

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

ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA, FÍSICA E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA
ERITROMICINA VEICULADA EM SISTEMAS LÍQUIDO-CRISTALINOS PARA
TRATAMENTO DA *ACNE VULGARIS*

KAREN ROSSIT SOTIRO

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Virgínia Scarpa

Araraquara-SP
2007

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

**ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA, FÍSICA E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA
ERITROMICINA VEICULADA EM SISTEMAS LÍQUIDO-CRISTALINOS PARA
TRATAMENTO DA *ACNE VULGARIS***

KAREN ROSSIT SOTIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Virgínia Scarpa

Araraquara-SP
2007

Dedico aos meus pais

Carlos Roberto e Maria Aparecida

e a meu irmão André.

Por todo amor, compreensão e apoio.

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é consequência.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho gostaria de agradecer às pessoas que contribuíram de diferentes formas para a sua realização.

À professora Maria Virgínia Scarpa pela oportunidade concedida, pela orientação e incentivo.

Ao professor Dr. Celso Santilli e ao Dr. Vitor Hugo Sarmento do Departamento de Físico – Química do Instituto de Química da UNESP, pela colaboração nas análises de reologia.

A Dra. Leila A. Chiavacci pela amizade e ajuda nas análises de SAXS.

A todos os professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos da UNESP, que contribuíram para minha formação, em especial aos professores Drs. Anselmo Gomes de Oliveira, Raul César Evangelista, Luis Vitor Silva do Sacramento e as professoras Dras. Hérica Salgado, Maria Palmira Daflon Gremião e Ana Dóris de Castro, pela amizade e incentivo.

Às funcionárias da seção de Pós – Graduação; Cláudia, Laura e Sônia, pelo auxílio e atenção em todos os momentos.

Aos técnicos do Departamento de Fármacos e Medicamentos da UNESP, em particular Fátima e Margareth pela amizade, companheirismo e profissionalismo.

A todos os funcionários da biblioteca de FCFar - UNESP, especialmente Moacir, Max, Irani, Lucas e Ana Cristina pela atenção e seriedade com que desempenham seu trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos que encontrei e pude conviver durante esse tempo: Maria Carolina, Rubiana, Traudi, Cristina, Helen, Luana, Danielle, Daniela, Nelson, Andréia, Arnóbio, Ketylin, Gisele, Thiago, Gustavo, Priscileila, Fabrício, Priscila, Juliane, Thais, Vanessa, Suzana, Marlus, Celso, Gabriela, Tina, Thalita, Kelle, Cristiane, Flávia , Velma e Ednir.

As minhas amigas de república Gabriela, Maria Carolina, Traudi, Mariana, Alianda, Priscila e Nicole, obrigada por carinho e pela paciência.

A minha família maravilhosa e ao meu namorado Jair, pelo companheirismo e paciência durante todo tempo.

A amiga Ana Cristina, pela nossa amizade.

A Deus, por tudo e por mais esta oportunidade,

Muito obrigada !!

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract.....	iii
Lista de abreviaturas.....	iv
Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1.1 Material.....	30
3.1.2 Equipamentos.....	31
3.2 Métodos.....	32
3.2.1 Caracterização da eritromicina.....	32
3.2.1.1 Espectroscopia de infravermelho.....	32
3.2.2. Construção do diagrama de fases.....	32
3.2.3 Formulações escolhidas.....	33
3.2.4 Incorporação da ER nos sistemas.....	34
3.2.5 Caracterização física.....	34
3.2.5.1 Índice de refração	35
3.2.5.2 Condutividade eletrolítica.....	35
3.2.5.3 Microscopia de luz polarizada.....	35
3.2.5.4 Reologia.....	36
3.2.5.5 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.....	37
3.2.6 Estabilidade física.....	37

3.2.6.1	Teste de prateleira e Estabilidade preliminar das formulações.....	37
3.2.7.	Metodologia analítica para CLAE.....	38
3.2.7.1	Condições cromatográficas.....	38
3.2.7.2	Validação da metodologia.....	38
3.2.7.3	Curva analítica.....	41
3.2.8	Estabilidade da química da eritromicina no sistema.....	42
3.2.9	Coefficiente de partição.....	42
3.2.10	Variação do tempo de retenção da ER.....	43
3.2.10.1	Fase móvel	43
3.2.10.2	Constante dielétrica.....	43
3.2.11	Liberação <i>in vitro</i>	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1	Caracterização da eritromicina.....	47
4.1.1	Espectroscopia de infravermelho.....	47
4.2	Construção do diagrama de fases.....	49
4.3	Incorporação da ER nos sistemas.....	53
4.4	Caracterização física.....	54
4.4.1	Índice de refração	54
4.4.2	Condutividade eletrolítica.....	55
4.4.3	Reologia.....	57
4.4.4	Microscopia de luz polarizada.....	64
4.4.5	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.....	67
4.5	Estabilidade física.....	72
4.5.1	Teste de prateleira e Estabilidade preliminar das formulações.....	72

4.6 Metodologia analítica para CLAE.....	87
4.6.1 Variação do tempo de retenção.....	87
4.6.2 Constante dielétrica	88
4.6.3 Validação da metodologia.....	89
4.7 Estabilidade da eritromicina nos sistemas.....	93
4.8 Coeficiente de partição.....	97
4.9 Perfil de solubilidade da ER.....	98
4.9.1 Perfil de liberação da ER <i>in vitro</i>	98
5. CONCLUSÕES.....	101
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

RESUMO

A acne é uma patologia que acomete a pele e ocorre da metade ao final da adolescência, afetando ambos os sexos. Acredita-se que a *acne vulgaris* ocorra em adolescentes em decorrência das variações hormonais fisiológicas e das alterações na maturação dos folículos pilosos. A eritromicina é indicada como fármaco de primeira escolha no tratamento da acne e outras doenças infecciosas que afetam a pele. O objetivo desse trabalho foi desenvolver formulações alternativas para a administração cutânea de eritromicina (ER), formadas através da mistura de adipato de butila, álcool etoxilado e propoxilado e água, que fossem agradáveis no momento do uso e o menos irritante possível para a pele. Obtiveram-se sistemas de diferentes formas de estruturação, como emulsão, microemulsão, sistemas de transição de fase e sistemas líquido - cristalinos. Esse último escolhido para um estudo mais completo por apresentar menor quantidade de fase oleosa e por ser um sistema dotado de propriedade tixotrópica e boa aderência a pele, que se deforma durante a aplicação e recuperam a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, evitando que o produto escorra. Os sistemas foram caracterizados pelo estudo reológico, medidas de índice de refração, condutividade, microscopia de luz polarizada e espalhamento de raio-X a baixo ângulo, que revelaram, sucessivamente sistemas plásticos com tixotropia, com domínio polar e estruturação interna do tipo hexagonal relacionada a interação das três fases constituintes. A estabilidade do fármaco no sistema escolhido deu-se através de exposição das formulações as temperaturas de 25 e 60°C, onde apresentaram diminuição de aproximadamente 6,25% e 81,25% de ER respectivamente, nos primeiros 29 dias. O ensaio de liberação, *in vitro*, realizado para verificar se os sistemas

prolongam o tempo de liberação da eritromicina, demonstrou um perfil mais lento de liberação do fármaco contido nos cristais-líquidos, quando comparado ao fármaco livre.

ABSTRACT

The acne is a pathology that affects the skin and occurs in the half to the end of the adolescence, affecting both the sexes. One gives credit that the vulgar acne occurs in adolescents in result of the physiological hormonal variations and of the alterations in the maturation of the pilosos folliculus. The erythromycin is indicated as drug of first choice in the treatment of the acne and other illnesses that affect the skin. The objective of this work was to develop alternative formulations for the cutaneous administration of erythromycin (ER), formed through the mixture of butil adipate, propoxyl and ethoxyl cethyl alcohols and water, that was pleasant at the moment of the use and possible, less irritating to skin. Systems of different forms of structured had been gotten, like emulsion, microemulsion, systems of phase transition and liquid - crystalline systems. This last one chosen for containing least amount of oily phase, being thus, less greasy and for this systems being that, if deform during the application and recovery initial viscosity at the moment where stop the application, preventing that the product drains. The system was characterized by the rheological study, measures of refractive index, conductivity, microscopy of polarized light and small-angle X-ray scattering, that had discovered, successively plastic systems with thixotropy, with polar domain and hexagonal internal structured related the interaction of the three constituent phases. The stability of the drug in the chosen system gave through exposition of the formulations at 2 different temperatures, environment and 60 °C, they had presented reduction of 6.25% and 81.25% of ER approximately respectively, in first the 29 days.

The *in vitro* release assay was realized to verify if these systems are able to prolong the time release of the erythromycin. They demonstrated a slower profile of the drug contained in the liquid crystals, when compared with the free drug.

ABREVIATURAS

SMT / SLC – Sistema microestruturado/ sistema líquido-cristalino

SME– Sistema microemulsionado

STF – Sistema de transição de fase

SE – Sistema emulsionado

SF – Separação de fases

ER – Eritromicina

CV – Coeficiente de variação

IR – Índice de refração

F1- Formulação 1

F2 – Formulação 2

F3 – Formulação 3

F4 – Formulação 4

RVL – Região viscoelastica linear

G – Módulo de rigidez de sólidos

J – Compliância

CL - Cristal líquido

q- Vetor de espalhamento

U.A. –Unidades arbitrárias

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Sincroton

ACN - Acetonitrila

K- Coeficiente de partição

ϵ - Constante dielétrica

BOH - Álcool butílico terciário

FM - Fase móvel

RCF – força centrífuga relativa

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia da pele.....	2
Figura 2: Adaptação de esquema de ilustração dos caminhos da permeação de fármacos através do estrato córneo.....	3
Figura 3: Evolução do processo de inflamatório do folículo pilo-sebáceo; a) folículo normal; b) ceratina ocluindo a glândula, comedão; c) início da inflamação; d) processo inflamatório em grau elevado e e) rompimento da parede folicular.....	6
Figura 4: Fórmula estrutural da eritromicina.....	10
Figura 5: Fórmula do PPG-5-Ceteth-2.....	13
Figura 6: Fórmula estrutural do adipato de dibutila.....	13
Figura 7: A) micela normal e reversa; B) microemulsão O/A; C) fase lamelar; D) fase hexagonal e hexagonal reversa e E) fase cúbica.....	18
Figura 8: Texturas líquido-cristalinas típicas, observadas em um microscópio óptico de luz polarizada. A- nemática; B- colestérica; C- esmética.....	21
Figura 9: Vários tipos de comportamento de fluxo.....	25
Figura 10: Perfis de curvas reológicas para líquidos newtonianos, sólidos hookeanos e materiais viscoelásticos.....	27
Figura 11: Gráfico de fluência e relaxação. Dentre os corpos viscoelásticos, eles podem ser classificados durante a recuperação em: mais elásticos (ou seja, sólido viscoelástico) ou mais viscosos (líquidos viscoelásticos).....	28

- Figura 12:** Diagrama de fases referente as formulações iniciais de onde partiram as adições de água purificada. As linhas (...) representam à fase aquosa, as linhas (___) a fase oleosa e as linhas (---) a fase tensoativa.....33
- Figura 13:** Esquema de célula de difusão (à esquerda), adaptada ao equipamento de dissolução (a direita). (a) dispositivo de agitação do meio receptor, (b) abertura para coleta e reposição do meio, (c) orifício de colocação do tubo com a membrana.....46
- Figura 14:** Espectro da eritromicina na região do infravermelho. Os números referem-se a bandas não encontradas no espectro de referência, e as letras, referem-se às bandas indexadas em comum entre os espectros.....48
- Figura 15:** Espectro de infravermelho de referência da eritromicina. As letras das bandas indexadas estão referidas entre parênteses no texto.49
- Figura 16:** Diagrama de fases com as regiões de cada sistema. SME- sistema microemulsionado, SMT- sistema microestruturado, STF- sistema de transição de fases, SE- sistema emulsionado, SF- separação de fases.....51
- Figura 17:** A- separação de fases, B- microemulsão, C- sistema microestruturado (líquido - cristalino), D- sistema de transição de fases e E- emulsão.....52
- Figura 18:** Separação de fases após repouso.....52
- Figura 19:** Sistema emulsionado após repouso.....52
- Figura 20:** Diagrama com as formulações selecionadas.....53
- Figura 21:** Representação gráfica do índice de refração.....55
- Figura 22:** Efeito da variação da fase aquosa nos valores de condutividade.....56
- Figura 23:** Representação gráfica da relação entre tensão de cisalhamento e velocidade de cisalhamento do sistema F2 a 25 e 37° C.....58

- Figura 24:** Representação gráfica da relação entre tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento do sistema F3 a 25 e 37° C.....58
- Figura 25:** Representação gráfica da relação entre tensão de cisalhamento e velocidade de cisalhamento do sistema F4 a 25 e 37° C.....59
- Figura 26:** Representação gráfica da relação entre viscosidade e velocidade de cisalhamento do sistema F2 a 25 °C (A) e 37° C (B), respectivamente.....60
- Figura 27:** Representação gráfica da relação entre viscosidade e velocidade de cisalhamento do sistema F2 a 25 °C (A) e 37° C (B), respectivamente.....60
- Figura 28:** Representação gráfica da relação entre viscosidade e velocidade de cisalhamento do sistema F2 a 25 °C (A) e 37° C (B), respectivamente.....61
- Figura 29:** Viscosidade comparativa entre as formulações F2, F3 e F4, a 25 e 37°C.....62
- Figura 30:** Curvas de fluência e relaxação das formulações F2, F3 e F4.....63
- Figura 31:** Fotomicrografias do sistema F1 em aumento de 20 X, as setas indicam aparecimento de estrias; A) fase hexagonal, B) fase hexagonal em sistema contendo ER.....65
- Figura 32:** Fotomicrografias do sistema F2 em aumento de 20 X, as setas indicam aparecimento de estrias; A) fase hexagonal, B) mistura de fases lamelar e hexagonal em sistema contendo ER.....66
- Figura 33:** Fotomicrografias do sistema F3 em aumento de 20 X, as setas indicam aparecimento de estrias; A) fase hexagonal, B) fase hexagonal em sistema contendo ER.....66

