



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico de um gel de pilocarpina e avaliação do seu efeito na atrofia do epitélio vaginal de ratas

CRISTINA ALVES DE SOUSA LAGES

Teresina - Piauí

Dezembro/2014

CRISTINA ALVES DE SOUSA LAGES

Desenvolvimento tecnológico de um gel de pilocarpina e avaliação do seu efeito na atrofia do epitélio vaginal de ratas

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

Co-orientador:

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

Teresina - Piauí

Dezembro/2014

CRISTINA ALVES DE SOUSA LAGES

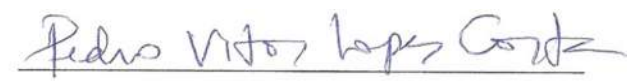
Desenvolvimento tecnológico de um gel de pilocarpina e avaliação do seu efeito na atrofia do epitélio vaginal de ratas.

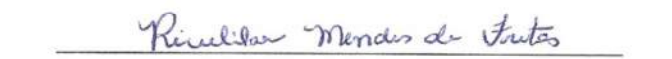
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 05/12/2014.

Banca examinadora:


Presidente: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva
Departamento Materno Infantil – CCS/UFPI


Examinador externo: Dr. Pedro Vitor Lopes Costa
Departamento Materno Infantil – CCS/UFPI


Examinador interno: Prof. Dr. Rivelilson Mendes Freitas
Departamento de Bioquímica e Farmacologia – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

VICE - COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes Freitas

“Suba o primeiro degrau com Fé.
Não é necessário que você veja toda
escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther king

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado:

A **Deus**, com imensa gratidão, por amparar-me nos momentos de fraquezas, dar-me força e mostrar caminhos nas horas incertas, por ser minha fortaleza. Pelos os sorrisos conquistados, as derrotas, as alegrias e vitórias, tudo é sinônimo de vida e aprendizado.

A minha amada e admirável filha **Ana Beatriz**, meu estímulo, que mesmo tão pequenina foi capaz de aceitar minha ausência com lindo sorriso ao me despedir para o trabalho e abraços acolhedores ao retornar para casa.

Ao meu querido marido **Lívio Portela de Deus Lages**, por toda paciência e compreensão com que tolerou meus anseios e ausência durante essa etapa da minha vida.

Ao meu pai, **Enoque Alves de Sousa** (*in memoriam*), minha eterna gratidão, um homem extraordinário, exemplo de coragem e vida. Sempre falava conselhos valiosos que foram fundamentais para minha formação, uma mão amiga e outra pesada pra puxar a orelha, mas sempre ao meu lado quando eu precisava. Como gostaria de agradecer pessoalmente por tudo que hoje sou... Como gostaria de receber aquele abraço apertado por mais uma vitória
... Saudades.

À minha mãe, **Rosa Maria de Jesus Sousa**, por sua dedicação, exemplo ético, por toda paciência, esforços sem limites e incentivo durante toda minha formação e vida. Por ser essa mãe maravilhosa e compreensiva. Minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos **Célia, Francelina, Paula e Chaguinha**, os quais amo muito, pelas lições, carinhos e sempre torcerem por mim.

A meus sogros, **Paulo Lages e Maria Lúcia**, por proporcionar uma escola de qualidade a Ana Beatriz e apoiar minha qualificação profissional.

À minha prima, **Regina Sena**, pois mesmo pegando a barca andando, cuida maravilhosamente da Ana Beatriz e do meu lar.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, orientador dessa dissertação, pela paciência, amizade e confiança depositada em mim. Pelo os ensinamentos intelectuais prestados com muita dedicação e inestimável ajuda em todos os momentos solicitados, sem os quais não seria possível a concretização deste trabalho. Acrescentou muito na minha vida profissional e pessoal. Eis um grande exemplo de vida, homem ético, professor e pesquisador, que tem dedicado a sua vida a formação de recursos humanos no Piauí.

Minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a **todos** que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a realização dessa pesquisa, especialmente:

Ao coordenador **Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira** e **docentes** do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela oportunidade e contribuição indispensável na minha formação em mestre.

Ao **Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes**, por seus ensinamentos e intermediações para realização desta pesquisa. Pela amizade, toda paciência dispensada e pelo desafio, confiado a mim.

Ao **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas**, por seus esclarecimentos, disponibilidade em todos os momentos que solicitei sua ajuda e espaço cedido no LAPNEX.

Ao **Prof. Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez**, pela confiança, incentivo e colaboração na realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho**, pela colaboração e valiosas sugestões, a mim prestada e acesso as dependências da Farmácia Escola.

Aos Professores Doutores **Pedro Vitor Lopes Costa**, **Edson Cavalcanti da Silva Filho** e **Cleânio da Luz Lima** pelo apoio, e **Aírton Mendes Conde Júnior** e **Alesse Ribeiro dos Santos** pelo auxílio imprescindível na realização deste estudo. Minha gratidão.

À **Profa. Dra. Adriana da Rocha Tomé**, **Profa. Dra. Hilris Rocha e Silva**, a **Profa. Me. Mayara Ladeira Coelho** e ao **Prof. Me. Márcio dos Santos Rocha**, pela amizade, incentivo e colaboração para a construção desse estudo.

Ao **Me. Rafael Leite Dantas**, pelo auxílio aos procedimentos realizados nesta pesquisa.

À **Dra. Lécia Maria Freire**, por todas as incontáveis correções e críticas, sempre construtivas, que foram fundamentais para construção desta pesquisa. É tão bom quando nos deparamos com pessoas especiais como você... Muito obrigada!

À **Patrícia Virna Sales Leão** pela compreensão, confiança e apoio. Por acreditar em nossa capacidade. Minha gratidão.

À minha grande amiga, **Hellen Kelen Maria Medeiros Coimbra Viana**, por estarmos juntas nessa caminhada, pela generosidade. Simplesmente porque divide comigo todos os momentos, alegrias, tristezas, ganhos, perdas. Acredite para nossa vida Deus tem a saída e uma nova história.

A todos os meus amigos de mestrados, **Oskar, Katrícia, Hellen, Jurandy, Jefferson, George, Angélica, Iluska, Ana Cristina, Marcela, Sean, Allyson, Kátia, Rodrigo** por termos compartilhado tantas emoções e experiências ao longo dessa jornada. E aos mais chegados por toda ajuda prestada para realização deste estudo.

À **Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI)**, pela bolsa de estudo fornecida, que me auxiliou em muito nessa trajetória.

Aos funcionários do Hospital Getúlio Vargas por permitirem acesso ao meu orientador em especial da Clínica Ginecológica, **D. Helena** e **Anatália**, e aos funcionários do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica em especial os Senhores **Ari, Francisco e Horlando** e a Senhora **Ivelta** pelo apoio na realização deste estudo.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	28
3. OBJETIVOS.....	34
Objetivo geral.....	35
Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Manipulação do gel.....	37
Estudo da estabilidade do gel.....	39
Avaliação da estabilidade preliminar.....	39
Parâmetro organolépticos.....	40
Determinação de pH.....	40
Viscosidade.....	40
Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	40
Quantificação do fármaco.....	41
Avaliação da atividade biológica.....	41
Animal.....	41
Calculo da amostra	42
Rata castrada.....	42
Rata em estro permanente.....	43
Protocolo experimental.....	44
<i>Screening</i> Hipocrático.....	46
Análise morfológica.....	46

Análise morfométrica.....	47
Análises estatísticas.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS e APÊNDICE.....	69

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abreviaturas	Descrição
ATR	Refletância Total Atenuada
°C	Grau Cesium
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
G	Gramas
GC	Gel de Carbopol
GCP5	Gel de carbopol com pilocarpina a 5%
GCP15	Gel de carbopol com pilocarpina a 15%
HE	Hematoxilina eosina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
M	Molar
ml	Mililitro
M ₃	Receptor colinérgico muscarínico do subtipo 3
NaOH	Hidróxido de Sódio
Ng	Nanograma
pH	Potencial de Hidrogênio
Psi	Libra força por polegada ao quadrado
R	Coefficiente de correlação
®	Marca registrada
Rpm	Rotação por minuto
µg	Micrograma

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

- Figura 1** Estrutura molecular do cloridrato de pilocarpina, (3S, 4R)-3-ethyl-4-[(3-methylimidazol-4-yl) methyl]oxalan-2-one..... 31
- Figura 2** Avaliação visual das formulações géis de Carbopol 940[®] e cloridrato pilocarpina (48 h iniciais)..... 39
- Figura 3** Procedimento cirúrgico de castração das ratas sob anestesia de Cetamina 60mg/kg associado a Midazolam 2,5 mg/kg..... 43
- Figura 4** Administração subcutânea na região dorso cervical, no segundo dia de vida, de 12,5 mg/mL de propionato de testosterona para indução de estro permanente..... 44
- Figura 5** Fotomicrografias da citologia vaginal de rata em estro permanente e castrada (controles positivo e negativo, respectivamente), corada pela técnica de papanicolau, para confirmação do estado de persistência estrogénica e hipoestrogenismo (magnificação original 100x)..... 45
- Figura 6** Curva da viscosidade para as formulações GC (gel veículo), GCP5 (gel carbopol com pilocarpina 5%) e GCP15 (gel carbopol com pilocarpina 15%) em relação à velocidade no tempo t_0 (A) e t_6 (B) durante o estudo de estabilidade..... 51
- Figura 7** Espectro de FTIR de sobreposição do cristal cloridrato de pilocarpina sólida (CP), gel de carbopol (GC), gel de carbopol com pilocarpina 5% (GCP5), gel de carbopol com pilocarpina 15% (GCP15) e ampliações A e B..... 53
- Figura 8** Curva de linearidade do princípio ativo cloridrato de pilocarpina no gel)..... 54
- Figura 9** Fotomicrografias de corte histológico da vagina mostrando o epitélio vaginal (E) de rata em estro permanente e ratas castradas tratadas com os géis (veículo e contendo pilocarpina nas concentrações 5% e 15%)..... 56

TABELAS

Tabela 1	Composição qualitativa e quantitativa da formulação em gel contendo com princípio ativo cloridrato de pilocarpina.....	38
Tabela 2	Resultados da avaliação da estabilidade preliminar do gel de Carbopol [®] 940 e dos géis de Carbopol [®] com pilocarpina nas concentrações de 5% e 15%.....	50
Tabela 3	Espessura do epitelial vaginal de ratas em estro permanente tratadas com veículo, grupo I controle positivo, e ratas castradas II, III e IV com tratamento de gel veículo e de pilocarpina (Média ± Desvio Padrão).....	57
Tabela 4	Hábitos fisiológicos de ratas castradas tratadas com gel veículo e gel de pilocarpina, via vaginal, durante 14 dias consecutivos (Média ± Desvio Padrão).....	58

RESUMO

CRISTINA ALVES DE SOUSA LAGES. Desenvolvimento tecnológico de um gel de pilocarpina e avaliação do seu efeito na atrofia do epitélio vaginal de ratas. Orientador Prof. Dr. Benedito Borges da Silva. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Curso de farmácia, UFPI, p. 79, 2014.

As mulheres na pós-menopausa apresentam vários sintomas decorrentes da falência ovariana como ondas de calor, perda de massa óssea, queixas urinárias, atrofia vaginal e dispareunia. Para esta condição a estrogênio-terapia pode ser o tratamento mais eficaz, todavia é contraindicado em mulheres portadoras de câncer de mama, reforçando a necessidade da busca por novas terapêuticas alternativas para este fim. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do gel pilocarpina tópico em epitélio vaginal de ratas castradas. Para tanto, foi desenvolvida uma formulação em gel de pilocarpina e sua caracterização organoléptica e físico-química. O estudo foi realizado em 40 ratas Wistar possuindo 90 dias de vida e, aproximadamente, 200 g de peso. A seguir, as fêmeas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos com 10 animais cada: grupo I (controle positivo - estro permanente), grupo II (controle negativo - veículo), III (gel de carbopol com pilocarpina 5% – GCP5), grupo IV (gel de carbopol com pilocarpina 15% – GCP15). O estro persistente foi obtido por meio da administração subcutânea de propionato de testosterona no segundo dia de vida. As ratas dos grupos II, III e IV, aos 90 dias de vida, foram castradas e recebeu por via vaginal gel de veículo (carbopol), pilocarpina a 5%, pilocarpina a 15%, respectivamente, durante 14 dias. No 15º dia, após o tratamento, todos os animais foram eutanasiados para remoção das vaginas, que foram fixadas em formol tamponado a 10% para estudo histológico morfológico e morfométrico. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de modelo de regressão linear, com nível de segurança estabelecido em $p < 0,05$. Os parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químicos (pH e viscosidade) do gel estavam de acordo com a Farmacopeia Brasileira. A espessura epitelial média e desvio padrão da vagina dos animais nos grupos I, II, III e IV foi $195,10 \pm 12,23$, $30,90 \pm 1,14$, $28,16 \pm 2,98$ e $29,84 \pm 2,30$, respectivamente. A espessura do epitélio vaginal das ratas do grupo I foi maior ($195,10 \mu\text{m}$) que a dos animais dos grupos II, III e IV ($p < 0,0001$), enquanto a comparação entre as ratas dos grupos II, III e IV não demonstrou diferença ($p = 0,0809$). Os resultados do presente estudo demonstraram que a pilocarpina sob a forma de gel não alterou a espessura do epitélio vaginal de ratas castradas.

ABSTRACT

CRISTINA ALVES DE SOUSA LAGES. **Technology development of a gel pilocarpine and evaluation of its effect on vaginal atrophy of the epithelium of rats.** Advisor Prof. Dr. Health Sciences Center. Pharmacy course, UFPI, p. 79, 2014.

