Self-assembling materials for therapeutic delivery. *Acta Biomaterialia*, 5(3), 817–831.
- Cabana, A., Aït-Kadi, A., & Juhász, J. (1997). Study of the gelation process of polyethylene oxide(a)-polypropylene oxide(b)-polyethylene oxide, copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 190(2), 307–312.
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252–267.
- Chimie, R. R. De, Bercea, M., Darie, R. N., & Morariu, S. (2013). RHEOLOGICAL INVESTIGATION OF XANTHAN / PLURONIC F127 HYDROGELS, 58, 189–196.
- Cho, H.-J., Balakrishnan, P., Park, E.-K., Song, K.-W., Hong, S.-S., Jang, T.-Y., ... Kim, D.-D. (2011). Poloxamer/cyclodextrin/chitosan-based thermoreversible gel for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(2), 681–691.
- Ćirin, D., Krstonošić, V., & Poša, M. (2017). Properties of poloxamer 407 and polysorbate mixed micelles: Influence of polysorbate hydrophobic chain. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 47, 194–201.
- Das, N., Madan, P., & Lin, S. (2012). Statistical optimization of insulin-loaded Pluronic F-127 gels for buccal delivery of basal insulin. *Pharmaceutical Development and Technology*, 17(3), 363–374.
- De Lima, R., Feitosa, L., Pereira, A. D. E. S., De Moura, M. R., Aouada, F. A., Mattoso, L. H. C., & Fraceto, L. F. (2010). Evaluation of the genotoxicity of chitosan nanoparticles for use in food packaging films. *Journal of Food Science*, 75(6), 89–96.
- Desai, P. R., Jain, N. J., Sharma, R. K., & Bahadur, P. (2001). Effect of additives on the micellization of PEO/PPO/PEO block copolymer F127 in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 178(1–3), 57–69.

- Dewan, M., Sarkar, G., Bhowmik, M., Das, B., Chattoopadhyay, A. K., Rana, D., & Chattopadhyay, D. (2017). Effect of gellan gum on the thermogelation property and drug release profile of Poloxamer 407 based ophthalmic formulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 258–265.
- Dumortier, G., Grossiord, J. L., Agnely, F., & Chaumeil, J. C. (2006). A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical Research*, 23(12), 2709–2728.
- Engleder, E., Honeder, C., Klobasa, J., Wirth, M., Arnoldner, C., & Gabor, F. (2014). Preclinical evaluation of thermoreversible triamcinolone acetonide hydrogels for drug delivery to the inner ear. *International Journal of Pharmaceutics*, 471(1–2), 297–302.
- Escobar-Chávez, J. J., López-Cervantes, M., Naik, a., Kalia, Y. N., Quintanar-Guerrero, D., & Ganem-Quintanar, a. (2006). Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(3), 339–358.
- Fakhari, A., Corcoran, M., & Schwarz, A. (2017). Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon*, 3(8).
- Gibb A. (2016). from the SAGE Social Science Collections . Downloaded All Rights.
- Goldstein, R. E. (2017). B-6-84 3N (Named Node Network) Implementation evaluation report of 3N (Named Node Network), 80(May), 2017.
- Hirani, A., Grover, A., Lee, Y. W., Pathak, Y., & Sutariya, V. (2014). Triamcinolone acetonide nanoparticles incorporated in thermoreversible gels for age-related macular degeneration. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1–7.
- Hu, P., Wang, T., Xu, Q., Chang, Y., Tu, H., Zheng, Y. *et. al.* (2013). Genotoxicity evaluation of stearic acid grafted chitosan oligosaccharide nanomicelles. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 751(2), 116–126.
- Jagur-Grodzinski, J. (2010). Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. *Polymers for Advanced Technologies*, 21(1), 27–47.