- Figura 34:** Fotomicrografias do sistema F4 em aumento de 20 X e 10 X respectivamente, as setas indicam aparecimento de estrias; A) fase hexagonal, B) fase hexagonal em sistema contendo ER.....67
- Figura 35:** Comparação estrutural entre as formulações F2, F3 e F4.....69
- Figura 36:** Evolução estrutural das formulações F2 e F2 com ER.....70
- Figura 37:** Evolução estrutural das formulações F3 e F3 com ER.....70
- Figura 38:** Evolução estrutural das formulações F4 e F4 com ER.....71
- Figura 39:** Relação entre tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento após 45 dias em estufa sob diferentes temperaturas (25 °C e 60 °C) para as formulações F2 (A), F3 (B) e F4 (C).....76
- Figura 40:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F2 sem o fármaco após 45 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.....76
- Figura 41:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F3 sem o fármaco após 45 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.....77
- Figura 42:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F4 sem o fármaco após 45 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.....77
- Figura 43:** Relação entre tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento após 90 dias em estufa sob diferentes temperaturas (25 °C e 60 °C) para as formulações F2 (A), F3 (B) e F4 (C).....78
- Figura 44:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F2 sem o fármaco após 90 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.....78
- Figura 45:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F3 sem o fármaco após 90 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.....79

- Figura 46:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F4 sem o fármaco após 90 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.....79
- Figura 47:** Reogramas de escoamento e, fluência e relaxação da formulação F2 contendo o fármaco após o preparo sob temperatura ambiente (25 °C).....80
- Figura 48:** Reogramas de escoamento e, fluência e relaxação da formulação F3 contendo o fármaco após o preparo sob temperatura ambiente (25 °C).....80
- Figura 49:** Reogramas de escoamento e, fluência e relaxação da formulação F4 contendo o fármaco após o preparo sob temperatura ambiente (25 °C).....81
- Figura 50:** Reogramas de escoamento da formulação F2, F3 e F4 contendo o fármaco após 45 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.....81
- Figura 51:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F2 contendo o fármaco após 45 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.....82
- Figura 52:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F3 contendo o fármaco após 45 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.....82
- Figura 53:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F4 contendo o fármaco após 45 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.....83
- Figura 54:** Reogramas de escoamento da formulação F2, F3 e F4 contendo o fármaco após 90 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.....83
- Figura 55:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F2 contendo o fármaco após 90 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.....84
- Figura 56:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F3 contendo o fármaco após 90 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.....84

- Figura 57:** Reogramas de fluência e relaxação da formulação F4 contendo o fármaco após 90 dias em estufas à temperaturas de 25° (ambiente) e 60 °C.....85
- Figura 58:** Fotomicrografia do campo escuro característico de isotropia.....86
- Figura 59:** Tempo de retenção da eritromicina (em minutos) em função da proporção de álcool butílico terciário presente na solução A da fase móvel.....88
- Figura 60:** Curva analítica da eritromicina obtida em 215 nm, em fase móvel: acetonitrila álcool butílico terciário e fase aquosa (3:20:77).....90
- Figura 61:** (A) cromatograma da fase móvel (variação: acetonitrila 3%, álcool butílico terciário 20% e fase aquosa 77%), (B) cromatograma do sistema micro estruturado sem o fármaco.....91
- Figura 62:** Cromatograma da solução padrão de eritromicina.....92
- Figura 63:** Gráfico referente à estabilidade da ER nas formulações F2, submetida à temperatura de 25 °C e 60 °C.....95
- Figura 64:** Gráfico referente à estabilidade da ER nas formulações F3, submetida à temperatura de 25 °C e 60 °C.....95
- Figura 65:** Gráfico referente à estabilidade da ER nas formulações F4, submetida à temperatura de 25 °C e 60 °C.....96
- Figura 66:** Mudança de coloração dos sistemas após exposição à temperatura constante de 60°C.97
- Figura 67:** Curva analítica da ER em tampão fosfato pH 6,8.....98
- Figura 68:** Perfil de liberação *in vitro* dos CL contendo ER.....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de acne e seu grau de identificação.....	8
Tabela 2: Formulações selecionadas e suas respectivas porcentagens de cada componente da formulação e classificações.....	34
Tabela 3: Constantes dielétrica dos solventes utilizados.....	44
Tabela 4: Valores médios do índice de refração de cada formulação, em triplicata a 20°C.....	55
Tabela 5: Valores dos parâmetros obtidos a partir das curvas de SAXS.....	71
Tabela 6: Valores de pH das amostras sob as temperaturas; 25, 45 e a 60°C, respectivamente.....	74
Tabela 7: Valores da constante dielétrica e temperatura do estudo.....	89
Tabela 8: Relação das concentrações de ER em fase móvel e área do pico obtida	90
Tabela 9: Valores de recuperação encontrados.....	93

1. INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de esclarecer cada vez mais a permeabilidade cutânea das substâncias ativas. Devido à estrutura e composição lipídica da epiderme, mais especificamente do estrato córneo, existe uma grande dificuldade na difusão dos fármacos através da pele, principalmente daqueles com natureza hidrofílica.

Para que se possa desenvolver adequadamente um produto de uso tópico bem como compreender sua permeabilidade cutânea é preciso, primeiramente, conhecer muito bem a pele humana (LEONARDI, 2004).

A pele cobre uma área de aproximadamente 2m² e promove o contato entre o corpo e o ambiente externo impedindo a perda de água por evaporação e o ingresso de materiais estranhos e atritos, agindo como uma barreira dupla (JUNQUEIRA et al. 1999, SUHONEN et al., 1999; HARDGRAFT, 2001). Essencialmente composta por duas camadas, uma camada epitelial de origem ectodérmica mais externa e não vascularizada chamada epiderme (epitélio estratificado pavimentoso queratinizado) e outra mais interna de origem mesodérmica, a derme, que possui um rico suplemento de capilares, glândulas sudoríparas e sebáceas, além de folículos pilosos (SUHONEN et al., 1999). Em continuidade com a derme esta a hipoderme, que, embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele, servindo de suporte e união com os órgãos subjacentes (figura 1). Através das suas terminações nervosas, a pele esta em comunicação constante com o ambiente e por meio de seus vasos, glândulas e tecido adiposo, colaboram na termorregulação do corpo (SUHONEN et al., 1999; LEONARDI, 2004).

A camada superficial da epiderme, o estrato córneo, é formada por diversas camadas de células mortas (queratinócitos) firmadas em uma matriz lipídica (SUHONEN et al., 1999).

Durante a passagem da camada basal para o estrato córneo, as células sofrem queratinização, transformando células epiteliais em células mortas através desidratação celular com decomposição do citoplasma e núcleo, dando origem aos lipídios (LEONARDI, 2004). Esses lipídios conferem ao estrato córneo permeabilidade à água 1000 vezes menor que a maioria das membranas biológicas (SUHONEN et al., 1999). Essa impermeabilidade é considerada um problema, pois se estima que apenas uma pequena porcentagem de material ativo penetra através da pele quando aplicado topicamente (HARDGRAFT, 2001).

Essas células sofrem esfoliação, ocorrendo dessa forma um deslocamento permanente e repetido de células, que da camada basal atingem gradualmente a superfície epidérmica, para se desprenderem já mortas. Essa diferenciação ocorre em torno de duas semanas para jovens e em torno de 37 dias para pessoas com mais de 50 anos (LEONARDI, 2004).

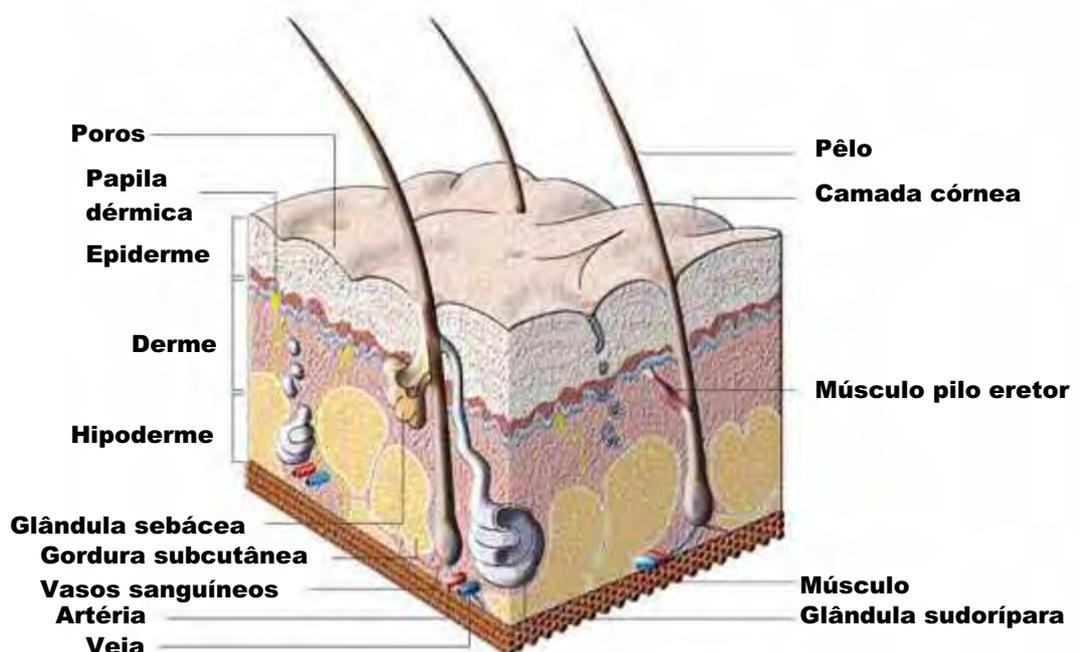


Figura 1: Anatomia da pele (www.cnrs.fr)

Depois que uma molécula ativa atravessa o estrato córneo (espessura de 75 a 150 μm), não há outra barreira à difusão nas outras camadas da pele se a molécula não ficar retida ou metabolizada no caminho.

A permeação de substâncias através da pele pode ocorrer por difusão da substância ativa através da epiderme intacta ou através dos apêndices da pele, como: folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Esses caminhos pelos quais as moléculas podem atravessar o estrato córneo são: intercelular ou intracelular, transcelular e apendicular ou transanexal, como pode ser observado na Figura 2 (ANSEL et al., 2000; HARDGRAFT, 2001). O caminho intercelular é o maior responsável pela permeação da maioria dos fármacos (SUHONEN et al., 1999), pois a substância ativa não tem que atravessar os queratinócitos, apenas difunde-se pelo meio intercelular, enquanto que o transcelular, a substância ativa não apenas difunde-se entre os lipídios como também atravessa os queratinócitos (LEONARDI, 2004). Enquanto que a via apendicular, é rápida e direta, e o fármaco penetra cutaneamente pelo folículo pilosebáceo e poros (ABRAHAM et al.; 1995).

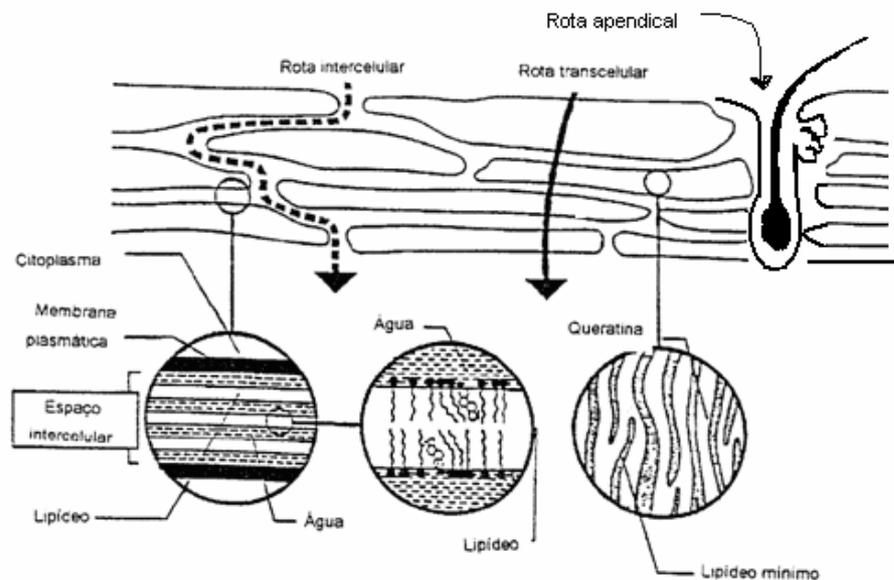


Figura 2: Adaptação de esquema de ilustração dos caminhos da permeação de fármacos através do estrato córneo (ABRAHAM et al., 1995).

Melhoras na penetração cutânea se dão por agentes específicos chamados de promotores de penetração, que interagem com o estrato córneo, alterando sua resistência natural. São exemplos, dimetil-sufóxido (DMSO), ácido lático, ácido oléico, ácido salicílico, uréia, solventes orgânicos (etanol, metanol e acetona) e os tensoativos (SUHONEN et al., 1999; LEONARDI, 2004), os quais são farmacologicamente inativos, mas podem interagir com o estrato córneo quando incorporados em formulações de uso tópico, reduzindo a resistência da pele para a difusão do fármaco. Desse modo, a água, de natureza polar, interage com as cabeças polares do tensoativo na bicamada lipídica, permitindo a entrada de substâncias polares, devido ao intumescimento dessas cabeças, induzindo alterações na estrutura do estrato córneo, através da hidratação. A presença do álcool também induz modificações na região de grupos de cabeças polares das bicamadas lipídicas (SUHONEN et al., 1999).