Women postmenopausal present various symptoms resulting from ovarian failure such as hot flashes, bone loss, urinary complaints, vaginal atrophy and dyspareunia. For this condition to estrogen therapy may be the most effective treatment, but is contraindicated in women with breast cancer, reinforcing the need to search for new therapeutic alternatives for this purpose. This study aimed to evaluate the effects of topical gel pilocarpine in vaginal epithelium of castrated rats. For this purpose, a gel formulation of pilocarpine and its characterization organoleptic and physical chemistry was developed. The study was performed on 40 male Wistar rats having 90 days of age and approximately 200g weight. Then, the mice were randomly divided into four groups with 10 animals each: group I (positive control - persistent estrus), group II (negative control - vehicle), III (carbopol gel with 5% pilocarpine - GCP5), group IV (carbopol gel with 15% pilocarpine - GCP15). Persistent estrus was obtained by subcutaneous administration of testosterone propionate on the second day of life. The rats in Groups II, III and IV at 90 days of age, were castrated and received vehicle vaginal gel (Carbopol), 5% pilocarpine, pilocarpine and 15%, respectively, for 14 days. On the 15th day after treatment, all animals were euthanized for removal of vaginas, which were fixed in buffered formalin 10% for morphological and morphometric histological study. Data were analyzed by the nonparametric linear regression model, with security level set at $p < 0.05$. Organoleptic parameters (appearance, color and odor) and physico-chemical (pH and viscosity) of the gel were in agreement with the Brazilian Pharmacopoeia. Epithelial average thickness and standard deviation of the vagina of the animals in groups I, II, III and IV was 195.10 ± 12.23 , 30.90 ± 1.14 , 28.16 ± 2.98 and 29.84 ± 2.30 , respectively. The thickness of the vaginal epithelium of rats in Group I was higher (195.10 mM) of the animals in Groups II, III and IV ($p < 0.0001$), while the comparison between the mice in Groups II, III and IV did not show difference ($p = 0.0809$). The results of this study demonstrated that pilocarpine in the form of gel did not alter the thickness of the vaginal epithelium of castrated rats.

Keywords: Vaginal atrophy. Castration. Epithelium. Persistent estrus. Pilocarpine. Rata.

1. INTRODUÇÃO

As mulheres na pós-menopausa frequentemente procuram ajuda médica em consequência dos sintomas climatéricos, causados pela falência ovariana, como ondas de calor, perda de massa óssea, queixas urinárias e, principalmente, secura vaginal e dispareunia, decorrentes da atrofia vaginal (GUARISI *et al.*, 2001; KAMEL, 2006; ORTMANN; LATTRICH, 2012).

A atrofia vaginal decorrentes do hipoestrogenismo são tratados, principalmente, por meio do uso de estrogênios, contudo existem tratamentos alternativos, como hidratantes para os sintomas da atrofia vaginal e lubrificantes para a dispareunia (MAC BRIDE *et al.*, 2010). O uso de estrogênios para atrofia vaginal em mulheres na pós-menopausa, portadoras de cânceres hormônio dependentes é contraindicado, daí a busca por terapêuticas alternativas. A propósito, uma substância não hormonal, cuja pesquisa vem despertando interesse é o cloridrato de pilocarpina por ser um agonista parassimpaticomimético colinérgico com amplo efeito farmacológico, com predominante atividade muscarínica que atua principalmente em receptores colinérgicos de subtipo M₃ (WISEMAN, 1995; WIINN, 1996).

Alguns autores têm demonstrado um efeito da pilocarpina sobre a secura ocular e oral de pacientes portadores de Síndrome de *Sjögren*, sendo também observada uma melhora significativa da secura vaginal decorrente da atrofia (VIVINO *et al.*, 1999). Outros autores postularam que a melhora da secura vaginal poderia ser devido à produção de muco pelas glândulas de *Bartholin*, todavia não comprovaram esta melhora da secura vaginal em humanos, empregando pilocarpina na concentração de 5 mg por via oral no total de 201 pacientes (LOPRINZI *et al.*, 2011).

A pilocarpina, administrada por via oral, apresenta efeitos colaterais indesejáveis, todavia o estudo direto da pilocarpina no tecido vaginal de mulheres na pós-menopausa, por razões de natureza ética, apresenta limitações, daí a busca de modelos experimentais. O modelo animal que apresenta morfologia e endocrinologia com pontos semelhantes aos da espécie humana é o modelo animal de rato (RUSSO; RUSSO, 1987).

A propósito, a rata castrada é um modelo biológico, cujo epitélio vaginal vem despertando interesse para o estudo da interação de diversas substâncias. A atrofia do epitélio vaginal de ratas castradas mimetiza a de mulheres na pós-menopausa. Por outro lado, um modelo biológico caracterizado por interrupção do ciclo estral, é o de rata em estro

permanente, que apresenta maturação do epitélio vaginal com cornificação vaginal persistente, devido à ação estrogênica constante e mimetizando a síndrome dos ovários policísticos diferenciado do epitélio vaginal de ratas castradas que tem deficiência da ação estrogênica (BARRACLOUGH, 1961; NOGUEIRA; DA SILVA, 2009).

Portanto, devido à necessidade de melhor estudar terapêuticas alternativas aos estrogênios, particularmente em mulheres na pós-menopausa com atrofia vaginal e câncer hormônio-dependente, e na ausência de pesquisas, até onde investigamos, em modelos animais de ratas castradas que analisasse o efeito direto da pilocarpina sobre tecido vaginal, é que concebeu o presente estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As mulheres na pós-menopausa frequentemente procuram ajuda médica em consequência dos sintomas climatéricos, causados pela falência ovariana, como ondas de calor, perda de massa óssea, queixas urinárias e, principalmente, secura vaginal e dispareunia, decorrentes da atrofia vaginal (ORTMANN; LATTRICH, 2012). A propósito, as alterações anatômicas e fisiológicas do trato gênito urinário que surgem em decorrência do estado hipostrogênico incluem redução da vascularização, lubrificação e espessura do epitélio vaginal (MAC BRIDE *et al.*, 2010, STIKA, 2010).

A atrofia vaginal está frequentemente associada com a redução da produção estrogênica e após a menopausa é tratada, principalmente, por meio de estrogênio. Entretanto, existem tratamentos alternativos, como hidratantes e lubrificantes que minimizam o desconforto, mas possuem efeito de curta duração (MAC BRIDE *et al.*, 2010; STURDEE, 2010; MINKIN *et al.*, 2013). A atrofia da parede vaginal resulta em secura vaginal, irritação, prurido, dispareunia e incontinência urinária, sintomas frequentes entre mulheres pós-menopáusicas, apresentam prevalência variando de 10 a 50%, comumente tendo como consequência a vaginite atrófica (LEVINE *et al.*, 2008).

A vaginite atrófica é uma inflamação vaginal desenvolvida quando há uma redução nos níveis hormonais de estrogênios comuns em mulheres na menopausa, mulheres em tratamento de câncer de mamas, uso de quimioterápicos, estresse grave, depressão ou exercício rigorosos ou que passem por cirurgia para retirada dos ovários (CASTELOBRANCO *et al.*, 2005). O termo vaginite atrófica pós-menopáusicas tem sido restrito ao desenvolvimento de um corrimento vaginal inflamatório associado com o supercrescimento de patógenos genitais, após perda dominante de lactobacilos e da acidez vaginal.

O diagnóstico de vaginite atrófica é mais comumente aplicado a um espectro de sintomas incluindo secura vaginal, dispareunia, prurido ou dor, infecções urinárias recorrentes, bem como corrimento vaginal anormal associado, além de redução da lubrificação vaginal com fissura do introito vaginal e dor pós-coital (PANDIT; OUSLANDER, 1997). A incidência de secura ou irritação vaginal foi demonstrada em 27% e 19%, respectivamente, em mulheres na pós-menopausa (LOPRINZI *et al.*, 2011). Já, consoante Dennerstein e colaboradores (2000), a secura vaginal na pós-menopausa ocorre em 25% a 40% dos casos sendo uma considerável prevalência.

A atrofia vaginal na pós-menopausa é tratada principalmente com o uso de substâncias estrogênicas. Vários estrogênios são usados para tratar os sintomas climatéricos. Estradiol, valerato de estradiol, succinato de estriol e estrogênios conjugados estão disponíveis em várias preparações. O sistema de administração pode ser por via oral, transdérmico, intramuscular ou vaginal. O estradiol pode ser usado na forma de comprimidos, anel ou creme vaginais, enquanto o estriol pode ser usado também desta maneira para a atrofia vaginal, mas comumente sob a forma de creme vaginal. A biodisponibilidade das drogas varia consoante a via de administração. Estas drogas são bem absorvidas por via vaginal, alcançando níveis plasmáticos mensuráveis, podendo ter efeitos estrogênicos sistêmicos, portanto sendo contra indicadas para mulheres portadoras de câncer de corpo uterino e/ou mamário hormônio dependente devido à possibilidade do estímulo isolado e constante do estrogênio poder provocar uma mutação genética e aumentar proliferação celular descontrolada (ORTMANN; LATTRICH, 2012).

Contudo, a terapêutica para atrofia vaginal pode ser complementada com lubrificantes vaginais para os sintomas atroficos, em particular, a dispareunia. Lubrificantes vaginais, que são a base de água, estão disponíveis como líquidos, géis, ou óvulos, que inseridos diariamente podem ser seguramente usados por longo tempo, todavia precisam ser usados regularmente, já que possuem efeito rápido (MAC BRIDE *et al.*, 2010). Reforçando a necessidade da busca por novas terapias alternativas para mulheres menopáusicas portadoras destas patologias

A propósito, uma substância não hormonal, cuja pesquisa vem despertando interesse é o cloridrato de pilocarpina (**Figura 1**), devido ao seu efeito no aumento do tônus da musculatura lisa e secreções de glândulas secretoras (BERNARDI *et al.*, 2002). A pilocarpina é um agonista parassimpaticomimético colinérgico que exerce um amplo espectro de efeitos farmacológicos, com predominante atividade muscarínica por meio de ligação reversível, principalmente, aos receptores muscarínico do subtipo M₃ (WISEMAN, 1995; WIINN, 1996; MIURA, 2009).

Estudos relatam que a absorção da pilocarpina por via oral ocorre uma redução quando administrado com alimentação rica em gorduras. A pilocarpina não se liga às proteínas do plasma humano ou de rato ao longo de um intervalo de concentração de 5 a 25.000 ng/mL e seus produtos de degradação minimamente ativos ou inativos são excretados

na urina (DRUGSATFDA, 2014). Embora haja contraindicações, os ensaios clínicos apontam efeitos colaterais mínimos e quando estes ocorrem, geralmente caracteriza por rubor facial e aumento da atividade intestinal (NETO; SUGAYA, 2004).

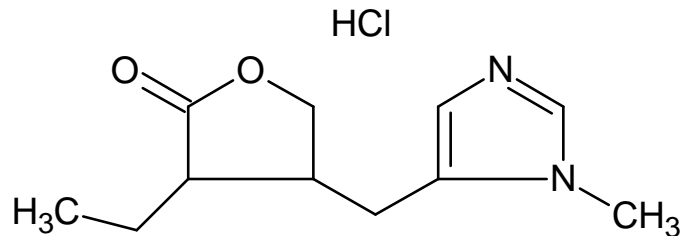


Figura 1: Estrutura molecular do cloridrato de pilocarpina, (3S, 4R)-3-ethyl-4-[(3-methylimidazol-4-yl) methyl]oxalan-2-one.

FONTE: Coblenz, 2014.

Alguns autores têm demonstrado o efeito oral da pilocarpina sobre a secreção ocular e oral de pacientes portadores de Síndrome de *Sjögren*. Entretanto foi observada uma redução significativa sobre a secreção vaginal (VIVINO *et al.*, 1999). Outros autores também demonstraram melhora da secreção vaginal com pilocarpina via oral em mulheres na pré-menopausa com atrofia vaginal decorrente do uso do quimioterápico ciclofosfamida (LEVEQUE; HENDRIX, 2004). Esta informação sugere que a pilocarpina pode ser útil para o tratamento da secreção vaginal e tendo como mecanismo de ação proposto, consoante Loprinzi e colaboradores (2011), a estimulação colinérgica das glândulas de Bartholin, levando ao aumento de muco e fluido vaginal. Contudo, a pilocarpina por via oral está associada a alguns efeitos colaterais, dentre eles, náuseas, sudorese, incontinência urinária e, em menor escala, diarreia, astenia, rubor, rinite e calafrios (COBLENTZ, 2014). A aplicação direta da pilocarpina no tecido vaginal de mulheres na pós-menopausa apresenta limitações éticas, daí a busca de modelos experimentais que mimetizam as condições humana.

O modelo experimental *in vitro* conta com a desvantagem da não reprodutibilidade das características do meio endócrino humano, além da ausência de interações imunológicas,

vasculares e estromais. Por sua vez, o modelo animal representa uma boa opção, tendo contribuído bastante para a compreensão da biologia e desenvolvimento de estratégias terapêuticas (HARRIS; LEVINE, 1965; CLARKE, 1996).

O modelo animal que apresenta morfologia e endocrinologia que se assemelham aos da espécie humana, é o de rata (RUSSO; RUSSO, 1987). A rata castrada é um modelo biológico em que epitélio vaginal apresenta características interessantes para o estudo da interação de diversas substâncias hormonais (AGUIAR, 2011).