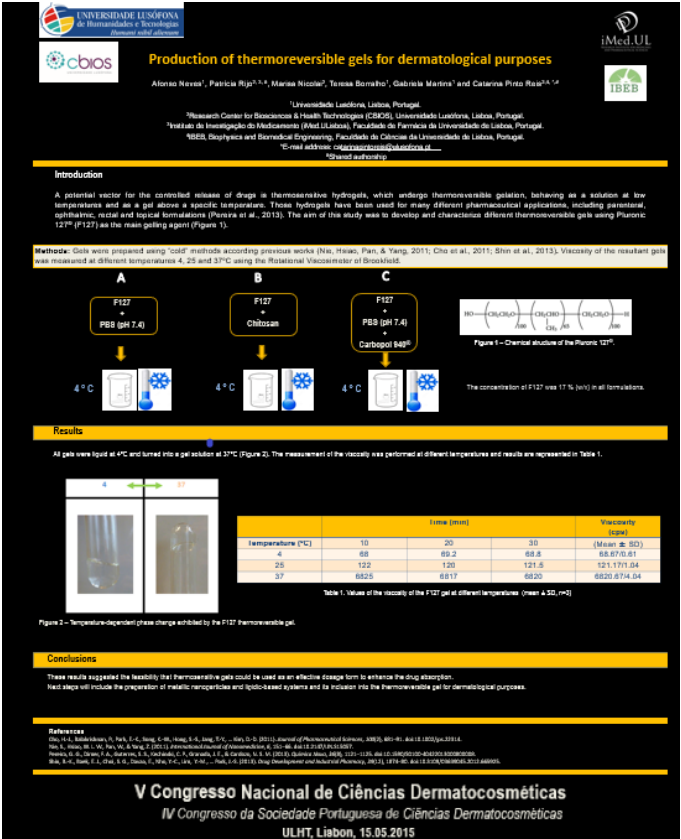
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., & Alakhov, V. Y. (2002). Pluronic (R) block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 82(2–3), 189–212.
- Khoo, X., Simons, E. J., Chiang, H. H., Hickey, J. M., Sabharwal, V., Pelton, S. I., *et al.* (2013). Formulations for trans-tympanic antibiotic delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1281–1288.
- Kojarunchitt, T., Hook, S., Rizwan, S., Rades, T., & Baldursdottir, S. (2011). Development and characterisation of modified poloxamer 407 thermoresponsive depot systems containing cubosomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 408(1–2), 20–26.
- Kuroiwa, Y., Higashi, K., Ueda, K., Yamamoto, K., & Moribe, K. (2018). Nano-scale and molecular-level understanding of wet-milled indomethacin/poloxamer 407 nanosuspension with TEM, suspended-state NMR, and Raman measurements. *International Journal of Pharmaceutics*, 537(1–2), 30–39.
- Kyoung, J., Hyung, K., Kim, J., & Lee, J. C. J. (2014). Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery, 60–68.
- Majithiya, R. J., Ghosh, P. K., Umrethia, M. L., & Murthy, R. S. R. (2006). Thermoreversible-mucoadhesive gel for nasal delivery of sumatriptan. *AAPS PharmSciTech*, 7(3), 67.
- Managa, M., Britton, J., Prinsloo, E., & Nyokong, T. (2018). Effects of Pluronic F127 micelles as delivering agents on the vitro dark toxicity and photodynamic therapy activity of carboxy and pyrene substituted porphyrins. *Polyhedron*, 152, 102–107.
- Markus, F., Dreher, F., Laschat, S., Baudis, S., Tovar, G. E. M., & Southan, A. (2017). Physically and chemically gelling hydrogel formulations based on poly(ethylene glycol) diacrylate and Poloxamer 407. *Polymer (United Kingdom)*, 108, 21–28.
- Moreno, E., Schwartz, J., Larra, E., Nguewa, P. A., Sanmartín, C. *et al.* (2014). Thermosensitive hydrogels of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) – Pluronic® F127 copolymers for controlled protein release, 459, 1–9.

