

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO
***IN VITRO* E PERMEAÇÃO *IN VIVO* DE SISTEMAS**
MICROESTRUTURADOS CONTENDO CAFEÍNA

DANIELA PAULA LONGO

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA VIRGÍNIA COSTA SCARPA

ARARAQUARA – SP
2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO
***IN VITRO* E PERMEAÇÃO *IN VIVO* DE SISTEMAS**
MICROESTRUTURADOS CONTENDO CAFEÍNA

DANIELA PAULA LONGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA VIRGÍNIA COSTA SCARPA

ARARAQUARA – SP
2006

Candidata: Daniela Paula Longo

Título da dissertação: “Obtenção, caracterização e estudos de liberação *in vitro* e permeação *in vivo* de sistemas microestruturados contendo cafeína”.

A comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 07/08/2006, considera a candidata:

REPROVADA

APROVADA

Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco

1º examinador

Prof. Dr. Marcos Antônio Córrea

2º examinador

Profa. Dra. Maria Virgínia Costa Scarpa

Orientadora/Presidente

Daniela Paula Longo

“A felicidade ou infelicidade do homem dependem unicamente de sua forma de pensar e aceitar as coisas. Se o ser humano enfrentar tudo com coragem e boa vontade, aprendendo e pesquisando cada coisa, poderá ampliar cada vez mais o seu interesse, a ponto de entender que a vida é um tesouro inesgotável.”

Nidai Sama

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, João e Francisca.

“Mestres da vida iluminaram meu caminho para eu chegar até aqui...”

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por sua constante presença em minha vida e por iluminar meu caminho nos momentos difíceis.

Aos **meus pais**, João e Francisca, que além da vida me deram amor, apoio e orientação. Que muitas vezes renunciaram seus sonhos a favor dos meus e que permitiram que cada etapa da vida se transformasse em uma conquista. Eu simplesmente amo vocês.

Ao meu **noivo e melhor amigo**, Daniel, pelo amor, carinho, paciência, compreensão e companheirismo. Amor, obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus queridos **irmãos**, Neide e Nilton, aos meus **cunhados** Valdeci e Ericléia, aos meus **sobrinhos** - Mariane, Ewerton, Gabrielle e João Vitor (*in memoriam*) - e à **toda minha família**, por estarem presentes em todos os momentos dessa caminhada. Minha vida não seria a mesma sem cada um de vocês.

À família do Daniel, que passou a ser a **minha segunda família**, pelo carinho, confiança e apoio. Principalmente à Danielzinho e Dudu, que me fizeram ver a vida com outros olhos.

Aos **meus amigos** Janaine, Elisa, Gabi (*in memoriam*), Juliana e Maryson. Apesar da distância são amigos que estão presentes no meu coração e que jamais me esquecerei.

Aos **amigos e vizinhos**, Janaina, Ediana, Aline, Murilo, Dú, Natália, Paulo, Thiago, André e Adelino, pela maravilhosa companhia e amizade. E à **amiga** Dona Amélia, que foi uma mãezona durante o período que passei em Araraquara.

À todos os **meus amigos de laboratório** - Carol, Karen, Cris, Luana, Nelson, Marlus, Gustavo, Fernando, Rubiana, Giseli, Tina, Helen, Daniele, Ketylin, Andreia, Arnóbio, Ednir, Thalita, Bruna, Tiago, Cinara, Kélia, Taís, Mara, Vanessa - pelo companheirismo e amizade.

E as **estagiárias** Thereana, Thaís e Márcia, pela amizade e imensa ajuda.

À **minha orientadora**, Profa. Virgínia, pela orientação, incentivo, oportunidade, amizade, confiança e conhecimentos transmitidos.

À **mais do que amiga**, Maria de Fátima, pelos favores, ensinamentos e companheirismo durante todos os trabalhos no laboratório. Fatiminha, nunca me esquecerei de você!

À **minha banca de qualificação e defesa**, Profa. Renata Lopez, Prof. Marcos Côrrea e Profa. Valéria Robles, por terem ajudado a melhorar este trabalho com suas valiosas discussões.

Aos **funcionários do biotério**, Celso e Osvaldo, pela ajuda com os porquinhos.

Aos **professores e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pela disposição e ajuda nos momentos em que precisei.

Ao **professor João Aristeu e a Zenaide** técnica da disciplina de parasitologia pela disponibilidade e ajuda com as análises microscópicas.

Ao **professor Paulo Sérgio Cerri e ao Luis Potenza** técnico da disciplina Histologia e Embriologia pela imensa ajuda no processamento do material e análise histológica.

Ao **Chico da seção de apoio acadêmico** pela disponibilidade e ajuda com as fotos.

Aos **funcionários da Secretaria da Pós-graduação e da Biblioteca** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp.

A **Capes, CNPq, FAPESP e UNESP** pelo apoio financeiro.

A **todos aqueles que, mesmo não mencionados, contribuíram para a realização desse sonho. Muito obrigada!**

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Pele	11
1.2. Sistemas microestruturados	16
1.2.1. Sistemas microemulsionados.....	18
1.2.2. Mesofases líquido-cristalinas liotrópicas.....	20
1.3. Componentes da formulação	22
1.3.1. Tensoativo	22
1.3.2. Fase oleosa.....	24
1.4. Caracterização física.....	25
1.4.1. Índice de refração	25
1.4.2. Densidade	25
1.4.3. Comportamento reológico	26
1.4.4. Condutividade eletrolítica	28
1.4.5. Microscopia de luz polarizada	28
1.5. Celulite.....	29
1.6. Cafeína.....	34
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Materiais empregados.....	37
3.2. Métodos	38
3.2.1. Ensaios preliminares com a cafeína.....	38
3.2.1.1. Determinação do ponto de fusão	38
3.2.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	38
3.2.1.3. Determinação do espectro de absorção da cafeína nas regiões ultravioleta e visível.....	38
3.2.1.4. Determinação das curvas analíticas da cafeína.....	39

3.2.2. Preparo das formulações.....	39
3.2.3. Diagrama de fases.....	40
3.2.4. Caracterização física das formulações selecionadas	41
3.2.4.1. Microscopia de luz polarizada.....	41
3.2.4.2. Determinação do índice de refração	42
3.2.4.3. Determinação da densidade relativa.....	42
3.2.4.4. Determinação da condutividade eletrolítica	43
3.2.4.5. Estudo do comportamento reológico.....	44
3.2.5. Determinação da solubilidade da cafeína nos componentes da formulação	44
3.2.6. Determinação da solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5	45
3.2.7. Determinação da solubilidade da cafeína nas formulações C, D, H e K.....	45
3.2.8. Determinação do coeficiente de partição óleo/água.....	46
3.2.9. Liberação in vitro	47
3.2.10. Estudos de permeação cutânea in vivo e avaliação histológica.....	51
3.2.11. Análise estatística	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Estudos preliminares com a cafeína	54
4.1.1. Determinação do ponto de fusão	54
4.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	54
4.1.3. Determinação do espectro de absorção da cafeína nas regiões ultravioleta e visível	55
4.1.4. Determinação das curvas analíticas da cafeína.....	56
4.2. Diagrama de fases.....	60
4.3. Formulações selecionadas para a caracterização física	63
4.4. Caracterização física das formulações.....	64
4.4.1. Microscopia de luz polarizada.....	64
4.4.2. Determinação do índice de refração	69
4.4.3. Determinação da densidade relativa.....	71
4.4.4. Determinação da condutividade eletrolítica	74
4.4.5. Análise do comportamento reológico.....	75
4.5. Determinação da solubilidade da cafeína nos componentes da formulação.....	82
4.6. Determinação da solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5	83
4.7. Determinação da solubilidade da cafeína em formulações C, D, H e K	83

4.6. Determinação do coeficiente de partição óleo/água	84
4.7. Perfil da liberação in vitro	84
4.8. Estudos de permeação cutânea in vivo e avaliação histológica.....	91
5. DISCUSSÃO	95
6. CONCLUSÕES	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

RESUMO

A mistura de óleo, água e tensoativo é capaz de formar estruturas e sistemas variados, dependendo das características e da proporção dos componentes utilizados. Sistemas microestruturados, como cristais líquidos e microemulsões, são utilizados para encapsular fármacos e substâncias ativas em produtos farmacêuticos e cosméticos. O objetivo desse trabalho foi desenvolver sistemas microestruturados para a incorporação da cafeína com finalidade de uso tópico para otimizar o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide. A mistura direta de PPG-5-Ceteth-20 (tensoativo), adipato de dibutila (fase oleosa) e água em diferentes proporções possibilitou a obtenção de formulações com formas de estruturação variadas, como microemulsão, emulsão e mesofases líquido-cristalinas. As formulações obtidas foram caracterizadas por meio de microscopia de luz polarizada, determinação de índice de refração, densidade relativa e condutividade e comportamento reológico. Estudos de solubilidade mostraram que os sistemas foram capazes de solubilizar cerca de 1,5% de cafeína. Estudos de liberação *in vitro*, que utilizaram modelo de célula de difusão em sistema estático do tipo Franz adaptada ao equipamento de dissolução indicaram que as formulações apresentaram características de sistemas reservatórios de liberação prolongada. Para o estudo de permeação *in vivo* foram utilizados suínos machos, Landrace x Large White, submetidos ao tratamento com formulação acrescida ou não de cafeína. Fragmentos de pele e hipoderme foram retirados para a análise histológica. A formulação com características de cristal líquido de fase hexagonal foi eficaz em aumentar a permeação cutânea à cafeína, facilitando assim sua ação. A cafeína aplicada desta forma fez com que houvesse uma redução significativa da espessura da hipoderme. Assim, o sistema desenvolvido é adequado para uso tópico, atua como promotor de permeação e garante a eficácia da cafeína no tratamento da celulite.

Palavras-chave: microemulsão, cristal líquido, cafeína, hidrolipodistrofia ginóide, permeação cutânea.

ABSTRACT

Oil, water and surfactant mixture may form a variety of structures and phases accordingly to the characteristics and the ratio of the used components. Microcompartmented systems as liquid crystals and microemulsions are used to encapsulated drugs and active substances in pharmaceutical and cosmetic products. The objective of this research was the development of microcompartmented systems for incorporation of caffeine with the purpose of topical use on treatment of the gynoid lipodystrophy. The direct mixture of PPG-5-Ceteth-20 (surfactant), dybutyl adipate (oil phase) and water in differents proportions made possible to obtain formulations with different structuring forms as microemulsions, emulsions and liquid crystalline mesophases. The formulations were characterized through the polarization light microscopy, refractive index, relative density, conductivity and behavior rheological. Solubility studies were accomplished showed that the systems were capable to solubilize about 1,5% of caffeine. In vitro release studies using the cell of diffusion model in static system of Franz's type adapted to the dissolution equipment indicated formulations with characteristics of reservoirs systems. The permeability study in vivo used male pig (Landrace x Large White) and they were submitted to the treatment. Formulations with or without caffeine were applied. Skin's fragments and hypoderm of them were removed for histology analysis after the treatment. The formulation with liquid crystal of hexagonal phase characteristics was efficient in increasing skin permeability to the caffeine, thus facilitating its drug action. The application of caffeine this way led to a significant reduction of the hypoderms thickness. The developed system is adjusted for topical use, is skin penetration enhancers and it guarantees the effectiveness of the caffeine in the treatment of the cellulite.

Keywords: microemulsion, liquid crystals, caffeine, gynoid hidrolipodystrophy, skin permeability.

LISTA DE ABREVIATURAS

MEs – microemulsões

ME – microemulsão

A/O – água em óleo

O/A – óleo em água

PRO – PPG-5-Ceteth-20

ADP – adipato de dibutila

ML – microemulsão líquida

MV – microemulsão viscosa

ST – sistema semitransparente

SE – sistema emulsionado

SF – separação de fases

η – viscosidade

τ – tensão de cisalhamento

γ – gradiente de cisalhamento

UV – ultravioleta

VIS – visível

$\pm s$ – desvio padrão

CV% – coeficiente de variação

K_{OCT/H_2O} – coeficiente de partição octanol/água

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

AUC – área sob a curva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores das absorvâncias das soluções aquosas da cafeína, obtidos por espectrofotometria no comprimento de onda de 273 nm.	57
Tabela 2. Valores das absorvâncias da cafeína em etanol, obtidos por espectrofotometria no comprimento de onda de 273 nm.	58
Tabela 3. Valores das absorvâncias das soluções de cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5.5, obtidos por espectrofotometria no comprimento de onda de 273 nm.	59
Tabela 4. Composição percentual (p/p) das formulações A a K.	63
Tabela 5. Índices de refração das formulações estudadas (n = 3).	71
Tabela 6. Densidades relativas das formulações estudadas (n = 3).	72
Tabela 7. Condutividades eletrolíticas das formulações estudadas (n = 3).	74
Tabela 8. Solubilidade da cafeína nos componentes da formulação.	82
Tabela 9. Solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5.	83
Tabela 10. Solubilidade da cafeína nas diferentes formulações.	83
Tabela 11. Coeficiente de partição octanol/água para a cafeína (n = 3).	84
Tabela 12. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir de uma solução de cafeína 1,5% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 em função do tempo (minutos).	85
Tabela 13. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir da formulação C acrescida de 1,5% de cafeína em função do tempo (minutos).	86
Tabela 14. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir da formulação D acrescida de 1,5% de cafeína em função do tempo (minutos).	86
Tabela 15. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir da formulação H acrescida de 1,5% de cafeína em função do tempo (minutos).	87
Tabela 16. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir da formulação K acrescida de 1,5% de cafeína em função do tempo (minutos).	87
Tabela 17. Área sob a curva (AUC) determinada pelo método do trapezóide a partir da curva de liberação de cada uma das repetições das amostras (n = 3).	89
Tabela 18. Processo de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) entre a solução de cafeína, as formulações C, D, H e K antecedido pela análise de variância (ANOVA).	89

- Tabela 19. Determinação da ordem de reação de liberação da cafeína a partir de diferentes formulações, utilizando o parâmetro de coeficiente de correlação (r^2).90
- Tabela 20. Características das regressões lineares de cada curva, obtidas através da liberação acumulativa da cafeína (mg/cm^2) versus a raiz quadrada do tempo ($\text{min}^{1/2}$).91
- Tabela 21. Medidas da espessura da hipoderme (μm) de suínos machos que sofreram diferentes tratamentos durante 15 dias. Cada animal ($n = 5$) recebeu todos os tratamentos em diferentes áreas: área controle, formulação 1 e formulação 294

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do tegumento (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).	14
Figura 2. Representação dos mecanismos de penetração de fármacos através do estrato córneo (adaptado de HADGRAFT, 2001).	15
Figura 3. Representação esquemática das estruturas auto-associativas de anfifílicos mais comumente encontradas em água, óleo ou na combinação entre eles. (a) molécula de anfifílico; (b) micela; (c) micela reversa; (d) fase hexagonal; (e) fase hexagonal reversa; (f) fase lamelar; (g) fase cúbica micelar; (h) cúbica bicontínua; (i) microemulsão O/A e A/O; (j) microemulsão bicontínua (adaptado de EZRAHI <i>et al.</i> , 1999; CUNHA JUNIOR <i>et al.</i> , 2003; LAWRENCE e REES, 2000).	17
Figura 4. Estrutura das microemulsões (OLIVEIRA e SCARPA, 2001).	19
Figura 5. Fórmula estrutural do PPG-5-Ceteth-2 (WENNINGER, 1997).	24
Figura 6. Fórmula estrutural do adipato de dibutila.	24
Figura 7. Mulher com celulite na região das nádegas e coxas (ROSSI e VERGNANINI, 2000).	30
Figura 8. Esquema do aspecto da pele com celulite (adaptado de AMERICAN SKINCARE e CELLULITE EXPERT ASSOCIATION, 2006).	30
Figura 9. Esquema da diferença estrutural entre as células de gordura dos homens e das mulheres (adaptado de LUEDER <i>et al.</i> , 2004).	32
Figura 10. Mecanismo de ação da cafeína (GALENA, 2005).	33
Figura 11. Fórmula estrutural da cafeína.	34
Figura 12. Modelo de um diagrama de fases.	41
Figura 13. Ilustração do dispositivo de placas paralelas do reômetro.	44
Figura 14. Esquema da célula de difusão: (a) abertura para coleta e reposição de amostra, (b) entrada do dispositivo de agitação, (c) abertura para a colocação do tubo com a membrana (URBAN, 2004).	47
Figura 15. Esquema da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução (URBAN, 2004).	47
Figura 16. Fotos da célula de difusão utilizada no ensaio de liberação <i>in vitro</i>	48
Figura 17. Fotos da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução em diversos ângulos.	49

- Figura 18. Suíno macho, não castrado e híbrido (Landrace x Large White) utilizado no estudo de permeação cutânea da cafeína. O animal apresenta o dorso demarcado em oito regiões, nas quais foram aplicadas diferentes formulações contendo cafeína. 52
- Figura 19. Pele e hipoderme. (1) epiderme; (2) derme; (3) hipoderme superficial; (4) septo de tecido conjuntivo; (5) hipoderme profunda. 53
- Figura 20. Espectro de absorção da cafeína na região do infravermelho. 54
- Figura 21. Espectro de absorção de uma solução aquosa de cafeína, faixa de leitura 200 a 700 nm, concentração 2,44 µg/ml. 55
- Figura 22. Espectro de absorção de cafeína em etanol, faixa de leitura 200 a 700 nm, concentração de 2,44 µg/ml. 55
- Figura 23. Espectro de absorção de cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, faixa de leitura 200 a 700 nm, concentração 2,44 µg/ml. 56
- Figura 24. Curva analítica da cafeína em água, obtida por espectrofotometria a 273 nm (n = 3). 57
- Figura 25. Curva analítica da cafeína em etanol, obtida por espectrofotometria a 273 nm (n = 3). 58
- Figura 26. Curva analítica da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, obtida por espectrofotometria a 273 nm (n = 3). 59
- Figura 27. Diagrama de fase pontual do sistema PPG-5-Ceteth-20 (tensoativo), água (fase aquosa) e adipato de dibutila (fase oleosa). (●) sistema microestruturado líquido; (●) sistema microestruturado viscoso; (▼) sistema semitransparente; (▼) separação de fases; (■) sistema emulsionado. 61
- Figura 28. Diagrama de fase do sistema PPG-5-Ceteth-20, água e adipato de dibutila. ML: sistema microestruturado líquido; MV: sistema microestruturado viscoso; ST: sistema semitransparente; SE: sistema emulsionado; SF: separação de fases. 62
- Figura 29. Diagrama ilustrando a composição das formulações escolhidas (●) para a caracterização física. 63
- Figura 30. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação A. A seta indica parte de uma bolha para evidenciar o campo escuro. 65
- Figura 31. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação B. A seta indica parte de uma bolha para evidenciar o campo escuro. 66

- Figura 32. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação C. A seta indica parte de uma bolha para evidenciar o campo escuro. 66
- Figura 33. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação D. As setas indicam as estruturas que representam o arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal. 66
- Figura 34. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação E. As setas indicam as estruturas que representam o arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal (presença de estrias). 67
- Figura 35. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação F. As setas mostram as estruturas que representam o arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal (presença de estrias). 67
- Figura 36. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação G. As setas indicam as estruturas que representam arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal (presença de estrias). 67
- Figura 37. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação H. As setas indicam as estruturas que representam arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase lamelar (presença de cruces-de-malta). 68
- Figura 38. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação I. As setas mostram as estruturas que representam arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase lamelar (presença de cruces-de-malta). 68
- Figura 39. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação J. A seta indica parte de uma bolha para evidenciar o campo escuro. 68
- Figura 40. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação K. As setas mostram as estruturas que representam arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal (início de formação). 69
- Figura 41. Representação esquemática do índice de refração das formulações estudadas, da água, do ADP e do PRO. 70
- Figura 42. Representação esquemática do índice de refração dos sistemas A, B, C, D, E e F. 71
- Figura 43. Representação esquemática do índice de refração dos sistemas F, G, H, I e J. 71
- Figura 44. Representação esquemática da densidade relativa das formulações estudadas, da água, do ADP e do PRO. 72

Figura 45. Representação esquemática das densidades relativas das formulações A, B, C e D.	73
Figura 46. Representação esquemática das densidades relativas das formulações G, H, I e J.	73
Figura 47. Representação esquemática das condutividades eletrolíticas das formulações estudadas.	74
Figura 48. Representação esquemática das condutividades eletrolíticas dos sistemas A, B, C, D, E e F.	75
Figura 49. Representação esquemática das condutividades eletrolíticas dos sistemas F, G, H, I e J.	75
Figura 50a e b. Reogramas da formulação A, composta por 85% de PPG-5-Ceteth-20, 10% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	76
Figura 51a e b. Reogramas da formulação B, composta por 77,5% de PPG-5-Ceteth-20, 17,5% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	76
Figura 52a e b. Reogramas da formulação C, composta por 70% de PPG-5-Ceteth-20, 25% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	77
Figura 53a e b. Reogramas da formulação D, composta por 65% de PPG-5-Ceteth-20, 30% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	77
Figura 54a e b. Reogramas da formulação E, composta por 60% de PPG-5-Ceteth-20, 35% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	77
Figura 55a e b. Reogramas da formulação F, composta por 55% de PPG-5-Ceteth-20, 40% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	78
Figura 56a e b. Reogramas da formulação G, composta por 55% de PPG-5-Ceteth-20, 35% de água e 10% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	78
Figura 57a e b. Reogramas da formulação H, composta por 55% de PPG-5-Ceteth-20, 30% de água e 15% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	78
Figura 58a e b. Reogramas da formulação I, composta por 55% de PPG-5-Ceteth-20, 20% de água e 25% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	79
Figura 59a e b. Reogramas da formulação J, composta por 60% de PPG-5-Ceteth-20, 30% de água e 10% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	79
Figura 60a e b. Reogramas da formulação K, composta por 60% de PPG-5-Ceteth-20, 30% de água e 10% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.	79
Figura 61a e b. Reogramas da formulação C, acrescida de 1,5% de cafeína a 25°C e 37°C.	80
Figura 62a e b. Reogramas da formulação D, acrescida de 1,5% de cafeína a 25°C e 37°C.	80

- Figura 63a e b. Reogramas da formulação H, acrescida de 1,5% de cafeína a 25°C e 37°C. .. 81
- Figura 64a e b. Reogramas da formulação K, acrescida de 1,5% de cafeína a 25°C e 37°C. .. 81
- Figura 65. Viscosidades comparativas das formulações estudadas, gradiente de cisalhamento de 185 1/s, temperatura de 25°C e 37°C. 82
- Figura 66. Solubilidade da cafeína em diferentes formulações e nos seus respectivos componentes. 84
- Figura 67. Perfil de liberação de cafeína (mg) em função do tempo (minutos) a partir das formulações envolvidas no estudo. (■) solução de cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5; (●) formulação C; (●) formulação D; (▼) formulação H; (▼) formulação K. 88
- Figura 68. Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de AUC, obtidos a partir do experimento de liberação *in vitro*. 89
- Figura 69. Curvas da quantidade liberada acumulada de cafeína (mg/cm²) das formulações C (●), D (●), H (▼) e K (▼) e na solução (■) em função da raiz quadrada do tempo. Cada linha indica a regressão linear de sua respectiva curva, cujas características estão descritas na tabela 20. 91
- Figura 70. Fotomicrografias da pele e hipoderme de suínos machos que sofreram diferentes tratamentos. *Controle* (1), *formulação sem cafeína* (2) e *formulação com cafeína* (3). As setas indicam a região da hipoderme mensurada e evidenciam a diminuição de sua espessura. Aumento de 30 vezes. 92
- Figura 71. Fotomicrografias evidenciando a hipoderme de suínos machos que sofreram diferentes tratamentos. *Controle* (1), *formulação sem cafeína* (2) e *formulação com cafeína* (3). Aumento de 32 vezes em A e 200 vezes em B. 93
- Figura 72. Representação esquemática dos valores encontrados para a espessura da hipoderme de suínos machos submetidos a diferentes tratamentos. *Controle* (■), *formulação sem cafeína* (■) e *formulação com cafeína* (■). 94

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele

A pele, maior órgão do organismo, possui primariamente a função de proteção, garantindo a manutenção dos fluidos biológicos e do balanço eletrolítico graças a sua capacidade metabólica, imunológica e sensorial e impedindo a absorção de partículas prejudiciais e desnecessárias do ambiente externo (MORGANTI *et al.*, 2001). Recobre toda a superfície do corpo e é constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. A hipoderme está abaixo e em continuidade com a derme, porém não faz parte da pele, serve apenas de suporte e união com os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). A pele e a hipoderme constituem a unidade morfológica chamada tegumento, ilustrada na figura 1.

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. É formada por diferentes tipos de células, como os queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e de Merkel. Sua espessura e estrutura variam de acordo com o local estudado. Vista da derme para a superfície, a epiderme apresenta cinco camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea, relacionadas a seguir (SAMPAIO e RIVITTI, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A **camada basal** é a mais profunda das camadas da epiderme. É constituída por células basais, de forma cilíndrica, que se dispõem perpendicularmente à linha formada pela junção derme-epiderme e por células denominadas melanócitos. Essa camada é essencialmente germinativa, em que se observa intensa atividade mitótica; assim, é responsável, juntamente com a camada espinhosa, pela constante renovação da pele.

A **camada espinhosa**, também chamada camada malpighiana ou corpo mucoso de Malpighi, é formada por células cubóides ou ligeiramente achatadas, que contêm

filamentos de queratina que se ligam às células vizinhas por meio de desmossomos (expansões citoplasmáticas). Os filamentos de queratina e os desmossomos são responsáveis pela manutenção da coesão entre as células da epiderme e pela resistência ao atrito.

A **camada granulosa** é composta por 3-5 fileiras de células poligonais achatadas, com citoplasma repleto de grânulos basófilos (grânulos de querato-hialina) e grânulos lamelares. Esses grânulos têm função de impermeabilizante epidérmico; eles se fundem com a membrana plasmática e expulsam seu conteúdo para o espaço intercelular da camada granulosa, onde o material lipídico se deposita e forma a barreira contra a penetração.

A **camada lúcida**, que é mais evidente na pele espessa, possui uma delgada camada de células achatadas, eosinófilas e translúcidas. Apresenta numerosos filamentos de queratina no citoplasma.

A **camada córnea** tem espessura muito variável e é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo, com o citoplasma repleto de queratina.

Logo abaixo da epiderme está a derme, que é formada de tecido conjuntivo e compreende um verdadeiro gel, rico em mucopolissacarídeos (substância fundamental) e material fibrilar de três tipos: fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares. Serve de apoio para a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme. Sua espessura também varia de acordo com a região observada. Apresenta uma superfície externa irregular, na qual se observam saliências (chamadas de papilas dérmicas) que aumentam a área de contato entre a derme e a epiderme, reforçando a união das duas camadas. Além de vasos sanguíneos e linfáticos, são encontradas na derme estruturas derivadas da epiderme, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. (SAMPAIO e RIVITTI, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A derme é composta por duas camadas: camada papilar e camada reticular.

A **camada papilar** é delgada e de tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas. Contém fibras de colágeno (fibrinas), que ajudam na união da derme com a epiderme, fibras elásticas, numerosos fibroblastos e abundante substância fundamental. Estão presentes nessa camada os corpúsculos de Meissener, responsáveis pela sensibilidade tátil, e os corpúsculos de Ruffini e Paccini, órgãos terminais sensitivos.

A **camada reticular**, mais espessa que a camada papilar, é constituída por tecido conjuntivo denso e contém muitas fibras elásticas, feixes colágenos mais espessos e menor quantidade de substância fundamental e fibroblastos.

A hipoderme, também chamada de tela subcutânea, é composta por tecido adiposo e conjuntivo frouxo que une a derme aos órgãos subjacentes. Dependendo da região e do grau de nutrição do organismo, pode ter uma camada variável de tecido adiposo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Funcionalmente, a hipoderme, além de depósito nutritivo de reserva, participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a motilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).

A tela subcutânea compõe-se em geral de duas camadas, sendo chamada de areolar a mais superficial. Abaixo dela existe um septo de tecido conjuntivo, de desenvolvimento variável conforme a região, chamado fáscia superficial ou subcutânea. Esse septo separa a camada areolar da camada mais profunda, a lamelar, que aumenta de espessura quando há ganho de peso, com aumento do volume dos adipócitos. A proporção dessas camadas varia de acordo com diversos fatores, como espessura da pele (na pele espessa a camada areolar é preponderante sobre a lamelar, na pele fina ocorre o inverso), região do corpo, sexo (na mulher a camada areolar é mais espessa) e idade (a camada areolar é mais espessa no adulto) (GUIRRO e GUIRRO, 2004; ROSENBAUM, 1998).

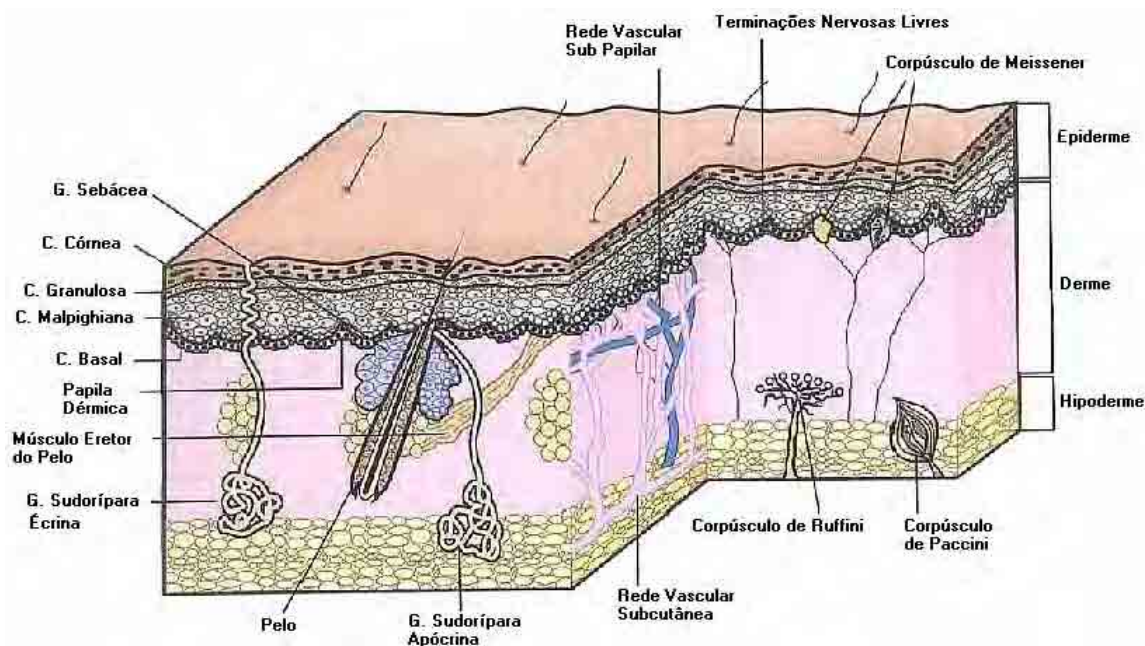


Figura 1. Estrutura do tegumento (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).

Os estudos de permeabilidade cutânea são limitados pela camada ou estrato córneo, localizado na epiderme, que é a maior barreira para a entrada de uma substância no corpo (VIANNA *et al.*, 1998; KREILGAARD *et al.*, 2000; BARRY, 2001; MOSER *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2001). Constituído de células mortas (corneócitos), água e lipídios, o estrato córneo comporta-se como uma membrana artificial semipermeável, e as moléculas dos medicamentos penetram por difusão passiva (ANSEL, 2000).

A maioria dos fármacos utilizados no tratamento de problemas dermatológicos precisa atingir os tecidos mais profundos da pele, tendo que permear o estrato córneo para chegar ao seu local de ação. Desse modo, a utilização dermatológica de fármacos está limitada pela capacidade destes ultrapassarem a barreira da pele (MARTINS e VEIGA, 2002). Apesar disso, a administração tópica oferece vários atrativos quando comparada às tradicionais vias (KREILGAARD, 2002). Além de não ser invasiva, evita o metabolismo pré-sistêmico e a degradação de fármacos peptídicos e protéicos (MITRAGOTRI, 2000; TANG *et al.*, 2001).

Os fármacos podem permear o estrato córneo, atravessando as células da camada córnea (transcelular), entre elas (intercelular) ou através dos apêndices (glândulas sudoríparas ou sebáceas e folículos pilosos) (ANSEL, 2000; HADGRAFT, 2001). Na figura 2 estão esquematizadas as possíveis vias de penetração.

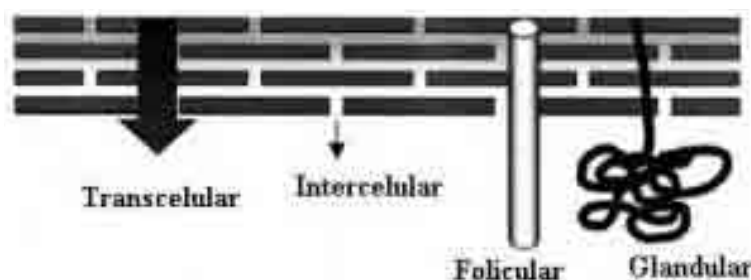


Figura 2. Representação dos mecanismos de penetração de fármacos através do estrato córneo (adaptado de HADGRAFT, 2001).

Nos últimos anos, vários métodos têm sido investigados com a finalidade de vencer os problemas com relação à impermeabilidade da pele e à variabilidade biológica e também de aumentar o número de fármacos candidatos ao desenvolvimento de medicamentos transdérmicos (MARTINS e VEIGA, 2002). Dentre estes, estão a modificação físico-química de fármacos com capacidade de permeação fraca em pró-fármacos que permeiem a pele com facilidade (MARTINS e VEIGA, 2002), o uso de tensoativos, lipossomas (MOSER *et al.*, 2001) e microemulsões (KREILGAARD, 2002).

A absorção percutânea é um complexo processo físico-químico e biológico. Vários experimentos, *in vitro* e *in vivo*, são realizados a fim de se entender e/ou prever a distribuição de fármacos da superfície da pele até o interior do corpo de animais e humanos (VENTER *et al.*, 2001).

Numerosas linhas de pesquisa trabalham na busca de membranas equivalentes à pele humana, mas encontrar um tecido no qual as características lipofílicas sejam as mesmas é muito difícil. (HADGRAFT, 2001).