A propósito, a rata por volta de 35 a 42 dias de vida, apresenta início dos ciclos estrais. Com início dos ciclos estrais, os esteróides ovarianos, estradiol e progesterona, induzem a proliferação do epitélio vaginal. As ratas são animais do tipo poliestro apresentando ciclos estrais regulares e sucessivos manifestando por mudanças morfológicas nos ovários, glândulas mamárias, útero e vagina. Estes ciclos duram de quatro a seis dias e sua observação pode ser acompanhada pelo exame citológico do esfregaço vaginal (MONTES *et al.*, 1978 ; SIMÕES, 1984; DOS SANTOS *et al.*, 2008).

Todavia, a interrupção do ciclo estral da rata, caracterizada por queratinização vaginal persistente ou estro permanente pode ser diferente do curto período de receptividade sexual denominado estro ou cio. Este modelo foi melhor estudado por Barraclough (1961), que caracterizou o seu período de maior sensibilidade hipotalâmica já que com apenas uma injeção subcutânea de androgênios, particularmente, propionato de testosterona na dose de 1,25 mg, aplicada nos primeiros cinco dias de vida, induziu estro permanente em todos os animais. Quando adultos, os animais apresentavam anovulação, ovários policísticos (HARRIS; LEVINE, 1965; DA SILVA *et al.*, 2007), além de oclusão da porção distal da vagina (WRENN *et al.*, 1969).

A rata em estro permanente é um modelo biológico sob constante estímulo estrogênico apresentando estratificação celular do epitélio vaginal com queratinização ao contrário do modelo de ratas castradas, que apresentam genitais, útero, vagina e também as glândulas mamárias, mimetizando os de mulheres pós-menopáusicas, particularmente a vagina, que apresenta epitélio predominantemente atrófico (SILVA, 1997).

Desta forma, através dos modelo experimental supracitado, optou por incorporar a pilocarpina em uma base gel de carbopol[®] 940 para administração intravaginal das ratas

castradas. O gel é uma forma farmacêutica semissólida de simples desenvolvimento farmacotécnico que consiste na dispersão de moléculas grandes ou pequenas em um veículo líquido que adquire consistência semelhante à gelatina pela ação de um polímero a ele adicionada, como o carbopol (ANSEL *et al.*, 2007). O carbopol é um polímero de ácido acrílico de alto peso molecular e ligação cruzada que produz um gel hidrofílico de aparência cristalina e brilhante (MERCLIN *et al.*, 2004).

Assim, diante da necessidade de se buscar uma alternativa aos estrogênios em mulheres na pós-menopausa com atrofia vaginal e cânceres hormônio dependente, além de que, até onde investigou, não foi encontrado estudos em modelos animais de ratas castradas analisando o efeito da formulação gel de pilocarpina no tecido epitelial vaginal destas ratas, o que levou a concepção do presente estudo.

3. OBJETIVOS

Geral

- Desenvolver e avaliar os efeitos do gel de pilocarpina tópica sobre o epitélio vaginal de ratas castradas.

Específicos

- Delinear uma fórmula farmacêutica semissólida contendo o princípio ativo cloridrato de pilocarpina para uso vaginal;
- Estudar a estabilidade e caracterizar a formulação delineada;
- Verificar os efeitos desta formulação sobre na morfologia e morfometria do epitélio vaginal de ratas castradas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental do presente trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos (LAPCOM) da Universidade Federal do Piauí e Laboratório de Ginecologia do Hospital Getúlio Vargas (HGV).

1. Material

Matérias primas e reagentes

Para desenvolvimento da presente dissertação foi utilizado o Cloridrato de pilocarpina (lote: 1101) extraída e isolada pela Vegeflora extrações do nordeste LTDA, Povoado Rosápolis s/n – Parnaíba – Brasil; Carbopol 940[®] (lote: 148637; Mapric); Metilparabeno (lote: 20121210; Gemini); Hidróxido Sódio (lote: 1009504; Vetec); formalina neutra tamponada 10%; Ácido fórmico grau HPLC (lote: 0090824; Vetec).

2. Métodos

2.1 Manipulação do gel

A formulação do Gel de Carbopol 940[®] foi determinada com base na formulação descrita por Ferreira (2006), avaliando a estabilidade das formulações de acordo com Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004; ANVISA, 2014). As concentrações dos componentes da fórmula base inicial foram ajustadas com o propósito para obtenção de uma formulação adequada com características desejadas para o gel. A **Tabela 1** descreve a composição da formulação composta por um polímero, um conservante, solução Hidroxido de Sódio para ajuste de pH, princípio ativo e solvente.

Tabela 1: Composição qualitativa e quantitativa da formulação em gel contendo com princípio ativo cloridrato de pilocarpina.

Composição	Gel-veículo GC (100g)	GCP5 (100g)	GCP15 (100g)
Carbopol [®] 940	0,5 g	0,5g	0,5 g
Metilparabeno	0,1 g	0,1g	0,1 g
Solução de NaOH 1M	1 mL	1 mL	1 mL
Cloridrato de Pilocarpina	0	14,28 µg	42,86 µg
Água destilada	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g

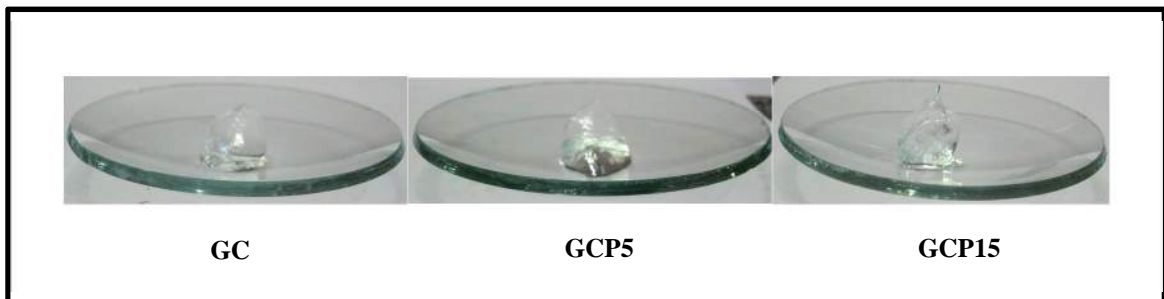
Legenda: GC – Gel de Carbopol[®]940; GCP5 – Gel de carbopol com pilocarpina a 5%; GCP15– Gel de carbopol com pilocarpina a 15%; CP – Cloridrato de Pilocarpina.

FONTE: AUTORA, 2014.

A partir destes constituintes foi preparado gel contendo pilocarpina, para administração tópica vaginal de ratas castradas, nas concentrações de 142,8 µg/g e 428,6 µg/g, correspondendo em um animal de peso médio de 200g a 5% e 15% de pilocarpina, respectivamente. Para o preparo da formulação, foi pesada 0,1 g de pilocarpina em balança analítica (Shimadzu, AY220), em seguida, transferiu-a para um balão volumétrico adicionando água destilada até o volume de 100 mL. Dessa solução fez-se diluições para obter soluções nas concentrações de 14,28 mg/100mL (GCP5) e 42,86 mg/100mL (GCP15). Foi adicionada água destilada a 60 °C à solução, quantidade suficiente para dispersar o metilparebano. Após resfriamento, juntou-se o Carbopol 940[®] às soluções GCP5 e GCP15, respectivamente, em béquer de vidro (200 mL), separadamente e num terceiro foi colocado o gel veículo, que ficaram em repouso por 3 horas para intumescimento do polímero. Com auxílio de um agitador magnético (Lucadema[®]), as soluções ficaram sob agitação no período de 3 horas para total homogeneização dos componentes. Finalmente, o ajuste do pH foi realizado com acréscimo da solução de Hidróxido de sódio (NaOH) em quantidade suficiente para gelificação da solução, homogeneizando manualmente através de uma espátula. Os géis foram acondicionados em potes plásticos, branco opaco (polietileno de alta densidade), boca

larga e tampa de boa vedação. Conservados em lugar, protegido da luz em temperatura ambiente (entre 20 °C e 35 °C), separando a porção a ser administrada aos animais da porção a ser submetida à avaliação da estabilidade. A **Figura 2** demonstra aparência visual dos géis.

Figura 2: Avaliação visual das formulações géis de Carbopol 940[®] e cloridrato pilocarpina (48 h iniciais).



Legenda: GC – Gel de carbopol; GCP5 – Gel de carbopol com pilocarpina 5%; GCP15 – Gel de carbopol com pilocarpina 15%.

FONTE: Autora, 2014.

2.2 Estudo de estabilidade do gel

Antes de iniciar o estudo de estabilidade, submeteram-se os géis ao teste de centrifugação. Utilizando 5g das amostras e centrifugou (Centribio, modelo 80-2B) a 3.000 rpm durante 30 minutos para detectar qualquer sinal de instabilidade como a separação espontânea em duas fases (gel e líquido). Em seguida, foi realizado o teste de estabilidade preliminar analisando parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químicos (pH e viscosidade).

Avaliação da estabilidade preliminar

Previamente foi verificado o comportamento da formulação mediante variações extremas de temperatura, com o objetivo de acelerar possíveis reações de incompatibilidade entre seus componentes. Para isto, as mostras dos géis foram submetidas a seis ciclos alternados de 24 h a 45±2 °C em estufa (Quimis, modelo – Q316M2) e 24 h a - 5±2 °C em refrigerador (Eletrolux – DC35A) durante 12 dias e outras três amostras permaneceram em

temperatura ambiente (entre 20 °C e 35 °C). Analisou os parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor), valor de pH e viscosidade antes e após os ciclos. Depois deste período, as amostras foram submetidas também ao teste de centrifugação (Centrífuga – Centribio® - 3.000 rpm durante 30 min), utilizando 5 g de amostra. Mediante a qualquer sinal de instabilidade, os géis seriam submetidos a uma reformulação.

- **Parâmetros organolépticos**

Observou as características organolépticas de cada amostra (aspecto, cor e odor) verificando a ocorrência de modificações. O teste foi realizado através da inspeção visual.

- **Determinação de pH**

A análise de pH dos géis foi realizada em pHmetro digital (PHTeK®), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, determinadas pelo próprio equipamento. O eletrodo foi inserido diretamente no gel veículo, gel de pilocarpina a 5% e gel de pilocarpina a 15%, respectivamente a temperatura ambiente (25 °C) para verificação do potencial hidrogeniônico das formulações. As leituras foram feitas em triplicata.

- **Viscosidade**

Para avaliação da viscosidade foi empregado o viscosímetro rotativo micro processado (Quimis, modelo Q-860M21) que consiste, basicamente, na medição do requerido para rodar um fuso imerso no gel. Utilizou aproximadamente 50 g de amostra, suficiente para manter a harte do sistema imerso na amostra e padronizou o “*spindle 2*”, em quatro velocidades (6, 12, 30 e 60 rpm) o que permite medir eletronicamente a força de torção já convertida em viscosidade. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção no infravermelho por transformada de Fourier foram obtidos pelo método de refletância total atenuada (ATR). As amostras do cloreto de pilocarpina (fármaco sólido), do gel veículo (carbopol) e dos géis de carbopol com pilocarpina 5% e 15% foram processadas e avaliadas quanto às bandas de intensidade dos grupos moleculares do cloridrato de pilocarpina. Para esse procedimento utilizou um Espectrômetro FTIR (Vertex

70), na faixa de 4000 – 600 cm^{-1} , com 32 scans. Todos os espectros obtidos foram processados usando software Origin 8.0.

Quantificação do fármaco

A quantificação da pilocarpina no gel foi realizada por espectrometria de massas ESI, Ion Trap (AmaZon SL, Bruker Daltonics, Bremen – Alemanha), no modo positivo, com -1500 V para capillary, -200 V para End Plate Offset, fluxo de gás de 6 L/min e temperatura de 200 °C. O espectrômetro de massa foi operado em modo de monitorização de reação múltipla (MRM) com hélio como gás de dissociação induzida por colisão (CID), a uma pressão de 12 psi. Cada amostra de gel estava na concentração de 50 ng/ μL em solução aquosa de ácido fórmico 2% e o volume injectado foi de 5 μL , com 0,3 mL/min de fluxo total.

2.3 Avaliação da atividade biológica

- **Animais**

Foram utilizadas 40 ratas Wistar-Hannover, com noventa dias de vida e pesando aproximadamente 200 gramas, oriundas do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí, no qual foram acompanhadas desde o nascimento. Dois dias após o parto, os filhotes foram separados em machos e fêmeas, baseados na distancia do orifício anogenital, e mantidos juntamente com a mãe durante o período de aleitamento. A seguir, as fêmeas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos com 10 animais cada: grupo I (controle positivo - estro permanente), grupo II (controle negativo - veículo), III (gel de carbopol com pilocarpina 5% – GCP5), grupo IV (gel de carbopol com pilocarpina 15% – GCP15). O grupo I foi submetido ao estro permanente e os grupos II, III e IV após 90 dias foram castradas. Os animais foram transportados para o laboratório do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) e mantidos cinco por gaiolas plásticas, 49x34x16 de dimensões, com tampa gradeada de metal. Receberam alimentação padrão (Labicil[®], São Paulo) e água "ad libitum", em temperatura de 25 °C \pm 2 °C, mantidas por uso de ar-condicionados, com ciclos claro/escuro de 12 horas, com luz das 6:00 às 18:00 horas.