A penetração através da pele e permeação do fármaco após aplicação tópica, depende também das propriedades físico-químicas de suas moléculas, como também da função da pele como uma barreira de transporte que pode ser influenciada pela aplicação da formulação (MÜLLER et al., 2003).

O veículo empregado no transporte do fármaco interfere de maneira bastante significativa na penetração cutânea, pois controla a liberação da substância ativa, que é modulada pela interação físico-química do veículo com o fármaco, o qual deve ser primeiramente liberado para então permear a pele. Desse modo o fármaco deve apresentar maior atração físico-química com a pele do que com o veículo no qual é apresentado (ANSEL et al., 2000; LEONARDI, 2004).

Outros meios para se aumentar à liberação do fármaco através da pele são modificações químicas, que transportam o fármaco como inativo (pró-fármaco), o qual

penetra sem dificuldade pela pele através de meios elétricos como iontoforese, eletroforese e aplicação de ultra-som (SUHONEN et al., 1999; ROMÁN et al., 2004).

Uma das patologias a qual se pode aplicar veículos, capazes de permanecer em contato com a pele por mais tempo, é a *Acne vulgaris*.

Patologia que acomete a pele, a acne é praticamente universal da metade ao final da adolescência, afeta ambos os sexos na puberdade, embora o sexo masculino tenha tendência a apresentar uma doença mais grave (SAMPAIO, 2001, DEGITZ et al.; 2007), devido à produção de testosterona, hormônio responsável pelo crescimento de pêlos pelo corpo, tanto em homens como em mulheres, aumentado rapidamente na idade da puberdade, entre 10 a 13 anos e regredindo em torno dos 20-25 anos. Em alguns pacientes a acne persiste na quarta ou quinta década da vida, chamada de acne persistente (GUYTON et al., 1997, DEGITZ et al.; 2007). A testosterona também é responsável pelo aumento da espessura da pele e aumento da taxa de secreção de sebo pelas glândulas sebáceas (GUYTON et al., 1997; ZOUBOULIS, 2004).

Acredita-se que a acne vulgaris ocorra em adolescentes em decorrência dessas variações hormonais fisiológicas e das alterações na maturação dos folículos pilosos, localizando-se principalmente na face e nas costas, onde a maioria das glândulas sebáceas são encontradas, isto é, regiões onde a acne ocorre preferencialmente. A característica desses folículos é ter uma glândula sebácea hipertrofiada e um pêlo fino-rudimentar (SAMPAIO, 2001, DEGITZ et al.; 2007). Conforme ilustrado na figura 3;

A acne é observada em todas as raças, porém é tida como mais discreta em pessoas de origem asiática.

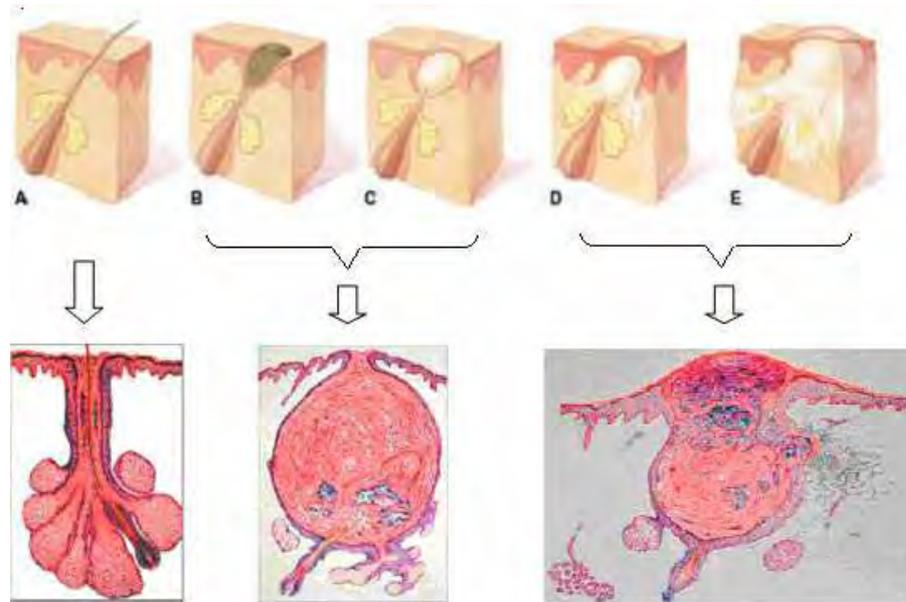


Figura 3: Evolução do processo inflamatório do folículo pilo-sebáceo; a) folículo normal; b) ceratina ocluindo a glândula, comedão; c) início da inflamação; d) processo inflamatório em grau elevado e e) rompimento da parede folicular (adaptado de DEGITZ et al.; 2007; www.sante-naturelle.info/acne).

O conceito atual é que a acne resulta da interação de diversos fatores patogênicos. Entre estes a elevada produção hormonal determinando a seborréia, comedões foliculares (fechados e abertos) da hiperqueratose, mudanças na flora microbiana e processos de inflamação imunológica (DEGITZ et al.; 2007). Assim, a acne é uma patologia que afeta o folículo pilo-sebáceo, na qual participam concomitantemente fatores genéticos, hiperqueratinização folicular, presença da bactéria *Propionibacterium acnes* e aumento da produção sebácea, influenciada por fatores hormonais. Pode ser classificada em acne primária (vulgar) ou secundária (cosmética, medicamentosa, solar, etc). No primeiro caso, trata-se da acne de adolescentes e adultos jovens, onde a predisposição genética, estimulada pelo início da produção hormonal, favorece o desenvolvimento das lesões na pele. No caso da acne secundária, certos medicamentos como corticóides e vitaminas do complexo B têm como

efeito colateral, o aparecimento da acne. Em relação à acne cosmética, matérias primas adicionadas aos produtos com tendência comedogênica (como exemplos: óleo mineral, manteiga de cacau, miristato de isopropila) são as responsáveis (LEONARDI, 2004). As manifestações clínicas da acne podem ser induzidas ou exacerbadas por fármacos (corticosteróides, hormônio adrenocorticotrópico, testosterona, gonadotropinas, anticoncepcionais orais, trimetadiona, iodetos e brometos), contatos ocupacionais (óleos, hidrocarbonetos clorados e alcatrões) e condições oclusivas, como o uso de roupas pesadas em climas tropicais. Algumas famílias parecem ser particularmente afetadas pela acne, sugerindo também um fator hereditário (ROBBINS, 2000). Este fator inclui o gene citocromo P-450-1A1 e a hidroxilase do esteroide 21, que influenciam a produção do androgênio na glândula adrenal (DEGITZ et al.; 2007).

Tanto a acne primária, como a secundária podem ser subdivididas em 2 tipos; não inflamatório e inflamatório, embora ambas possam coexistir. O primeiro consiste em comedões abertos e fechados. Os *comedões abertos* (lesão inicial) são pequenas pápulas foliculares contendo uma rolha central preta de ceratina. Essa cor resulta da oxidação do pigmento melanina. Os *comedões fechados* são pápulas foliculares sem rolha central visível. Como a rolha de ceratina é retida abaixo da superfície epidérmica, essas lesões constituem fontes potenciais de ruptura folicular e inflamação. A acne inflamatória caracteriza-se por pápulas eritematosas, nódulos e pústulas. As variantes graves resultam em formação de edemas fistulosos e cicatrizes, além dos problemas emocionais decorrentes das lesões (ROBBINS, 2000).

O quadro clínico é polimorfo, caracterizado por comedões, pápulas, pústulas, nódulos e abscessos localizados na face, ombros e porção superior do tórax, geralmente associado com seborréia. Consoante ao número e ao tipo de lesões, define-se as formas clínicas ou graus de *Acne vulgar* (SAMPAIO, 2001); conforme tabela 1;

Tabela 1: Tipos de acne e seu grau de identificação (SAMPAIO, 2001).

TIPO DE ACNE	IDENTIFICAÇÃO
Acne não-inflamatória	Acne comedônica ou Acne grau I
Acne inflamatória	Acne pápulo-pustulosa ou Acne grau II
	Acne nódulo-abscedente ou Acne grau III
	Acne conglobata ou Acne grau IV
	Acne fulminante ou Acne grau V

A *Propionibacterium acnes* pertence ao grupo de bactérias da flora resistente da pele humana, sendo predominante nos folículos pilosos, preferindo assim condições anaeróbicas e colonizando regiões preferencialmente com grande produção de sebo. A seborréia e a hiperqueratose folicular promovem obviamente a proliferação da propionibactéria, tornando-se um ambiente propício. Uma grande concentração dessa bactéria é encontrada em indivíduos entre 11 e 20 anos de idade acometidos pela acne em relação aos indivíduos com a mesma idade sem a doença. O papel da propionibactéria na acne é decorrente a sua intensa proliferação, resultando no aumento do metabolismo bacteriano com ação inflamatória, decorrente de ácidos graxos livres liberados através da ação de lípases bacterianas (DEGITZ et al.; 2007).

O tratamento tópico da acne consiste na combinação de uma série de fármacos, entre eles, os antibióticos, que diminuem o *Propionibacterium acnes*; como a eritromicina (2 – 4 %) (LEONARDI, 2004).

A terapia antimicrobiana com agentes tópicos e sistêmicos é utilizada há muitos anos como tratamento da acne. Os antibióticos de uso tópico são geralmente indicados para pacientes que apresentam quadros de acne inflamatória de leve a moderada. Dentre os

antibióticos de escolha estão os macrolídeos, em especial a eritromicina (LANGNER et al., 2007).

A eritromicina é um antibiótico eficaz descoberto em 1952 por McGuire. Oriunda da cepa de *Streptomyces erythreus* é eficaz em infecções por cocos gram-positivos. Denominada como antibiótico macrolídeo porque contém um anel lactônico grande ao qual se ligam um ou mais açúcares desóxi, conforme Figura 4; (GOODMAN, 1996; SCHEINFELD et al, 2003; RESENDE, 2004). Tem seu mecanismo de ação interferindo com a síntese protéica dos microrganismos susceptíveis, ligando-se reversivelmente à subunidade 50S dos ribossomos dessa bactéria, bloqueando as reações de transpeptidase e inibindo a síntese protéica, portanto o crescimento celular (SCHEINFELD et al, 2003; MARTINDALE, 1999; RESENDE, 2004; BRITISH PHARM., 2001; REMINGTON, 2000; TAVARES, 1996).

Desse modo, pode-se dizer que a eritromicina é bacteriostática, ou seja, inibe o crescimento do microrganismo, mas também demonstrou-se bactericida, promovendo em concentrações elevadas a morte de diversos microrganismos sensíveis. O antibiótico é mais eficaz *in vitro* contra cocos gram-positivos aeróbicos e bacilos, apresenta espectro de ação relativamente amplo, sendo ativo também contra alguns gram-negativos, actinomicetos, micoplasmas, espiriquetas, clamídias, riquetsias e certas micobactérias atípicas (MARTINDALE, 1999; KOROLKOVAS, 2001; RESENDE, 2004; REMINGTON, 2000). (GOODMAN, 1996).

A eritromicina consiste em mistura que contém não menos de 90% de eritromicina A, cerca de 10% de eritromicina B e traços de eritromicina C. A somatória das porcentagens de eritromicina A, B e C não é menor que 90% e não é maior que 100,5% da base anidra (FARMACOPÉIA BRASILEIRA,1988; TAVARES, 1996; USP 24, 2000; BRITISH PHARM., 2001).

Devendo ser usada topicamente ou oralmente no tratamento da acne, é usada como tratamento de primeira escolha para acne de primeiro grau e conjuntamente com outros fármacos no tratamento da acne severa (MARTINDALE, 1999).

A eritromicina tem espectro de ação relativamente amplo, sendo ativa contra a maioria dos germes gram-positivos e alguns gram-negativos, actinomicetos, micoplasmas, espiriquetas, clamídias, riquetsias e certas micobactérias atípicas (MARTINDALE, 1999; KOROLKOVAS, 2001; RESENDE, 2004; REMINGTON, 2000).

Sua ação é aumentada em pH neutro para moderadamente alcalino (7,5 a 10,5) principalmente contra espécies gram-negativas (MARTINDALE, 1999; RESENDE, 2004).

A eritromicina é empregada como base livre ou na forma de sal (estearato) ou ésteres (estolato e etilsuccinato). Estearato e etilsuccinato são formas latentes da eritromicina. A base é extremamente amarga e pouco solúvel em água, mas é solúvel em metanol, clorofórmio, éter e álcool (USP 24, 2000; MARTINDALE, 1999; BRITISH PHARM., 2001; TAVARES, 1996; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

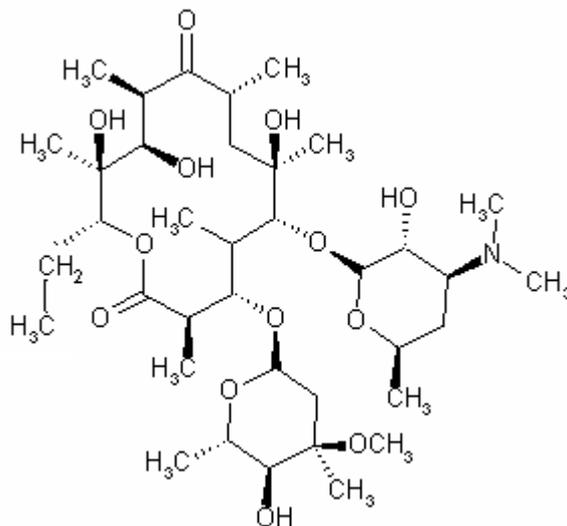


Figura 4: Fórmula estrutural da eritromicina (GOODMAN, 1996).

