



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, LIBERAÇÃO,
PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* E ESTABILIDADE DE
EMULSÕES CONTENDO (-)- TERPINEN-4-OL.**

Mestranda: Flavia Lima Ribeiro Maccari

Orientadora: Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara, SP, 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, LIBERAÇÃO,
PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* E ESTABILIDADE DE
EMULSÕES CONTENDO (-)- TERPINEN-4-OL.**

Flavia Lima Ribeiro Maccari

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 Scarpa

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara, SP, 2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M115a Macari, Flavia Lima Ribeiro
Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* e estabilidade de emulsões contendo (-)- terpinen-4-ol . / Flavia Lima Ribeiro Macari. – Araraquara, 2011
132 f

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Maria Virginia Scarpa
Co-orientador: Marcos Antonio Corrêa

I. Permeação cutânea. 2. Estabilidade. 3. Validação de metodologia. I. Scarpa, Maria Virginia, orient.. II. Corrêa, Marcos Antonio, co-orient.. III. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA:

“Os ventos que as vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar...”

Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado. Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre...” (Bob Marley)

Dedico minha dissertação ao meu avô, que infelizmente faleceu dia primeiro de junho de 2010. Ele sempre foi um estímulo para que eu iniciasse esse estudo sobre o câncer de pele e seu tratamento. Quando iniciei este trabalho, o que me motivava era encontrar um medicamento seguro e eficaz para o tratamento desta neoplasia, já que ele estava sofrendo e fazendo várias cirurgias para retirar os tumores que não paravam de aparecer, ora no rosto, outros no braço e nas costas. Meu avô, também pai, bisavô, sempre muito forte, paciente, amável, preocupado com todos, e também muito querido por todos, sempre de bem com a vida e sorridente, resumindo, feliz! Que sua alegria continue onde você está, e saiba que para sempre estarás no meu coração. Infelizmente minha pesquisa não poderá mais te ajudar, mas com certeza poderá contribuir com outras pessoas, e sei que ficarás feliz e orgulhoso por isso. Quando você se foi queria mais um abraço, falar o quanto te amo, ter você do nosso lado para sempre! Vozinho você estará para sempre no meu coração, te amo, fique em paz e ilumine minha vózinha para ela continuar a viver em paz, e consiga superar sua ausência. A vida começa aqui, e após esse acontecimento, entendi que nosso corpo, é só um corpo, e o que somos não depende de nossa aparência e sim do modo que agimos, pensamos e nos colocamos diante da vida. A pessoa física se vai, mas seus sentimentos e ensinamentos continuam presentes com os que ficaram.

AGRADECIMENTOS:

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita.” (Mahatma Gandhi)

Agradeço primeiramente aos meus pais, que durante minha vida não foram apenas referência, mas também me mostraram o que é o amor, a educação, sinceridade, cumplicidade, humildade, esperança, força, vontade, entre outras qualidades. Muito obrigada mãe, pela sua paciência, por sua garra, pelos dias em que teve que aguentar minha tristeza, e muitas vezes compartilhar as alegrias. Sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando, você é minha luz. E lembre-se sempre: “Quero sua risada mais gostosa, esse seu jeito de achar que vida pode ser maravilhosa” (Ivan Lins). Maravilhosa, acho que essa palavra se encaixa perfeitamente a você. E você meu pai, sempre muito amoroso, conselhos mil sobre minha carreira e minhas inseguranças, a palavra mais linda que escutei, foi quando o vô morreu, você disse no meio das minhas lágrimas: me desculpe filha por não estar aí com você, vou lembrar disso pro resto de minha vida!

“A vida é para quem topa qualquer parada. Não para quem para em qualquer topada.” (Bob Marley)

Ao grande amor da minha vida, gostaria de agradecer o amor, força e a torcida. Tenho certeza que nossos encontros e reencontros aconteceram no momento certo, desde a primeira vez que nos vimos, até os encontros sinistros que fizeram você olhar para mim. Com certeza tudo isso que aconteceu com agente não foi por acaso, você é minha felicidade, meu sonho, meu amor eterno. Já se passaram dez anos e a cada dia me sinto mais apaixonada. Tenho certeza que fui, sou e serei muito feliz e realizada ao seu lado. Toda sua força, seu carinho, sua vontade são essenciais e muito estimulantes para minha vida. Sinto que cada dia ao seu lado é muito bom, me dá força e vontade de continuar e tentar ser cada dia melhor. Cada vez que vejo seu olhar me apaixono mais, adoro suas palavras, seus gestos, não tenho como

descrever tudo que gosto em você. Quero para sempre te amar e espero que tenha sempre vontade e cultive nosso amor!

"Não existe amor à primeira vista. O que existe é a pessoa certa, no momento certo. Você por acaso estava lá."

Agradeço meus irmãos: Paula, menina, mulher, irmãzinha fantástica, às vezes de mau humor, mas sempre companheira; Henrique, meu veterinário preferido, irmão, compreensivo, pai carinhoso, marido amoroso; Marcelo, irmão professor, às vezes gozador, te amo maninho, muito obrigada por sua ajuda.

Agradeço ao meu afilhado Felipe e meus sobrinhos Maria Fernanda e Carlos Henrique, pela alegria da existência de vocês; crianças, ingênuas e sinceras; gosto de aprender com vocês, meus amores.

"A distância não é ruim, ela apenas nos mostra o quanto é bom estarmos juntos" (Jaqueline R M Costa)

Agradeço meus avós (Izaura e Afrânio, "na memória"), meus tios (Cintia, André), meus padrinhos (Tia Janda e Tio Rodolfo), meus priminhos (Rafa e Juninho) pela convivência, amor e carinho. Amo muito vocês.

Ao meu sogro e sogra (Lanes e Célia) e meus cunhados (Laninho e Bruno), que me acolheram como se eu fosse da família.

"A família é como um corrimão quando a subida está difícil sempre temos em quem se apoiar!" (Fábio Ribeiro)

Agradeço minha orientadora, amiga e companheira, Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa. Agora eu entendo muito bem o significado da palavra orientadora, você não só me orientou profissionalmente, como também me orientou para vida, me fez ver coisas que são mais importantes que um simples relacionamento profissional, você é amiga, com sua bagunça organizada, amável, uma linda pessoa, sempre disposta a ouvir, a aconselhar, e a viver intensamente até os problemas dos outros. Quando

vim para UNESP, tive muita sorte que o Juninho me falou de você, pois essa oportunidade de ter feito mestrado com você e de conhecer melhor a pessoa Virgínia foi inigualável, perfeita, muito obrigada por tudo, minha “orientadora”.

“Nunca se afaste de seus sonhos. Porque se eles forem, você continuará vivendo, mas terá deixado de existir.” (Mark Twain)

Um agradecimento especial a todos os meus amigos, os novos que fiz durante o mestrado e os mais antigos que estão sempre presentes em meus pensamentos e atitudes.

“Cada novo amigo que ganhamos no decorrer da vida aperfeiçoa-nos e enriquece-nos, não tanto pelo que nos dá, mas pelo que nos revela de nós mesmos.” (Miguel Unamuno)

Agradeço o pessoal do laboratório, Fatiminha “dez em uma”, com suas histórias emocionantes que me fizeram rir e também chorar; Eliete e Paula, pela paciência e ajuda. As meninas do Controle Microbiológico Flavia, Lucélia, Cris, Josi e Rudy, pela amizade, apoio, dicas e pelas noites emocionantes no laboratório. As estagiárias e amigas: Juju, Lary, Mari, Jaque e Daniel agradeço pela força durante meu mestrado. Ao pessoal dos outros laboratórios, muitos que passaram, uns apenas risadas, outros me deram opiniões e muitos conselhos, e ainda os amigos, muito bom conhecer pessoas novas que sei que posso contar, e vocês podem contar comigo, Gustavo, Hilris, Charlene, Priscileila, Flavia Chiva, Velma, Fer, Léo, Flavio, Silvio, Ana Paula, Juliana, Bruna, Jemima, Luciana, Juninho, Marcelo, Guilherme, Zé Ricardo, Priscila, Gabrielle, Eloísa, Juliana.

“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.” (Vinícius de Moraes)

Agradeço à todos professores da UNESP que me deram muita força e auxiliaram no meu desenvolvimento durante o mestrado. Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, meu co-

orientador, sempre disposto e gentil; Prof. Dr. Marlus Chorilli, inteligente e super companheiro, me deu muitas idéias boas; Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, que me ajudou com muita disposição; Prof. Dra. Rosangela Gonçalves Peccinini, uma professora sonhadora e super competente que gostei muito de conhecer; Prof. Dra. Vera Lúcia Borges Isaac, obrigada pelo apoio; Prof. Dr. José Paschoal Batistuti, tive oportunidade de conhecê-lo antes do mestrado, agradeço imensamente pelas dicas e amizade; Prof. Dra. Leila A. Chiavacci, que me ajudou bastante na parte de reologia e fez uma grande participação na minha banca; Prof. Dr. Raul César Evangelista, agradeço a disposição e atenção dada durante meu mestrado; Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, que foi muito importante para minha evolução profissional; Prof. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, uma ótima professora, bastante preocupada e empenhada para melhorar a qualidade do nosso Programa; Prof. Dr. Luís Vitor Silva do Sacramento, um professor nota dez, de bem com a vida, agradeço pelas dicas e amizade; Prof. Dra. Taís Maria Bauab, serena e atenciosa, muito obrigada pelo apoio.

Agradeço a grande participação da Prof. Mary Ann Foglio na minha qualificação e a participação brilhante da Prof. Renata Vianna Fonseca na minha defesa, fiquei bastante satisfeita e feliz com todas as considerações e elogios ao meu trabalho.

“Se os fatos não se encaixam na teoria, modifique os fatos.” (Albert Einstein)

Agradeço as meninas da Seção de Pós-graduação, Laura, Sônia, Cláudia, Ângela e Márcia.

Aos funcionários da biblioteca, secretaria, limpeza, manutenção, STI, e os técnicos de todos os laboratórios que de alguma forma contribuíram para a evolução do meu trabalho.

Um agradecimento especial à FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado, ao PADC da UNESP pelo apoio financeiro e a STIEFEL pela doação dos equipamentos que foram utilizados nesta pesquisa.

“Agradeço a tudo e todos que passaram na minha vida; acredito que agradecer é a arte de atrair coisas boas!”

Agradeço principalmente à Deus, por ter me dado a vida, saúde e pessoas maravilhosas que em poucas palavras tive que escrever um pouquinho de cada, para que minha dissertação não tivesse um número maior de páginas de agradecimentos e lembranças, do que de pesquisa.

"Não teme nem desanima quem se convence que é mantido pelo poder divino podendo ter a certeza em Deus o auxiliará em todas as suas necessidades. Quem ama Deus nada lhe falta." Santa Teresa de Jesus

“Um dia a gente aprende que...”

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma.

E você aprende que amar não significa apoiar-se, que companhia nem sempre significa segurança, e começa a aprender que beijos não são contratos, e que presentes não são promessas.

Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança; aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo, e aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende que falar pode aliviar dores emocionais, e descobre que se leva anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida; aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida, e que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que eles mudam; percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas; pode ser a última vez que as vejamos.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Começa a aprender que não se deve compará-los com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que não importa onde já chegou, mas onde se está indo, mas se você não sabe para onde está indo qualquer lugar serve.

Aprende que ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática.

Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se; aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou; aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha; aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens; poucas coisas são tão humilhantes... e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que quando se está com raiva se tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém; algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo.

Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás, portanto, plante seu jardim e decore sua alma ao invés de esperar que alguém lhe traga flores, e você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

Descobre que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.”

William Shakespeare

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
3.1. AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA	33
3.1.1. Câncer	33
3.1.2. Estimativa do câncer	33
3.1.3. Melanoma	34
3.1.4. Melanócitos	36
3.1.5. Tratamento	38
3.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES	39
3.3. ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004)	39
3.4. ESTABILIDADE ACELERADA (BRASIL, 2005).....	40
3.5. REOLOGIA	42
3.6. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA	45

3.7. LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1. MATERIAIS.....	53
4.1.1. PADRÕES E MATÉRIAS-PRIMAS.....	53
4.1.2. SOLVENTES E REAGENTES.....	53
4.1.3. EQUIPAMENTOS E SOFTWARES.....	54
4.2. MÉTODOS.....	56
4.2.1. AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA	56
4.2.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES	59
4.2.3. ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004)	61
4.2.3.1. Centrifugação.....	61
4.2.3.2. Características organolépticas.....	62
4.2.3.3. Microscopia Óptica	62
4.2.3.4. pH	62
4.2.3.5. Viscosidade mínima aparente	63
4.2.4. ESTABILIDADE ACELERADA (BRASIL, 2005)	63
4.2.4.1. Testes Microbiológicos	63
4.2.4.2. Contagem de microorganismos totais	63
4.2.4.3. <i>Salmonella</i> e <i>Escherichia coli</i>	63
4.2.4.4. <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
4.2.5. REOLOGIA	64
4.2.6. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA	65
4.2.6.1. Especificidade/seletividade	65
4.2.6.2. Linearidade	66
4.2.6.3. Precisão	66

4.2.6.4. Limite de quantificação	66
4.2.6.5. Exatidão	67
4.2.6.6. Robustez	67
4.2.7. LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA	68
4.2.7.1. Liberação <i>in vitro</i>	69
4.2.7.2. Permeação cutânea <i>in vitro</i>	70
4.2.7.3. Retenção cutânea <i>in vitro</i>	70
4.2.7.4. Validação da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	72
5.1. AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA	73
5.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES	78
5.3. ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004)	79
5.3.1. Centrifugação.....	79
5.3.2. Características organolépticas.....	80
5.3.3. Microscopia Óptica	80
5.3.4. pH	84
5.3.5. Viscosidade mínima aparente	85
5.4. ESTABILIDADE ACELERADA (BRASIL, 2005)	86
5.5. REOLOGIA	88
5.6. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA	90
5.6.1- Especificidade/seletividade	90
5.6.2- Linearidade	93
5.6.3- Precisão	95
5.6.3.1- Precisão (repetibilidade)	95
5.6.3.2- Precisão intermediária	96

5.6.4- Limite de quantificação	97
5.6.5- Exatidão	99
5.6.6- Robustez	100
5.7. LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA	103
5.7.1. Liberação	103
5.7.2. Permeação e retenção cutânea	108
5.7.3. Validação da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	116
6. CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do terpinen-4-ol.....	26
Figura 2 - Progressão da lesão dos melanócitos e a profundidade da invasão nos tecidos cutâneos.....	35
Figura 3 – Representação de estruturas das três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.....	37
Figura 4 – Unidade epidermo-melânica da pele formada pelos melanócitos e queratinócitos.....	38
Figura 5 – Curvas representativas do comportamento de fluxo, classificando-os em Newtonianos ou não Newtonianos.....	43
Figura 6 - Curva de fluxo, demonstrativo da tixotropia e área de histerese.....	44
Figura 7 - Célula de Franz – demonstração do compartimento doador e receptor e disposição da membrana.....	49
Figura 8 – Esquema representativo do equipamento Microette Plus Hanson.....	49
Figura 9 - Linhagens de células tumorais humanas utilizadas no ensaio antiproliferativo.....	57
Figura 10 - Esquema da aplicação das amostras, em quatro concentrações distintas, na placa teste (T1).....	58
Figura 11 – Curva de concentração e resposta da doxorubicina frente as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento de células e a concentração de amostra após 48 horas de exposição.....	75
Figura 12 – Curva de concentração e resposta do óleo de <i>Melaleuca</i> frente às linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento de células e a concentração de amostra após 48 horas de exposição.....	76

Figura 13 – Curva de concentração e resposta do (+)-terpinen-4-ol frente às linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento de células e a concentração de amostra após 48 horas de exposição.....	77
Figura 14 – Curva de concentração e resposta do (-)-terpinen-4-ol frente às linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento de células e a concentração de amostra após 48 horas de exposição.....	77
Figura 15 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Análise inicial.....	81
Figura 16 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Temperatura ambiente, 15 dias.....	81
Figura 17 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Geladeira, 15 dias.....	81
Figura 18 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Estufa, 15 dias.....	81
Figura 19 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Ciclo, 15 dias.....	82
Figura 20 – Fotomicrografia da formulação 2 (F2) – Análise inicial.....	82
Figura 21 – Fotomicrografia da formulação 2 (F2) – TA, 15 dias.....	82
Figura 22 – Fotomicrografia da formulação (F2) – Geladeira, 15 dias.....	83
Figura 23 – Fotomicrografia da formulação 2 (F2) – Estufa, 15 dias.....	83
Figura 24 – Fotomicrografia da formulação 2 (F2) – Ciclo, 15 dias.....	83
Figura 25 – Teste de varredura de tensão da formulação 1.....	88
Figura 26 – Teste de varredura de tensão da formulação 2.....	89
Figura 27 – Curva de fluxo I e II das formulações F1 e F2.....	90
Figura 28 – Curva de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, referente às formulações F1 e F2.....	90
Figura 29 – Injeção do placebo da formulação 1.....	91
Figura 30 – Injeção do placebo da formulação 2.....	91
Figura 31 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em água após 1 hora em balão	

volumétrico, sem abrigo da luz.....	92
Figura 32 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em ácido clorídrico após 1 hora em balão volumétrico, sem abrigo da luz.....	92
Figura 33 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em hidróxido de sódio após 1 hora em balão volumétrico, sem abrigo da luz.....	92
Figura 34 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em peróxido de hidrogênio após 1 hora em balão volumétrico, sem abrigo da luz.....	92
Figura 35 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em água exposto por 1 hora à luz ultravioleta.....	93
Figura 36 – Curva analítica do (-)-terpinen-4-ol, equação da reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (R^2).....	94
Figura 37 – Curva da analítica feita a partir de concentrações próximas ao suposto limite de quantificação.....	98
Figura 38 – Padrão do (-)-terpinen-4-ol nas concentrações de 5,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$	99
Figura 39 – Injeção do meio receptor selecionado em CLAE, utilizando as mesmas condições do método previamente validado.....	104
Figura 40 – Injeção do meio receptor com adição do padrão (20 $\mu\text{g/mL}$) de terpinen-4-ol selecionado em CLAE, utilizando as mesmas condições do método previamente validado.....	104
Figura 41 – Modelo de cinética de liberação de zero ordem.....	106
Figura 42 – Modelo de cinética de liberação de primeira ordem.....	107
Figura 43 – Modelo de cinética de liberação com aplicação da equação de Higuchi.....	107
Figura 44 – Curvas da permeação cutânea das formulações 1 e 2, com as	

respectivas equações.....	110
Figura 45 – Retenção cutânea das formulações 1 e 2 na epiderme e derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).....	111
Figura 46 – Retenção cutânea das formulações 1 e 2 no estrato córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).....	112
Figura 47 – Injeção em CLAE da retenção do terpinen-4-ol no EC, extração com etanol.....	116
Figura 48 – Injeção em CLAE da retenção do terpinen-4-ol no EC, extração com acetonitrila.....	117
Figura 49 – Injeção em CLAE da fase receptora.....	117
Figura 50 – Cromatograma obtido em CLAE, injeção da alíquota da fase receptora após a permeação cutânea na célula que continha o placebo da F1.....	118
Figura 51 – Cromatograma obtido em CLAE, injeção da alíquota da fase receptora após a permeação cutânea na célula que continha o placebo da F2.....	118
Figura 52 – Injeção do estrato córneo, fita adesiva e acetonitrila.....	118
Figura 53 – Injeção da epiderme mais derme em acetonitrila.....	119
Figura 54 – Curva analítica do (-)-terpinen-4-ol utilizando-se como solvente o meio receptor, equação da reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (R^2)...	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da formulação 1 (F1)	60
Tabela 2 - Composição da formulação 2 (F2)	60
Tabela 3 – Variáveis utilizadas para o teste de Robustez (esquerda) e definição dos testes 1 a 8 alternando estas variáveis (direita).....	68
Tabela 4 – Inibição de 50% do crescimento celular nas linhagens de células testadas. GI ₅₀ (µg/mL).....	74
Tabela 5 – pH das formulações 1 e 2 submetidas a diferentes temperaturas.....	84
Tabela 6 – Valores de viscosidade apresentada durante o teste de estabilidade preliminar, referente as formulações 1 e 2.....	85
Tabela 7 – pH das formulações 1 e 2 durante a estabilidade acelerada.....	86
Tabela 8 – Resultados referentes viscosidade F1 e F2, até o período de 60 dias.	87
Tabela 9 – Resultados da variação do teor da F1 e F2, submetidas á estabilidade acelerada.....	87
Tabela 10 – Dados da linearidade.....	94
Tabela 11 – Resultados obtidos na análise da precisão feita pelo mesmo analista, em diferentes dias.....	96
Tabela 12 – Resultados obtidos na análise da precisão feita por analistas diferentes em diferentes dias.....	96
Tabela 13 – Valores obtidos no ensaio de exatidão.....	99
Tabela 14 – Valores obtidos na robustez utilizando método de Yonden e Steiner (1975).....	101
Tabela 15 – Resultados finais obtidos na análise de robustez.....	102
Tabela 16 – Resultado da porcentagem solúvel nos meios receptores testados...	103

Tabela 17 – Liberação do terpinen-4-ol na formulação F1.....	105
Tabela 18 – Liberação do terpinen-4-ol na formulação F2.....	105
Tabela 19 – Permeação cutânea do (-)terpinen-4-ol na formulação 1.....	108
Tabela 20 – Permeação cutânea do (-)terpinen-4-ol na formulação 2.....	109
Tabela 21 – Resultados encontrados para recuperação do terpinen-4-ol no estrato córneo e epiderme mais derme.....	120

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A – água

AI – Análise Inicial

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHT – butilhidroxitolueno

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CO₂ – Gás carbônico

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

CV – Coeficiente de Variação

DMSO – Dimetilsulfóxido

EC – Estrato Córneo

F1 – Formulação 1

F2 – Formulação 2

FDA – Food and Drug Administration

FR – Fator de Resposta

GI 50 – Inibição 50% do crescimento celular

HT-29 - Linhagem de célula tumoral de cólon

H₂O – Água

HCl – Ácido clorídrico

ICH – International Conference on Harmonisation

INCA – Instituto Nacional Câncer

J – Fluxo

K562 - Linhagem de célula tumoral de leucemia

MCF-7 - Linhagem de célula tumoral de mama

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NCI – National Cancer Institute

NCI-ADR/RES - Linhagem de célula tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos

NCI-H460 - Linhagem de célula tumoral de pulmão, tipo não pequenas células

O – óleo

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVCAR-3 - Linhagem de célula tumoral de ovário

PC3 - Linhagem de célula tumoral de próstata

pH – potencial hidrogeniônico

pka – Constante de dissociação

PM – Peso Molecular

Q – Quantidade

SFB – Soro bovino fetal

SNC – Sistema Nervoso Central

SPPC – Scientific Committee on Consumer Products

TA – Temperatura Ambiente

TCA – Ácido tricloroacético

TGI – Inibição total do crescimento celular

TTO – óleo de *Melaleuca alternifolia*

UACC-62 – Linhagem de célula tumoral de melanoma

UV – Ultravioleta

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

U251 - Linhagem de célula tumoral de glioma

VERO - Linhagem de célula epitelial normal de rim de macaco verde)

786 - Linhagem de célula tumoral de rim

η - viscosidade

RESUMO

O terpinen-4-ol é o principal componente da *M. alternifolia*, apresenta atividade antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica; em estudos recentes *in vitro* a atividade antineoplásica para linhagens celulares de melanoma (M14) foi demonstrada. O objetivo específico deste trabalho foi verificar a atividade farmacológica *in vitro* dos isômeros óticos (-) terpinen-4-ol e (+) terpinen-4-ol e do óleo de *Melaleuca alternifolia* em nove linhagens diferentes de células tumorais, incluindo a célula UACC-62 do melanoma que ainda não havia sido estudada, e a concentração eficaz para o desenvolvimento de formulação que possa ter ação contra o melanoma. Após realização dos ensaios farmacológicos *in vitro* verificou-se que o (-)terpinen-4-ol apresentou melhor atividade nas linhagens celulares de melanoma, sendo o princípio ativo de escolha para as duas formulações que foram desenvolvidas, testadas e comprovadas a qualidade e estabilidade. Para caracterização das formulações foram efetuados os ensaios reológicos, sendo comprovado que as emulsões desenvolvidas são adequadas para o uso tópico no que diz respeito às suas características reológicas, sendo que as duas apresentaram comportamento de fluxo semelhante, diferindo apenas na área de histerese. Posteriormente foram feitos testes de permeação e retenção cutânea *in vitro*, para verificar qual formulação permite que o princípio ativo atinja em maior concentração a camada de interesse para atividade contra o melanoma. O método proposto para quantificação do (-)-terpinen-4-ol foi validado e utilizado nos ensaios de estabilidade acelerada, liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*. Os ensaios de liberação demonstraram que as duas formulações apresentam cinética de zero ordem, com fluxo de 14,62 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para formulação 1 e de 6,70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para formulação F2. Na retenção cutânea *in vitro* verificou-se que a F1 apresentou retenção do terpinen-4-ol menor no estrato córneo, em relação a F2. De modo inverso, a retenção na epiderme mais derme do terpinen-4-ol foi superior na F1. Verificou-se que a formulação F1 atingiu a camada mais profunda da pele, sendo mais adequada para a utilização que foi proposta neste trabalho.

Palavras-chave: terpinen-4-ol, liberação, retenção cutânea *in vitro*, permeação cutânea *in vitro*, antiproliferativo *in vitro*, validação de métodos, estabilidade de medicamentos, controle de qualidade.

ABSTRACT

The terpinen-4-ol is the major component of *M. alternifolia*, has anti-inflammatory, antibacterial and antifungal, in recent studies *in vitro* anticancer activity for melanoma cell lines (M14) was demonstrated. The specific objective of this study was to assess the *in vitro* pharmacological activity of optical isomers (-) terpinen-4-ol and (+) terpinen-4-ol and oil of *Melaleuca alternifolia* in nine different tumor cell lines, including cell UACC -62 melanoma that had not yet been studied, and effective concentration for the formulation development that may have action against melanoma. After performing the *in vitro* pharmacological tests showed that the (-) terpinen-4-ol showed better activity in melanoma cell lines, with the active ingredient of choice for the two formulations were developed, tested and proven quality and stability. For characterization of the formulations were made the rheological tests and confirmed that the developed emulsions are suitable for topical use in relation to their rheological characteristics, and the two had similar flow behavior, differing only in the area of hysteresis. Subsequent tests were performed permeation and skin retention *in vitro*, to determine which formulation allows the active ingredient reaches higher concentration in the layer of interest for activity against melanoma. The proposed method for quantification of (-)-terpinen-4-ol was validated and used in accelerated stability testing, release, skin permeation and retention *in vitro*. The release assays demonstrated that both formulations have zero order kinetics at a rate of 14.62 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ for formulation 1 and 6.70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ for formulation F2. *In vitro* skin retention was found that the F1 showed retention of terpinen-4-ol smaller in the stratum corneum, compared to F2. Conversely, the retention in the epidermis over the dermis of terpinen-4-ol was higher in F1. It was found that formulation F1 reached the deepest layer of skin, being more suitable for the use that was proposed in this paper.

Keywords: terpinen-4-ol, release, skin retention *in vitro*, permeation *in vitro*, antiproliferative *in vitro*, methods validation, drug stability, quality control.

1. INTRODUÇÃO

Melaleuca alternifolia (família: Myrtaceae), também chamada de *tea tree oil* (TTO), é uma planta nativa da Austrália, é cultivada em outros países em menor escala, inclusive no Brasil. O óleo essencial desta planta possui mais de 100 componentes. A composição do TTO é regulamentada pela norma internacional ISO-4730, que estabelece limites máximos e mínimos para 14 componentes do óleo. Os principais componentes são terpinen-4-ol e 1,8-cineol. O terpinen-4-ol é o marcador da planta, com teor indicado acima de 30%, e o 1,8-cineol não deve exceder 15%, pois este composto não interfere significativamente na ação terapêutica e possui propriedades altamente tóxicas e irritantes. Normalmente os valores encontrados destes dois componentes é de 40% e 3%, respectivamente (International Organisation for Standardisation, 1996; SILVA *et al*, 2002).

O óleo de *M. alternifolia* é amplamente utilizado pela população, embora os dados disponíveis sobre a segurança e toxicidade do óleo sejam limitados (HAMMER *et al*, 2005). A maior parte dos estudos com o TTO estão relacionados com sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-viral e anti-câncer (CALCABRINI *et al*, 2004).

A árvore de *Melaleuca alternifolia* possui de 5 a 7 metros de altura, cresce em áreas pantanosas e próximo de cursos de água da região costeira subtropical de New South Wales na Austrália, tendo melhor crescimento em áreas de alta pluviosidade, ou áreas com irrigação. A primeira colheita é realizada no período de 1 a 3 anos, dependendo do clima e do crescimento (BURFIELD & SHEPPARD-HANGER, 2000).

O óleo essencial é obtido por hidrodestilação das folhas, apresentando um rendimento de aproximadamente 1 a 2 % do peso fresco da planta. É recolhido com 50 mL de água, extraído com pentano três vezes, seguido da adição de sulfato de magnésio anidro na fase orgânica (SILVA *et al*, 2002).

Alguns fatores como solo, clima, irrigação, plantação, colheita, idade da árvore, época do ano, influenciam na produção da substância ativa na planta, assim como o modo de extração do princípio ativo das folhas, farmacógeno da *M. alternifolia*. Dependendo destas condições têm-se diferentes concentrações dos ativos. O acondicionamento, transporte e armazenamento também são relevantes à qualidade do produto final, pois tem sido sugerido que o armazenamento prolongado provoca o aparecimento de produtos de oxidação que são os principais alérgenos (HAMMER *et al*, 2006).

O terpinen-4-ol (figura 1) é o principal componente do óleo de *Melaleuca alternifolia*, mas também pode ser produzido pelo metabolismo secundário de outras plantas, como *Alpinia zerumbet*, *Camellia sinensis*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, *Artemisia*, *Cinnamomum*, *Citrus*, *Cuminum*, *Cupressus*, *Cymbopogon*, *Lantana*, *Lippia*, *Myrsinica*, *Origanum*, *Pimpinella*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Thymus*, entre outras (PRIEST & PRIEST, 2002; BETTONI, 2004; VIEIRA *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2005.). Possui atividade antiinflamatória, antifúngica e antimicrobiana. Recentemente, estudos *in vitro* demonstram eficácia da *Melaleuca alternifolia* e do (+)-terpinen-4-ol na inibição das células M14 do melanoma (CALCABRINI *et al.*, 2004). Outros autores demonstraram elevada citotoxicidade da *Melaleuca alternifolia*, que apresenta em sua composição aproximadamente 40% de terpinen-4-ol, em células cancerígenas do pulmão (A549), mama (MCF-7) e próstata (PC-3) (LIU, *et al.*, 2009). A figura 1 apresenta a estrutura deste composto químico.

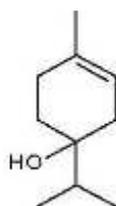


Figura 1 – Estrutura química do terpinen-4-ol.