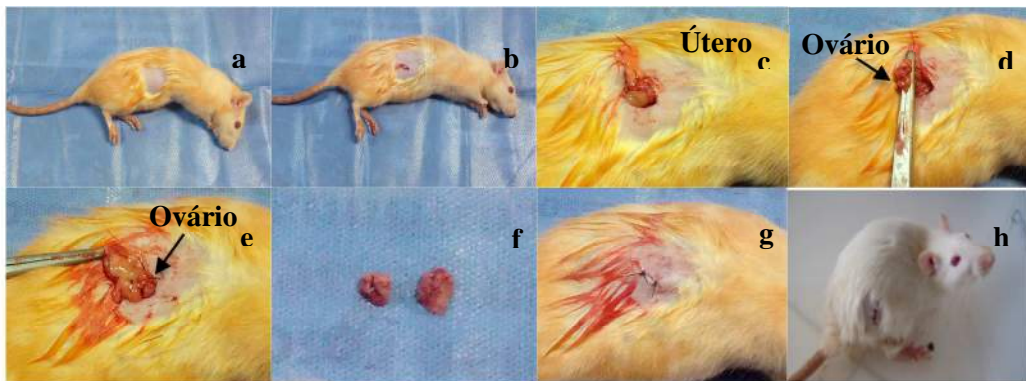
O modelo de animal utilizado, ratas castradas, foi baseado nas parametrizações estabelecidas por Dos Santos e colaboradores (2008), os quais definiram o uso de ratas virgens da espécie Wistar-Hannover enquanto o modelo de ratas em estro permanente seguiu os critérios de Silva, (1997). O protocolo experimental e procedimentos, utilizado neste estudo, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI N° 0107/12 e N° 012/14), e está em conformidade com as Normas do regimento Interno do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

- **Cálculo da amostra**

Foi realizado o cálculo de amostragem utilizando o software Bioestat 5.0[®] para a realização de um teste não paramétrico. O resultado deste determinou uma amostra mínima de 5 (cinco) animais para cada grupo.

- **Ratas castradas**

Todos os animais dos grupos II, III, IV foram castrados para eliminar a produção de estrogênios e mimetizar o estado pós-menopausa. Utilizou como medicação pré-anestésica acepromazina 1 mg/kg por via intramuscular. Sob anestesia por via intra peritoneal com 60 mg/kg de cetamina associada a 2,5 mg/kg de midazolam, monitorando a função respiratória para evitar depressão acentuada, foi realizada a tricotomia, através de uma lâmina de barbear, na região dorsal entre o rebordo costal inferior e a coxa, fazendo a assepsia desta região com PVPI (polivinil-pirrolidona-iodo). Os animais foram submetidos a uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão de 2 a 3 cm na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários (**Figura 3**), seguida de síntese da parede abdominal por planos. Ao final do procedimento os animais foram colocados em gaiolas individuais para recuperação pós-cirúrgica para ação analgésica e antiinflamatória foi administrado ácido acetil salicílico 100 mg/kg a cada 4 horas por dois dias.



Legenda: a = tricotomia e assepsia; b = incisão; c = exposição do corno uterino; d = isolamento ovário direito; e = isolamento ovário esquerdo; f = ovários extirpados; g = sutura da pele; h = 1º dia pós-operatório.

FONTE: Autora, 2014.

Figura 3: Procedimento cirúrgico de castração das ratas sob anestesia de Cetamina 60mg/Kg associado a Midazolam 2,5 mg/Kg.

- **Rata em estro permanente**

O modelo de rata em estro permanente dos animais do grupo I foi obtido através da aplicação subcutânea, na região dorso-cervical, de 1,25 mg de propionato de testosterona diluído em 0,1 mL de óleo de milho no segundo dia de vida (**Figura 4**). Após 90 dias de vida, as ratas em estro permanente foram selecionadas para pesquisa excluindo algumas ratas que não apresentaram estado de estro permanente (n=3). O estado de estro permanente foi confirmado nos animais com base na presença da obliteração do terço distal da vagina (WRENN *et al.*, 1969; SILVA, 1997), queratinização do epitélio vaginal, a principal característica do estro permanente, e também pela presença de ovários policísticos, por ocasião da autópsia. Em seguida, os animais foram eutanasiados, por meio da indução do pentobarbital sódico, 60 mg.kg⁻¹ por via intraperitoneal, e suas vaginas foram removidas para confecção de lâminas histológica com coloração hematoxilina e eosina (HE).



FONTE: Autora, 2014.

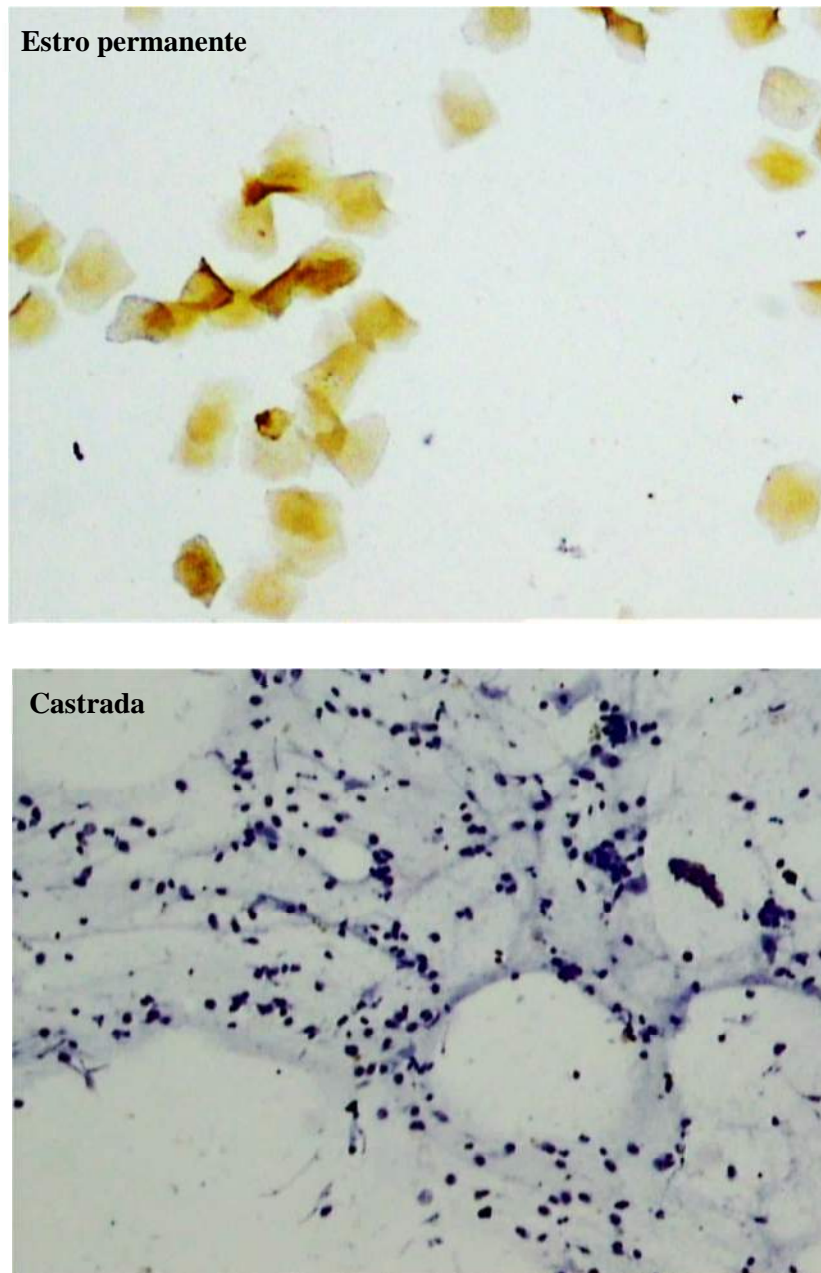
Figura 4: Administração subcutânea na região dorso cervical, no segundo dia de vida, de 12,5 mg/mL de propionato de testosterona para indução de estro permanente.

Protocolo experimental

Trinta dias após a castração, o exame citológico do esfregaço vaginal (**Figura 5**), corado pela técnica de *Papanicolaou*, foi realizado para caracterizar o estado hipoestrogênico das ratas, por meio da identificação celular foram excluídas algumas ratas que não apresentaram hipoestrogenismo após castração (n=6). O **Apêndice C** apresenta fotomicrografias do exame citológico que auxiliou na confirmação das ratas em estado pós-menopausal. Após confirmação do estado de atrofia vaginal, administrou diariamente os géis com veículo e contendo o princípio ativo de pilocarpina a 5% e 15%, baseado em concentrações sugerido pelos Ahlenius e Larsson (1985) e Andersen e colaboradores (2004), por via vaginal, no grupo II (0,1 mL/dia de GC, veículo), grupo III (71,4 µg/kg/dia em 0,1 mL de GCP5) e grupo IV (214,3 µg/kg/dia 0,1 mL GCP15) durante 14 dias consecutivos. Ao final do experimento, no 15º dia, todos os animais do grupo I, II, III e IV foram eutanasiadas com solução de pentobarbital sódico, administrado por via intraperitoneal, na dose 60 mg.kg⁻¹, conforme protocolo Fundação Osvaldo Cruz, (DE PAIVA; MAFFILI; FIOCRUZ, 2012)). Com isso, fez-se a remoção da vagina por meio de uma incisão abdominal longitudinal, que foram fixadas em solução formalina neutra tamponada a 10% por 12-24 h

para confecção dos blocos de parafina e lâminas histológicas com coloração de HE e posterior análise morfológica e morfométrica.

Figura 5: Fotomicrografias da citologia vaginal de rata em estro permanente e castrada (controles positivo e negativo, respectivamente), corada pela técnica de papanicolau, para confirmação do estado de persistência estrogênica e hipoestrogenismo (magnificação original 100x).



FONTE: Autora, 2014.

Screening Hipocrático

O *screening* hipocrático foi observado apenas nos grupos II, III, IV após 30 minutos através da administração tópica via vaginal, durante 14 dias de tratamento, com os géis GC (veículo), GCP5 e GCP15, diariamente. Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais, descrito por Brito (1994) – **Anexo E**: a) Estado de consciência e disposição (aparência geral, frêmito vocal e irritabilidade); b) Coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, marcha e reflexo de endireitamento); c) Tônus muscular (tônus das patas, tônus do corpo, força para agarrar e ataxia); d) Reflexos corneal; e) Atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsões, estimulações, fenômeno de “*Straub*”, sedação, hipnose e anestesia); f) Atividade do sistema nervoso autônomo (lacrimação, ptoses, micção, defecação, piloereção, hipotermia e respiração). Os sinais qualificados na observação comportamental e exame clínico sistemático dos animais foram registrados em protocolo impresso, e modificações, com a lista de sinais a serem investigados, (MALONE; ROBICHAUD, 1983) – **Anexo E**. Além disso, durante todo o experimento foi observado e registrado, a cada 72 horas, parâmetros fisiológicos como a massa corporal, consumo de água, de ração e de excretas (fezes e urina) dos animais. As médias da massa corporal foram obtidas pela evolução ponderal dos animais por grupo. O consumo de água foi avaliado através de mamadeiras graduadas. O consumo de ração foi analisado pela diferença entre peso de ração inicial disponibilizada e o peso restante após 72h. De forma semelhante às excretas foi avaliada padronizando quantidade inicial de maravalha e pesando após o prazo determinado tendo como resultado a diferença entre os dois valores.

Análise morfológica

Após a remoção das vaginas, o material foi fixado durante 12-24 h em formalina neutra tamponada a 10%. Em seguida, foram desidratados em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 100%), num período de 90 minutos cada, diafanizado, três vezes, em xilol (Xileno-C₈H₁₀-Vetec, Sigma) para clarificação. A impregnação e inclusão em parafina (Paraplast, Sigma) foram efetuadas em duas incubações durante 1 hora a 60 °C, para confecção dos blocos. O processamento do material foi realizado automaticamente utilizando o Histotécnico Oma® (Modelo DM-20). As vaginas foram

incluídas em porções centrais posicionados mais externamente no bloco. Após confecção dos blocos, foram realizados em média 15 cortes no eixo longitudinal de 4 μm de espessuras no micrótomo (Leica, RM-2125) após chegar em nível da porção da vagina. As secções foram colocada em lâminas de vidro, fosca e lapidada, para microscópio, e submetidas a colorações histológicas com hematoxilina-eosina (HE). Finalizando com uma lamínula sobre os cortes e fixadas com 2 gotas de Tisse-tek[®]. A análise descritiva do epitélio vaginal foi feito com o objetivo de se observar a estratificação celular, atipias celulares e a presença ou não de queratinização.

Análise morfométrica

Para o estudo morfométrico as vaginas foram avaliadas utilizando imagens digitalizadas pelo programa de software ImageLab[®]. As medidas histométricas do epitélio vaginal foram realizadas no sistema de contagem de luz microscópica (Nikon Eclipse E-400, Tokyo, Japão) conectado a uma câmara de vídeo (Câmera digital Samsung SCC-131, Seoul, Korea) com captura de imagem e transmissão para um monitor equipado com programa de software ImageLab[®] (Softium Informática LTDA, São Paulo, Brasil) com ampliação original de 100x. A espessura epitelial do canal vaginal de cada animal foi definida como a média de quatro medições lineares (em μm), realizado em áreas mais espessas do epitélio vaginal.