- Nascimento, M. H. M., Franco, M. K. K. D., Yokaichya, F., de Paula, E., Lombello, C. B., & de Araujo, D. R. (2018). Hyaluronic acid in Pluronic F-127/F-108 hydrogels for postoperative pain in arthroplasties: Influence on physico-chemical properties and structural requirements for sustained drug-release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111(2017), 1245–1254.
- Nie, S., Hsiao, W. L. W., Pan, W., & Yang, Z. (2011a). Thermoreversible pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: In vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *International Journal of Nanomedicine*, 6(1), 151–166.
- Nie, S., Hsiao, W. W., Pan, W., & Yang, Z. (2011b). Thermoreversible pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: In vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *International Journal of Nanomedicine*, 6(1), 151–166.
- Ordoñez, A. A. L., Ordoñez, R. M., Zampini, I. C., & Isla, M. I. (2009). Design and quality control of a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 378(1–2), 51–58.
- Parhi, R. (2017). Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: A review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(4), 515–530.
- Pereira, G. G., Dimer, F. A., Guterres, S. S., Kechinski, C. P., Granada, J. E., & Cardozo, N. S. M. (2013). Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. *Química Nova*, 36(8), 1121–1125.
- Pli, P., Experimental, T., Lus, U., & Grande, C. (2005). de C IÊNCIAS, (2), 95–100.
- Ramon, J. (2015). Preformulation and characterization of a Lidocaine Hydrochloride and Dexamethasone Sodium Phosphate thermo-reversible and bioadhesive long-acting gel for intraperitoneal administration.
- Ricci, E. J., Lunardi, L. O., Nanclares, D. M. A., & Marchetti, J. M. (2005). Sustained

- release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2), 235–244.
- Rijo, P., Matias, D., Fernandes, A. S., Simões, M. F., Nicolai, M., & Reis, C. P. (2014). Antimicrobial plant extracts encapsulated into polymeric beads for potential application on the skin. *Polymers*, 6(2), 479–490.
- Roberto, a. (2007). Metodo rapido para triagem da citotoxicidade geral parte II foto-toxicidade.
- Roque, L. V., Dias, I. S., Cruz, N., Rebelo, A., Roberto, A., Rijo, P., & Reis, C. P. (2017). Design of Finasteride-Loaded Nanoparticles for Potential Treatment of Alopecia. *Skin Pharmacology and Physiology*, 30(4), 197–204.
- Shin, B.-K., Baek, E. J., Choi, S. G., Davaa, E., Nho, Y.-C., Lim, Y.-M., ... Park, J.-S. (2013). Preparation and irradiation of Pluronic F127-based thermoreversible and mucoadhesive hydrogel for local delivery of naproxen. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(12), 1874–1880.
- Singh, R. M. P., Kumar, A., & Pathak, K. (2013). Thermally Triggered Mucoadhesive In Situ Gel of Loratadine: β -Cyclodextrin Complex for Nasal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 412–424.
- Singh, R. M. P., Kumar, A., Pathak, K., Basu, S., & Bandyopadhyay, A. K. (2010). Development and characterization of mucoadhesive in situ nasal gel of midazolam prepared with Ficus carica mucilage. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1223–1231.
- Soga, O., Van Nostrum, C. F., Fens, M., Rijcken, C. J. F., Schiffelers, R. M., Storm, G., & Hennink, W. E. (2005). Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. *Journal of Controlled Release*, 103(2), 341–353.
- Wang, X., Dellamary, L., Fernandez, R., Ye, Q., LeBel, C., & Piu, F. (2011). Principles of inner ear sustained release following intratympanic administration. *The Laryngoscope*, 121(2), 385–391.
- Xi, L., Wang, T., Zhao, F., Zheng, Q., Li, X., *et. al.* (2014). Evaluation of an injectable thermosensitive hydrogel as drug delivery implant for ocular glaucoma surgery. *PLoS ONE*, 9(6), 571–582.

Anexo 1

Poster



Anexo 2

Preparação do meio de cultura YPD (1% de extrato de levedura (Y); 0,5 de peptona (P) e 2% de dextrose)

1. Mediu-se o volume necessário de água desionizada para um balão de Erlenmeyer de 500mL.
2. Pesou-se o extrato de levedura, peptona e dextrose.
3. Adicionou-se ao balão e agitou-se o sistema até à dissolução.
4. Perfez-se o volume final desejado, adicionando água com agitação.
5. Dividiu-se por Erlenmyer de 50mL e procedeu-se à sua esterilização no autoclave a 121°C, durante 20min.