As neoplasias são classificadas em benignas e malignas. Os tumores benignos possuem células diferenciadas com crescimento lento e expansivo, pouca mitose e, na maioria das vezes, não capazes de originar metástases, apresentando apenas complicações locais. Os tumores malignos não são encapsulados e apresentam perda da função de tecidos e/ou órgãos em consequência da ausência de diferenciação, invasão e destruição dos tecidos adjacentes, proliferação incontrolada e geração de metástases que normalmente levam o paciente ao óbito. As células neoplásicas, originada de mutações, podem ser hereditárias ou adquiridas somaticamente como resultado de processos endógenos ou exposição a uma variedade de fatores ambientais, químicos, físicos e biológicos (COELHO, 1998).

O melanoma é a principal doença fatal manifestada na pele consistindo em um tipo de câncer maligno que tem origem nos melanócitos, com predominância em

adultos brancos. Embora represente apenas 4% dos tipos de câncer de pele, relatos de várias partes do mundo demonstram aumento nas taxas de incidência e mortalidade devido ao melanoma, de acordo com dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer) (BRASIL, 2009).

Atualmente, não se tem medicação de uso tópico para o melanoma e os tratamentos convencionais com agentes antineoplásicos possuem níveis elevados de toxicidade, principalmente relacionada à falta de especificidade desses agentes pelas células tumorais. A aplicação tópica de emulsões contendo agentes antineoplásicos sugerida neste trabalho, desde que garantida a atuação específica sem a absorção sistêmica da substância que pode apresentar potencial tóxico, pode ser útil no tratamento do melanoma, e desta forma minimizar os efeitos da medicação em células normais, em outros tecidos e/ou órgãos, não específicos.

As emulsões são definidas como um sistema heterogêneo, sendo consideradas misturas relativamente estáveis de água e componentes oleosos, na presença de um emulsificante que atua reduzindo a tensão interfacial entre a água e o óleo, prevenindo a coalescência das gotículas. Nas emulsões também podem ser incorporados outros componentes com finalidades específicas. Podem ser classificadas em O/A (óleo em água) ou A/O (água em óleo), dependendo da natureza das fases dispersa, ou dispersante; ou ainda em O/A/O e A/O/A para sistemas trifásicos (SILVA & SOARES, 1996).

Para o desenvolvimento de emulsões, além do aspecto macroscópico da formulação, o delineamento das propriedades físicas e a estabilidade são fundamentais (MOSTEFA *et al.*, 2006). Os principais fatores de instabilidade das emulsões são cremeação, floculação e coalescência. Alguns fatores podem desencadear os processos de instabilidade tais como, a composição da formulação, o tensoativo utilizado, o tamanho dos glóbulos (observados na microscopia óptica), a viscosidade, a reologia, o valor de pH, o processo de fabricação e a velocidade de agitação (BREUER, 1985).

As características reológicas são de fundamental importância para caracterização e verificação da predisposição da formulação em apresentar instabilidade frente a situações que possam ocorrer, desde o processo de fabricação até a utilização do produto pelo consumidor. O uso da técnica de reologia das emulsões e demais formulações farmacêuticas de uso tópico estão cada vez mais freqüentes em pesquisas realizadas pela comunidade científica, pois a estabilidade

física de uma formulação é necessária para o controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia. O estudo das características reológicas está relacionado com fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001). A caracterização reológica é efetiva na comparação das propriedades estruturais de emulsões, de forma a se obter informações sobre a resistência à forças externas, e ainda pode indicar a estabilidade da formulação (THORGEIRSDÓTTIR *et al.*, 2006).

As formulações de uso tópico podem ser submetidas aos ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, sendo essencial para estudar a cinética de liberação do princípio ativo e absorção dérmica, analisar a quantidade de princípio ativo que ficará nas camadas da pele e a quantidade permeada que poderá ser absorvida *in vivo* (CROSS *et al.*, 2008). A permeação cutânea *in vitro* também é considerada como ferramenta na seleção de formulações, sendo utilizada para verificar as possíveis influências relativas à formulação na liberação ou permeação do princípio ativo (SPPC, 2006) e na triagem ou comparação do potencial de permeação cutânea em diferentes matrizes (SANCO, 2004).

Para quantificação da substância em análise nos ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea, faz-se necessário a utilização de metodologia analítica adequada. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que é atualmente a mais utilizada em indústrias farmacêuticas, é considerada precisa e exata em uma faixa específica na qual a substância é analisada, garantindo facilmente resultados confiáveis e reprodutíveis.

Para garantir a confiabilidade do método analítico é necessário realizar a validação do mesmo, definir a faixa de trabalho e o limite mínimo de substância que poderá ser quantificado. Os parâmetros avaliados na validação de uma metodologia analítica são: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003). O método analítico validado também é utilizado para a quantificação do princípio ativo no estudo de estabilidade acelerada, que é um conjunto de testes projetados visando obtenção de informações sobre a estabilidade física e química de produtos farmacêuticos, e desta forma, definir se o produto se mantém estável durante o seu prazo de validade.

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, e outros, relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos,

forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2004).

Este trabalho consiste no desenvolvimento, controle de qualidade e comprovação de atividade farmacológica *in vitro* de uma formulação farmacêutica com atividade anticancerígena. Esta é primeira etapa da busca de uma alternativa para o combate ao câncer de pele maligno, tendo como finalidade obtenção de novas medicações para tratamento de pacientes em estágio avançado da doença.

Estudos realizados comprovaram a eficácia do (+)-terpinen-4-ol contra o melanoma em células M14 *in vitro* e do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, cujo principal componente é o terpinen-4-ol, contra o câncer de próstata, mama e pulmão. A avaliação do óleo essencial e do (-) e (+)-terpinen-4-ol em oito linhagens diferentes de células tumorais, é de suma importância, já que ainda não existem estudos comparativos entre os isômeros para a atividade antiproliferativa. Outro fator relevante é o custo do (-)-terpinen-4-ol, que é inferior ao do (+)-terpinen-4-ol, sendo viável sua utilização, se este apresentar atividade igual ou superior ao isômero (+) (CALCABRINI *et al.*, 2004; LIU, *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, (-) e (+) terpinen-4-ol em células *in vitro*, bem como, desenvolver e testar qualidade e eficácia de formulações farmacêuticas de uso tópico contendo (-)-terpinen-4-ol para o tratamento do melanoma.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a atividade farmacológica anticâncer em nove linhagens de células tumorais *in vitro* do óleo de *Melaleuca alternifolia*, (-) e (+) terpinen-4-ol;
- 2- Desenvolver formulações de uso tópico contendo terpinen-4-ol para tratamento do melanoma;
- 3- Avaliar estabilidade física preliminar das formulações (Estabilidade Preliminar);
- 4- Avaliar a estabilidade das formulações com estudos de estabilidade acelerada, realizando testes físicos, químicos e microbiológicos das formulações.
- 5- Analisar a reologia das formulações;
- 6- Desenvolver e validar método analítico para quantificação do terpinen-4-ol;
- 7- Analisar a liberação, permeação e retenção cutânea do princípio ativo *in vitro*;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Revisão Bibliográfica

3.1. AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA

3.1.1. Câncer

As neoplasias são classificadas em benignas e malignas. Os tumores benignos possuem células diferenciadas com crescimento lento e expansivo, pouca mitose e, na maioria das vezes não são capazes de originar metástases, apresentando apenas complicações locais. Os tumores malignos, não são encapsulados e apresentam perda da função em consequência da ausência de diferenciação, invasão e destruição dos tecidos adjacentes, proliferação incontrolada e geração de metástases que normalmente levam o paciente ao óbito. Câncer é um termo específico para as neoplasias malignas. A célula neoplásica origina-se de mutações, que podem ser hereditárias ou adquiridas somaticamente como resultado de processos endógenos ou exposição a uma variedade de fatores ambientais, químicos, físicos e biológicos (FERNANDES JÚNIOR, 2000; COELHO, 1998).

3.1.2. Estimativa do câncer

Atualmente o câncer é uma das maiores ameaças para saúde pública mundial. O crescimento populacional e o envelhecimento tardio da população contribuem para o aumento da incidência de câncer e consequente aumento de óbitos, principalmente em países com baixo e médio nível de desenvolvimento (BRASIL, 2009). O relatório publicado em 2008 pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report*), demonstrou que o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. O foco principal de discussão do câncer atualmente, além das alternativas de tratamentos que estão sendo amplamente pesquisadas, é a prevenção, detecção precoce, diagnóstico, vida após o câncer (inclusão social) e morte (NCI, 2010).

No Brasil, as neoplasias malignas ocupam o segundo lugar em causas de morte da população, sendo quase 17% dos óbitos de causa conhecida que foram notificados em 2007 (BRASIL, 2009).

Revisão Bibliográfica

3.1.3. Melanoma

O melanoma é a principal doença fatal manifestada da pele sendo um tipo de câncer maligno que tem origem nos melanócitos com predominância em adultos brancos. Embora só represente 4% dos tipos de câncer de pele, relatos de várias partes do mundo demonstram aumento de 4 a 8% nas taxas de incidência, tendo o maior aumento registrado no período de 2004 a 2005, aproximadamente 9% (SAMPAIO & RIVITTI, 2008; BRASIL, 2009; NCI, 2010).

O melanoma apresenta um crescente aumento em sua taxa de incidência, embora não seja o câncer mais freqüente na população. Apesar da baixa incidência deste tipo de neoplasia, sua letalidade é elevada. Segundo INCA (Instituto Nacional do Câncer) é muito provável que exista um baixo registro de pessoas com esta neoplasia devido ao subdiagnóstico e por ser uma neoplasia de excelente prognóstico, apresentando taxas elevadas de cura completa se tratado corretamente.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima 132 mil novos casos deste tipo de câncer a cada ano, em torno de 2,5% de prevalência, com um significativo aumento na incidência em populações de pele branca. Outros tumores de pele são mais freqüentes que o melanoma, mas menos expressivos em relação à mortalidade, porém seu prognóstico é considerado bom quando detectado em estágios iniciais da doença, havendo uma grande melhoria na sobrevida dos pacientes, principalmente por causa da detecção precoce. Sua fácil visualização facilita o prognóstico e diagnóstico em estágios iniciais da doença, sendo essencial para o tratamento rápido, o que aumenta as chances de cura e diminui a possibilidade de ocorrência de metástases das células cancerosas para outros órgãos. Essa visibilidade também é benéfica para o estudo da evolução e tratamento da doença (MENDELSON, 2001).

Em geral, os cânceres de pele estão associados com a exposição excessiva à radiação ultravioleta, mas para o melanoma em particular, o risco maior inclui o histórico pessoal ou familiar de melanoma. Alguns fatores provavelmente influenciam no aparecimento de melanoma cutâneo, dentre eles, os fatores genéticos, fatores físicos (raios ultravioleta - UV), fatores biológicos (hormônios) e vírus. Todavia, geralmente não se sabe qual é o real agente causador desta neoplasia, e possivelmente existem fatores associados, os quais vêm se

Revisão Bibliográfica

desenvolvendo ao longo de vários anos. Entretanto, alguns fatores de risco podem ser controlados, como por exemplo o fumo, álcool, alimentação, proteção solar, entre outros, e por este motivo, é importante investir em prevenção e informação, além de auxiliar o monitoramento e redução desses fatores (SAMPAIO & RIVITTI, 2008; BRASIL, 2009).

Ações de prevenção, como proteção contra a luz solar, são efetivas e de baixo custo, além do auto-exame, que facilita a detecção precoce da doença, facilitando sua cura, além da educação em saúde, que deve ser realizada com o intuito de alertar a população. Tais medidas são eficazes e estratégicas para minimizar as mortes relacionadas com este tipo de neoplasia (BRASIL, 2009).

O melanoma é o resultado da transformação maligna dos melanócitos, células epiteliais que sintetizam melanina (MENDELSON, 2001). A figura 1 demonstra a progressão da lesão dos melanócitos e a profundidade da invasão nos tecidos cutâneos.

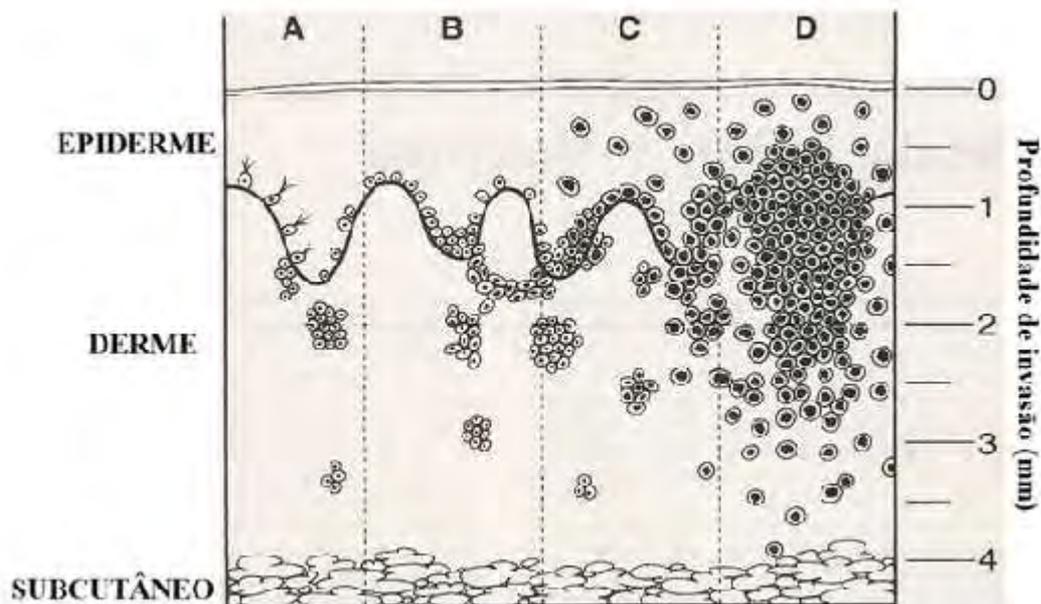


Figura 2 - Progressão da lesão dos melanócitos e a profundidade da invasão nos tecidos cutâneos. Fonte: Mendelsohn (2001).

A figura 2 representa quatro níveis de progressão, sendo: A - melanócitos normais na junção dermo-epidérmica organizados individualmente (pele normal) ou

Revisão Bibliográfica

em pequenos aglomerados (como pode ser visto em tumores benignos); B - displasia precoce, à esquerda, uma proliferação de melanócitos na junção dermo-epidérmica, e à direita, melanócitos atípicos maiores, com ligação adjacente abaixo da epiderme; C - melanoma precoce, à esquerda proliferação de grandes melanócitos atípicos ao longo da junção dermo-epidérmica e estendendo-se células individuais nas camadas superiores da epiderme, e à direita, invasão precoce com melanócitos atípicos como pequenos aglomerados e células individuais; D - melanoma invasivo avançado com uma lesão vertical, um grande número de células transformadas presentes profundamente na derme e tecido subcutâneo (MENDELSON, 2001).

3.1.4. Melanócitos

A pele é considerada o órgão mais extenso do corpo humano, sendo uma barreira de proteção contra agentes externos, impedindo a perda de água, eletrólitos e outras substâncias do meio interno. É um tecido de estrutura complexa, disposto de modo harmônico para desempenhar todas suas funções. Além de sua função de proteção, a pele é também importante na termorregulação, percepção e secreção (CHIEN, 2001).

A pele é representada por três camadas distintas, demonstradas na figura 3: epiderme, derme e hipoderme.

Revisão Bibliográfica

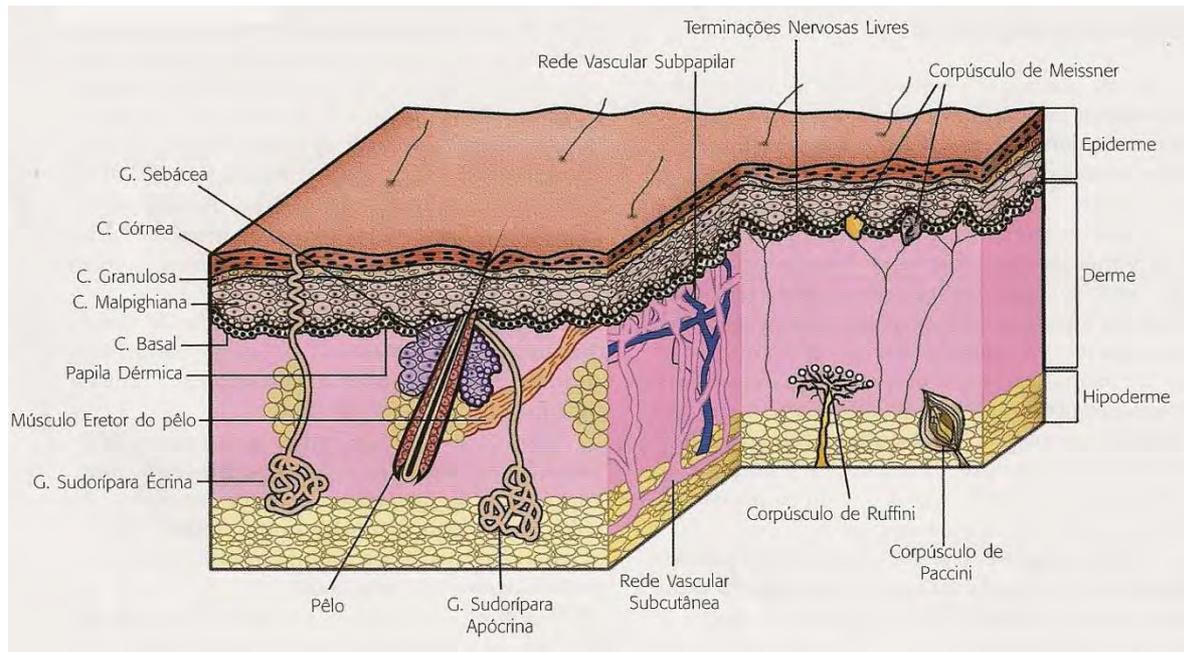


Figura 3 – Representação de estruturas das três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Sampaio & Rivitti (2008).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele, composta por tecido adiposo de tamanho variável. Sua função é depósito nutritivo de reserva, isolamento e proteção mecânica (SAMPAIO & RIVITTI, 2008).

A derme é rica em fibras colágenas, elásticas e reticulares. Nesta camada, se encontram as estruturas anexiais da pele, como glândulas sudoríparas, folículos pilossebáceos e músculo eretor do pelo. Em quantidades variáveis encontram-se os vasos sanguíneos, linfáticos e estruturas nervosas (SAMPAIO & RIVITTI, 2008).

A epiderme é composta por queratinócitos e constituída por quatro camadas. A camada basal (camada mais profunda da epiderme), constituída por células basais e melanócitos, é germinativa, e através dela são originadas as demais camadas da epiderme, tendo intensa atividade mitótica. A camada malpighiana é formada por células escamosas ou espinhosas, além de uma pequena quantidade de algumas citoqueratinas. A camada granulosa é formada por células granulosas, com grânulos irregulares compostos de querato-hialina. E a camada córnea, ou estrato córneo, constitui células epidérmicas anucleadas, membranas espessas e citoplasma bifásico de filamentos de queratina (SAMPAIO & RIVITTI, 2008).

Os melanócitos contém organelas especializadas, denominadas melanossomas, responsável pela síntese e deposição de melanina. Os melanócitos

Revisão Bibliográfica

e os queratinócitos constituem as unidades epidermo-melânicas da pele (figura 4). A atividade melanocítica é influenciada pelos queratinócitos, hormônios, mediadores de inflamação e vitamina D3 (SAMPAIO & RIVITTI, 2008).

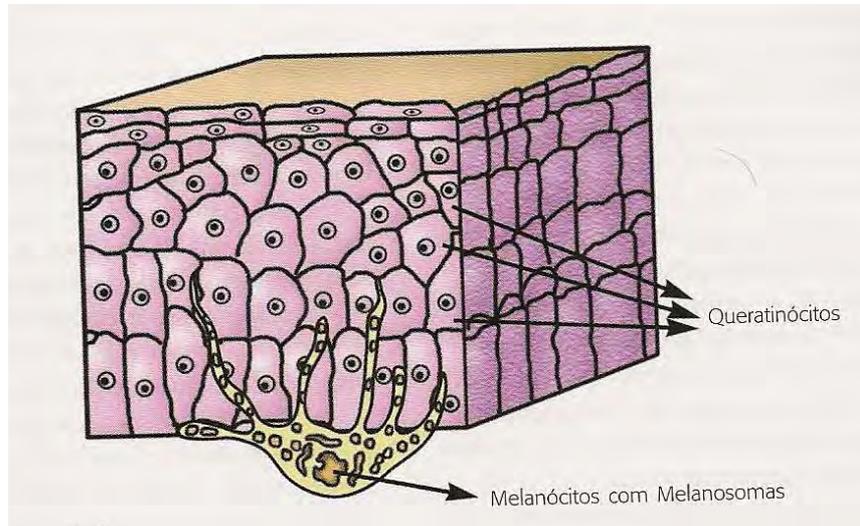


Figura 4 – Unidade epidermo-melânica da pele formada pelos melanócitos e queratinócitos. Fonte: Sampaio & Rivitti (2008).

3.1.5. Tratamento

O tratamento dos pacientes com câncer é composto por três modalidades: 1) a cirurgia que é a forma mais antiga e definitiva para o tratamento do câncer, sendo bastante invasiva, é utilizada quando o tumor está em um local que favoreça sua retirada e em estágio inicial, geralmente é seguido de outro protocolo para aumentar a eficácia do tratamento; 2) a radioterapia que é utilizada para tumores localizados, seus efeitos colaterais se devem principalmente pela lesão dos tecidos normais adjacentes ao local onde foi aplicada a radiação; 3) a quimioterapia que é o tratamento ao nível sistêmico, consiste em uma associação de fármacos com diferentes mecanismos de ação, que agem em diferentes etapas do ciclo celular, inviabilizando a divisão das células tumorais, e sendo tóxico também para as células normais (HAAGEDOEN, 2000).

Os tratamentos convencionais com agentes antineoplásicos possuem níveis elevados de toxicidade, principalmente relacionados à falta de especificidade desses

Revisão Bibliográfica

agentes pelas células tumorais; portanto, é essencial o estudo de novos fármacos antineoplásicos com menor toxicidade ao paciente (BONASSA, 2005).

3.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES

As emulsões são definidas como um sistema heterogêneo, sendo consideradas misturas relativamente estáveis de água e componentes oleosos, na presença de um emulsificante, que atua reduzindo a tensão interfacial, prevenindo a coalescência das partículas (SILVA & SOARES, 1996). Portanto, são sistemas com duas fases imiscíveis, dispersas uma na outra com o auxílio do agente emulsificante. As emulsões são classificadas principalmente como água/óleo (A/O) ou óleo/água (O/A), dependente de qual é a fase dispersa e qual é a fase contínua. Também podem ser emulsões múltiplas, A/O/A ou O/A/O, sendo capazes de controlar a liberação de fármacos (LEONARDI, 2004; AULTON, 2005).

A emulsão é considerada um importante sistema para a administração de princípios ativos farmacêuticos por via tópica, proporcionando a penetração de substâncias hidrossolúveis e lipossolúveis através da pele. Este tipo de formulação, considerada simples, pode influenciar a biodisponibilidade de fármacos (ECCLESTON, 1997).

As emulsões mais aquosas, ou leves, que contenham pequenas quantidades de material graxo são mais aceitas pelos consumidores, uma vez que proporcionam melhor espalhabilidade e sensação menos pegajosa quando aplicadas.

3.3. ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004)

Para o desenvolvimento de emulsões, além do aspecto macroscópico da formulação, o delineamento das propriedades físicas e da estabilidade são fundamentais (MOSTEFA *et al.*, 2006). Os principais fatores de instabilidade das emulsões são, cremeação, floculação e coalescência. Alguns fatores podem desencadear os processos de instabilidade, como composição da formulação, tensoativo utilizado, tamanho dos glóbulos (observados na microscopia óptica), viscosidade e reologia, valor de pH, processo de fabricação e velocidade de agitação (BREUER, 1985).

Revisão Bibliográfica

Para esta avaliação a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, preconiza que o teste deve ser feito em 15 dias e avaliados as características organolépticas (aspecto, cor e odor) e características físicas (pH e viscosidade).

A vantagem deste ensaio é a simplicidade e o período curto para sua realização, além da facilidade, pois somente os parâmetros físicos são verificados. Basicamente, as amostras são submetidas às condições extremas com o objetivo de acelerar reações que possam ocorrer entre os constituintes da formulação, seja o ativo ou não (BRASIL, 2004).

3.4. ESTABILIDADE ACELERADA (BRASIL, 2005)

Após a comprovação de atividade farmacológica, outros testes são necessários para garantir a qualidade dos medicamentos, e assim verificar se o princípio ativo e a formulação em que ele foi incorporado mantêm-se estáveis e inalterados, reduzindo assim, riscos de danos aos produtos decorrentes do acondicionamento, armazenamento e transporte, possibilitando a previsão do comportamento da formulação e avaliando sua compatibilidade com o sistema, ou outras características que podem interferir na qualidade final.

O teste de estabilidade é auxiliar para demonstrar que o desempenho e integridade do medicamento são mantidos ao longo do tempo, dentro dos limites especificados, avaliando-se fatores ambientais em função do tempo. Para isso, são realizados testes físicos, químicos e microbiológicos com a finalidade de assegurar que o produto apresenta a qualidade necessária, durante seu prazo de validade. A estabilidade dos medicamentos e seu monitoramento é um método eficaz para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante o prazo de validade (ANSEL et al., 2007; SILVA, 2009).

Essa análise também é importante para obtenção de informações do período de utilização na embalagem e condição de armazenamento adequada para um determinado produto. Os testes projetados para obtenção de informações sobre a estabilidade são dependentes de fatores ambientais (temperatura, umidade e luz) e fatores relacionados ao próprio produto (propriedades físicas e químicas da(s) substância(s) ativa(s) e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica, processo de fabricação e tipo e propriedades dos materiais de embalagem) (BRASIL, 2005).

Revisão Bibliográfica

A estabilidade acelerada é realizada com o objetivo de acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas dos medicamentos submetidos às condições forçadas de temperatura, tendo como objetivo a orientação e definição dos dados de estabilidade para um novo medicamento, sendo que essa avaliação não indica o prazo de validade nem a cinética de degradação do princípio ativo presente no medicamento em análise (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

Os dados do estudo de estabilidade devem ser fornecidos em três lotes do medicamento e devem ser realizados na mesma embalagem proposta para o armazenamento e distribuição do produto (ICH, 2003).

Os testes realizados durante o estudo de estabilidade abrangem testes físico-químicos e microbiológicos (BRASIL, 2005). Na condição de armazenamento acelerado é recomendado um estudo de seis meses com o mínimo de três períodos de análise, por exemplo, 0, 3 e 6 meses, sendo que as formulações devem ser acondicionadas em embalagens impermeáveis durante o estudo da estabilidade acelerada, sendo submetidas à temperatura de $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. O estudo de fotoestabilidade deverá ser realizado somente nos casos em que a embalagem primária não oferecer proteção adequada contra a luz (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

O grau de variabilidade entre os lotes afeta a confiança de que um futuro lote de produção continuará dentro das especificações ao longo do tempo. Para análise dos dados quantitativos determina-se o limite de confiança de 95% (ICH, 2003). Segundo o ICH (2003), uma mudança significativa dos resultados de dosagem durante o teste de estabilidade seria uma variação maior que 5% em relação ao valor inicial. A Resolução nº 1 da ANVISA de 2005; permite uma diminuição do teor do princípio ativo de até 5% em relação ao inicial, nos testes de estabilidade acelerada, para fins de prazo de validade provisório de 24 meses. A aparência, cor, separação de fases, pH e outros atributos físicos da formulação devem ser avaliados e especificados limites de aceitação durante a avaliação de estabilidade (BRASIL, 2005).

Os testes microbiológicos de produtos não estéreis são feitos para garantir um número máximo de microorganismos viáveis (dependendo da via de administração do produto) e a ausência de patógenos (*Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas*) 24 horas após a fabricação e após seu armazenamento, no caso da estabilidade acelerada, após 6 meses.

3.5. REOLOGIA

A reologia pode ser definida como “resistência do fluido ao fluxo ou ao movimento”, utilizada para caracterização de sistemas, sendo ferramenta importante para a elaboração, desenvolvimento e avaliação de produtos farmacêuticos (AULTON, 2005; CHIEN, 2001).

A interpretação correta dos resultados obtidos na análise reológica permite relacionar a qualidade de um determinado produto, podendo prever, a habilidade em resistir às vibrações durante o transporte, a possibilidade de haver separação de fases ou instabilidades durante o período de estocagem, os possíveis problemas relacionados com o processo de fabricação e avaliação da provável aceitação pelo consumidor (SCHRAMM, 1998). Realizar as medidas reológicas considerando a temperatura é de fundamental importância, pois pequenas variações neste parâmetro podem resultar em resultados discrepantes (TADROS, 2004; BARRY, 1993).

O comportamento reológico de um material pode ser classificado como viscoso, elástico ou viscoelástico; dependendo das condições de tensão aplicada, taxa de cisalhamento ou tempo. A viscosidade é a resistência ao fluxo e a elasticidade é a capacidade de uma substância retornar instantaneamente ao seu estado inicial depois da deformação, após cessado a tensão de cisalhamento aplicada. O equipamento utilizado para medir as propriedades viscosas e elásticas de fluidos, sólidos e semi-sólidos é chamado de reômetro, enquanto outro equipamento comumente utilizado, o viscosímetro, é limitado apenas à medida de viscosidade (SCHRAMM, 1998).

Em reologia, os sistemas são denominados Newtonianos ou não Newtonianos, e ainda, os fluidos não Newtonianos podem apresentar características pseudoplásticas, dilatantes ou plásticas. A maioria das formulações semi-sólidas farmacêuticas e cosméticas apresentam característica de fluxo não Newtoniano e pseudoplástico. A figura 5 apresenta os tipos de comportamento de fluxo. O gráfico A mostra a curva de fluxo ascendente, ou seja, quando a taxa de cisalhamento é aumentada, podendo ser visualizada a relação entre a tensão de cisalhamento (τ) e taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), e o gráfico B, apresenta a relação entre a viscosidade (η) e a taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 1998; AULTON, 2005; ANSEL, 2007).