Análise estatística

Todos os dados da histometria foram apresentados sob a forma de média e desvio padrão. Para a análise da comparação da espessura do epitélio vaginal dos quatro grupos foi utilizado o teste não paramétrico de modelo de regressão linear robusta para comparar a espessura média destes quatro grupos. As espessuras foram consideradas como o inverso da variância em cada grupo para controlar a heterocedasticidade. Um nível de 5% de significância foi adotado para concluir todos os testes. Os resultados do *screening* hipocrático foram expressos como $\text{media} \pm \text{Desvio Padrão}$ e analisados por meio de análise de variância (ANOVA), seguindo Newman–Keuls ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de mulheres na menopausa está aumentando em todo o mundo. Em um estudo realizado em seis países, aproximadamente 45% das mulheres na menopausa relataram sintomas que ocorrem como resultado de falência ovariana (SIMON *et al.*, 2013). Na atrofia vaginal, a consequência principal é a secura vaginal e a dispareunia, é o sintoma mais comum, afetando entre 10 e 50% de mulheres na menopausa (LEVINE *et al.*, 2008; BEDELL *et al.*, 2014).

Em mulheres sobreviventes de câncer de mama, a prevalência de secura vaginal é de 61,5%, maior que a encontrada na população em geral de mulheres na menopausa (STIKA, 2010). Isso nos encorajou a tentar identificar uma alternativa não-estrogênicos para melhorar a atrofia e secura vaginal nestas mulheres por meio de uma formulação semissólida gel através da administração vaginal que é habitualmente usada por mulheres para reposição hormonal. O princípio ativo cloridrato de pilocarpina foi incorporada em uma base gel de Carbopol[®] 940 uma vez que este é um gel hidrofílico de baixo custo com a vantagem adicional de permanecer no local por um longo período de tempo, devido às suas propriedades mucoadesivas (BONACUCINA *et al.*, 2004; MERCLIN *et al.*, 2004).

O estudo de estabilidade preliminar de uma formulação semissólida fundamenta-se na realização do teste na fase inicial da evolução do produto, que utiliza condições extremas de temperatura com a finalidade de acelerar possíveis reações entre seus constituintes e o aparecimento de sinais de instabilidade que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto (ANVISA, 2014).

Durante o estudo de estabilidade na avaliação preliminar dos géis, os resultados foram considerados satisfatórios, permaneceram estáveis além dos 12 dias de observação. Não foi observados sinais de instabilidades como sinerese (separação espontânea homogêneo em duas fases: gel e líquido), alteração da cor, do odor, da aparência e da homogeneidade. Segundo Singh e colaboradores (2008), as características organolépticas guardam relação com a integridade e a qualidade das amostras e por serem teste visual devem ser associados a outros métodos que aumente a garantia do produto. A composição do gel foi considerada adequada para experiência descartando a possibilidade de uma reformulação. A **Tabela 2** descreve os perfis dos géis, por meio da análise das características citados no t_0 e t_{12} .

Para a avaliação do parâmetro de pH observou pouca variação durante o período de estudo de estabilidade entre os géis. No entanto, há uma diferença não significativa do pH do géis com ativo em relação gel veículo (**Tabela 2**). Zoppi e colaboradores (2012) relatam em

seus experimentos que existe interação entre pilocarpina e o Carbopol, em solução e no estado sólido, esta relação é favorecida pela ligação eletrostática entre o grupo amino do fármaco e o grupo ácido carboxílico do Carbopol. Este fenômeno pode está relacionado com a redução do pH do gel de pilocarpina.

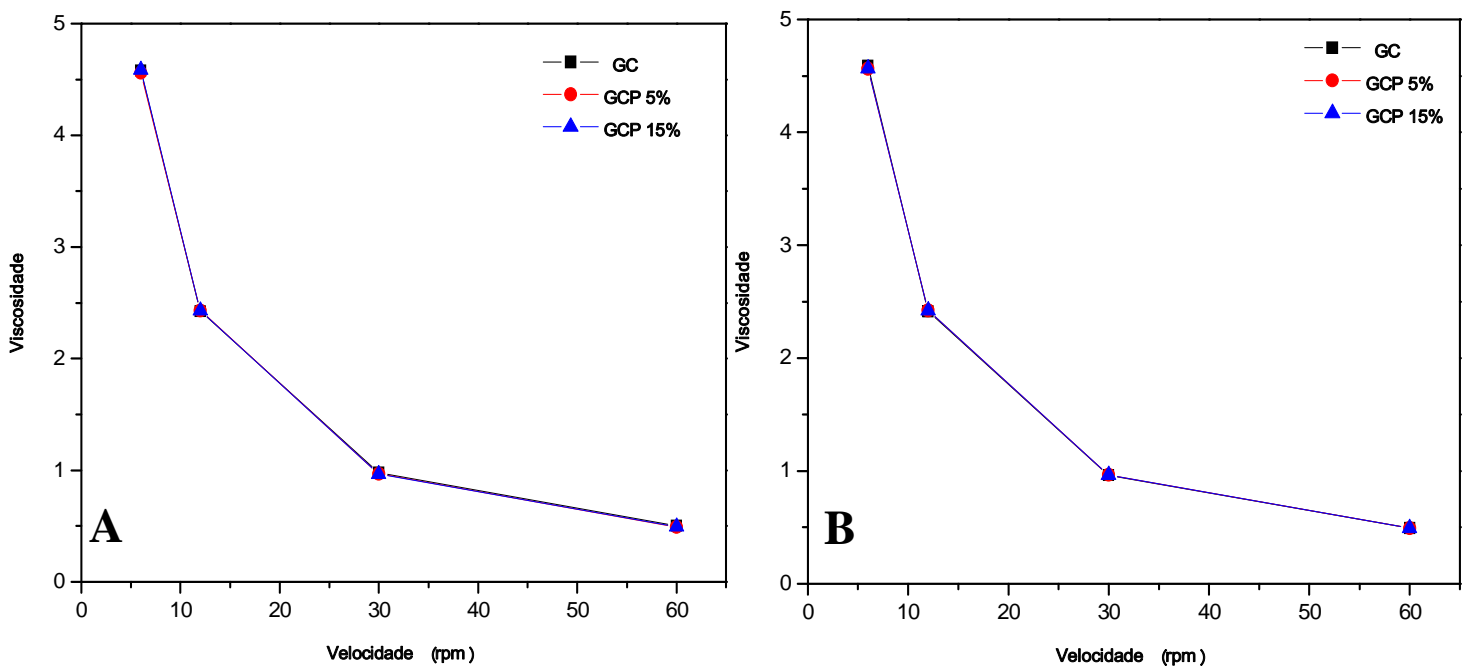
Tabela 2: Resultados da avaliação da estabilidade preliminar do gel de Carbopol[®] 940 e dos géis de Carbopol[®] com pilocarpina nas concentrações de 5% e 15%.

Amostra/Tempo	Aspecto	pH	Viscosidade	Centrifugação
GC (tempo zero)	Homogêneo, translucido, incolor	5,45	2.11	–
GC (final 6 ciclos)	Conservou as características iniciais	5,43	2.11	Não houve nenhuma instabilidade perceptível
GCP5 (tempo zero)	Homogêneo, translucido, incolor	4,65	2.11	–
GCP5 (final 6 ciclos)	Conservou as características iniciais	4,54	2.11	Não houve nenhuma instabilidade perceptível
GCP15 (tempo zero)	Homogêneo, translucido, incolor	4,57	2.11	–
GCP15 (final 6 ciclos)	Conservou as características iniciais	4,53	2.12	Não houve nenhuma instabilidade perceptível

Legenda: GC = gel de carbopol (veículo); GCP5 = gel de carbopol com pilocarpina a 5%; GCP15 = gel de carbopol com pilocarpina a 15%.

FONTE: Autora, 2014.

O controle da viscosidade dos géis no estudo da estabilidade é útil, também, para monitorar indiretamente a degradação química e estabilidade física, as alterações a nível molecular podem produzir mudanças na viscosidade, além das condições de temperatura (THOMPSON, 2006). A **Figura 6** demonstra que as amostras em estudo, nos tempos T_0 e T_6 , apresentam comportamento típico de fluídos não newtonianos possivelmente pseudoplásticos, visto que a viscosidade diminuiu com o aumento da tensão de cisalhamento aplicada e não existe relação linear entre o aumento do cisalhamento e a força aplicada sobre o fluido. A diminuição da viscosidade juntamente com o possível comportamento pseudoplástico observado nos ensaios demonstraram que as formulações tendem a possuir uma facilidade maior na sua espalhabilidade devido à diminuição da viscosidade ao se aplicar certa força, e ao mesmo tempo possui a propriedade de permanecer no local da aplicação sem escorrer (SIDDIG *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2010).



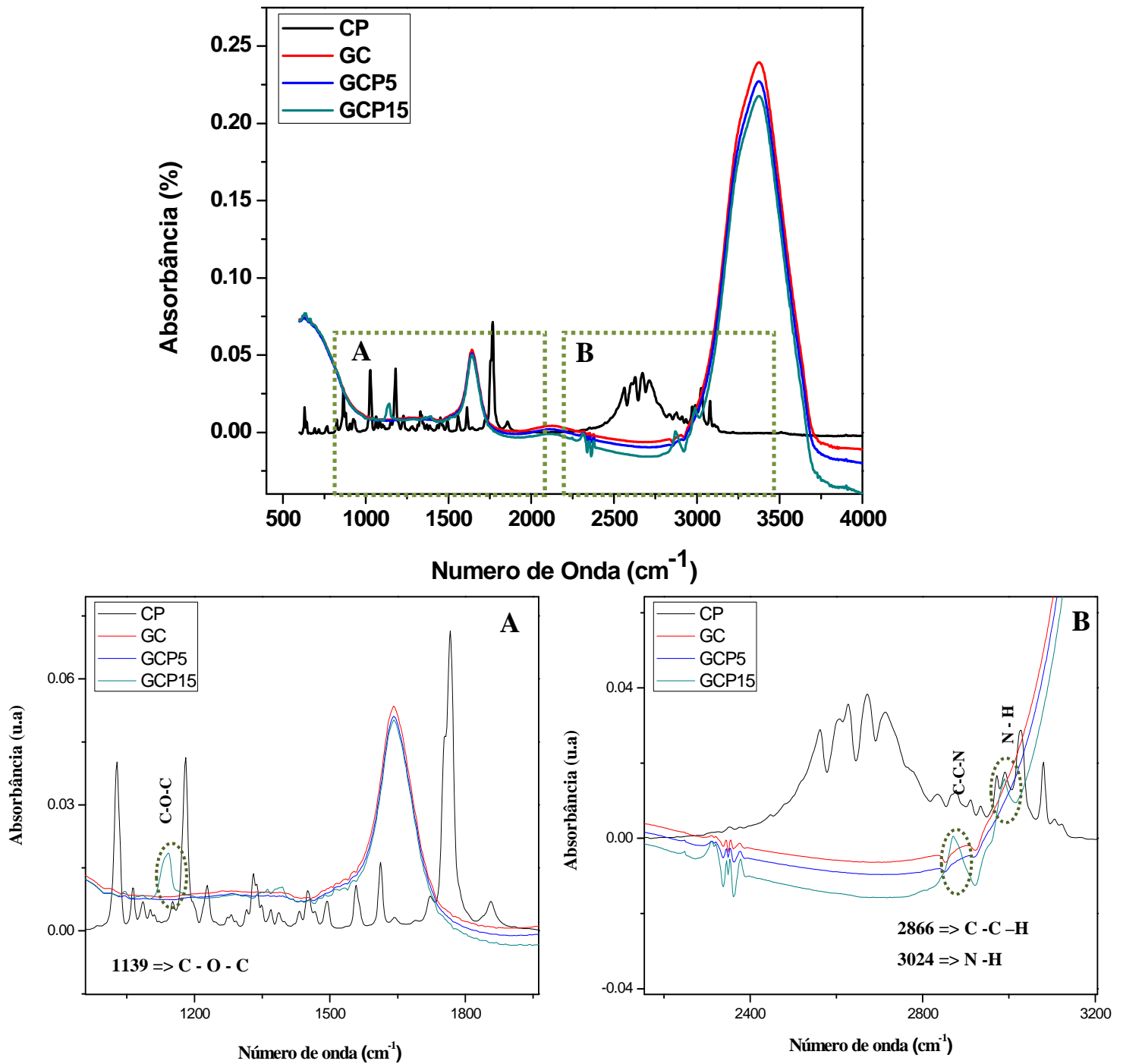
FONTE: Autora, 2014.

Figura 6: Curva da viscosidade para as formulações GC (gel veículo), GCP5 (gel carbopol com pilocarpina 5%) e GCP15 (gel carbopol com pilocarpina 15%) em relação à velocidade no tempo t_0 (A) e t_6 (B) durante o estudo de estabilidade.

Rechia (2010) descreve durante o estudo de estabilidade a estrutura polimérica do gel em virtude da temperatura elevada, que as amostras foram submetidas, possivelmente pode estar relacionado com a quebra das ligações cruzadas e das pontes de hidrogênio existentes na estrutura do carbopol resultando a perda de viscosidade e impactando na característica dos géis. No entanto, no presente estudo as amostras do gel de carbopol-pilocarpina, na temperatura de 45 ± 2 °C, não houve variação da viscosidade, já que os mesmos permaneceram estáveis durante todo o estudo estabilidade.