O uso de suíno como modelo animal em pesquisas biomédicas vem crescendo a cada dia, porque ele apresenta muitas características anatômicas e fisiológicas comuns ao ser humano. A absorção percutânea em homens, ou em animais, varia dependendo da área do corpo em que o produto químico é aplicado, da idade, do sexo, da espessura da pele, dentre outras (SIMON e MAIBACH, 2000).

A pele do suíno, da mesma forma que a do homem, é coberta com pouca quantidade de pêlos; a pigmentação é rica em algumas raças e pobre em outras. Possui epiderme fina e derme bem diferenciada, com um conteúdo grande de tecido elástico (SIMON e MAIBACH, 2000).

O aspecto histológico da epiderme, tanto do homem quanto do suíno, é similar quando julgado por parâmetros de modificação de tecido e caracterização de proteínas queratinosas. O estrato córneo de suínos contém frações grosseiras de proteína parecidas com o tecido epitelial humano e apresenta-se semelhante ao estrato córneo no que diz respeito à variabilidade da densidade dos filamentos e à área de sobreposição de células (SIMON e MAIBACH, 2000).

Segundo dados de BRONAUGH (1989) *apud* PIRES DE CAMPOS (2004), a espessura da camada córnea de suínos é de 26,4 μm e do homem é de 16,8 μm . Como a camada córnea é considerada a principal barreira à permeação, justifica-se a escolha deste animal como modelo experimental (MORIMOTO *et al.*, 1994; SIMON e MAIBACH, 2000; PIRES DE CAMPOS, 2004).

1.2. Sistemas microestruturados

O interesse na busca de novos sistemas de liberação de fármacos é bastante relevante para desenvolver novas formulações, otimizar preparações farmacêuticas e contribuir com a busca de alternativas terapêuticas modernas, mais eficientes, com efeitos

colaterais minimizados.

A mistura de óleo, água e tensoativo, e eventualmente co-tensoativo, é capaz de formar uma ampla variedade de estruturas e fases, dependendo das características e da proporção dos componentes utilizados. Além de microemulsões, análises estruturais podem revelar a existência de emulsões normais (O/A ou A/O), bicontínuas, fases líquido-cristalinas lamelares, hexagonais ou cúbicas (LAWRENCE e REES, 2000; KREILGAAD, 2002). A figura 3 ilustra as estruturas auto-associativas de anfifílicos mais comumente encontradas na presença de água, óleo ou na combinação entre eles.

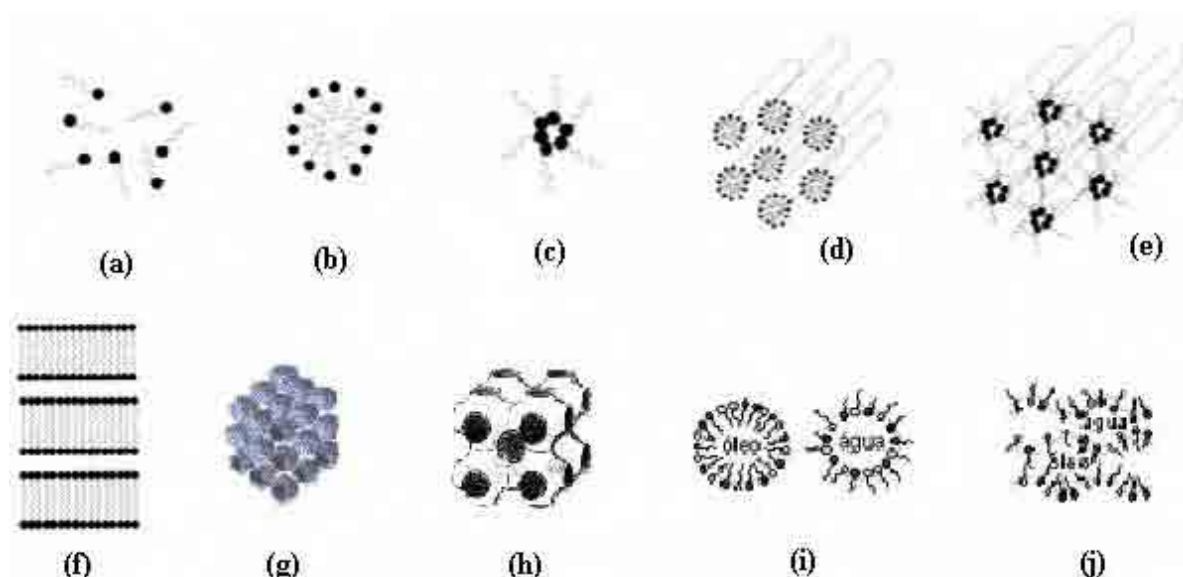


Figura 3. Representação esquemática das estruturas auto-associativas de anfifílicos mais comumente encontradas em água, óleo ou na combinação entre eles. (a) molécula de anfifílico; (b) micela; (c) micela reversa; (d) fase hexagonal; (e) fase hexagonal reversa; (f) fase lamelar; (g) fase cúbica micelar; (h) cúbica bicontínua; (i) microemulsão O/A e A/O; (j) microemulsão bicontínua (adaptado de EZRAHI *et al.*, 1999; CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003; LAWRENCE e REES, 2000).

A maioria dessas diferentes fases e estruturas é facilmente reconhecida, pela simples visualização da aparência física, por causa de sua composição (exemplo, emulsões não são transparentes e costumam separar fases com o tempo; estruturas lamelares e fases cúbicas são sistemas viscosos), ou podem ser reveladas através da observação com luz

polarizada (por exemplo, fases cristalinas) e assim serem diferenciadas da microemulsão propriamente dita (KREILGAARD, 2002).

Os sistemas microestruturados, tais como microemulsões e cristais líquidos, são amplamente utilizados para encapsular fármacos e substâncias ativas em produtos farmacêuticos e cosméticos (FA *et al.*, 2004).

1.2.1. Sistemas microemulsionados

Vários trabalhos têm mostrado as microemulsões (MEs) como um potente e inovador veículo que aumenta a permeação cutânea de fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos quando comparada a outras formas farmacêuticas, por exemplo, soluções aquosas, soluções micelares, emulsões e lipossomas (PEYREFITTE *et al.*, 1998; KREILGAARD, 2002). Sistemas microemulsionados podem ser utilizados ainda para aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em meio aquoso, melhorar a absorção e aumentar a eficiência terapêutica (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As MEs, por possuírem grande quantidade de tensoativo, podem interagir com o estrato córneo e desestruturar sua bicamada lipídica, fazendo com que os lipídios passem de uma forma cristalina para uma forma líquida desordenada, aumentando a permeabilidade cutânea e facilitando a penetração de substâncias que normalmente não atravessam essa barreira (OLIVEIRA *et al.*, 2004; WILLIAMS e BARRY, 2004).

Podem ser caracterizadas como agregados esféricos e com diâmetros menores de 1400 Å. O sistema envolve gotículas com tamanhos suficientemente pequenos para ser opticamente transparente. Um óleo ou um fármaco lipofílico está disperso num meio aquoso (ou vice-versa), com um tensoativo e um co-tensoativo apropriados, gerando um sistema termodinamicamente estável (OLIVEIRA e SCARPA, 2001).

A formação das MEs é espontânea, a preparação é relativamente fácil, e não é necessário fornecimento de grande quantidade de energia ao sistema, como ocorre nas emulsões tradicionais (LAWRENCE e REES, 2000).

Por representar uma forma micronizada das emulsões, a microemulsão (ME) pode ser de água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), podendo da mesma forma inverter de um tipo para outro pela adição de uma fase ou alteração do tensoativo. A figura 4 é uma representação esquemática da organização das microemulsões.

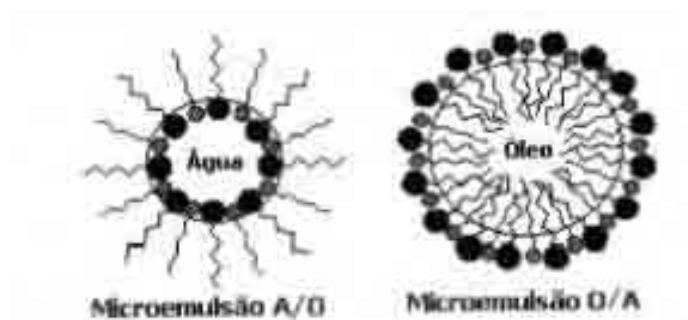


Figura 4. Estrutura das microemulsões (OLIVEIRA e SCARPA, 2001).

Microemulsões A/O têm sido propostas para aumentar a absorção de substâncias hidrossolúveis (CERA, 2001). Enquanto as MEs O/A, formadas por gotículas de óleo dispersas em água, contendo um tensoativo na interface óleo/água, possuem ótima capacidade de solubilização de substâncias lipossolúveis e permitem a incorporação de vários tipos de compostos na fase interna oleosa (baixa constante dielétrica), na região interfacial (constante dielétrica intermediária entre o óleo e a água) e na fase externa (constante dielétrica alta) (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Para a formação e a manutenção da estabilidade desses sistemas, seria necessário diminuir a tensão interfacial do sistema, numa proporção tal que a energia livre originada a partir da expansão da área interfacial seja neutralizada, pelo menos, parcialmente (OLIVEIRA e SCARPA, 2001).

Os agentes tensoativos, por apresentarem caráter anfifílico, quando incorporados a misturas imiscíveis de óleo e água, posicionam-se na interface óleo/água, o que é termodinamicamente favorável (LAWRENCE e REES, 2000), reduzindo a tensão superficial existente entre elas e permitindo a mistura.

Os co-tensoativos, componentes adicionais nas microemulsões quando comparadas às emulsões, têm o papel de abaixar ainda mais a tensão interfacial, pela neutralização da energia livre remanescente derivada da expansão da interface que o tensoativo não consegue neutralizar (OLIVEIRA e SCARPA, 2001; CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003).

1.2.2. Mesofases líquido-cristalinas liotrópicas

Os cristais líquidos são sistemas que se apresentam como uma distinta fase de materiais condensados que combina propriedades simétricas e mecânicas de ambos estados, líquido isotrópico e sólido cristalino, com parcial ordem/desordem das espécies atômicas. Por combinarem características físicas dos estados líquido e sólido, as fases são também chamadas de mesofases, em que o prefixo *meso* significa “intermediário”. Existem dois tipos principais de cristais líquidos: os termotrópicos obtidos a partir de uma fase cristalina por processos unicamente térmicos e os liotrópicos formados a partir da adição de solventes, mas que também podem sofrer variação de suas estruturas com alteração da temperatura (SINGH, 2000; HYDE, 2001 *apud* URBAN, 2004; MÜLLER-GOYMANN, 2004).

A utilização de cristais líquidos como sistemas transportadores de fármacos, veículos solubilizantes e como sistemas de liberação controlada de fármacos tem sido muito estudada. Nesses sistemas, as moléculas de fármaco na forma não dissociada presentes na região aquosa apresentam-se como espécies que podem ser capazes de se difundir e atravessar

as barreiras lipofílicas da pele (GABBOUN *et al.*, 2001).

As interações de soluto-solvente representam um importante papel, pois controlam a taxa de transporte de fármaco nesse tipo de sistema microestruturado. Assim, fármacos em cristais líquidos liotrópicos podem ser liberados dependendo da estrutura da mesofase e do tipo de soluto dissolvido (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2001 *apud* URBAN, 2004).

Os cristais líquidos liotrópicos contêm dois componentes no mínimo. Um componente orgânico, por exemplo, o tensoativo, e seu solvente. A porção orgânica deve possuir algumas características químicas diferenciadas, caso contrário, o solvente simplesmente solubilizaria a molécula, originando soluções moleculares dispersas e desordenadas, e certamente não formaria cristais líquidos. A adição de um solvente, como a água, irá hidratar seletivamente a porção hidrofílica das moléculas de tensoativo, evitando as regiões hidrofóbicas (HYDE, 2001 *apud* URBAN).

Certos tensoativos em água, a determinada temperatura e concentração, proporcionam bons exemplos de cristais líquidos liotrópicos. Com o aumento da concentração do tensoativo, diferentes formas líquido-cristalinas podem ser formadas. Mais de uma fase líquido cristalina (mesofase) pode existir e coexistir. Lamelares, hexagonais e cúbicas são as três formas mais conhecidas (DRUMMOND e FONG, 2000; GABBOUN *et al.*, 2001).

A fase lamelar (Figura 3f) consiste em bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, normalmente água, organizadas paralelamente e planamente umas com as outras, formando uma rede unidimensional, de maneira que as caudas hidrofóbicas das moléculas de tensoativo sejam o centro da lamela e a porção hidrofílica esteja em contato com a camada de solvente, quando este é água (EZRAHI *et al.*, 1999).

Se os agregados de tensoativo são cilindros indefinidamente longos no lugar de bicamadas, dois tipos de estruturas bidimensionais podem ser formados, fase hexagonal

normal ou inversa (Figuras 3d e 3e). Na fase hexagonal normal, as moléculas de tensoativo agregam-se em micelas cilíndricas circulares que se empacotam, e uma região aquosa contínua preenche os espaços entre os cilindros. Na fase hexagonal inversa, os cilindros contêm no seu interior moléculas de água circundadas por cabeças polares do tensoativo, e os espaços livres entre os cilindros são preenchidos com a porção oleosa (EZRAHI *et al.*, 1999).

A fase cúbica apresenta estrutura bem diferenciada, mais complicada e visualizada com maior dificuldade que as outras fases. São estruturas tridimensionais que podem ser classificadas em dois tipos: cúbica bicontínua e cúbica micelar (EZRAHI *et al.*, 1999). As fases cúbicas micelar e bicontínua estão representadas nas figuras 3g e 3h, respectivamente.

Uma das maneiras de se classificarem as fases líquido-cristalinas é determinar a isotropia óptica da mesofase. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz polarizada, e isotrópica, se não desviar a luz polarizada. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas são isotrópicas (HYDE, 2001 *apud* URBAN).

1.3. Componentes da formulação

1.3.1. Tensoativo

Moléculas anfifílicas são também chamadas de tensoativos ou surfactantes em virtude do seu poder de diminuir tensões superficiais. Possuem uma cabeça polar (hidrofílica) e uma cauda apolar (hidrofóbica). O comportamento dessas moléculas está diretamente relacionado ao meio em que elas se encontram. Se estiverem em meio polar, tendem a se associar em agregados que maximizem o contato da cabeça polar e o meio e minimizem o contato entre a parte hidrofóbica e o meio. Em solventes polares, as moléculas anfifílicas posicionam as cabeças polares para a parte mais externa do agregado e direcionam a cadeia apolar para a região interna. A este sistema dá-se o nome de micelas. Se as mesmas moléculas

estão em um meio apolar, surge a formação de micelas reversas, nas quais as cabeças polares se posicionam na parte interna da micela e as cadeias apolares tendem a maximizar o contato com o solvente apolar (MACIAN *et al.*, 1996).

Os tensoativos são classificados de acordo com a carga do grupo polar, podendo ser: catiônicos, quando possuem carga positiva; aniônicos, quando a carga é negativa; neutros ou não iônicos, quando não possuem carga; e zwitteriônicos, quando a carga líquida é nula em virtude de possuírem dois grupos na cabeça polar, um positivo e outro negativo (LAWRENCE e REES, 2000).

Os tensoativos não iônicos têm a propriedade de reduzir a tensão superficial de um sistema a valores muito próximos de zero, o que não é comportamento típico da maioria das moléculas tensoativas (RESENDE, 2004).

Sistemas de liberação de fármacos estabilizados com tensoativos não iônicos são, geralmente, menos afetados pela presença de aditivos (tampão, eletrólitos e conservantes) e mudanças de pH que os tensoativos iônicos, além de serem mais seguros e menos susceptíveis em causar irritação (URBAN, 2004).

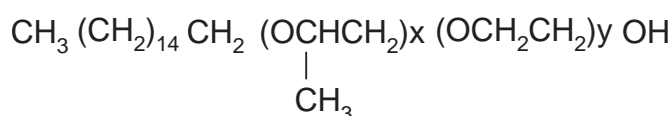
Alguns tensoativos não iônicos, como a classe dos polioxietileno n-álquil éteres, são capazes de formar sistemas estáveis sem a necessidade da adição de co-tensoativo, isso é importante, pois reduzem a complexidade dos sistemas e a possibilidade de toxicidade (LAWRENCE e REES, 2000).

Produzido pela reação entre álcool cetílico com a mistura de óxido de etileno e óxido de propileno, o PPG-5-Ceteth-2 (Figura 5) foi o tensoativo não-iônico da classe dos polioxietilenos e polioxipropilenos escolhido para o sistema trabalhado.

Pode ser encontrado na literatura com o nome de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP ou nome comercial PROCETYL AWS[®] (PRO), apresenta-se como um

líquido claro à levemente turvo, estável a variações de pH, hidrossolúvel e solúvel em álcool e não irritante. Possui um EHL 16 e em solução aquosa 3% um pH na faixa de 5,5-7,5 (CRODA DO BRASIL, 1994).

Sua composição proporciona multifuncionalidades, assim é comumente empregado como tensoativo, emoliente, solubilizante de essências, umectantes, plastificantes e como agente molhante (WENNINGER, 1997; CRODA DO BRASIL, 1994).



Sendo, x em média 5 e y em média 20.

Figura 5. Fórmula estrutural do PPG-5-Ceteth-2 (WENNINGER, 1997).

1.3.2. Fase oleosa

A fase oleosa pode favorecer a formação de sistemas microestruturados estáveis e para isso são importantes a associação e penetração das moléculas do óleo no filme interfacial do tensoativo. Dependendo da natureza do óleo, em particular seu tamanho em relação à cadeia hidrofóbica do tensoativo, o óleo pode penetrar em extensões variadas das caldas apolares do tensoativo na monocamada interfacial (LAWRENCE e REES, 2000; KREILGAARD, 2002; URBAN, 2004).

O adipato de dibutila (ADP), fase oleosa escolhida para o sistema trabalhado, é um diéster de álcool butílico e ácido adípico que apresenta a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_4$ e fórmula estrutural ilustrada na figura 6.

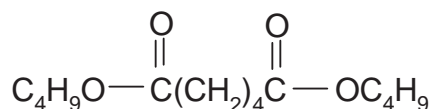


Figura 6. Fórmula estrutural do adipato de dibutila.

1.4. Caracterização física

Os ensaios mais comumente utilizados para a caracterização de microemulsões como sistemas são a avaliação do índice de refração, da densidade relativa, da viscosidade e do comportamento reológico, condutividade elétrica, determinação de tamanho médio de partículas por espalhamento de luz (*light scattering*), observação da estrutura interna por microscopia de luz polarizada e SAXS (espalhamento de raios X a baixo ângulo) (MOULIK e PAUL, 1998; LAWRENCE e REES, 2000; CERA, 2001).

1.4.1. Índice de refração

O índice de refração é uma constante física freqüentemente utilizada na determinação da identidade e pureza de fármacos e produtos alimentícios. Pode ser usado para determinar quantitativamente a pureza de soluções ou as proporções em que certos líquidos são misturados.

O índice de refração de uma substância é a relação da velocidade de propagação da luz no ar e sua velocidade na substância. É dado pela razão entre o seno do ângulo de incidência (seno i) e o seno do ângulo de refração (seno r). Depende do comprimento de onda da luz utilizada no experimento e da variação da temperatura (USP 25, 2002).

1.4.2. Densidade

Diversos termos são usados para expressar a massa de volumes iguais de diferentes substâncias. Densidade é definida como a massa de uma substância por unidade de volume e pode ser classificada em três tipos: densidade absoluta, densidade aparente e densidade relativa.

A *densidade absoluta* é a razão de massa de um objeto, determinada ou referida a

um vácuo, em uma temperatura específica, ao volume de objeto na mesma temperatura. A *densidade aparente* difere da densidade absoluta somente pelo fato de que a massa do objeto é determinada no ar. E a *densidade relativa* de uma substância é a razão de sua massa pela massa de igual volume de água, ambas a 20°C (REICH *et al.*, 2000).

1.4.3. Comportamento reológico

Para a formulação de produtos farmacêuticos, cosméticos ou de higiene pessoal, deve-se ter em mente o desenvolvimento de produtos com características reológicas desejáveis, em função da sua aplicação específica.

Na área farmacêutica, as medições reológicas são utilizadas para caracterizar a facilidade com que o material pode ser despejado de um frasco, o bombeamento de um produto do equipamento em um processo industrial, o espalhamento de um creme ou loção sobre a pele, entre outras (SCHOTT, 2000; WOOD, 2001; ALMEIDA e BAHIA, 2003).

O termo reologia, do grego *rheo* (fluxo) e *logos* (ciência), foi designado para descrever as deformações de sólidos e a fluidez de líquidos. Esse estudo abrange viscosidade, tipo de fluxo, valor de rendimento e tixotropia do produto (TOKUMOTO, 1996; WOOD, 2001).

Viscosidade (η) é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo (deformação ou escoamento). Quanto maior a viscosidade, maior a resistência, e esta é dada pela razão entre a tensão de cisalhamento aplicada (τ) e o gradiente de cisalhamento (γ), sendo diretamente proporcional à temperatura (WOOD, 2001). A equação abaixo expressa a viscosidade.

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} \quad (\text{Eq. 1})$$

Considerando-se o tipo de escoamento e a deformação, os fluidos podem ser

classificados em duas categorias: newtonianos e não-newtonianos. Segundo a lei de Newton, para líquidos ideais, a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional ao gradiente de cisalhamento. De acordo com Newton, a viscosidade é independente da velocidade de deformação, o que só é verdade para líquidos ideais, como os designados fluidos newtonianos. Nos fluidos newtonianos se verifica uma proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de cisalhamento para todos os valores de tensão aplicados (TOKUMOTO, 1996; WOOD, 2001; ALMEIDA e BAHIA, 2003).

Na prática, encontram-se descritos fluidos com comportamentos mais complexos, que não se enquadram na lei de Newton, os quais são denominados de “fluidos não-newtonianos ou fluidos de Stokes”. Os líquidos complexos e preparações semi-sólidas apresentam comportamento não-newtoniano, que é caracterizado por variações da viscosidade aparente em função do gradiente de cisalhamento aplicado à amostra. Esses tipos de fluidos podem ser ainda classificados quanto ao tipo de escoamento em plásticos, pseudoplásticos ou dilatantes (ALMEIDA e BAHIA, 2003).

Assim, a aplicação de uma força tangencial a um corpo e sua deformação subsequente constituem a base de observação numa análise reológica. Se esta força for aplicada por um período de tempo e, após ser retirada, o material readquire sua forma inicial, diz-se que a deformação é elástica, ou plástica, se a deformação permanece (WOOD, 2001).

Após a aplicação de uma tensão de cisalhamento, o material pode ou não se reestruturar rapidamente. Se a recuperação é imediata, as curvas ascendentes e descendentes do reograma são sobrepostas e a deformação é dita tempo-independente. No entanto, se a estrutura não se recupera imediatamente e a curva ascendente indicar maior viscosidade que a descendente, o material é chamado tixotrópico; quando ocorre o contrário, o material é dito reopético (WOOD, 2001).

1.4.4. Condutividade eletrolítica

A condutividade eletrolítica, também chamada de condutância específica, é a capacidade de uma solução conduzir corrente elétrica e é dada em Siemens/cm na temperatura de 20°C. A condução da corrente elétrica em soluções eletrolíticas difere da dos metais, por ser composta unicamente de elétrons livres, já nos líquidos a condução é feita por íons (BRITISH pharmacopoeia, 2001).

Condutividade eletrolítica é uma ferramenta sensível e freqüentemente usada na investigação de mudanças estruturais em macro e microemulsões (MO *et al.*, 2000). Medidas de condutividade apresentam-se como um importante meio para se determinar uma microemulsão possui domínio contínuo aquoso ou oleoso (LAWRENCE e REES, 2000).

1.4.5. Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma técnica muito usada para a verificação de estruturas internas de um sistema e fundamenta-se em um campo elétrico de raio luminoso polarizado que uma substância birrefringente é capaz de provocar (RESENDE, 2004).

O microscópio de luz polarizada é projetado para observar e fotografar estruturas que são principalmente visíveis devido ao seu caráter óptico anisotrópico. Com a finalidade de realizar essa tarefa, o microscópio deve ser equipado com um polarizador posicionado no trajeto da luz, antes do material analisado, e um analisador (um segundo polarizador) localizado no caminho óptico entre a abertura traseira da objetiva e os tubos de observação ou o ponto da câmera. O contraste da imagem origina-se da interação da luz plano-polarizada com a substância birrefringente para produzir dois componentes individuais da onda, sendo cada um polarizado em planos mutuamente perpendiculares (DAVIDSON e ABRAMOWITZ, 2003).

O comportamento de uma substância, ou composto, em relação ao efeito que causa na luz polarizada pode ser classificado como anisotrópico ou isotrópico. Se o feixe de luz polarizada que atravessar a substância, ou composto, for dividido em dois feixes de planos perpendiculares, é porque as direções da propagação da luz no interior da substância não são equivalentes e o comportamento é conhecido como anisotropia. Se a substância, ou composto, permitir a passagem da luz polarizada sem modificação da sua propagação, tem-se o fenômeno de isotropia (DAVIDSON e ABRAMOWITZ, 2003; RESENDE, 2004).

A microscopia de luz polarizada é apropriada para a detecção de cristais líquidos ou mesofases (exceto mesofase cúbica), já que estes são birrefringentes, assim como os cristais verdadeiros. O arranjo cúbico apresenta-se isotrópico, somente sendo detectado com outras técnicas de análise, como difração de raio X de baixo ângulo (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

O arranjo hexagonal apresenta uma forma chapada típica que o distingue facilmente do lamelar, quando observados ao microscópio com luz polarizada. Os agregados de tensoativo organizam-se em cilindros, que podem se empacotar formando uma fase fluida bidimensional. Já o arranjo lamelar apresenta-se com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando espécies de ondas e estruturas denominadas “cruzes-de-malta” que são observadas ao microscópio com luz polarizada (MÜLLER-GOYMANN, 2004; RESENDE, 2004).

1.5. Celulite

O termo celulite foi usado pela primeira vez em 1920 por Alquier e Paviot para descrever uma alteração estética da superfície cutânea. É caracterizada por um aspecto de “casca de laranja” (ROSSI e VERGNANINI, 2000), que ocorre principalmente em mulheres na região pélvica, região ginóide (região abaixo do umbigo, nádegas, coxas, face interna dos

joelhos, face posterior do braço) e abdômen. A figura 7 é uma foto de uma mulher com celulite na região das nádegas e coxas.



Figura 7. Mulher com celulite na região das nádegas e coxas (ROSSI e VERGNANINI, 2000).

“Panniculopatia edematose-fibrosclerótica” é o termo médico para descrever a celulite. Após longas investigações com a finalidade de esclarecer como se desenvolve a celulite, vários autores concordaram nos seguintes pontos: as células adiposas se alargam, devido à acumulação de gordura; as paredes capilares tornam-se excessivamente permeáveis, causando a acumulação localizada de fluidos; a drenagem linfática insuficiente retarda a eliminação do excesso de fluidos; as células adiposas agrupam-se e ficam ligadas por fibras de colágeno e dificultam a circulação sanguínea; as fibras de tecido conjuntivo endurecem, contraem-se e puxam a pele para baixo (AMERICAN SKINCARE e CELLULITE EXPERT ASSOCIATION, 2006). O resultado é o aspecto irregular da pele (Figura 8).



Figura 8. Esquema do aspecto da pele com celulite (adaptado de AMERICAN SKINCARE e CELLULITE EXPERT ASSOCIATION, 2006).

A hidrolipodistrofia ginóide, popularmente conhecida como celulite, é decorrente de diversos fatores, tais como ciclo e/ou desequilíbrio hormonal, hábitos alimentares, sedentarismo, fator hereditário e emocional, que iniciam esse processo pelo qual a gordura começa a se depositar em alguns pontos específicos das camadas mais profundas da pele. Este excesso comprime os vasos sangüíneos, dificultando a nutrição, oxigenação e circulação de fluidos na região (CURRI, 1993), e aumenta a sensibilidade devido à pressão exercida sobre as extremidades nervosas (BARATA, 1995).

Tem sido comum relacionar celulite com orientação das fibras colágenas que se estendem da derme até a fáscia superficial que, na mulher, é diferente em relação ao homem.

Segundo ROSENBAUM *et al.* (1998), os septos de tecido conjuntivo na mulher apresentam-se verticalmente e, no homem, obliquamente. Assim, uma hipertrofia da hipoderme na mulher provoca a invasão na derme reticular, ocasionando as herniações que resultam no aspecto comumente chamado de “casca de laranja”, característico da celulite. Já no homem, os septos oblíquos empurram a hipoderme ao encontro da musculatura, razão pela qual os homens obesos não apresentam celulite. Embora a arquitetura desses septos possa ser alterada com cirurgia plástica, qualquer redução na hipoderme pode atenuar o aspecto irregular provocado pela celulite.

Assim, a celulite acomete predominantemente mulheres, devido a uma diferença estrutural nas células de gordura (adipócitos). Enquanto no homem o tecido conjuntivo dá uma força estrutural extra para as células de gordura, na mulher as células são menos estruturadas e estão apenas posicionadas verticalmente (Figura 9) e, portanto, permitem acumular mais gordura (AMERICAN SKINCARE e CELLULITE EXPERT ASSOCIATION, 2006; LUEDER *et al.*, 2004; ROSENBAUM *et al.*, 1998).

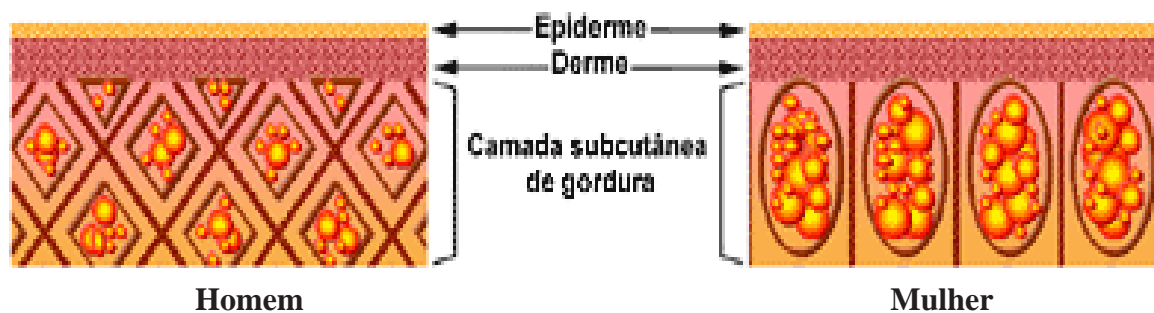


Figura 9. Esquema da diferença estrutural entre as células de gordura dos homens e das mulheres (adaptado de LUEDER *et al.*, 2004).

Na literatura, é bastante confundida hidrolipodistrofia ginóide com obesidade. Entretanto, a única correlação existente é a de que a obesidade é um dos fatores predisponentes que podem dar origem à celulite. Na obesidade são observadas somente hipertrofia e hiperplasia adipocitária, enquanto, na celulite, há uma série de alterações estruturais na derme, na microcirculação e nos adipócitos, tais como alterações histoquímicas, bioquímicas e ultra-estruturais (ROSSI e VERGNANINI, 2000).

Sendo assim, o estudo de algumas substâncias ativas comumente empregadas no tratamento da celulite é interessante. Tais fármacos devem atuar sobre a camada adiposa excessiva, promovendo a lipólise, e ainda ativar a circulação que vai arrastar os resíduos (BARATA, 1995).

Acredita-se que a lipólise seja mediada, em parte, pelo sistema nervoso, pela ação dos receptores β e α_2 adrenérgicos na superfície da célula gordurosa (DI SALVO, 1996).

A adenosil ciclase (ou adenilato ciclase) é uma proteína integral da membrana plasmática que catalisa a síntese do AMPc (3,5-ciclo adenosina monofostato) a partir do ATP (adenosil trifosfato). No entanto, o AMPc é rapidamente degradado pela nucleotídeo cíclico fosfodiesterase até 5-AMP (5-adenosina monofostato), que é inativo (LEHNINGER, 2002). Metilxantinas, tais como a cafeína (um tipo de estimulador β -adrenérgico), inibem a fosfodiesterase, aumentando a vida média do AMPc.

O AMPc, por sua vez, afeta a proteína quinase A (PKA) que regula várias enzimas biológicas (LEHNINGER, 2002). A PKA induz a resposta celular à adrenalina, catalisando a fosforilação da fosforilase b quinase inativa, gerando a forma ativa. E a forma ativa, estimulada pela elevação da concentração de AMPc, fosforila e ativa a triglicéride lipase, levando à mobilização dos ácidos graxos e glicerol (lipólise). A figura 10 ilustra o mecanismo simplificado da ação da cafeína, o mesmo se aplica as outras metilxantinas.



Figura 10. Mecanismo de ação da cafeína (GALENA, 2005).

A diminuição seletiva e bem-sucedida dos depósitos de gordura, via liberação tópica de substâncias ativas, exige o transporte do(s) agente(s) ativo(s) para camadas mais profundas do tegumento e em concentração eficaz na área de depósito adiposo onde se procura obter a lipólise. Essa liberação pode, teoricamente, ser auxiliada pelo uso de sistemas que sejam veículos transportadores das partículas visando os tecidos, como, por exemplo, as microemulsões (DI SALVO, 1996).

1.6. Cafeína

As metilxantinas são classificadas como β -agonistas e são a principal categoria de substâncias com ações documentadas no tratamento da celulite. Dentre as principais metilxantinas estão cafeína, teobromina e teofilina, sendo a cafeína a mais utilizada no tratamento da celulite, normalmente na concentração de 1 a 2% (HEXSEL *et al.*, 2005).

A cafeína, fármaco escolhido para ser incorporado às formulações em estudo, apresenta-se sob a forma de pó branco ou cristais aciculares, brancos e brilhantes. Facilmente sublimável sob a ação do calor. É inodora e de sabor amargo. Com fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$ e fórmula estrutural representada na figura 11, é pouco solúvel em água, solúvel em água fervente e clorofórmio e ligeiramente solúvel em álcool diidratado e pouco solúvel em éter (O'NEIL, 2001; USP 25, 2002).

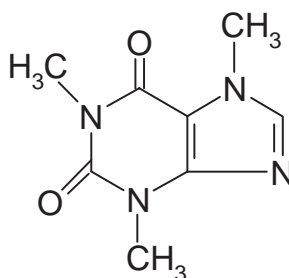


Figura 11. Fórmula estrutural da cafeína.