Revisão Bibliográfica

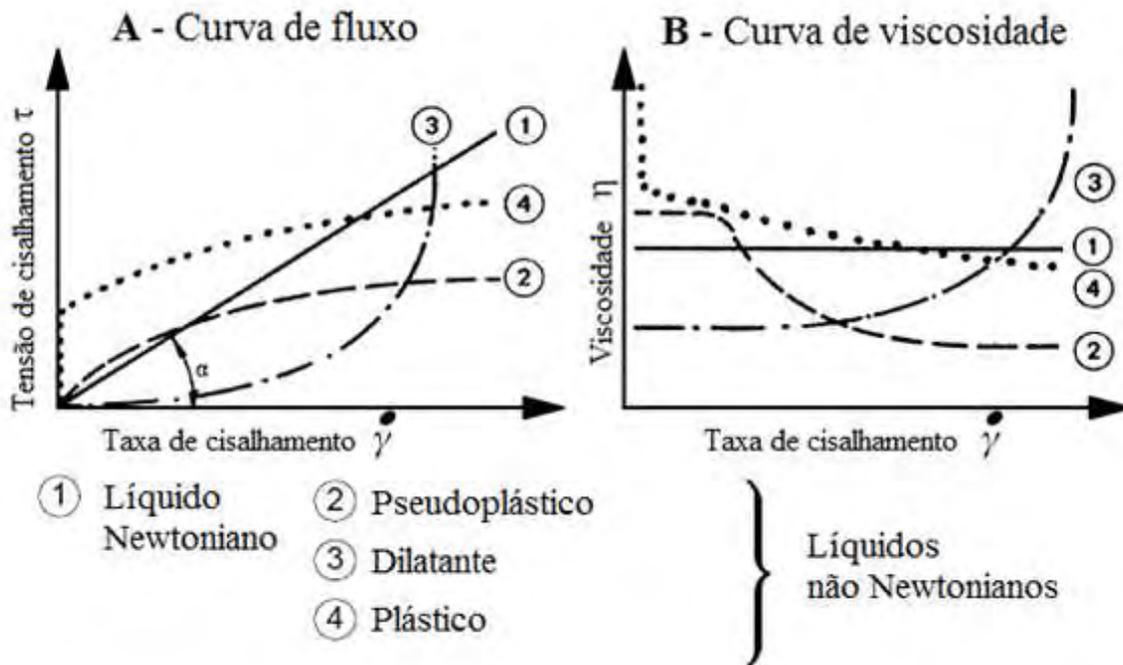


Figura 5 – Curvas representativas do comportamento de fluxo, classificando-os em Newtonianos ou não Newtonianos. Fonte: Schramm (1998).

Conforme pode ser observado na figura 5, os fluidos Newtonianos são caracterizados pela viscosidade constante, não sendo afetados por mudanças na taxa de cisalhamento. Os fluidos não Newtonianos pseudoplásticos são caracterizados pela diminuição da viscosidade quando é aumentada a taxa de cisalhamento, para os materiais tixotrópicos o efeito do cisalhamento é reversível quando o mesmo é interrompido. Os fluidos não Newtonianos dilatantes possuem a característica de aumentar a viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta e os fluidos não Newtonianos plásticos (também chamados de pseudoplásticos com limite de escoamento), tem um caráter sólido e com viscosidade extremamente alta, caracterizando-se pela deformação elástica na presença de forças extremas de tensão e podendo mudar de estado de maneira irreversível (SCHRAMM, 1998).

A tixotropia é outra característica que é descrita como sendo o potencial de uma estrutura ser reversível quando a taxa ou tensão de cisalhamento é cessada. Portanto, a estrutura se rompe (deforma-se) quando a tensão é aplicada sobre ela, mas quando a tensão é interrompida a estrutura original volta a ser quase a mesma, característica importante para formulações de uso tópico. Quando o produto é

Revisão Bibliográfica

aplicado na pele ele sofre uma deformação decorrente da aplicação, podendo ser comparado com a tensão e taxa de cisalhamento aplicados no teste de reologia. É interessante que após cessar a aplicação, o produto volte à sua forma original, para que não escorra. As amostras tixotrópicas tem estruturas relativamente fracas que podem ser destruídas temporariamente como resultado de um cisalhamento constante ou dinâmico (SCHRAMM, 1998).

A figura 6 demonstra a tixotropia de forma gráfica a partir da curva de fluxo, na qual se tem uma curva de fluxo ascendente e outra descendente, demonstrando o comportamento da tensão quando a taxa de cisalhamento é aumentada (curva I), e o comportamento da tensão quando a taxa é diminuída até cessar (curva II). Esta área entre a curva I e II é denominada área de histerese; quanto maior a área de histerese, mais tixotrópico será o sistema (SCHRAMM, 1998; ANSEL, 2000).

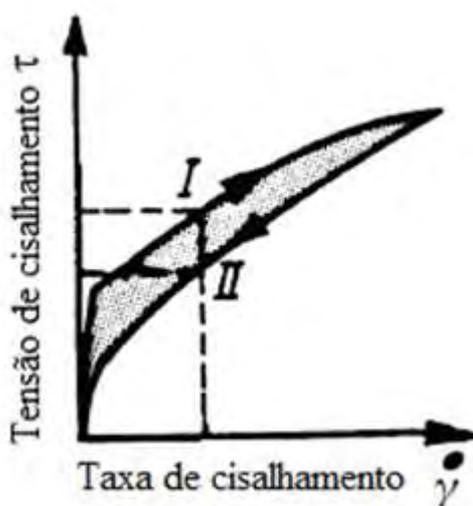


Figura 6 - Curva de fluxo, demonstrativo da tixotropia e área de histerese.
Fonte: Schramm (1998).

A avaliação da capacidade de um sistema em recuperar sua forma inicial é feita utilizando-se o teste de fluência e recuperação. É necessário entender que uma amostra pode levar pouco tempo para romper sua estrutura tixotrópica, e sua recuperação para o estado original pode demorar muito. Portanto durante este teste, espera-se que uma amostra viscoelástica tenha recuperação de 30 a 50% da viscosidade, em um período de tempo pré estabelecido (SCHRAMM, 1998).

Revisão Bibliográfica

Para evitar desvios nas análises feitas no reômetro, antes de iniciar os testes, é necessário avaliar a faixa de viscoelasticidade linear, que pode ser obtida por meio do teste de varredura de tensão, auxiliando na caracterização e classificação dos sistemas. A tensão utilizada não deve levar a uma deformação ilimitada da amostra (tensão em que a amostra começa a fluir). Este teste também é chamado de tensão crítica. É a definição da tensão máxima a que a amostra pode ser submetida sem afetar os resultados da análise, definindo qual a tensão máxima de cisalhamento que a amostra suporta, podendo ser preventivo para que não ocorram alterações irreversíveis na amostra durante o transporte ou a retirada do produto de sua embalagem (SCHRAMM, 1998).

O teste de varredura de tensão também é indicativo da estabilidade do produto. Sendo que o gráfico obtido demonstra os valores de G' (módulo de armazenamento, componente elástico), G'' (módulo de perda, componente viscoso) e η^* (viscosidade complexa). Quando o G' é maior que o G'' , significa que além da propriedade viscoelástica, a substância possui a capacidade elástica maior que a viscosa; indicando maior estabilidade do produto, pois após cessar a tensão de cisalhamento o produto tem maior capacidade de retornar a sua forma inicial em função da característica elástica.

A reologia das emulsões e demais formulações farmacêuticas de uso tópico estão cada vez mais freqüentes em pesquisas realizadas pela comunidade científica, sendo fundamental para o seu controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia (CORRÊA *et al.*, 2005). A caracterização reológica é efetiva na comparação das propriedades estruturais de emulsões e para obter informações sobre a resistência à forças externas, e ainda pode dar indícios sobre a estabilidade da formulação (THORGEIRSDÓTTIR *et al.*, 2006).

3.6. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Para quantificação do (-)-terpinen-4-ol nos ensaios de liberação e permeação cutânea, foi necessário o desenvolvimento e validação de método analítico. A metodologia empregada na quantificação do ativo foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada no método analítico proposto por Nielsen & Nielsen (2006).

Revisão Bibliográfica

A CLAE é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, pois apresenta vantagens em relação a outros métodos, como: ser sensível a diversas amostras; possuir alta resolução; apresentar detecção de alta sensibilidade; fazer análises rápidas, exatas e precisas; ser flexível em uma faixa específica na qual a substância é analisada; a fase estacionária pode ser utilizada várias vezes, ser versátil (sendo o único requisito a solubilidade da amostra na fase móvel), obter bons resultados quantitativos, deste modo, garantindo resultados confiáveis, exatos e reprodutíveis (ICH, 2005).

A validação deve garantir, em estudos experimentais, que o método atende às exigências, assegurando a confiabilidade dos resultados. Deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados. As metodologias analíticas que são descritas em farmacopéias ou formulários oficiais, reconhecidos pela ANVISA, são consideradas validadas. Caso contrário a metodologia será considerada validada desde que sejam avaliados os parâmetros descritos acima (BRASIL, 2003).

A validação de um método analítico é necessária para dar validade, credibilidade e confiança, sendo ferramenta importante para obter a qualidade exigida nos resultados, em condições estabelecidas do ensaio. Tem como principal objetivo, demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida (FDA, 2000; ICH, 2005; BRASIL, 2003).

Os parâmetros avaliados na validação de uma metodologia analítica são:

A) Especificidade e seletividade, que é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz;

B) Linearidade, que representa a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do princípio ativo na amostra, dentro de um intervalo especificado;

C) Precisão, sendo a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis:

C1) Repetibilidade (precisão intra-corrída), referente à concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação;

Revisão Bibliográfica

C2) Precisão intermediária (precisão inter-corridas), referente à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes;

C3) Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), referente à concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes;

D) Limite de detecção, sendo a menor quantidade do princípio ativo presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas;

E) Limite de quantificação, sendo a menor quantidade do princípio ativo em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas;

F) Exatidão, que representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro;

G) Robustez, que indica a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003).

Neste trabalho a validação fez-se necessária para garantir a utilização de um método confiável e capaz de quantificar o terpinen-4ol nos estudos de estabilidade acelerada, permeação e retenção cutânea *in vitro*.

3.7. LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *in vitro*

O teste de liberação é realizado com membrana sintética, a fim de verificar a quantidade de fármaco que é liberada da formulação em determinado período de tempo pré determinado, dependendo das condições de uso da formulação. Sob as mesmas condições do ensaio de liberação é realizado o teste de permeação e retenção cutânea, diferindo apenas na membrana, sendo utilizada, neste caso membrana natural (SCCP, 2006).

O estudo de permeação cutânea *in vitro* é um dos meios mais comumente utilizados para verificar a cinética de absorção transdérmica e pode ser útil na avaliação e quantificação do transporte de fármacos nos estudos farmacológicos e estudos de outros agentes químicos que podem estar associados com os efeitos adversos (CROSS, 2008).

A permeação cutânea *in vitro* é considerada como ferramenta na seleção de formulações, sendo empregada em estudos para verificação dos parâmetros que

Revisão Bibliográfica

influenciam na liberação do princípio ativo do veículo para a superfície cutânea e sua difusão nas camadas da pele, entretanto, sem interferência dos fatores biológicos.

Sob as condições *in vivo*, o sistema de microcirculação pode facilitar a reabsorção dos fármacos. Portanto, nos ensaios *in vitro*, o tecido dérmico pode manter a permeação de compostos que, *in vivo*, seriam reabsorvidos no compartimento sistêmico (SPPC, 2006).

A retenção cutânea é avaliada após o teste de permeação, sendo retirada a membrana natural, lavada e tratada para que o fármaco seja quantificado, podendo ser obtido valores referentes à retenção no estrato córneo e retenção na epiderme e derme viável.

Propriedades físicas e químicas têm uma influência decisiva sobre a penetração das moléculas através da pele. As mais importantes destas parecem ser: lipossolubilidade (geralmente máxima quando log P esta entre 1 e 2); peso molecular (moléculas com baixo PM passam mais facilmente); estrutura eletrônica e constante de dissociação (pKa), produtos altamente ionizados não penetram muito; a natureza da formulação e do fator de diluição da substância é decisivo (polar ou não-polar), uma vez que transportadores não polar aumentam a penetração; presença na estrutura molecular de determinados radicais especiais que favorecem ou inibem a penetração; e a água, que favorece a penetração distintamente. (SINKO, 2008).

O modelo *in vitro* pode ser útil como ferramenta de triagem ou para comparação qualitativa do potencial de permeação cutânea (SANCO, 2004).

O fluxo máximo (em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, calculado a partir da parte linear da absorção em função da curva de tempo) obtido em estudos *in vitro* pode ser utilizado para análise semi-quantitativa de comparação da absorção de produtos químicos entre espécies e entre diferentes veículos, desde que testados em idênticas condições de ensaio (SANCO, 2004).

O equipamento comumente utilizado é constituído por células de Franz. Basicamente, a célula de difusão é constituída de um compartimento superior (doador) e um compartimento inferior (receptor), separados pela membrana, como pode ser observado na figura 7, modelo de célula de Franz utilizada atualmente. O controle de temperatura do meio receptor é crucial em todo o experimento. A temperatura da superfície da pele na célula de difusão deve ser mantidas à $32 \pm 1^\circ \text{C}$, temperatura da pele "*in vivo*". O meio receptor presente nas células de difusão

Revisão Bibliográfica

deve ser bem agitado (pela hélice agitadora) durante todo experimento (SCCP, 2006; OECD/428, 2004).

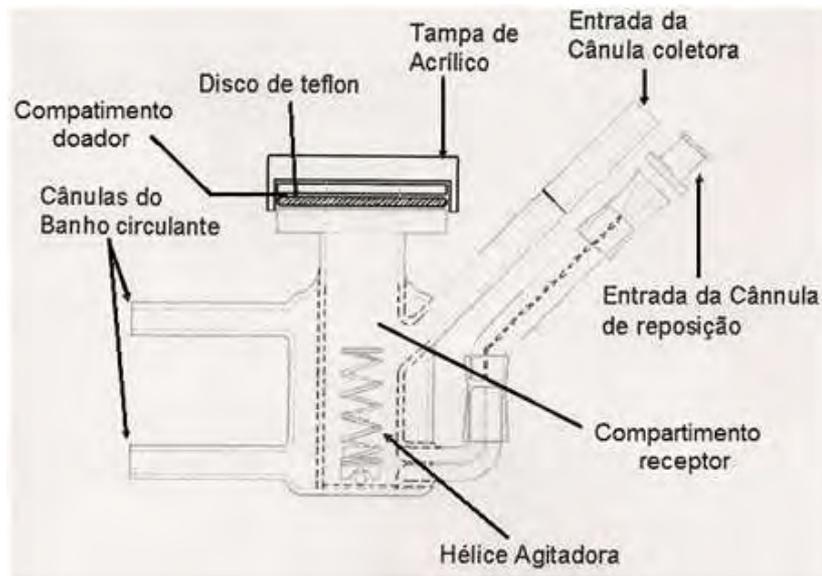


Figura 7 - Célula de Franz – demonstração do compartimento doador e receptor e disposição da membrana.

A figura 8 apresenta o esquema do equipamento Microette da Hanson.

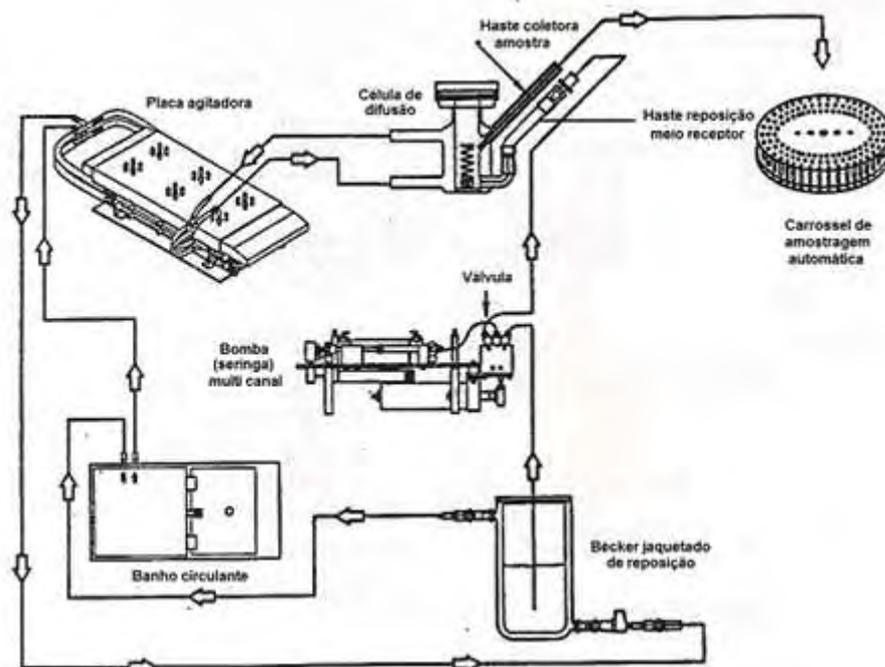


Figura 8 - Esquema representativo do equipamento Microette Plus Hanson. (SUPAC SS GUIDELINES, 2004).

Revisão Bibliográfica

A escolha da composição do fluido receptor é feita de forma que não se limite à extensão da difusão da substância, ou seja, a solubilidade e a estabilidade no fluido receptor das substâncias químicas durante o experimento devem estar garantidas. Os meios comumente empregados para compostos hidrofílicos são a solução salina ou solução salina tamponada. Para moléculas lipofílicas são adicionadas às soluções salinas a albumina ou tensoativos adequados em quantidades que não interfiram com a integridade da membrana. Além disso, é necessário verificar se o meio receptor irá interferir no processo analítico de quantificação. O fluido receptor deve ser degaseificado, a fim de evitar a formação de bolhas de ar durante o experimento. A quantidade de substância no líquido receptor não deve exceder 10% do seu nível de saturação, em qualquer momento do experimento, para minimizar a interferência do processo de difusão, podendo produzir uma subestimação da absorção cutânea (SCCP, 2006).

A pele humana é obviamente a melhor escolha como membrana natural para os ensaios de permeação e retenção cutânea, porém envolve questões éticas, além de mais difícil obtenção. Alternativamente, a pele de orelha de porco pode ser utilizada, pois compartilha as características de permeação essenciais com a pele humana. Amostras de pele devem ter espessura de 200-500 μm ou, se necessário, com justificativa, pode-se utilizar a espessura total (500-1000 μm) (OECD/428, 2004; SCCP, 2006).

A dose da formulação em teste, bem como seu tempo de contato (exposição) com a pele devem ser semelhantes às condições de uso (SCCP, 2006). Sendo assim, o período de exposição da formulação durante o teste *in vitro* deve ser coerente com a utilização prevista, estudos por períodos prolongados, acima de 24 horas, podem resultar na deterioração da membrana, requerendo assim um controle cuidadoso da integridade da membrana (OECD/428, 2004; SCCP, 2006).

O método analítico para quantificação da substância em análise deve ser apropriado e previamente validado, tendo sua sensibilidade e limites de detecção avaliados. A reprodutibilidade do método também deve ser verificada, analisando-se o coeficiente de variação dentre as amostras. A variabilidade dos estudos de absorção cutânea depende da taxa de permeação do ativo, sendo que quanto menor a taxa de permeação, maior a variabilidade. Essa variabilidade é devido às características conhecidas do estrato córneo e também pode ser parcialmente explicada pelas diferenças nas amostras de pele. Portanto, é necessário utilizar um

Revisão Bibliográfica

número suficiente de amostras e repetições (no mínimo $n=4$) e o coeficiente de variação deve ser inferior a 30%. Os resultados dos estudos de permeação e absorção cutânea devem ser reprodutíveis (OECD/428, 2004; SCCP, 2006).

A coleta de dados é realizada avaliando-se a quantidade da substância no meio receptor (quantidade permeada), quantidade verificada no estrato córneo (retirado pela técnica de “tape stripping”) e quantidade de fármaco presente na epiderme e derme (200 - 500 μm), sem o estrato córneo (absorção ou retenção cutânea), considerando-se um excesso de produto sobre a pele (dose infinita). A absorção e permeação cutânea devem ser expressas como um valor absoluto em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele e como porcentagem da quantidade de substância contida na dose aplicada destinados por centímetro quadrado da superfície da pele (OECD/428, 2004).

As quantidades de substância permeada encontrada no fluido receptor são consideradas sistemicamente disponíveis, sendo que todas as medidas, tratamento estatístico e curvas de cinética devem ser fornecidos (SCCP, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Padrões e matérias-primas

Gentamicina (Nutricel[®])

Doxorrubicina (Eurofarma[®])

(+)-terpinen-4-ol (Fluka[®]) (pureza 98,7%)

(-)-terpinen-4-ol (Fluka[®]) (pureza 98,8%)

Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Galena)

Butilhidroxitolueno (BHT) (Pharma Special)

Palmitato de isopropila (Pharma Special)

Álcool cetoestearílico (All Chemistry)

Álcool cetoestearílico etoxilado (All Chemistry)

Metilparabeno (Volp)

Propilparabeno (Deg)

Polímero carboxivinílico (Carbopol[®]) (Pharma Chemical)

Propilenoglicol (Vetec)

EDTA dissódico (Volp)

Trietanolamina (Carlo Erba)

Estearato de octila (Deg)

Vaselina sólida (Tec Lab)

Álcool cetoestearílico (e) álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE (Cosmowax J[®])
(Croda)

Monoestearato de glicerila (Pharma Special)

Metildibromoglutaronitrila e fenoxietanol (Cosmoguard[®]) (Galena)

Monoleato de sorbitano etoxilado 20 OE (Tween 80[®]) (Volp)

4.1.2. Solventes e Reagentes

Soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®])

Dimetilsulfóxido (Merck)

Ácido tricloroacético (J T Baker)

Sulforrodamina B (SBR)

Materiais e Métodos

Ácido acético (Quemis)

Trizma base (Sigma[®])

Acetonitrila (J T Baker)

Metanol (J T Baker)

Hidróxido de sódio (Cinética)

Ácido clorídrico (Fmaia)

Peróxido de hidrogênio (Merck)

Fosfato de potássio monobásico (Merck)

Cloreto de sódio (Merck)

Ágar tioglicolato (Merck)

Ágar sabouraud (Acumedia)

Caldo lactosado (Acumedia)

Caldo tetracionato (Acumedia)

Caldo selenito-cistina (Merck)

Ágar verde brilhante (Acumedia)

Ágar xilose-lisina desoxicolato (Acumedia)

Ágar bismuto sulfito (Acumedia)

Ágar triplice açúcar-ferro (TSI) (Acumedia)

Ágar Mc Conkey (Merck)

Ágar eosina-azul de metileno (Acumedia)

Caldo soja caseína (Acumedia)

Ágar Vogel Johnson (VJ) (Acumedia)

Ágar cetrimida (Merck)

RPMI 1640 (Gibco[®])

4.1.3. Equipamentos e softwares

Software Origin, versão 8.0

Software Rheowin 3.5

Peagômetro Micronal

Termômetro Incoterm

Microscópio óptico Zeiss

Reometro de oscilação HAAKE, modelo RHEOSTRESS RS-1

Sensor tipo cone-placa (C35/2°Ti)

Materiais e Métodos

Coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm

Microette HANSON 0700-1251

Dermatômetro TCM 3000 NOUVAG

Vórtex MVS-1 Biomixer

Ultra Turrax[®] T25 IKA Labortechnik

HPLC Agilent, detector Uv-Vis

Ultrassom Unique

Geladeira Consul

Estufa Fabbe

Centrífuga Jorvall[®] TC Dupont

4.2. MÉTODOS

4.2.1. AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA

O teste antiproliferativo *in vitro* foi realizado em colaboração com o CPQBA – UNICAMP, baseado no teste feito pelo NCI (Nacional Cancer Institute). Sua finalidade foi a triagem de substâncias que possam ter ação farmacológica antiproliferativa nas linhagens de células avaliadas, possibilitando a pesquisa de novas alternativas de fármacos eficazes para o tratamento de neoplasias malignas.

As dez linhagens de células utilizadas neste ensaio foram cedidas gentilmente ao CPQBA da Unicamp pelo NCI e são mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm³ (Nunc[®]), com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®]) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

As linhagens são: Células tumorais: U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon), K562 (leucemia) (figura 9); Célula normal: VERO (célula epitelial de rim de macaco verde).

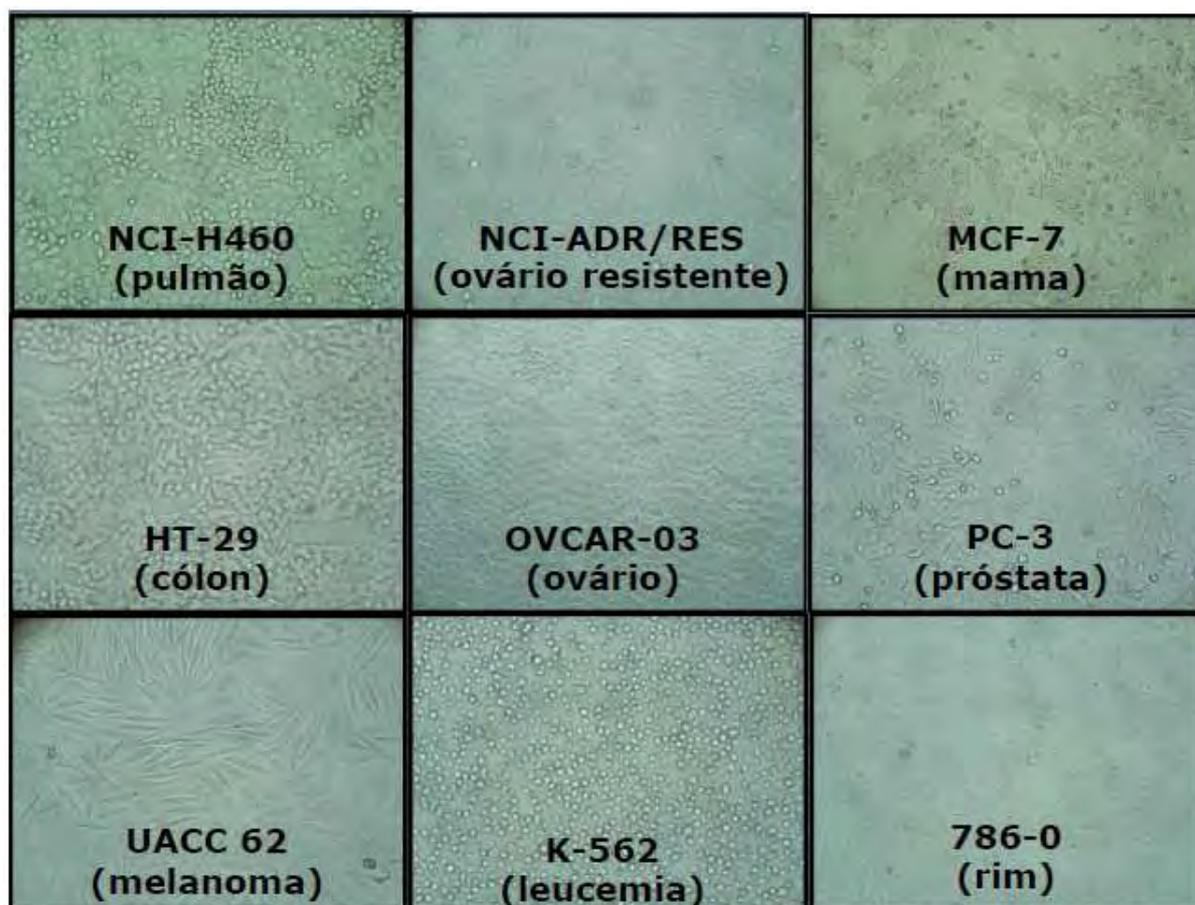


Figura 9 - Linhagens de células tumorais humanas utilizadas no ensaio antiproliferativo.

A avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais humanas utilizou o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular. Todos procedimentos foram realizados sob condições estéreis em fluxo laminar.

Foram inoculados 100µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc®), em suspensão com densidade de inoculação entre 3×10^4 e $6,5 \times 10^4$ cel/mL dependente do tamanho das células, em meio RPMI/SFB acrescido de 50µg/mL de gentamicina. As amostras foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, após 24 horas foram adicionados 100µL/compartimento da amostra a em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL). A disposição das amostras na placa está demonstrada na figura 10.

O preparo das amostras, foi realizado transferindo-se uma alíquota dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe

Materiais e Métodos

foram dispersos em 950 μ L de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 μ g/mL todas em triplicata, como pode-se observar no esquema apresentado na figura 10.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

○	Branco do meio de cultura (sem células)
○	Branco da suspensão celular
○	Branco das amostras teste
○	Suspensão celular na presença da amostra 1 em quatro concentrações distintas
○	Suspensão celular na presença da amostra 2 em quatro concentrações distintas
○	Suspensão celular na presença da amostra 3 em quatro concentrações distintas
○	Suspensão celular na presença da amostra 4 em quatro concentrações distintas
○	Suspensão celular na presença da amostra 4 em quatro concentrações distintas

Figura 10 - Esquema da aplicação das amostras, em quatro concentrações distintas, na placa teste (T1).

A doxorubicina foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações das amostras. Fez-se a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle, chamada de T₀, que determinou qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Após 48 h de incubação, as células foram fixadas com 50 μ L/compartimento de TCA a 50% e as placas incubadas por 1h a 4°C; em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio RPMI/SFB e metabólitos secundários. Depois, as placas foram

Materiais e Métodos

coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 60 min a 4°C; em seguida, lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1%. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®), 10µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância, calculou-se a porcentagem de crescimento celular para cada uma das concentrações testadas, levando-se em conta que:

Se $T > C$: estímulo de crescimento celular

Se $T \geq T_0 < C$: atividade citostática: $\%Crescimento = 100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$

Se $T < T_0$: atividade citocida: $\%Crescimento = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Nas quais:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância branco da amostra

C = absorbância do branco de células

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

A partir da porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada, foram gerados gráficos, para cada uma das linhagens testadas. Três concentrações efetivas denominadas GI_{50} (do inglês *growth inhibition*, concentração necessária para interromper em 50% o crescimento celular), foram calculadas por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 8.0.

4.2.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES

As formulações foram desenvolvidas após a avaliação da atividade antiproliferativa do óleo de *M. aternifolia*, (+) e (-)- terpinen-4-ol, sendo que nesses estudos foram obtidos melhores resultados com o (-)-terpinen-4-ol nas linhagens de melanoma avaliada (UACC-62). Portanto, diferentes emulsões contendo este princípio ativo foram desenvolvidas e avaliadas quanto a sua qualidade, para obtenção de uma terapia alternativa e auxiliar no tratamento tópico do melanoma.

As tabelas 1 e 2 apresentam a composição das formulações testadas.

Materiais e Métodos

Tabela 1 - Composição da formulação 1 (F1).

Terpinen-4-ol	1,00 g
Butilhidroxitolueno (BHT)	0,05 g
Palmitato de isopropila	2,00 g
Álcool cetosteárico	1,00 g
Álcool cetosteárico etoxilado 20 EO	1,00 g
Metilparabeno	0,18 g
Propilparabeno	0,02 g
Polímero carboxivinílico dispersão 2%	15,0 g
Propilenoglicol	3,00 g
EDTA dissódico	0,05 g
Água destilada qsp	100,0 g
Trietanolamina qs	pH 6,00

O preparo da formulação 1(F1) foi realizado aquecendo-se os componentes da fase oleosa e os componentes da fase aquosa (tabela 1), até 70°C. Verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa sob agitação, até resfriamento 40°C para incorporação do terpinen-4-ol, mantendo-se agitação constante até o resfriamento total. Com o auxílio de peagômetro adicionou-se a trietanolamina até obtenção de pH aproximadamente 6,0.

Tabela 2 - Composição da formulação 2 (F2).