A **Figura 7** apresenta o espectro do cristal do cloridrato de pilocarpina sólido, do gel de carbopol e dos géis de carbopol com pilocarpina nas concentrações 5% e 15%. À espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) possui uma vasta aplicação na identificação dos compostos por possuir propriedades físico-químicas características. Isso permite detectar modificações na forma e na posição dos picos de absorbância por meio do espectro vibracional dos diferentes grupos funcionais ou das moléculas livres da molécula de fármacos livres ou complexados. No entanto, essas interações podem mudar ou alterar as intensidade das bandas e aumentar as vibrações equivalentes das matérias primas constituintes. Às técnicas de FTIR são muito utilizadas na ocorrência de interações por serem determinações rápidas e precisas, mesmo as informações obtidas por este ensaio apresentando limitações (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

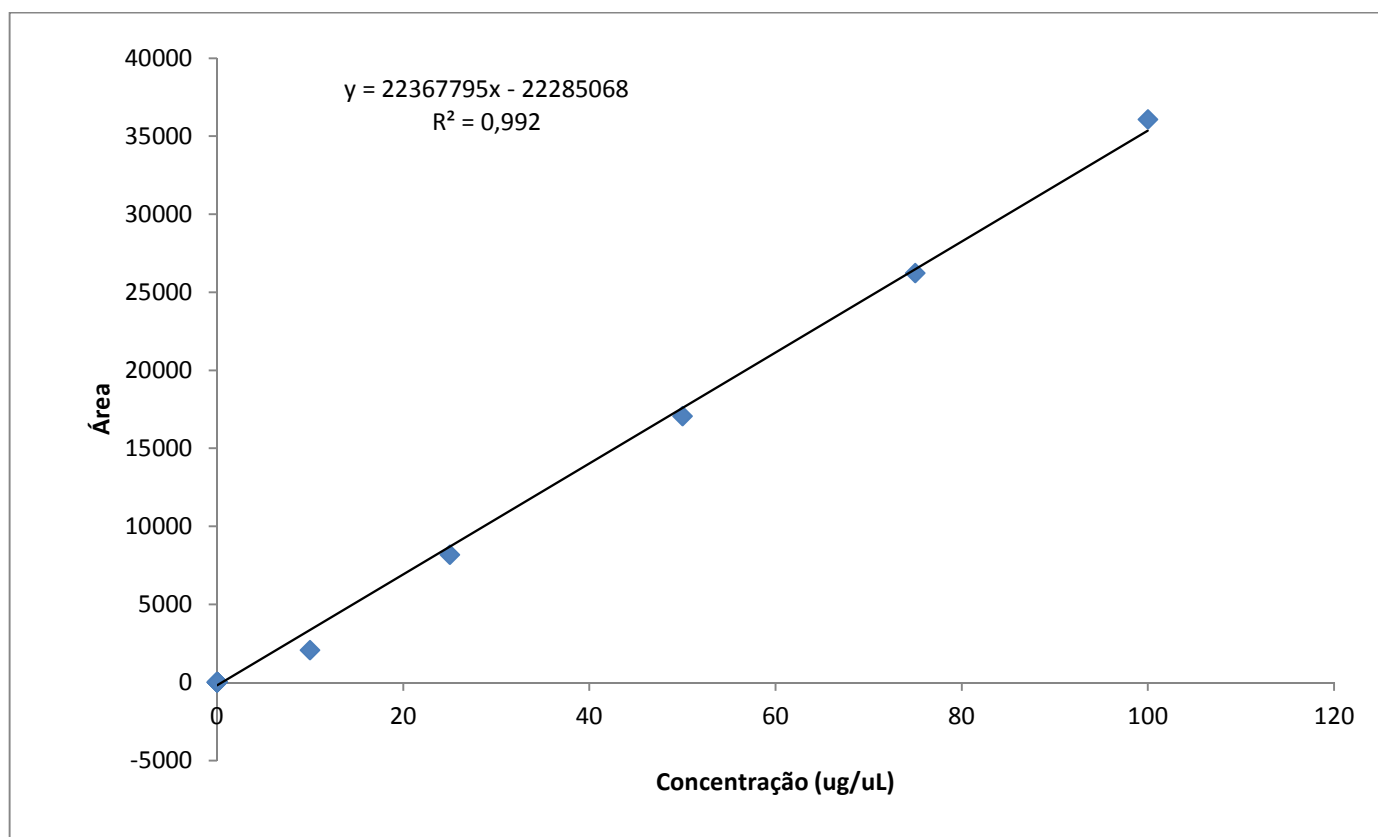
Zoppi e colaboradores (2012) demonstram em seu estudo que a diferenças das FTIR da pilocarpina pura e da pilocarpina – carbopol ocorre devido formação de um complexo resultante da interação do grupo amina (pilocarpina) e grupo carbolixa (carbopol). Em relação aos espectros do gel com pilocarpina e a pilocarpina sólida observa um pequeno desvio da banda do espectro (**Figura 7A**), isso pode está relacionado ao complexo, como supracitado, entre suas estruturas. As principais bandas detectadas no FTIR do cloridrato de pilocarpina no GCP15, gel mais concentrado, foram absorção em 1139 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C-O-C; em 2866 cm^{-1} a banda expõe estiramento assimétrico da ligação C-C-H e em 3024 cm^{-1} apresenta vibração de ligação simples N-H (**Figura 7B**). O fato de o GCP5 não ter mostrado nenhum deslocamento ou banda pode está relacionado à pequena intensidade de estiramento molecular.



FONTE Laboratório de Física - UFPI, 2014.

Figura 7: Espectro de FTIR de sobreposição do cristal cloridrato de pilocarpina sólida (CP), gel de carbopol (GC), gel de carbopol com pilocarpina 5% (GCP5), gel de carbopol com pilocarpina 15% (GCP15) e ampliações A e B.

O doseamento do cloridrato de pilocarpina, **Figura 8**, nos géis nas concentrações de 5% e 15% foi de 94,58% e 95,24%, respectivamente. O método de espectrometria de massas ESI utilizado foi satisfatório utilizando a curva de linearidade do cloridrato de pilocarpina e a equação da reta ($y = 22367795x - 22285068$) para quantificação. A curva de linearidade do princípio ativo cloridrato de pilocarpina apresentou coeficiente de correlação ($R^2 \geq 0,99$), atendendo o requisito da resolução de conformidade da ANVISA Resolução 899 de 2003 (BRASIL, 2003). A utilização da espectrometria de massa se deve a capacidade de identificar e quantificar os analitos, com alto grau de seletividade e sensibilidade, fornecendo informações de massa molecular bem como a estrutura do analito (HOFFMANN; STROOTBART, 2007).

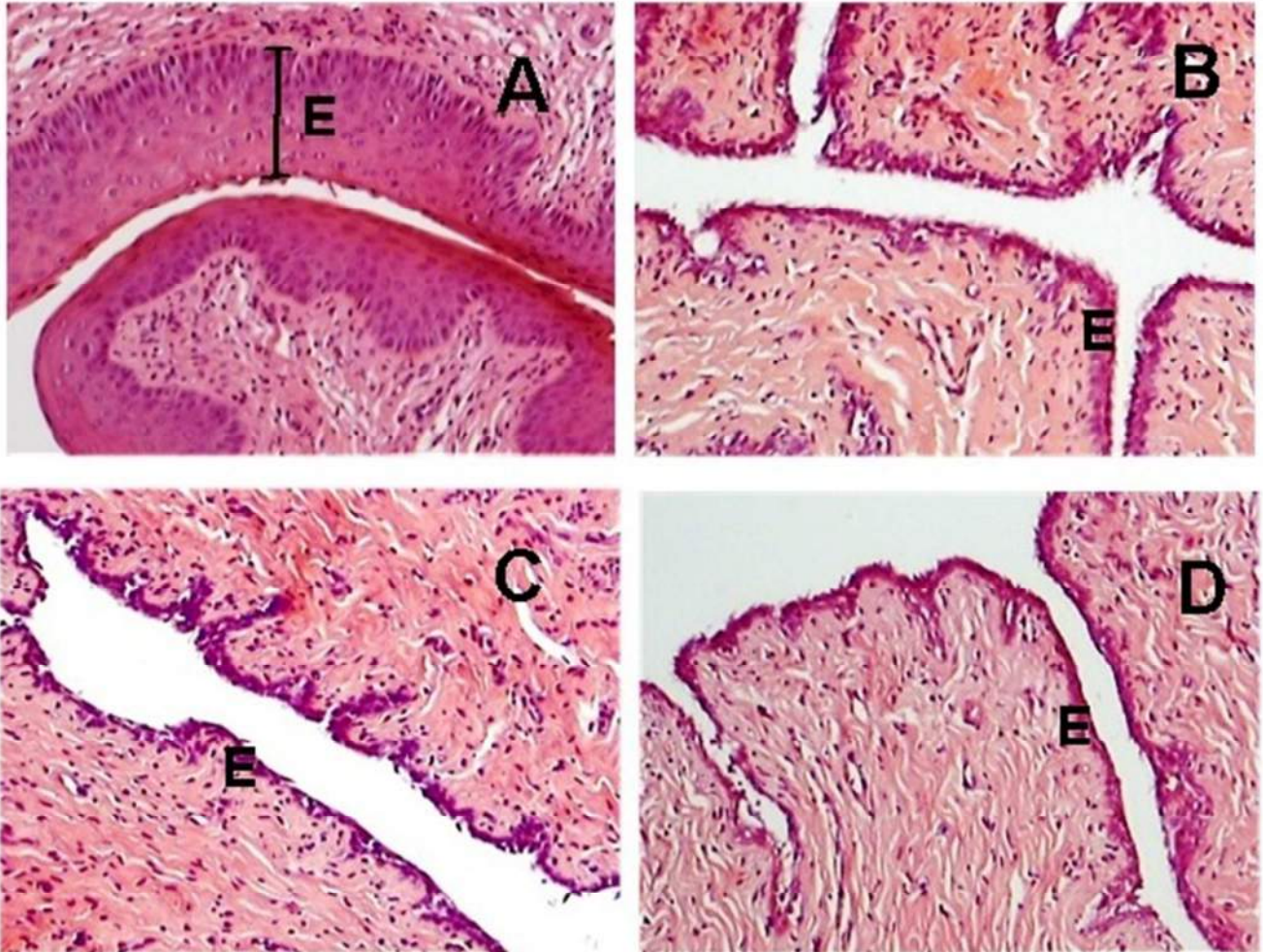


FONTE: Laboratório de Biotecnologia - UFPI, 2014.

Figura 8: Curva de linearidade do princípio ativo cloridrato de pilocarpina no gel.

Na análise da citologia vaginal foi observada em microscópio óptico em magnificação original de 100 x para o reconhecimento das camadas celulares, que no epitélio escamoso ou pavimentoso vaginal, quando maduro, possui quatro camadas celulares, basais, parabasais intermediárias e superficiais. No estado hipoestrógeno, apresentado pelas ratas castradas predominam as células profundas basais e parabasais no epitélio vaginal. O esfregaço atrófico, comum no climatério, pode ser caracterizado pela ausência de células epiteliais e conificadas e predominância de leucócitos (LUSTOSA, 2002; MARCONDES, 2002). No estado de estro permanente, cujas ratas mimetizam síndrome dos ovários policísticos, que estão sob constante estímulo estrogênico podem estar presentes todas as quatro camadas com predomínio de queratina nas células superficiais (MARCONDES, 2002; KIM *et al.*, 2006). O estudo das células epiteliais descamadas pelo *swab* possibilitou identificar o estágio hormonal na qual pode ser encontrada a rata.

Os resultados morfológicos grupo I, ratas em estro permanente (controle positivo) que receberam apenas água e alimentação *ad libitum*, apresentam durante análise histológica, espesso tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado (**Figura 9A**). A indução desta epitelização foi identificada pela primeira vez por Barraclough (1961) observando o período de maior sensibilidade hipotalâmica em ratas pela indução de estro permanente por meio da injeção subcutânea de 12,5 mg/mL de propionato de testosterona durante os primeiros 5 dias de vida. Quando adultos esses animais apresentam anovulação crônica, esterilidade, ovários policísticos, excesso de peso e agressividade quando em contato com os machos (BARRACLOUGH, 1961; NOGUEIRA; DA SILVA, 2009). Os animais castrados dos grupos II (veículo), III e IV (experimentais) apresentaram, durante a análise histológica, espessura do epitélio celular da vagina não queratinizada (**Figura 9B, C, e D**) pouca desenvolvida com uma fina camada parabasal de células. Fato esse, caracterizado pela ausência de estrógenos de acordo com Dos Santos, 2008. Contudo, não foi observada necrose nem atipias celulares em geral.



Legenda: A = Grupo I, estro permanente (controle positivo); B = Grupo II, controle negativo (veículo); C = Grupo III (gel de carbopol com pilocarpina a 5%); D = Grupo IV (gel de carbopol com pilocarpina a 15%). A figura (A) apresenta espessa camada de epitélio vaginal e (B, C e D) fina camada parabasal de epitélio vaginal (magnificação original 100x)

FONTE: Autora, 2014.

Figura 9: Fotomicrografias de corte histológico da vagina mostrando o epitélio vaginal (E) de rata em estro permanente e ratas castradas tratadas com os géis (veículo e contendo pilocarpina nas concentrações 5% e 15%).

Na análise morfométrica da espessura do epitélio vaginal expresso na **Tabela 3**, revelou através do teste não paramétrico de regressão linear robusta, que não há diferença estatística entre as médias dos grupos II, III e IV ($p = 0,0809$) e a espessura média do epitélio vaginal das ratas do grupo I é diferente dos demais grupos considerando $p < 0,0001$ apresentando resultado significativamente maior. O epitélio vaginal varia consideravelmente em espessura dependendo da faixa etária da mulher (THOMAS *et al.*, 2003) na pós-menopausa a espessura epitelial encontra-se bem reduzida. Assim a análises morfométrica foi usada pra avaliar os efeitos do gel de pilocarpina no tecido epitelial da vagina porque constitui um método simples e prático (SILVA *et al.*, 2007).