A cafeína é mais conhecida pelo seu efeito sistêmico estimulante ao sistema nervoso central, promovendo um maior estado de alerta de nosso cérebro. Seu tempo de meia vida ($t_{1/2}$) esta em torno de 4-5 horas em humanos (via oral). Entretanto, em vista de sua utilidade prática, em formulações dermatológicas e cosméticas para o combate às hidrolipodistrofias, vem sendo sistematicamente introduzida em formulações por via tópica, especialmente no combate à celulite.

Sob o enfoque do seu potencial de aplicação em formulações cosméticas e dermatológicas, a propriedade específica da cafeína que fundamenta tal modalidade de

aplicação repousa sobre seu efeito de inibir a enzima fosfodiesterase. A inibição da fosfodiesterase promove elevação nos níveis de AMP cíclico, estimula a atividade da enzima lipase, resultando na quebra dos triglicérides dos adipócitos, ou seja, na queima de gorduras (lipólise). Conseqüentemente, produtos à base de cafeína estão indicados principalmente para o combate à celulite e suas manifestações de característica lipodistrófica localizada (FA *et al.*, 2004; GALENA, 2005; VIA FARMA NET, 2005).

Segundo o Parecer Técnico nº 1 de 29 de junho de 2002 estabelecido pela Câmara Técnica de Cosméticos – CATEC, de todas as xantinas, a cafeína é a substância que apresenta maior número de estudos clínicos utilizando a via de administração cutânea. CATEC recomenda e a Gerência-Geral de Cosméticos determina: estabelecer o limite de 8% expresso em cafeína, isolada ou sob forma associada, em preparações cosméticas (ANVISA, 2006).

Na área dermocosmética, é interessante que os sistemas de liberação utilizados sejam seletivos para que favoreçam a penetração e direcionem a substância ativa até o sítio-alvo, reduzindo a absorção sistêmica e conseqüentemente os efeitos colaterais. Assim, a otimização da liberação de fármacos através da pele é muito importante.

Desta forma, seria ideal uma formulação à base de cafeína adequada ao uso tópico e que tivesse capacidade de promover a permeação e liberar o fármaco no tecido adiposo em níveis terapêuticos relevantes e com baixos efeitos colaterais.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- obter e caracterizar sistemas microestruturados utilizando um tensoativo não-iônico e cafeína com componente ativo;
- avaliar a liberação *in vitro* da cafeína nas formulações desenvolvidas;
- verificar a permeação cutânea da cafeína *in vivo* (modelo animal).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais empregados

- Cafeína Anidra P.A., Synth®;
- PPG-5-Ceteth-20 (INCI) – álcool cetílico etoxilado 20OE e propoxilado 5OP - Procetyl AWS®, fabricante CRODA, distribuidora Volp Indústria e Comércio Ltda;
- Dibutyl Adipate (INCI) – adipato de dibutila - Polymol ADP®, fabricante Polytechno/Brasil, distribuidora Vital Especialidades;
- Água deionizada e purificada em sistema de purificação de água Milli-Q Plus – Millipore®;
- Membrana de diálise de acetato de celulose, PM 12.000-14.000, Sigma®;
- Os sais e solventes empregados foram de grau analítico ou grau farmacêutico.

3.2. Métodos

3.2.1. Ensaios preliminares com a cafeína

3.2.1.1. Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão da cafeína foi determinado utilizando-se equipamento Stuart Científica Meeting Pint, Aparados SMP3. Amostra de cafeína previamente dessecada por 24 horas foi colocada em tubos capilares e estes introduzidos horizontalmente no equipamento.

3.2.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Uma quantidade de amostra de cafeína foi misturada a uma quantidade de brometo de potássio e transformada em uma pastilha. A pastilha foi introduzida ao espectrofotômetro FTIR Shimadzu 8300 de forma a obter-se o espectro de infravermelho característico da substância para posterior comparação com dados da literatura.

3.2.1.3. Determinação do espectro de absorção da cafeína nas regiões ultravioleta e visível

Para verificar a região de comprimento de onda de maior absorvância da cafeína nos solventes empregados (água, etanol e tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5), foram realizadas leituras espectrofotométricas nas regiões ultravioleta (UV) e visível (VIS).

Preparou-se uma solução aquosa estoque de cafeína (concentração de 100 µg/ml). Numa cubeta de quartzo com capacidade de 3 ml e caminho óptico de 1cm (Hewlett Packard®) colocaram-se 2,0 ml de água e adicionaram-se 50 µl da solução estoque. Homogeneizou-se e efetuou-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro UV/VIS Hewlett Packard, Mod. 8453 na faixa de comprimento de onda de 200 a 700 nm.

O mesmo procedimento foi realizado com a solução de cafeína em etanol e em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5.

3.2.1.4. Determinação das curvas analíticas da cafeína

As soluções estoques de cafeína utilizadas na determinação das curvas analíticas foram preparadas conforme descrito no item anterior.

Colocaram-se 2 ml de água em cubeta de quartzo e em seguida volumes de solução de cafeína foram adicionados de modo a se obterem concentrações crescentes, e a cada adição, agitou-se adequadamente e em seguida procedeu-se à leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 273 nm.

O experimento foi realizado em triplicata, e a curva analítica foi construída com as médias dos valores das absorvâncias obtidas para cada concentração. Pelo gráfico da absorvância em função da concentração, determinaram-se a equação da reta e o coeficiente de regressão linear, que foram empregados para calcular concentrações de cafeínas em outros ensaios.

O mesmo procedimento foi realizado para a solução de cafeína em etanol e em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5.

3.2.2. Preparo das formulações

As formulações foram preparadas por mistura direta, padronizada, de fase oleosa (adipato de dibutila – ADP) e tensoativo (PPG-5-Ceteth-20 – PRO) previamente homogeneizadas em béqueres ou frascos de vidro transparentes com tampa de capacidades adequadas, seguidas pela adição de fase aquosa (água purificada) com agitação manual até homogeneização. Em alguns casos, principalmente para pontos de microemulsão altamente viscosa, foi necessário aquecimento brando da mistura em banho a 50°C para completa homogeneização e eliminação de bolhas.

3.2.3. Diagrama de fases

Para a obtenção do diagrama de fases, foram realizadas misturas iniciais de tensoativo e fase oleosa, nas seguintes proporções: 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9. Também foi necessária a realização de outras misturas, com diferentes proporções dos componentes, para melhor delimitar as regiões de transição de uma fase para outra.

Cada preparação foi titulada com fase aquosa com o auxílio de uma microseringa, sob agitação manual em béqueres de capacidades adequadas. As preparações obtidas foram transferidas para frascos transparentes com tampa e mantidas em repouso a temperatura ambiente por 24 horas para observação de eventuais mudanças em suas características.

A cada alíquota de água adicionada foram detectadas visualmente mudanças nas características das diferentes preparações, como transição de sistemas opticamente transparentes líquidos (sistema microestruturado líquido) para sistemas opticamente transparentes viscosos (sistema microestruturado viscoso) ou para sistemas semitransparentes ou ainda separação de fases; transições de sistemas semitransparentes e de microestruturados viscosos para sistemas leitosos líquidos ou viscosos (emulsão) e posterior separação de fases também foram observadas. Os pontos foram colocados em gráfico (diagrama ternário) para a obtenção do diagrama de fases, sendo as concentrações de cada um dos componentes transformadas em porcentagem.

Representados como triângulos equiláteros, os diagramas de fase construídos mostram tanto a proporção de cada componente utilizado (diagrama de pontos), bem como as regiões de domínio dos diferentes sistemas encontrados (diagrama de linhas). Cada vértice do triângulo corresponde a 100% de cada fase, estando representados no vértice superior o tensoativo, no vértice esquerdo a fase aquosa e, no direito, a fase oleosa.

Para a leitura das concentrações, em porcentagem, de cada componente em qualquer

ponto do diagrama de fases, deve-se seguir a orientação horária, sendo que no eixo oposto ao vértice superior está representada a fase oleosa, no eixo oposto ao vértice esquerdo, o tensoativo, e no eixo oposto ao vértice direito, a fase aquosa.

A figura 12 representa um modelo de diagrama, no qual na linha contínua lê-se a fase aquosa, na linha pontilhada o tensoativo e na linha tracejada a fase oleosa. O ponto destacado no diagrama é de uma preparação com composição de 30% de fase aquosa, 30% de fase oleosa e 40% de tensoativo.

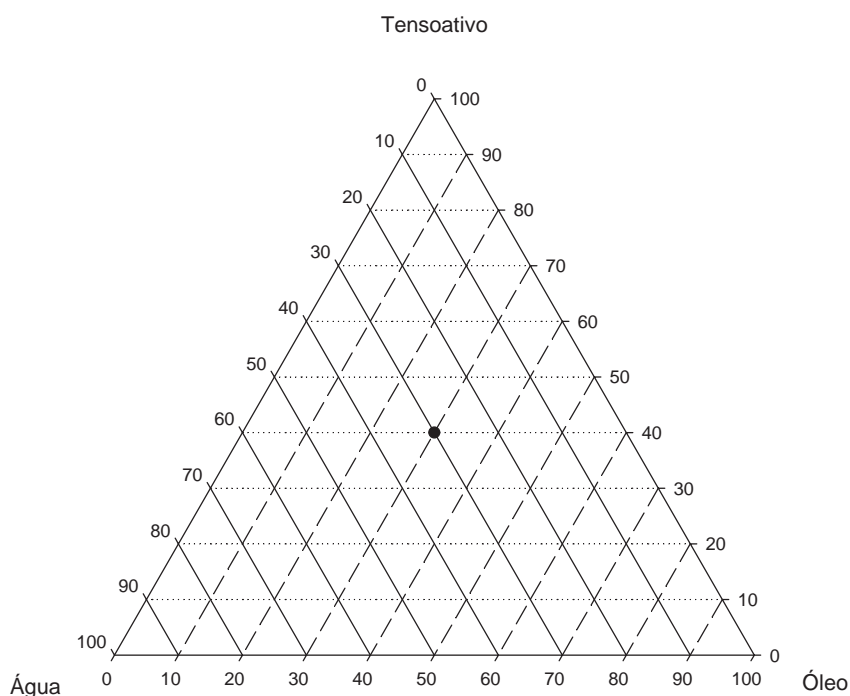


Figura 12. Modelo de um diagrama de fases.

3.2.4. Caracterização física das formulações selecionadas

3.2.4.1. Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada foi empregada para análise da estrutura interna das formulações eleitas.

As amostras foram preparadas segundo o item 3.2.1.

Lâminas e lamínulas lavadas e secas foram limpas com etanol a 95%. Pequena quantidade de microemulsão foi colocada sobre a lâmina de vidro e coberta com a lamínula, sendo em seguida observada em microscópio óptico (Laica Leitz DMRXE), com luz polarizada, acoplado a uma câmara fotográfica nos aumentos de 50, 100 e 200 vezes, sendo o aumento de 200 vezes o escolhido para a captura das imagens, devido a melhor visualização das estruturas formadas.

3.2.4.2. Determinação do índice de refração

O experimento foi realizado em triplicata, empregando-se o refratômetro de Abbé, Atago. O equipamento foi aferido com água purificada, tratada em aparelho Millipore, modelo Milli-Q plus, cujo índice de refração é 1,3330. Visto que o índice de refração varia significativamente com a temperatura, as leituras foram realizadas a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As formulações foram preparadas conforme descrito no item 3.2.1, sendo que pequena quantidade de amostra foi colocada no local adequado do equipamento e espalhada uniformemente. A refringência de cada amostra foi medida de acordo com a escala interna do equipamento. Foram construídos gráficos de colunas com a média dos resultados.

3.2.4.3. Determinação da densidade relativa

Um picnômetro de 5 ml de capacidade foi limpo, seco e previamente tarado com água destilada e fervida. Em ambiente com temperatura controlada a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ colocou-se a formulação no picnômetro, removendo-se o excesso, se necessário, e em seguida realizou-se a pesagem. Para retirar bolhas de ar formadas em algumas das formulações, foi utilizado o banho de ultra-som UNIQUE[®]. O peso da amostra foi obtido pela diferença de massa do picnômetro cheio e vazio.

O cálculo da densidade relativa consiste no quociente entre densidade de massa (razão entre a massa e seu volume) da amostra e da densidade de massa da água, ambas a 20°C.

Os cálculos foram efetuados por meio das expressões a seguir:

Densidade de massa:

$$d_{\text{formulação}} = \frac{\text{massa do picnômetro com formulação (g)} - \text{massa do picnômetro vazio (g)}}{\text{volume do balão (ml)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$d_{\text{água destilada}} = \frac{\text{massa do picnômetro com água destilada (g)} - \text{massa do picnômetro vazio (g)}}{\text{volume do balão (ml)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Densidade relativa:

$$D_{\text{rel}} = \frac{d_{\text{formulação}}}{d_{\text{água destilada}}} \quad (\text{Eq. 4})$$

As análises foram feitas em triplicata para cada ponto analisado (A, B, C, D, G, H, I, J e K). Não foi possível a determinação da densidade relativa das formulações E e F por serem muito viscosas e incorporarem muitas bolhas que não puderam ser retiradas.

3.2.4.4. Determinação da condutividade eletrolítica

A determinação da condutividade eletrolítica das formulações foi realizada num Condutivímetro 441 Corning conforme metodologia descrita na Farmacopéia Britânica (2001). As formulações foram colocadas em contato com o eletrodo, previamente calibrado com soluções-padrão de cloreto de potássio 12.88 mS/cm e 1413 µS/cm, e o aparelho forneceu a medida da condutividade eletrolítica em µS/cm. Os ensaios foram realizados em triplicata a 20°C ± 1°C.

3.2.4.5. Estudo do comportamento reológico

O comportamento reológico foi caracterizado para as formulações selecionadas (A, B, C, D, E, F,G, H, I, J e K) utilizando-se um reômetro Carrid-Med, modelo CLS100.

O aparelho funciona pelo princípio de rotação de um dispositivo de placas paralelas (Figura 13) de diâmetro de 20 mm e espaçamento de 200 μm , com controle de temperatura que fornece os valores de tensão de cisalhamento a partir de valores da velocidade de cisalhamento. O valor do torque (força aplicada) empregado foi estabelecido de modo a obter-se valor de tensão de cisalhamento superior a zero e fixou-se o limite máximo de velocidade de cisalhamento em 600 1/s. As análises foram feitas em triplicata, mantendo-se a temperatura constante de 25°C e posteriormente repetidas a 37°C.

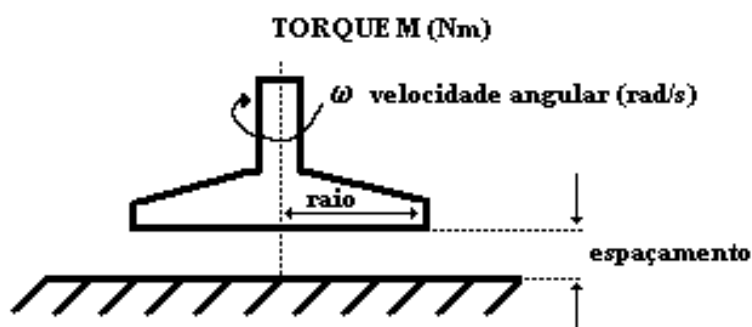


Figura 13. Ilustração do dispositivo de placas paralelas do reômetro.

3.2.5. Determinação da solubilidade da cafeína nos componentes da formulação

O ensaio da solubilidade da cafeína foi realizado separadamente em cada componente da formulação (ADP, PRO e água).

Soluções supersaturadas foram preparadas adicionando-se excesso de cafeína aos componentes em frascos tampados, lacrados com filme plástico e protegidos da luz solar em ambiente apropriado, que em seguida foram submetidos a agitação, num homogeneizador de sangue, por 48 horas sob temperatura controlada de 20°C \pm 1°C.

Após a agitação, procedeu-se à separação da cafeína não solubilizada. As amostras foram centrifugadas em Centrífuga Du Pont – Sorvall TC 6, filtradas, adequadamente diluídas e submetidas à leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 273 nm. As soluções saturadas de cafeína em ADP e em PRO foram diluídas em etanol, e a solução aquosa de cafeína, em água. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os valores de solubilidade da cafeína em cada componente foram calculados utilizando-se a equação das curvas analíticas obtidas, por espectrofotometria no respectivo solvente empregado.

3.2.6. Determinação da solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5

Soluções supersaturadas foram preparadas adicionando-se excesso de cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 e submetidas ao mesmo procedimento descrito no item anterior.

As amostras de solução saturada de cafeína foram adequadamente diluídas em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 e em seguida lidas em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda de 273 nm.

A concentração da cafeína solubilizada foi determinada pela equação da curva analítica obtida por espectrofotometria no mesmo tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5.

3.2.7. Determinação da solubilidade da cafeína nas formulações C, D, H e K

Excesso de cafeína foi adicionado a cada uma das formulações em frascos tampados, lacrados com filme plástico e protegidos da luz solar em ambiente adequado e submetidos a agitação, num homogeneizador de sangue, por 48 horas em temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após a agitação, procedeu-se à separação da cafeína não solubilizada. As amostras foram centrifugadas, filtradas, adequadamente diluídas em etanol e submetidas à leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 273 nm.

Utilizando-se a equação da curva analítica da cafeína em etanol obtida por espectrofotometria, foram calculados os valores da solubilidade da cafeína nas diferentes formulações escolhidas.

3.2.8. Determinação do coeficiente de partição óleo/água

Para a determinação do coeficiente de partição óleo/água, uma mistura de octanol e água na proporção de 1:1 foi submetida a agitação (agitador magnético Fisatom[®]) por 24 horas, sendo posteriormente centrifugada e filtrada para a separação dos componentes.

Com a fase aquosa obtida, foi preparada uma solução de cafeína, que ficou sob agitação vigorosa por 4 horas. Em seguida, essa solução foi misturada com octanol (obtido da partilha com a água) na proporção de 1:1 (v/v) e submetida a agitação por 30 minutos.

Após a agitação, a mistura foi transferida para um funil de separação e deixada em repouso. A fase aquosa foi retirada e submetida a centrifugação para separação do sobrenadante orgânico residual.

As soluções aquosas de cafeína obtidas antes e depois da partilha com octanol foram diluídas adequadamente com água e procedeu-se a leitura espectrofotométrica para a determinação das concentrações de cafeína na fase aquosa.

O coeficiente de partição foi calculado utilizando-se a equação 5.

$$K_{O/A} = \frac{C_1 - C_2}{C_2} \quad (\text{Eq. 5})$$

Nessa equação: C1 é a concentração de cafeína na fase aquosa antes da partilha;

C2 é a concentração de cafeína na fase aquosa depois da partilha.

3.2.9. Liberação *in vitro*

Para avaliar o perfil de liberação da cafeína quando incorporada às formulações D, H e K, utilizou-se o modelo de célula de difusão *in vitro* em sistema estático do tipo Franz adaptada ao equipamento de dissolução (URBAN, 2004). Esquemas ilustrativos da célula de difusão utilizada no experimento podem ser observados nas figuras 14 e 15.

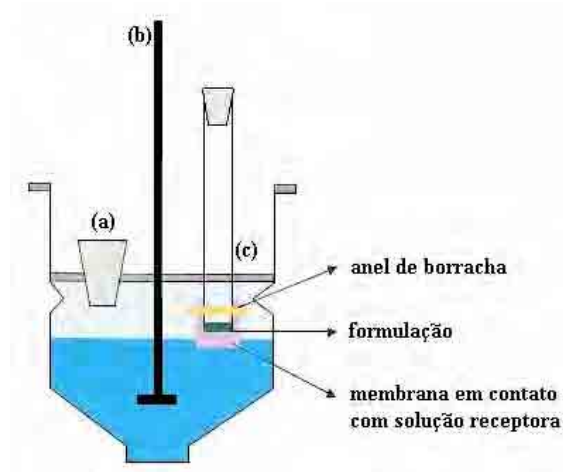


Figura 14. Esquema da célula de difusão: (a) abertura para coleta e reposição de amostra, (b) entrada do dispositivo de agitação, (c) abertura para a colocação do tubo com a membrana (URBAN, 2004).

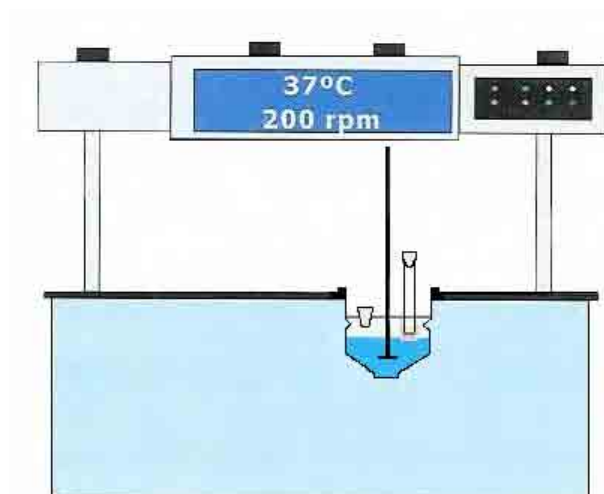


Figura 15. Esquema da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução (URBAN, 2004).

Na figura 16 encontram-se fotos da célula de difusão utilizada no ensaio de liberação *in vitro*, e na figura 17, a célula adaptada ao aparelho de dissolução Hanson Research[®], modelo SR8 Plus.

Como pode ser observada nas fotos da figura 16, a célula de difusão do sistema adaptado possui uma tampa com três aberturas, sendo uma abertura para a coleta e reposição de amostra (à esquerda na foto), uma abertura central para a entrada do dispositivo de agitação e uma outra abertura (à direita na foto) para a colocação do tubo de ensaio com a membrana.

Um pedaço de membrana é fixado no tubo de ensaio de 1,24 cm de diâmetro através de um anel de borracha. A área de exposição calculada é de 1,21 cm².



Figura 16. Fotos da célula de difusão utilizada no ensaio de liberação *in vitro*.



Figura 17. Fotos da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução em diversos ângulos.

Os experimentos foram conduzidos a $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e a solução receptora empregada (25 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5) foi constantemente agitada a $200 \pm 0,2$ rpm. Utilizou-se membrana de diálise sintética de acetato de celulose previamente hidratada. Foram selecionadas as formulações C, D, H e K, acrescidas ou não de 1,5% de cafeína para o ensaio de liberação. O perfil de liberação de uma solução de cafeína 1,5% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 (substância ativa livre) também foi realizado. Foram espalhados 200 mg de cada formulação ou 200 μl da solução de cafeína sobre a área de exposição da membrana.

A cada intervalo de tempo foi coletado do meio receptor 1 ml de amostra, que foi adequadamente diluído para a determinação da quantidade de cafeína liberada por

espalhamento de luz no comprimento de onda de 273 nm. Amostras foram coletadas em intervalos de 15 minutos nas duas primeiras horas e sucessivamente a cada 30 minutos até completar 7 horas de experimento. A última coleta foi realizada na oitava hora. Posteriormente à coleta das alíquotas, o volume retirado foi repostado com solução receptora recentemente preparada e em seguida foram feitos os cálculos para corrigir essa diluição.

Esse procedimento foi necessário, pois os experimentos deveriam ser realizados em condições “*sink*”, ou seja, condições em que a concentração do fármaco dissolvido em um tempo t é muito menor que a solubilidade do fármaco no meio receptor. A simulação de condições “*sink*” *in vitro* em testes de dissolução normalmente é obtida usando-se um grande volume de meio de dissolução ou usando-se o procedimento no qual o meio de dissolução é constantemente repostado com solvente adequado em uma proporção determinada, de forma que a concentração do soluto não alcance mais que 10-15% de sua solubilidade máxima. Se esse parâmetro é mantido, é dito que o teste é conduzido dentro das condições “*sink*” (FORMARIZ, 2004).

Para a comparação dos dados obtidos no experimento de liberação *in vitro* da cafeína quando incorporada à solução tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 e às formulações C, D, H e K, foram determinadas as áreas sob a curva (AUC) pelo método do trapézóide para os dados da quantidade liberada (mg) em função do tempo (min) para as repetições de cada amostra. Estas determinações foram utilizadas para análise estatística, realizada através do teste de variância (ANOVA) e comparação múltipla entre os resultados pelo teste de Tukey-Kramer com significância de $p < 0,05$.

Para determinar as ordens de reação do perfil de liberação da cafeína em cada amostra, foi realizada análise da regressão linear para os dados de liberação obtidos. Foram aplicados os modelos de ordem zero, pseudo primeira ordem, ou Higuchi, e primeira ordem.

3.2.10. Estudos de permeação cutânea *in vivo* e avaliação histológica

O protocolo experimental deste projeto foi estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (CEP/FCF/Car. protocolo nº 02/2006).

Foram utilizados 5 suínos machos, não castrados e híbridos (Landrace x Large White) com 45 dias de idade e aproximadamente 15 kg. Os animais foram alimentados com ração específica fabricada e oferecida pelo criador, composta de milho moído, farelo de soja, farinha de carne, calcário e sal. Um dia antes do tratamento, a região dorsal dos suínos foi depilada.

Os animais foram numerados de 1 a 5 e tiveram seus dorsos demarcados em 8 regiões (A, B, C, D, E, F, G e H) com áreas de 9 cm² cada, nas quais foram aplicadas diferentes formulações. A figura 18 é uma foto de um dos animais usados no experimento mostrando as regiões demarcadas no dorso. A região A foi escolhida como controle (sem aplicação de formulação); nas regiões B a F foram aplicadas formulações de outros trabalhos que estão sendo realizados em nosso laboratório; e nas regiões G e H foram aplicadas, respectivamente, as formulações 1 e 2, descritas a seguir:

- *formulação 1*: formulação D composta por 65% de PPG-5-Ceteth-20, 5% de adipato de dibutila e 30% de água;
- *formulação 2*: mesma composição da formulação 1, acrescida de 1,5% de cafeína.

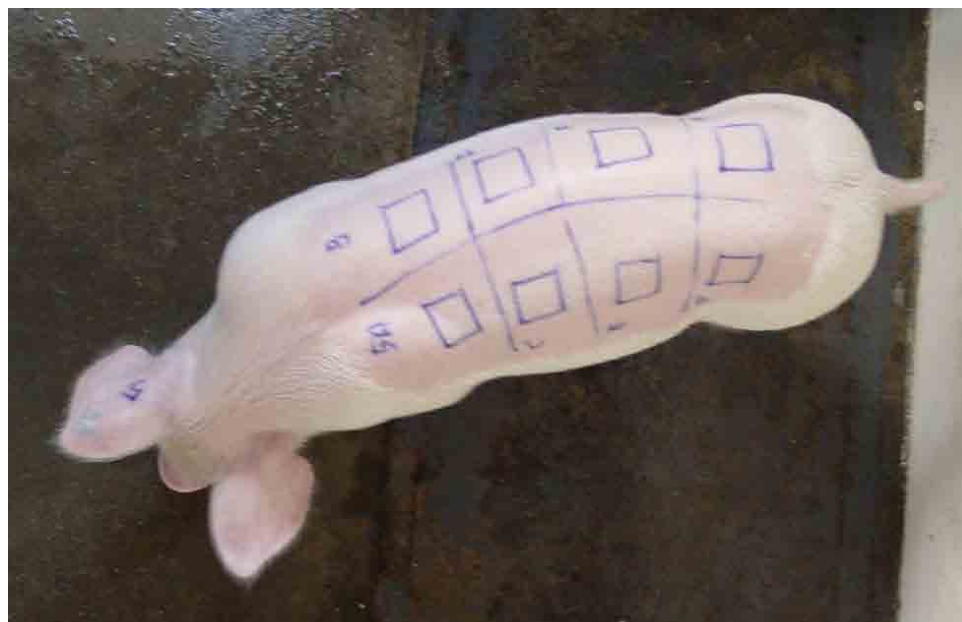


Figura 18. Suíno macho, não castrado e híbrido (Landrace x Large White) utilizado no estudo de permeação cutânea da cafeína. O animal apresenta o dorso demarcado em oito regiões, nas quais foram aplicadas diferentes formulações contendo cafeína.

As formulações foram aplicadas topicamente, massageando-se as áreas de tratamento por cerca de 1 minuto. Decorridos os 15 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por perfuração cardíaca (estocada), e os fragmentos de pele expostos às formulações foram retirados para análise histológica.

Os fragmentos contendo a pele e a hipoderme de cada área tratada foram removidos e, imediatamente, fixados com líquido de Bouin, durante 48 horas. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Com auxílio de um micrótomo (Mícron, HM325), foram obtidos cortes com 6 μm de espessura que foram corados com o método H/E (hematoxilina/eosina).

A espessura da hipoderme foi mensurada a partir de 10 cortes semi-seriados (com intervalo de, no mínimo, 60 μm) por área tratada de cada animal. As imagens de cada corte foram capturadas no microscópio óptico (Laica Leitz, DMRXE) com auxílio de um sistema de análise de imagens (Quantimet 500 IW – Leica Qwin).

Para estimar a espessura da hipoderme, foi traçada uma linha a partir do limite derme-hipoderme até o septo de tecido conjuntivo que separa a hipoderme superficial (adjacente à derme) da hipoderme profunda. As regiões da pele e da hipoderme estão ilustradas na figura 19.

Em cada corte foram traçadas 3 linhas. A partir dos valores das 30 medidas obtidas por área de tratamento em cada um dos 5 animais, calculou-se a média para cada um.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística (análise de variância, ANOVA *one-way*, associada à comparação múltipla entre os resultados, teste de Tukey-Kramer, com significância de $p < 0,05$).

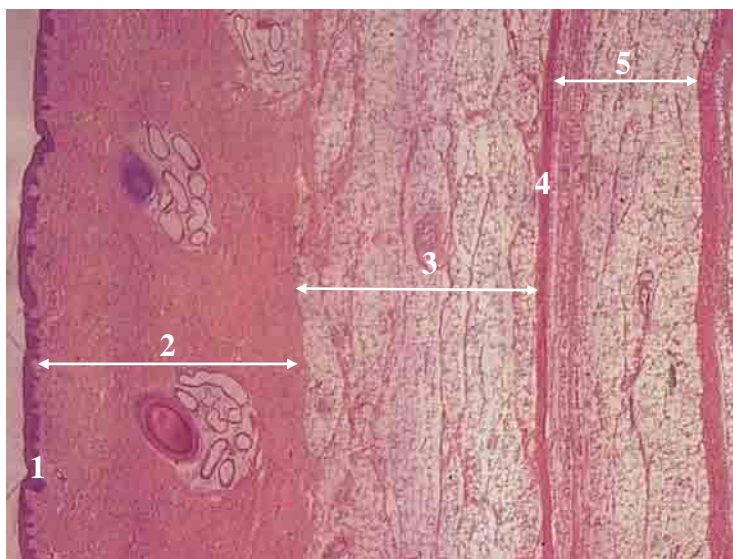


Figura 19. Pele e hipoderme. (1) epiderme; (2) derme; (3) hipoderme superficial; (4) septo de tecido conjuntivo; (5) hipoderme profunda.

3.2.11. Análise estatística

Os dados obtidos nos diferentes experimentos foram representados com a média, desvio-padrão ($\pm s$) e coeficiente de variação (CV%). Para a aplicação dos testes estatísticos foi utilizado o programa JMP Intro[®] – The Statistical Discovery Software, SAS, versão 5.0.1.

4. RESULTADOS

4.1. Estudos preliminares com a cafeína

4.1.1. Determinação do ponto de fusão

A taxa de aquecimento utilizada foi de 1,0°C por minuto a partir de 10,0°C antes do valor esperado para a faixa de fusão, prosseguindo até 10,0°C após esses valores.

O fármaco apresentou ponto fusão em cerca de 235,6°C, estando em acordo com dados da literatura (USP 25, 2002), que especificam faixa de fusão de 234,0 a 239,0°C para a cafeína.

4.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Pode-se observar no espectro de absorção no infravermelho da cafeína, representado na figura 20, que as bandas mais intensas da carbonila (C=O) estão localizadas em 1697.2 cm⁻¹ e 1658.7 cm⁻¹. Adicionalmente há outras bandas presentes em 1548.7 cm⁻¹, 1415.5 cm⁻¹ e 1361 cm⁻¹.

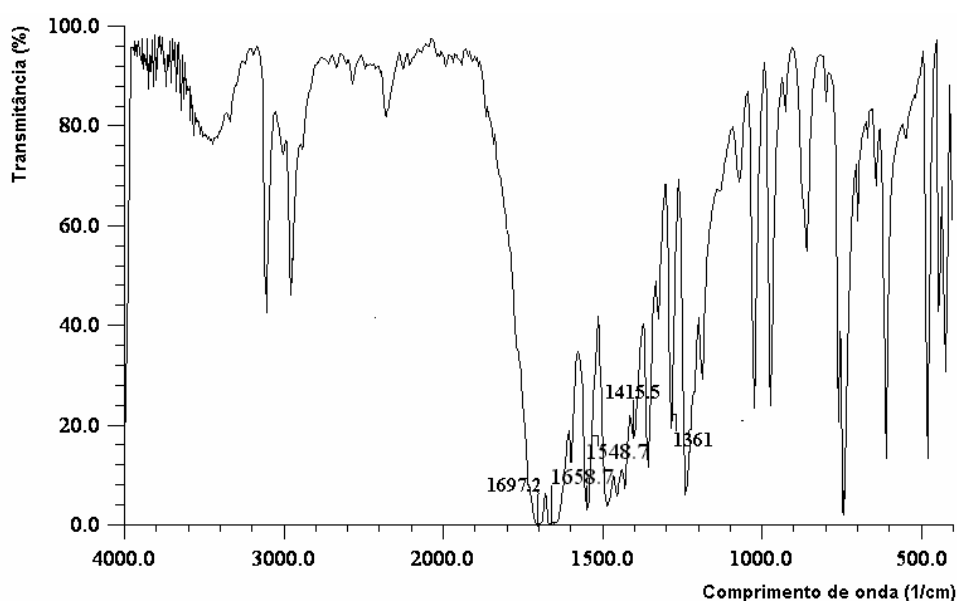


Figura 20. Espectro de absorção da cafeína na região do infravermelho.

4.1.3. Determinação do espectro de absorção da cafeína nas regiões ultravioleta e visível

A solução aquosa de cafeína, na concentração de 2,44 $\mu\text{g/ml}$, apresentou pico máximo de absorção em 273 nm, conforme pode ser verificado na figura 21. A cafeína em etanol e em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, na mesma concentração que na solução aquosa, também apresentou picos máximos de absorção em 273 nm, como pode ser observado nas figuras 22 e 23.