Terpinen-4-ol	1,00 g
BHT	0,05 g
Estearato de octila	1,50 g
Vaselina sólida	0,30 g
Álcool cetosteárico (e) álcool ceto. etoxilado 20 OE*	12,0 g
Monoestearato de glicerila	1,00 g
Metildibromoglutaronitrila e fenoxietanol	0,20 g
Propilenoglicol	5,00 g
EDTA dissódico	0,02 g
Água destilada qsp	100,0 g

* Cosmowax[®]

Materiais e Métodos

A formulação 2 (F2) foi preparada aquecendo-se os componentes da fase oleosa (tabela 2) até 70°C e vertendo-se sobre esta os componentes da fase aquosa, também aquecidos simultaneamente e paralelamente à 70°C, sob agitação manual constante até atingir a temperatura ambiente. Na temperatura de 40°C o terpinen-4-ol foi adicionado à formulação, sob agitação constante. As emulsões foram acondicionadas em tubos de alumínio com capacidade de 10 g.

4.2.3. ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004)

4.2.3.1. Centrifugação

A estabilidade preliminar foi realizada conforme está descrita no Guia de Cosméticos da ANVISA, portanto não é obrigatória sua execução em medicamentos, mas por ser uma ferramenta importante, foi utilizada neste trabalho, com o intuito de auxiliar e orientar a escolha das formulações que foram utilizadas na estabilidade acelerada e demais testes.

Inicialmente as amostras foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm, por 30 minutos, e avaliadas visualmente verificando seu aspecto, cor, odor, precipitações e separação de fases. As formulações submetidas ao teste de centrifugação, que não apresentaram sinais evidentes de instabilidade foram submetidas aos testes de estabilidade preliminar. As formulações foram expostas à estufa (45 ±1°C), geladeira (5 ±1°C), temperatura ambiente (TA) (25°C ± 1 °C) e ao ciclo, onde a formulação alternou entre temperatura de -5 ±1°C por 24 horas e 45 ±1°C por 24 horas, sendo analisadas por 15 dias consecutivos. Foram realizados os testes de pH, aspecto macroscópico, cor e odor todos os dias. As análises microscópicas e os testes de viscosidade foram realizados no primeiro e décimo quinto dia. Todos os testes foram realizados em triplicata. A análise do primeiro dia é chamada de análise inicial (AI), sendo considerado um tempo de 24 horas após a manipulação. As amostras aprovadas foram submetidas ao teste de permeação cutânea e estabilidade acelerada.

Materiais e Métodos

4.2.3.2. Características organolépticas

O aspecto macroscópico foi avaliado visualmente, em relação a cor, aspecto, odor e separação de fase.

4.2.3.3. Microscopia Óptica

A análise do aspecto microscópico permite visualizar alterações na estruturação da emulsão durante a estabilidade preliminar. Sendo realizada com o auxílio de um microscópio óptico, sendo acrescentada com o auxílio de uma espátula uma quantidade de amostra suficiente para o preparo da lâmina. Colocou-se a lamínula e observou-se em microscópio óptico. A fotomicrografia foi feita no primeiro e último dia do ensaio.

4.2.3.4. pH

A determinação do pH foi realizada em peagômetro Micronal, devidamente calibrado, empregado-se o método descrito no Manual of Cosmetic Analysis no qual adiciona-se 9,0 mL de água destilada e 1,0 g de amostra (NEWBURGER, 1997).

4.2.3.5. Viscosidade aparente

A viscosidade foi determinada utilizando o equipamento reômetro de oscilação HAAKE modelo RHEOSTRESS RS-1 utilizando o sensor do tipo cone-placa (C35/2Ti) e os dados analisados pelo software Rheowin 3.5. A viscosidade aparente foi obtida a partir da curva de fluxo, sendo observada quando a taxa de cisalhamento máxima era alcançada. Os dados foram obtidos a partir de uma taxa de cisalhamento de 0 – 100 Pa, por um período de 120 segundos para curva ascendente e 120 segundos para a curva descendente, à temperatura de 25°C.

Materiais e Métodos

4.2.4. ESTABILIDADE ACELERADA (BRASIL, 2005)

A estabilidade acelerada foi realizada mantendo as amostras em estufa de 40°C \pm 2°C, por um período de 6 meses. As análises foram realizadas no tempo inicial (tempo zero), 30 dias, 60 dias, 90 dias e 180 dias, com relação ao teor, aspecto, cor, odor, pH, viscosidade e teste microbiológico para produtos não estéreis (ICH, 2003).

Os testes de aspecto, pH e viscosidade estão descritos no item 4.2.3.

A quantificação de terpinen-4-ol foi realizada em CLAE conforme método validado e descrito no item 4.2.6.

4.2.4.1. Testes Microbiológicos

Os testes microbiológicos foram realizados no tempo zero e 180 dias.

4.2.4.1.1. Contagem de microorganismos totais

Fez-se uma solução com 10,0 g de formulação para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, agitando-se em vórtex por 10 min. Pipetou-se em placa de Petri, previamente esterilizada, 1,0 mL de cada amostra e adicionado 20,0 mL ágar tioglicolato para análise de bactérias e ágar Sabouraud para análise de leveduras. Após solidificação dos meios de cultura as placas foram levadas à estufa a 35°C \pm 1°C por 48 horas para contagem de bactérias e 25°C \pm 1°C por 7 dias para fungos. A contagem do número de colônias foi realizada com o auxílio de contador, calculando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) (USP, 2010; PINTO *et al.*, 2003).

As análises foram realizadas em triplicata, os meios preparados conforme indicação do fabricante e as placas incubadas na posição invertida (PINTO *et al.*, 2003).

4.2.4.1.2. *Salmonella e Escherichia coli*

Tranferiu-se 10,0 g de formulação para 90,0 mL de caldo lactosado e incubou-se a 35°C \pm 1°C por 24 horas.

Materiais e Métodos

Para pesquisa de *Salmonella* spp, transferiu-se 1 mL do caldo lactosado para um tubo contendo caldo tetrionato e outro tubo contendo caldo selenito cistina. Estes foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. As amostras dos tubos anteriores foram semeadas para um tubo contendo ágar verde brilhante, duas placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato e ágar bismuto sulfito, incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, em posição invertida. As colônias suspeitas foram semeadas com alça reta em tubo contendo agar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A confirmação de *Salmonella*, se presente, foi realizada pela técnica de Gram.

Para *E. coli*, transferiu-se 1,0 mL de caldo lactosado para placa contendo ágar Mac Conkey e incubou-se a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. As colônias suspeitas foram semeadas em agar eosina-azul de metileno, sendo incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A confirmação de *E. coli*, quando presente, foi realizada pela técnica de Gram.

As análises foram realizadas em triplicata, os meios preparados conforme indicação do fabricante e as placas incubadas na posição invertida (PINTO *et al.*, 2003).

4.2.4.1.3. *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Transferiu-se 10,0 g de formulação para 90,0 mL de caldo soja-caseína, o que foi incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Semeou-se 1,0 mL em placa de Petri contendo ágar Vogel Johnson para *S. aureus* e em placa contendo ágar cetrimida para *P. aeruginosa*. Foi incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A confirmação foi feita pela técnica de Gram, as análises foram realizadas em triplicata, os meios preparados conforme indicação do fabricante e as placas incubadas na posição invertida (PINTO *et al.*, 2003).

4.2.5. REOLOGIA

O comportamento reológico foi avaliado em reômetro de oscilação HAAKE modelo RHEOSTRESS RS-1 utilizando o sensor do tipo cone-placa (C35/2°Ti). Os dados foram analisados pelo software Rheowin 3.5. O comportamento reológico foi avaliado determinando-se: propriedades de fluxo (*flow curves*) das amostras, com

Materiais e Métodos

taxa de cisalhamento de 0 - 100 (1/s) por um período de 120 segundos para curva ascendente e taxa de cisalhamento de 100 – 0 (1/s) por 120 segundos para a curva descendente, obtendo dados a cada segundo, na temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Para determinar a faixa de tensão foi feita a varredura de tensão, usando frequência de 1Hz, previamente estabelecida, e tensão de cisalhamento de 0 - 100 Pa.

4.2.6. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA

Para a quantificação de terpinen-4-ol nos testes de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, e estabilidade acelerada foi necessário adequar uma metodologia eficiente utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia utilizada baseia-se no método realizado por Nielsen & Nielsen (2006) com pequenas modificações (vazão e coluna). O equipamento empregado foi um HPLC AGILENT, com detector UV-Vis. A fase móvel foi composta por acetonitrila e água (55:45), coluna C18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 μm , Agilent Zorbax Eclipse), vazão 1,0 mL/min, injeção de 30 μL , detecção à 200 nm, solução de padrão e amostra 50 $\mu\text{g/mL}$ diluídas na fase móvel. Após o preparo, as amostras foram submetidas a banho de ultrassom, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Para a validação da metodologia foram avaliados os parâmetros especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

4.2.6.1. Especificidade/seletividade

A avaliação da especificidade foi realizada com três alíquotas de padrão do (-)-terpinen-4-ol na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e três alíquotas de placebo da formulação 1 e 2, preparados com 2,5 g de placebo para 100 mL de acetonitrila, e posterior diluição desta solução, na proporção de 1:5 de fase móvel. As alíquotas foram injetadas no cromatógrafo nas condições citadas no item 4.2.6. e verificou-se a possível interferência do pico do placebo no pico do padrão.

Quando as impurezas e produtos de degradação não estão disponíveis, a seletividade pode ser avaliada submetendo-se o analito a condições de estresse, que forçam a obtenção de produtos de degradação, sendo possível verificar a interferência destes produtos na análise. Porém, o método por CLAE não é capaz de

Materiais e Métodos

identificar os compostos gerados. Esta análise foi realizada submetendo-se o padrão de terpinen-4-ol na concentração de 50 µg/mL em água, solução de hidróxido de sódio 0,1 N, solução de ácido clorídrico 0,1 N, solução de peróxido de hidrogênio 3 % e luz ultravioleta (254 nm), por um período de uma hora. E desta forma, foi possível verificar a presença de picos de degradação que possam interferir na análise.

4.2.6.2. Linearidade

Para avaliação da linearidade foram preparados oito padrões do (-)-terpinen-4-ol em diferentes concentrações, em triplicata: Padrão 1: 5 µg/mL; Padrão 2: 10 µg/mL; Padrão 3: 20 µg/mL; Padrão 4: 30 µg/mL; Padrão 5: 40 µg/mL; Padrão 6: 50 µg/mL; Padrão 7: 100 µg/mL; Padrão 8: 150 µg/mL. Verificando-se a relação linear e os resultados foram tratados pelo coeficiente de variação em relação ao fator de resposta de cada concentração.

4.2.6.3. Precisão

A avaliação de precisão intra-corrída (repetibilidade), foi realizada utilizando-se os Padrões 1, 6 e 8 em triplicata, em dias diferentes, feitas pelo mesmo analista. A precisão inter-corrída (intermediária) foi realizada com diferentes analistas, em dias diferentes. Analisou-se desta forma a concordância dos resultados através do coeficiente de variação.

4.2.6.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi obtido de 3 curvas analíticas do padrão de terpinen-4-ol, contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação, calculando-se os desvios padrão dos coeficientes angulares das retas e os coeficientes lineares das mesmas.

Materiais e Métodos

4.2.6.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada com três concentrações do padrão de tepinen-4-ol (5 µg/mL, 50µg/mL e 150 µg/mL), com a adição de placebo da formulação 1 e 2, em triplicata. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente.

4.2.6.6. Robustez

A robustez foi avaliada utilizando-se o método de Yonden e Steiner (1975), que é um método confiável, simples e viável, que analisa a robustez por intermédio de um delineamento que envolve sete parâmetros combinados em oito análises, e assim, é possível determinar a influência de cada parâmetro no método desenvolvido (CÉSAR, 2009). As variáveis analisadas foram: coluna cromatográfica, comprimento de onda, vazão da fase móvel, proporção da fase móvel, volume de injeção, temperatura do forno e tempo de extração da amostra.

O parâmetro que apresentar maior variação nas medições deverá ser controlado e monitorado durante as análises de rotina (BRASIL, 2003).

Injetou-se em CLAE o padrão 50 µg/mL e três amostras na mesma concentração, alterando-se as variáveis demonstradas na tabela 3.

Materiais e Métodos

Tabela 3 – Variáveis utilizadas para o teste de Robustez (esquerda) e definição dos testes 1 a 8 alternando estas variáveis (direita).

VARIÁVEIS									
*Coluna cromatográfica	A: XDB C18	1	2	3	4	5	6	7	8
	a: ODS C18								
Comprimento de onda	B: 200 nm	A	A	A	A	a	a	a	a
	b: 205 nm	B	B	b	b	B	B	b	b
Vazão da fase móvel	C: 1,0 mL/minuto	C	c	C	c	C	c	C	c
	c: 1,3 mL/minuto	D	D	d	d	d	d	D	D
Proporção da fase móvel	D: 55:45 (ACN:H2O)	E	e	E	e	e	E	e	E
	d: 60:40 (ACN:H2O)	F	f	f	F	F	f	f	F
Volume de injeção	E: 30 µL	G	g	g	G	g	G	G	g
	e: 20 µL								
Temperatura do forno	F: 25° C								
	f: 30° C								
Tempo de extração	G: 15 min ultrassom								
	g: 30 min ultrassom								

*As colunas utilizadas eram da marca Agilent, ambas C18, 250 mm x 4,6 mm de comprimento e tamanho da partícula de 5µm.

As variáveis apresentadas por letra maiúscula são as condições normais de análise, ou seja, as condições que foram utilizadas no teste. As variáveis minúsculas são os valores alternativos que foram modificados para a avaliação da robustez do método analítico empregado.

4.2.7. LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *in vitro*

Neste trabalho, após a avaliação da concentração mais eficaz do princípio ativo, que foi realizada no ensaio antiproliferativo, fez-se a incorporação de (-)-terpinen-4-ol em emulsões para realizar o teste de liberação, permeação e retenção cutânea, de modo a avaliar qual a dose que ficaria retida na pele e a forma de liberação da formulação, garantindo assim que o fármaco fique retido na concentração e local desejados.

Materiais e Métodos

O estudo *in vitro* de liberação, permeabilidade e retenção cutânea foi realizado no equipamento Microette HANSON 0700-1251.

4.2.7.1. Liberação *in vitro*

O meio receptor foi determinado após avaliação da solubilidade de 30 mg de fármaco em 10mL da solução receptora, garantindo a condição *sink* da fase receptora. Foram avaliadas a solução tampão fosfato de potássio monobásico 0,01M pH 7,4 e solução de cloreto de sódio 0,9%, ambas contendo 1% de Tween 80. Estas soluções foram diluídas para obtenção da concentração de 20 µg/ mL para leitura em CLAE, utilizando-se método validado anteriormente.

A liberação do fármaco foi avaliada utilizando-se membrana sintética de acetato de celulose 0,45 µm, com fase receptora composta por NaCl 0,9% em água Mili-Q e adição de 1% de Tween 80. A formulação foi colocada até completar o anel dosador do equipamento (aproximadamente 270 mg de formulação e área de exposição de 1,77cm²). Os experimentos foram conduzidos a 32,5°C e a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm, por meio de um agitador magnético. Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 12 horas, filtradas em membrana 0,45 µm e injetadas em CLAE para quantificação. Um volume de 0,8 mL foi desprezado antes do início de cada coleta. As alíquotas da coleta e volume desprezados foram repostos automaticamente e utilizadas nos cálculos da quantidade real permeada. Os resultados foram colocados em gráficos para a definição do modelo de cinética adequado para cada formulação.

A equação 1, demonstrada abaixo, foi utilizada para calcular a quantidade real liberada/permeada (Q real) em determinado tempo:

$$Q_{\text{real, t}} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad (\text{equação 1})$$

Na qual:

Q real, t = quantidade real permeada referente ao tempo t ;

C t = concentração obtida referente ao tempo t;

Vr = volume da solução receptora (7 mL)

Cc = concentração da amostragem anterior

Vc = volume amostrado (coletado + limpeza)

Materiais e Métodos

4.2.7.2. Permeação cutânea *in vitro*

A membrana utilizada no teste de permeação e retenção cutânea foi retirada da pele da orelha de porco, não escaldada, adquirida do Frigorífico Olhos d'água logo após o abate rotineiro de animais para o consumo, por isso não havendo necessidade de aprovação pelo comitê de ética. O transporte foi feito em caixa de isopor com gelo. A orelha foi lavada em água destilada e dissecada com o auxílio de pinça e bisturi. Em seguida foi lavada e dermatomizada a 500 μm , obtendo-se o estrato córneo, epiderme e parte da derme.

A pele foi colocada na célula de difusão (volume de 7 mL), com o lado da derme voltado para baixo, ficando em contato com o meio receptor. Na região do estrato córneo foi adicionada a formulação a ser avaliada até completar o anel dosador do equipamento. As condições de agitação, temperatura e tempo de coletas foram mantidas como descritas no ensaio de liberação.

4.2.7.3. Retenção cutânea *in vitro*

Para análise de retenção cutânea a pele ficou exposta por 8 e 12 horas, nas condições do teste de permeação cutânea *in vitro*. Depois foram retiradas e o excesso da formulação foi removido com auxílio de papel absorvente, sendo mantidas em vidro de relógio durante o *tape stripping*, para não haver perda do princípio ativo. O estrato córneo foi retirado com a técnica de *tape stripping*, utilizando-se 16 fitas adesivas, descartando-se a primeira fita. As fitas foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL de acetonitrila, agitado em vórtex por um minuto e posteriormente submetido ao banho de ultrassom por 15 minutos. A solução foi filtrada em membrana 0,45 μm e injetada em CLAE para quantificação. Após a retirada do estrato córneo verificou-se a retenção da derme e epiderme, picotando-se o restante da membrana com o auxílio de uma tesoura. Os fragmentos foram colocados em tubo para centrífuga. Adicionou-se 5 mL de acetonitrila, levando ao homogeneizador tipo Turrax[®] por um minuto, em seguida ao banho de ultrassom por 15 minutos e centrifuga por 5 minutos. A solução foi filtrada em papel filtro e depois em membrana de 0,45 μm e injetada em CLAE. Foi utilizada a acetonitrila na retenção do estrato córneo e epiderme viável mais derme, pois o metanol e etanol interferiram na quantificação por CLAE.

Materiais e Métodos

4.2.7.4. Validação da permeação e retenção cutânea *in vitro*

Para a validação da metodologia utilizada na avaliação da permeação e retenção cutânea, foi necessário preparar amostras sem o princípio ativo. Sendo pele da orelha de porco dissecada e dermatomizada, não submetida ao ensaio.

Primeiramente, injetou-se a fase receptora selecionada e o solvente extrator para verificar a influência no pico do terpinen-4-ol. Como solventes extratores foram testados o metanol, etanol e acetonitrila.

Para avaliação da interferência do estrato córneo, fez-se o procedimento descrito no item 4.2.7.3 utilizando-se a técnica de *tape stripping*, a solução foi filtrada em membrana 0,45 μm e injetada em CLAE para avaliação da interferência no pico do fármaco em questão.

Após a retirada do estrato córneo a epiderme e derme foram picotadas seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.2.7.3, e após filtração foram injetados em CLAE para verificar a interferência no pico do terpinen-4-ol.

Além do teste de interferentes foi realizado o estudo de linearidade do fármaco no meio receptor e recuperação.

A linearidade foi avaliada nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$.

A recuperação foi realizada utilizando-se o padrão e novamente a pele de orelha de porco dissecada e dermatomizada não submetida ao teste de permeação e retenção cutânea. Para avaliar a recuperação do estrato córneo, retirou-se o estrato córneo utilizando a técnica de *tape stripping*, colocou-se as fitas em tubo de ensaio contendo 5 mL de acetonitrila e adicionou-se as fitas quantidade conhecida de padrão do terpinen-4-ol em três concentrações distintas (25, 50 e 100 $\mu\text{g/cm}^2$), após agitação em vórtex por um minuto as amostras foram submetidas ao banho de ultrassom por 15 minutos, a solução foi filtrada em membrana 0,45 μm e injetada em CLAE para quantificação.

Para verificar a recuperação na epiderme mais derme, utilizou-se a pele sem o estrato córneo e adicionou-se uma quantidade conhecida do fármaco em três concentrações distintas (25, 50 e 100 $\mu\text{g/cm}^2$) na pele e após 15 minutos de contato fez-se a extração como descrita no item 4.2.7.3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA

No modelo utilizado, a porcentagem de crescimento é realizada fazendo-se a leitura espectrofotométrica da absorbância de proteínas celulares coradas com sulforrodamina B (SRB), corante aniônico de coloração rosa brilhante. Esse corante liga-se às terminações básicas de aminoácidos protéicos de células vivas fixadas com ácido tricloroacético (TCA), sendo um ensaio independente do metabolismo celular que permite a quantificação de proteínas de modo linear com o número de células da cultura. O ensaio de SRB é consideravelmente rápido, simples e apresenta sensibilidade comparável àquelas das metodologias fluorescentes, sendo considerada superior aos ensaios que utilizam corantes visíveis mesmo em baixas concentrações celulares (1000 a 2500 células por compartimento) (MONKS *et al.*, 1991).

Este ensaio permite avaliar a atividade antitumoral através da exposição de células tumorais humanas, em fase exponencial de crescimento, em diferentes concentrações da amostra e verificar se essa exposição induziu interrupção na taxa de crescimento sem morte celular (atividade citostática) ou se provocou a morte celular (atividade citocida). Para mensurar a atividade foi calculada a concentração efetiva denominada GI50 (do inglês *Growth Inhibition 50*, concentração necessária para que ocorra 50% de crescimento) (SHOEMAKER, 2006).

A doxorubicina, potente quimioterápico, foi empregada como controle positivo. Além de padrão de comparação, seu objetivo principal foi verificar se todas as linhagens empregadas mantinham o perfil de resposta ao quimioterápico, porque com as sucessivas passagens para a manutenção da cultura de células, existe a possibilidade de mutação da linhagem em cultivo, e essa mutação poderia ser detectada pela mudança de resposta frente à doxorubicina. Além disso, a fim de se minimizar a ocorrência de mutações, as linhagens só são perpetuadas por no máximo 20 passagens, quando então são substituídas por novas células da mesma linhagem, que são mantidas congeladas.

Os resultados obtidos no teste estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Valor de concentração necessário para inibição de 50% do crescimento celular nas linhagens de células testadas. GI₅₀ (µg/mL)

	Doxorrubicina	<i>M. alternifolia</i>	Terpinen-4-ol (+)	Terpinen-4-ol (-)
UACC-62	0,2	250	>250	126,5
MCF7	0,027	153,9	>250	44,6
NCI-ADR/RES	0,082	31,5	>250	>250
746-0	0,028	169,8	>250	>250
NCI-H460	>25,0	>250	>250	>250
PC-3	0,22	178,6	>250	>250
HT29	>25,0	99,9	>250	224,7
K-562	<0,025	5,2	8	250
VERO	0,45	>250	>250	250

UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); HT29 (colorretal); K562 (leucemia); VERO (rim, célula normal, macaco verde).

GI₅₀: *Growth Inhibition 50* – concentração necessária para que ocorra 50% de crescimento, calculadas por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 8.0.

Na tabela 4 encontram-se os valores obtidos da concentração necessária para inibição de 50 % do crescimento celular. O (+)-terpinen-4-ol, apresentou inibição celular em 50 % das células (GI₅₀) em apenas uma linhagem, ou seja, apresentou atividade citostática seletiva na linhagem de leucemia (K-562, GI₅₀= 8.00 µg/mL), sendo inativo nas concentrações analisadas nas outras linhagens celulares. O (-)-terpinen-4-ol manifestou efeito citostático seletivo em câncer de mama (MCF-7, GI₅₀= 44,6 µg/mL) e moderado na linhagem celular de melanoma (UACC-62, GI₅₀= 126,5 µg/mL). Por outro lado, o (-)-terpinen-4-ol apresentou efeito citostático fraco em linhagens de colorretal (HT-29, GI₅₀= 224,7 µg/mL) e leucemia (K-562, GI₅₀= 250.00 µg/mL), sendo inativo para NCI-ADR/RES, 786-0, NCI-H460 e PC-3. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, demonstrou atividade citostática seletiva para ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES, GI₅₀ = 31,5 µg/mL) e leucemia (K-562, GI₅₀ = 5,2 µg/mL), atividade citostática moderada em linhagens tumorais de mama (MCF7, GI₅₀ = 153,9 µg/mL), rim (786-0, GI₅₀ = 168,9 µg/mL), próstata (PC-3, GI₅₀ = 178,6 µg/mL) e colorretal (HT29, GI₅₀ = 99,9 µg/mL), além de efeito citostático fraco na linhagem de melanoma (UACC-62, GI₅₀ =250 µg/mL), sendo inativo na concentração de 250 µg/mL em linhagens de pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460).

Nota-se que o óleo de *M. alternifolia* exibiu comportamento citostático para quase todas as linhagens celulares, sendo a melhor escolha para maioria dos tumores *in vitro* testados, porém em melanoma, nosso objeto de estudo, o (-)-terpinen-4-ol foi o que apresentou menor concentração eficaz na inibição do crescimento da linhagem UACC-62.

O (+)-terpinen-4-ol, que já havia sido estudado por Calcabrini (2004) obteve resultados de inibição do crescimento celular em linhagens de melanoma (M14) *in vitro* na concentração de 100 µg/mL. Contrário ao que esperávamos, nossos resultados demonstram que o (+)-terpinen-4-ol não apresentou atividade citostática na linhagem de melanoma UACC-62 na concentração avaliada.

As figuras 11, 12, 13 e 14 demonstram a atividade antiproliferativa da doxorrubicina, óleo de *M. alternifolia*, (+) e (-)-terpinen-4-ol, frente as linhagens testadas, obtidas no software Origin, versão 8.0.

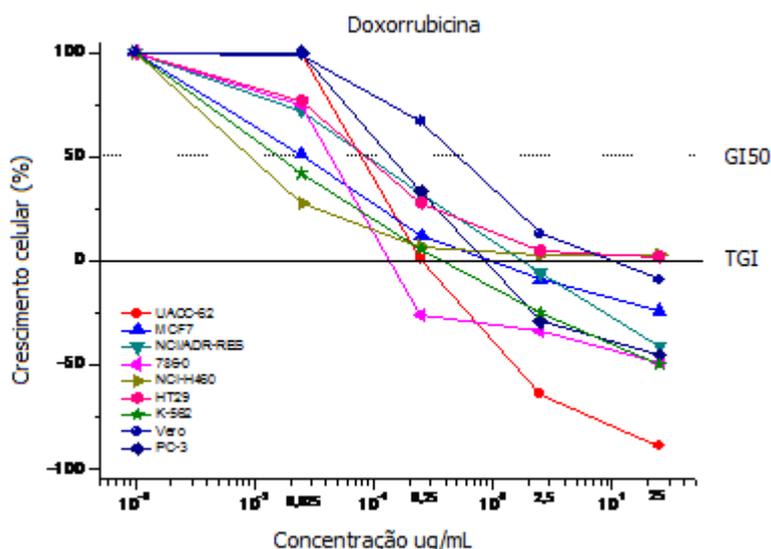


Figura 11 – Curva de concentração e resposta da doxorrubicina frente as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento de células e a concentração de amostra após 48 horas de exposição.

Pode-se observar na figura 11 o comportamento da doxorrubicina frente às linhagens testadas sendo possível verificar que não houve mudanças na resposta deste quimioterápico frente às linhagens testadas. Portanto, pode-se afirmar que não houve mutação nas células utilizadas, e tampouco as linhagens celulares apresentaram sensibilidade imprevista frente à doxorrubicina.

Nas figuras 12 a 14 encontram-se os gráficos referentes ao comportamento das linhagens celulares frente ao óleo de *Melaleuca alternifolia*, (+)-terpinen-4-ol e (-)-terpinen-4-ol, respectivamente. Esses gráficos foram obtidos empregando-se o software Origin, versão 8.0. A primeira linha horizontal do gráfico indica o GI 50 (*Growth Inhibition 50*), e a segunda linha indica o TGI (*Total Growth Inhibition*). Neles pode-se verificar a atividade citostática para as amostras, conforme relacionadas na tabela 4.

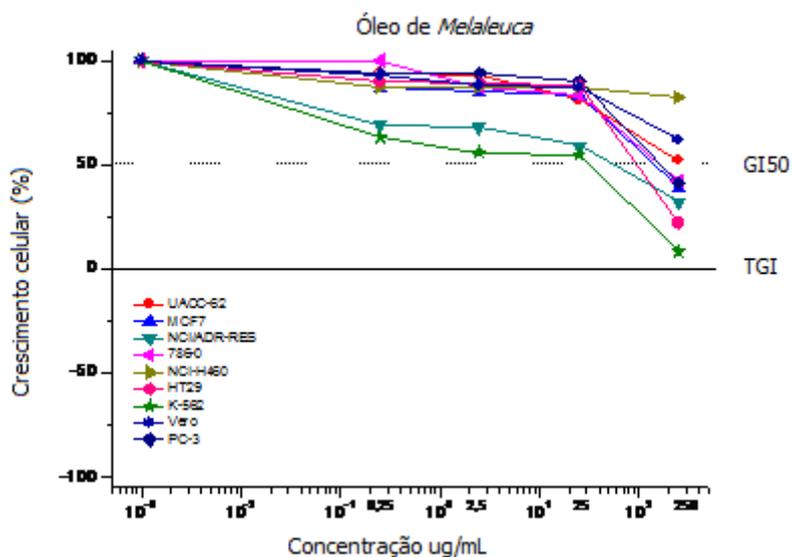


Figura 12 – Curva de concentração e resposta do óleo de *Melaleuca* frente às linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento de células e a concentração de amostra após 48 horas de exposição.

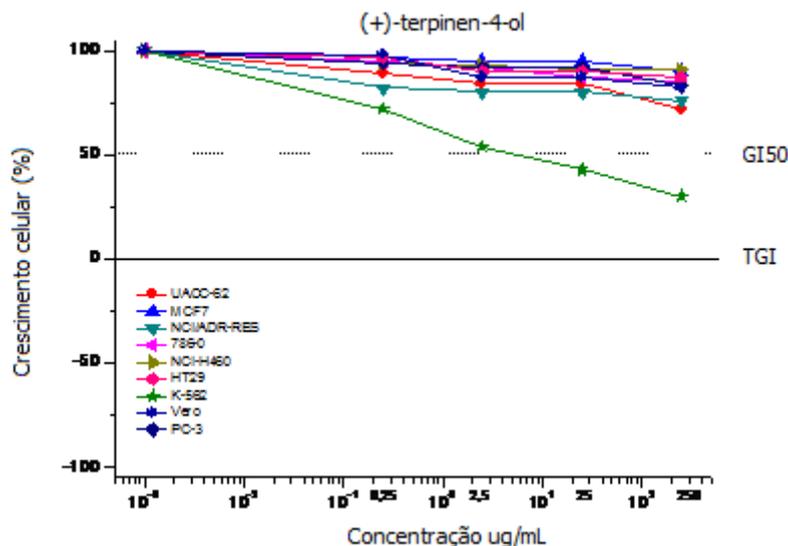


Figura 13 – Curva de concentração e resposta do (+)-terpinen-4-ol frente às linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento de células e a concentração de amostra após 48 horas de exposição.