Pacientes intolerantes a uma forma de eritromicina podem ser intolerantes também as outras formas. A eritromicina é o antibiótico indicado no tratamento de infecções por clamídias, de ferimentos por queimadura, oculares da pele e do tecido mole, do trato geniturinário, tratamento da *Acne vulgaris*, profilaxia de conjuntivite neonatal, difteria, endocardite bacteriana, febre reumática, oftalmia do recém-nascido, e preparação pré-operatória do intestino (KOROLKOVAS, 2001).

A proposta desse projeto é veicular a eritromicina base, indicada como fármaco de primeira escolha no tratamento da acne, em sistemas formados por álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP.

Em virtude do seu poder de diminuir tensões superficiais, moléculas anfifílicas também são chamadas de tensoativos. Em sua estrutura, compostos anfifílicos são caracterizados por possuírem na mesma molécula dois grupos que diferem grandemente em suas propriedades de solubilidade. Uma parte da molécula é *hidrofílica*, altamente solúvel em água ou outros solventes polares; enquanto que a outra parte é *hidrofóbica*, altamente solúvel em hidrocarbonetos ou solventes não-polares, com uma região polar chamada de cabeça polar e outro grupo, formado por uma cadeia de moléculas lipofílicas, chamada de cauda apolar (hidrofóbica) (BECHTOLD, 2005).

Os tensoativos permitem incorporação de fármacos hidrofílicos em sua região polar e fármacos lipofílicos em sua região apolar (LAWRENCE e REES, 2000). Esse comportamento das moléculas está diretamente relacionado ao meio em que elas se encontram. Se estiverem em meio polar, tendem a se associar em agregados que maximizem o contato da cabeça polar e o meio e minimizem o contato entre a parte hidrofóbica e o meio. Em solventes polares, as moléculas anfifílicas posicionam as cabeças polares para a parte mais externa do agregado e direcionam a cadeia apolar para a região interna. A este sistema dá-se o nome de micelas. Se as mesmas moléculas estão em um meio apolar, surge a formação de micelas reversas, nas

quais as cabeças polares se posicionam na parte interna da micela e as cadeias apolares tendem a maximizar o contato com o solvente apolar (MACIAN *et al.*, 1996 *apud* LONGO).

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

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

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

Produzido pela reação entre álcool cetílico com a mistura de óxido de etileno e óxido de propileno, o PPG-5-Ceteth-2, Figura 5, pode ser encontrado na literatura com o nome de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP ou nome comercial PROCETYL AWS[®].

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

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

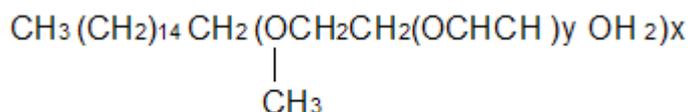


Figura 5. Fórmula do PPG-5-Ceteth-2 (WENNINGER, 1997). Sendo, x em média 5 e y em média 20.

Em formas farmacêuticas, a fase oleosa é um componente importante, quando se pretende incorporar fármacos lipofílicos. Em adição, favorecem a formação de sistemas estáveis como, microemulsionados e microestruturados, associando-se e penetrando nas moléculas do tensoativo, ou seja, no filme interfacial. Dependendo da natureza do óleo, em particular seu tamanho em relação à cadeia hidrofóbica do tensoativo, o óleo pode penetrar em extensões variadas nas caudas apolares do tensoativo na monocamada interfacial (LAWRENCE e REES, 2000; KREILGAARD, 2002; URBAN, 2004).

O adipato de dibutila é um diéster de álcool butílico e ácido adípico, que apresenta a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_4$ e fórmula estrutural ilustrada na Figura 6.

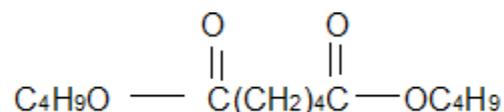


Figura 6: Fórmula estrutural do adipato de dibutila (LONGO, 2006).

O maior desafio para formulações tópicas é promover um aumento suficiente de permeação do fármaco na pele e determinar o caminho preciso pelo quais os compostos penetram através dela, e como isso pode ser afetado por formulações. (HARDGRAFT, 2001; KREILGAARD, 2002).

Segundo Hadgraft e Somers, a máxima permeação ocorre quando o medicamento combina solubilidade em lipídios e moderada solubilidade em água.

Formas farmacêuticas convencionais quando usadas para veicular fármacos, geralmente não conseguem disponibilizar o fármaco em concentrações terapêuticas para o tecido alvo do organismo, uma vez que, entre o local onde deve exercer seu efeito farmacológico e o local da aplicação, existem tecidos normais do organismo que podem sofrer efeito potencialmente tóxico do fármaco (OLIVEIRA et al., 2004).

Novos sistemas de liberação de fármacos vêm sendo muito estudados na área farmacêutica, porque podem proporcionar alternativas terapêuticas modernas a partir de fármacos já existentes, reduzindo efeitos colaterais e sendo mais eficientes farmacologicamente. Além disso, esses sistemas podem proteger o fármaco da decomposição ou aceleração desses processos, bem como direcionar o fármaco para tecidos ou células específicas do organismo por se apresentarem como sistemas de liberação para fármacos do tipo reservatório (OLIVEIRA et al., 2004).

Ao se misturar moléculas de tensoativo, seja em água ou óleo, formam-se soluções isotrópicas de agregados micelares que se auto-organizam, sem uma ordem orientacional, chamadas de microemulsões e emulsões. Com o aumento de uma das fases, pode-se formar uma variedade de tipos de sistemas, inclusive aqueles que se caracterizam principalmente pela presença de ordem orientacional e diferentes geometrias como os cristais líquidos (HYDE, 2001; EZRAHI et al., 1999).

Sistemas microestruturados, sejam eles, microemulsões ou cristais líquidos, podem aumentar significativamente a solubilidade de antibióticos, funcionando como sistema reservatório que proporciona atividade terapêutica mais intensa e por tempo prolongado, além de um excelente meio de solubilização de compostos polares e apolares, suportando altas concentrações de fármaco nas fases aquosas e oleosas (OLIVEIRA et al., 2004; FORMARIZ

et al., 2004). De acordo com esses pesquisadores a liberação de substâncias ativas dissolvidas na fase interna desses sistemas é mais lenta em relação ao fármaco livre, mostrando a habilidade desse tipo de agregado como sistema reservatório que pode promover efeito prolongado, proporcionando liberação constante e regular numa faixa de tempo mais ampla, quando comparada ao controle.

Um diagrama de fases descreve em que, condição experimental, é possível obter as microemulsões, regiões limites de transição de fases entre emulsão, fases separadas e microemulsões A/O e O/A (OLIVEIRA et al., 2004), além de outros tipos de sistemas microestruturados como os cristais líquidos. Portanto, uma variedade de fases internas com potencial para serem usadas como sistemas de liberação de fármacos, podem se formar quando se estrutura combinações de tensoativo, água e óleo em escala microscópica. Como ilustrado na figura 7;

Formulações microestruturadas têm se mostrado superiores para ambas, liberação transdermal e dermal de compostos particularmente lipofílicos, mas também compostos hidrofílicos parecem beneficiar-se pela aplicação em sistemas microestruturados comparado a veículos convencionais como hidrogéis, emulsões e lipossomas (KREILGAARD, 2002).

Hoar e Schulman, em 1945, definiram microemulsões, como formulações espontâneas translúcidas que ocorrem quando misturado óleo, água e tensoativo, combinado ou não com um co-tensoativo, geralmente um álcool de cadeia média. O tipo de emulsão produzida depende das propriedades do óleo, dos agentes tensoativos utilizados (ANSEL et al., 2000; SOLANS et al., 1997; KUMAR et al., 1999; MOULIK, et al., 1998) e da adição de um álcool de cadeia média, em proporções corretas, tornando o sistema transparente. (KUMAR et al., 1999).

Desse modo, microemulsões são misturas isotrópicas, termodinamicamente estáveis e opticamente transparentes, um sistema bifásico de óleo em água, estabilizados em uma única

fase macroscopicamente homogênea e microscopicamente heterogênea com tensoativos (ANSEL et al.,2000; KUMAR et al., 1999; SOLANS et al.,1997; LAWRENCE et al.,2000; MOULIK et al.,1998). Portanto, os componentes tensoativos (diminuem a tensão interfacial ou superficial) encontram seu papel fundamental na estabilidade farmacotécnica de emulsões e microemulsões (OLIVEIRA e SCARPA, 2001).

A formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de 3 a 5 componentes, tais como; tensoativo, fase aquosa, fase oleosa, e quando necessário, o co-tensoativo, sendo que a orientação para sistemas O/A e A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo, traduzidas principalmente pelo seu EHL (OLIVEIRA et al., 2004).

Sabe-se qualitativamente que outros fatores determinam quando o sistema formado, é O/A ou A/O. Sendo muito comum que a fase com menor volume forme as gotículas e a de maior volume, a fase contínua. (LAWRENCE et al, 2000).

As microemulsões diferem das emulsões comuns por serem opticamente transparentes, e principalmente pela estabilidade termodinâmica, pois, o sistema forma-se espontaneamente, quando a energia remanescente da interface é muito próxima a zero (OLIVEIRA e SCARPA, 2001).

O equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) é usado para se conhecer a contribuição relativa dos fragmentos hidrofílicos e lipofílicos das moléculas do tensoativo. Geralmente tensoativos com EHL baixo (3-6) formam microemulsões A/O e tensoativos com EHL alto (8-18) formam microemulsões O/A. Tensoativos iônicos com EHL maior que 20, freqüentemente precisam de um co-tensoativo, para reduzir seu valor de EHL (LAWRENCE et al., 2000).

As vantagens normalmente citadas para o uso de microemulsões na administração de medicamentos são: absorção oral mais rápida e eficiente do que as formas farmacêuticas

sólidas, melhor absorção transdérmica por maior difusão da substância ativa na pele, inigualável potencial de aplicação no desenvolvimento de eritrócitos artificiais e no direcionamento de medicamentos citotóxicos para células cancerosas (ANSEL et al., 2000).

Outro sistema que tem merecido destaque na liberação de fármacos são os cristais líquidos.

Os cristais líquidos são caracterizados por apresentarem um grau de ordem molecular intermediário, entre a ordem orientacional e posicional de longo alcance dos sólidos cristalinos e a desordem de longo alcance dos líquidos isotrópicos e gases (BECHTOLD, 2005). São substâncias que escoam como líquidos viscosos, mas suas moléculas ficam em um arranjo moderadamente ordenado, semelhante ao de um cristal (ATKINS e JONES, 2006), ou seja, um estágio intermediário da matéria. Por estarem classificados entre sólidos cristalinos e líquidos, também são chamados de *mesofases*, o prefixo *meso* significa intermediário (HYDE, 2001).

O fato das suas moléculas estarem ordenadas torna os cristais líquidos anisotrópicos (ATKINS e JONES, 2006). Alguns cristais líquidos, como os de organização lamelar e hexagonal, apresentam anisotropias em suas propriedades ópticas, elétricas e magnéticas, semelhantes às de sólido cristalino anisotrópico, e propriedades mecânicas semelhantes aos líquidos, o que caracteriza sua fluidez. São classificados em mesofases essencialmente por causa de sua simetria e grau de ordenamento. Dessa forma, as mesofases líquido-cristalinas são caracterizadas pelos graus de liberdade que a molécula de cristal líquido apresenta, através de simetria de rotação e translação (BECHTOLD, 2005).

As mesofases liotrópicas podem ser consideradas um arranjo molecular de micelas ordenadas, caracterizadas por domínios hidrofóbicos e hidrofílicos alternadamente. Conforme o aumento da concentração do tensoativo, diferentes formas líquido-cristalinas podem se formar, como hexagonais, lamelares e cúbicas (GABBOUN et al., 2001).

A forma lamelar (L_{α}) é formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo, alternadas por camadas de água, formando uma rede unidimensional. Enquanto que na forma hexagonal (H_I ou H_{α}) ou hexagonal reversa (H_{II}) os constituintes da formulação arranjam-se em formato de extensos cilindros, formando estruturas bidimensionais (WANG et al., 2006; EZRAHI et al., 1999; AMARAL et al., 1992). As formas cúbicas (I_1) apresentam estruturas mais organizadas e de difícil visualização através do microscópio óptico de luz polarizada, em relação as demais formas (WANG et al., 2006).