Tabela 3: Espessura do epitelial vaginal de ratas em estro permanente tratadas com veículo, grupo I controle positivo, e ratas castradas II, III e IV com tratamento de gel veículo e de pilocarpina (Média \pm Desvio Padrão).

GRUPOS				
	I	II	III	IV
	192,83	31,58	35,41	27,74
	170,48	32,60	25,62	26,95
	202,19	30,47	26,33	29,15
	191,85	29,65	26,86	32,00
	214,22	32,23	26,15	27,80
	196,26	29,67	29,46	32,48
	197,89	30,08	28,41	33,81
			27,04	28,27
				30,39
MÉDIA \pm DP	195,10 \pm 12,23	30,90 \pm 1,14	28,16 \pm 2,98	29,84 \pm 2,30

Modelo linear de regressão robusta

I > II, III e IV ($p < 0,0001$)

II x III x IV ($p = 0,0809$)

Pelo *screening* hipocrático, dentre todos os parâmetros acompanhados (**Anexo E**), não houve o aparecimento de sinais e sintomas de toxicidade, embora o aumento da diurese e fezes diarreicas entre os grupos experimentais de gel de pilocarpina prevaleceu durante todo o período de tratamento. A diurese foi mais intensa, principalmente, no grupo IV (maior concentração de pilocarpina) observando que, em seguida, alguns minutos a administração do gel os animais urinavam espontaneamente, sem nenhum esforço. O aumento significativo, entre os grupos das excretas (**Tabela 4**) provavelmente está relacionado a ação da pilocarpina nos receptores muscarínicos do subtipo M₃ existentes na bexiga e parede intestinal (MIURA, 2009). Segundo estudos de Gornitsky (2004) expostos banco de dados Dailymed (COBLENTZ, 2014), em dois ensaios clínicos com humanos, randomizados duplo-cego, controlados com placebos, os efeitos adversos mais frequentes com uso de cloridrato de pilocarpina foram sudorese, náuseas, rinite, diarreia, calafrios, rubor, incontinência urinária, tonturas e astenia com intensidades diretamente proporcional a dose administrada.

Tabela 4: Hábitos fisiológicos de ratas castradas tratadas com gel veículo e gel de pilocarpina via vaginal durante 14 dias consecutivos (Média ± Desvio Padrão).

Grupo	Peso Corporal (g)	Água (mL)	Ração (g)	Excretas (g)
GC (n=7)	220,0±9,81	68,89±5,0	31,89 ± 4,71	30,72 ± 1,09
GCP5 (n=8)	226,5±8,71	61,39±3,64	40,73±0,29	35,73 ± 5,02*
GCP15 (n=9)	230, ± 10,82	63,33±2,23	39,69 ± 1,17	49,90 ± 3,90*

Legenda: GC = gel de carbopol (veículo); GCP5 = gel de carbopol com pilocarpina a 5%; GCP15 = gel de carbopol com pilocarpina a 15%. * p<0,05
 FONTE: Autora, 20014

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, pode ser sugerido que a formulação do gel apresentada é estável. Contudo, não houve alteração na morfologia e espessura do epitélio vaginal das ratas castradas exposta ao gel de pilocarpina nas concentrações 5% e 15%.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. R. N. **Efeito do tamoxifeno na expressão da proteína Ki-67 na vagina de ratas castradas**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências da saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Piauí. 2011.

AHLENIUS, S.; LARSSON K. Central muscarinic receptors and male rat sexual bahaviorfacilitation by oxotremorine but not arecoline or pilocarpine in methscopolamine pretreated animals. **Psychopharmacology**, v. 87, p. 127-129, 1985.

ANDERSEN, M. L.; BIGTNOTTO, M.; PAPALE, L. A; TUFIK, S. Cholinergic mechanisms in cocaine-induced genital reflexes in paradoxical sleep-deprived male rats. **Phamacology biochemistry and behavior**, v. 77, p. 525-531, 2004.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 8 ed. São Paulo: Premier, p. 775, 2007.

BARRACLOUGH, C. A. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. **Endocrinology**, v. 68, p. 62-67, 1961.

BEDELL, S.; NACHTIGALL, M.; NAFTOLIN, F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, p. 225-236, 2014.

BERNARDI, R.; PERIN, C.; BECKER, F. Z.; RAMOS, G. Z.; LOPES, L. R.; PIRES, M. Effect of pilocarpine mouthwash on salivary flow. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 105-110, 2002.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio

de 2003 – **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: Anvisa, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004.

BRITO, A. R. M. S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas (Brasil): Ed. Unicamp, p. 122, 1994.

CARVALHO, F. C.; BARBI, M. S.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; NETTO, F. M.; GREMIAO, M. P. D. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 430-439, 2010.

CASTELO-BRANCO, C.; CANCELO, J. C.; VILLERO, J.; NOHALES, F.; JULIÁ, M. D.; Management of pos-menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. **The European Menopause Journal**, v. 52, p. 46-52, 2005.

CLARKE, R. Animals models of breast câncer. In: HARRIS, J. R.; LIPPMAN, M. E.; MORROW, M.; HELLMAN, S. **Diseases of the Breast**, Philadelphia, Lippincott-Raven, p. 225 – 244, 1996.

COBLENTZ SOCIETY. **Pilocarpine Hydrochloride**. Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899. Disponível em: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=8db0db4f-55ad-46b2af50e71b4a763aaa>>. Acessado em: 11 jul.2014.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 01-09, 2009.

DA SILVA B. B.; MOITA, D. S.; PIRES, C. G.; SOUSA-JÚNIOR E. C.; DOS SANTOS A. R.; COSTA, P. V. L. Evaluation of insulin-like growth factor-I in postmenopausal women with breast cancer treated with raloxifene. **International Seminars in Surgical Oncology**, v. 4, p. 18-21, 2007.

DENNERSTEIN, L.; DUDLEY, E. C., HOPPER, J. L., GUTHRIE, J. R., BURGER, H. G. A prospective population-based study of menopausal symptoms. **Obstetrics & Gynecology**, v. 96, p. 351 – 358, 2000.

DE PAIVA, F. P.; MAFFILI, V.V. **Curso de Manipulação de animais de laboratório. Fundação Osvaldo Cruz, FIOCRUZ, Salvador, BA, 2012.**

DOS SANTOS, A. R.; LOPES-COSTA, P.V.; DE CASTRO, J.C.; CAMPOS, I.C.; BORGES, R.S.; PIRES, C.G.; *et al.* Morphometric analysis of the urethra of castrated female rats treated with tamoxifen. **Maturitas**, v. 59, p. 275-280, 2008.

DOS SANTOS, L.G.; LOPES-COSTA, P.V.; DOS SANTOS, A.R.; FACINA, G.; DA SILVA B. B. Bcl-2 oncogene expression in estrogen receptor-positive and negative breast carcinoma. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 29, p. 459-461, 2008.

DRUGSATFDA. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>>. Acesso em: 13 Set 2014.

FERREIRA, A. O.; **Formas farmacêuticas semi-sólidas**. São Paulo: ANFARMAG, p. 02-03, 2006.

GORNITSKY, M.; SHENOUDA, G.; SULTANEM, K, KATZ, H.; HIER, M.; PRETO, M.; VELLY, A.M. Estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo de pilocarpina para salvar a função da glândula salivar durante a radioterapia de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Cirurgia Oral, Medicina Oral, Patologia Oral, Oral Radiologia e Endodontia**, v. 98, n. 1, p. 45-52, 2004.

GUARISI, T.; PIINTO NETO, A. M.; OSIS, M. J.; PEDRO, A. O.; PAIVA, L. H.; FAÚDES, A. Urinary incontinence among climacteric brazilian women: household survery. **Revista Saúde Pública**, v. 35, p. 428-435, 2001.

HOFFMANN, R.; STROOTBART, V. **Mass spectrometry: priciples and applications**, 3 Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience, p. 502, 2007.

KAMEL, H. K.; Postmenopausal osteoporosis: etiology, current diagnostic strategies, and nonprescription interventions. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 12, p. 04-09, 2006.

KIM, N.N.; STANKOVIC, M.; ARMAGAN, A.; CUSHMAN, T.T.; GOLDSTEIN, I.; TRAISH, A.M. Effects of tamoxifen on vaginal blood flow and epithelial morphology in the rat. **BMC Womens Health**, v.6, p. 14-24. 2006.

HARRIS, G. W.; LEVINE, S. Sexual differentiation of the brain and its experimental control. **Journal of Physiology**, v. 181, p. 379-400, 1965.

LE VEQUE, G., HENDRIX, S. Oral pilocarpine to treat vaginal xerosis associated with chemotherapy-induced amenorrhea in pre-menopausal women. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 14, p. 80-99, 2004.

LEVINE, K.B., WILLIAMS, R.E., HARTMANN, K.E. Vulvovaginal atrophy is strongly associated with female sexual dysfunction among sexually active postmenopausal women. **Menopause**, v. 5, n. 4, p. 661-666, 2008.

LOPRINZI, C. L.;BALCUEVA, E. P.; LIU, H.; SLOAN, J. A.; KOTTSCHADE, L. A.; STELLA, P. J.; CARLSON, M. D.; MOORE, D. F.; ZON, R. T.; LEVITT, R.; JASLOWSKI, A. J. A fase III randomized, double – blid, placebo – controlled study of pilocarpine for vaginal dryness: North central Cancer treatment group study NO4CA. **Supportive Oncology**, v. 9, n. 3, p. 105-112, 2011.

LUSTOSA, A.B.; *et al.* Citologia Hormonal do Trato Urinário Baixo e da Vagina de

Mulheres na Pós-menopausa, antes e durante Estrogenioterapia Oral e Transdérmica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 9, p. 573-577, 2002.

MAC BRIDE, M. B.; RHODES, D. J.; SHUSTER, L. T. Vulvovaginal atrophy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, p. 87-94, 2010.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natural products general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of Pharmacology**, v. 8, p. 127-147, 1983.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.

MERCLIN, N.; BRAMER, T.; EDSMAN, K. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as vehicle. **Journal Controlled Release**, v. 98, p. 57-65, 2004.

MINKIN, M. J.; MAAMARI, R.; REITER, S. Improved compliance and patient satisfaction with estradiol vaginal tablets in postmenopausal women previously treated with another local estrogen therapy. **International Journal of Women's Health**, v. 5, p. 133-139, 2013.

MIURA, L. M. C. V. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e a avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmaniana, antiviral, antiesquistossoma e sialagoga**. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) – Faculdade de Biologia, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, p. 126, 2009.

MONTES, G. S.; ALONSO, C. R.; HUNTER, J. C.; MONTORO, L. S.; RODRIGUES, D. A.; Investigações relacionadas com as transferências embrionárias em ratas: Colpocitologia exfoliativa. **Gac. Vet.**, v. 40, p. 175-90, 1978.

NETO, C. B.; SUGAYA, N. N. Tratamento da xerostomia em pacientes irradiados na região

da cabeça e do pescoço. **Revista Biociências**, v. 10, n. 3, p. 147-151, 2004.

NOGUEIRA, L. T.; DA SILVA, B. B. Effects of raloxifene on the mammary epithelium off emale rats in persistente estrus. **Gynecological Endocrinology**, v. 25, n. 6, p. 357-361, 2009.

ORTMANN, O.; LATTRICH, C. The treatment of climacteric sympptoms. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 109, n. 17, p. 316-324, 2012.

PANDIT, L.; OUSLANDER, J. G. Post-menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 314, n. 4, p. 228-31, 1997.

RECHIA, L. M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de gel a base de extrato de *Melissa Officinalis* L.** Florianópolis, 2010. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

RUSSO, J. e RUSSO, I.H. Biology of disease: biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Laboratory Investigation**, v. 57, p. 112-37, 1987.

SIDDIG, M. A.; RADIMAN, S.; JAN, L. S.; MUNIANDY, S. V. Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucohone (APG) surfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 276, p. 15-21, 2006.

SIMON, J. A.; KOKOT-KIEREPA, M.; GOLDSTEIN, J.; NAPPI, R.E. Vaginal health in the United States: results from the Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes survey. **Menopause**, v. 20, p. 1043-1048, 2013.

SINGH, M. V.; DIAS, L.; BALDINI, N. F. B.; SILVEIRA, D.; ZAGO, R. Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da estabilidade de gel com extrato aquoso de camomila para uso bucal. **Revista Brasileira de Farmácia**, p. 123-427, 2008.

SILVA, B.B. **Estudo morfológico e morfométrico da mama de ratas em estro-permanente tratadas com tamoxifeno e com estrogênios conjugados.** Tese apresentada à

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Medicina, São Paulo, 1997.

SILVA, B. B.; LOPES-COSTA, P. V.; ROSAL, M. A.; PIRES, C. G.; DOS SANTOS, L. G.; GOTIJO, J. A.; ALENCAR, A. P.; DE JESUS SIMÕES, M. Morphological and morphometric analysis of the Adrenal cortex of androgenized female rats. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 64, p. 44-48, 2007.

SIIMÕES, M. J.; MORA, O. A. Aspectos morfométricos e ultra-estrutural dos macrófagos presentes no endométrio de rata durante o ciclo estral. **Revista Brasileira Biologia**, v. 44, n. 2, p. 197-201, 1984.

STIKA, C.S. Atrophic vaginitis. **Dermatology Therapy**, v. 23, n.5, p. 514-522, 2010.