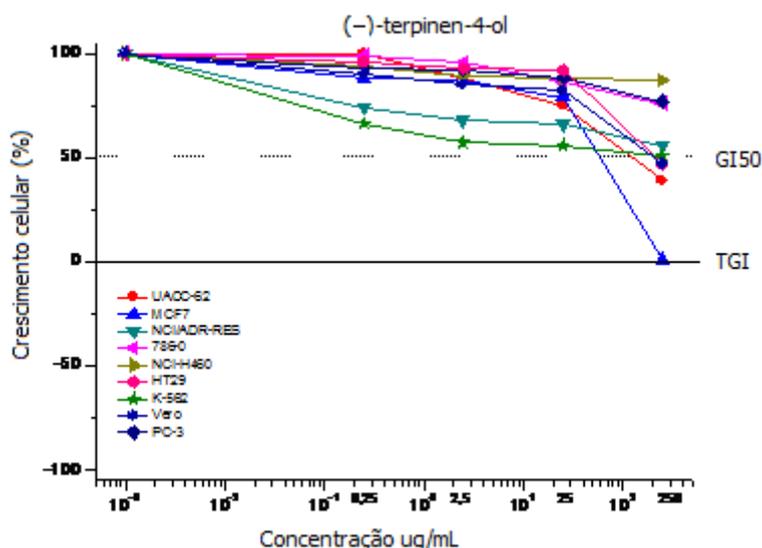


Figura 14 – Curva de concentração e resposta do (-)-terpinen-4-ol frente às linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento de células e a concentração de amostra após 48 horas de exposição.

Pela visualização dos gráficos foi possível verificar que, de um modo geral, o óleo de *Melaleuca* apresentou melhor atividade do que os isômeros de terpinen-4-ol nas diferentes linhagens. O (+)-terpinen-4-ol, apresentou atividade citostática em apenas uma linhagem celular. O (-)-terpinen-4-ol apresentou atividade citostática em

quatro linhagens, sendo que este isômero apresentou atividade maior do que as demais amostras analisadas para a linhagem UACC-62 (melanoma), ou seja, a atividade citostática foi obtida em menor concentração do princípio ativo quando comparado com as demais amostras submetidas ao teste.

Nossos estudos corroboram com os resultados obtidos por Liu (2009) para linhagens de câncer de mama (MCF-7) e câncer de próstata (PC-3). Os demais estudos que utilizaram células do melanoma e células cancerígenas de pulmão não apresentaram resultados semelhantes, mas não podem ser comparados, pois, as linhagens utilizadas são diferentes.

As formulações 1 e 2 contendo (-)-terpinen-4-ol, (+)-terpinen-4-ol e óleo de *M. alternifolia*, e o placebo das duas formulações foram submetidas ao ensaio antiproliferativo, porém a atividade citostática das formulações com e sem o princípio ativo foi semelhante. Presumindo-se que o placebo interfere na leitura espectrofotométrica, os resultados das formulações adicionadas de princípio ativo não podem ser considerados e tampouco avaliados neste trabalho.

5.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES

As formulações foram propostas com o intuito de obter formulações simples estáveis e de baixo custo para o tratamento do melanoma cutâneo. A utilização de duas fórmulas foi importante, principalmente para comparar-se o perfil de liberação e permeação do princípio ativo em sistemas diferentes.

Para o preparo das formulações foram utilizados coadjuvantes a fim de minimizar efeitos de oxidação, contaminação, dentre outros. O BHT foi utilizado como agente antioxidante da formulação, evitando o aparecimento de compostos de degradação consequentes do processo oxidativo. O estearato de octila e o palmitato de isopropila são utilizados como emolientes, ajudando na espalhabilidade e conferindo a sensação aveludada e seca à pele, não impedindo sua respiração. A vaselina sólida foi utilizada na F2 como emoliente e lubrificante. O cosmowax J[®] é o agente auto emulsionante composto por álcool cetosteárilico e álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE. O monoestearato de glicerila é um emulsionante secundário, capaz de dar consistência e auxiliar na estabilidade da formulação. O conservante antimicrobiano utilizado na F1 foi o metilparabeno e propilparabeno, e na F2 foi o metildibromoglutaronitrila e fenoxietanol, ambos utilizando uma

associação de conservantes como intuito de aumentar a efetividade destes agentes. O propilenoglicol é um composto da fase aquosa e devido as suas propriedades higroscópicas, tem a capacidade de absorver água e funcionar como um hidratante e umectante em formulações e/ou na pele. O EDTA dissódico, é o responsável pela ação quelante ou sequestrante da formulação. A trietanolamina foi utilizada somente na F1 para acertar o pH da formulação e oferecer viscosidade ao polímero carboxivinílico (ANSEL, 2007).

Basicamente, a diferença entre as duas formulações testadas, é que a F2 utiliza o Cosmowax J[®], uma mistura de tensoativo com agente espessante e estabilizante, na quantidade adequada, previamente analisada, capaz de proporcionar maior estabilidade da emulsão. Na F1, esta mesma mistura de tensoativo mais o agente espessante foi utilizada, mas em uma proporção menor, sendo necessário o uso do polímero carboxivinílico como agente para promoção do aumento da viscosidade. Foram obtidas, desta forma, duas formulações diferentes, com consistências semelhantes, analisadas e comparadas pela reologia. A F1 também é mais aquosa do que a F2.

5.3. ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004)

5.3.1. Centrifugação

Após a manipulação das fórmulas propostas, foi realizado o teste de centrifugação, sendo realizado na fase inicial de desenvolvimento de produtos, com a finalidade de auxiliar na triagem das formulações. Neste teste as emulsões são consideradas estáveis se os constituintes da fase dispersa mantiverem-se na fase dispersante, após submetê-las a agitação e força da gravidade, ou seja, deve-se observar a ocorrência de precipitação, separação de fases, coalescência e *caking* (formação de sedimento compacto) (BRASIL, 2004; ANTONIO, 2007).

5.3.2. Características organolépticas

A F1 é uma emulsão com aspecto homogêneo, de cor branca, opaco, com odor característico do terpinen-4-ol. Durante o período que foi avaliado, em nenhuma das condições houve alterações no aspecto físico macroscópico desta formulação.

Na F2 o aspecto macroscópico verificado foi de emulsão branca homogênea, com odor característico do terpinen-4-ol. Quando comparada com uma amostra que ficou em temperatura ambiente esta formulação também não apresentou variações quanto ao aspecto, variações de cor, odor, consistência ou separação de fases visível.

5.3.3. Microscopia óptica

Nas figuras 15 a 19 encontram-se as fotomicrografias da formulação 1. As amostras foram submetidas às condições de temperatura ambiente, geladeira, estufa e ciclo, sendo avaliadas quanto ao seu aspecto microscópico, em microscópio óptico e fotografadas com lente de aumento de 100 vezes.

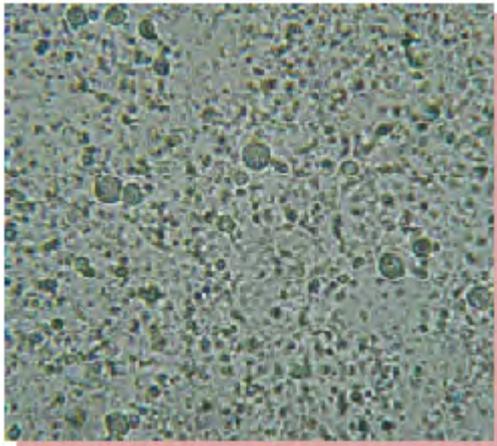


Figura 15 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Análise inicial

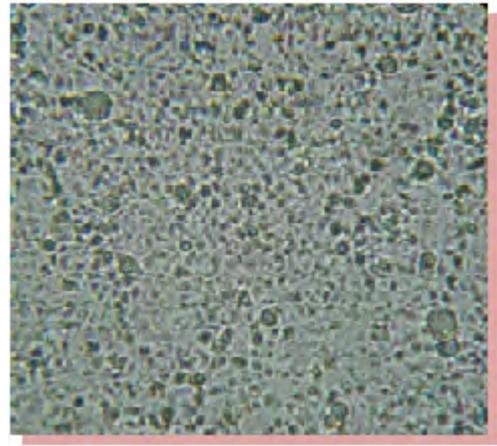


Figura 16 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Temperatura ambiente, 15 dias.

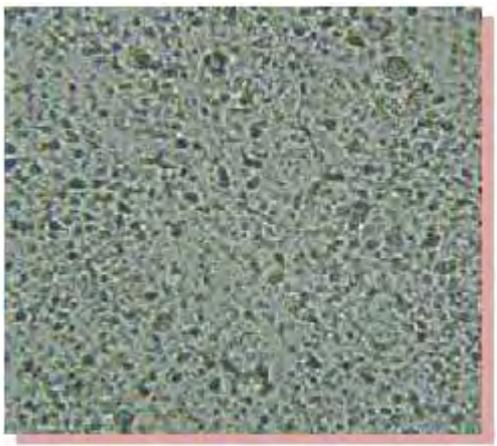


Figura 17 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Geladeira, 15 dias.

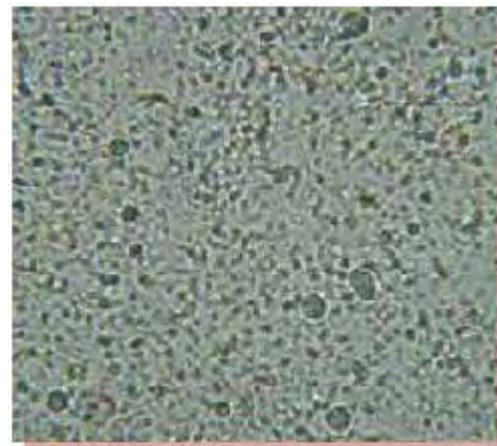


Figura 18 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Estufa, 15 dias.

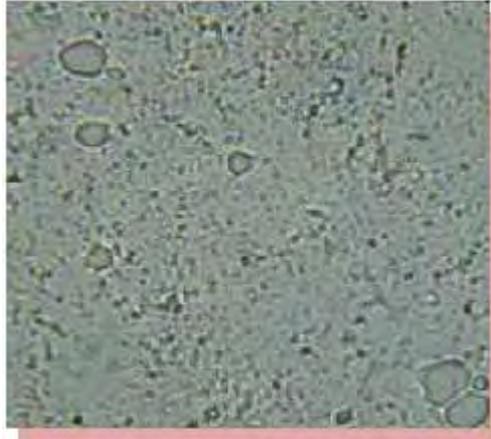


Figura 19 – Fotomicrografia da formulação 1 (F1) – Ciclo, 15 dias.

As figuras de 20 a 24 mostram os resultados da fotomicrografia da estabilidade preliminar da formulação 2 (F2), as amostras foram submetidas às condições de temperatura ambiente, geladeira, estufa e ciclo, sendo avaliadas quanto ao seu aspecto microscópico, em microscópio óptico e fotografadas com lente de aumento de 100 vezes.



Figura 20 – Fotomicrografia da formulação 2 (F2) – Análise inicial.



Figura 21 – Fotomicrografia da formulação 2 (F2) – TA, 15 dias.



Figura 22 – Fotomicrografia da formulação 2 (F2) – Geladeira, 15 dias.

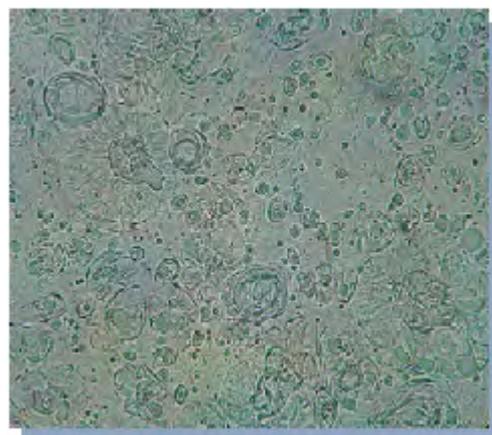


Figura 23 – Fotomicrografia da formulação 2 (F2) – Estufa, 15 dias.

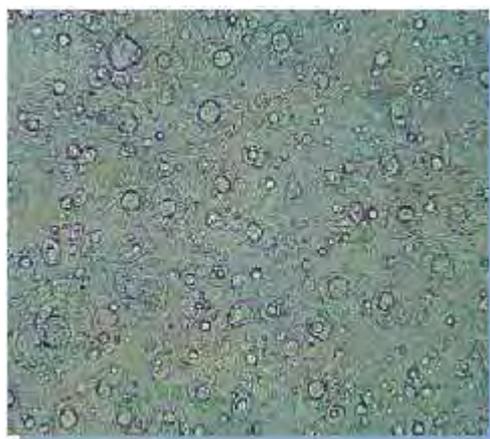


Figura 24 – Fotomicrografia da formulação 2 (F2) – Ciclo, 15 dias.

Nota-se pela fotomicrografia da microscopia óptica das formulações F1 e F2, que encontram-se nas figuras 15 a 24, que as duas formulações não apresentaram sinais de coalescência, mesmo quando submetida às condições mais extremas de temperatura (estufa, $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). As alterações nas fotomicrografias devem-se às quantidades colocadas de amostra e variação na luz incidente. Portanto, as amostras foram aprovadas neste teste, não apresentando variações avaliadas preocupantes ou significativas.

5.3.4. pH

Na tabela 5 encontram-se os resultados da análise de pH das formulações submetidas ao teste de estabilidade preliminar com desvio padrão, média e coeficiente de variação.

Tabela 5 – pH das formulações 1 e 2 submetidas a diferentes temperaturas.

	F1 TA*	F1 5°C*	F1 45°C*	F1 ciclo*	F2 TA*	F2 5°C*	F2 45°C*	F2 ciclo*
1º dia	6,05	6,05	6,05	6,05	6,19	6,19	6,19	6,19
2º dia	6,01	6,04	6,13	6,06	6,25	6,34	6,26	6,30
3º dia	6,15	6,13	6,24	6,20	6,10	6,14	6,25	6,17
4º dia	6,38	6,35	6,43	6,33	6,31	6,23	6,43	6,26
5º dia	6,24	6,24	6,28	6,26	6,23	6,21	6,38	6,19
6º dia	6,09	6,04	6,07	6,05	6,42	6,48	6,54	6,41
7º dia	6,04	6,03	6,08	5,99	6,38	6,44	6,43	6,37
8º dia	6,23	6,20	6,27	6,12	6,15	6,13	6,22	6,12
9º dia	6,19	6,34	6,30	6,23	6,34	6,27	6,40	6,21
10º dia	6,07	6,15	6,09	6,03	6,19	6,13	6,29	6,24
11º dia	6,00	5,97	6,05	6,01	6,39	6,45	6,43	6,38
12º dia	6,21	6,14	6,19	6,12	6,21	6,12	6,35	6,15
13º dia	6,13	6,24	6,29	6,14	6,22	6,21	6,33	6,19
14º dia	6,02	6,09	6,15	6,05	6,35	6,35	6,42	6,25
15º dia	6,32	6,24	6,24	6,17	6,27	6,35	6,40	6,24
DP**	0,12	0,12	0,11	0,10	0,09	0,12	0,10	0,09
Média	6,14	6,15	6,19	6,12	6,27	6,27	6,35	6,24
CV***	1,91	1,88	1,83	1,64	1,51	1,99	1,52	1,39

*Média de três amostras

**Desvio padrão.

***Coeficiente de variação.

TA – Temperatura ambiente

O pH das formulações durante a estabilidade preliminar, conforme apresentado na tabela 5, sofreu pequenas variações nas duas formulações. A F1 apresentou valores entre 5,97 e 6,43, e a F2 apresentou pH em todas as condições entre: 6,10 a 6,54, sendo que o desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação, foi

abaixo de 2% para as duas formulações em todas as condições, não indicando alterações relevantes dos resultados. Nota-se que na média, os menores valores de pH foram obtidos na condição de ciclo, e os maiores valores na condição de 45°C (estufa), e ainda, que entre as amostras que ficaram na TA e geladeira apresentaram uma variação muito pequena entre as médias desta medida.

5.3.5. Viscosidade aparente

Tabela 6 – Valores de viscosidade aparente no teste de estabilidade preliminar, referente as formulações 1 e 2.

	η F1 (Pa)	η F2 (Pa)
TA AI	1,69	1,62
TA 15d	1,56	1,75
5°C 15d	1,68	1,47
45°C 15d	1,63	1,75
ciclo 15d	1,39	1,48
Média	1,59	1,61
DP	0,12	0,13
CV	7,69	8,36

*

Os valores de viscosidade das formulações F1 e F2 foram obtidos a partir da média de três leituras, com coeficiente de variação menor que 5%. Na tabela 6, η = viscosidade mínima aparente, Pa = Pascal, TA = Temperatura ambiente, AI = Análise inicial, 5°C = geladeira, 45°C = estufa, ciclo = 24 horas à -5°C e 24 horas à 45°C, DP = desvio padrão relativo, CV = coeficiente de variação entre as amostras submetidas às condições citadas acima.

A viscosidade aparente obtida em curva de fluxo no equipamento reômetro de oscilação HAAKE foi analisada pelo software Rheowin 3.5 e os resultados estão apresentados na tabela 6. A formulação F1 apresentou valores entre 1,39 e 1,69 Pa e desvio padrão relativo (DPR) de 7,7. Os menores valores de viscosidade foram obtidos nas condições ciclo e TA (15 dias). Durante o ciclo ocorre o congelamento e descongelamento da amostra, que resultou em uma diminuição da viscosidade. A F2 apresentou viscosidade inicial de 1,62 Pa, e valores entre 1,47 a 1,75 Pa e CV de

8,4. Os menores valores de viscosidade foram obtidos nas condições de ciclo e geladeira, decorrentes das temperaturas baixas.

5.4. ESTABILIDADE ACELERADA (BRASIL, 2005)

Os resultados da avaliação de estabilidade acelerada das duas formulações desenvolvidas estão descritas neste tópico. Durante esta análise as formulações foram avaliadas até o período de 6 meses, correspondente a 180 dias.

As duas formulações não apresentaram modificações quanto ao aspecto durante o prazo avaliado.

Abaixo na tabela 7 a descrição dos valores encontrados de pH das formulações 1 e 2, lotes 1, 2 e 3.

Tabela 7 – pH das formulações 1 e 2 durante a estabilidade acelerada.

Tempo (dias)	F1 L1*	F1 L2*	F1 L3*	F2 L1*	F2 L2*	F2 L3*
AI	6,12	6,16	6,04	6,21	6,18	6,28
30	6,17	6,25	6,15	6,29	6,21	6,37
60	6,14	6,18	6,07	6,25	6,23	6,34
90	6,19	6,28	6,12	6,33	6,25	6,40
180	6,13	6,15	6,06	6,27	6,21	6,31
média	6,15	6,204	6,088	6,27	6,216	6,34
DP**	0,0292	0,0577	0,0455	0,0447	0,0261	0,0474
CV***	0,4741	0,9301	0,7473	0,7133	0,4195	0,7482

*Média de três amostras

**Desvio padrão.

***Coeficiente de variação

TA – Temperatura ambiente, F - formulação, L – lote.

Na tabela 8 pode-se observar os valores da viscosidade aparente (Pa/s) obtida nos períodos inicial, 30, 60, 90 e 180 dias que foram avaliados.

Tabela 8 – Resultados referentes viscosidade aparente F1 e F2, até o período de 60 dias.

	F1 Lote 1*	F1 Lote 2*	F1 Lote 3*	F2 Lote 1*	F2 Lote 2*	F2 Lote 3*
AI	1,676	1,567	1,789	1,274	1,143	1,363
30 dias	1,698	1,586	1,665	1,375	1,183	1,458
60 dias	1,589	1,621	1,721	1,298	1,245	1,435
90 dias	1,634	1,636	1,716	1,334	1,212	1,467
180 dias	1,745	1,672	1,733	1,401	1,254	1,497
média	1,6684	1,6164	1,7248	1,3364	1,2074	1,444
DP	0,060	0,041	0,044	0,053	0,046	0,050
CV	3,582	2,562	2,570	3,931	3,784	3,493

*Média de três amostras, CV inferior a 2 %.

DP – desvio padrão

CV – coeficiente de variação

TA – Temperatura ambiente, F – formulação.

Os resultados do teor de princípio ativo durante o teste de estabilidade acelerada até o período de 180 dias estão descritos abaixo na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da variação do teor da F1 e F2, submetidas á estabilidade acelerada

	F1 Lote 1*	F1 Lote 2*	F1 Lote 3*	F2 Lote 1*	F2 Lote 2*	F2 Lote 3*
AI	100,58%	100,27%	101,46%	101,54%	100,40%	100,62%
30 dias	99,64%	97,85%	99,48%	99,60%	99,91%	98,38%
60 dias	98,72%	98,27%	98,01%	99,08%	99,04%	97,96%
90 dias	99,32%	99,27%	99,34%	98,76%	100,21%	98,45%
180 dias	99,15%	98,45%	98,43%	98,56%	99,01%	99,21%
média	99,48%	98,82%	99,34%	99,51%	99,71%	98,92%
DP	0,006978	0,009599	0,013333	0,0120197	0,006529	0,010498
CV	0,70%	0,97%	1,34%	1,21%	0,65%	1,06%

*Média de três amostras, CV inferior a 2 %.

DP – desvio padrão

CV – coeficiente de variação

TA – Temperatura ambiente, F – formulação.

Neste teste as duas formulações se apresentaram adequadas, obtendo-se valores de pH, viscosidade e teor satisfatórios e dentro do limite de desvio de acordo com o permitido na legislação vigente.

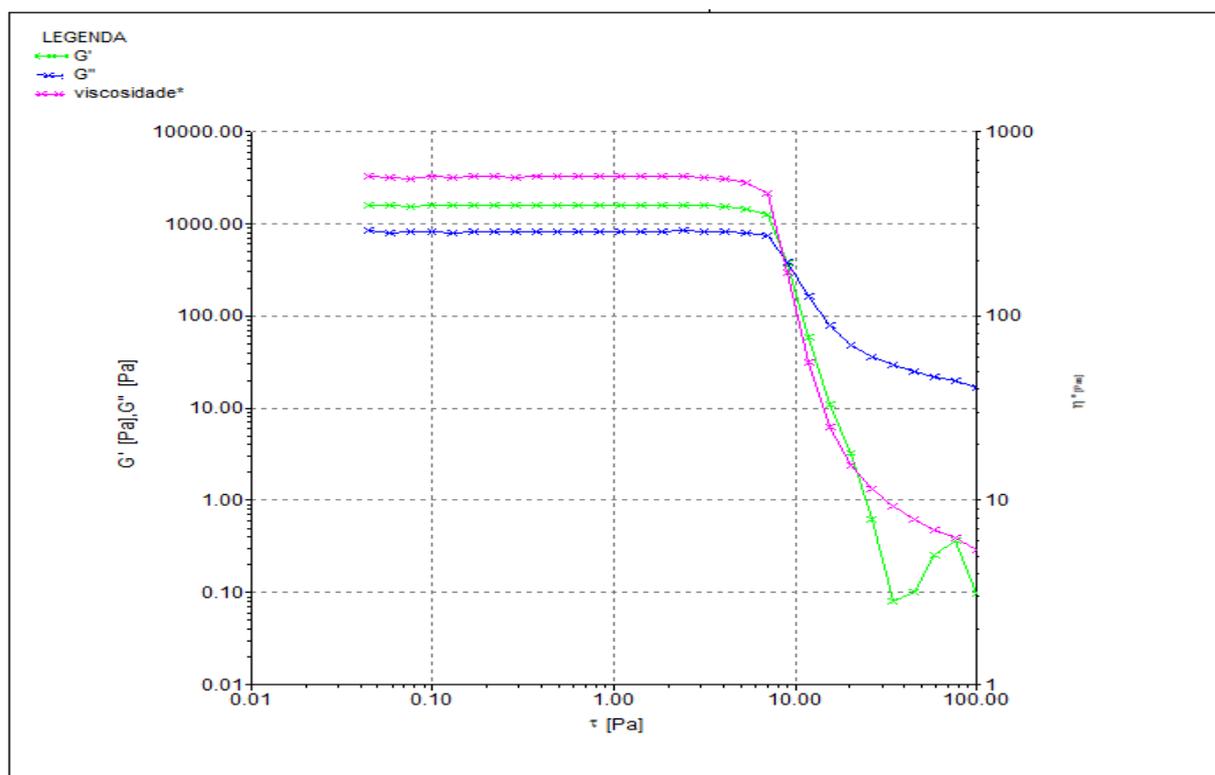
A análise microbiológica de produtos não estéreis foi realizada no período inicial e após 180 dias em que as formulações foram submetidas à 40°C. Foi

realizado o teste de contagem de microorganismos totais não sendo observado nenhum crescimento de bactérias e fungos nos dois períodos analisados.

As formulações foram aprovadas na avaliação física, química e microbiológica. Ambas demonstraram-se estáveis na condição exigida pela legislação para avaliação de estabilidade acelerada. Na avaliação microbiológica em produtos farmacêuticos o número de microorganismos totais deve ser inferior a 10^2 a 10^3 UFC/g (mL) ou, no máximo 5×10^2 a 5×10^3 UFC/g (mL) de amostra e ausência de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp e *E. coli*.

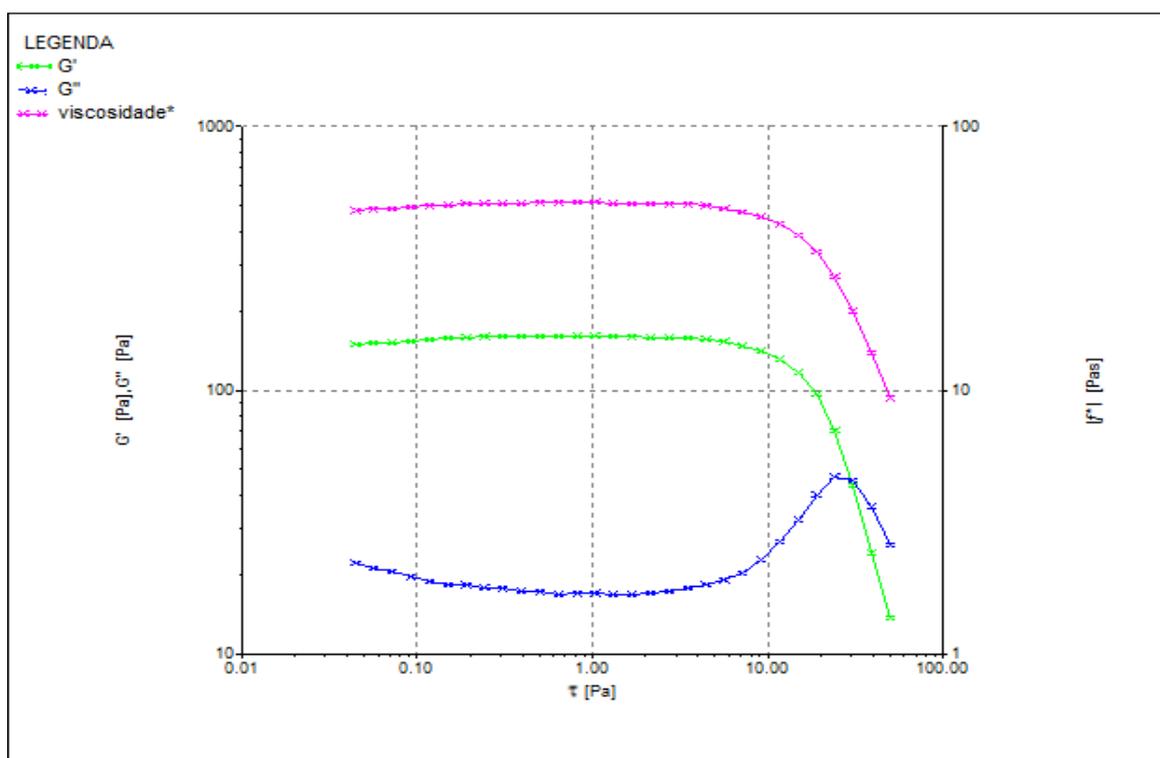
5.5. REOLOGIA

As figuras 25 e 26 mostram os resultados da variação de G' e G'' em função da varredura de tensão linear das formulações F1 e F2. Nesta análise foram avaliados a tensão e o limite de escoamento, ou região de viscoelasticidade não linear.



G' = módulo elástico, G'' = módulo viscoso, η^* = viscosidade complexa.

Figura 25 – Teste de varredura de tensão da formulação 1.



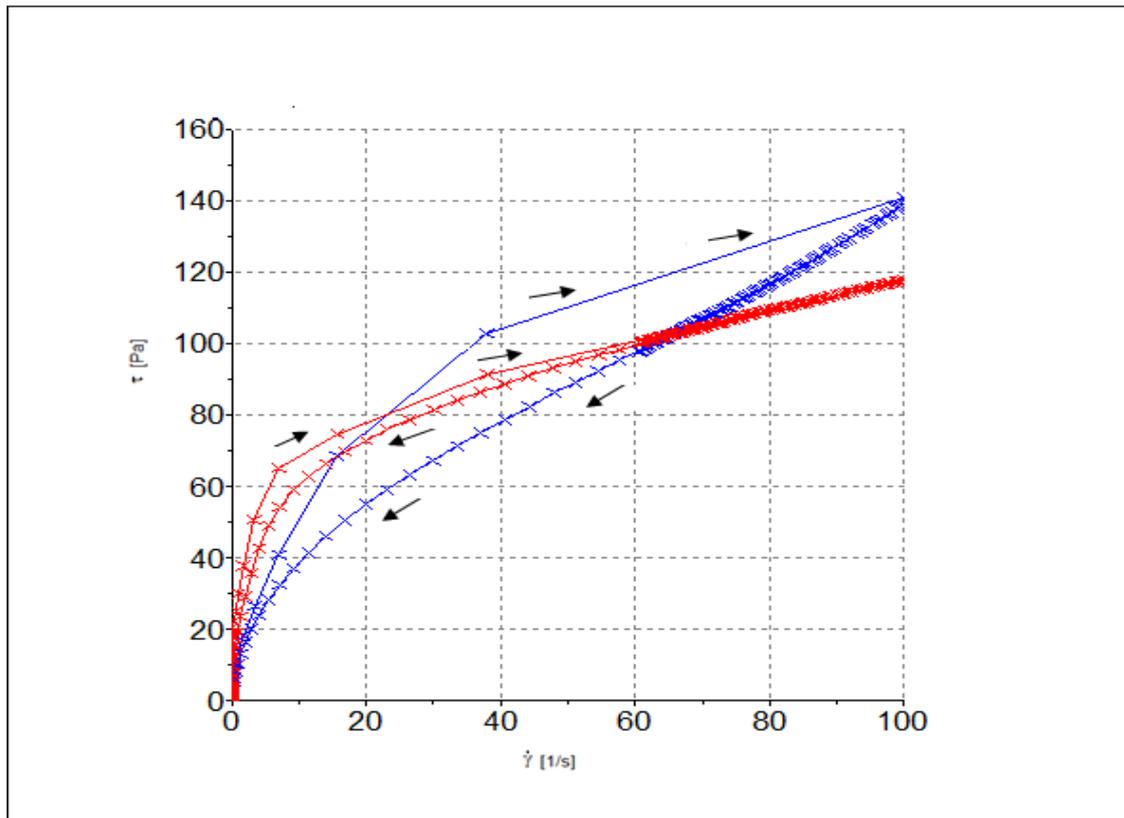
G' = módulo elástico, G'' = módulo viscoso, η^* = viscosidade complexa.