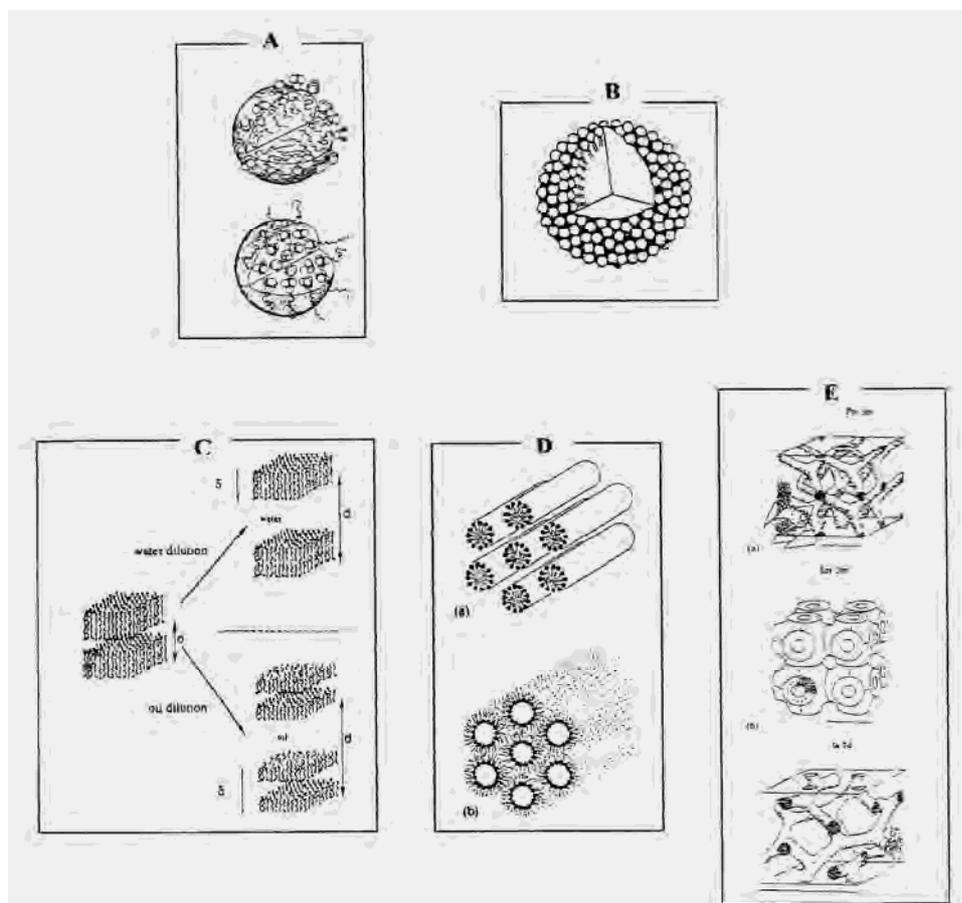


Figura 7: A- micela normal e reversa; B- microemulsão O/A; C- fase lamelar; D- fase hexagonal e hexagonal reversa e E- fase cúbica (EZRAHI et al., 1999).

Os materiais que apresentam mesofases líquido-cristalinas se dividem em duas grandes categorias, de acordo com os parâmetros mais relevantes nas transições de fases; os termotrópicos e os liotrópicos (BECHTOLD, 2005).

Os cristais líquidos (CLs) termotrópicos são constituídos por substâncias orgânicas, compostas por substâncias anisométricas (BECHTOLD, 2005). Ao serem aquecidos acima de uma temperatura característica tornam-se líquidos isotrópicos, porque as moléculas adquirem energia suficiente para vencer as atrações que restringem seus movimentos (ATKINS e JONES, 2006). Sua importância não está apenas nos aspectos de pesquisa básica, mas também por suas aplicações tecnológicas. Podem ser caracterizados pelo grau de desordem que sofrem com o aumento da temperatura (BECHTOLD, 2005).

As primeiras observações de CLs liotrópicos foram feitas por Elliott e Ambrose em 1950, quando observaram a formação de uma fase líquida birrefringente. Estes CLs são sistemas químicos compostos por dois ou mais constituintes. São misturas de compostos anfifílicos em um solvente, em geral a água (BECHTOLD, 2005). Formam estruturas em camadas que resultam da ação de um solvente sobre um sólido ou um líquido, como soluções de detergentes e lipídeos em água (ATKINS e JONES, 2006).

Nessa mistura liotrópica de moléculas anfifílicas, acima de uma concentração chamada concentração micelar crítica (CMC), formam-se aglomerados de moléculas que podem assumir formas e dimensões diferentes, chamadas *micelas*. Nas micelas, as cabeças hidrofóbicas estão localizadas em permanente contato com a água, enquanto que as caudas hidrofóbicas são mantidas no interior da micela sem contato com o solvente, e mesmo após o aparecimento de micelas, continua havendo moléculas anfifílicas dispersas na solução. Se utilizarmos solventes não-polares, serão formadas *micelas reversas*, onde a cauda fica na parte externa da micela em contato com o solvente e a cabeça polar no interior (BECHTOLD, 2005).

Investiga-se a estrutura micelar das fases liotrópicas e a sua similaridade com a membrana celular e estruturas do interior da célula (BECHTOLD, 2005), devido folhas espontaneamente formadas por tensoativo e água, nas quais as moléculas estão alinhadas em fila formando uma camada dupla (ATKINS e JONES, 2006).

A classificação das mesofases, feita por Friedel em 1922 (Figura 8), de acordo com suas propriedades estruturais e ordem molecular, propôs a divisão em três classes tanto para liotrópicos como para termotrópicos; *mesofase nemáticas*, as moléculas ficam juntas, todas na mesma direção, mas não alinhadas. Do ponto de vista da estrutura molecular, possuem ordem orientacional de longo alcance onde as moléculas se orientam paralelas entre si; *mesofase colestérica*, as moléculas formam camadas ordenadas porém as camadas vizinhas tem moléculas em ângulos diferentes. A estrutura líquido-cristalina é formada por moléculas quirais. *Mesofase esmética*, as moléculas se alinham e formam camadas paralelas, apresentam ordem posicional ao longo de uma dimensão, onde as moléculas estão organizadas em camadas periódicas com ordem bem definida no interior das camadas, conforme Figura 8. Além destas fases líquido-cristalinas existem muitas outras como: colunares, cúbicas, hexagonais, etc. (BECHTOLD, 2005; ATKINS e JONES, 2006).

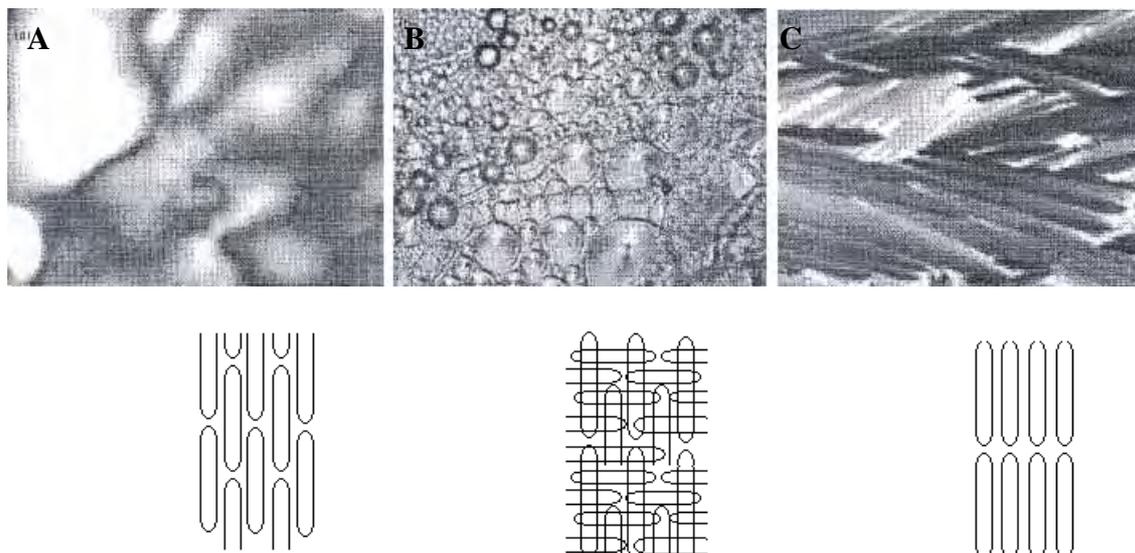


Figura 8: Texturas líquido-cristalinas típicas, observadas em um microscópio óptico de luz polarizada. A- nemática; B- colestérica; C- esmética (BECHTOLD, 2005).

A microscopia de luz polarizada é uma técnica muito usada, que permite estudar estruturas designadas por anisotrópicas e birrefringentes. Fundamenta-se em um campo elétrico de raio luminoso polarizado que uma substância birrefringente é capaz de provocar (RESENDE, 2004).

O microscópio de luz polarizada é um microscópio óptico comum, onde junto ao condensador se coloca um polarizador, que orienta as ondas luminosas provenientes da fonte de luz em uma só direção, em um só plano. As alterações que uma substância birrefringente provoca na direção da propagação da luz, em um equipamento desse tipo, são feitas graças ao analisador, um segundo sistema de polarização, junto a ocular. O máximo de luz é obtido quando o polarizador e analisador estão com eixos em paralelo e, ao contrário, a luz extingue quando são perpendiculares (ABRAMOWITZ et al, 2005).

O fenômeno de difração é importante para o conhecimento sobre a estrutura cristalina dos sólidos, através de interferência entre ondas que surge quando existe um objeto em seu

caminho. A difração ocorre quando o comprimento de onda da radiação é comparável aos espaçamentos característicos do objeto que causa a difração (ATKINS e JONES, 2006).

Os raios-X são gerados na aceleração de elétrons até velocidades muito altas. Na difração de raios-X que utiliza a radiação intensa de uma fonte, na qual os elétrons são acelerados em um círculo por campos eletromagnéticos (ATKINS e JONES, 2006).

Luz síncrotron é a intensa radiação eletromagnética produzida por elétrons de alta energia num acelerador de partículas. A luz síncrotron abrange uma ampla faixa do espectro eletromagnético, tais como: Raios-X, Luz Ultravioleta e Infravermelha, além da Luz Visível, que sensibiliza o olho humano, são emitidas pela fonte. Essa luz é utilizada na descoberta de novas propriedades físicas, químicas e biológicas existentes em átomos e moléculas, os componentes básicos de todos os materiais (www.lnls.br).

A irradiação ocorre através de uma amostra relativamente fina, colocada perpendicularmente a um feixe monocromático (luz visível, raios-X, nêutrons, elétrons), onde pode-se observar, na vizinhança angular próxima ao feixe transmitido, o espalhamento de suas partículas a baixos ângulos (URBAN, 2004).

Em análises semi-quantitativas de valores de espalhamento, o parâmetro estrutural d , corresponde à distância média entre as partículas, dada pela equação:

$$d = 2\pi / q_{max} \quad (\text{Eq. 1})$$

Na qual; q é o vetor de espalhamento e q_{max} correspondente à intensidade de espalhamento máxima.

Esta equação é usada em sistemas ordenados, pois a distância média depende em particular do tipo do arranjo encontrado em cada partícula do sistema (CRAIEVICH, 2001).

Através das curvas de SAXS, podem se obter informações sobre o tamanho, forma, quantidade e o arranjo dos objetos espalhadores dos raios-X no sistema estudado.

A técnica de SAXS é utilizada na caracterização de sistemas e confirmação de dados semelhantes aos obtidos por outras técnicas de caracterização, além de possibilitar determinar o tamanho médio das partículas espalhadoras e a distância entre elas (URBAN, 2004).

No âmbito das ciências biológicas e farmacêuticas, a reologia ou caracterização reológica é indispensável para o entendimento de diferentes fenômenos, muitos deles essenciais a vida, eficácia dos medicamentos e dos processos tecnológicos. As características reológicas de um produto estão associadas a aspectos de absorção e biodisponibilidade de um fármaco, bem como a escolha correta dos equipamentos a serem usados na sua produção (NERTZ e ORTEGA, 2002).

A instabilidade física das formulações pode ser detectada, em alguns casos, por uma mudança na aparência como, por exemplo, na textura. O estudo científico desse tipo de estabilidade vem sendo feito principalmente através da reologia (LEONARDI, 2004).

O termo reologia, do grego rheo (fluxo) e logos (ciência) foram sugeridos para descrever as deformações de sólidos e a fluidez de líquidos. Viscosidade é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo: quanto maior a viscosidade, maior a resistência ao fluxo (NERTZ e ORTEGA, 2002; ALMEIDA, et al. 2003; LEONARDI, 2004; WOOD, 2001).

A reologia descreve as deformações de um corpo sob a influência de tensão. Sólidos ideais se deformam elasticamente, assim, a energia requerida para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida, enquanto que os líquidos ideais, tais como, líquidos e gases, deformam-se irreversivelmente, fluem. A energia requerida para a deformação é dissipada sob forma de calor e não pode ser recuperada pela remoção da tensão (SCHRAMM, 2006).

A reologia tem sido assunto de grande e crescente importância para a indústria farmacêutica e cosmética, tendo em vista que a consistência e o espalhamento dos produtos devem ser reproduzidos de lote para lote, assegurando a qualidade tecnológica do produto

acabado. Além disso, a aceitação de produtos por parte do consumidor depende, principalmente, da eficácia e das qualidades sensoriais do produto, ambas influenciadas pela reologia (LEONARDI, 2004).

Nos estudos de reologia, existem os sistemas denominados newtonianos e os não newtonianos. O fluxo newtoniano caracteriza-se por viscosidade constante, independente da tensão de cisalhamento aplicada. Os fluidos newtonianos apresentam baixa interligação molecular (alguns líquidos e gases de baixa densidade, como a água).

A viscosidade em sistemas não-newtonianos não é constante e depende, além da temperatura, que a diminui através da redução da atração entre as moléculas (WOOD, 2001), de outros fatores tais como: forma de preparação, manuseio e tempo de repouso, bem como, dispersões heterogeneas, sólidas e líquidas, como dispersões coloidais, emulsões, suspensões líquidas, assim como pomadas e unguentos (NERTZ e ORTEGA, 2002).