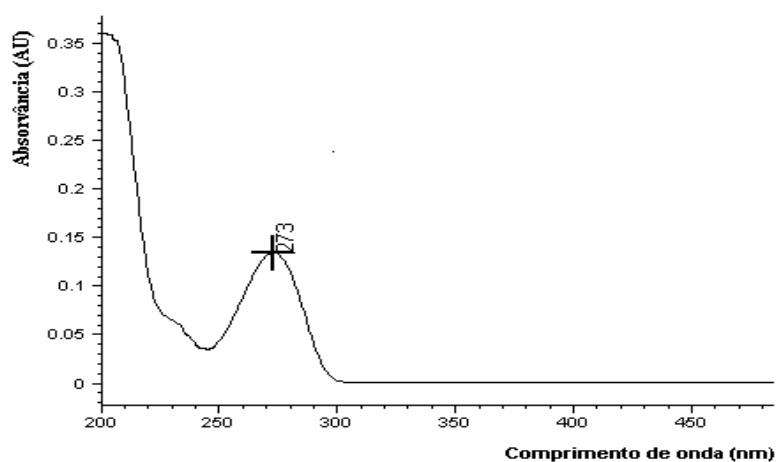


Figura 21. Espectro de absorção de uma solução aquosa de cafeína, faixa de leitura 200 a 700 nm, concentração 2,44 $\mu\text{g/ml}$.

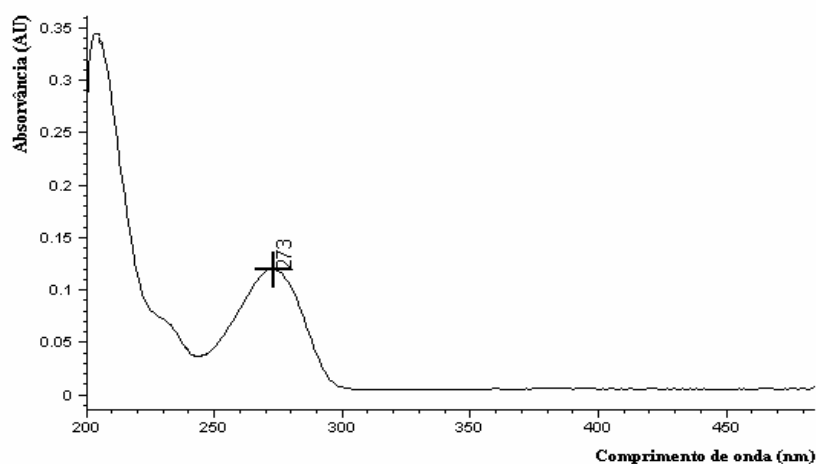


Figura 22. Espectro de absorção de cafeína em etanol, faixa de leitura 200 a 700 nm, concentração de 2,44 $\mu\text{g/ml}$.

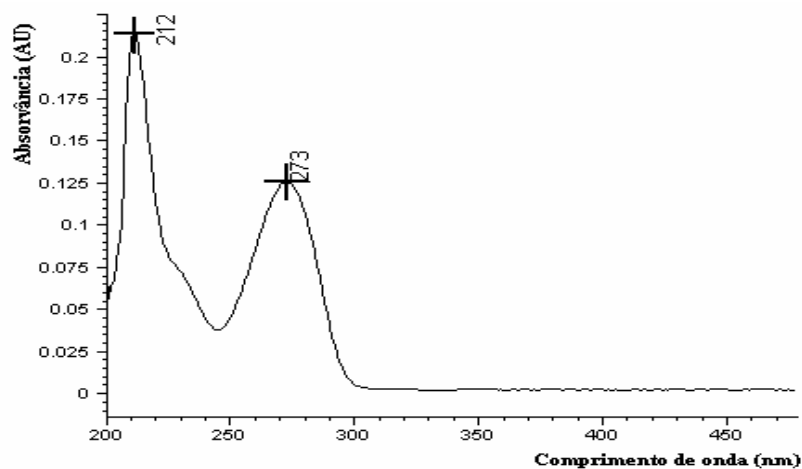


Figura 23. Espectro de absorção de cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, faixa de leitura 200 a 700 nm, concentração 2,44 µg/ml.

4.1.4. Determinação das curvas analíticas da cafeína

Nas tabelas 1, 2 e 3 estão indicados os valores de absorvância, assim como os valores das médias das 3 determinações, desvio-padrão e coeficiente de variação utilizados na construção da curva analítica da cafeína em água, em etanol e em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, respectivamente, no comprimento de onda de 273 nm apresentados nas figuras 24, 25 e 26, respectivamente.

Tabela 1. Valores das absorvâncias das soluções aquosas da cafeína, obtidos por espectrofotometria no comprimento de onda de 273 nm.

Concentração µg/ml	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	± s *	CV % **
0,00	0,0000	0,0000	0,0000	0,000	0,0000	0,0000
2,44	0,1501	0,1330	0,1328	0,139	0,0099	7,1634
4,76	0,2874	0,2660	0,2637	0,272	0,0131	4,7987
6,98	0,4140	0,3885	0,3868	0,396	0,0152	3,8435
9,09	0,5338	0,5072	0,5047	0,515	0,0161	3,1302
11,11	0,6505	0,6216	0,6186	0,630	0,0176	2,7951
13,04	0,7607	0,7316	0,7391	0,744	0,0151	2,0313
14,89	0,8643	0,8383	0,8331	0,845	0,0167	1,9776
16,67	0,9634	0,9370	0,9276	0,943	0,0186	1,9689

* desvio padrão

** coeficiente de variação

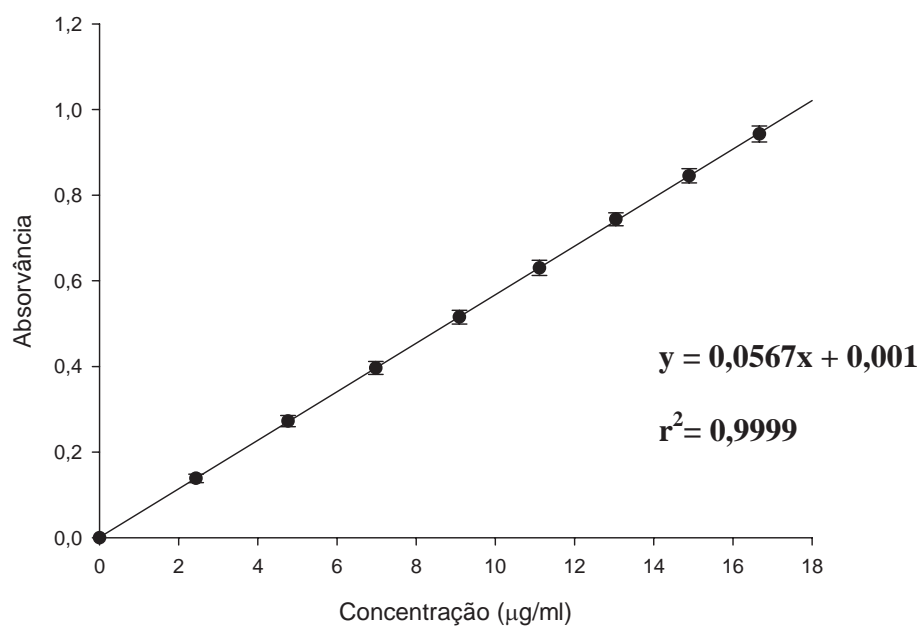


Figura 24. Curva analítica da cafeína em água, obtida por espectrofotometria a 273 nm (n = 3).

Tabela 2. Valores das absorvâncias da cafeína em etanol, obtidos por espectrofotometria no comprimento de onda de 273 nm.

Concentração µg/ml	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	± s *	CV % **
0,00	0,0000	0,0000	0,0000	0,000	0,0000	0,0000
2,44	0,1159	0,1175	0,1215	0,118	0,0029	2,4382
4,76	0,2253	0,2360	0,2314	0,231	0,0054	2,3246
6,98	0,3316	0,3424	0,3390	0,338	0,0055	1,6354
9,09	0,4329	0,4430	0,4451	0,440	0,0065	1,4813
11,11	0,5288	0,5407	0,5459	0,538	0,0088	1,6280
13,04	0,6209	0,6345	0,6433	0,633	0,0113	1,7831
14,89	0,7095	0,7236	0,7386	0,724	0,0146	2,0103
16,67	0,7949	0,8076	0,8274	0,810	0,0164	2,0222
18,37	0,8774	0,8917	0,9120	0,894	0,0174	1,9455
20,00	0,9541	0,9769	0,9937	0,975	0,0199	2,0387

* desvio padrão

** coeficiente de variação

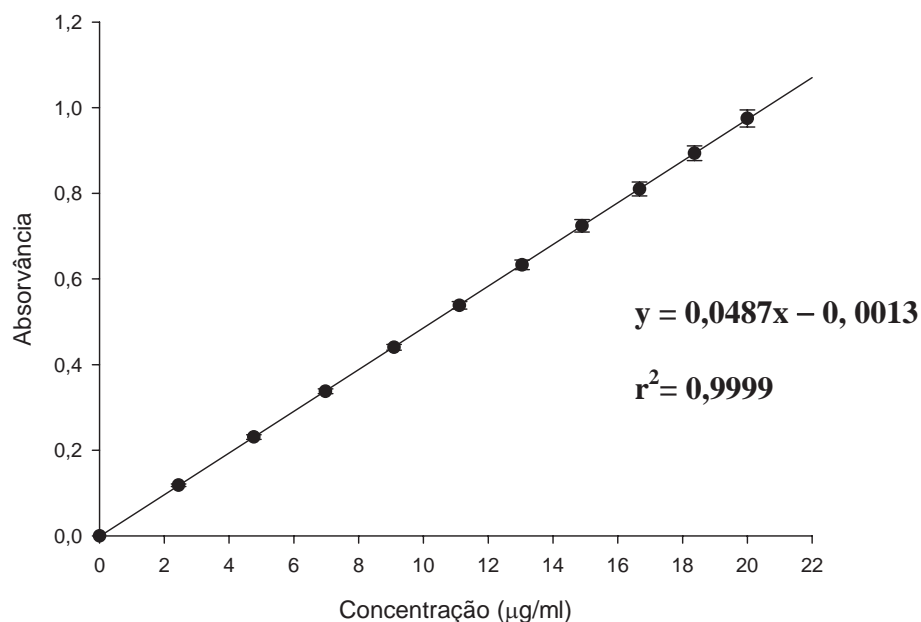


Figura 25. Curva analítica da cafeína em etanol, obtida por espectrofotometria a 273 nm (n = 3).

Tabela 3. Valores das absorvâncias das soluções de cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, obtidos por espectrofotometria no comprimento de onda de 273 nm.

Concentração $\mu\text{g/ml}$	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	$\pm s$ *	CV % **
0,00	0,0000	0,0000	0,0000	0,000	0,0000	0,0000
2,44	0,1326	0,1292	0,1267	0,130	0,0030	2,2868
4,76	0,2583	0,2509	0,2460	0,252	0,0062	2,4598
6,98	0,3773	0,3654	0,3607	0,368	0,0086	2,3263
9,09	0,4902	0,4767	0,4809	0,483	0,0069	1,4316
11,11	0,5991	0,5842	0,5815	0,588	0,0095	1,6113
13,04	0,7021	0,6824	0,6817	0,689	0,0116	1,6815
14,89	0,8018	0,7793	0,7726	0,785	0,0153	1,9496
16,67	0,8970	0,8734	0,8664	0,879	0,0160	1,8241
18,37	0,9863	0,9576	0,9578	0,967	0,0165	1,7072

* desvio padrão

** coeficiente de variação

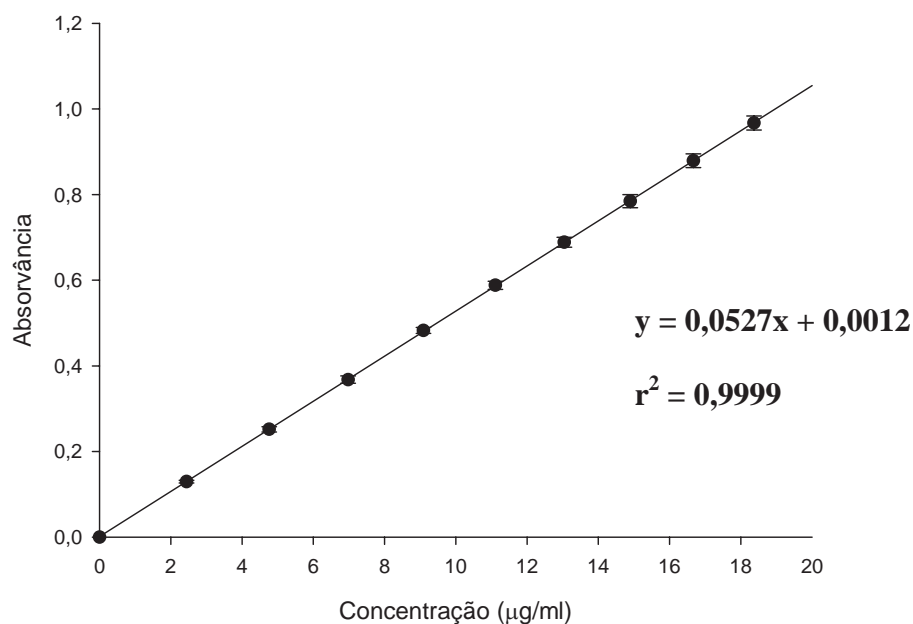


Figura 26. Curva analítica da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, obtida por espectrofotometria a 273 nm ($n = 3$).

4.2. Diagrama de fases

O método escolhido para a construção do diagrama de fases foi o método da titulação, por apresentar a vantagem da possibilidade do estudo de grande número de pontos com relativa rapidez, visto que as preparações adquirem o equilíbrio rapidamente. Foi necessária, porém, a preparação de amostras de diferentes composições para a completa definição do diagrama.

Após as titulações aquosas, foi calculada a concentração de cada componente utilizado em cada ponto preparado e detectada, visualmente, a formação de diversas fases. Esses pontos foram colocados em gráficos (diagrama ternário) para a obtenção do diagrama de fases, sendo as concentrações de cada um dos componentes transformadas em porcentagem. Esse diagrama está apresentado na figura 27.

As regiões delimitadas no diagrama de fases foram sistema microestruturado líquido (ML), sistema microestruturado viscoso (MV), sistema semitransparente (ST), sistema emulsionado (SE), separação de fases (SF) e encontram-se representadas na figura 28.

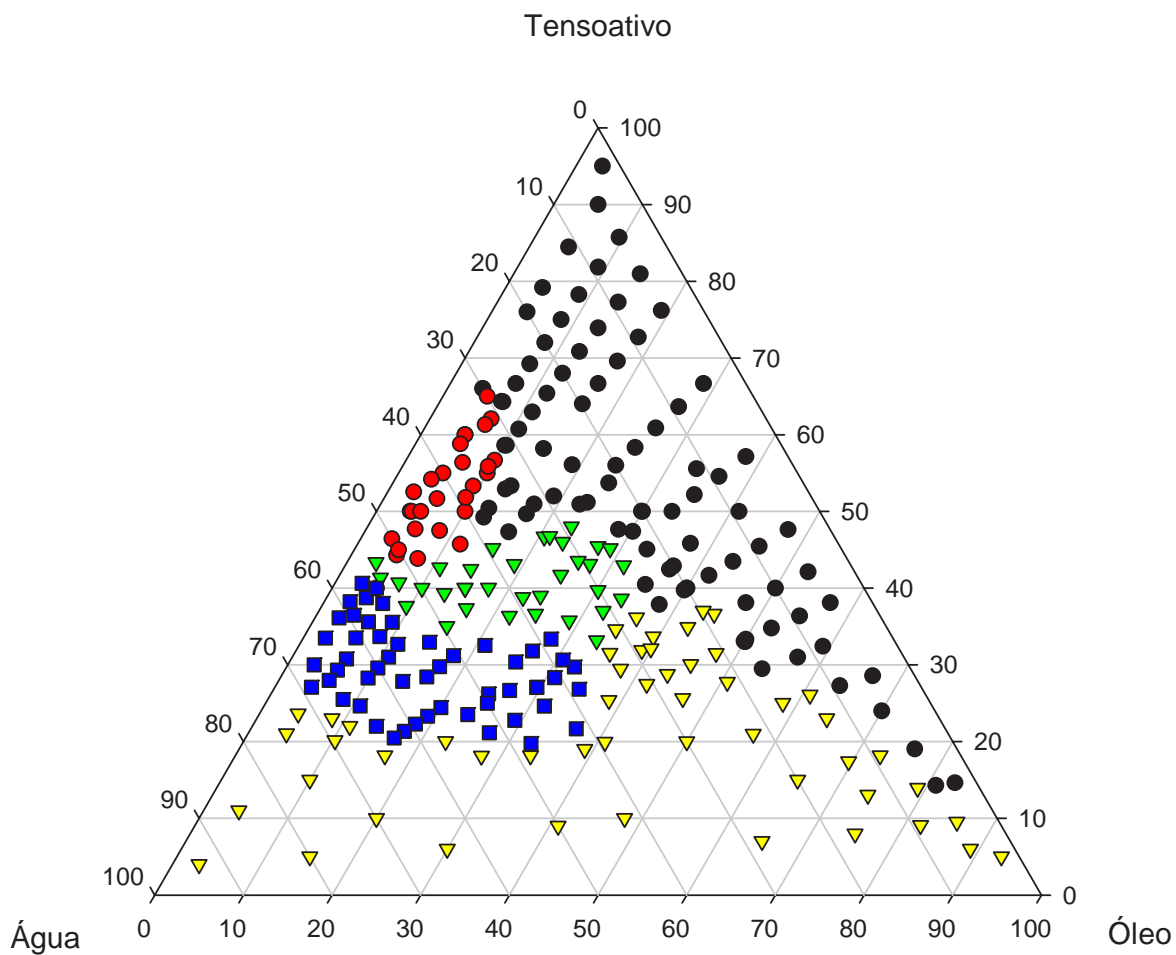


Figura 27. Diagrama de fase pontual do sistema PPG-5-Ceteth-20 (tensoativo), água (fase aquosa) e adipato de dibutila (fase oleosa). (●) sistema microestruturado líquido; (●) sistema microestruturado viscoso; (▼) sistema semitransparente; (▼) separação de fases; (■) sistema emulsionado.

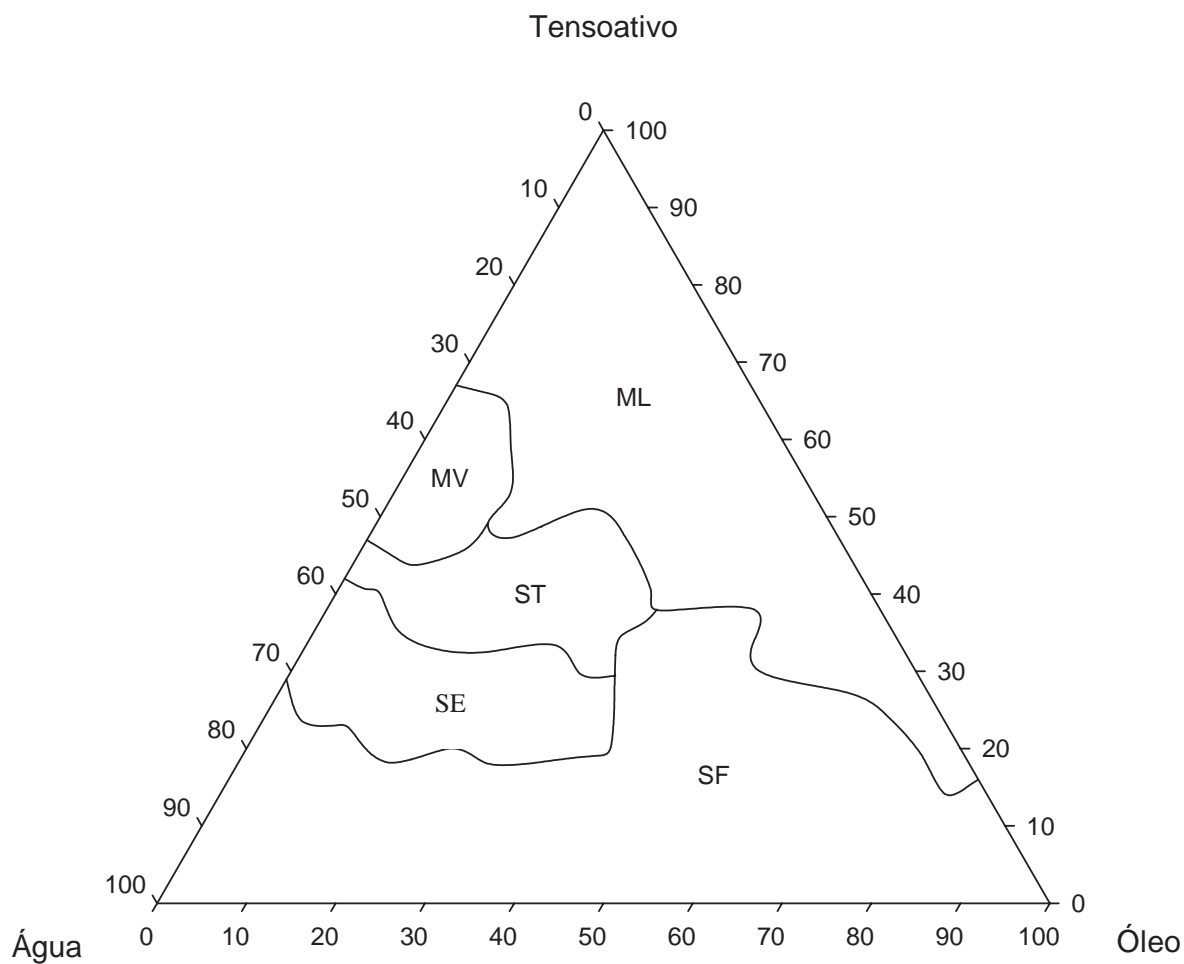


Figura 28. Diagrama de fase do sistema PPG-5-Ceteth-20, água e adipato de dibutila. ML: sistema microestruturado líquido; MV: sistema microestruturado viscoso; ST: sistema semitransparente; SE: sistema emulsionado; SF: separação de fases.

4.3. Formulações selecionadas para a caracterização física

Após a determinação das regiões do diagrama de fases, selecionaram-se as formulações cujas composições estão descritas na tabela 4 e ilustradas no diagrama (Figura 29).

Tabela 4. Composição percentual (p/p) das formulações A a K.

Formulação	Tensoativo (%)	Fase aquosa (%)	Fase oleosa (%)
A	85	10	5
B	77,5	17,5	5
C	70	25	5
D	65	30	5
E	60	35	5
F	55	40	5
G	55	35	10
H	55	30	15
I	55	20	25
J	55	10	35
K	60	30	10

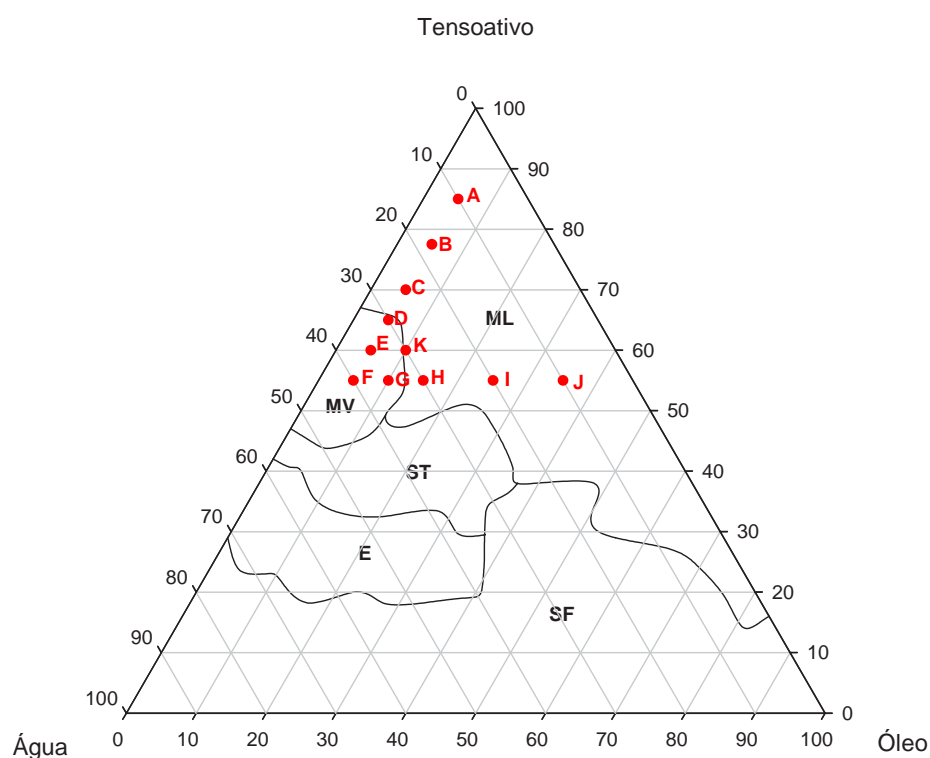


Figura 29. Diagrama ilustrando a composição das formulações escolhidas (●) para a caracterização física.

A caracterização física das formulações escolhidas foi determinada em função da variação da fase aquosa e da quantidade de tensoativo presente nas formulações. Para as formulações A., B, C, D, E e F, manteve-se constante a proporção de fase oleosa e variou-se a proporção de fase aquosa e de tensoativo. Para as formulações F, G, H, I e J, a proporção de tensoativo foi mantida constante e variou-se a proporção de fase oleosa e fase aquosa. O ponto K foi caracterizado para avaliar mais um ponto de transição de microemulsão líquida para viscosa.

A cafeína foi incorporada na concentração de 1,5% nas preparações D, H e K. Estudo do comportamento reológico, determinação do índice de refração e microscopia de luz polarizada foram os ensaios empregados para a caracterização dessas formulações.

4.4. Caracterização física das formulações

4.4.1. Microscopia de luz polarizada

As fotomicrografias obtidas nas análises de microscopia de luz polarizada estão representadas nas figuras 30 a 40. O aumento empregado foi de 200 vezes para todas as fotomicrografias.

As figuras 30, 31, 32 e 39 representam respectivamente as formulações líquidas A, B, C e J. Pode-se observar nas fotomicrografias um sistema isotrópico (campo escuro), ou seja, não desviaram a luz sob o plano de luz polarizada. Como são sistemas líquidos, pode-se sugerir sua classificação como sistemas microemulsionados.

As formulações viscosas D, E, F e G são sistemas com arranjo interno anisotrópico (desviam o plano de luz polarizada) com a presença de estrias características, semelhantes ao exibido pela fase hexagonal, como pode ser observado nas fotomicrografias (Figuras 33, 34, 35 e 36, respectivamente).

As formulações líquidas H e I apresentaram arranjo anisotrópico característico de fase lamelar com o aparecimento das “cruzes-de-malta” (Figuras 37 e 38).

Já a formulação K, presente na região de transição de fases, apresentou vestígios de arranjo anisotrópico característico de fase hexagonal, com tendência a tornar-se anisotrópica com estrias com o passar do tempo (Figura 40).

Para as formulações C, D, H e K, acrescidas de cafeína, foram verificadas as mesmas características quando observadas na ausência do fármaco. Assim, a incorporação do fármaco não interferiu na estruturação das fases.

As setas, presentes em cada fotomicrografia que exibe campo escuro, destacam a presença de bolhas para evidenciar os sistemas isotrópicos.



Figura 30. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação A. A seta indica parte de uma bolha para evidenciar o campo escuro.



Figura 31. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação B. A seta indica parte de uma bolha para evidenciar o campo escuro.



Figura 32. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação C. A seta indica parte de uma bolha para evidenciar o campo escuro.

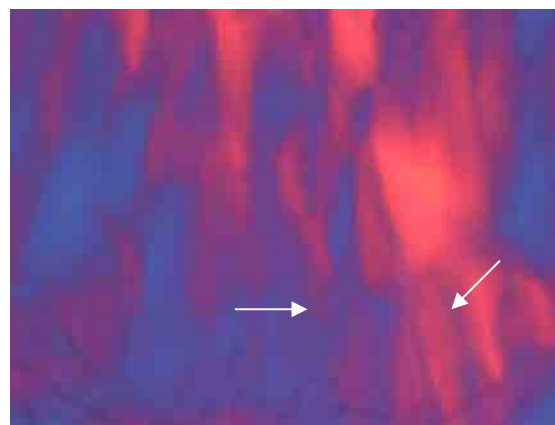


Figura 33. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação D. As setas indicam as estruturas que representam o arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal.

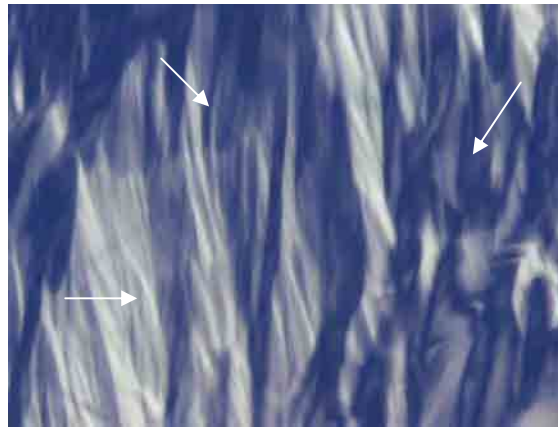


Figura 34. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação E. As setas indicam as estruturas que representam o arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal (presença de estrias).

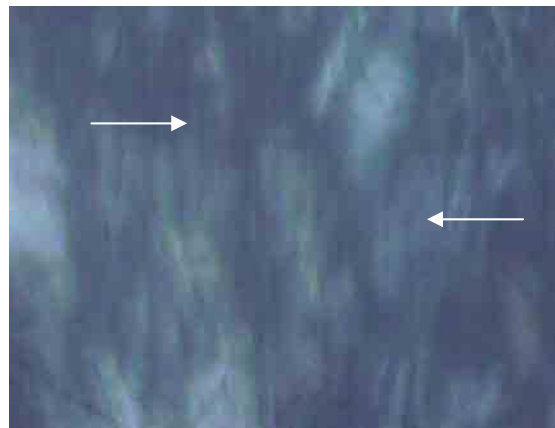


Figura 35. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação F. As setas mostram as estruturas que representam o arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal (presença de estrias).

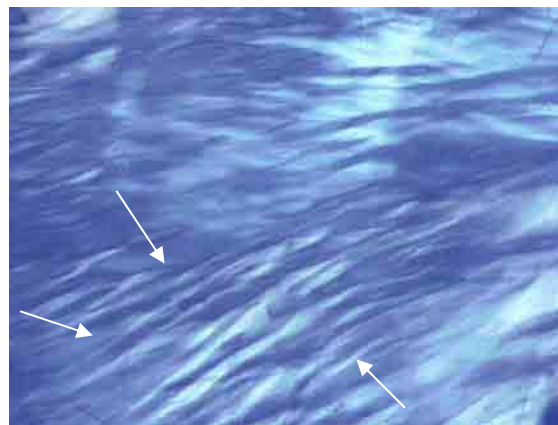


Figura 36. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação G. As setas indicam as estruturas que representam arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal (presença de estrias).

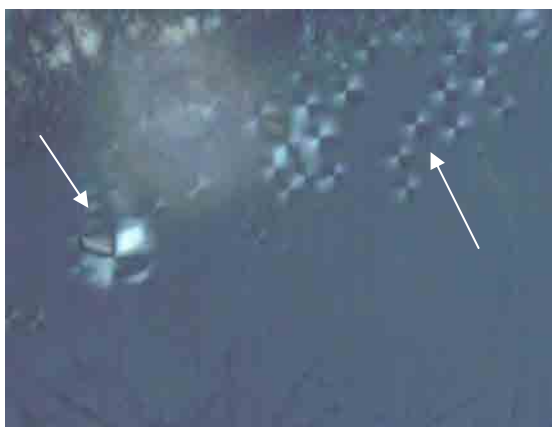


Figura 37. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação H. As setas indicam as estruturas que representam arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase lamelar (presença de cruze-de-malta).

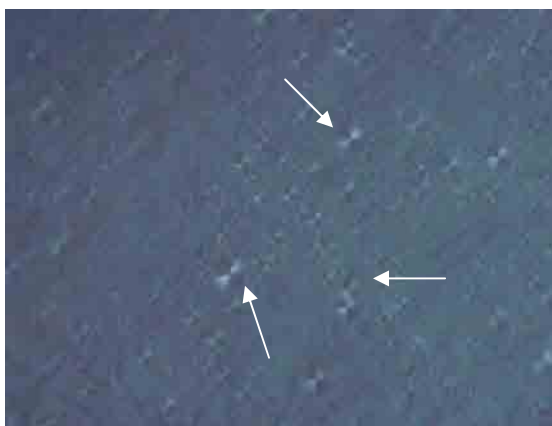


Figura 38. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação I. As setas mostram as estruturas que representam arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase lamelar (presença de cruze-de-malta).

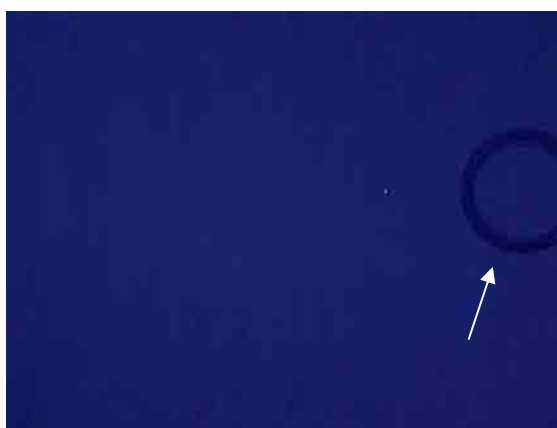


Figura 39. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação J. A seta indica parte de uma bolha para evidenciar o campo escuro.

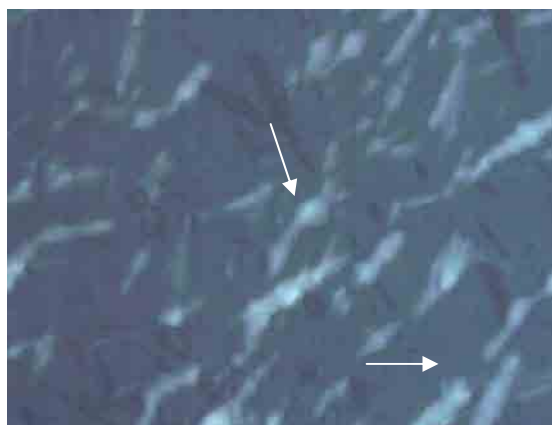


Figura 40. Fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação K. As setas mostram as estruturas que representam arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal (início de formação).

4.4.2. Determinação do índice de refração

Na tabela 5 encontram-se médias dos índices de refração determinados para as formulações estudadas juntamente com o desvio-padrão e o coeficiente de variação dos resultados obtidos.