Figura 26 – Teste de varredura de tensão da formulação 2.

No teste de varredura de tensão, representado nas figuras 25 e 26, observa-se o módulo de estocagem (G), verificando-se que o G' encontra-se acima do G'' . Este resultado significa que o componente elástico (módulo de armazenamento) é maior do que o componente viscoso (módulo de perda), indicando significativa estabilidade da formulação. Nota-se que na tensão de 1 Pa as duas formulações encontram-se lineares, portanto essa tensão foi utilizada nos testes subsequentes.

O teste de varredura de tensão também indica qual a tensão crítica, ou limite de escoamento dos sistemas. A F1 quando submetida a uma tensão maior que 10 Pa apresentou uma região não linear de viscoelasticidade, o que representa que, se a amostra for submetida a uma tensão superior a 10 Pa (tensão crítica) durante a estocagem, transporte, armazenamento ou aplicação, o produto pode perder sua viscosidade de maneira irreversível. Para a F2 a tensão crítica observada foi abaixo de 10 Pa.

Na figura 27, pode-se observar as curvas de fluxo referentes as formulações F1 e F2, tendo um gráfico da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento.



τ - tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ - taxa de cisalhamento, curva I – curva ascendente ($\dot{\gamma} = 0 - 100$ (1/s)) e curva II – curva descendente ($\dot{\gamma} = 100 - 0$ (1/s)).

Figura 27 – Curva de fluxo I e II das formulações F1 e F2

De acordo com a curva de fluxo, apresentada na figura 27, as formulações desenvolvidas foram caracterizadas como fluxos não Newtonianos pseudoplásticos e tixotrópicos, sendo que a F2 é mais tixotrópica do que a F1, pois apresenta maior área de histerese.

As áreas de histerese calculadas pelo software Rheowin 3.5 da F1 e F2, apresentaram valores médios de 363,3 e 1677,0 Pa/s respectivamente, amostras em triplicata e coeficiente de variação entre as amostras menor que 2%.

5.6. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA

5.6.1- Especificidade/seletividade

Na análise inicial injetou-se a fase móvel, placebo das formulações 1 e 2. Os picos obtidos na solução com o placebo e a fase móvel não apresentaram pico próximo ou no mesmo tempo de retenção do terpinen-4-ol (aproximadamente 9,4

minutos), portanto, não interferiram na análise. A figura 29 representa a injeção do placebo da F1 e a figura 30 a injeção do placebo da F2. Com estas injeções foi possível verificar que a fase móvel não interferiu na análise.

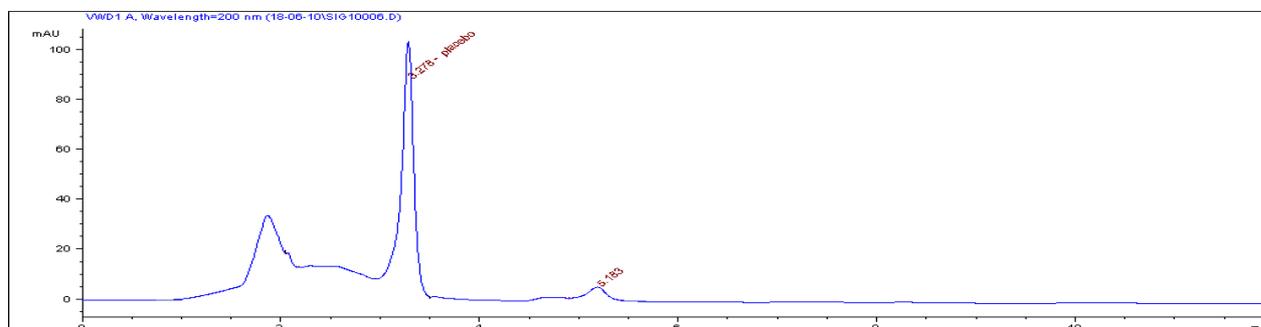


Figura 29 – Injeção do placebo da formulação 1

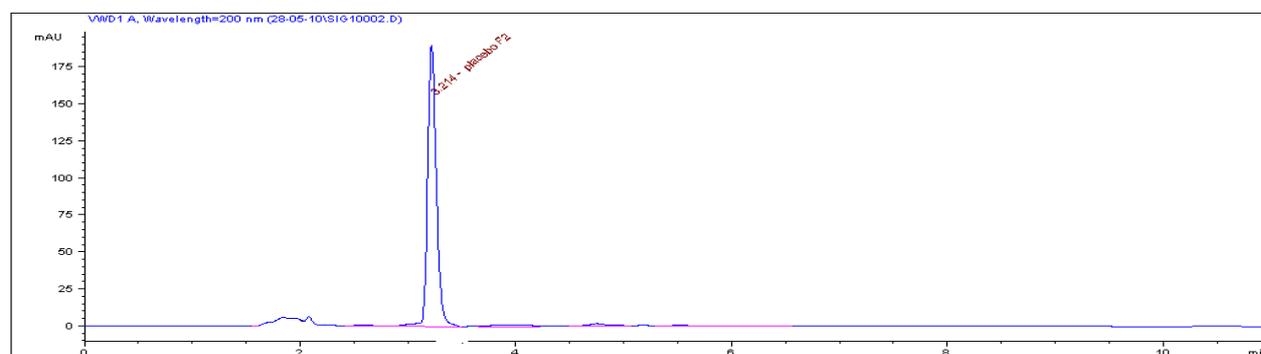


Figura 30 – Injeção do placebo da formulação 2

A seletividade foi realizada utilizando-se o teste de estresse, já que os produtos de degradação deste fármaco não estão disponíveis no mercado. Esta análise é utilizada para verificar a influência dos produtos de degradação no pico do princípio ativo. Portanto, injetou-se em CLAE diferentes soluções com concentração de 50 µg/mL do terpinen-4-ol, contendo, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e luz ultravioleta. Após o período de exposição estas soluções foram injetadas em CLAE, e deste modo foram obtidos os cromatogramas que podem ser observados nas figuras 31 a 35. Notou-se que não existem interferentes no pico de análise do terpinen-4-ol, ou seja, não foi observado nenhum pico próximo ao tempo de retenção do padrão.

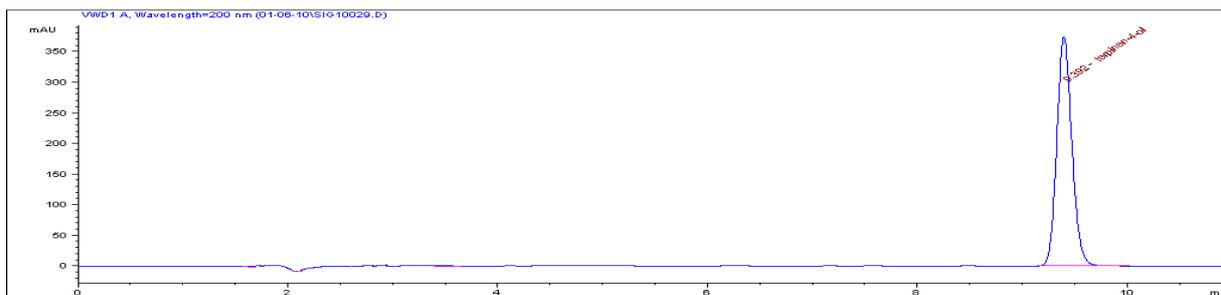


Figura 31 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em água após 1 hora em balão volumétrico, sem abrigo da luz.

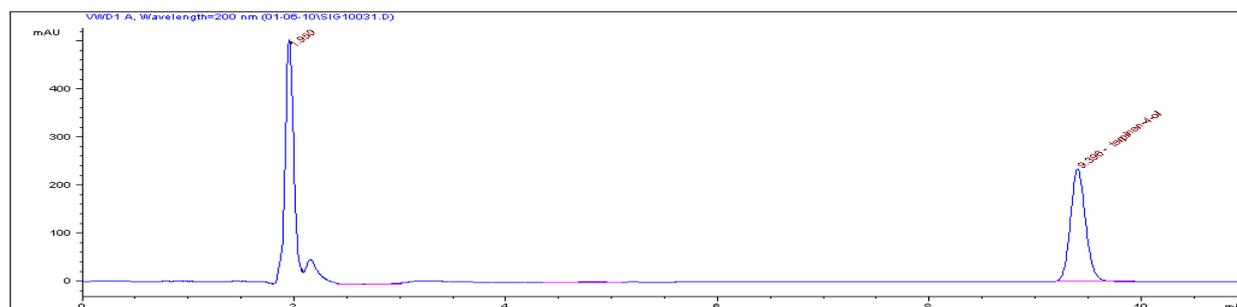


Figura 32 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em ácido clorídrico após 1 hora em balão volumétrico, sem abrigo da luz.

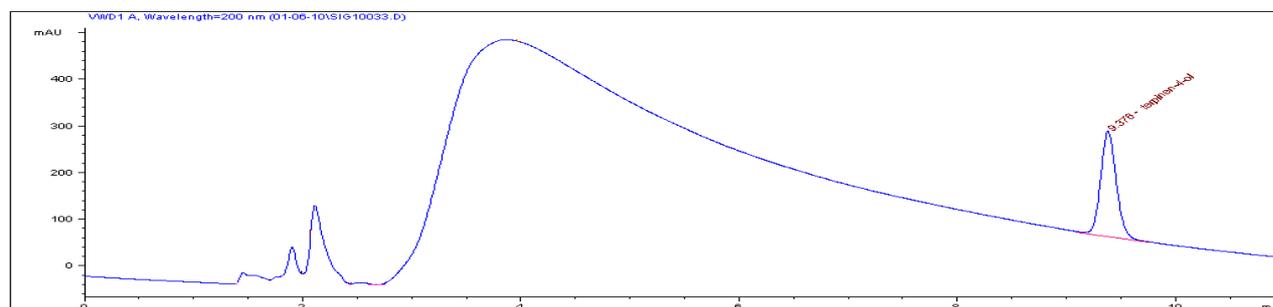


Figura 33 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em hidróxido de sódio após 1 hora em balão volumétrico, sem abrigo da luz.

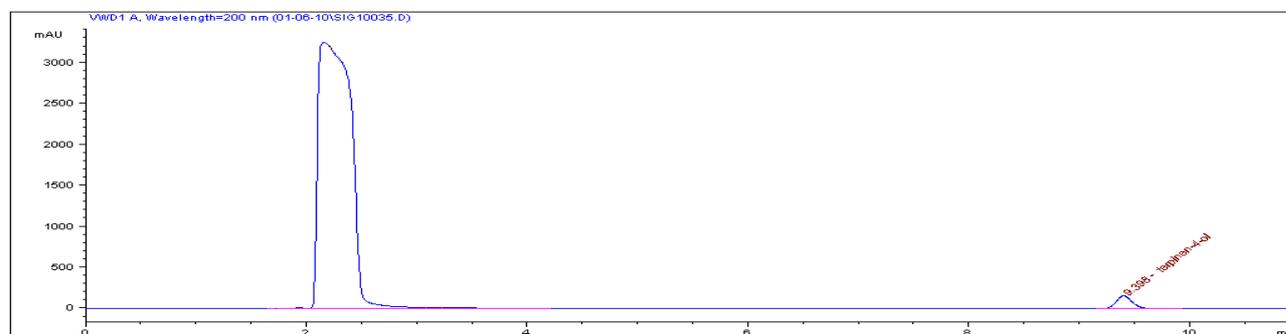


Figura 34 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em peróxido de hidrogênio após 1 hora em balão volumétrico, sem abrigo da luz.

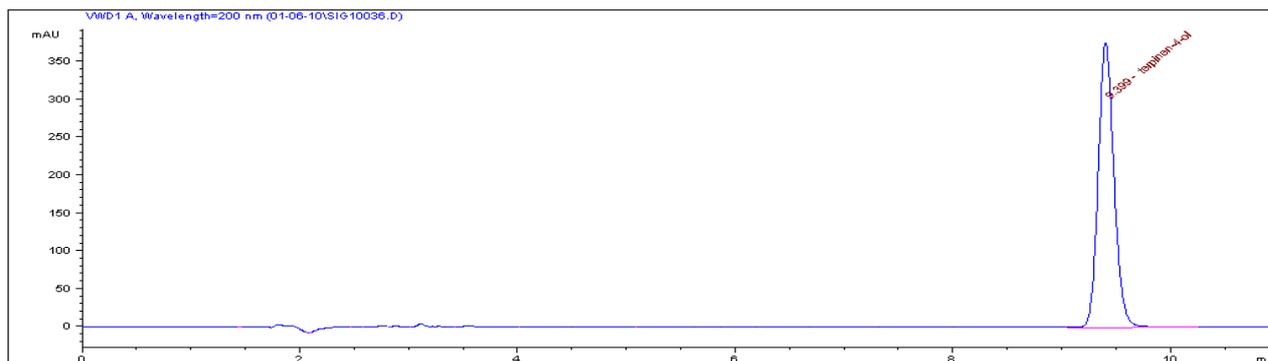


Figura 35 – Padrão de (-)-terpinen-4-ol em água exposto por 1 hora à luz ultravioleta.

Os cromatogramas obtidos no teste de estresse demonstram a ausência de picos próximos ao tempo de retenção do terpinen-4-ol, portanto, nestas condições o terpinen-4-ol não produz nenhum produto de degradação que poderá interferir na análise quando utilizado esta metodologia.

O fato de não aparecer pico de degradação, não significa que não houve degradação, mas indica que se houve degradação o pico não pode ser visto no comprimento de onda utilizado em nosso ensaio, portanto não interferiu em nossa análise.

5.6.2- Linearidade

A figura 36 apresenta a curva analítica obtida em programa gráfico, a partir de 8 concentrações do analito e os resultados obtidos encontram-se na tabela 10.

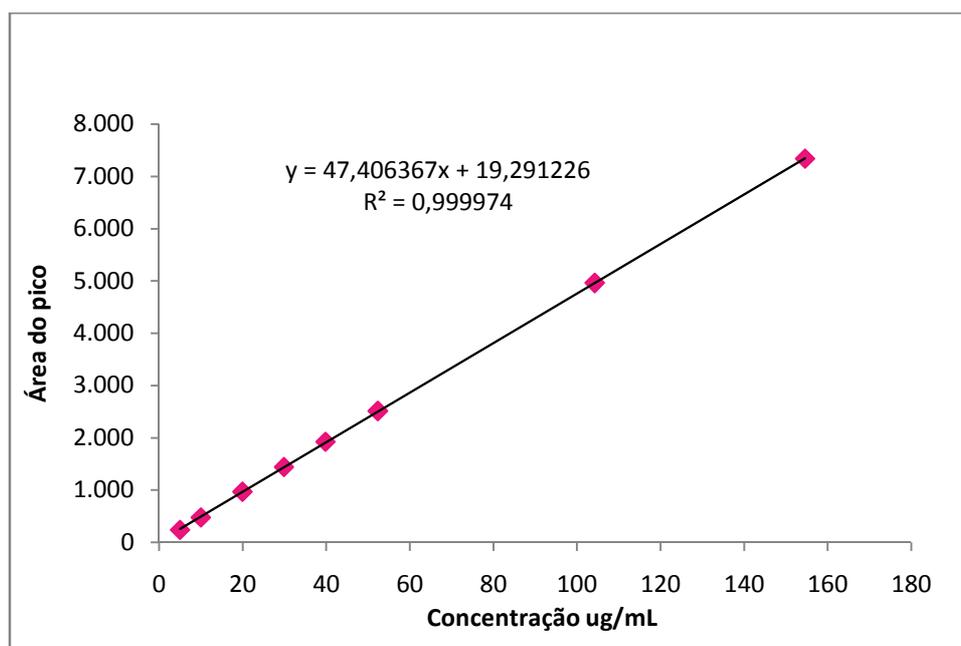


Figura 36– Curva analítica do (-)-tepinen-4-ol, equação da reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (R^2).

A curva apresentada na figura 36, apresentou-se linear no intervalo de concentração de 5 a 150 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9999. O critério mínimo aceitável pela ANVISA é de 0,99 (BRASIL, 2003).

A tabela 10 apresenta os resultados da linearidade obtidos na análise do padrão.

Tabela 10 – Dados da linearidade.

[] teórica µg/mL*	Área *	FR	DP	CV	CV geral
4,9745	238,192	0,020885	0,0001025	0,492	
9,9490	475,666	0,020916	5,999E-05	0,288	
19,8979	967,183	0,020573	3,377E-05	0,162	
29,8469	1.441,080	0,020712	4,378E-05	0,210	0,824
39,7958	1.922,553	0,020699	9,298E-05	0,446	
52,3110	2.512,067	0,020824	6,185E-05	0,297	
104,2272	4.960,923	0,021010	0,0001165	0,559	
154,5642	7.337,163	0,021066	5,37E-05	0,258	

*média de três valores, CV menor que 2%. [] – concentração, FR – fator de resposta, DP – desvio padrão, CV – coeficiente de variação.

O coeficiente de variação foi calculado pela equação 2:

$$CV = \frac{DP}{M} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

na qual:

CV = coeficiente de variação.

DP = desvio padrão do fator de resposta.

M = média determinada do fator de resposta.

O fator de resposta é utilizado para avaliar se a amostra apresentou a resposta dependente da concentração e foi calculado pela razão entre a concentração do padrão e a área do padrão. O cálculo do coeficiente de variação foi feito utilizando-se o fator de resposta. A concentração teórica é dependente da quantidade adicionada do padrão e suas diluições. Nota-se na tabela 10 que o coeficiente de variação entre as amostras de mesma concentração foi relativamente baixo, sendo que o maior valor apresentado foi de 0,56%. O coeficiente de variação entre todas as amostras de todas as concentrações, representado como CV geral, foi de 0,82%.

5.6.3- Precisão

A precisão foi avaliada realizando ensaios em dias diferentes com o mesmo analista (repetibilidade), e em dias diferentes por dois analistas (intermediária).

5.6.3.1- Precisão (repetibilidade)

A tabela 11 apresenta os resultados da precisão por repetibilidade.

Tabela 11 – Resultados obtidos na análise da precisão feita pelo mesmo analista, em diferentes dias.

[] teórica ug/mL*	Área*	FR	DP	CV	CV geral
5,053	241,056	0,020965651	2,4121E-04	1,156	
49,54	2402,73	0,020621512	7,5438E-05	0,361	
147,4	7068,39	0,020861651	5,1193E-05	0,245	0,824
4,974	238,192	0,020884694	1,0250E-04	0,491	
52,31	2512,07	0,020824013	6,1847E-05	0,296	
154,6	7337,16	0,021066025	5,3703E-05	0,257	

*média de três valores, CV menor que 2%

[] – concentração, FR – fator de resposta, DP – desvio padrão, CV – coeficiente de variação.

Utilizou-se três concentrações, baixa, média e alta (5, 50 e 150 µg/mL) na precisão (repetibilidade), sendo avaliado o CV em relação ao FR. O FR é obtido pela razão entre a concentração e a área de cada amostra. Para a comparação entre os valores, foram utilizadas as áreas obtidas nas três concentrações no teste de linearidade e as áreas obtidas feitas dois dias depois da análise da linearidade, realizadas pelo mesmo analista. O CV entre as amostras de mesma concentração e realizadas no mesmo dia, conforme apresentado na tabela 11, foi inferior a 2%, tendo o maior valor na concentração de 5 µg/mL que foi de 1,15%. O CV entre todas as amostras nos diferentes dias e diferentes concentrações foi de 0,8%. A ANVISA (BRASIL, 2003) permite para a análise de precisão um coeficiente de variação até 5%.

5.6.3.2- Precisão intermediária

A tabela 12 apresenta os resultados obtidos na precisão intermediária.

Tabela 12 – Resultados obtidos na análise da precisão feita por analistas diferentes em diferentes dias.

[] teórica ug/mL*	Área*	FR	DP	CV	CV geral
5,0140	245,912	0,020389965	0,00014578	0,70451646	
49,350	2434,61	0,020270209	2,58322E-05	0,12484066	
146,866	7088,79	0,020718058	3,9898E-05	0,19281704	
4,9740	238,192	0,020884694	0,000102496	0,49533629	1,423
52,311	2512,067	0,020824013	6,18468E-05	0,29888986	
154,564	7337,163	0,021066025	5,3703E-05	0,25953324	

*média de três valores, CV menor que 2%.

[] – concentração, FR – fator de resposta, DP – desvio padrão, CV – coeficiente de variação.

Na precisão intermediária também foi avaliado o CV em relação ao FR. O FR foi obtido pela razão entre a concentração e a área de cada amostra. Para a comparação entre os valores desta precisão, foram utilizados as áreas obtidas nas três concentrações no teste de linearidade e as áreas obtidas feitas por dois analistas diferentes, em dois dias posteriores à análise de linearidade. O CV entre as análises com amostras de mesma concentração, realizadas no mesmo dia, conforme apresentado na tabela 12, foi inferior a 1%, sendo que o maior valor obtido para a concentração de 5 µg/mL, foi de 0,7%. O CV entre todas as análises com as amostras em diferentes dias e diferentes concentrações foi de 1,4%. Portanto os valores obtidos para o CV na análise de precisão intermediária estão dentro das especificações da ANVISA, 2003 (menor que 5%).

O valor de variação encontrado na precisão feita em diferentes dias, com diferentes analistas, foi maior pois as variáveis também eram maiores.

5.6.4- Limite de quantificação

O limite de quantificação foi obtido injetando-se concentrações baixas de amostra, ou próximo do suposto limite. Na figura 37 encontra-se a curva analítica, acrescida das concentrações de 4,0; 2,0; 1,0; 0,4; 0,2 e 0,1 µg/mL, utilizadas no ensaio de limite de quantificação. Observa-se que a curva obtida e o coeficiente de correlação (R^2) apresentou coeficiente de correlação acima de 0,99. Este teste foi realizado, pois no teste de permeação cutânea uma concentração baixa da amostra no tecido ou fase receptora poderia ser encontrada. Não foram testadas concentrações menores que 0,1 µg/mL, pois este valor já está abaixo do esperado no teste de permeação. O coeficiente de variação da amostra na concentração de 0,1 µg/mL foi 3,3 % e os demais coeficientes foram menores que 2%.

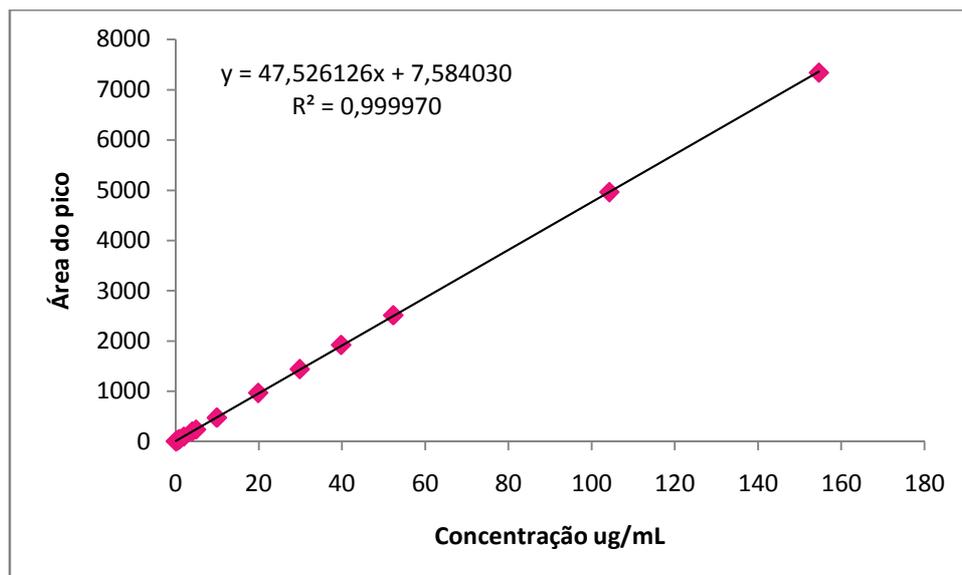


Figura 37 – Curva da analítica feita a partir de concentrações próximas ao suposto limite de quantificação.

Nota-se na figura 37, que o valor obtido do coeficiente de correlação ficou muito próximo ao obtido na análise de linearidade demonstrada na figura 36, indicando que as concentrações que foram incluídas neste teste não modificaram significativamente a resposta da concentração do analito em relação à área. Este teste demonstrou que a amostra pode ser quantificada com segurança, mesmo na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, mas conforme diminui-se a concentração do analito, o coeficiente de variação aumenta. O CV obtido na concentração mínima foi superior a 3%, mas ainda encontra-se dentro do limite especificado pela ANVISA que é de 5% (BRASIL, 2003).

A figura 38 apresenta os picos obtidos do padrão de (-)-terpinen-4-ol nas concentrações de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ que foram utilizadas na análise de limite de quantificação.

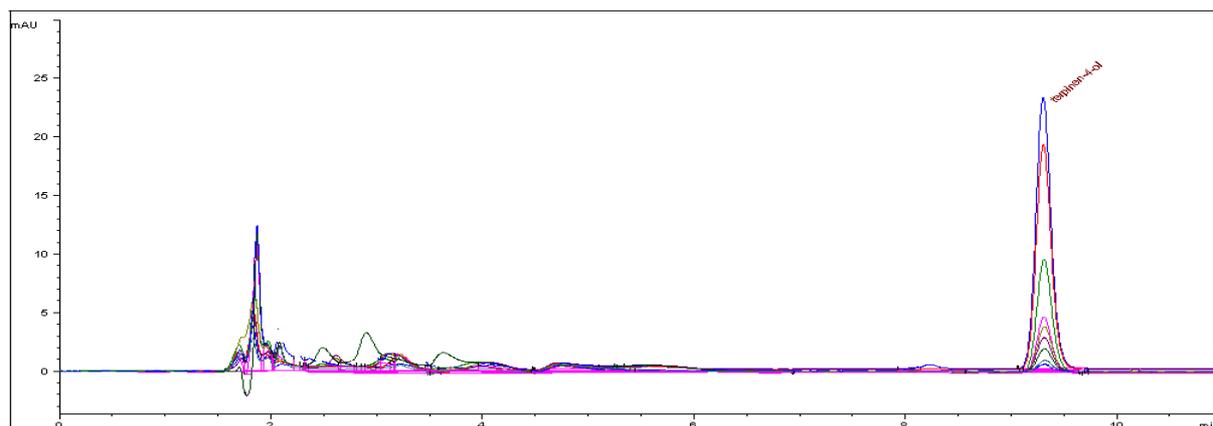


Figura 38 – Padrão do (-)-terpinen-4-ol nas concentrações de 5,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 µg/mL.

5.6.5- Exatidão

A tabela 13 apresenta os resultados encontrados na análise da exatidão do método analítico.

Tabela 13 – Valores obtidos no ensaio de exatidão

[] teórica ug/mL	Área	FR	DP	CV	CV geral	Rec	Rec Média
4,994	239,019	0,02089				99,95	
4,994	242,806	0,02057	1,82E-4	0,875		101,53	
4,994	239,288	0,02087				100,06	
48,955	2366,930	0,02068				100,68	
48,955	2382,450	0,02055	6,74E-05	0,325	0,857	101,34	100,70
48,955	2375,300	0,02061				101,04	
145,089	6948,540	0,02088				100,89	
145,089	6903,050	0,02102	6,88E-05	0,331		100,23	
145,089	6925,530	0,02095				100,55	

[] – concentração, FR – fator de resposta, DP – desvio padrão, CV – coeficiente de variação, Rec – Recuperação.

Primeiramente foi obtido o FR, dividindo a concentração teórica pela área correspondente, e calculado o coeficiente de variação. A recuperação foi calculada a partir dos resultados obtidos na curva analítica utilizando o padrão primário de (-)-terpinen-4-ol. Para obtenção da recuperação foi utilizada a equação 3.

$$\frac{AA \times [Pd] \times 100}{AP \quad [Am]} \quad \text{(equação 3)}$$

na qual:

AA = área média da amostra

AP = área média do padrão

[Pd] = concentração média teórica do padrão

[Am] = concentração média teórica da amostra

Na equação utilizada para obter a recuperação, a área da amostra é a área do padrão de (-)-terpinen-4-ol utilizada na exatidão (placebo com adição do padrão de (-)-terpinen-4-ol), a área do padrão foi considerada a área obtida na linearidade.

A tabela 13 apresenta os resultados da exatidão do método, que foram calculados a partir do FR e recuperação da amostra. Nota-se que o maior CV entre as amostras está na menor concentração (CV = 0,87%). O CV dentre as amostras nas três concentrações, foi de 0,857%. A recuperação ficou entre 99,95% e 101,53%, obtendo-se uma recuperação média de 100,7%.

5.6.6- Robustez

A robustez foi avaliada seguindo o método proposto por Yonden e Steiner (1975), sendo realizadas oito análises, variando sete parâmetros pré estabelecidos e descritos na tabela 3. O mesmo padrão e as três amostras foram submetidos aos testes 1 a 8. Os resultados estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14 – Valores obtidos na robustez utilizando método de Yonden e Steiner (1975).

Teste		Área	TEOR	Média	CV
1	padrão	2386,02			
	amostra 1	2365,90	99,95		
	amostra 2	2361,20	99,75	99,92	0,16
	amostra 3	2368,50	100,06		
2	padrão	1265,50			
	amostra 1	1237,28	98,55		
	amostra 2	1251,87	99,51	99,10	0,50
	amostra 3	1242,31	99,23		
3	padrão	1309,23			
	amostra 1	1288,02	99,16		
	amostra 2	1290,37	99,15	99,13	0,05
	amostra 3	1283,17	99,07		
4	padrão	1009,22			
	amostra 1	985,70	98,45		
	amostra 2	984,39	98,12	98,54	0,48
	amostra 3	988,98	99,05		
5	padrão	1612,8			
	amostra 1	1591,95	99,49		
	amostra 2	1591,21	99,25	99,30	0,17
	amostra 3	1582,34	99,17		
6	padrão	1809,74			
	amostra 1	1794,88	99,97		
	amostra 2	1801,16	100,12	100,14	0,18
	amostra 3	1796,21	100,32		
7	padrão	894,62			
	amostra 1	876,87	98,8		
	amostra 2	878,82	98,82	99,23	0,74
	amostra 3	885,75	100,08		
8	padrão	1017,18			
	amostra 1	1016,71	100,75		
	amostra 2	1021,09	100,98	100,91	0,14
	amostra 3	1016,35	101		

CV – coeficiente de variação

O teor foi calculado utilizando a equação 3.

A tabela 15 apresenta os resultados finais da análise de robustez. Foi colocado ao lado da variável (representado pelas letras A até G em maiúsculo e minúsculo) a média dos teores obtidos nos testes de 1 a 8 que utilizaram a variável em questão. Os valores da última coluna foram obtidos pela diferença entre os parâmetros, desconsiderando o sinal, (“A” menos “a”, por exemplo), indicando qual o parâmetro que interfere mais ou menos na análise, em função do número obtido. O maior valor obtido na última coluna significa que o parâmetro avaliado é o que mais interfere.