A viscosidade (η), representada pela equação 2, é um expressão de resistência ao fluxo (deformação ou escoamento). Quanto maior a viscosidade, maior a resistência, e esta é dada pela razão entre a tensão de cisalhamento aplicada (τ) e o gradiente de cisalhamento (γ), sendo diretamente proporcional a temperatura (WOOD, 2001).

$$\eta = \tau / \gamma \quad (\text{Eq. 2})$$

Na qual:

η é a viscosidade

τ = tensão de cisalhamento

γ = gradiente de cisalhamento

O fluxo não-newtoniano caracteriza-se por mudança de viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento e é representado por três tipos de curvas de consistência (Figura 9); fluido plástico, também conhecido como fluido de Bingham, que só começa a escoar a partir

de uma determinada tensão aplicada, logo, este precisa de uma tensão inicial mínima; fluido pseudoplástico, apresenta maior resistência ao escoamento no início, ou seja, com baixa tensão de cisalhamento; representado por uma curva tendo como origem o zero, ao contrário do fluido dilatante que apresenta baixa viscosidade (pouca resistência) frente à baixa tensão de cisalhamento (SCHOTT, 1995; ANSEL et al., 2000; NERTZ e ORTEGA, 2002; ALMEIDA, et al. 2003; LEONARDI, 2004).

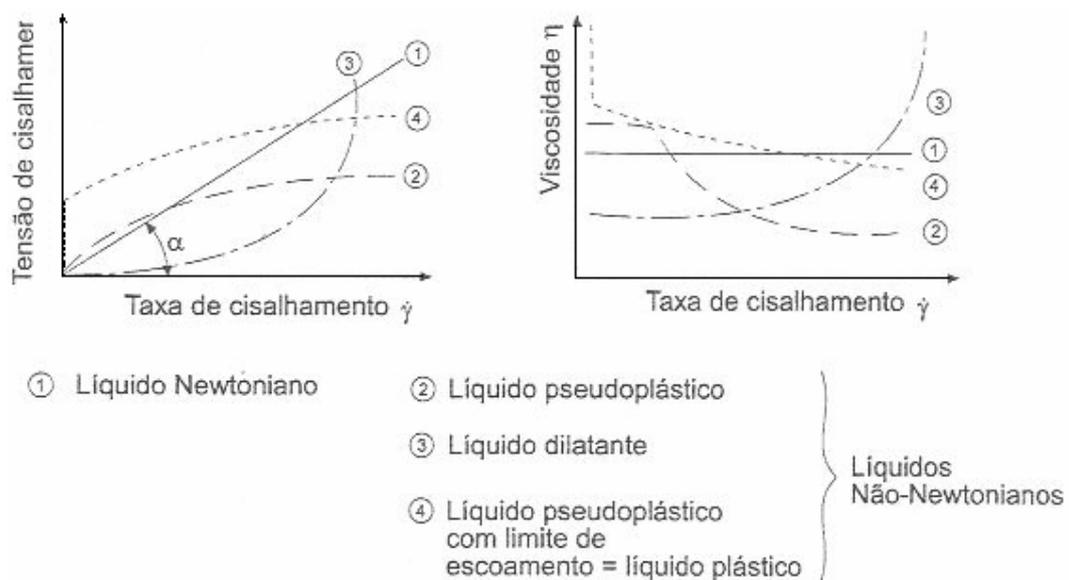


Figura 9: Vários tipos de comportamento de fluxo (SCHRAMM, 2006).

Considerando aspectos de estrutura molecular, observa-se que a maioria das substâncias geradoras de sistemas pseudoplásticos é composta por cadeias poliméricas lineares, que, quando hidratadas ou solvatadas, tendem a estruturar-se de acordo com o sentido da força de cisalhamento aplicada e isso se manifesta como uma diminuição da viscosidade a medida que aumenta a força ou a tensão de cisalhamento (NERTZ e ORTEGA, 2002; SCHRAMM, 2006).

Para obter os reogramas fazem-se, inicialmente, as medidas de velocidade de cisalhamento aumentando-se a tensão de cisalhamento progressivamente a fim de se obter a curva ascendente e depois se repete o procedimento ao contrário, ou seja, vai diminuindo-se a tensão de cisalhamento, para obtenção da curva descendente (LEONARDI, 2004).

Os reogramas podem apresentar-se com as curvas ascendente e descendente sobreponíveis (sem tixotropia) ou não sobreponíveis (com tixotropia). As curvas não sobreponíveis resultam numa área conhecida como área de histerese. A área entre as curvas representa a medida de tixotropia, ou seja, quanto maior a área, maior a tixotropia (LEONARDI, 2004). O fluxo tixotrópico é uma transformação gel-sol reversível (ANSEL et al., 2000; SCHRAMM, 2006).

Tixotropia é uma propriedade importante em formas farmacêuticas líquidas e semi-sólidas que caracteriza um medicamento mais consistente quando em repouso, mas de elevada fluidez quando agitado pelo paciente. Logo, esse fenômeno está associado a uma recuperação lenta da consistência do material, perdida pelo cisalhamento através do retorno das ligações quebradas, redefinindo sua estrutura (WOOD, 2001) e desenhado pela curva de histerese (NERTZ e ORTEGA, 2002). A obtenção de formulações com caráter tixotrópico é bastante interessante, pois como elas se deformam durante a aplicação tornando-se mais fluidas e facilitam assim, o espalhamento e recuperam a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra. Além disso, o produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira (“shelf-life”), pois durante o armazenamento, como apresenta viscosidade constante, dificulta a separação dos constituintes da formulação (LEONARDI, 2004; WOOD, 2001).

A determinação da viscosidade e do comportamento reológico de produtos semi-sólidos assumem cada vez mais importância, pois, permitem compreender melhor a natureza físico-química do veículo, controlam a qualidade de matérias-primas e produtos acabados, e

ainda, através desses estudos pode-se verificar o efeito da consistência do produto na liberação e penetração cutânea de substâncias ativas (LEONARDI, 2004).

O comportamento reológico de corpos reais que não se comportam nem como sólidos ideais e nem como fluidos ideais podem ser analisados através de medidas de fluência e relaxamento. A grande maioria dos líquidos classifica-se em uma região entre líquidos e os sólidos: eles são elásticos e viscosos e, por isso, podem ser chamados de viscoelásticos (SCHRAMM, 2006). Conforme pode ser observado no esquema apresentado na Figura 10;

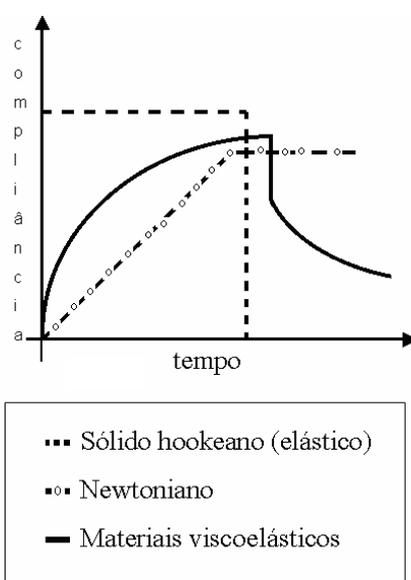


Figura 10: Perfis de curvas reológicas para líquidos newtonianos, sólidos hookeanos e materiais viscoelásticos.

O termo viscoelasticidade é usado para descrever comportamento de materiais, os quais apresentam comportamento intermediário entre os elásticos clássicos extremos, que são chamados de sólidos hookeanos e líquidos newtonianos. Materiais viscoelásticos têm simultaneamente propriedades elástica e viscosa (KORHONEN, 2003). É possível saber se um material é mais elástico ou viscoso através dos valores de compliância que o mesmo

apresenta. Dessa forma, quanto maior a compliância durante a recuperação, mais viscoso é o material, como representado na figura 11;

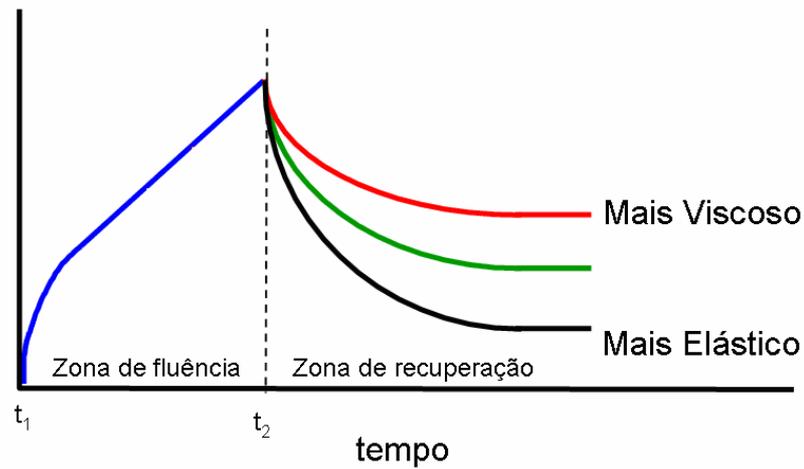


Figura 11: Gráfico de fluência e relaxação. Dentre os corpos viscoelásticos, eles podem ser classificados durante a recuperação em: mais elásticos (ou seja, sólido viscoelástico) ou mais viscosos (líquidos viscoelásticos).

Fonte: dp-UNION-TS instruments.

2. OBJETIVOS

- Obtenção e caracterização do sistema, utilizando tensoativo não-iônico, água e fase oleosa.
- Determinar a região de existência de sistemas líquido-cristalinos, através da construção do diagrama pseudoternário de fases.
- Caracterização física do sistema de interesse
- Estudo da estabilidade física desse sistema
- Estudo da estabilidade química e física do fármaco no sistema;
- Estudo da liberação *in vitro* do fármaco no sistema.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.2 Reagentes e Solventes

- Água purificada Milli-Q
- Polymol ADB (adipato de dibutila)-Polytechno/Brasil
- Procetyl AWS (álcool cetílico propoxilado e etoxilado)- Volp indústria e comercio LTDA.
- Eritromicina base (grau farmacêutico) - Galena
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2O_4) - MILLINCKRODT AR
- Fosfato de potássio dibásico P.A. anidro (K_2HPO_4) – Vetec química fina LTDA
- Acetonitrila (CH_3CN) grau HPLC – J.T.BAKER
- Ácido fosfórico P.A. – B. HERZOG Comércio e indústria S.A.
- Hidróxido de sódio (Synth)
- Álcool butílico terciário P.A. ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)- Vetec química fina LTDA
- Metanol grau HPLC – J.T.BAKER.
- Octanol (Sigma –Aldrich) grau HPLC (99%)

3.1.3 Equipamentos

- Agitador Magnético SELECTA[®], mod. MULTIMATIC 9S
- Balança analítica - OHAUS[®], mod. AP250D
- Purificador de água MILLIPORE – mod. Milli-Q Plus
- Refratômetro Carl Zeiss Jena
- Microscópio óptico Lio Serum (aumento 10X)
- Microscópio óptico Leica Leitz DMRXE de luz polarizada
- Reômetro modelo Carri–Med CLS rheometer – DP union
- Lavadora ultra-sônica-(ultrasonic cleaner UNIQUE)
- Estufas de secagem e esterilização FANEM mod. 315SE e SOC.FABBE
- Infravermelho com transformada de Fourier – SHIMADZU[®], mod.FTIR 8300
- Centrifuga Sorvall mod. TC
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - SHIMADZU mod. LC-9A acoplado a detector espectrofotométrico UV-VIS mod. SPD-6AV- SHIMADZU.
- Bomba de vácuo
- Coluna 250 x 4,6 mm- VARIAN- mod. Hypersil 5 ODS de fase reversa.
- Sistema filtrante (membrana de 0,45 µm de acetato de celulose)
- Condutivímetro - conductivity meter 441 - CORNING
- Dissolutor – Dissolution Hanson Research[®] - mod. SR8 Plus
- Célula dedifusão, membrana de acetate de cellulose (MILLI-Q)

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização da eritromicina

3.2.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Com a finalidade de identificar algumas funções químicas características, a espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada. A amostra foi misturada em brometo de potássio (KBr) e compactada para obtenção de pastilhas de KBr mais fármaco. O espectro de infravermelho foi obtido através do aparelho SHIMADZU FRTI-8300, na região entre 400 e 4.000cm^{-1} , através de modos vibracionais dos grupos funcionais gerados ao absorverem radiação.

3.2.2 Construção do Diagrama de Fases

A construção do diagrama de fases partiu da preparação de formulações iniciais, com determinadas proporções de tensoativo não-iônico (álcool cetílico etoxilado 20 OD e propoxilado 5 OP), fase oleosa (adipato de dibutila) e água purificada, como ilustrado na Figura 12. Cada uma dessas formulações foi preparada por pesagem dos três constituintes, seguidos de homogeneização.

Diariamente foi adicionado $0,1$ mL de água a essas formulações iniciais, as quais foram agitadas manualmente, seguidas de aquecimento em banho-maria, também sob agitação manual, num intervalo de 1 à 2 minutos à 50°C , suficientes para solubilizar todos os componentes. As formulações foram deixadas em repouso por 24 horas a temperatura ambiente para que os sistemas se estabilizassem e para que o ar incorporado fosse

espontaneamente eliminado. Decorridas as 24 horas as formulações foram observadas e classificadas em diferentes sistemas. A adição de água foi realizada até que se completasse 99% de fase aquosa.