Os índices de refração da água, do ADP e PRO são respectivamente 1,3330; 1,4350 e 1,4620.

As formulações acrescidas de cafeína apresentaram índice de refração semelhante aos encontrados para as formulações isentas de fármaco.

Tabela 5. Índices de refração das formulações estudadas (n = 3).

Ensaio		Amostras										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Índice de refração	Média	1,451	1,444	1,436	1,430	1,424	1,415	1,424	1,427	1,435	1,442	1,427
	$\pm s$ *	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,004	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002
	CV % **	0,040	0,080	0,080	0,107	0,070	0,248	0,081	0,000	0,080	0,069	0,107

* desvio padrão

** coeficiente de variação

Na figura 41 encontram-se os valores dos índices de refração das formulações comparados com os valores dos índices de refração da água, do ADP e PRO.

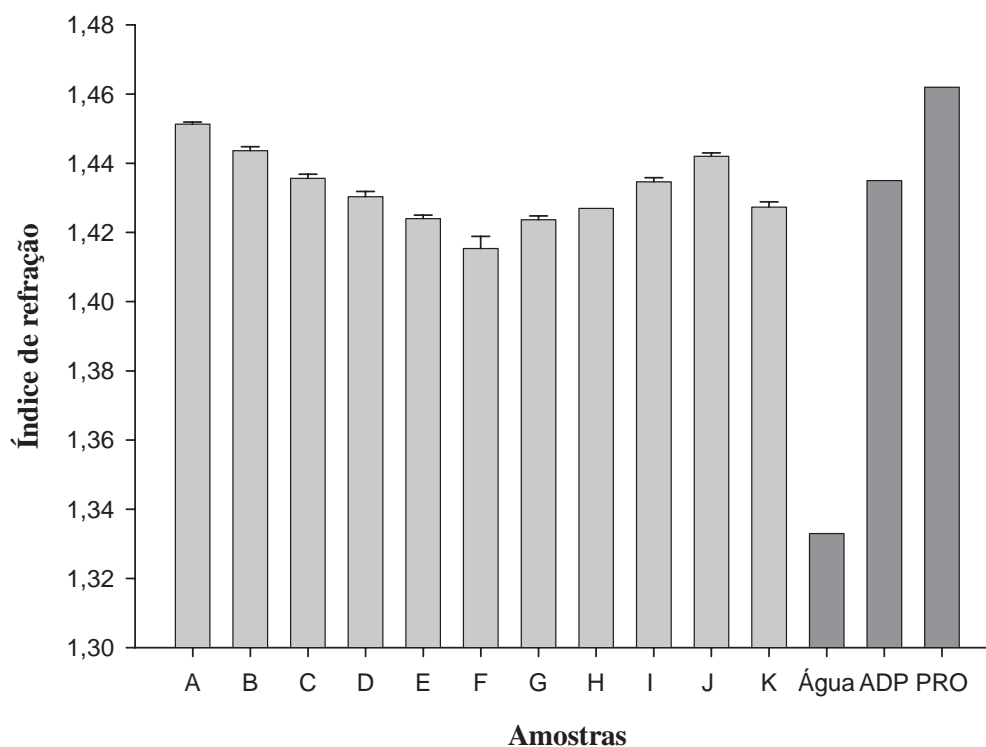


Figura 41. Representação esquemática do índice de refração das formulações estudadas, da água, do ADP e do PRO.

Nas figuras 42 e 43 pode-se observar o efeito da variação de fase aquosa nos índices de refração. Os gráficos foram obtidos a partir dos valores dos índices de refração em função da porcentagem de fase aquosa das formulações estudadas.

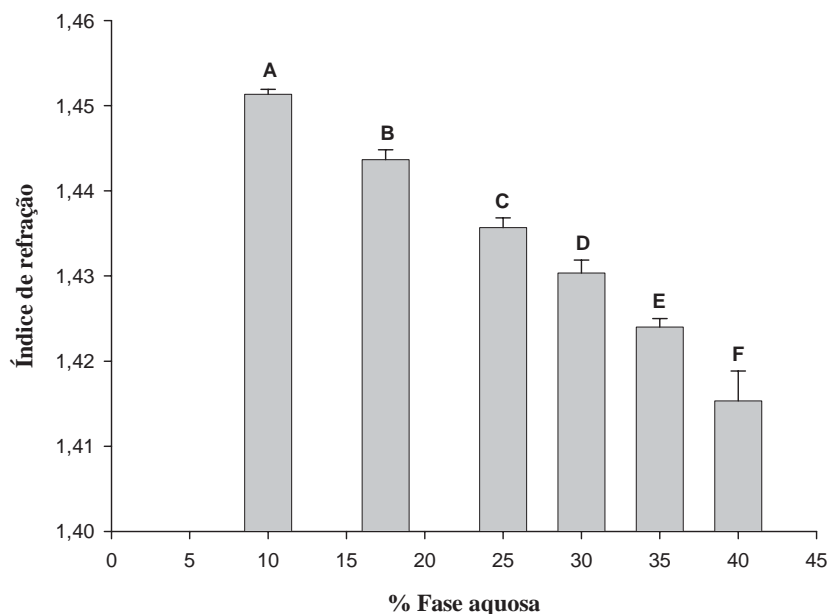


Figura 42. Representação esquemática do índice de refração dos sistemas A, B, C, D, E e F.

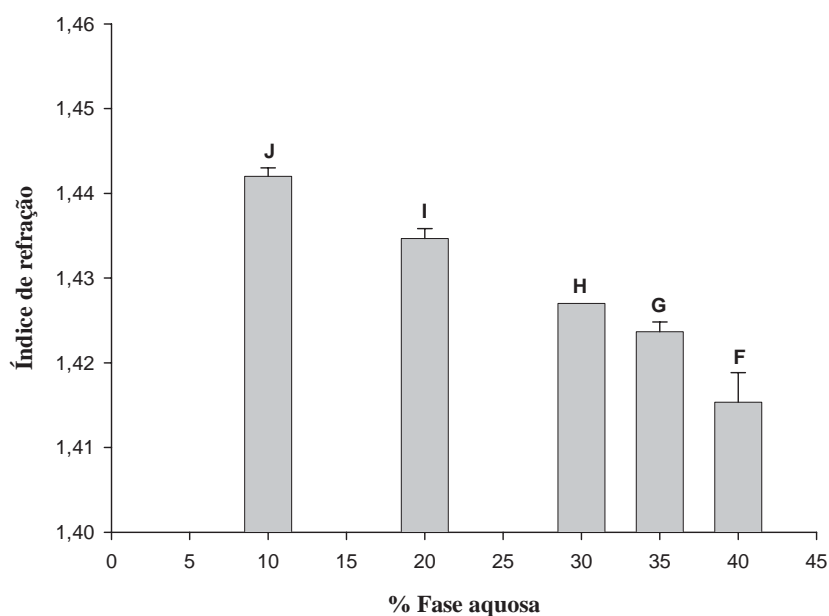


Figura 43. Representação esquemática do índice de refração dos sistemas F, G, H, I e J.

4.4.3. Determinação da densidade relativa

Os resultados das determinações de densidade relativa (média dos valores obtidos), valores de desvio-padrão e coeficiente de variação estão representados na tabela 6.

As densidades relativas da água, ADP e PRO são respectivamente 1,00; 0,960 e 1,050.

Tabela 6. Densidades relativas das formulações estudadas (n = 3).

Ensaio		Amostras										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Densidade relativa (g/ml)	Média	1,045	1,049	1,050	1,049	***	***	1,043	1,038	1,027	1,017	1,043
	$\pm s$ *	0,003	0,000	0,000	0,001	***	***	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000
	CV % **	0,258	0,009	0,024	0,094	***	***	0,072	0,066	0,103	0,140	0,108

* desvio padrão

** coeficiente de variação

*** Densidade relativa não determinada devido à alta viscosidade da formulação.

O gráfico representado na figura 44 foi obtido com os valores de densidade relativa encontrados para as formulações escolhidas, comparando-se com os valores da densidade relativa da água, do ADP e do PRO.

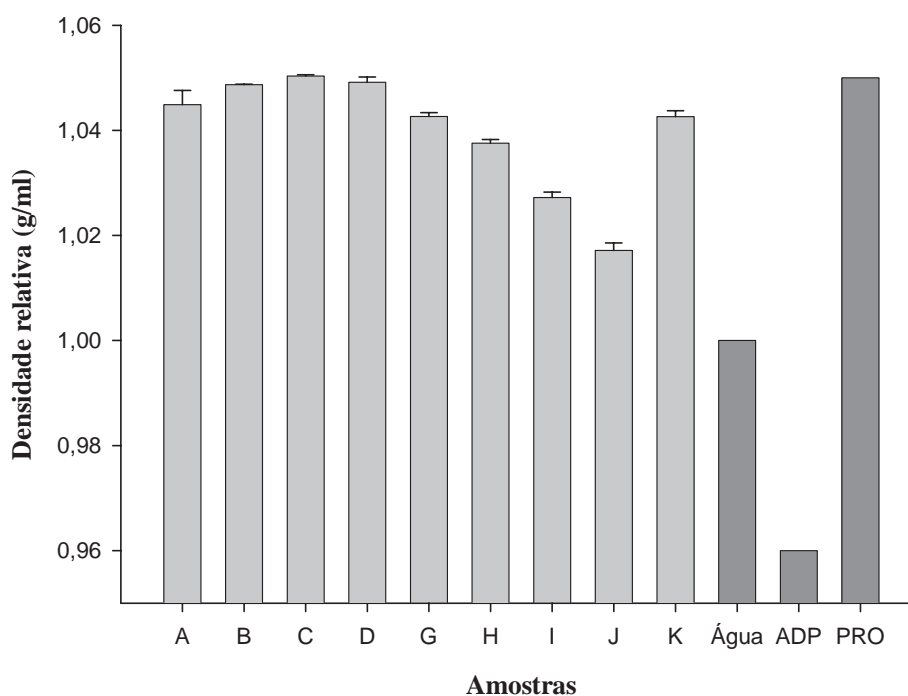


Figura 44. Representação esquemática da densidade relativa das formulações estudadas, da água, do ADP e do PRO.

Nas figuras 45 e 46 pode-se observar o efeito da variação da fase aquosa na densidade relativa das formulações. Os gráficos foram obtidos a partir dos valores de densidade relativa em função da porcentagem de fase aquosa das formulações estudadas.

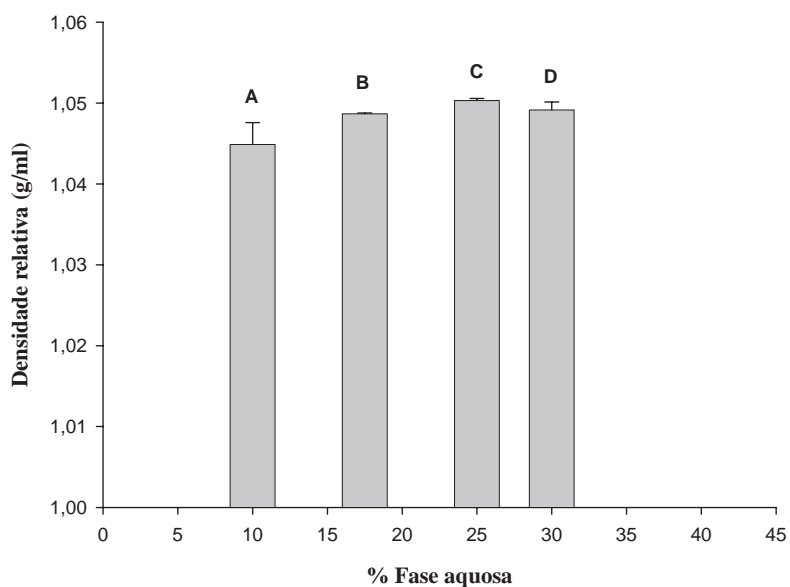


Figura 45. Representação esquemática das densidades relativas das formulações A, B, C e D.

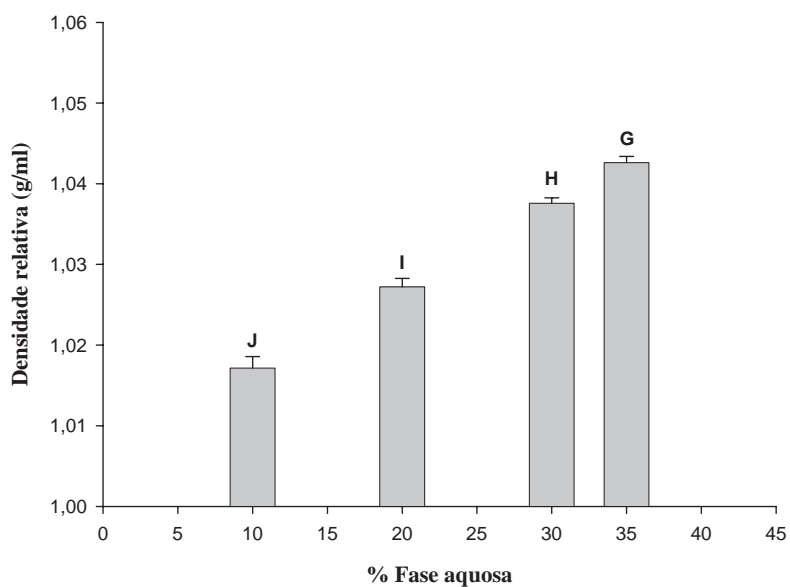


Figura 46. Representação esquemática das densidades relativas das formulações G, H, I e J.

4.4.4. Determinação da condutividade eletrolítica

Na tabela 7 estão representados os valores de condutividade em $\mu\text{S}/\text{cm}$ das formulações estudadas. Na figura 47 podem-se comparar os valores de condutividade encontrados.

Nas figuras 48 e 49 estão representados os valores de condutividade em relação à variação da fase aquosa.

Tabela 7. Condutividades eletrolíticas das formulações estudadas (n = 3).

Ensaio		Amostras										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Condutividade eletrolítica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Média	0,26	0,85	1,81	2,29	3,08	3,90	3,35	2,71	0,28	0,16	2,73
	\pm *	0,02	0,06	0,17	0,14	0,15	0,36	0,09	0,02	0,02	0,01	0,21
	CV % **	8,08	6,50	9,18	6,11	4,73	9,31	2,78	0,85	7,14	7,07	7,51

* desvio padrão

** coeficiente de variação

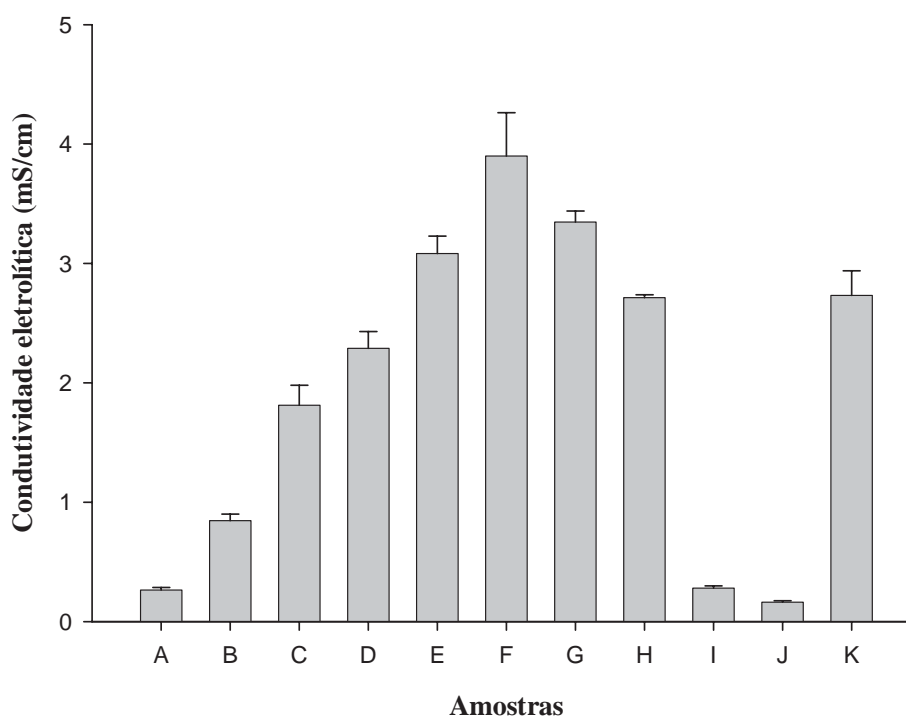


Figura 47. Representação esquemática das condutividades eletrolíticas das formulações estudadas.

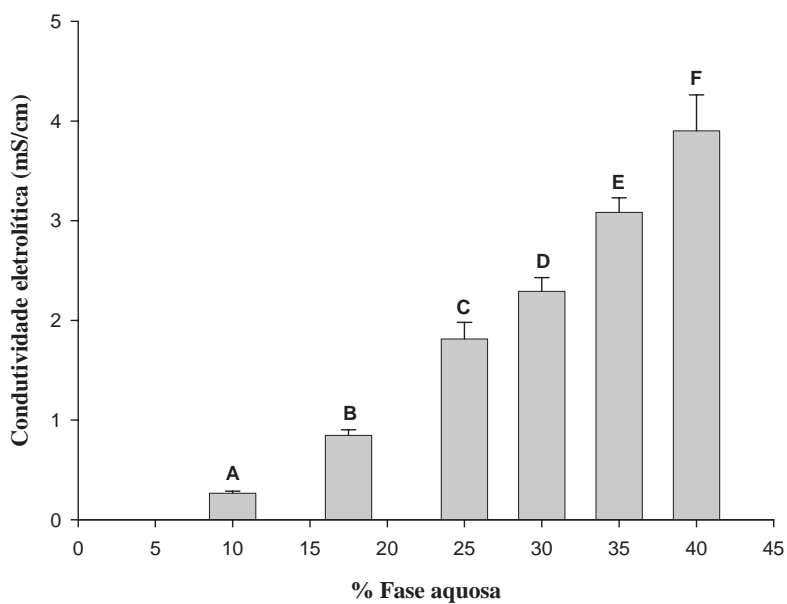


Figura 48. Representação esquemática das condutividades eletrolíticas dos sistemas A, B, C, D, E e F.

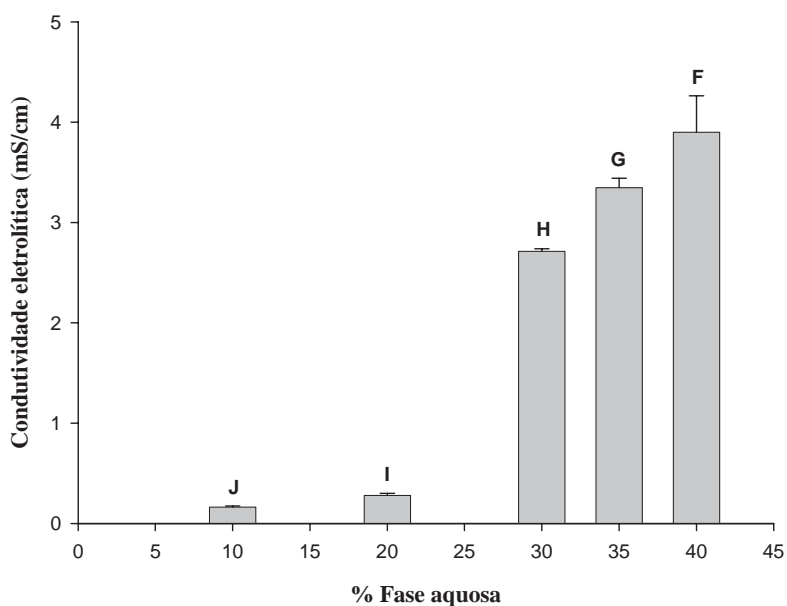


Figura 49. Representação esquemática das condutividades eletrolíticas dos sistemas F, G, H, I e J.

4.4.5. Análise do comportamento reológico

A partir dos dados obtidos da análise reológica, foram construídos os reogramas que demonstram a relação entre gradiente de cisalhamento ($1/s$) e tensão de cisalhamento (Pa)

tanto para o comportamento reológico realizado a 25°C quanto a 37°C (Figuras 48a a 58a). Também foram construídos os gráficos que relacionam viscosidade (Pa.s) e gradiente de cisalhamento (1/s), a 25° e 37°C (Figuras 50b a 60b).

As figuras 50 a 60 apresentam o comportamento reológico das formulações selecionadas.

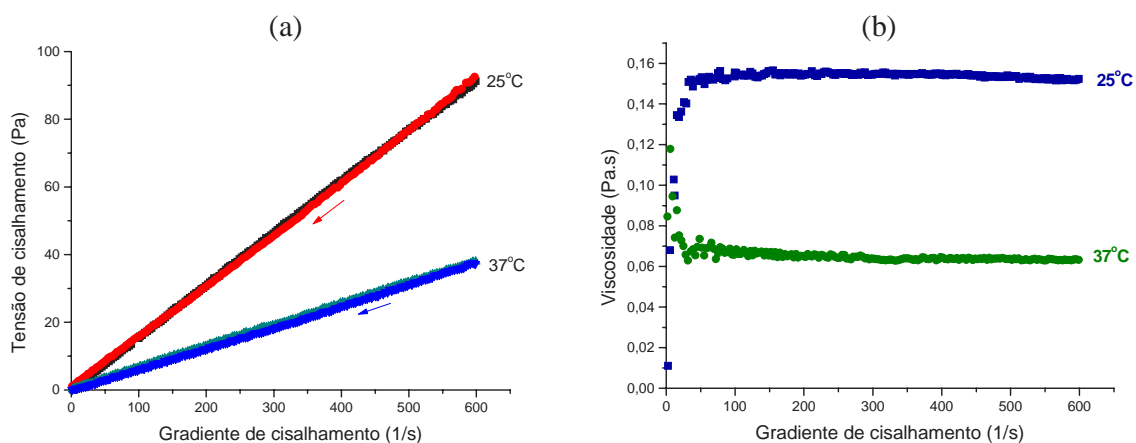


Figura 50a e b. Reogramas da formulação A, composta por 85% de PPG-5-Ceteth-20, 10% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

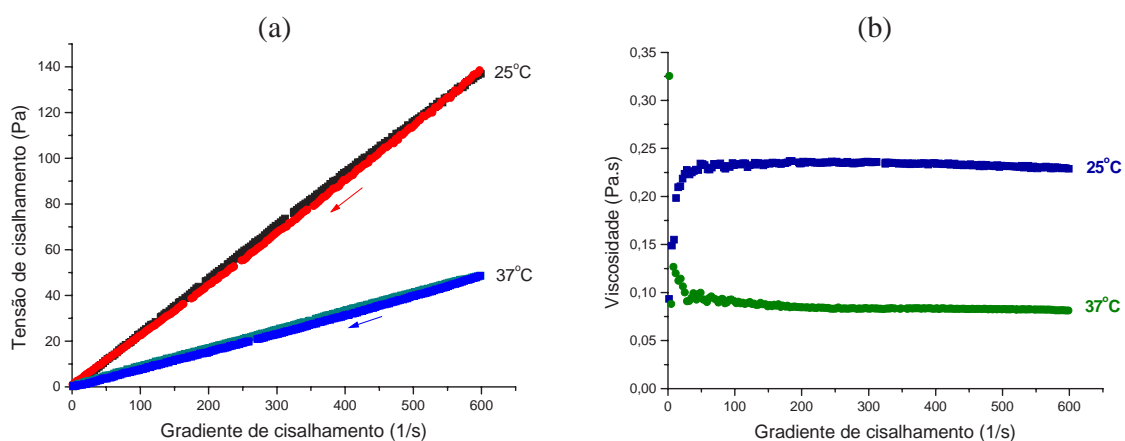


Figura 51a e b. Reogramas da formulação B, composta por 77,5% de PPG-5-Ceteth-20, 17,5% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

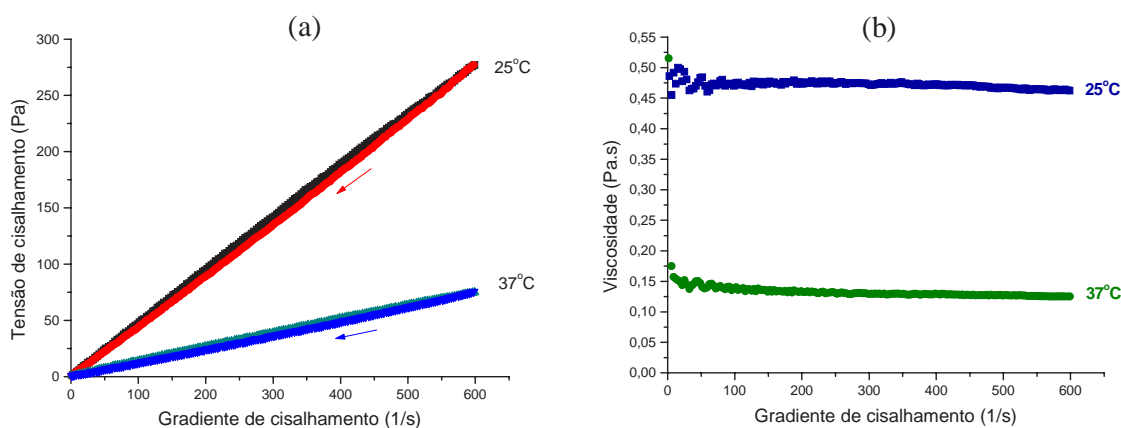


Figura 52a e b. Reogramas da formulação C, composta por 70% de PPG-5-Ceteth-20, 25% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

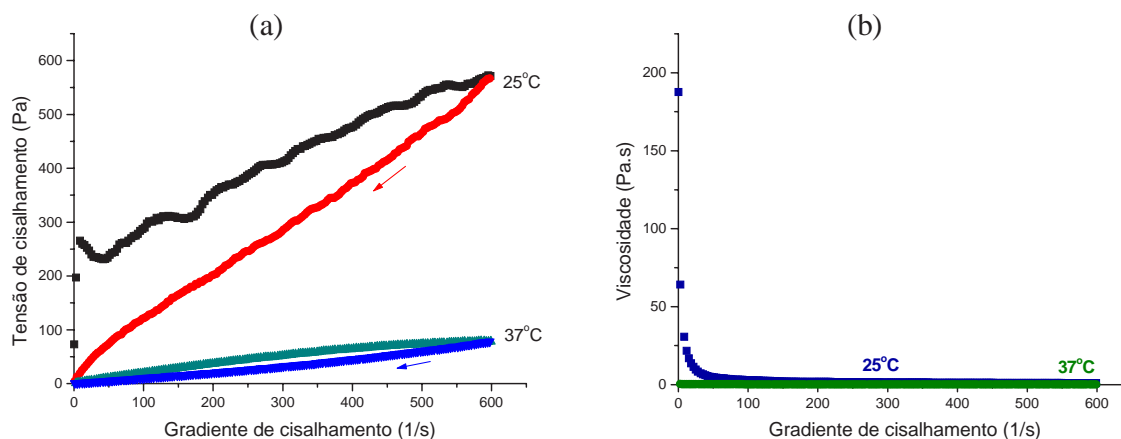


Figura 53a e b. Reogramas da formulação D, composta por 65% de PPG-5-Ceteth-20, 30% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

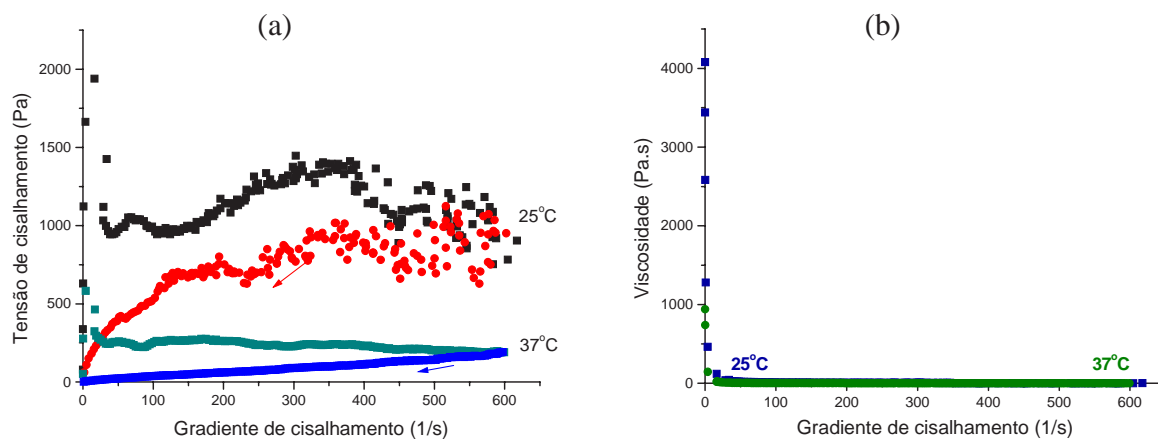


Figura 54a e b. Reogramas da formulação E, composta por 60% de PPG-5-Ceteth-20, 35% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

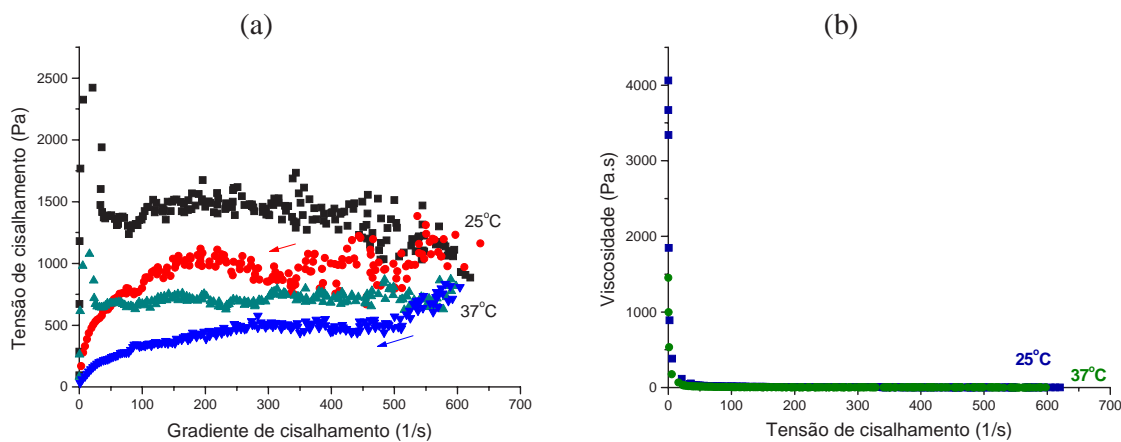


Figura 55a e b. Reogramas da formulação F, composta por 55% de PPG-5-Ceteth-20, 40% de água e 5% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

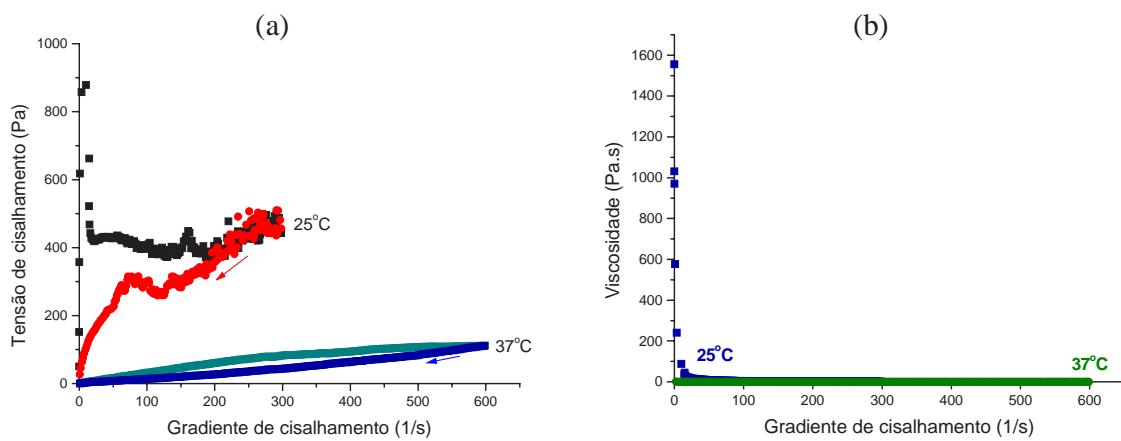


Figura 56a e b. Reogramas da formulação G, composta por 55% de PPG-5-Ceteth-20, 35% de água e 10% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

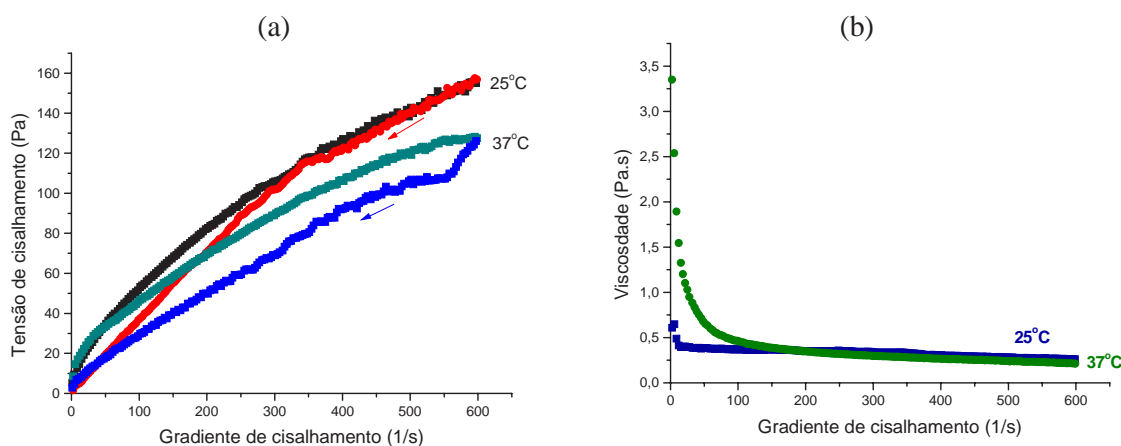


Figura 57a e b. Reogramas da formulação H, composta por 55% de PPG-5-Ceteth-20, 30% de água e 15% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

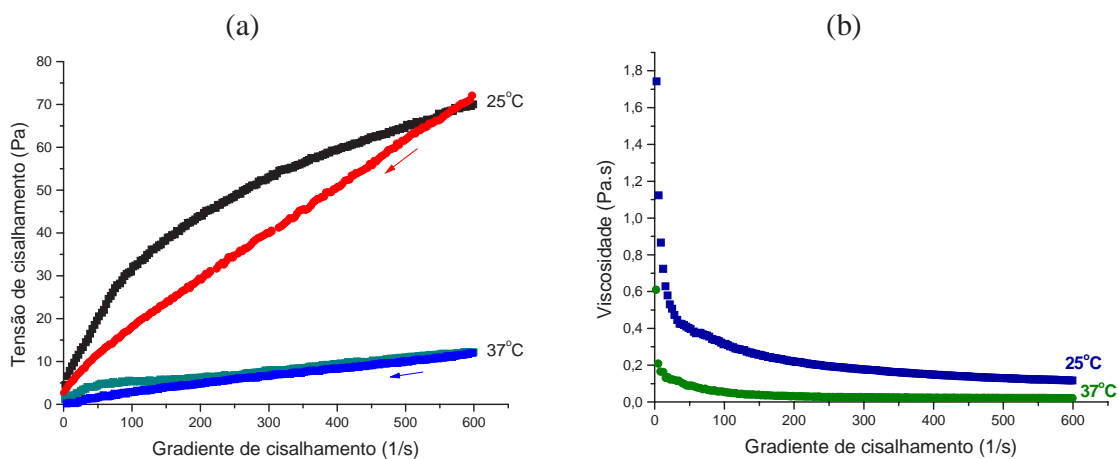


Figura 58a e b. Reogramas da formulação I, composta por 55% de PPG-5-Ceteth-20, 20% de água e 25% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

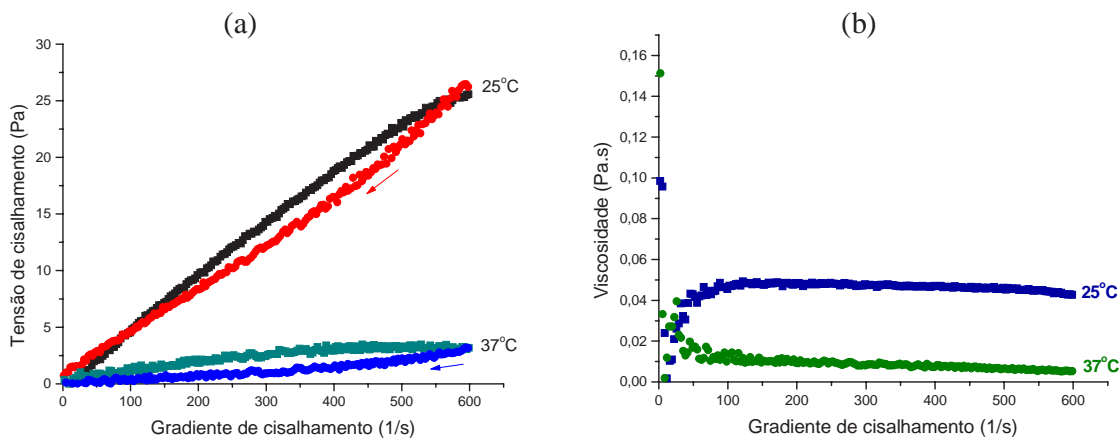


Figura 59a e b. Reogramas da formulação J, composta por 60% de PPG-5-Ceteth-20, 30% de água e 10% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

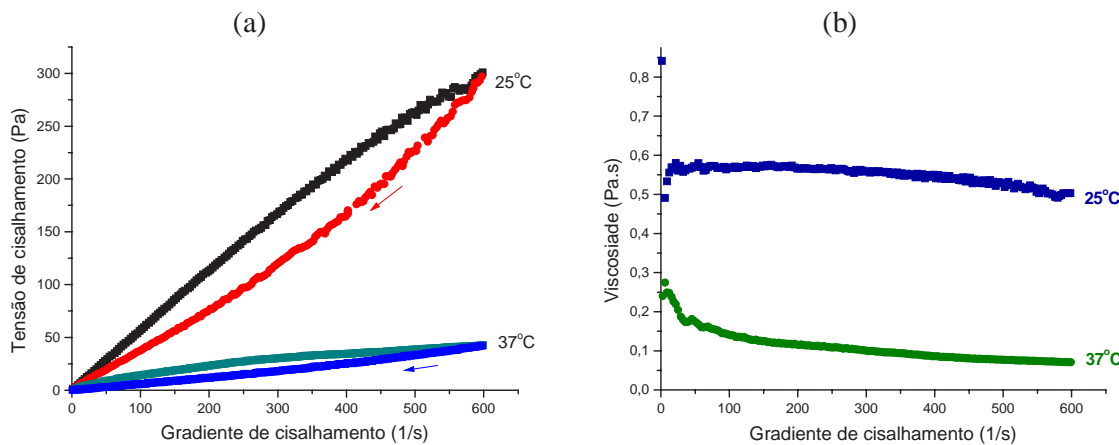


Figura 60a e b. Reogramas da formulação K, composta por 60% de PPG-5-Ceteth-20, 30% de água e 10% de adipato de dibutila a 25°C e 37°C.