STURDEE, D.W.; PANAY, N. International Menopause Society Writing Group. Recommendations for the management of postmenopausal vaginal atrophy. **Climacteric**, v. 13, n. 6, p. 509-22, 2010.

TOMPSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed Editora, p. 345-367, 2006.

THOMAS, A.; CORREA, M. M.; KUMAR, K. R. Clinical profile and cervical cytomorphology in symptomatic postmenopausal women. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 176-179, 2003.

VIVINO, F.B.; AL-HASHIMI, I.; KHAN, Z.; LEVEQUE, F.G.; SALISBURY, R.D. P. L.; TRAN-JOHNSON, T.K.; MUSCOPLAT, C.C.; TRIVEDI, M.; GOLDLUST, B.; GALLAGHER, S.C. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with *Sjögren* syndrome: a randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. P92-01 Study Group. **Archives of Internal Medicine**, v.159, p.174-181, 1999.

ZOPPI, A; LINCK, Y. G.; MONTI, G. A.; GEOVESE, D. B.; KAIRUZ, A.F.J.; MANZO, R.

H.; LONGHI, M. R. Studies of pilocarpine:carbomer intermolecular interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, p. 252-250, 2012.

WRENN, T. R.; WOOD, J. R.; BIRTMAN, J. Oestrogen reponses of rats neonatally sterilized with steroids. **Journal of Endocrinology**. v. 45, p. 415-420, 1969.

WISEMAN, L.R, FAULDS, D. Oral pilocarpine: a review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia. **Drugs**, v. 49, p. 143–155, 1995.

WYNN, R.L. Oral pilocarpine (Salagen)—arecently approved salivary stimulant. **General Dentistry**, v. 44, n. 26, p. 9–30, 1996.

ANEXOS E APÊDICES

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal da UFPI do projeto “Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica tópica contendo pilorcapina para avaliação do efeito na atrofia vaginal de ratas”.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 21 de Fevereiro de 2014.

Ilmo.

Prof. Dr. BENEDITO BORGES DA SILVA
Departamento: Materno e Infantil - CCS/UFPI

Senhor Pesquisador

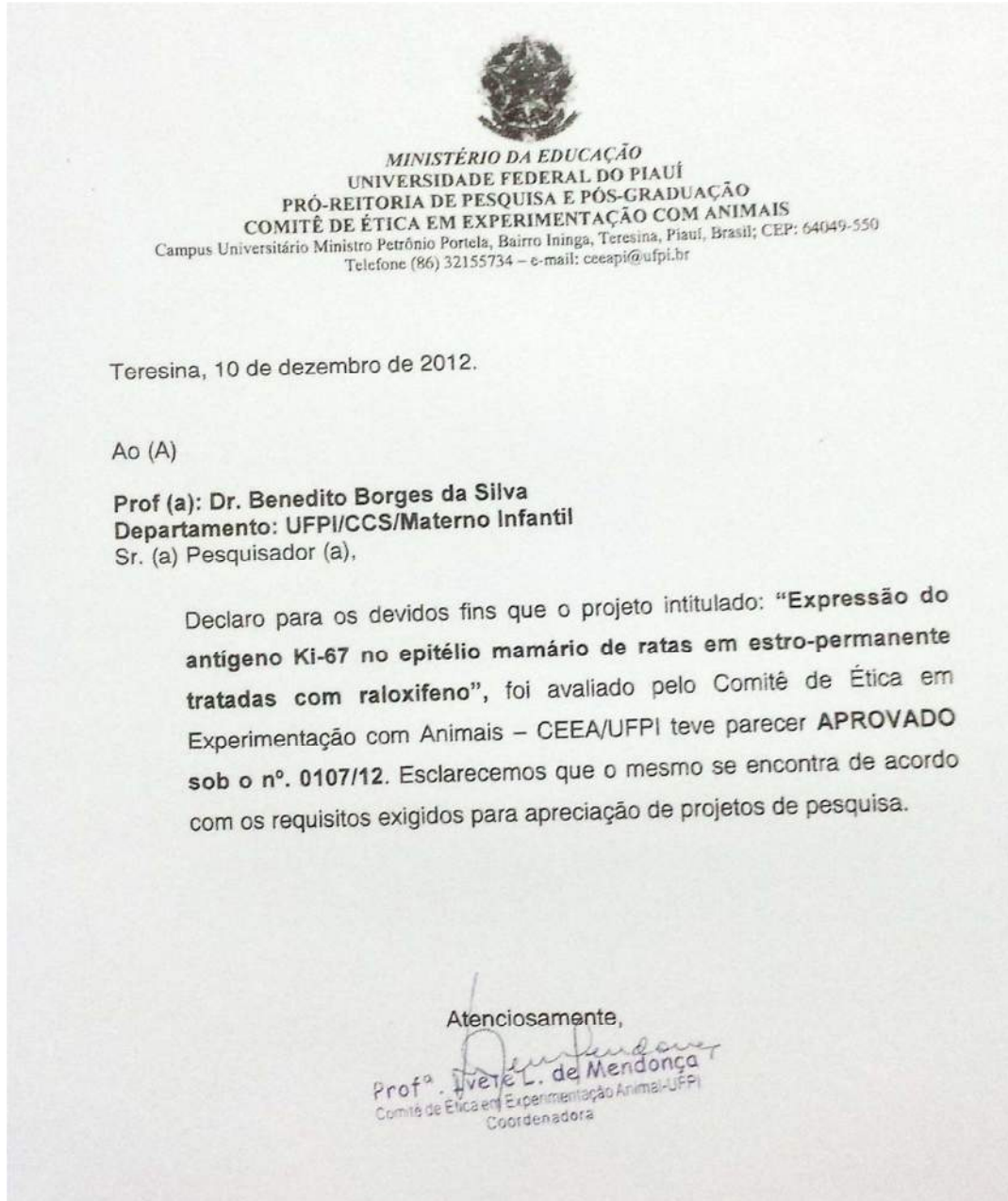
Em reunião na presente data (21 de Fevereiro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **012/14**, o projeto de pesquisa intitulado “**Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica tópica contendo Pilocarpina para tratamento da secura vaginal**”, sob a sua responsabilidade. Informamos que no projeto serão usados 30 *Rattus norvegicus albinus* (fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

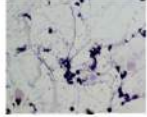

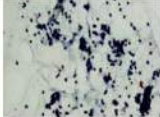
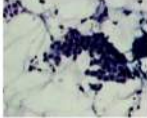
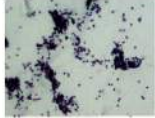
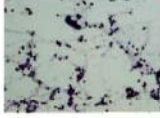


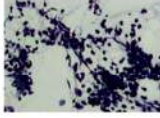
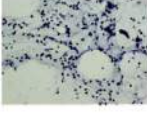

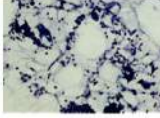
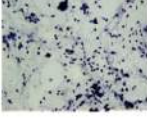








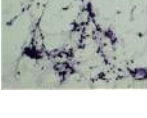
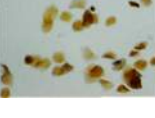
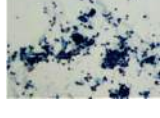

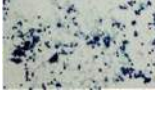
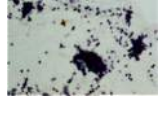
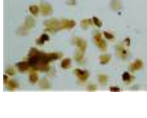

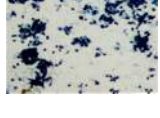
Atenciosamente,


Prof^a Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora




ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal da UFPI do projeto “Expressão do antígeno Ki-67 no epitélio mamário de ratas em estro-permanente tratadas com raloxifeno.”



APENDICE C: Fotomicrografias da citologia vaginal dos animais, coradas pela técnica de papanicolau, para inclusão ou exclusão em estado de hipoesrogenismo.

Grupo II (controle negativo-GC)	Grupo III (GCP5)	Grupo IV (GCP15)
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		

ANEXO C – Artigo submetido BMC Complementary and Alternative Medicine.

2091115213147090 Effect of a gel containing pilocarpine on vaginal atrophy in castrated rats    Entrada x

 **BioMed Central Editorial** <editorial@biomedcent>   

Article title: Effect of a gel containing pilocarpine on vaginal atrophy in castrated rats

MS ID : 2091115213147090

Journal : BMC Complementary and Alternative Medicine

Dear Prof da Silva

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

Best wishes,

The BMC Complementary and Alternative Medicine Editorial Team

Tel: [+44 \(0\) 20 3192 2013](tel:+442031922013)

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>

ANEXO D – Artigo publicado na Revista Geintec.



POLÍMEROS MUCOADESIVOS PARA USO VAGINAL: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

POLYMERS MUCOADHESIVES FOR VAGINAL USE: A TECHNOLOGICAL FORECASTING

Cristina Alves de Sousa Lages¹; Jurandy do Nascimento Silva¹; Edson Cavalcanti da Silva Filho², Lívio César Cunha Nunes¹; Benedito Borges da Silva¹.

Resumo

Novos sistemas capazes de melhorar a liberação de fármacos vêm sendo bastante estudados e com destaque especial para os sistemas que envolvem polímeros mucoadesivos que atuam na mucosa vaginal. Estudos recentes mostram que a vagina também é uma importante via para administração de medicamentos e apresenta vantagens como menor exposição à ação sistêmica e efeitos colaterais. A prospecção teve como objetivo a busca e análises de patentes nas bases European Patent Office (EPO), World Intellectual Property Organization (WIPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO), State Intellectual Property Office Of The P.R.C. (SIPO) e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. A base do WIPO mostrou resultados significativos para todos os termos buscados, apresentado um somatório de 231 pedidos de depósitos de patentes para todos os termos pesquisados e 16 depósitos para os termos específicos da análise, sendo encontrado entre 2005 a 2012 e apresentando igual classificação internacional (A61K), as demais bases não apresentaram nenhum resultado para esses mesmos termos.

Revista GEINTEC – ISSN: 2237-0722. São Cristóvão/SE – 2014. Vol. 4/n.1/ p.622-631
D.O.I.: 10.7198/S2237-0722201400010016

622

ANEXO E - Protocolo experimental das avaliações do teste “Screening Hipocrático”.

Os parâmetros a serem observados de acordo com a tabela de Brito (1994) e segundo explicações de alguns padrões comportamentais descritos por Malone e Robichaud (1983), são os seguintes:

Frêmito vocal	Emissão de ruídos frequentes
Irritabilidade	Reação ao indivíduo ao lado ou ao manuseá-lo
Resposta ao toque	Direcionar algo em direção ao animal e esperar ele desviar
Aperto de cauda	Apertar a ponta da cauda e puxá-lo
Contorção	Animal faz movimento sinuoso
Trem osterior	Pata posterior abaixada
Endireitamento	5, pode ser posicionado em único lado; 6, pode ser posicionado em qualquer dos lados igualmente bem; 7, pode ser posicionado de costas tão bem como qualquer lado; 8, não pode ser despertado, estando de costas, com um beliscão no dedo da pata traseira.
Tônus corporal	Puxar a pele pra ver se ela retorna ao normal
Força de agarrar	Fazê-lo segurar na grade e puxá-lo pela cauda
Ataxia	1, detecção de perda de coordenação; 2, dificuldade de andar reto mas prosseguir alinhado; 3 não conseguir andar reto, com curso errante; 4, não conseguir qualquer curso
Reflexo auricular	Mexer a orelha com a pinça

Reflexo corneal	Levar em direção ao olho a pinça para ver se eles tentam fechá-los.
Tremores	Verificar se eles tremem, comparando com o normal.
Convulsões/ crises epilépticas	São medidas subjetivamente de 1 a 4 de acordo com a severidade e duração
Estimulações	Movimentos repentinos
Straub	Cauda levantada como uma bandeira
Hipnose	Dormir agrupados
Anestesia	1- resposta lenta quando uma agulha é pressionada no pé; 2-sem reação à agulha firme pressionada; 3- sem reação com a penetração da agulha.
Lacrimação	Comparar com a normal
Ptose	1- notável fechamento do olho; 2- metade fechado; 3-quase completamente fechado; 4- fechado completamente
Micção	Considerar subjetivamente a frequência e quantidade
Defecação	Verificar alteração na consistência das fezes
Piloereção:	A gradação é analisada subjetivamente através da ereção e do aspecto do pelo
Hipotermia	Tocar o animal e verificar se a temperatura é baixa em relação ao controle
Respiração	Comparar com o normal
Cianose	Observar a alteração da cor de orelhas, patas e da mucosa oral.
Número de mortos	Anotar a cada verificação dos comportamentos

ANEXO F – *Screening* hipocrático por análise comportamental.“*Screening Hipocrático*”

Nº DA FICHA _____ DATA: ___/___/___ HORA: ___:___ AVALIADOR: _____

DROGA: _____ DOSE: _____ VIA DE ADMINISTRAÇÃO: _____

FÊMEAS										
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Atividade geral										
Frênito vocal										
Irritabilidade										
Resposta ao toque										
Aperto de cauda										
Contorção										
Endireitamento										
Tônus corporal										
Força de agarrar										
Ataxia										
Reflexo corneal										
Tremores										
Convulsões										
Straub										
Hipnose										
Anestesia										
Lacrimação										
Ptose										
Micção										
Defecação										
Piloereção										
Respiração										
Nº de mortes										



Nº DA FICHA:

DATA:

HORA: ___:___

AVALIADOR: _____

FÊMEAS										
___mg/kg (v.v)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Peso corporal (g)										
Água (mL)										
Ração (g)										
Excretas (g)										