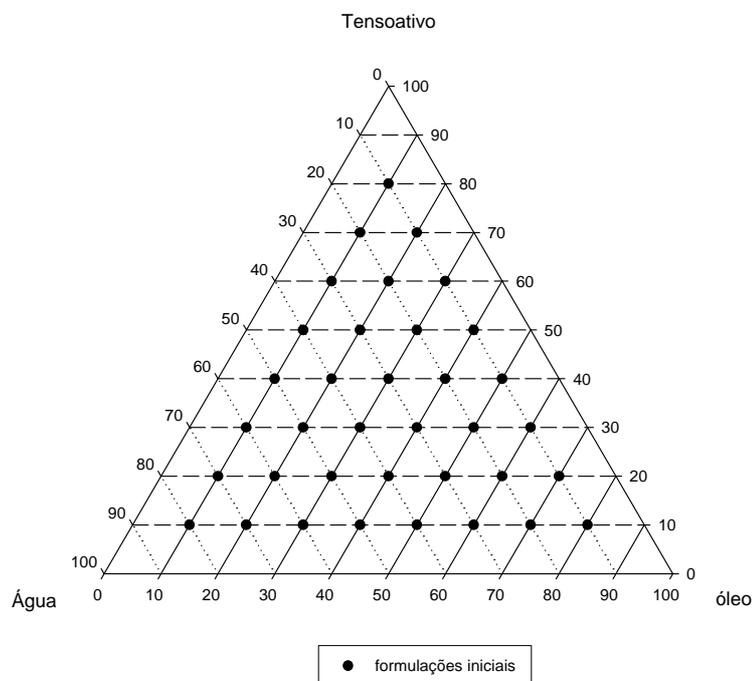


Figura 12: Diagrama de fases referente as formulações iniciais de onde partiram as adições de água purificada. As linhas (...) representam à fase aquosa, as linhas (___) a fase oleosa e as linhas (---) a fase tensoativa.

3.2.3 Formulações Escolhidas

Um sistema de liberação destinado à aplicação facial da eritromicina para o tratamento da acne, deve possuir viscosidade considerável para que a formulação possa ter aplicação em uma área definida, fase oleosa e tensoativa mínimas com o intuito de tornar o sistema menos irritante e mais agradável ao toque e o menos engordurante possível, uma vez que o veículo destina-se a pessoas com problemas muitas vezes relacionados à oleosidade excessiva da pele, fator esse, causador e agravador da acne. Assim, as formulações da Tabela 2 foram

selecionadas para serem caracterizadas e estudadas como veículo para administração cutânea da ER.

Tabela 2: Formulações selecionadas e respectivas porcentagens de cada componente da formulação e classificações

AMOSTRAS	PROCETYL (%)	ADIPATO (%)	ÁGUA (%)	CLASSIFICAÇÃO
F1	45	5	50	SMT
F2	50	5	45	SMT
F3	55	5	40	SMT
F4	60	5	35	SMT

SMT (sistema microestruturado)

3.2.4 Incorporação da eritromicina nos Sistemas

A incorporação de 2% (p/p) do fármaco nos sistemas foi realizada a 25°C triturando a eritromicina com um pistilo em um gral, onde foi acrescentado individualmente e lentamente cada formulação, homogeneizando. Ao término da incorporação, cada sistema foi observado a olho nú buscando alguma alteração na transparência do sistema, como turvação e também em microscópio óptico (Lio Serum), aumento de 10 vezes, para observar se houve total dissolução dos cristais de ER. Realizou-se também um controle negativo, ou seja, cada sistema microestruturado sem o fármaco, foi igualmente observado para possíveis comparações (REZENDE, 2004).

3.2.5 Caracterização Física

3.2.5.1 Índice de Refração

A determinação do índice de refração das amostras foi realizada utilizando-se um refratômetro Carl Zeiss Jena, em sala climatizada a 20°C, usando água destilada como líquido padrão, cujo índice de refração a 20°C é de 1,3330 (KOROLKOVAS, 1988).

Conforme metodologia descrita na farmacopéia brasileira (1997), as leituras foram realizadas em triplicata, colocando-se quantidade suficiente de cada amostra individualmente para cobrir a face do prisma (KOROLKOVAS, 1988). A leitura foi efetuada um dia após a preparação das amostras.

3.2.5.2 Condutividade Eletrolítica

Os ensaios no condutivímetro CORNING foram realizados em triplicata, conforme metodologia da Farmacopéia Britânica, 2001.

3.2.5.3. Microscopia de Luz Polarizada

As amostras com e sem ER, foram observadas em microscópio de luz polarizada Leica Leitz DMRXE, com auxílio de lâmina e lamínula, um dia após a mistura das fases, como descrito anteriormente.

3.2.5.4. Reologia

O comportamento reológico das amostras foi determinado em reômetro modelo CSL CARRI-MED a 25°C e 37°C.

Os parâmetros do processo encontram-se relatados abaixo:

- Medida de escoamento: Fluxo
- Temperatura: 25 °C e a 37 °C
- Distância entre as placas: 200 µm
- Diâmetro da placa utilizada: 2 cm
- Gradiente de Velocidade crescente: 0 a 300 1/s;
- Gradiente de Velocidade decrescente: de 300 a 0 1/s.

Além das medidas de escoamento de fluxo, foi realizada a reologia com medidas de fluência e relaxação, com o intuito de estudar a viscoelasticidade dos sistemas.

Os parâmetros para determinação da região viscoelastica linear (RVL) foram: bn

Medida de escoamento: Fluência e relaxação

- Temperatura: 25 °C
- Distância entre as placas: 200 µm
- Frequência: 1 Hz
- Região de fluência utilizada: 50 Pa.
- Valor inicial: 0,1 Pa.
- Valor final: 100,0 Pa.
- Diâmetro do cone utilizado: 2 cm
- Tempo: 180 segundos.

3.2.5.5 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A análise estrutural das formulações em função do teor das fases tensoativa e aquosa, foi realizada por SAXS. Os resultados foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, na estação de medidas D11-A SAS, a qual é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1,608 Å.

O espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra foi subtraído da intensidade total da amostra.

3.2.6 Estabilidade Física dos Sistemas

3.2.6.1 Teste de Prateleira e Estabilidade Preliminar das Formulações

O teste de prateleira é realizado a temperatura ambiente (25° C), enquanto que o estudo de estabilidade preliminar é realizado a temperaturas superiores a esta, em estufas por 90 dias. Dessa forma, as formulações foram acondicionadas em frascos de vidro transparente com tampa garantindo a vedação e colocadas em estufas com temperaturas controladas de 25 +/- 2° C, 45 +/- 2° C e 60 +/- 2° C (GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004)

A avaliação da estabilidade física dessas formulações frente à centrifugação, deu-se por 30 minutos a 3.000 rpm $RCF = 2.550,717 \times g$, a 25° C, em centrífuga Sorvall mod. TC, utilizando 3g de cada formulação com e sem o fármaco, avaliadas em intervalos de tempo, T:0, T:45 e T:90 (dias) (GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004). O mesmo se deu para os ensaios de pH, viscosidade e estruturação interna através

microscopia de luz polarizada, bem como os organolépticos; tato, cor, aspecto e odor, avaliados nesses mesmos intervalos.

3.2.7 Metodologia Analítica para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.2.7.1 Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas experimentais encontram-se na Farmacopéia Americana (2006). Porém, houve necessidade de serem feitas algumas adaptações durante as análises.

- Coluna cromatográfica: Hypersil C18 de fase reversa, Varian
- Composição da fase móvel: solução A: acetonitrila: água (5:2:1), a: solução A é composta por 77% de fase aquosa (tampão fosfato e água) 20% álcool butílico terciário e 3% acetonitrila .
- Vazão da fase móvel: 1,0 ml/min.
- Comprimento de onda: 215nm
- Volume de injeção: 20µL
- Temperatura da coluna: 65° C
- Detector espectrofotométrico: UV-VIS

A fase móvel foi previamente filtrada em membrana de acetato de celulose 0,45µm e em seguida, deaerada através de banho de ultra-som, por 30 minutos.

3.2.7.2 Validação da metodologia analítica

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma validação. Independente da originalidade do método analítico empregado no controle de medicamentos, todos devem ser previamente

validados. A validação é uma documentação exigida pela legislação para comprovação de que determinado processo ou método é adequado e confiável (GIL, et al., 2005).

Exatidão

A exatidão foi determinada pela recuperação, adicionando-se quantidades pré-estabelecidas do padrão a amostra. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado foi determinado pela razão do valor encontrado na análise da amostra simulada pela quantidade real adicionada do padrão, multiplicada por 100 (ICH, 1996).

A exatidão é expressa pela equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

A exatidão depende e esta relacionada com a seletividade, linearidade do método, validação dos padrões utilizados, calibração da instrumentação e condições de recuperação.

Precisão

Precisão é definida pelo grau de repetibilidade entre os valores obtidos. Dessa forma relacionou-se a repetibilidade dos resultados obtidos em uma mesma análise, ou reprodutibilidade do método quando executado em diferentes condições. É estabelecida durante o estágio de desenvolvimento do produto (GIL, et al., 2005).

A precisão é expressa pela fórmula:

$$\text{CV\%} = \frac{\text{desvio-padrão}}{\text{Média}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Robustez e Resistência

Relacionam-se á precisão a vulnerabilidade que o método tem de ser afetado por pequenas variações das condições de ensaio, ambientais ou operacionais, tais como; temperatura, pH, grau de pureza dos reagentes e até iluminação ambiente (GIL, et al., 2005).

A robustez foi estabelecida durante todo o desenvolvimento do ensaio.

Especificidade ou Seletividade

A capacidade que o método teve de avaliar de forma inequívoca a ER em uma mistura de água purificada, adipato dibutila e tensoativo, foi determinada através do exame da solução padrão do fármaco e amostra, ou o padrão na presença de componentes que possam interferir na sua determinação (GIL, et al., 2005). É expressa pela concordância entre resultados obtidos para solução-padrão e amostra.

A especificidade é expressa pela equação:

$$\% \text{ concordância (C\%)} = \frac{\text{teor de solução-padrão}}{\text{teor de solução-amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq.5})$$

Sensibilidade

Definida como a capacidade que o método tem de avaliar baixas concentrações de um determinado analito (GIL, et al., 2005).

Limite de detecção (LD) é a mais baixa concentração detectável pelo método (semi-quantitativo). (equação 6).

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser determinada quantitativamente por um método. (equação 7).

$$LD = \frac{\text{desvio-padrão médio} \times 3}{\text{inclinação da reta}} \quad (\text{Eq.6})$$

$$LQ = \frac{\text{desvio-padrão médio} \times 10}{\text{inclinação da reta}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da curva analítica da ER. Preparou-se uma solução padrão em fase móvel na concentração de 4000µg/mL. Em seguida, foram obtidas as diluições de 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL. Essas soluções foram filtradas em membrana de acetato de celulose (0,22 µm) e analisadas por CLAE.

Para cada concentração foram realizadas 3 determinações. Os resultados foram utilizados para o cálculo de regressão linear (ICH, 1996).

3.2.7.3 Curva Analítica

Para a quantificação da eritromicina, foi construída curva analítica em fase móvel composta por solução A: acetonitrila: água (5:2:1), a: solução A é composta por 77% de fase aquosa (tampão fosfato e água) 20% álcool butílico terciário e 3% acetonitrila. Partiu-se de uma solução padrão (estoque) de ER, na concentração de 4000µg/mL. Foram preparadas diluições a partir dessa solução; 2000µg/mL, 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL,

62,5 µg/mL, as quais foram filtradas em membrana 0,22µm de poro. As análises foram realizadas em triplicata. A média das áreas dos picos obtidos foram relacionada diretamente com as suas respectivas concentrações e colocadas em gráfico, e a equação de reta calculada.

3.2.8 Estabilidade Química da Eritromicina no Sistema

Alíquotas de 0,5g das formulações mantidas em estufas a temperaturas 25 e 60 °C, foram tomadas e solubilizadas primeiramente em 5mL de acetonitrila, e em seguida, completado o volume para 25 mL em balão volumétrico com fase móvel. Essas amostras foram filtradas em membrana com poros de 0,22 µm e submetidas à análise por CLAE, em intervalos de sete dias, num total de 13 semanas. A estabilidade da ER frente à alta temperatura foi calculada, através da curva analítica, utilizando as áreas encontradas para cada concentração.

3.2.9 Coeficiente de Partição óleo/água

Com o objetivo de traçar um perfil de penetração cutaneamente da ER, determinou-se o coeficiente de partição octanol/água do fármaco, preparando uma solução aquosa de eritromicina a 20%, a qual foi submetida à agitação constante por 12 horas. Posteriormente essa solução foi filtrada em membrana de acetato de celulose 0,22µm.

Uma alíquota (3mL) dessa solução foi misturada em octanol 1:1 (v/v) e submetida a agitação em funil de separação, por 30 minutos.

Após esse período, essa mistura foi deixada em repouso para a separação das fases. A fase aquosa foi retirada e submetida à centrifugação por 30 minutos a 3800 rpm, cuja RCF (Relative Centrifugal Force) é 2.550,717 x g ou G, para separação do sobrenadante orgânico.

A solução aquosa resultante foi submetida a análise por CLAE e comparada com uma amostra da mesma solução aquosa de ER, antes da mistura com octanol e submetida a mesma análise.

O coeficiente de partição foi calculado através da equação;

$$K_{o/a} = (C_1 - C_2) / C_2 \quad (\text{Eq. 8})$$

Na qual: C_1 é a concentração de ER na fase aquosa antes da partilha com o octanol;

C_2 é a concentração da ER na fase aquosa depois da partilha com o octanol.

3.2.10 Variação do Tempo de Retenção (TR) da ER

3.2.10.1 Fase Móvel

Realizou-se o estudo da variação do tempo de retenção em relação à constituição da fase móvel. Desse modo, manteve-se fixa a percentagem de acetonitrila, variando-se somente a percentagem de álcool butílico terciário (B OH) e consequentemente a fase aquosa da solução A da fase móvel (solução A é composta por 77% de fase aquosa (tampão fosfato e água) 20% álcool butílico terciário e 3% acetonitrila) (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2001).