O comportamento reológico das formulações C, D, H e K acrescidas de cafeína estão representados nas figuras 61, 62, 63 e 64, respectivamente.

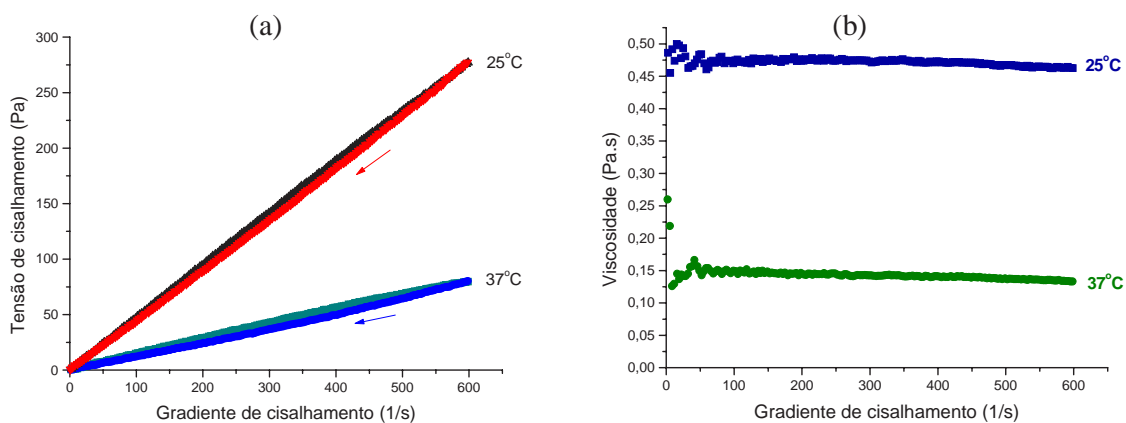


Figura 61a e b. Reogramas da formulação C, acrescida de 1,5% de cafeína a 25°C e 37°C.

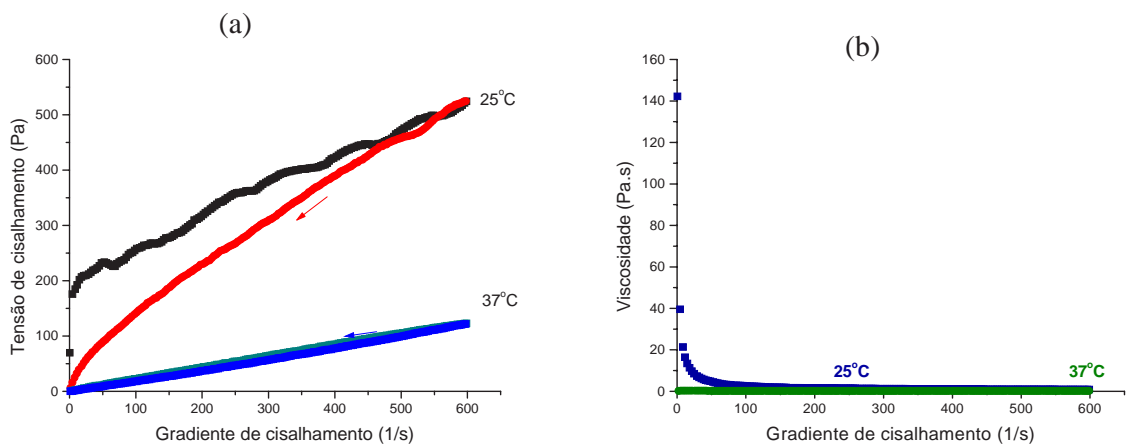


Figura 62a e b. Reogramas da formulação D, acrescida de 1,5% de cafeína a 25°C e 37°C.

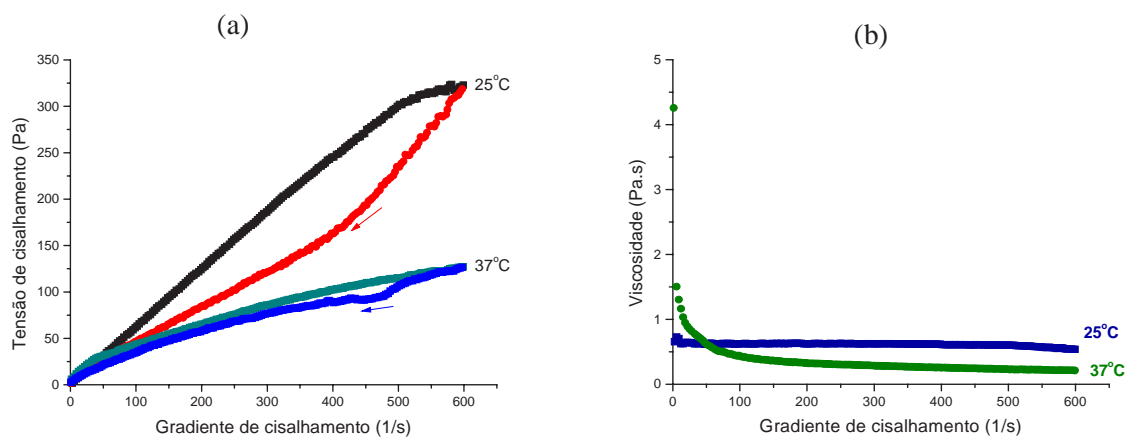


Figura 63a e b. Reogramas da formulação H, acrescida de 1,5% de cafeína a 25°C e 37°C.

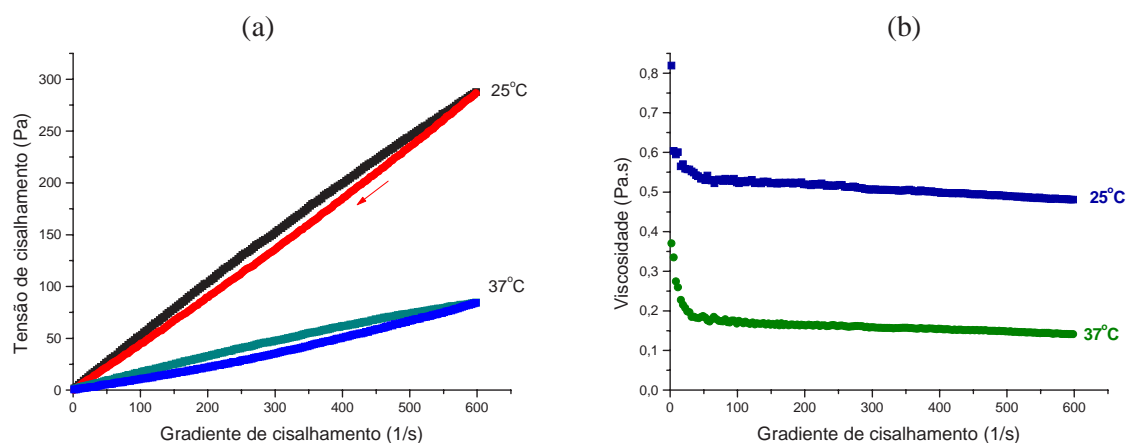


Figura 64a e b. Reogramas da formulação K, acrescida de 1,5% de cafeína a 25°C e 37°C.

A figura 65 ilustra a relação entre viscosidade e temperatura. O gradiente de cisalhamento foi fixado em 185 1/s e obtiveram-se leituras nas temperaturas de 25°C e 37°C para todas as formulações estudadas.

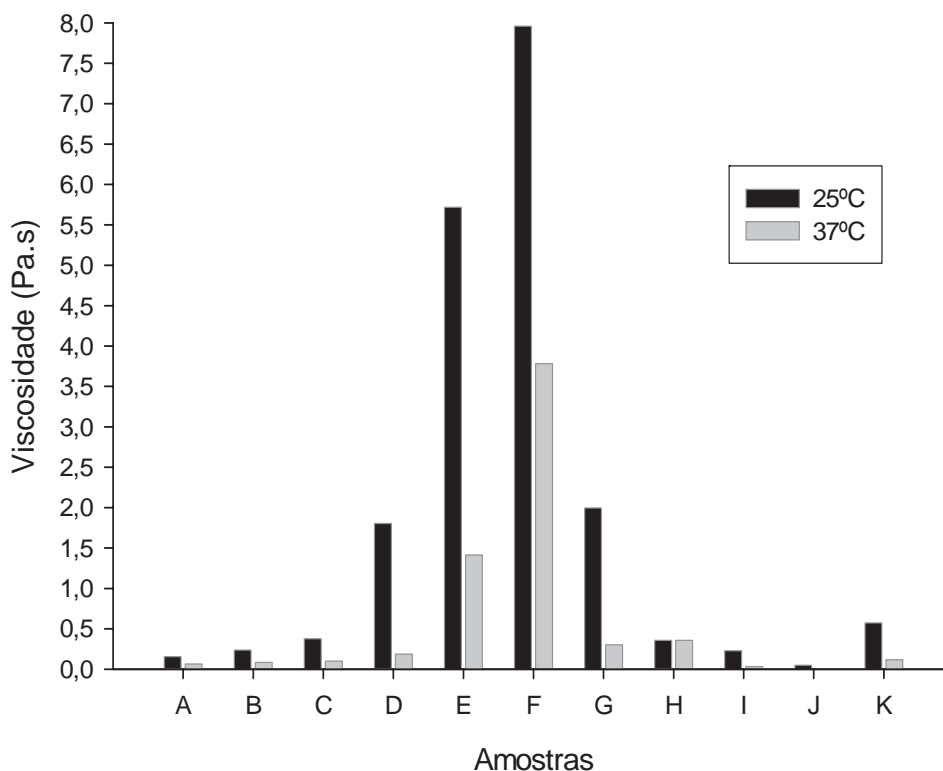


Figura 65. Viscosidades comparativas das formulações estudadas, gradiente de cisalhamento de 185 1/s, temperatura de 25°C e 37°C.

4.5. Determinação da solubilidade da cafeína nos componentes da formulação

Na tabela 8 encontra-se a concentração máxima ($n = 3$) de cafeína que foi possível incorporar nos componentes da formulação. As concentrações de cafeína foram calculadas a partir das equações da reta obtidas pela curva analítica em água (solubilidade em água) e em etanol (solubilidade em ADP, PRO) por espectrofotometria.

Tabela 8. Solubilidade da cafeína nos componentes da formulação.

	Solubilidade da cafeína (mg/ml)		
	Água destilada	ADP	PRO
n = 3	19,508	5,548	5,712
	20,824	5,457	5,648
	20,595	6,118	6,188
Média	20,309	5,708	5,850
± s *	0,703	0,359	0,295
CV % **	3,463	6,281	5,045

* desvio-padrão

** coeficiente de variação

4.6. Determinação da solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5

A partir da equação da reta obtida pela curva analítica da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 por espectrofotometria e do valor da absorvância das soluções de fármaco em tampão, mantidas sob agitação por 48 horas, calculou-se a quantidade de cafeína solúvel no tampão. Os resultados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5.

Solubilidade da cafeína (mg/ml)	
Tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,5	
n = 3	21,167
	19,499
	21,386
Média	20,68
$\pm s$ *	1,03
CV% **	4,99

* desvio-padrão

** coeficiente de variação

4.7. Determinação da solubilidade da cafeína em formulações C, D, H e K

Na tabela 10 estão indicados os valores das concentrações máximas de cafeína possíveis de serem incorporadas nas formulações selecionadas (C, D, H e K).

A figura 66 demonstra uma comparação entre os valores de solubilidade da cafeína nos componentes da formulação e nas formulações selecionadas.

Tabela 10. Solubilidade da cafeína nas diferentes formulações.

Solubilidade da cafeína (mg/ml)				
	Formulação C	Formulação D	Formulação H	Formulação K
n = 3	14,420	16,263	15,513	16,240
	13,369	16,154	14,598	15,242
	12,769	15,774	15,444	14,811
Média	13,519	16,064	15,185	15,431
$\pm s$ *	0,837	0,257	0,510	0,733
CV% **	6,188	1,597	3,357	4,751

* desvio-padrão

** coeficiente de variação

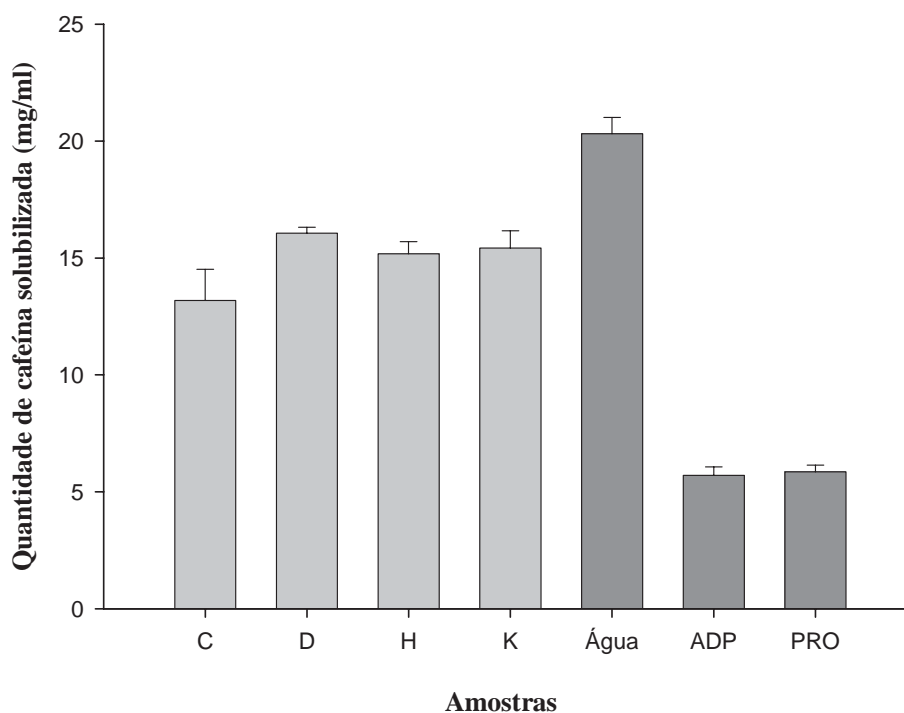


Figura 66. Solubilidade da cafeína em diferentes formulações e nos seus respectivos componentes.

4.6. Determinação do coeficiente de partição óleo/água

A partir da equação da reta obtida pela curva analítica da cafeína em água por espectrofotometria, foram calculadas as concentrações das soluções aquosas de cafeína antes (C_1) e depois (C_2) da partilha. Os valores das C_1 e C_2 , do coeficiente de partição octanol/água (K_{OCT/H_2O}), bem como do log de K , estão na tabela 11.

Tabela 11. Coeficiente de partição octanol/água para a cafeína ($n = 3$).

C_1	C_2	K_{OCT/H_2O}	Log K
$11,63 \pm 0,09$ mg/ml	$6,81 \pm 0,04$ mg/ml	0,708	-0,150

4.7. Perfil da liberação *in vitro*

Os valores das absorvâncias obtidos foram aplicados na equação da reta determinada pela curva analítica da cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 com a

finalidade de obter-se a quantidade de cafeína liberada. Nas tabelas 12, 13, 14, 15 e 16 encontram-se as quantidades de cafeína liberadas no meio receptor a partir de uma solução em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 e das formulações C, D, H e K. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os perfis de liberação da cafeína podem ser observados no gráfico da quantidade liberada no meio receptor (mg) em função do tempo (minutos) para cada uma das preparações utilizadas no experimento (Figura 67).

Tabela 12. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir de uma solução de cafeína 1,5% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 em função do tempo (minutos).

Tempo (min)	Quantidade liberada (mg)	$\pm s$ (mg)	CV%	Quantidade liberada (%)
15	0,802	0,033	4,11	26,74
30	1,381	0,040	2,88	46,02
45	1,822	0,038	2,11	60,73
60	2,127	0,027	1,26	70,89
75	2,376	0,068	2,84	79,19
90	2,556	0,046	1,79	85,21
105	2,694	0,049	1,82	89,79
120	2,780	0,047	1,70	92,66
150	2,889	0,038	1,30	96,31
180	2,948	0,045	1,53	98,26
210	2,966	0,029	0,96	98,85
240	2,985	0,021	0,72	99,50
270	2,966	0,048	1,60	98,86
300	2,980	0,004	0,15	99,34
330	2,984	0,025	0,83	99,46
360	2,983	0,015	0,51	99,45
390	2,989	0,002	0,06	99,65
420	2,996	0,015	0,49	99,85
480	2,970	0,031	1,04	98,99

* desvio-padrão

** coeficiente de variação

Tabela 13. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir da formulação C, acrescida de 1,5% de cafeína em função do tempo (minutos).

Tempo (min)	Quantidade liberada (mg)	$\pm s$ (mg)	CV%	Quantidade liberada (%)
15	0,284	0,023	8,21	9,46
30	0,434	0,032	7,32	14,46
45	0,577	0,040	6,91	19,22
60	0,711	0,056	7,93	23,70
75	0,818	0,053	6,50	27,26
90	0,919	0,050	5,40	30,64
105	1,008	0,050	4,94	33,61
120	1,096	0,043	3,91	36,54
150	1,249	0,053	4,25	41,64
180	1,412	0,027	1,89	47,06
210	1,530	0,020	1,27	51,01
240	1,653	0,019	1,12	55,09
270	1,779	0,030	1,69	59,29
300	1,894	0,031	1,62	63,15
330	1,980	0,011	0,54	66,01
360	2,100	0,011	0,52	69,99
390	2,200	0,014	0,64	73,34
420	2,301	0,010	0,44	76,70
480	2,459	0,043	1,75	81,98

* desvio-padrão

** coeficiente de variação

Tabela 14. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir da formulação D, acrescida de 1,5% de cafeína em função do tempo (minutos).

Tempo (min)	Quantidade liberada (mg)	$\pm s$ (mg)	CV%	Quantidade liberada (%)
15	0,267	0,021	7,82	8,90
30	0,433	0,013	3,07	14,42
45	0,585	0,031	5,23	19,51
60	0,721	0,028	3,88	24,03
75	0,837	0,046	5,44	27,89
90	0,952	0,054	5,62	31,74
105	1,075	0,065	6,02	35,82
120	1,174	0,080	6,85	39,12
150	1,326	0,100	7,57	44,20
180	1,483	0,093	6,27	49,43
210	1,618	0,079	4,88	53,93
240	1,774	0,089	5,04	59,13
270	1,886	0,074	3,94	62,86
300	2,021	0,086	4,24	67,37
330	2,150	0,089	4,13	71,65
360	2,255	0,079	3,50	75,15
390	2,347	0,123	5,22	78,23
420	2,437	0,136	5,60	81,25
480	2,683	0,146	5,44	89,45

* desvio-padrão

** coeficiente de variação

Tabela 15. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir da formulação H, acrescida de 1,5% de cafeína em função do tempo (minutos).

Tempo (min)	Quantidade liberada (mg)	$\pm s$ (mg)	CV%	Quantidade liberada (%)
15	0,280	0,009	3,37	9,34
30	0,457	0,023	5,04	15,23
45	0,610	0,035	5,81	20,34
60	0,744	0,049	6,57	24,81
75	0,862	0,058	6,76	28,74
90	0,983	0,052	5,32	32,78
105	1,075	0,048	4,42	35,85
120	1,184	0,050	4,18	39,46
150	1,359	0,059	4,34	45,30
180	1,521	0,075	4,95	50,70
210	1,683	0,056	3,31	56,09
240	1,822	0,087	4,78	60,72
270	1,929	0,076	3,96	64,30
300	2,039	0,068	3,34	67,97
330	2,129	0,051	2,41	70,97
360	2,214	0,069	3,13	73,81
390	2,284	0,076	3,34	76,12
420	2,363	0,066	2,81	78,77
480	2,476	0,064	2,60	82,52

* desvio-padrão

** coeficiente de variação

Tabela 16. Quantidade de cafeína liberada no meio receptor (mg) a partir da formulação K, acrescida de 1,5% de cafeína em função do tempo (minutos).

Tempo (min)	Quantidade liberada (mg)	$\pm s$ (mg)	CV%	Quantidade liberada (%)
15	0,257	0,006	2,14	8,56
30	0,420	0,019	4,61	14,00
45	0,550	0,031	5,63	18,33
60	0,663	0,039	5,87	22,10
75	0,765	0,041	5,32	25,51
90	0,865	0,053	6,15	28,84
105	0,948	0,038	4,01	31,61
120	1,101	0,074	6,74	36,69
150	1,200	0,031	2,55	39,98
180	1,329	0,031	2,33	44,30
210	1,467	0,050	3,42	48,91
240	1,568	0,067	4,30	52,27
270	1,670	0,086	5,17	55,67
300	1,769	0,107	6,02	58,97
330	1,860	0,118	6,33	62,00
360	1,944	0,152	7,84	64,80
390	1,999	0,140	7,01	66,62
420	2,072	0,148	7,13	69,07
480	2,220	0,195	8,77	74,00

* desvio-padrão

** coeficiente de variação

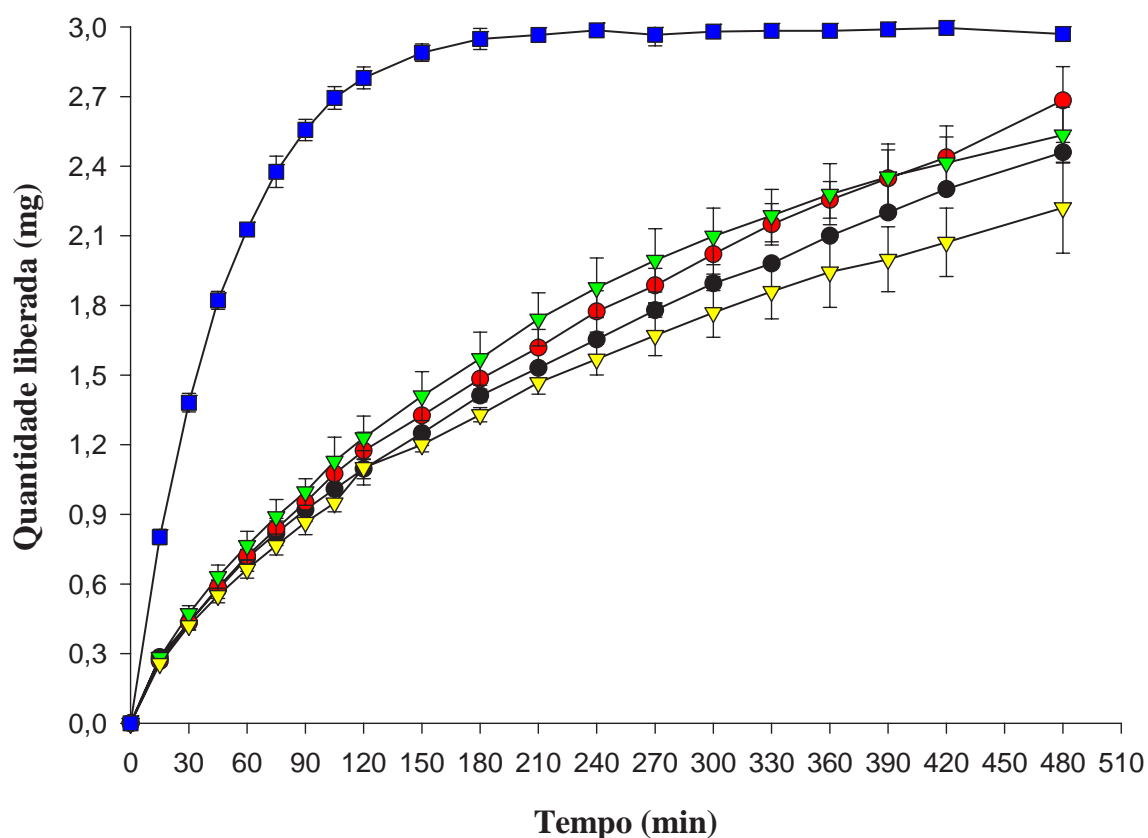


Figura 67. Perfil de liberação de cafeína (mg) em função do tempo (minutos) a partir das formulações envolvidas no estudo. (■) solução de cafeína em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5; (●) formulação C; (●) formulação D; (▼) formulação H; (▼) formulação K.

Os valores da AUC determinados pelo método do trapézioide para os dados da quantidade liberada (mg) em função do tempo (min) das repetições de cada amostra obtidos no experimento de liberação *in vitro* e utilizados no teste de variância (ANOVA), associado ao teste de Tukey-Kramer, para a comparação entre o perfil de liberação da solução e das formulações encontram-se na tabela 17.

Os resultados da análise de múltipla comparação com significância de $p < 0,05$ encontram-se na tabela 18, e a figura 68 é uma ilustração do teste de Tukey-Kramer aplicado às amostras.

Tabela 17. Área sob a curva (AUC) determinada pelo método do trapezóide a partir da curva de liberação de cada uma das repetições das amostras (n = 3).

Determinação		Amostras				
		Solução de cafeína em tampão	Formulação C	Formulação D	Formulação H	Formulação K
AUC	Média	1293,49	747,17	795,38	815,04	695,81
	± s	13,95	12,13	37,63	49,43	34,15

Tabela 18. Processo de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) entre a solução de cafeína e as formulações C, D, H e K, antecedido pela análise de variância (ANOVA).

Comparação	Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05)
solução versus K	sim
solução versus C	sim
solução versus D	sim
solução versus H	sim
H versus K	sim
H versus C	não
H versus D	não
D versus K	sim
D versus C	não
C versus K	sim

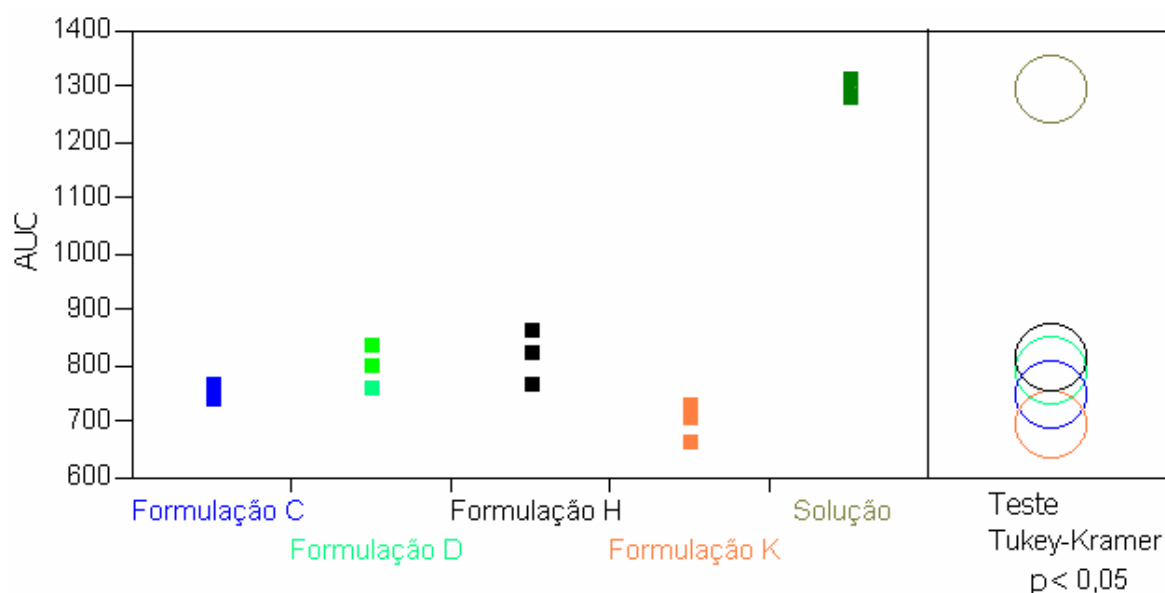


Figura 68. Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de AUC, obtidos a partir do experimento de liberação *in vitro*.

A análise da regressão linear para os dados de liberação utilizada para determinar as ordens de reação do perfil de liberação está apresentada na tabela 19. Os modelos aplicados para todos os resultados de liberação *in vitro* foram ordem zero, pseudo primeira ordem, ou Higuchi, e primeira ordem.

Para a solução de cafeína, nota-se que a liberação atinge quase 90% no tempo de 105 min, uma liberação rápida que também se enquadra no modelo de Higuchi, como pode ser observado nos valores de coeficiente de correlação obtidos para cada tipo de ordem de reação, apresentados na tabela 19.

Tabela 19. Determinação da ordem de reação de liberação da cafeína a partir de diferentes formulações, utilizando-se o parâmetro de coeficiente de correlação (r^2).

Amostra	Ordem de liberação			
	Ordem zero	Pseudo primeira ordem (Higuchi)	Primeira ordem	Ordem de liberação
solução	0,9424	0,9876	0,8461	Higuchi*
C	0,9732	0,9995	0,8205	Higuchi
D	0,9739	0,9992	0,8100	Higuchi
H	0,9517	0,9968	0,7894	Higuchi
K	0,9573	0,9983	0,7954	Higuchi

* até tempo de 105 minutos.

Como os resultados apresentados na tabela sugerem que a liberação da cafeína pelas microestruturas das formulações é controlada pelo mecanismo de difusão, conhecido como modelo de Higuchi (ou ordem de reação denominada pseudo primeira ordem), é possível, por meio de cada uma das curvas de liberação e seus respectivos dados de regressão linear, calcular o gradiente de liberação de cada uma das formulações.

As curvas exibidas na figura 69 foram construídas com os valores médios da quantidade liberada acumulada por área de contato com o meio receptor (mg/cm^2) e seus respectivos desvios-padrão em função da raiz quadrada do tempo ($\text{min}^{1/2}$) obtidos no experimento para cada formulação seguindo o modelo de Higuchi. Foram determinadas as regressões lineares, e as características de cada curva encontram-se na tabela 20.