Para avaliar a significância dos resultados e verificar se o método é robusto, é necessário que o efeito de cada variável (observado na última coluna da tabela 15), seja menor do que o efeito maior, calculado da seguinte forma: desvio padrão dos oito resultados multiplicado pela raiz de dois (1,055).

Tabela 15 - Resultados finais obtidos na análise de robustez

Coluna Cromatográfica	A: XDB C18	A	99,17	0,73
	a: ODS C18	a	99,90	
Comprimento de onda	B: 200 nm	B	99,61	0,16
	b: 205 nm	b	99,45	
Vazão da fase móvel	C: 1,0 mL/minuto	C	99,39	0,28
	c: 1,3 mL/minuto	c	99,67	
Proporção da fase móvel	D: 55:45 (ACN:H ₂ O)	D	99,79	0,51
	d: 60:40 (ACN:H ₂ O)	d	99,28	
Volume de injeção	E: 30 µL	E	100,02	0,98
	e: 20 µL	e	99,04	
Temperatura do forno	F: 25°C	F	99,67	0,27
	f: 30°C	f	99,40	
Tempo de extração	G: 15 minutos	G	99,46	0,15
	g: 30 minutos	g	99,61	

Verifica-se na tabela 15 que o fator que mais interfere na análise é o “E” (“E” e “e”), que corresponde ao volume de injeção (tabela 3). Nota-se que quando o volume de injeção é diminuído para 20 µL, o teor diminuiu 0,98 em relação ao volume de injeção utilizado na análise com 30 µL. Outro fator que teve uma influência maior foi a coluna, apresentando um aumento de 0,73 do teor. As duas colunas são C18, do mesmo fabricante, tem o mesmo comprimento e tamanho de

partículas, o que difere é a disposição das partículas (XDB ou ODS). Este teste mostra que a troca da coluna é um fator que pode influenciar na análise. Em terceiro lugar encontra-se a influência da mudança de polaridade da fase móvel. O aumento da fração orgânica, pode diminuir o teor em 0,51. Os dois parâmetros que menos interferiram na análise foram o “B” e “G”, referentes ao comprimento de onda e tempo de extração (tabela 3), respectivamente.

Foram obtidos os parâmetros que mais influenciaram na análise, mas foi possível verificar que o método é robusto, pois todos os desvios entre as variáveis do mesmo parâmetro, verificados na última coluna apresentaram valores menores que 1,055.

5.7. LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *in vitro*

5.7.1. Liberação *in vitro*

O método escolhido para realização deste ensaio foi baseado na metodologia utilizada por Nielsen (2006) considerando-se o resultado obtido no teste de solubilidade e as condições do nosso laboratório. Como apresentado na tabela 16, o terpinen-4-ol tem solubilidade significativamente superior em meio contendo NaCl 0,9% em relação ao meio tampão fosfato 0,01M, pH 7,4; sendo que os dois meios tinham a mesma quantidade de tensoativo utilizado para aumentar a solubilidade de amostras lipofílicas em meios receptores aquosos. Nielsen (2006) utilizou o meio contendo NaCl 0,9% com adição de 1% de Tween[®] 80, em contraposição ao meio mais comumente utilizado que é o tampão fosfato pH 7,4. Por essa razão foi feito o teste de solubilidade em ambos os meios. Verificou-se que a solubilidade em tampão fosfato pH 7,4 é menor, o que comprometeria a condição *sink* durante o ensaio de permeação.

Tabela 16 - Resultado da porcentagem solúvel nos meios receptores testados.

TESTE SOLUBILIDADE	ÁREA	[] FINAL ug/mL	%
NaCl 0,9% + 1 % tween [®] 80	926,34	19,96	99,80
T fosfato 0,01M + 1% tween [®] 80	691,3	14,64	73,22

Após seleção do meio mais adequado, a solução de NaCl 0,9% com 1% de Tween 80 foi injetada em CLAE, nas condições previamente validadas, para verificar a influência da fase receptora na análise do terpinen-4-ol. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 39.

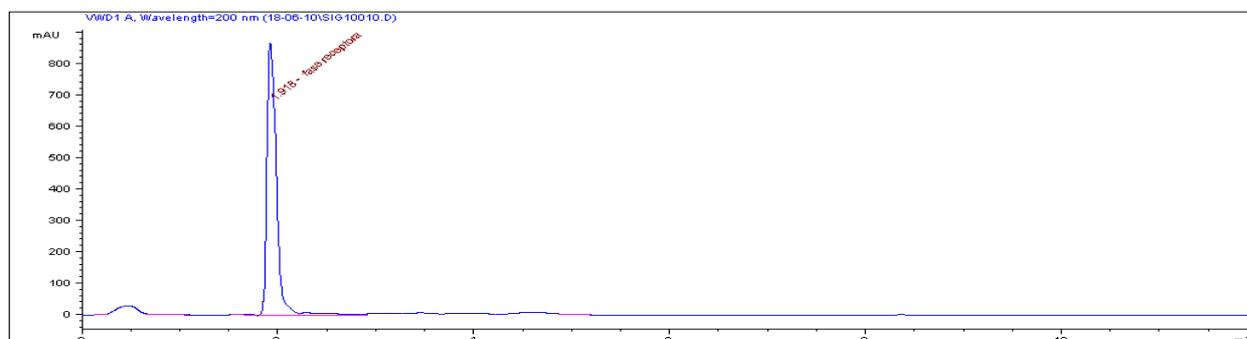


Figura 39 - Injeção do meio receptor selecionado em CLAE, utilizando as mesmas condições do método previamente validado.

Verifica-se na figura 39 que o meio receptor não influencia as análises, pois não se observa o aparecimento de pico interferente no mesmo tempo de retenção do princípio ativo.

Na figura 40 observa-se o cromatograma obtido da solução receptora com adição do padrão.

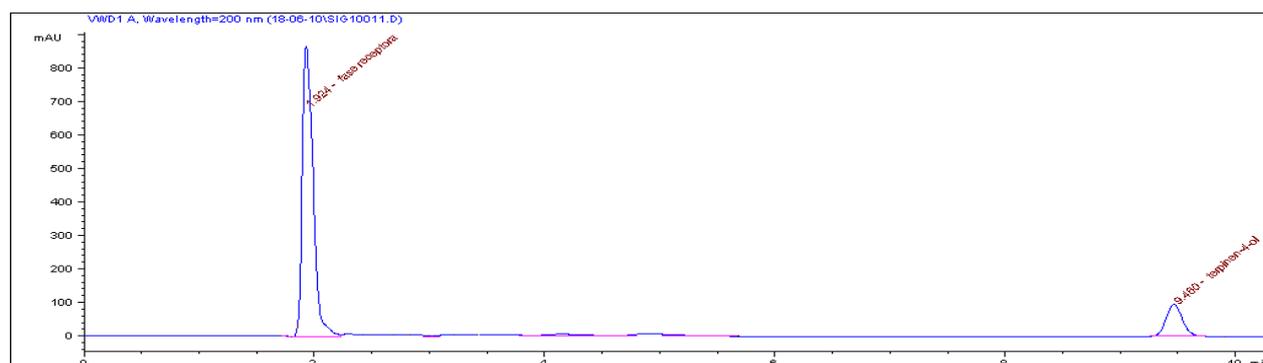


Figura 40 – Injeção do meio receptor com adição do padrão (20 µg/mL) de terpinen-4-ol selecionado em CLAE, utilizando as mesmas condições do método previamente validado.

O ensaio de liberação foi feito para verificar se a formulação é capaz de liberar o princípio ativo e verificar a quantidade liberada em um intervalo específico de tempo, de modo a caracterizar o sistema quanto ao modelo cinético de liberação.

As duas formulações foram desenvolvidas com 1% de (-)-terpinen-4-ol. Os resultados encontrados estão apresentados nas tabelas 17 e 18 e figuras 41 a 43.

Tabela 17 - Liberação do terpinen-4-ol na formulação F1

Tempo (h)	Média Q real $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	%	CV%
1	21,00	1,38	7,04
2	37,11	2,43	3,90
4	69,18	4,53	3,08
6	90,16	5,91	2,21
8	110,15	7,22	2,29
12	189,04	12,39	4,00

Tabela 18 - Liberação do terpinen-4-ol na formulação F2

Tempo (h)	Média Q real $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	%	CV%
1	10,45	0,69	4,08
2	18,68	1,22	7,03
4	30,58	2,00	4,29
6	39,45	2,59	2,91
8	46,64	3,06	4,65
12	89,50	5,87	1,63

A quantidade real permeada em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ foi calculada utilizando-se a equação 1 descrita no item 5.6, tendo-se calculado a média e o coeficiente de variação. Esta tabela também apresenta a porcentagem que permeou por cm^2 , em relação à quantidade de amostra e concentração do princípio ativo presente no anel dosador no teste de liberação.

Os valores obtidos para o coeficiente de variação (CV) do ensaio de liberação das formulações F1 e F2 estão dentro das especificações, ou seja, a variação entre as amostras são menores que 10% (tabela 17 e 18).

As figuras 46 a 48 apresentam o valor do fluxo na liberação e foi feita a comparação entre os resultados empregando-se diferentes modelos aplicados à cinéticas de liberação, com o intuito de identificar o modelo cinético de liberação dos

diferentes sistemas e verificar qual o modelo mais adequado. O valor do fluxo foi obtido a partir do coeficiente angular (a) da reta de regressão dos pontos do modelo aplicável à formulação.

A avaliação do modelo de cinética de liberação mais adequado foi feito a partir da aplicação do modelo de cinética de liberação de zero ordem (figura 41), utilizando o Q real $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em função do tempo; modelo de cinética de liberação de primeira ordem (figura 42), empregando-se a relação logarítmica da porcentagem de fármaco retido em função do tempo e aplicação do modelo de cinética de liberação de Higuchi (figura 43), relacionando-se a quantidade de substância liberada em função da raiz quadrada do tempo.

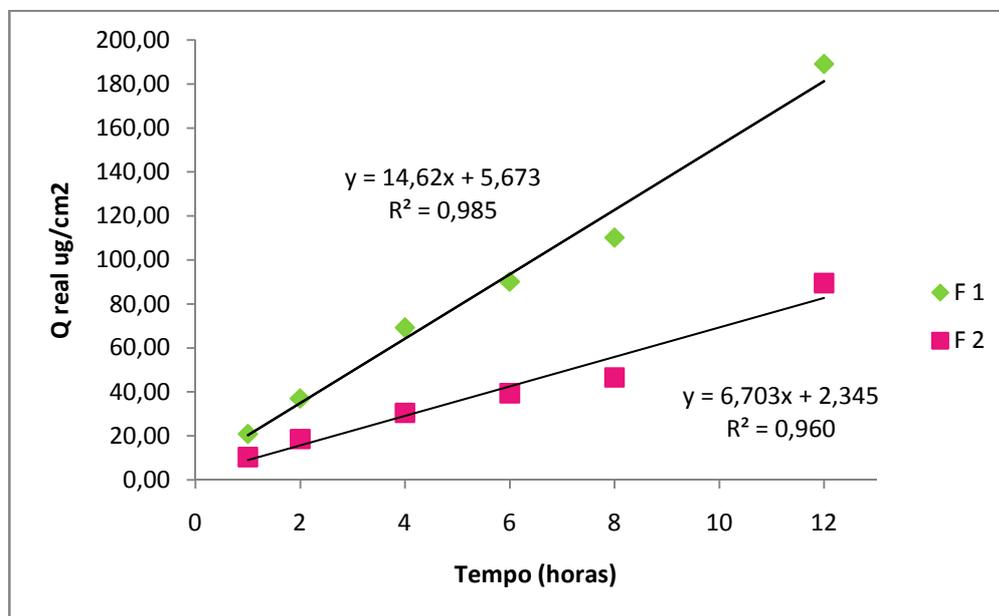


Figura 41 – Modelo de cinética de liberação de zero ordem

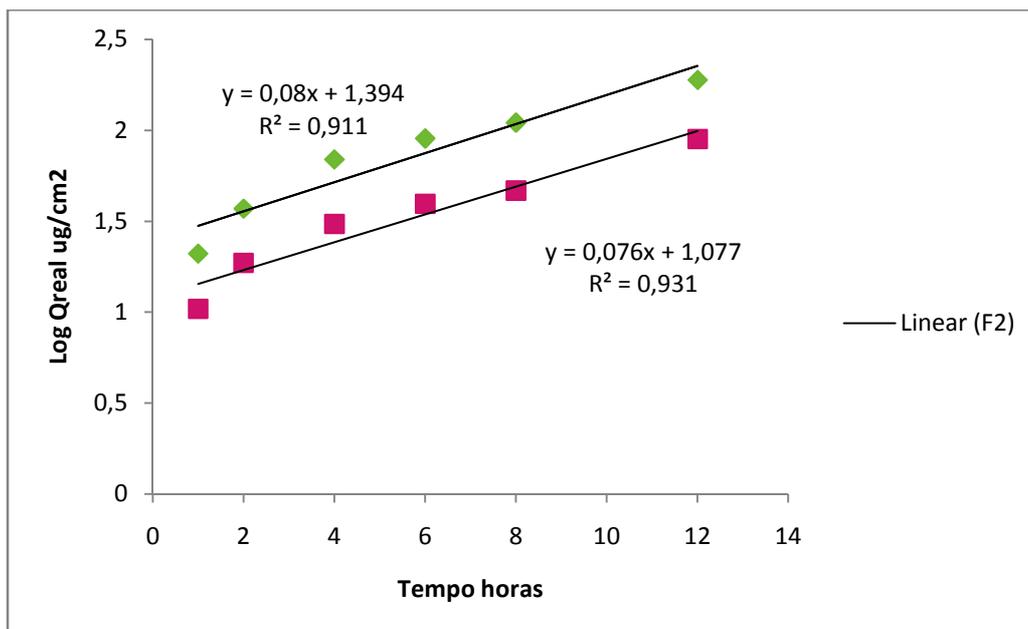


Figura 42 – Modelo de cinética de liberação de primeira ordem

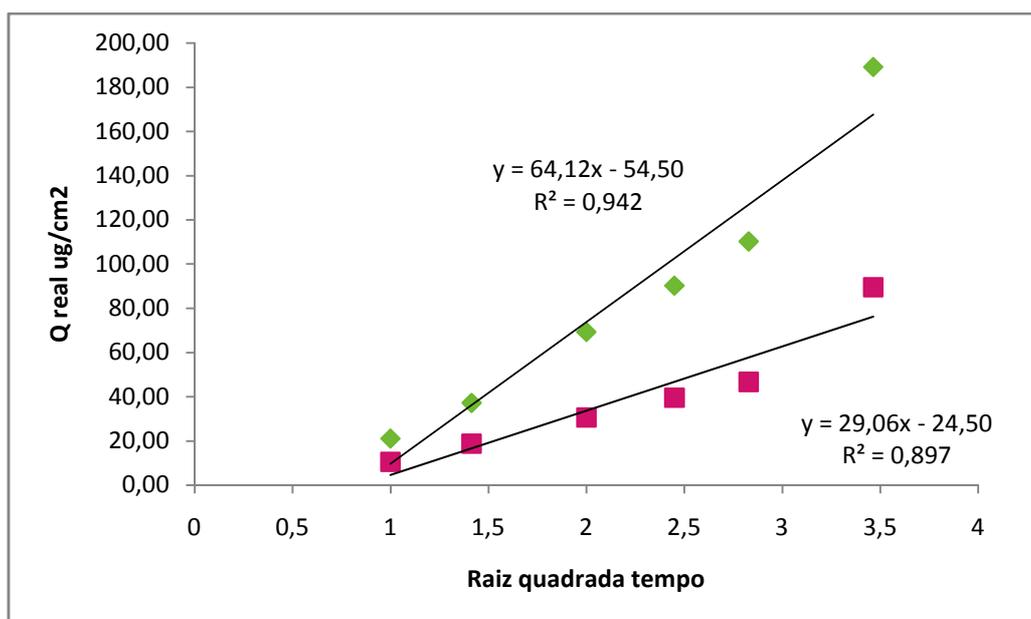


Figura 43 – Modelo de cinética de liberação com aplicação da equação de Higuchi

Conforme observa-se na figura 41, o modelo cinético de liberação mais adequado para a liberação do terpinen-4-ol das duas formulações é o modelo de zero ordem, na qual foram obtidos os melhores valores de R^2 , ou seja, mais próximos de 0,99. Este modelo sugere que a velocidade de liberação ocorre em uma velocidade constante, sendo independente da concentração do fármaco. Esta velocidade constante é altamente desejável na liberação de fármacos, pois significa

que a mesma quantidade de fármaco é liberado por unidade de tempo. Esta cinética é aplicada com frequência nos processos em que as substâncias são continuamente repostas por difusão, considerando que foi adicionada uma quantidade infinita de formulação (AULTON, 2005; SINKO, 2008)

O fluxo (J) obtido para a formulação F1 foi de 14,62 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e para a formulação F2 foi 6,703 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Isto demonstra que o terpinen-4-ol é mais facilmente liberado da formulação F1, tendo uma velocidade de liberação aproximadamente duas vezes maior do que a obtida na formulação F2.

O teste de liberação *in vitro* também indica a uniformidade de doses de formulações semi sólidas, portanto presume-se que as duas formulações avaliadas estão uniformes, devido ao coeficiente de variação dentro das especificações.

5.7.2. Permeação e retenção cutânea *in vitro*

Os ensaios de permeação e retenção cutânea foram realizados utilizando-se as mesmas condições do teste de liberação.

Nas tabelas 19 e 20 encontram-se os resultados da quantidade real permeada, a porcentagem em relação à quantidade de principio ativo que foi colocada no teste e o coeficiente de variação (CV) para as formulações F1 e F2, respectivamente.

Tabela 19 – Permeação cutânea do (-)terpinen-4-ol na formulação 1

Tempo (horas)	MÉDIA Q real $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	%	CV %
1	8,28	0,54	9,56
2	16,14	1,06	9,63
4	28,99	1,90	7,15
6	44,01	2,88	9,49
8	59,65	3,91	9,35
12	105,63	6,92	5,65

CV% = Coeficiente de variação percentual

Tabela 20 – Permeação cutânea do (-)terpinen-4-ol na formulação 2

Tempo (horas)	MÉDIA Q real $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	%	CV %
1	5,05	0,33	4,39
2	11,65	0,76	4,79
4	20,87	1,37	6,69
6	31,34	2,05	2,93
8	42,79	2,80	4,55
12	77,66	5,09	5,07

CV% = Coeficiente de variação percentual

Os coeficientes de variação (CV) apresentaram um valor menor que 10% (tabela 19 e 20), sendo considerado excelente, já que o limite especificado para esta análise é de no máximo 30% (SCCP,2006). O CV é maior para o teste de permeação, pois estamos trabalhando com membranas naturais nas quais ocorrem variações que não são consideradas no teste de liberação. Segundo Sanco (2004) a utilização de membranas naturais de pele de orelha de porco aumenta o desvio na análise de permeação. Há variação de animal para animal, além disso, a pele é uma multicamada com tamanhos e características de absorção específica, é um tecido vivo e, como tal suas características de absorção são suscetíveis a mudanças constantes.

A figura 44 apresenta as curvas da quantidade real permeada em relação ao tempo das coletas das formulações F1 e F2.

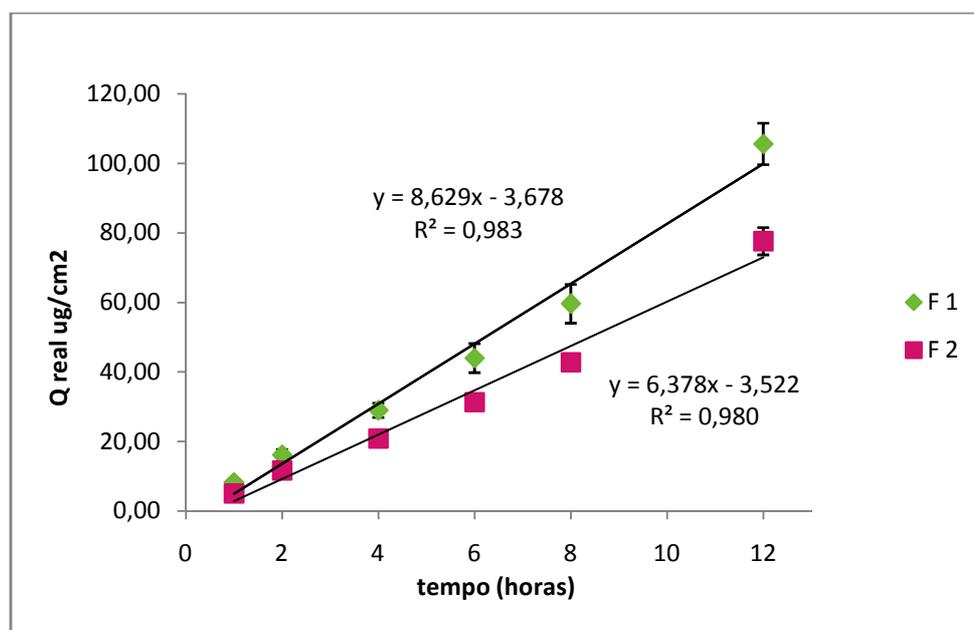


Figura 44 – Curvas da permeação cutânea das formulações 1 e 2, com as respectivas equações.

Como pode ser observado na figura 44, o fluxo (J) obtido para a formulação F1 foi de 8,629 ug/cm²/h e para a formulação 2 foi 6,378 µg/cm²/h. A F1 permeou em uma velocidade mais rápida, mas o fluxo de ambas formulações estão bem próximos.

Sugere-se que a formulação F2 é liberada do sistema com velocidade independente da membrana utilizada, pois os resultados obtidos com membrana sintética (liberação) e com membrana natural (permeação) foram semelhantes, o que pode indicar que a velocidade de permeação e liberação é dependente do sistema, que controla a liberação do princípio ativo na solução receptora. Para essa formulação pode-se considerar que o sistema é o fator limitante para a liberação e permeação do fármaco.

O fluxo da formulação 1 é dependente da membrana, pois na liberação obteve-se um valor maior de fluxo. Verificou-se que a F1 é capaz de liberar o princípio ativo, mas na presença da membrana natural o valor obtido de fluxo é menor. Para essa formulação a permeação provavelmente é controlada por outros fatores que podem estar relacionados com as características da pele e não com a matriz empregada.

Sugere-se que um dos fatores que podem ter influenciado a maior permeação da formulação F1, foi a presença de propilenoglicol que é considerado um promotor

de absorção. A quantidade de propilenoglicol utilizada na formulação 1 foi maior que na formulação 2. (FANG *et al*, 1995; SANCO, 2004).

As interações entre o fármaco e o veículo utilizado também são de suma importância na absorção cutânea, sendo a liberação do fármaco no veículo o fator limitante para a velocidade de penetração. Existe também a limitação da permeação pelo estrato córneo, mas que não pode ser considerado fator determinante na permeação. Os sistemas de liberação prolongada tem a capacidade de controlar o processo no qual o fármaco deixa a forma farmacêutica (AULTON, 2005).

As figuras 45 e 46 demonstram os valores obtidos no teste de retenção cutânea das duas formulações, no estrato córneo e epiderme mais derme viável.

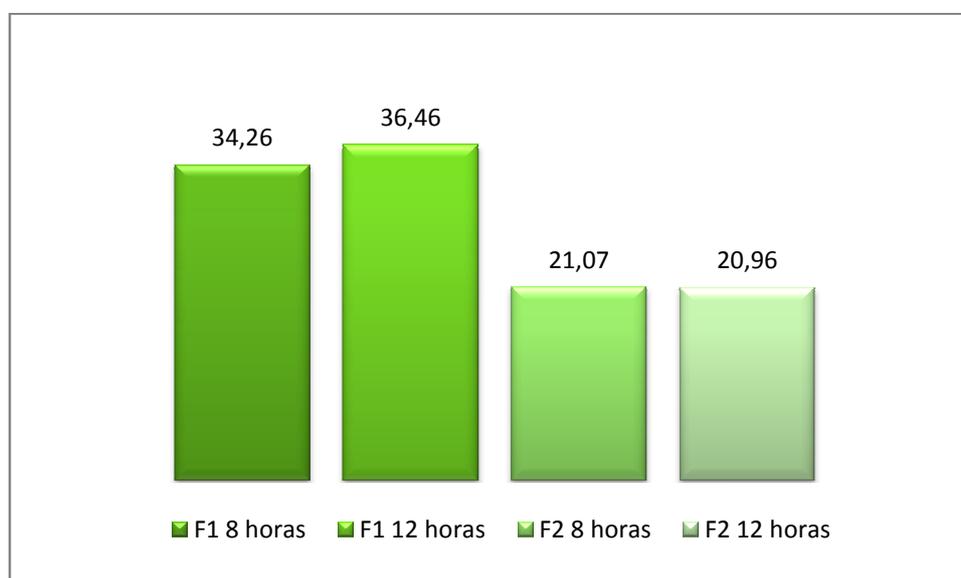


Figura 45 – Retenção cutânea das formulações 1 e 2 na epiderme e derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

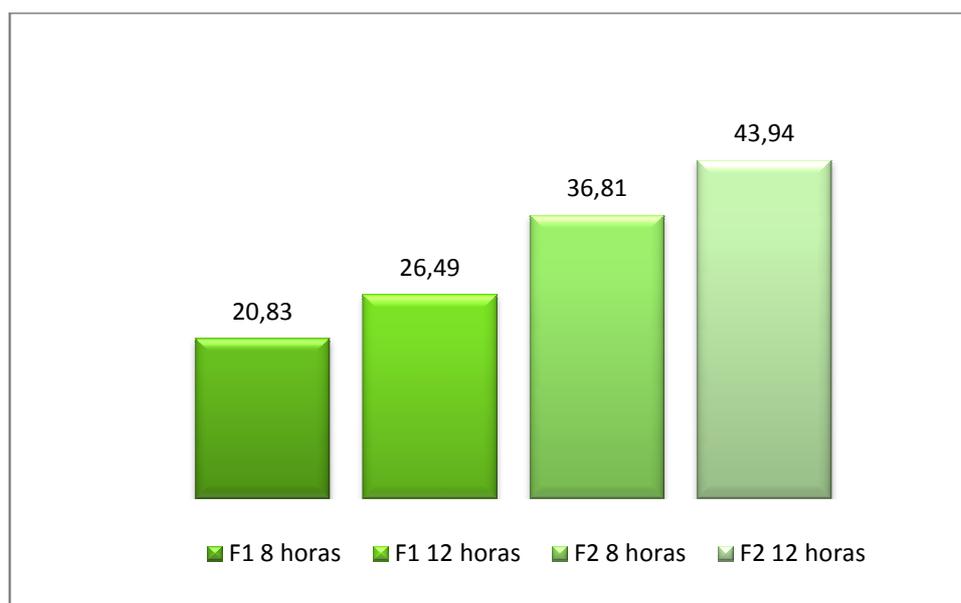


Figura 46 – Retenção cutânea das formulações 1 e 2 no estrato córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Na retenção cutânea o coeficiente de variação ficou entre 10 e 28%. Segundo o SCCP, (*Scientific Committee on Consumer Products*, 2006), os resultados dos estudos de absorção cutânea devem ser reprodutíveis, utilizando-se um mínimo de seis amostras e o coeficiente de variação deve ser inferior a 30%. O coeficiente de variação no teste de retenção é maior do que no teste de liberação porque as espessuras da camada córnea, epiderme e derme são variáveis, promovendo assim, variações na permeabilidade cutânea. (AULTON, 2005).

A figura 45 mostra que a formulação 1 apresentou uma retenção média na epiderme e derme viável 68% maior que a formulação 2. Portanto a concentração da formulação 1, que atingiu as camadas mais profundas da pele, foi superior. Os valores obtidos para ambas as formulações foram semelhantes nos tempos de 8 e 12 horas. Isto sugere que a formulação provavelmente atingiu a concentração máxima de sua retenção nestas camadas, sendo o restante absorvido ou acumulado no estrato córneo.

O perfil de retenção no estrato córneo pode ser observado na figura 46, e verifica-se que a formulação 1 ficou menos retida nesta camada do que a formulação 2, sendo 43% menor em 8 horas e 40% menor em 12 horas.

O gradiente de retenção na epiderme e derme do terpinen-4-ol da F1 foi maior, já o princípio ativo da F2 tem maior capacidade de ficar retida no estrato córneo.

Outra consideração importante é que as formulações em contato com a pele penetram o estrato córneo (quando não evapora ou é colocado fora da área desejada) e pode chegar posteriormente à epiderme viável, a derme e a rede vascular. Durante o processo de absorção, o composto também pode estar sujeito a biotransformação, fato que não pode ser avaliado no ensaio *in vitro*.

O estrato córneo é a maior barreira para compostos hidrofílicos, enquanto a epiderme viável oferece mais resistência aos compostos altamente lipofílicos. O que pode explicar a maior retenção do composto ativo que estava presente na F1, que é mais hidrofílica, nas camadas mais profundas. E, conseqüentemente o terpinen-4-ol presente na formulação F2, ficou mais retido no EC, devido à característica lipofílica da formulação e do princípio ativo. Os fatores que influenciam a penetração no estrato córneo podem ser as propriedades físico-químicas da substância, o tipo e a composição da formulação, a oclusão, a concentração da substância na formulação, local da aplicação, aspectos técnicos do respectivo teste *in vitro*, entre outros (SANCO, 2004; SPPC, 2006).

O fármaco apresenta características mais lipofílicas, portanto tem maior afinidade pela formulação F2. A liberação maior da F1, sugere que a menor afinidade por esta emulsão (hidrofílica), pode estar facilitando sua saída da formulação.

Dados da literatura (GODWIN, 1999) relatam a capacidade dos terpenos, incluindo o terpinen-4-ol, em aumentar a penetração de fármacos hidrofílicos. Esse autor mostrou que a combinação de terpinen-4-ol e propilenoglicol aumentam significativamente a penetração de três fármacos diferentes, e sugeriu que o mecanismo de ação dos terpenos na penetração transdérmica envolve a ruptura dos lipídios intercelulares de estrato córneo, aumentando assim a difusão de fármacos hidrofílicos nesta camada. Contudo, seria extremamente interessante a avaliação da penetração destas três substâncias somente em propilenoglicol, uma vez que este componente também é considerado um promotor de absorção.

Nielsen (2006) avaliou a influência da permeação *in vitro* do óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO) sob a penetração do ácido benzóico e o metiocarbe. Seus resultados demonstram que somente os compostos menos lipofílicos (menor log P) do TTO penetraram, incluindo o terpinen-4-ol; que o TTO a 1% não afeta as condições de integridade da membrana, e na concentração de 5% demonstra que pouca alteração foi observada na integridade da membrana. Demonstrou que o TTO

reduz o fluxo de permeação do ácido benzóico, mesmo na concentração de 1% e afeta o fluxo do metiocarbe a partir da concentração de 5%.

Por outro lado, deve-se ter cautela quando se faz comparação dos resultados, e os dados obtidos nas duas pesquisas citadas não podem ser extrapolados, considerando-se que, Cox (2001), sugeriu que a presença de outros componentes do TTO pode limitar a disponibilidade do terpinen-4-ol.