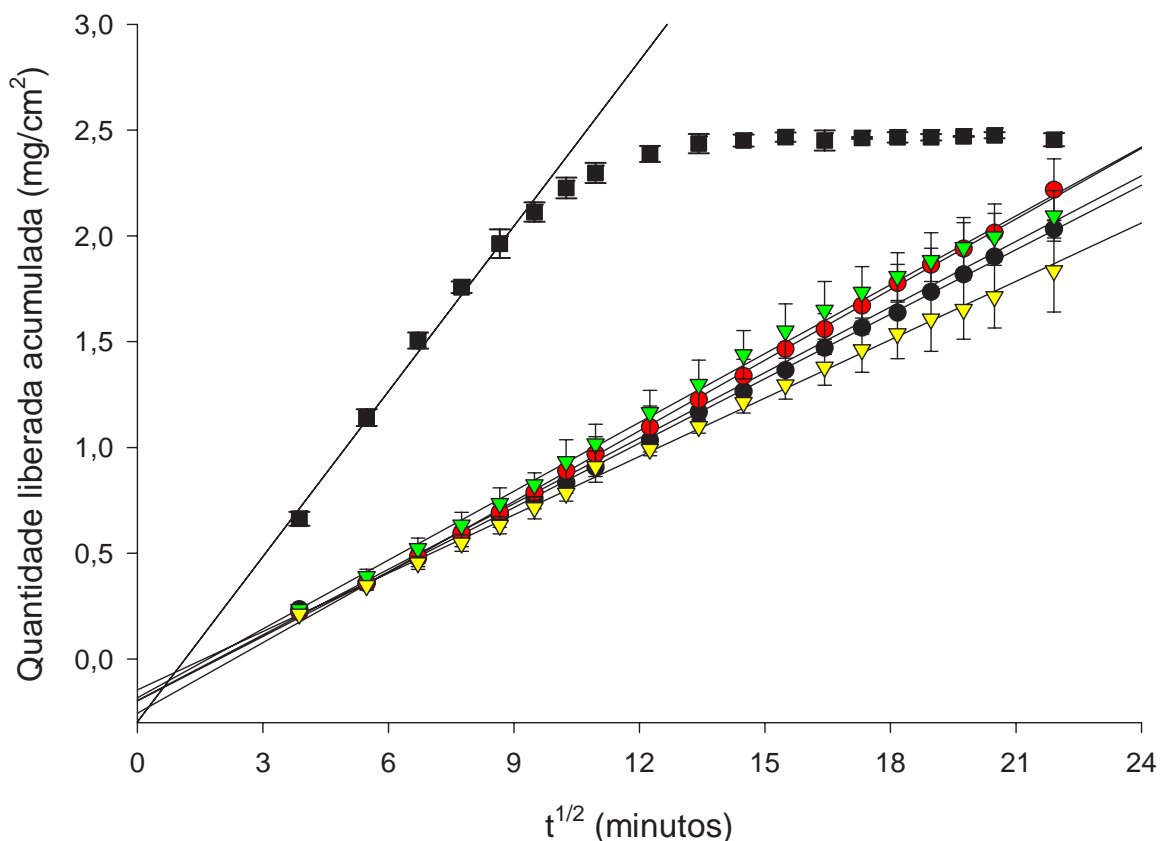


Figura 69. Curvas da quantidade liberada acumulada de cafeína (mg/cm^2) das formulações C (●), D (●), H (▼) e K (▼) e na solução (■) em função da raiz quadrada do tempo. Cada linha indica a regressão linear de sua respectiva curva, cujas características estão descritas na tabela 20.

Tabela 20. Características das regressões lineares de cada curva, obtidas através da liberação acumulativa da cafeína (mg/cm^2) versus a raiz quadrada do tempo ($\text{min}^{1/2}$).

Formulação	Gradiente (mg/cm^2 por $\text{min}^{1/2}$)	Intercepto	r^2
Solução	0,2473	-0,2200	0,9876
C	0,1016	-0,1980	0,9995
D	0,1113	-0,2561	0,9992
H	0,1084	-0,1823	0,9960
K	0,0920	-0,1462	0,9983

4.8. Estudos de permeação cutânea *in vivo* e avaliação histológica

A análise histológica revelou, nas áreas tratadas com a formulação acrescida de cafeína, aparente diminuição na espessura da camada da hipoderme superficial, quando comparada com as áreas controle e formulação sem cafeína (Figura 70).

Notou-se também achatamento dos feixes adipócitos, circundados por septos de tecido conjuntivo que compõem a hipoderme, devido provavelmente à ocorrência de destruição celular, alteração da forma e diminuição do volume dos adipócitos, características que podem ser observadas na figura 71.

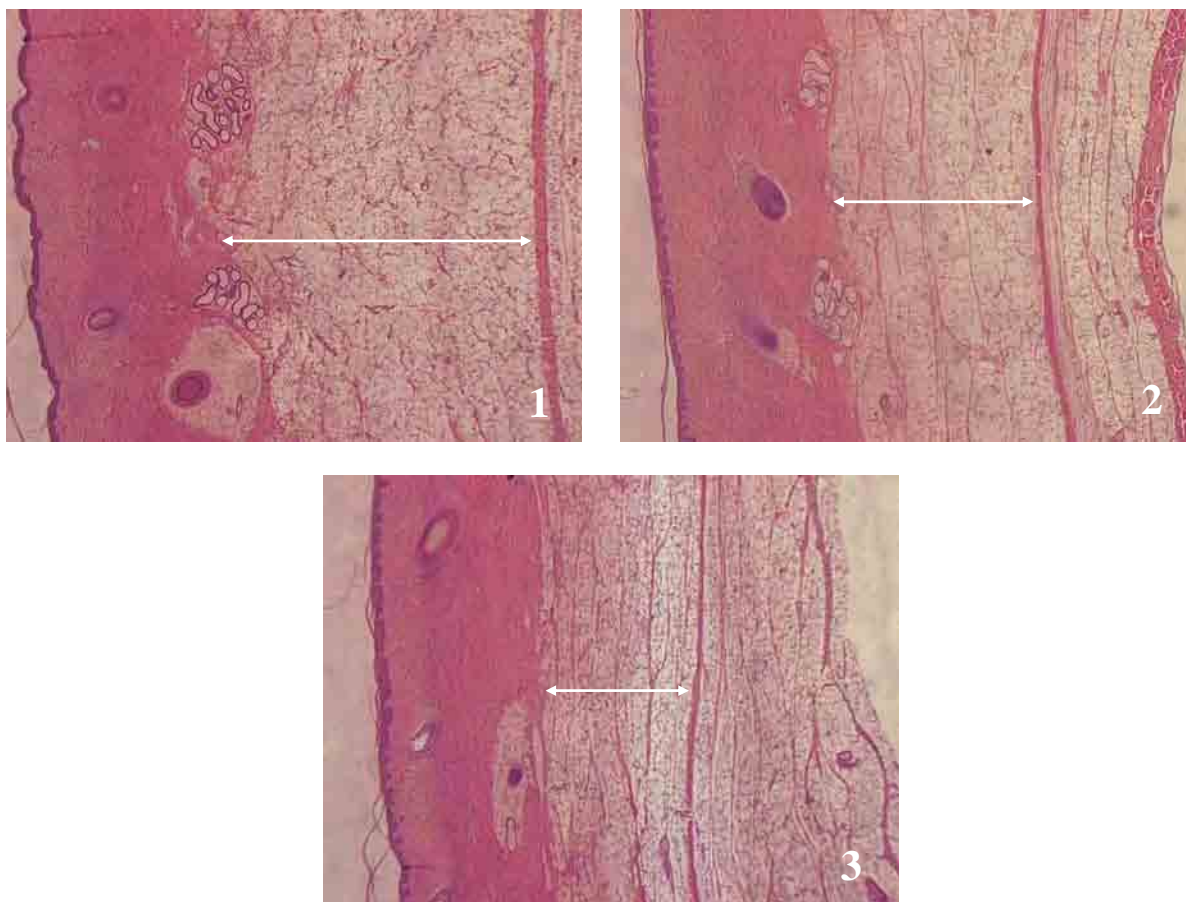


Figura 70. Fotomicrografias da pele e hipoderme de suínos machos que sofreram diferentes tratamentos. *Controle* (1), *formulação sem cafeína* (2) e *formulação com cafeína* (3). As setas indicam a região da hipoderme mensurada e evidenciam a diminuição de sua espessura. Aumento de 30 vezes.

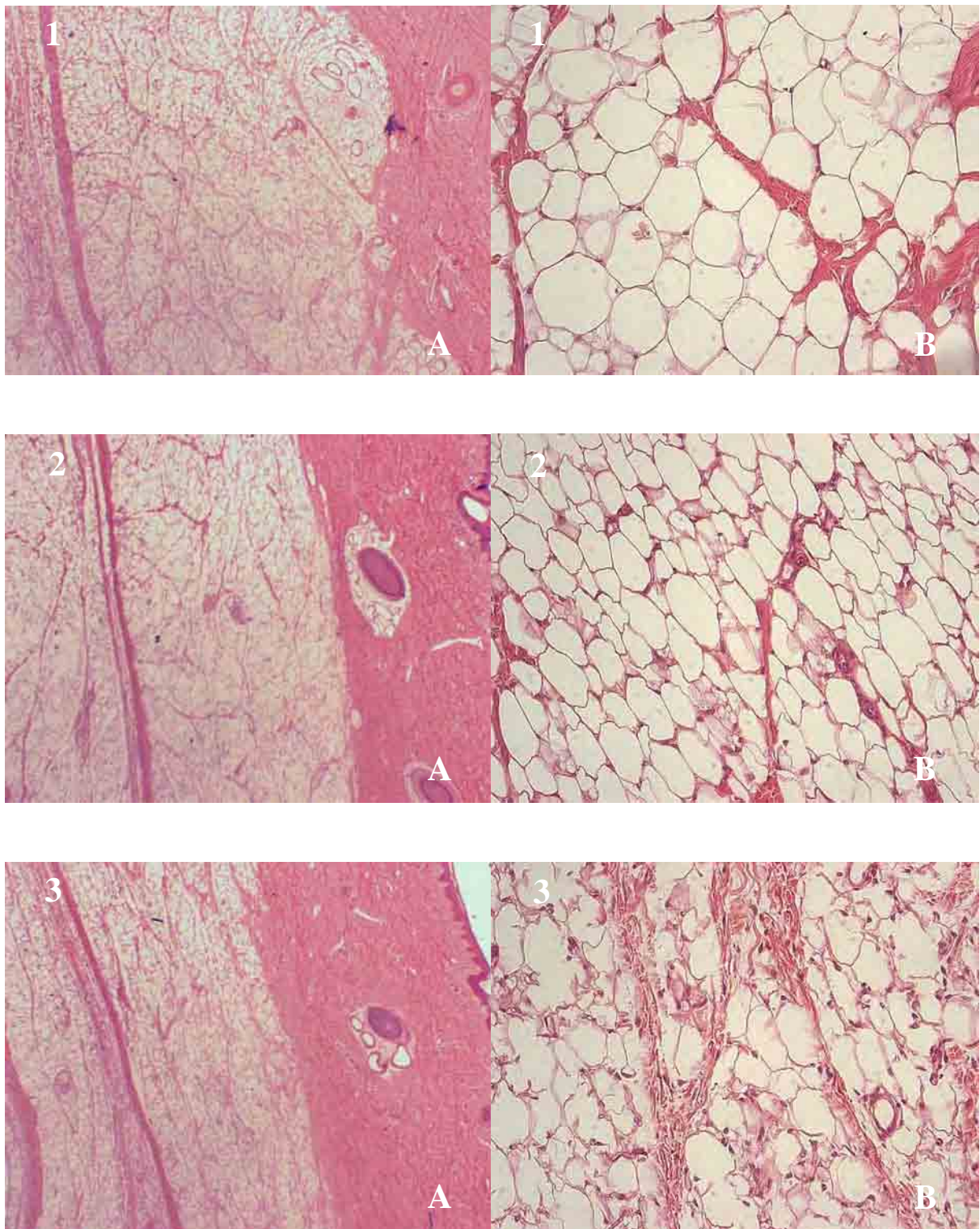


Figura 71. Fotomicrografias evidenciando a hipoderme de suínos machos que sofreram diferentes tratamentos. *Controle* (1), *formulação sem cafeína* (2) e *formulação com cafeína* (3). Aumento de 32 vezes em A e 200 vezes em B.

Para verificar se a aparente diminuição observada na espessura da hipoderme com os diferentes tratamentos (descritos no item 3.2.10) foi significativa, realizou-se o teste de variância (ANOVA) associado à comparação múltipla entre os resultados (teste de Tukey-Kramer) e as médias das medidas de espessura obtidas por animal ($n = 5$).

Quando o tratamento foi realizado com a formulação acrescida de cafeína, essa diferença foi maior em relação ao controle (45,52%) quando comparada com a área tratada com a formulação sem cafeína também em relação ao controle (31,89%) conforme pode ser observado na tabela 21 e figura 72.

Tabela 21. Medidas da espessura da hipoderme (μm) de suínos machos que sofreram diferentes tratamentos durante 15 dias. Cada animal ($n = 5$) recebeu todos os tratamentos em diferentes áreas: área controle, formulação 1 e formulação 2.

Animal	Controle			Formulação 1			Formulação 2		
	μm	$\pm s$	CV%	μm	$\pm s$	CV%	μm	$\pm s$	CV%
1	2811,64	181,45	6,45	1771,69	154,04	8,69	1275,18	83,97	6,58
2	2553,67	152,40	5,97	2169,07	151,44	6,98	1476,81	142,19	6,16
3	2822,96	185,28	6,56	1624,05	103,84	6,39	1720,23	69,67	4,05
4	2588,14	357,51	13,81	1754,61	141,67	8,07	1255,29	107,11	8,53
5	2778,38	306,87	11,04	1912,51	119,88	6,27	1656,54	138,16	8,34

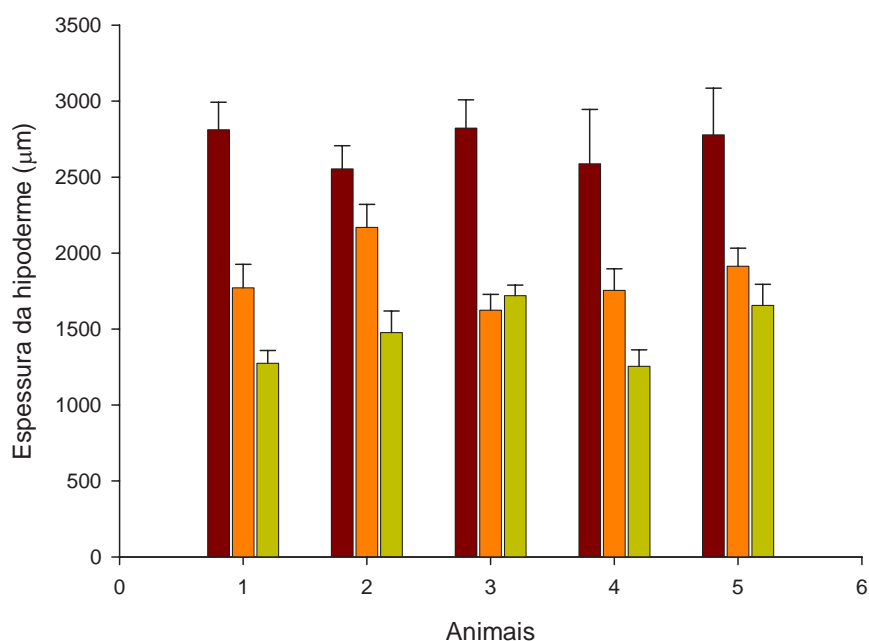


Figura 72. Representação esquemática dos valores encontrados para a espessura da hipoderme de suínos machos submetidos a diferentes tratamentos. Controle (■), formulação sem cafeína (■) e formulação com cafeína (■).

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação visando aumentar a eficácia dos fármacos existentes é um processo contínuo na pesquisa farmacêutica.

Substâncias farmacologicamente ativas, quando veiculadas em formas farmacêuticas convencionais, geralmente não conseguem atingir a concentração desejada no tecido-alvo do organismo porque, entre o local de aplicação e o local onde deve exercer seu efeito farmacológico, interpõe-se uma série de barreiras biológicas. O estudo de novos sistemas de liberação de fármacos, particularmente os sistemas microestruturados, tem sido muito relevante na área farmacêutica, pois podem proporcionar alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficientes e com efeitos colaterais bastante reduzidos (MOULIK e PAUL, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Para a terapia moderna é importante a otimização da liberação de fármacos através da pele humana, que é efetivamente uma barreira para a permeação. No geral, a epiderme, especificamente o estrato córneo, é responsável pelo maior controle da permeação (BARRY, 2001). Assim, o fluxo através da pele depende da natureza química da substância: fármacos lipofílicos são absorvidos em toda a área lipídica do estrato córneo, com coeficientes de permeação variáveis, enquanto a absorção de fármacos hidrofílicos se dá quase que exclusivamente por poros de passagem, sendo o coeficiente de permeação quase constante (MORIMOTO *et al.*, 1994).

Muitos trabalhos têm sido realizados com a finalidade de esclarecer cada vez mais a permeabilidade cutânea a diferentes fármacos, um assunto de profundo interesse para os profissionais das ciências farmacêuticas e cosméticas (DAL POZZO e PASTORI, 1996).

Lanfforgue *et al.* (1997) estudaram a importância do estrato córneo no processo de permeação e absorção percutânea. Quando essa camada é retirada, a quantidade de fármaco

absorvida é aumentada cerca de 100 vezes, e a quantidade retida, cerca de 10 vezes.

O maior obstáculo para as formulações tópicas é promover um aumento da penetração de fármacos na pele sem, contudo, induzir a alterações significantes e irreversíveis à função de barreira da pele (KREILGAARD, 2002).

Devido à dificuldade na penetração de fármacos pela pele, agentes químicos e físicos vêm sendo pesquisados para que as barreiras da pele sejam diminuídas e, assim, se acentue a penetração cutânea. Uma variedade de pesquisas tem sugerido que, para aumentar o sistema de transporte de fármacos pela pele, podem-se utilizar, entre outros recursos, as correntes elétricas e a aplicação de ultra-som, porque a ação de um promotor físico externo melhora a permeabilidade da pele (MARJUKKA SUHONEN *et al.*, 1999; UEDA *et al.*, 1996; MITRAGOTRI *et al.*, 1995).

Além disso, é comum utilizar nas formulações para uso tópico os chamados promotores de permeação cutânea, substâncias que quando presentes na formulação aumentam significativamente o fluxo de penetração de outra substância. Entre eles estão desde simples solventes (água, etanol, metil sulfóxido de alquila) ou tensoativos, até moléculas lipídicas que, acopladas ao ativo, aumentam sua lipossolubilidade ou, ainda, veiculam os ativos (lipossomas e microemulsões) (MARTINS e VEIGA, 2002; SCHUELLER e ROMANOWSKI, 2000).

MARJUKKA SUHONEN *et al.* (1999) revelaram que a desorganização no posicionamento das células da camada córnea provocada pelos promotores de permeação cutânea é um importante mecanismo para se acelerar tal processo.

Assim, para a utilização de um tratamento tópico, devem-se considerar não apenas a concentração e características farmacológicas dos princípios ativos, como também o tipo de veículo empregado, o perfil farmacocinético do fármaco, a interação deste com o veículo e

com a pele, o modo de aplicação, além das variáveis biológicas e do meio ambiente.

No tratamento da celulite, muitos princípios ativos farmacológicos atuam sobre o tecido adiposo, tecido conjuntivo ou na microcirculação.

Produtos dermocosméticos à base de cafeína são indicados principalmente para o combate à celulite e suas manifestações de característica lipodistrófica localizada (FA *et al.*, 2004; GALENA, 2005; VIA FARMA NET, 2005).

A diminuição seletiva e bem-sucedida dos depósitos de células de gordura, via liberação tópica, exige o transporte de um agente ativo até a área de depósito adiposo, para que seja alcançada concentração mais elevada onde se procura obter a lipólise (DI SALVO, 1996). Esse transporte pode, teoricamente, ser auxiliado pelo uso de sistemas que visam carrear as partículas até o tecido, como, por exemplo, as microemulsões.

Como mencionado anteriormente, os sistemas microestruturados (cristais líquidos e microemulsões) oferecem vantagens como aumento da solubilidade e da estabilidade de fármacos, possibilidade de agirem como sistemas reservatórios e/ou transportadores, melhora da eficiência terapêutica, dentre outras. Tendo em vista essas vantagens e a necessidade do transporte do agente ativo até o tecido adiposo para promover a lipólise, o desenvolvimento de sistemas microestruturados contendo água, tensoativo e uma fase oleosa para a incorporação de cafeína com a finalidade de uso tópico passou a ser um interessante meio para otimizar o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide e foi o objetivo principal deste trabalho.

O PPG-5-Ceteth-20 foi o tensoativo não-iônico da classe dos polioxietilenos e polioxipropilenos escolhido para o sistema trabalhado, por se tratar de um tensoativo bastante usado em farmácias de manipulação na área cosmética e por não haver muitos trabalhos relacionados a ele relatados na literatura. A fase oleosa escolhida foi o adipato de dibutila, um

líquido emoliente, não-comedogênico, com alto coeficiente de espalhabilidade e baixa toxicidade, bastante recomendado para uso em formulações cosméticas e farmacêuticas (WENNINGER, 1997).

Foram executados testes preliminares para a caracterização físico-química da cafeína para sua posterior incorporação nas formulações.

Verificou-se que o fármaco possui ponto de fusão em cerca de 235,6°C, comprovando os dados da literatura, que especificam faixa de fusão entre 234,0 a 239,0°C para a cafeína (USP 25, 2002).

Outra análise realizada foi a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier FTIR. A combinação das vibrações ou rotações de vários grupos funcionais e as interações desses grupos com outros átomos da molécula resultaram em um espectro complexo na região de infravermelho para cada composto individual. Desta forma, a FTIR é empregada principalmente na elucidação estrutural e na identificação de compostos (SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

No espectro de absorção obtido na caracterização da cafeína por FTIR notaram-se bandas mais intensas da carbonila (C=O) localizadas em 1697.2 cm^{-1} e 1658.7 cm^{-1} e observou-se também a presença de outras bandas em 1548.7 cm^{-1} , 1415.5 cm^{-1} e 1361 cm^{-1} (Figura 20). Esses resultados são semelhantes aos dados da literatura, que indicam bandas de C=O em 1704.8 cm^{-1} e 1658.5 cm^{-1} e outras bandas presentes em 1554.4 cm^{-1} e 1415.5 cm^{-1} (BOUHSAIN *et al.*, 1997; OHNSMANN *et al.*, 2002), o que caracteriza o fármaco estudado.

Para a seleção do comprimento de onda mais conveniente para as determinações das curvas analíticas da cafeína, obtiveram-se espectros de absorção no UV-VIS, com concentração fixa de cafeína (2,44 $\mu\text{g/ml}$) na faixa de 200 a 700 nm. Verificou-se que o pico máximo de absorvância do fármaco foi de 273 nm tanto em água e etanol como em tampão

acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 (Figuras 21, 22 e 23).

Os sistemas foram desenvolvidos, caracterizados e, posteriormente, estudos de liberação *in vitro* e permeação *in vivo* foram realizados.

No desenvolvimento dos sistemas foi adotado o método da titulação para a construção do diagrama de fases, que possibilita o estudo de um grande número de pontos com relativa rapidez, pois as preparações adquirem o equilíbrio rapidamente. Com a preparação de amostras com diferentes proporções dos constituintes foi possível definir as regiões do diagrama de fases.

Com a construção do diagrama de fases utilizando PPG-5-Ceteth-20 (Procetyl AWS[®]) como tensoativo, adipato de dibutila como fase oleosa e água, obtiveram-se diversos sistemas com as mais variadas características e tipos de organização a partir de uma ampla faixa de combinação de componentes. As regiões delimitadas no diagrama de fases foram: sistema microestruturado líquido (ML), sistema microestruturado viscoso (MV), sistema semitransparente (ST), sistema emulsionado (SE), separação de fases (SF) (Figuras 27 e 28).

Na figura 28 observou-se uma ampla área de existência de ML, a partir da concentração de cerca de 18% de tensoativo. Tanto microemulsões do tipo O/A quanto A/O podem estar presentes nessa região, porém houve o predomínio do tipo A/O, principalmente na presença de quantidades elevadas de tensoativo. Foi classificada como ML toda preparação que se apresentou como um sistema líquido transparente homogêneo que conservou suas características após 24 horas quando deixado em repouso, sendo que as amostras com maiores quantidades de água (próximo a 40%) apresentaram-se mais viscosas, porém ainda com escoabilidade.

Observou-se uma área de MV nos limites compreendidos entre 33 e 55% de água e 44 a 68% de tensoativo, na presença de quantidades pequenas de óleo (no máximo 15%).

Denominou-se MV toda preparação transparente e homogênea que apresentou resistência ao escoamento. É importante ressaltar que, nas regiões com maiores quantidades de água, as formulações apresentaram-se altamente viscosas, provavelmente devido à disposição da água em torno da cabeça polar do tensoativo.

A área de ST correspondeu a uma região onde as preparações se apresentaram translúcidas, podendo ou não ser resistentes ao escoamento, dependendo da quantidade de água utilizada.

Seguida da área de ST, estava a área de SE, restrita à região com no máximo 50% de fase oleosa. À medida que a quantidade de água foi aumentada, houve uma tendência em formar emulsões mais líquidas.

O sistema chamado de SF estava presente em uma região bem ampla, tanto para o vértice aquoso quanto para o oleoso. Nessa região puderam ser observadas duas situações: os três componentes da formulação não conseguiram ser homogeneizados, provavelmente devido à pequena quantidade de tensoativo presente, o que impossibilitou a diminuição da tensão superficial entre as fases oleosa e aquosa, ou então foram homogeneizados, mas quando deixados em repouso por 24 horas, ocorreu a separação das fases.

Ainda na figura 28 observou-se que no vértice do tensoativo do diagrama, onde a água e o óleo se apresentaram em baixas concentrações, estes puderam apresentar-se solubilizados pelo tensoativo, não formando nenhum tipo de estrutura organizada. Partindo desse vértice, observou-se que, à medida que a água foi adicionada, a viscosidade foi aumentada. A transparência foi mantida até o ponto em que a quantidade de tensoativo foi baixa para manter a estabilidade do sistema (cerca de 55% de tensoativo). A partir desse ponto, mantendo-se a adição de água, observou-se que a viscosidade diminuiu e sistemas semitransparentes seguidos de sistemas emulsionados começaram a ser formados até ocorrer a

separação de fases.

Assim, a formação de diferentes fases encontradas no diagrama depende diretamente da concentração do tensoativo. Em pequenas concentrações, o tensoativo não conseguiu estabilizar a mistura dos componentes e ocorreu separação de fases. Conforme a sua quantidade foi aumentada, sistemas emulsionados começaram a ser formados, indicando que o tensoativo em maiores concentrações pôde ser capaz de manter a estabilidade dos sistemas. Quando a concentração atingiu cerca de 55%, sistemas transparentes foram formados, apresentando diversos graus de viscosidade, dependendo da concentração de água presente, ocupando uma vasta área no diagrama.

Preparações opticamente transparentes líquidas e viscosas foram denominadas microemulsões no diagrama. A maioria destas, porém, principalmente as que possuíam certa viscosidade, quando caracterizadas pela microscopia de luz polarizada, apresentou indícios de serem sistemas denominados cristais líquidos com diferentes tipos de estruturas, dependendo da composição de cada um dos pontos avaliados. A transparência apresentada deve-se à capacidade do tensoativo em diminuir a tensão interfacial entre a água e o óleo a ponto de formar estruturas de tamanhos muito reduzidos que não desviam luz.

Definido o diagrama de fases com todos os possíveis sistemas formados, ensaios preliminares foram realizados com a finalidade de se avaliar e se escolher o melhor sistema microestruturado para veicular a cafeína.

As avaliações foram baseadas na análise sensorial dos produtos e na possibilidade de caracterização e diferenciação dos sistemas obtidos no diagrama. As preparações presentes no domínio de microemulsão viscosa do diagrama de fases apresentaram as melhores características para aplicação tópica. As formulações mais viscosas são mais adequadas, assim como são mais desejáveis para produtos contendo maior proporção de fase aquosa em relação

à fase oleosa, em função do sensorial menos untuoso.

Optou-se por caracterizar onze pontos, sendo dois pontos no domínio de sistema microestruturado viscoso (E e F), três pontos na transição sistema viscoso/líquido (D, G e K) e seis pontos na região de sistema microestruturado líquido (A, B, C, H, I e J). Na tabela 4 estão representadas as composições percentuais dos componentes de cada uma das formulações escolhidas.

Essas formulações apresentaram formação espontânea quando seus componentes foram colocados em contato um com o outro. Observou-se que a ordem de adição da água, do óleo e do tensoativo não influenciou na formação destas. Não foi necessária a adição de um co-tensoativo, sendo o PRO capaz de estabilizar sozinho cada uma delas, fato positivo, já que muitos co-tensoativos são conhecidos por causarem irritação tecidual.

As formulações escolhidas para a incorporação da cafeína foram C, D, H e K, tendo sido submetidas à caracterização física antes e após a incorporação de cafeína e escolhidas para o estudo de liberação *in vitro*.

A caracterização física das formulações foi importante para determinar os tipos de estruturas possíveis de serem formadas pela mistura direta dos três componentes (água, óleo e tensoativo) em diferentes proporções, bem como o efeito da variação das proporções.

A mistura de água, óleo e tensoativo é capaz de formar uma ampla variedade de estruturas cristalinas ou não. A microscopia de luz polarizada permite estudar as fases formadas pelas diferentes proporções de mistura desses três componentes. Entre as estruturas não cristalinas estão as microemulsões e as emulsões, e entre as cristalinas, os cristais líquidos (fases cúbicas, hexagonais e lamelares). Nas estruturas não cristalinas não há ordem orientacional nas interfaces, enquanto nas cristalinas essa ordem é uma condição essencial para a sua formação (KREILGAARD, 2002).

Os resultados das análises das formulações por microscopia de luz polarizada indicaram a presença de sistemas isotrópicos (campo escuro), ou seja, não desviaram a luz sob o plano de luz polarizada. Por se apresentarem como sistemas líquidos, podem-se classificar as amostras A, B, C e J como sistemas microemulsionados (Figuras 30, 31, 32 e 39).

Sistemas anisotrópicos, ou seja, que desviam o plano de luz polarizada, também foram observados. Nas fotomicrografias das formulações D, E, F e G (Figuras 33, 34, 35 e 36, respectivamente) notou-se a presença de estrias características de fase hexagonal. H e I apresentaram um arranjo anisotrópico característico ao exibido pela fase lamelar com aparecimento das “cruzes-de-malta” (Figuras 37 e 38), e K apresentou vestígios de arranjo anisotrópico característico de fase hexagonal (estrias) com tendência a tornar-se anisotrópica com o passar do tempo (Figura 40).

Como consequência da interação soluto-solvente, fármacos dissolvidos em mesofases podem induzir a mudanças no empacotamento molecular da estrutura do cristal líquido (GABBOUN *et al.*, 2001). No entanto, foi observado por microscopia de luz polarizada que a adição de cafeína não alterou as estruturas das mesofases quando comparadas com a formulação sem o fármaco.

O princípio básico do índice de refração diz que quando um raio de luz monocromática passa de uma substância transparente para outra de densidade óptica diferente, este é refletido ou refratado, exceto quando incide perpendicularmente à superfície de contato entre as substâncias. O índice de refração depende da natureza do meio, do raio de luz, da temperatura, da pressão (KOROLKOVAS, 1988).

Com base nos resultados obtidos e analisando-se a figura 42, pode-se dizer que para as formulações A, B, C, D, E e F ocorreu um decréscimo do índice de refração com o aumento da fase aquosa. Esse fato está relacionado com a diminuição da proporção de

tensoativo (índice de refração = 1,462), cujo índice de refração é mais alto que o da água (índice de refração = 1,333). A fase oleosa, por estar presente em quantidade pequena e constante, pouco influenciou os resultados.

Para as formulações F, G, H, I e J, notou-se que, quando se fixou a proporção de tensoativo e variou-se a quantidade de óleo e de água, o índice de refração aumentou à medida que havia na composição da formulação menor quantidade de água (Figura 43). Isso ocorreu devido às proporções maiores de óleo (índice de refração = 1,435) e tensoativo (índice de refração = 1,462) presentes, que possuem índices de refração mais alto que o da água (índice de refração = 1,333).

A microemulsão K apresentou índice de refração semelhante aos índices das microemulsões D e H, que possuem a mesma quantidade de água, variando as proporções do tensoativo e do óleo. Na figura 41 estão reunidos os índices de refração de todas as amostras em estudo.

Para D, H e K acrescidos de cafeína, os índices de refração não variaram significativamente em relação às formulações sem o fármaco, indicando que a cafeína foi bem solubilizada.

Quando analisada a densidade relativa, observou-se que as formulações mais viscosas apresentaram maiores valores. À medida que se aumentou a proporção de água, a viscosidade ficou maior e por conseqüência obteve-se valores de densidade relativa maiores (Figuras 45 e 46).

O experimento de condutividade é utilizado na tentativa de se classificar o tipo das formulações baseado na distribuição das fases, permitindo a determinação da condutividade dos domínios polares ou apolares (URBAN, 2004). Observando-se e analisando-se as figuras 47 e 48, se notou que a condutividade se elevou com o aumento da quantidade de água

presente. As formulações com até 20% de fase aquosa apresentaram as condutâncias mais baixas. Acima dessa porcentagem de fase aquosa, observou-se um acréscimo considerável nos valores de condutância. Assim, pode-se sugerir que as formulações com fase aquosa acima de 20% possuem fase externa ou contínua aquosa.

Na área farmacêutica, a avaliação do comportamento reológico de formulações, principalmente de uso tópico, é importante para caracterizar a facilidade com que o produto pode ser escoado de um frasco ou ser espalhado sobre a pele quando submetido à ação de uma força.

Nos estudos de reologia, considerando-se o tipo de escoamento e a deformação, os sistemas podem ser classificados em newtonianos e os não-newtonianos.

Em um reograma de um fluido newtoniano, a curva de tensão de cisalhamento (τ) em função do gradiente de cisalhamento (γ) é uma linha reta que passa pela origem (TOKUMOTO, 1996).

As formulações mais líquidas, consideradas microemulsões (sistemas A, B e C), apresentaram comportamento newtoniano. As MEs não apresentaram nenhum tipo de estrutura organizada que possa ser desestruturada pela tensão de cisalhamento. Assim, uma relação direta entre a τ e o γ aplicados pode ser observada (reogramas τ versus γ ilustrados nas figuras 50a, 51a e 52a). No reograma gradiente em função da viscosidade, esta se apresentou como uma constante paralela ao eixo do gradiente (Figuras 50b, 51b e 52b), outro comportamento característico de fluidos newtonianos.