Cross e colaboradores (2008) avaliaram a permeação do TTO puro e em solução alcoólica a 20% em sistemas sem oclusão ou com oclusão parcial. Em seus ensaios utilizou pele humana tratada pela técnica de separação por calor, obtendo-se somente a epiderme. A fase receptora empregada foi tampão fosfato pH 7,4 com adição de 4% de albumina sérica bovina, para aumentar a solubilidade deste composto no tampão, temperatura do banho circulante de 35°C, dose finita de 10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ e coletas até 24 horas. Os seguintes resultados foram obtidos quando analisados o sistema sem oclusão: TTO puro permeou na média $206,4 \pm 78,2$ $\mu\text{L}/\text{cm}^2$, ou 3,6 a 8 % da dose aplicada, em 24 horas. O TTO 20% em etanol permeou na média $24,3 \pm 11,3$ $\mu\text{L}/\text{cm}^2$, ou 1,1 – 1,9 % da dose aplicada, em 24 horas. Verifica-se que o coeficiente de variação foi relativamente alto, sendo 38% e 47%, respectivamente. O Comitê Científico de Produtos Consumíveis (SCCP, 2006) recomenda um CV menor que 30%, garantindo assim a reprodutibilidade do método.

Nos ensaios realizados neste trabalho, a F1 em um período de 12 horas permeou na média $105,63$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, com CV% inferior a 10%, considerando que o terpinen-4-ol estava na concentração de 1 %. O valor obtido na permeação para esta emulsão foi de aproximadamente 7% do terpinen-4-ol que foi colocado no anel dosador (dose infinita). Em nosso ensaio foi obtido um valor de permeação em 12 horas semelhante ao encontrado por Cross em 24 horas de exposição, (valor em porcentagem de dose aplicada), entretanto, o CV% encontrado neste trabalho foi muito menor do que o obtido por estes autores. Além disso, a recuperação obtida por Cross e colaboradores (2008) no sistema parcialmente ocluído foi baixa, com valores entre 25 e 30% para o terpinen-4-ol.

O coeficiente de variação e a recuperação da permeação realizada por Cross e colaboradores (2008), sugerem que alguns fatores, como a utilização do TTO puro e em solução, a fase receptora utilizada, a membrana sem a derme viável podem estar influenciando na permeação cutânea realizada por estes pesquisadores. Neste mesmo trabalho os valores obtidos na retenção da epiderme foram

significativamente inferiores aos nossos e ainda apresentaram um CV% acima do permitido pela SCCP para o sistema sem oclusão ou parcialmente ocluído demonstrados no trabalho. Sugere-se que a utilização apenas da epiderme pode ter influenciado neste teste. É interessante avaliar também, que o uso da dose finita é dependente da dose aplicada e da sua área de exposição, enquanto a dose infinita apresenta o mesmo perfil de permeação independente da área de aplicação (Corbo, 1993).

Cal (2008) discute a influência de diferentes modelos experimentais e resultados que foram obtidos na permeação realizada por diferentes pesquisadores, e comenta que nunca encontrou o terpinen-4-ol na fase receptora. O fato é que este pesquisador utiliza a pele com espessura total, o que pode estar dificultando a passagem do princípio ativo. Segundo SCCP, 2006, a utilização de pele com espessura total só deve ser realizada quando necessária e seu uso deve ser justificado. A absorção do TTO na formulação de hidrogel, no ensaio *in vitro* realizado por este autor, foi a que obteve maior resultado, corroborando com nossos resultados, onde a formulação mais hidrofílica (F1), permeou mais, e ficou mais retida na epiderme e derme (Cal, 2006 a).

Reichiling (2006) é bastante criticado pelo sistema utilizado na permeação, com 50% de etanol na fase receptora, o que pode interferir na integridade da membrana e não representa as condições fisiológicas (CROSS, 2008; Cal, 2008). Ao se comparar a absorção das formulações que ele utilizou, desconsiderando os valores exatos, verifica-se que a emulsão O/A teve o maior fluxo na epiderme, pois dentre as formulações testadas era a mais aquosa, assim mantendo o estrato córneo hidratado e facilitando a penetração na pele, e o creme apresentou menor taxa de liberação. Isto também foi verificado em nosso trabalho, sendo que a formulação 1, mais aquosa, permeou mais que a formulação 2.

Devido à discrepância dos dados obtidos na permeação *in vitro* por diferentes autores que utilizaram diferentes metodologias, é necessário, a avaliação da permeação cutânea e retenção nas camadas mais profundas da pele em ensaios *in vivo*. Cal, 2006 b, fez este teste *in vivo*, porém só foi avaliada a retenção no EC.

5.7.3. Validação da permeação e retenção cutânea *in vitro*

Para validar a metodologia de permeação e retenção cutânea que foi empregada neste trabalho, injetou-se a fase receptora selecionada e o solvente extrator.

O solvente de extração utilizado na retenção cutânea foi a acetonitrila, pois o metanol quando injetado em CLAE no comprimento de onda de 200 nm, utilizado para quantificação do terpinen-4-ol, apresentou um pico no mesmo tempo de retenção do princípio ativo. Como solventes extratores foram testados o etanol e a acetonitrila, sendo que o etanol quando injetado não interferiu no pico, mas na presença da fita adesiva utilizada para o *tape stripping*, apresentou um desvio na linha de base, que dificultou a integração do pico do princípio ativo (figura 49). A acetonitrila foi considerada mais adequada como solvente para a extração do ativo na pele de orelha de porco, tanto para o *tape stripping* quanto para a extração em homogeneizador tipo Turrax[®] das camadas da pele sem o estrato córneo (EC), não interferindo no pico do princípio ativo, como pode ser observado na figura 50. As figuras 47 e 48 apresentam as injeções realizadas em CLAE dos solventes propostos para extração do terpinen-4-ol que ficou retido na pele.

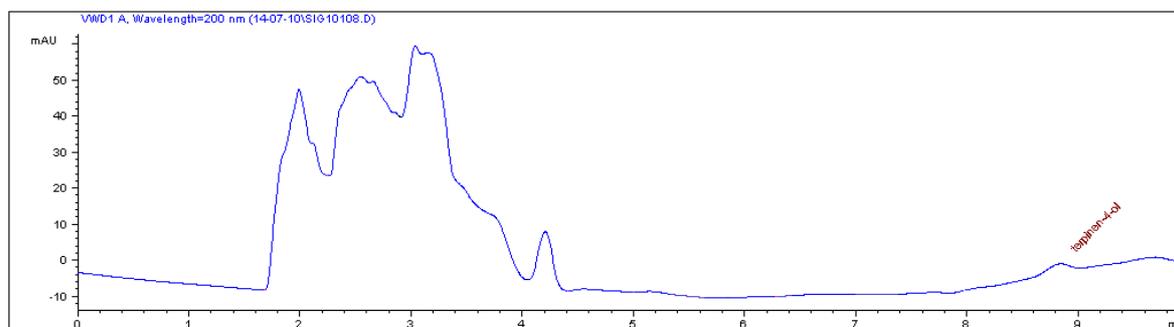


Figura 47 – Injeção em CLAE da retenção do terpinen-4-ol no EC, extração com etanol.

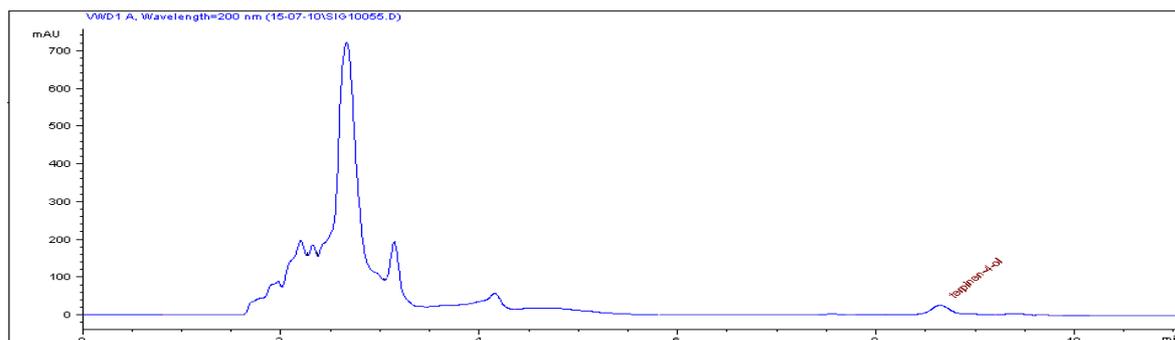


Figura 48 – Injeção em CLAE da retenção do terpinen-4-ol no EC, extração com acetonitrila.

A fase receptora também foi injetada e não apresentou picos no mesmo tempo de retenção do terpinen-4-ol, como pode-se observar na figura 49.

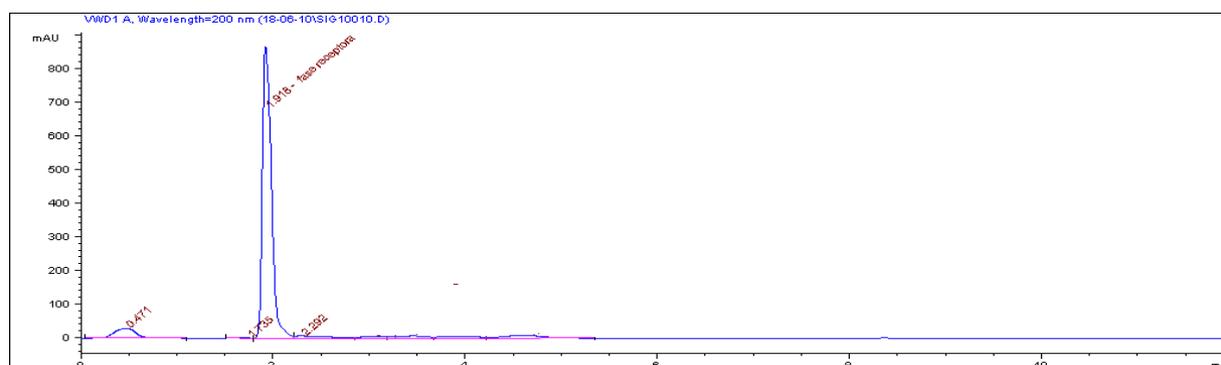


Figura 49 – Injeção em CLAE da fase receptora.

Durante a validação também foi analisada a interferência do placebo neste ensaio, sendo adicionado em uma das células o placebo das formulações. Os cromatogramas apresentados nas figuras 50 e 51 demonstram que o placebo na presença da fase receptora e em contato com a pele, também não interferiu na quantificação do terpinen-4-ol quando analisado por CLAE.

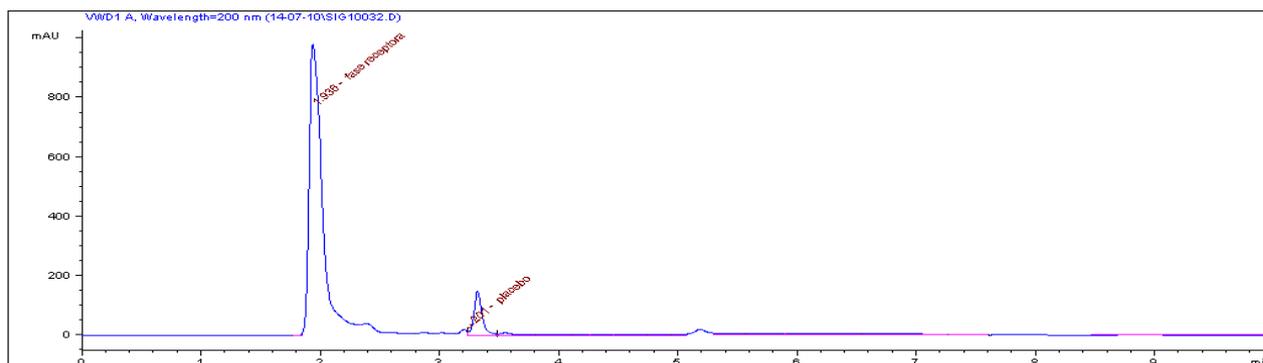


Figura 50 – Cromatograma obtido em CLAE, injeção da alíquota da fase receptora após a permeação cutânea na célula que continha o placebo da F1.

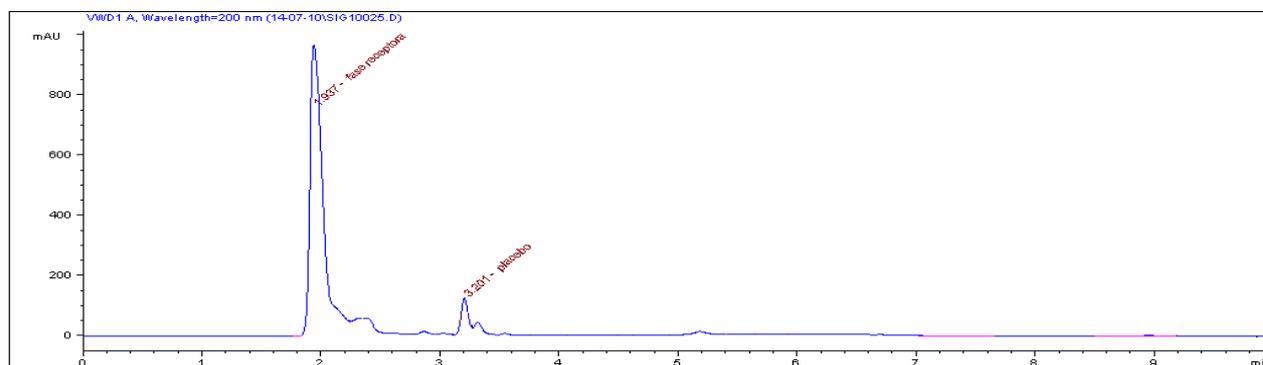


Figura 51 – Cromatograma obtido em CLAE, injeção da alíquota da fase receptora após a permeação cutânea na célula que continha o placebo da F2.

O estrato córneo e a epiderme mais derme também não interferiram na análise do princípio ativo utilizando-se o método desenvolvido e previamente validado por CLAE. Fato observado na figura 52 3 53, cujos cromatogramas não apresentam nenhum pico no mesmo tempo de retenção do fármaco.

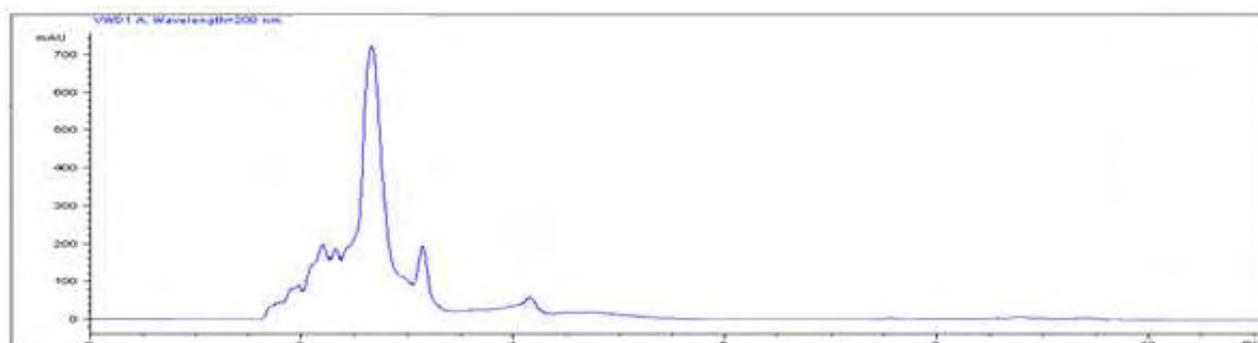


Figura 52 – Injeção do estrato córneo, fita adesiva e acetonitrila.

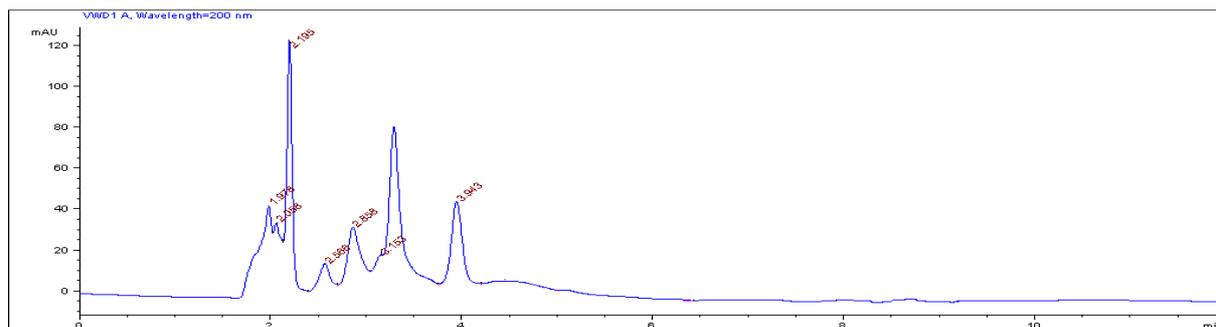


Figura 53 – Injeção da epiderme mais derme em acetonitrila.

Os resultados obtidos da linearidade do fármaco no meio receptor estão na figura 54.

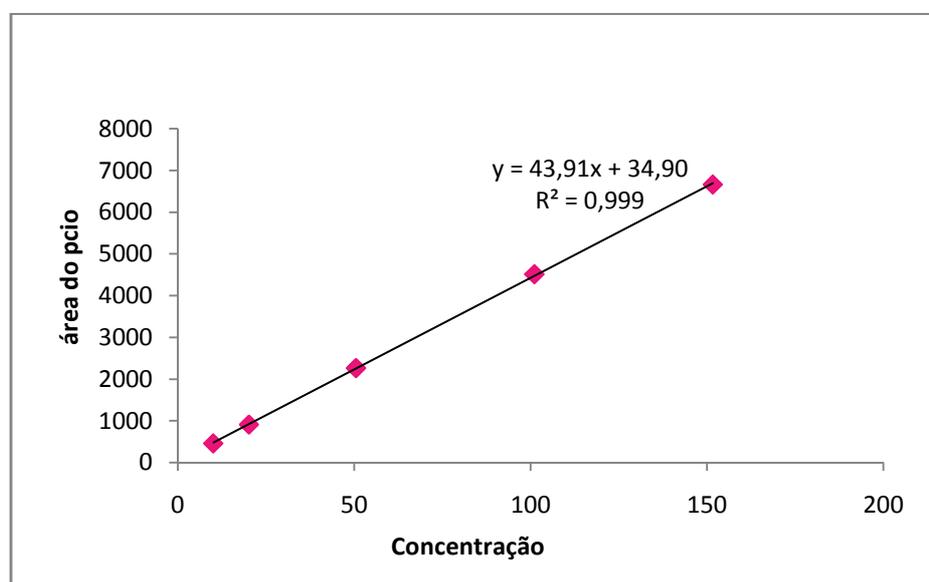


Figura 54 - Curva analítica do (-)-tepinen-4-ol utilizando-se como solvente o meio receptor, equação da reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (R^2).

Observando a figura 54 é possível notar que a resposta da área do pico é linear em relação a concentração do fármaco utilizada. Obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,999.

Os resultados da recuperação nas três concentrações avaliadas estão na tabela 21.

Tabela 21 – Resultados encontrados para recuperação do terpinen-4-ol no estrato córneo e epiderme mais derme.

	[] adicionada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	[] encontrada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Rec (%) EC
EC	30,8	29,92	97,14
EC	50,3	48,82	97,05
EC	102,2	97,50	95,40
E + D	25,8	23,67	91,74
E + D	53,4	49,12	91,98
E + D	101,3	95,15	93,93

Na tabela 21, a sigla EC significa estrato córneo, E + D, é a epiderme mais derme, obtida após a retirada do estrato córneo, e Rec é a recuperação obtida em cada amostra. A recuperação média obtida no estrato córneo foi de 96,5% e na epiderme mais derme foi de 92,55.

6. CONCLUSÕES

Foram avaliados o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, (-) e (+) terpinen-4-ol em células *in vitro* para verificar a atividade antiproliferativa.

A atividade obtida com (-)-terpinen-4-ol foi mais satisfatória para inibição de células do melanoma (UACC-62).

A partir deste resultado foram desenvolvidas duas formulações contendo 1% de (-)-terpinen-4-ol para uso tópico propostas para o tratamento do melanoma e comprovada a qualidade.

As formulações mostraram-se estáveis fisicamente após o teste de estabilidade preliminar realizados por 15 dias consecutivos, não havendo alterações no aspecto e características físicas avaliadas.

Os estudo físico-químico, realizado na estabilidade acelerada, tendo as amostras submetidas a situações extremas de temperatura, foi importante para verificarmos os aspetos físicos, que haviam sido avaliados previamente, e ainda a quantificação do princípio ativo, e verificar a concentração do princípio ativo depois de 6 meses de exposição. As duas formulações foram aprovadas neste teste.

As formulações também obtiveram resultados satisfatórios na avaliação de estabilidade microbiológica, sendo possível concluir que estão de acordo com as exigências da legislação sanitária vigente para produtos não estéreis.

A reologia foi utilizada para verificar o comportamento das duas formulações frente a condições de cisalhamento, sendo uma ferramenta importante e ainda, possibilitou a verificação das viscosidades que apresentaram resultados semelhantes entre as duas formulações, porém com as áreas de histereses diferentes.

O método proposto para quantificar o terpinen-4-ol por CLAE mostrou-se adequado, obtendo-se valores satisfatórios de linearidade, especificidade, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Ambas formulações apresentaram resultados satisfatórios em todas as análises realizadas, mas para o objetivo proposto os estudos de liberação, permeação e retenção cutânea foram essenciais para concluir qual a formulação mais adequada.

Para a liberação verificou-se que a F1 apresenta uma velocidade (fluxo) de liberação em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ maior do que a F2.

Na permeação o fluxo obtido foi semelhante, e os resultados obtidos com a formulação F1 na retenção cutânea se mostraram mais interessantes, pois verificou-

se uma maior retenção da emulsão nas camadas mais profundas da pele (epiderme + derme), onde está localizado o tumor.

É interessante a continuidade deste projeto com a realização de estudos farmacológicos *in vivo*, sendo que o teste de retenção servirá de parâmetro para estabelecer a dose que será utilizada no teste *in vivo*; avaliação da toxicidade e estudos clínicos; com a finalidade de comprovar a segurança e eficácia do produto desenvolvido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2º ed., Porto Alegre: Artmed, p.677, p.115, 2005.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 7º ed., São Paulo: Editorial Premier, p. 398-400, 2007.

ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação Cutânea *in vitro* como Ferramenta Auxiliar para o Estudo de Formulações Semi-sólidas de Cetoconazol para Aplicações Tópicas**. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/12097>>. Data de acesso: 08 set. 2008.

BARRY, B.W. Rheology of dermatological vehicles. In: **Dermatological Formulations**. New York: Marcel Dekker, p. 351-439, 1993.

BONASSA, E.M.A. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3ª Ed. – São Paulo: Atheneu, p. 538, 2005.

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Resolução RE nº 899, “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. 2003.

BRASIL, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1ª edição, Brasília, 2004.

BRASIL, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. **Resolução - RE nº. 1, de 29 de julho de 2005**, D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 01 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BETTONI, D. Óleo de Melaleuca. **International Journal of Pharmaceutical Compounding** (edição Brasileira), Austin, v.6, n.5, p. 268-269, 2004.

BREUER, M.M. **Cosmetics emulsions**. In: BECHER, P. (ed.) Encyclopedia of emulsions technology. New York, Marcel Dekker, v. 2, p. 385-424, 1985.

BURFIELD , T.; SHEPPARD-HANGER, S. *Super Clone "88 " Melaleuca alternifolia - what is its value ?* In: First International Phyto-Aromatic Conference, Nice, France by General Introduction. 2000.

CAL, K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. **Planta Medicinalis**. v. 72, p. 311-316, 2006 (a).

CAL, K. Stratum corneum absorption and retention of linalool and terpinen-4-ol applied as gel or oily solution in humans. **Journal of Dermatological Science**. v. 42, p. 265—267, 2006 (b).

CAL, K. Commentary to the article “Human skin penetration of the major components of Australian tea tree oil applied in its pure form and as a 20% solution in vitro”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 68, p. 838–839, 2008.

CALCABRINI ,A., STRINGARO, A., TOCCACIELI, L., MESCHINI, S., MARRA M., COLONE, M., GIUSEPPE, S., MONDELLOW, F., ARANCIA, G., MOLINARI, A. Terpinen-4-ol, The Main Component of Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil Inhibits the In Vitro Growth of Human Melanoma Cells. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 122, p. 349–360, 2004.

Câncer de Pele - Melanoma

Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335

CÉSAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 45, n. 2, p. 240-245, 2009.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2^o ed, New York: Marcel Dekker, Inc, p. 300-375, 2001.

COELHO, F.R.G. **Bases da Oncologia. Controle do câncer**. São Paulo, livraria e editora Marina, cap.1, p. 1-25, 1998.

CORBO, M.; SCHULTZ, T.W.; WONG, G.K.; VAN BUSKIRK, G.A. Development validation of in vitro release testing methods for semisolid formulations. **Journal Pharmaceutical technology**. v. 17, n. 9, p. 112-112, 1993.

CORREA, N.M.; CAMARGO Jr, F.B.; IGNACIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p. 73-78, 2005.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology** v. 91, p. 492–497, 2001.

CROSS, S.E.; RUSSEL, M.; SOUTHWELL, I.; ROBERTS, M.S. Human skin penetration of the major components of Australian tea tree oil applied in its pure form and as a 20% solution in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 69, p. 214–222, 2008.

ECCLESTON, G.M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, n.123-124, p. 161-82, 1997.

FANG, J. Y.; WU, P. C.; HUANG, Y. B.; TSAI, Y. H. *In vitro* permeation study of capsaicin and its synthetic derivatives from ointment bases using various skin types. **International Journal of Pharmaceutics**. Taiwan, v.1-2, n. 126, p. 119-128, 1995.

FERNANDES JÚNIOR, H.J. Introdução aos estudos das neoplasias. In: BARACAT, F.F.; FERNANDES JÚNIOR, H.J.; SILVA, M.J. **Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar**. São Paulo: Rocca, c. 1, p. 3-25, 2000.

FRANZ, T.M. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **Journal of Investigate Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.

GODWIN, D. A.; MICHNIAK, B. B. Influence of Drug Lipophilicity on Terpenes as Transdermal Penetration Enhancers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 8, p. 905–915, 1999.

HAAGENDOOEN, E. M. L.; et al: **Oncologia básica para profissionais de saúde**. São Paulo: Associação Paulista de Medicina; 2000.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; NIELSEN, J.B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 616–625, 2006.

ICH Topic Q1 A (R2) **Stability Testing of new drugs substances and products**, Step 5 Note for Guidance on stability testing: stability testing of new drug substances and products (CPMP/ICH/2736/99), 2003.

ICH, Topic Q2(R1). **Validation of analytical procedures: text and methodology**. 2005.

International Organisation for Standardisation, ISO 4730:1996. **Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil)**. 1996.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo, Medfarma, p. 50-52, 2004.

LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal Pharmaceutical Compounding**, v. 3, n. 4, p.154-156, 2001.

LIU, X.; ZU, Y.; FU, Y.; YAO, L.; GU, G.; WANG, W.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity and cytotoxicity towards cancer cells of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **European Food Research and Technology**, v. 253, p. 229-247, 2009.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 153-476, 1993.

MENDELSON, J.; HOWLEY, P.M.; ISRAEL, M.A.; LIOTTA, L.A. **The molecular basis of cancer**. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders company. 2001.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYDET, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 83, n. 11, p. 757 – 766, 1991.

MOSTEFA, N.M.; SADOK, A. H.; SABRI, N.; HADJI, A. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modeling. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 3, p. 211-218, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer trends progress report – 2009/2010 update**. 2010. Disponível em: <http://progressreport.cancer.gov>. Data de acesso: 20/07/2010.

NASCIMENTO, N.R.F.; LEAL_CARDOSO, J.H.; LESSA, L.M.A.; RORIZ-FILHO, J.S.; CUNHA, K.M.A.; FONTELES, M.C. Terpinen-4-ol: mechanisms of relaxation on rabbit duodenum. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, p. 467, 2005.

NEWBURGER, S. H. **Manual of Cosmetic Analysis**, editor Senzel, A. J., 2^aed, 1997

NIELSEN, J. B., NIELSEN, F. Topical use of tea tree oil reduces the dermal absorption of benzoic acid and methiocarb. **Archives of Dermatological Research**. v. 297, p. 395–402, 2006. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/pk13053xhw30u448/>. Data de acesso: 18/05/2009.

OECD/OCDE 428. **Skin absorption: in vitro method**. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2004

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. Sao Paulo: Atheneu, p. 81-104; 219-258; 261-286, 2003.

PRIEST, D.C.; PRIEST, M.D. Antimicrobiano e Antiinflamatório Naturais para a Acne. *Cosmet. Toilet.* (edição em Português), Austrália, v.14, n.1, p.55-57, 2002.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmaceutica**. 4. ed. Lisboa: Fundacao Calouste Gulbenkin, v.1, p.600, 1996.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K.; SCHAEFER, U. F. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.64, p. 222–228, 2006.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 3ª edição - 2007, 1ª reimpressão corrigida. Editora Artes Médicas Ltda. 2008.

SANCO/222 - EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, rev. 7, 2004. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkd0c20_rev_en.pdf
Data de acesso:02/08/2010.

SCCP/0970 - SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS – **Basic Criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetics ingredients , 2006.**

SCHRAMM, G. **A practical approach to rheology and rheometry.** 2nd edition. Ed. Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe, Federal Republic of Germany, 1998.

SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews/Cancer.** v. 6, p. 813 – 823, 2006.

SILVA, E.C.; SOARES, I.C. Tecnologia de emulsões. **Cosmetics & Toiletries,** v. 8, n.5, p.37-46, 1996.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada.** v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SILVA, S.R.S.; DEMUNER A.J.; BARBOSA L.C.A.; CASALI V.W.D.; NASCIMENTO E.A.; PINHEIRO A.L. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum Maringá,** v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SINKO, P.J. Martin: **Físico-farmácia e ciências farmacêuticas.** 5^a edição, Porto Alegre: Artmed, p. 354-358, 2008.

SUPAC-SS GUIDELINES. Topical and transdermal testing diffusion cell testing. Hanson Research. Rev. 2 – 2004.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science.** v.1, n. 108-109, p. 227-258, 2004.

THORGEIRSDÓTTIR, T. O., H. THORMAR; T. KRISTMUNDSDÓTTIR. Viscoelastic Properties of a Virucidal Cream Containing the Monoglyceride Monocaprin: Effects of Formulation Variables: A Technical Note. **AAPS PharmSciTech**. v. 7, n. 2, article 44, 2006.

USP DI 33: Drug information for the health care professional. – **United States Pharmacopeia**, 33rd ed. Greenwood Village, CO:MICRODEX Thonson Helthcare, p. 786-88, 2010.

VIEIRA, T.R.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE). **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p.536-539, 2004.

YODEN, W.J; STEINER, E.H. **Statatistical manual of AOAC** – Association of Official Analytical Chemistry, Washington: AOAC, p. 88, 1975.