Os sistemas reais que não obedecem ao comportamento linear previsto pela lei de Newton para o escoamento são denominados sistemas não-newtonianos, que normalmente são representados por três tipos de curvas de consistência: plástico, pseudoplástico e dilatante (TOKUMOTO, 1996; ALMEIDA e BAHIA, 2003).

As formulações D, E, F, G, H, I, J e K foram classificadas como sistemas não-newtonianos com escoamento do tipo pseudoplástico. A curva de um material pseudoplástico de um reograma τ em função $\dot{\gamma}$ não é linear e passa pela origem (Figuras 53a a 60a). O comportamento pseudoplástico também foi caracterizado pela diminuição da viscosidade com o aumento do gradiente de cisalhamento aplicado (Figuras 53b a 60b).

Os materiais plásticos e pseudoplásticos podem apresentar a propriedade de “afinar-se” com a aplicação de velocidades de cisalhamento crescentes. Quando a velocidade de cisalhamento é removida, as tensões de cisalhamento são relaxadas e o sistema tenderá a readquirir a estrutura inicial, de tal forma que as curvas de subida e descida do reograma estarão deslocadas, resultando em uma histerese. Este fenômeno é conhecido com tixotropia (TOKUMOTO, 1996).

As formulações D, E, F, G, H, I, J e K que apresentaram escoamento do tipo pseudoplástico comportaram-se como fluidos tixotrópicos. Quando o gradiente de cisalhamento diminuiu, as tensões de cisalhamento foram relaxadas e o sistema tendeu a readquirir a estrutura inicial, sendo que as curvas ascendente e descendente do reograma foram deslocadas, formando uma área de histerese. Essas formulações apresentaram tixotropia em ambas as temperaturas submetidas no momento da análise (25°C e 37°C).

O fenômeno de tixotropia é em geral reversível, retomando o fluido a sua viscosidade inicial algum tempo após cessar a deformação (ALMEIDA e BAHIA, 2003). Se a recuperação for instantânea, o material se diz não tixotrópico, que é o caso das microemulsões A, B e C (Figuras 50a, 51a e 52a).

Em relação à área de histerese formada, nos experimentos realizados a 25°C, podem-se dividir as formulações em três grupos: aquelas com pequena área de histerese (H e J), com área média (D, I e K) e aquelas com uma área de histerese bem desorganizada (E, F e

G). Esses resultados indicam que as formulações estudadas apresentaram diferentes capacidades de reestruturação. Quando submetidas à temperatura de 37°C, apresentaram áreas de histereses pequenas, bem como uma diminuição acentuada da viscosidade, podendo-se assim considerar a temperatura um fator desestruturante para os sistemas.

As preparações acrescidas de cafeína não tiveram seus comportamentos modificados, continuando a se apresentar como fluidos não-newtonianos com escoamento do tipo pseudoplástico e tixotropia no caso das formulações D, H e H, ou fluido newtoniano no caso da formulação C (Figuras 61a e b; 62a e b; 63a e b; 64a e b).

A viscosidade de um sistema está relacionada com a temperatura. Geralmente, a viscosidade diminui com o aumento da temperatura (LABBRA, 1993 *apud* URBAN, 2004). Essa relação pode ser observada na figura 65, que ilustra as viscosidades comparativas das formulações estudadas nas temperaturas 25°C e 37°C com o gradiente de cisalhamento fixado em 185 1/s.

As formulações C, D, H e K foram escolhidas para a incorporação da cafeína por apresentarem viscosidade que tanto permitiu a aplicação da metodologia escolhida para o experimento, como também o desenvolvimento de um produto de aplicação tópica adequada.

Para a incorporação de fármacos em microemulsões, é importante conhecer algumas propriedades físico-químicas do fármaco, tais como solubilidade e coeficiente de partição óleo/água. A quantidade de fármaco incorporado em determinado sistema é dependente de sua solubilidade relativa nos vários componentes da formulação, particularmente de seu coeficiente de partição óleo/água (MACOLMSON *et al.*, 1998).

A partir das curvas analíticas obtidas, determinou-se a solubilidade máxima de cafeína em água, PRO, ADP e em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, bem como a quantidade máxima incorporada nos quatro sistemas microestruturados escolhidos.

Com base nos resultados da tabela 8, foi possível fazer uma comparação entre os valores de solubilidade da cafeína nos componentes da formulação, sendo esta quatro vezes mais solúvel em água do que em ADP e PRO, podendo-se assim pressupor que a cafeína se particiona preferencialmente na fase aquosa dos sistemas.

Aplicando-se o teste de variância ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla (teste de Tukey) com significância de $p < 0,05$, observou-se que entre os valores da solubilidade da cafeína nas formulações D, H e K não há diferença estatisticamente significativa. Há diferença, porém, na solubilidade do fármaco na formulação C em relação às outras.

A cafeína possui maior solubilidade em água do que em PRO e ADP. Com base nos resultados da tabela 10, observou-se que o fármaco apresentou menor incorporação na formulação C (13,519 $\mu\text{g}/\text{mg}$), a qual, apesar de possuir maior proporção de tensoativo (70%), contém menor quantidade de água em relação às outras formulações (25%).

As formulações D, H e K apresentaram resultados de incorporação semelhantes (16,064; 15,185; 15,431 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente), essas formulações possuem a mesma quantidade de água (30%). Assim, a fase aquosa é a que mais influencia na quantidade de fármaco a ser incorporado.

Segundo dados da literatura, a cafeína possui um $\log K_{\text{OCT}/\text{H}_2\text{O}}$ de $-0,091$ (UNEP PUBLICATIONS, 2003). O valor obtido no experimento para o coeficiente de partição óleo/água da cafeína ($\log K_{\text{OCT}/\text{H}_2\text{O}} = -0,150$) foi próximo ao valor encontrado na literatura. Para uma boa penetração do fármaco na pele, é necessário que o log do coeficiente de partição seja igual ou maior que 1. Assim, a cafeína pode apresentar dificuldade em penetrar no estrato córneo.

Apesar de a incorporação não ter sido alta e o fármaco apresentar um log K menor

que 1, as formulações desenvolvidas podem ser capazes de promover a permeação da cafeína na pele e conseqüentemente o efeito terapêutico desejado, tendo em vista que sistemas microestruturados, como descrito anteriormente, apresentam essa propriedade.

A cafeína é freqüentemente usada em experimentos de cinética de liberação em emulsões, microemulsões e cristais líquidos (DIAS *et al.*, 1999; CLEMENT *et al.*, 2000; FA *et al.*, 2004).

Vários estudos mostram a utilização de microemulsões e cristais líquidos para a encapsulação de fármacos em produtos farmacêuticos e cosméticos. A cinética de liberação de fármacos desses sistemas microcompartimentados depende de suas estruturas e de fatores físico-químicos, como solubilidade do fármaco, propriedades do tensoativo utilizado, tensão interfacial, dentre outros (FA *et al.*, 2004).

Para efeito de comparação e levando-se em conta a quantidade de cafeína possível de ser incorporada nas formulações C, D, H e K, foi fixada a concentração de 1,5% de cafeína para os estudos de liberação *in vitro*. Os perfis de liberação das formulações foram comparados com o perfil do fármaco livre em solução de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5.

As características de liberação de produtos de uso tópico podem ser avaliadas para garantir a qualidade do produto, utilizando-se diferentes tipos de pele. Entretanto, membranas sintéticas têm sido utilizadas por apresentarem características de difusão que podem ser diretamente correlacionadas com a pele humana. Os tipos de membranas usualmente empregadas são aquelas com características porosas, por exemplo, acetato de celulose, ou polímeros homogêneos permeáveis, como o silicone (DIAS *et al.*, 1999).

A grande maioria dos trabalhos sobre liberação de fármacos com formulações tópicas tem sido realizada utilizando-se células clássicas de difusão *in vitro* do tipo Franz,

com vários tipos de membranas (KREILGAARD, 2002).

No presente trabalho, a membrana de acetato de celulose foi escolhida para a realização dos testes de liberação, utilizando-se o modelo de célula de difusão *in vitro* em sistema estático do tipo Franz, adaptada ao equipamento de dissolução, desenvolvido por URBAN (2004).

Para caracterizar melhor o perfil de liberação do fármaco através de uma membrana de acetato de celulose em função do tempo, foi necessário um tratamento estatístico com os resultados obtidos no experimento de liberação *in vitro*.

Pela observação da sobreposição dos círculos (figura 68) na ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de AUC, obtidos a partir do experimento de liberação *in vitro*, e os resultados da comparação entre os perfis de liberação da cafeína a partir da solução tampão e das formulações, exibidos na tabela 18, pode-se verificar que o perfil de liberação do fármaco em solução apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao fármaco liberado das formulações C, D, H e K. Assim, as formulações mostram uma tendência de prolongar a liberação em relação ao fármaco livre em solução.

A natureza das curvas mostradas na figura 67 sugere que nenhuma das formulações apresenta liberação que siga cinética de liberação de ordem zero. Observou-se que a liberação foi mais rápida nas primeiras quatro horas do experimento, seguida de uma liberação mais lenta e sustentada, atingindo o equilíbrio perto da sexta hora.

No entanto, quando se aplicou o modelo de Higuchi (HIGUCHI, 1960; HIGUCHI, 1962; ROSEMAN e HIGUCHI, 1970), verificou-se que todas as formulações apresentaram cinética de liberação com ordem de reação denominada pseudo primeira ordem, como se pode observar na figura 69.

Nesse modelo, a cinética de liberação pode ser descrita pela equação de Higuchi (Equação 6), na qual se espera uma reta para a quantidade liberada acumulada em função da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$) para sistemas baseados no mecanismo de difusão (OGAWA E PLEPIS, 2002).

$$M_t = k t^{1/2} \quad (\text{Eq. 6})$$

Nessa equação, M_t é a quantidade total de fármaco liberado, k é a constante de liberação, e t , o tempo.

O modelo de Higuchi é aproximado e fundamentado na primeira lei de Fick, sendo bastante aplicado a fármacos dispersos em matrizes poliméricas. Esse modelo assume que o fármaco na camada superficial do sistema dissolve-se na matriz polimérica e difunde-se para fora dele. Quando o teor de fármaco na superfície se esgota, a próxima camada começa a exaurir (OGAWA E PLEPIS, 2002; VULCANI, 2004).

Os sistemas microestruturados de fase lamelar e hexagonal (formulação D e H, respectivamente) envolvidos no estudo de liberação provavelmente apresentam comportamento semelhante ao das matrizes poliméricas. A fase lamelar é composta por bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente organizadas paralelamente, formando uma rede unidimensional. A fase hexagonal consiste em cilindros longos no lugar das bicamadas, sendo estes formados por moléculas de tensoativo agregadas, originando micelas cilíndricas que se empacotam. Assim, quando colocados em contato com a membrana e esta com o meio receptor, a liberação ocorre primeiramente na superfície dessas bicamadas ou cilindros e sucessivamente nas camadas mais internas.

No caso da formulação caracterizada como microemulsão, o fármaco presente no interior das gotículas é liberado para o meio externo e, a partir dele, difunde-se através da membrana de acetato de celulose para o meio receptor.

Pode-se sugerir que essas formulações com características internas microestruturadas (microemulsão e cristal líquido de fase hexagonal e lamelar) estejam funcionando como sistema reservatório de liberação lenta para a cafeína.

Observou-se que o fármaco, quando livre em solução, atravessa a barreira de acetato de celulose mais rapidamente. Em cerca de 105 minutos quase 90% encontram-se no meio receptor. Até esse tempo, a ordem de liberação se enquadra do modelo de Higuchi, com um gradiente de liberação ($0,2473 \text{ mg/cm}^2/\text{min}^{1/2}$) bem mais elevado que os gradientes obtidos para a liberação a partir das formulações C, D, H e K (respectivamente 0,1016; 0,1113; 0,1084; 0,0920 $\text{mg/cm}^2/\text{min}^{1/2}$).

Com o objetivo de avaliar a diferença entre os gradientes de liberação das formulações obtidos no experimento, aplicou-se análise de variância (ANOVA) associada à comparação múltipla entres os resultados (teste de Tukey), com significância de $p < 0,05$, para os valores de gradiente de liberação ($\text{mg/cm}^2/\text{min}^{1/2}$) de cada uma das repetições das amostras exibidos na tabela 20. Observou-se que há diferença estatisticamente significativa do gradiente de liberação entre as formulações D e K.

A formulação D apresenta arranjo interno do sistema anisotrópico semelhante ao de fase hexagonal. Na formulação K, o arranjo do tipo hexagonal sem estrias muito definidas apresenta-se em início de formação, por estar numa região de transição de fases. Essas características da formulação K podem sugerir que suas estruturas estejam dificultando a saída do fármaco do interior, levando a uma liberação mais lenta deste quando comparada à outra formulação de fase hexagonal bem-definida.

As formulações C e H, porém, classificadas como microemulsão e cristal líquido de fase lamelar, não apresentaram diferença estatisticamente significativa do gradiente em relação às formulações de fase hexagonal (formulação D). Assim, a cafeína tem uma

velocidade de liberação semelhante quando incorporada às formulações C (microemulsão), D (fase hexagonal) e H (fase lamelar) sob as mesmas condições experimentais.

URBAN (2004) realizou experimento de permeação *in vitro* para avaliar o efeito de formulações com diferentes características estruturais. A formulação com características de cristal líquido de fase hexagonal apresentou efeito reservatório e foi capaz de favorecer a permeação do fármaco em estudo (acetato de dexametasona).

De modo geral, para as formulações C, D e H, pode-se concluir que as características estruturais dos sistemas não interferem na velocidade de liberação da cafeína através da membrana de acetato de celulose, podendo-se escolher qualquer uma delas para a aplicação tópica eficaz de cafeína. Com relação à formulação K, não podemos fazer a mesma afirmação. Ao que tudo indica, a instabilidade interna do sistema que se encontra em transição de fase estaria dificultando a liberação do fármaco.

Foi escolhida a formulação D para o estudo de permeação cutânea *in vivo* por apresentar melhor aspecto do ponto de vista sensorial e melhor escoabilidade para aplicação tópica.

A pele é nosso maior órgão e forma uma fascinante e única interface entre o mundo exterior e o nosso interior. O estudo da permeação na pele tem uma função especial na seleção de fármacos de aplicação dérmica e transdérmica (SCHMOOK *et al.*, 2001; HADGRAFT, 2004).

Com a finalidade de se verificar a eficácia de uma formulação estudada (formulação D) como acentuador da permeação cutânea da cafeína em fragmentos de pele de animais que foram submetidos a este tratamento, foi um dos objetivos deste trabalho analisar as alterações morfológicas que ocorreram no tecido adiposo de suínos machos submetidos ao tratamento tópico, durante quinze dias, associado ou não à cafeína.

Pelos resultados obtidos na análise histológica da pele de suínos submetidos a diferentes tratamentos, foi possível observar que as células de gordura se apresentaram agrupadas em feixes circundados por septos de tecido conjuntivo, de forma mais globular no fragmento analisado, referente à área controle (sem aplicação de formulação). Quando a formulação contendo cafeína foi aplicada, observou-se que esses conjuntos de células se apresentaram posição mais longitudinal, o que levou à diminuição da espessura da hipoderme (figura 70).

Na figura 71 é possível notar o achatamento dos feixes de adipócitos que compõem a hipoderme, provavelmente devido à ocorrência de destruição celular, alteração da forma e diminuição do volume dos adipócitos, características observadas nas fotomicrografias.

Medidas lineares morfométricas são muito utilizadas em estudos histopatológicos, pois são muito objetivas, facilmente reproduzíveis e podem ser detectadas alterações que numa observação visual muitas vezes pode ser negligenciada (HAMILTON *et al.*, 1995; PIRES DE CAMPOS, 2004).

Para avaliar a capacidade da formulação aplicada sobre a pele em promover a permeação da cafeína e conseqüente efeito nos adipócitos, medidas da espessura da hipoderme foram realizadas nas áreas tratadas. Verifica-se na tabela 21 e na figura 72 uma redução estatisticamente significativa da espessura da hipoderme das áreas subjacentes ao tratamento com as formulações em relação à área controle ($p < 0,05$). Quando o tratamento foi realizado com a formulação acrescida de cafeína, a diferença foi maior quando comparada com a área tratada com a formulação sem cafeína.

PIRES DE CAMPOS (2004) obteve resultados semelhantes de redução de espessura de hipoderme quando realizou estudos, em suínos, de permeação cutânea da cafeína

veiculada em um gel, utilizando o ultra-som como promotor de permeação. Os resultados obtidos demonstraram que o fármaco aplicado desta forma levou a uma redução significativa da espessura da hipoderme e que essa diminuição está relacionada a uma redução significativa do número de adipócitos presentes na região tratada.

Tano (2003) verificou, em avaliação histológica do tecido adiposo de ratas de linhagem Wistar, a ação lipolítica da cafeína e do silício orgânico da cafeína (Cafeisilane C[®]) quando incorporados à emulsão não iônica e géis a base de polímero carboxivinílico ou a base de hidroxietilcelulose. Tanto a cafeína como o Cafeisilane C[®] apresentaram melhor resposta quando incorporados em emulsão não iônica, ocorrendo redução no diâmetro das células adiposas em 17% para a cafeína e 16% para o Cafeisilane C[®]. Nesta última preparação, também ocorreu redução de 32% no número de células adiposas. Da forma cosmética gel, apenas o que utilizou como base a hidroxietilcelulose com Cafeisilane C[®] promoveu redução de 26 % no número de adipócitos quando comparado com o gel controle.

Foi mensurada a hipoderme superficial por ter sido observada em todos os cortes histológicos das amostras de pele e hipoderme dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. Observou-se que as células adiposas próximas do limite derme/hipoderme apresentaram alterações mais evidentes que aquelas de regiões mais profundas. Os resultados poderiam ter sido melhores se o tempo de tratamento fosse maior, a massagem mais intensa ou ainda se um promotor físico, como o ultra-som, fosse usado, o que promoveria um maior estímulo da circulação local e possibilitaria a cafeína permear e agir em toda a hipoderme.

Assim, pelos resultados obtidos nesse experimento, verifica-se que a formulação classificada como cristal líquido de fase hexagonal utilizada no experimento de permeação *in vivo* atuou como um promotor da permeação da cafeína. A interação fase hexagonal/pele pode ter facilitado a permeação do fármaco, assim como a alta concentração de tensoativo presente

na formulação (65%) pode ter aumentado a permeabilidade cutânea por promover a ruptura da estrutura cristalina do estrato córneo. Sendo essa camada o maior obstáculo à permeação de fármacos na pele, uma vez desestruturada, permitiu que o fármaco a atravessasse mais facilmente.

6. CONCLUSÕES

- A partir da construção do diagrama de fases utilizando PPG-5-Ceteth-20 (Procetyl AWS®) como tensoativo não-iônico, adipato de dibutila como fase oleosa e água, foi possível a obtenção de diversos sistemas com as mais variadas características e tipos de organização em ampla faixa de combinação desses componentes.
- A cafeína é cerca de quatro vezes mais solúvel em água do que em ADP e PRO.
- As formulações escolhidas apresentaram formação espontânea quando seus componentes foram colocados em contato um com o outro. A ordem de adição da água, do óleo e do tensoativo não influenciou na formação destes.
- Os resultados das análises das formulações por microscopia de luz polarizada indicaram a presença de sistemas isotrópicos e sistemas anisotrópicos.
- Nos estudos de reologia, as formulações mais líquidas, consideradas microemulsões, apresentaram comportamento newtoniano, enquanto as formulações de fases líquido-cristalinas se apresentaram como sistemas não-newtonianos com escoamento do tipo pseudoplástico e tixotropia, o que facilita a aplicação tópica do produto.
- No teste de liberação *in vitro*, observou-se que as características estruturais dos sistemas microemulsionado e cristal líquido de fase hexagonal e lamelar (formulações C, D e H, respectivamente) não interferiram na velocidade de liberação da cafeína através da membrana de acetato de celulose. Para a formulação K, tudo indica que a instabilidade interna do sistema, que se encontrava em transição de fase, estaria dificultando a liberação do fármaco da formulação.

- As formulações C, D, H e K indicaram uma tendência de prolongar o tempo de liberação da cafeína quando seus perfis de liberação foram comparados ao perfil de liberação do fármaco livre em solução, funcionando como sistemas reservatórios de liberação prolongada.
- Embora a cafeína seja um fármaco hidrofílico, sua incorporação nas formulações não foi alta (cerca de 1,5%), apresentando um $\log K_{OCT/H_2O}$ menor que 1, podendo assim apresentar dificuldade em penetrar no estrato córneo. Os estudos de permeação *in vivo*, porém, mostraram que as formulações escolhidas foram capazes de promover a permeação da cafeína na pele e conseqüentemente o efeito terapêutico desejado.
- As análises histológicas da pele de suínos submetidas aos diferentes tratamentos demonstraram que a formulação com características de cristal líquido de fase hexagonal e com 65% de tensoativo em sua composição foi eficaz em aumentar a permeação cutânea pela cafeína, facilitando assim sua ação. Os resultados obtidos demonstraram que a cafeína aplicada desta forma levou a uma redução de cerca de 45% da espessura da hipoderme.

Portanto, o sistema desenvolvido é adequado para o uso tópico dos pontos de vista sensorial e cosmético. Do ponto de vista farmacêutico, atua como um promotor de permeação cutânea e apresenta características de um sistema reservatório de liberação lenta, podendo ser capaz de liberar o fármaco adequadamente durante um período de 8 horas e promover a ação da cafeína no tecido-alvo, garantindo assim a eficácia do fármaco no tratamento tópico da celulite.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Cosméticos – Informações Técnicas. Parecer técnico sobre utilização de metilxantinas em preparações cosméticas. Parecer Técnico nº1, de 29 de junho de 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_metil.htm>. 2002. Acesso em: 24 ago. 2006.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosm. Toil.**, v. 15, p. 96-100, 2003.

AMERICAN SKINCARE e CELLULITE EXPERT ASSOCIATION. **Cellulite**. Disponível em: <<http://www.celluliteexpert.com/index>>. Acesso em: 22 maio 2006.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N.P.; ALLEN, L. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p. 397-400.

BARATA, E.A.F. **A cosmetologia: princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, 1995. p.113-114.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 14, p. 101-114, 2001.

BOUHSAIN, Z.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Clean Method for the Simultaneous Determination of Propyphenazone and Caffeine in Pharmaceuticals by Flow Injection Fourier Transform Infrared Spectrometry. **Analyst**, v. 122, p. 441-445, 1997.

BRITISH pharmacopeia 2001. London: the stationery Office, 2001. v. 2, A 180.

BRONAUGH, R. *In vitro* tecnicas for percutaneous absorpction. In: BROUNAUGH, R.L e MAIBACH, H.I. Percutaneus Absorption, 2a ed., New York, Ed. Dekker, 1989. *Apud*: PIRES DE CAMPOS, M.S.M. **Influência do ultra-som na permeação cutânea da cafeína: estudo em fragmentos de pele e em adipócitos isolados de suínos**. 2004. Tese (Doutorado). Instituto de Biologia: Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004.

CERA, L.F.R. **Estudo da incorporação do diclofenaco sódico com microemulsões lipídicas: formulação e liberação *in vitro***. 2001. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2001.

CLEMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J.P. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated W/O emulsions. **J. Control. Release**, v. 66, p. 243–254, 2000.

CLEMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J.P. *In vitro* release of caffeine from concentrated W:O emulsions: effect of formulation parameters. **Int. J. Pharm.**, v. 207, p. 7-20, 2000.

CRODA DO BRASIL. **Procetyl AWS**. Campinas, 1994. 5p. (Ficha técnica DS-78)

CUNHA JUNIOR, A.S., FIALHO, S.L., CARNEIRO, L.B., ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de fármacos para administração ocular tópica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 66, p. 385-391, 2003.

CURRI, S.B. Cellulite and Fatty Tissue Microcirculation. **Cosm. Toil.**, v.108, p. 51-58, 1993.

DAL POZZO, A.; PASTORI, N. Percutaneous absorption of parabens from cosmetic formulations. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 18, p. 57-66, 1996.

DAVIDSON, M.W.; ABRAMOWITZ, D. Polarized Light Microscopy. Olympus America Inc. and The Florida State University. Disponível em <<http://microscope.fsu.edu/primer/techniques/polarized/polarizedhome.html>>. 2003. Acesso em: 01 fev. 2005.

DIAS, M.; FARINHA, A.; FAUSTINO, E.; HADGRAFT, J.; PAIS, J.; TOSCANO, C. Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. **Int. J. Pharm.**, v. 182, p. 41–47, 1999.

DI SALVO, R. M. Controlando o surgimento da celulite. **Cosm. Toil.**, v. 8, p. 56-62, 1996.

DRUMMOND, C. J.; FONG, C. Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. **Current Opinion in Colloid Interface Sci**, v. 4, p. 449-456, 2000.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation Behavior in One-Phase (Winsor IV) Microemulsion Systems. In: KUMAR, P.; MITTEL, K.L.; MITTAL, K.L. (Ed.). **Handbook of Microemulsion Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 185-246.

FA, N.; BABAK, V.G.; STÉBÉ, M. The release of caffeine from hydrogenated and fluorinated gel emulsions and cubic phases. **Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 243, p. 117-125, 2004.

FORMARIZ, T.P. **Incorporação da doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa *in vitro* através de cultura de células**. 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2004.

GABBOUN, N. H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid, diclofenac acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **Int. J. Pharm.**, v. 212, p. 73-80, 2001.

GALENA QUÍMICA FARMACÊUTICA. **Amara shape**: nanotecnologia para delinear formas. Campinas, 2005. 7p.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. Fisioterapia dermatofuncional. 3ed. São Paulo: Malone, 2004. p. 22-23.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **Int. J. Pharm.**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HADGRAFT, J. Skin deep. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 58, p. 291-299, 2004.

HAMILTON, P.W., ALLEN, D.C. Morphometry in histopathology. **J. Pathol.**, v. 175, p. 369-379, 1995.

HEXSEL, D., ORLANDI, C., ZECHMEISTER, P. Botanical extracts used in the treatment of cellulite. **Dermatol. Surg.** v. 31, p. 867-872, 2005.

HIGUCHI, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **J. Soc. Cosmet. Chem.** v. 11, p. 85-97, 1960.

HIGUCHI, W.I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **J. Pharm. Sci.**, v. 51, p. 802-804, 1962.

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. *Apud*: URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nano estruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.303-314, 427p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.359-366.

KREILGAARD, M; PEDERSEN, E.J.; JAKOSZEWSKI, J.W. NMR characterization and transdermal drug delivery potencial of microemulsion systems. **J. Control. Rel.**, v. 69, p. 421-433, 2000.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 54, p. 77-98, 2002.

KOROLKOVAS, A. Análise farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara. 1988. p. 35-38.

LABBRA, D. Rheological properties of cosmetics na toiletries. New York: Marcel Dekker. 1993. 426p. *Apud*: URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nano estruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2004.

LAFFORGUE, C.; CARRET, L.; FALSON, F.; REVERDY, M.E.; FRENEY, J. Percutaneous absorption of a chlorexidine digluconate solution. **Int. J. Pharm.**, v. 147, p. 243-246, 1997.

LAWRENCE, H.B. Medicated Topicals. In: GENARO, A.R.; MARDEROSIAN, A.H.; HANSON, G.R. MEDWICK, T. (Ed.). **Remington: the science and practice of pharmacy**. 20th ed. Philadelphia: Williams e Wilkins, 2000. p.836-857.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 45, p. 89-121, 2000.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p.350-352.

LUEDER, M.; MOREL, J.; TIEDTKE, J.; MARKS, O. Anti-cellulite actives, dream ou reality?. **Cosmetics Today**. Suplemento to chimica oggi/ Chemistry Today. p. 45-48, 2004.
Disponível em
<http://www.teknoscienze.com/supplements/cosmetics_today/pdf_cosmetics%20today/lueder.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2005.

MACIAN, M.; SEGUER, J.; INFANTE, M.R.; SELVE, C.; VINARDELL, M.P. Preliminary studies of the toxic effects of derived from lysine non-ionic surfactants. **Toxicology**, v. 106, p. 1-9, 1996.

MACOLMSON, C.; SATRA, C.; KATARINA, S.; SIDHU, A.; LAWRENCE, M.J. Effect of oil on the level of solubilization of testosterone propionate into nonionic oil-in-water microemulsion. **J. Pharm. Sci.**, v. 87, n.1, p. 109-116, 1998.

MARJUKKA SUHONEN, T., BOUWSTRA, J. A., URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **J. Control. Release**, v. 59, p. 149-161, 1999.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma aplicação para as ciclodextrinas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 38, p. 33-54. 2002.

MITRAGOTRI, S. *et al.*; A mechanistic study of ultrasonically enhanced transdermal delivery. **J. Pharm. Sci.**, 84:697-706, 1995.

MITRAGOTRI, S. Sinergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 17, p. 1354-1359, 2000.

MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of structure and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecyl sulfonate_*n*-heptane_*n*-butanol_water by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. **J. Electroanal. Chem.**, v. 493, p. 100-107, 2000.

MORIMOTO, Y.; SUGIBAYASHI, K.; NATSUME, H.; The transdermal drug delivery system and transcutaneous absorption. **Acta Derm Venerol. Suppl.**, v. 185, p. 15-17, 1994.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clin. Dermatol.**, v. 19: 489-501, 2001.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MOULIK, S.P.; PAUL, B.K. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 78, p. 99-195. 1998.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 58, p. 343–356, 2004.

OGAWA, C.A., PLEPIS, A.M. Liberação *in vitro* de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita: colágeno. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, p. 115-122, 2002.

OHNSMANN, J.; QUINTÁS, G.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Determination of caffeine in tea samples by Fourier transform infrared spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 374, p. 561-565, 2002.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v. 13, p. 73-79, 2001.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistemas de liberação de fármacos. **Quím. Nova**, v. 27, p. 131-138. 2004.

O'NEIL, M.J. (Ed.). **The merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13th. Ed. Whitehouse Station: Merck, 2001. p. 1636.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, Biologia geral, Biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998. p. 19-31.

PIRES DE CAMPOS, M.S.M. **Influência do ultra-som na permeação cutânea da cafeína: estudo em fragmentos de pele e em adipócitos isolados de suínos**. 2004. Tese (Doutorado). Instituto de Biologia: Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004.

RESENDE, K.X. **Obtenção e caracterização física de sistemas microemulsionados não-iônicos e estudo da atividade antibiótica *in vitro* de eritromicina base nesses sistemas**. 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2004.

REICH I.; SCHNAARE, R.L. SUGITA, E. Pharmaceutical calculations. In: GENARO, A.R.; MARDEROSIAN, A.H.; HANSON, G.R. MEDWICK, T. (Ed.). **Remington: the science and practice of pharmacy**. 20th ed. Philadelphia: Williams e Wilkins, 2000. p.91-123.

ROSEMAN, T.J. HIGUCHI, W.I. Release of medroxyprogesterone acetato from silicone polymer. **J. Pharm. Sci.** v. 59, p. 353-357, 1970.

ROSEMBAUM, M., PRIETO, V., HELLMER, J., BOSCHMANN, M., KRUEGER, J., LEIBEL, R.L., SHIP, A.G. An exploratory investigation of the morphology and biochemistry of cellulite. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 101, p. 1934-1939, 1998.

ROSSI, A.B.R.; VERGNANINI, A.L. Cellulite: a review. **Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 14, p. 251-262, 2000.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2000. p. 4-35.

SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin *in vitro* percutaneous absorption. **Int J. Pharm.**, v. 215, p. 51-56, 2001.

SCHOTT, H. Rheology In: GENARO, A.R.; MARDEROSIAN, A.H.; HANSON, G.R. MEDWICK, T. (Ed.). **Remington: the science and practice of pharmacy**. 20th ed. Philadelphia: Williams e Wilkins, 2000. p.1472-1473.

SCHUELLER, R., ROMANOWSKI, P. Emulsões. **Cosm. Toil.**, v. 3, p. 71-74, 2000.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6^a ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000. p. 67-135.

SIMON, G.A.; MAIBACH, H.I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations – an overview. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v. 13, p. 229-234, 2000.

SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reports**, v. 324, p.107-269, 2000.

TANG, H., MITRAGOTRI, S., BLANKSCHTEIN, D., LANGER, R. Theoretical description of transdermal transport of hydrophilic permeants: application to low-frequency sonophoresis. **J. Pharm. Sci.**, v. 90, p. 545-568, 2001.

TANO, C.T.N. **Avaliação histológica do tecido adiposo da pele de ratas sob ação de cafeína e Cafeisilane C[®]**. 2003. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

THE UNITED STATE PHARMACOPEIAL CONVENTION. The united state pharmacopeia: the official compendia of Standards. 25th.ed. Rockville, MD, 2002. p.274.

TOKUMOTO, M.S. **Evolução estrutural durante a transição sol-gel em suspensões coloidais aquosas de SnO₂: abordagem reológica.** 1996. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química – Departamento de físico-química: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 1996.

UEDA, H. *et al.*; Difference in the enhancing effects of ultrasound on the skin permeation of polar and non-polar drugs. **Chem. Pharm. Bull.**, 44, p. 1973-76, 1996.

UNEP PUBLICATIONS. **Caffeine.** 2003, 376p. Disponível em <http://portalserver.unepchemicals.ch/Publications/SIDS_Cafeine.pdf>. Acesso em: 25 agost. 2005.

URBAN, M.C.C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nano estruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona.** 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2004.

VENTER, J.P.; MULLER, D.G.; PLESSIS, J.; GOOSEN, C. A comparative study of an in situ adapted diffusion cell and an *in vitro* Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13, p. 169-177, 2001.

VIA FARMA NET. **Cafeína.** Disponível em <<http://www.viafarmanet.com.br/>>. Acesso em: 14 de Out. 2005.

VIANNA, R.F.L.; BENTLEY, M.V.L.B.; RIBEIRO, G.; CARVALHO, F.S.; NETO, A.F.; OLIVEIRA, D.C.R.; COLLETT, J.H. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with corticosteroids: their characterization and stability. **Int. J. Pharm.**, v. 167, p. 205-213, 1998.

VULCANI, V.A.S. **Matrizes de colágeno para liberação de progesterona**. 2004. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, São Carlos. 2004.

WENNINGER, J. A. **International cosmetic ingredient dictionary and handbook**. 7th. ed., Washington: The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 1997. p. 176; 177; 406; 1128.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 56, p. 603-618, 2004.

WOOD, J.H. Reologia farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, M.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 1, p. 211-253.