1. variação 1 : acetonitrila 3%, B OH 12%, fase aquosa 85%
2. variação 2: acetonitrila 3%, B OH 14%, fase aquosa 83%
3. variação 3: acetonitrila 3%, B OH 16,5%, fase aquosa 80,5%
4. variação 4: acetonitrila 3%, B OH 18%, fase aquosa 79%
5. variação 5: acetonitrila 3%, B OH 20%, fase aquosa 77%
6. variação 6: acetonitrila 3%, B OH 25%, fase aquosa 72%

3.2.10.2 Constante de dielétrica

A variação do tempo de retenção em relação a constante dielétrica da fase móvel também foi estudada. Esse estudo teve como objetivo principal, observar a influência da variação da constante dielétrica em função da constituição da fase móvel.

As constantes dielétrica de cada variação do eluente foi calculada utilizando a equação 9 abaixo:

$$\varepsilon = \frac{(\varepsilon \text{ fase aquosa} \cdot \% \text{ fase aquosa}) + (\varepsilon \text{ ACN} \cdot \% \text{ ACN}) + (\varepsilon \text{ BOH} \cdot \% \text{ BOH})}{100} \quad (\text{Eq. 9})$$

Na tabela 3, encontram-se os valores de ε :

Tabela 3: Constantes dielétrica dos solventes utilizados (DEAN, 1992).

solvente	Constante dielétrica (ε)	Temperatura ($^{\circ}$ C)
água	88,75	25
acetonitrila	37,5	25
Álcool butílico terciário	10,9	25

3.2.11 Perfil de liberação da ER *in vitro*

Para o ensaio de liberação *in vitro* foi utilizado um modelo de célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução (Dissolution SRO Plus).

A célula de difusão (Figura 13) é composta por uma tampa removível com três aberturas; uma para a coleta e reposição do meio receptor, outra para a passagem da haste que mantém o meio receptor sob constante agitação e uma terceira na qual é adaptado um tubo de

ensaio de 1,24 cm de diâmetro, onde foi colocada com auxílio de anel de borracha uma membrana de acetato de celulose, previamente hidratada através de sua submersão pernoite em água destilada.;

Pesou-se uma quantidade 0,3g de Cristal líquido contendo 6.048 mg de ER, suficiente para se estabelecer as condições *sink* de ensaio. Essa amostra foi distribuída sobre a membrana, homoganeamente, evitando a formação de bolhas. O tubo foi acoplado a célula de difusão entrando em contato com o meio receptor.

O mesmo procedimento foi realizado com a ER livre a fim de determinar o perfil de dissolução da mesma.

A simulação das condições *sink* normalmente é obtida, usando-se um grande volume de meio receptor, ou usando-se mecanismos pelos os quais o meio de dissolução é constantemente repostado, de modo que a concentração do soluto não alcance mais do que 10 a 15% da sua solubilidade máxima (MAINARDES, 2004).

A liberação do fármaco foi determinada por CLAE. Através de coleta de 50µL de amostra retirada do meio de dissolução, e em seguida, o mesmo volume foi reconstituído pela adição do meio receptor recentemente preparado, corrigindo-se, dessa maneira, o volume. O ensaio foi realizado em triplicata.

O equipamento de dissolução foi utilizado para se manter condições de temperatura e agitação, e as leituras foram realizadas em intervalos pré-determinados, partindo-se de intervalos de 5 minutos até 60 minutos, sendo o tempo total do ensaio 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra. Assim, a média das áreas dos picos obtidos, foi lançada na equação da reta da curva analítica em solução tampão pH 6.8 0,05 M, e a concentração de ER calculada.

- Temperatura 37 °C
- Membrana de acetato de celulose (0,22µm)

- Agitação constante (200 rpm)
- Meio de liberação: tampão fosfato pH 6,8 0,05M (USP, 2004).
- Volume do meio receptor: 16 mL.

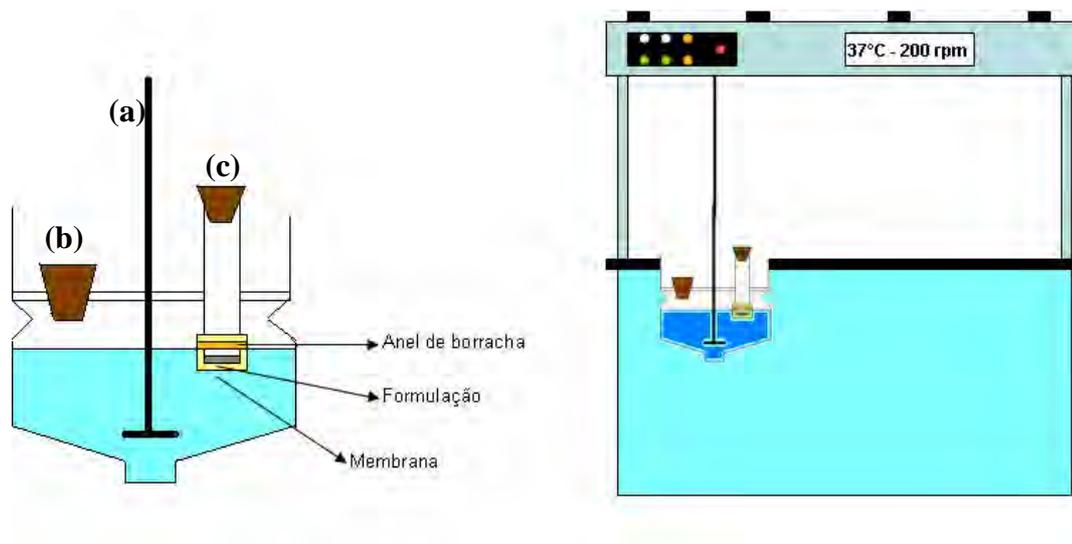


Figura 13: Esquema de célula de difusão (à esquerda), adaptada ao equipamento de dissolução (a direita). (a) dispositivo de agitação do meio receptor, (b) abertura para coleta e reposição do meio, (c) orifício de colocação do tubo com a membrana.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da eritromicina

4.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho, é uma das técnicas mais utilizadas na identificação das funções químicas. Através dos diferentes modos vibracionais gerados por grupos funcionais ao absorverem radiação na região do infravermelho em comprimentos de onda característicos, é possível determinar o grupo funcional existente no composto (SILVERSTEIN, et al. 1994).

Uma amostra de eritromicina, grau farmacêutico, foi utilizada para a realização da espectroscopia de absorção na região do infravermelho, que se situa entre 400 e 4.000 cm^{-1} . O espectro obtido nesse trabalho está ilustrado na figura 14 juntamente com o espectro de referência da ER na figura 15. Os números e letras das bandas indexadas estão referidos entre parênteses no texto.

A eritromicina foi caracterizada por duas bandas de absorção na região de 1700 a 1735 cm^{-1} referentes a bandas de deformação (MOFFAT, et al., 1986) do grupo cetona não conjugada (a), porém nessa região encontra-se também a deformação do grupo éster de 1200 a 1720 cm^{-1} (difícil de diferenciar das cetonas, pois não apresenta banda característica) (b). A seguir, estão as bandas de deformação angular simétrica no plano de CH_2 e CH_3 em 1300 a 1480 cm^{-1} (c). E finalmente na região de 1000 a 1200 cm^{-1} observa-se as bandas de deformação do grupo éter (d) (MOFFAT, et al., 1986; SILVERSTEIN, et al.1994).

Através da comparação entre os espectros, pode se dizer que a amostra analisada apresenta o mesmo espectro de absorção na região do infravermelho que a ER. A banda de

número 1 refere-se a provável hidratação da amostra no momento do preparo, enquanto que as bandas 2 e 3, referem-se as bandas de ligações C-H₃ dos alcanos e da ligação C-OH do álcool, que aparecem antes de 2000 cm⁻¹.

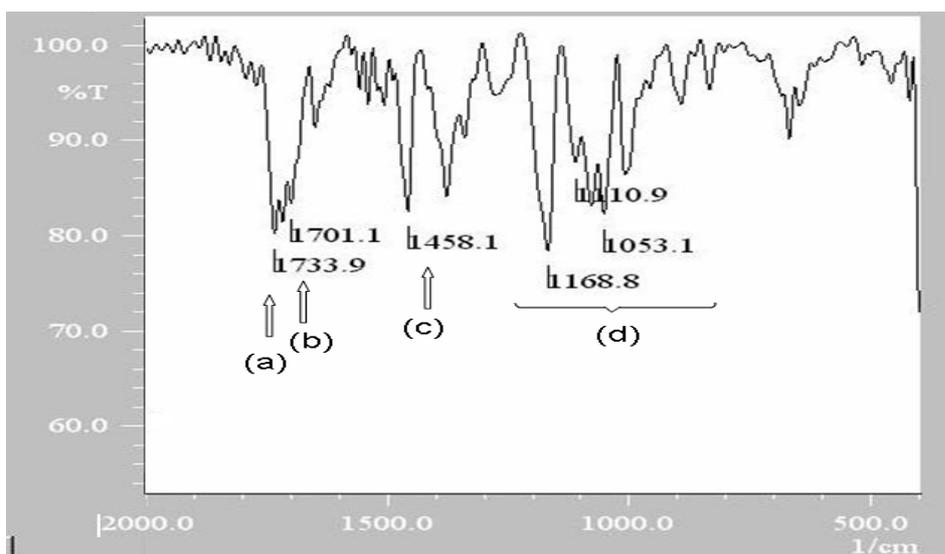


Figura 14: Espectro da eritromicina comercial na região do infravermelho. Os números referem-se a bandas não encontradas no espectro de referência, e as letras, referem-se às bandas indexadas em comum entre os espectros.

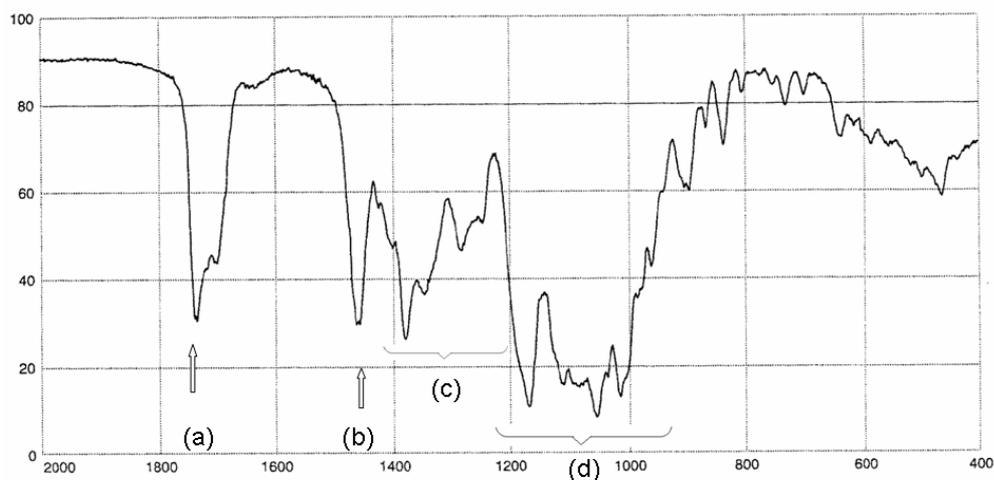


Figura 15: Espectro de infravermelho de referência da eritromicina (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2001). As letras das bandas indexadas estão referidas entre parênteses no texto.

4.2 Construção do Diagrama de Fases

Através das titulações de 0,1mL de água foram obtidas formulações relacionadas às variadas porcentagens de cada uma das três fases. Essas formulações sofreram transições, como separação de fases, formação de sistemas semi-transparentes (sistemas de transição de fases), sistemas emulsionados (opacos), sistemas microemulsionados (transparentes e líquidos) e sistemas microestruturados (transparentes e viscosos). Essas mudanças, ocasionadas pelas diferentes proporções de água, óleo e tensoativo, foram plotadas no diagrama ternário de fases como pode ser observado na figura 16;

O diagrama de fases ternário, representado pelo triângulo equilátero cujos vértices correspondem a 100% de cada fase, segue orientação horária.

Dessa forma é possível observar no diagrama da Figura 16, uma ampla área de microemulsão (SME), cuja área de domínio mínima de tensoativo é 30% e máximas de 35% de água e 70% de óleo.

A região de sistema microestruturado, apresenta área limite com concentração mínima de 40% de tensoativo e máximas de 65% em uma faixa de 35 a 60% de água e de 0 a 15% de óleo. O sistema semi-transparente (STF) limita-se a concentrações de aproximadamente 30-55% de tensoativo, aproximadamente 30-70% de água e 0-40% de óleo.

A região de separação de fase (SF) é bastante ampla, ocupando toda a parte inferior do diagrama, desde o vértice aquoso até o oleoso, com porcentagens de 0-100% de água, 0-100% de fase oleosa, fazendo limite com a região de microemulsão, apresentando cerca de 30% de tensoativo. Sistemas emulsionados apresentam-se em menor quantidade, com concentrações de 15-30% de tensoativo, 50-85% de água e 0-20% de fase oleosa.

Realizou-se a construção do diagrama de fases, identificando as regiões de cada diferente sistema em: SME- para sistemas líquidos e transparentes, SMT- para sistemas transparentes e com alta viscosidade, STF- para sistemas translúcidos, SE- para sistemas opacos e SF- para separação de fases (duas fases distintas).

Nota-se que a formação de sistemas líquidos está ligada a pequenas concentrações de fases aquosa e oleosa e grande proporção de tensoativo. Enquanto, sistemas viscosos transparentes apresentam quantidade de fase oleosa muito pequena em relação as demais fases, geralmente cerca de 10% . Nota-se também que, quanto mais água é adicionada à região de SME e SMT, maior sua viscosidade. Fato esse que sugere um aumento de hidratação das cabeças polares do tensoativo, ligado ao arranjo, que apresentam alta hidrofília.

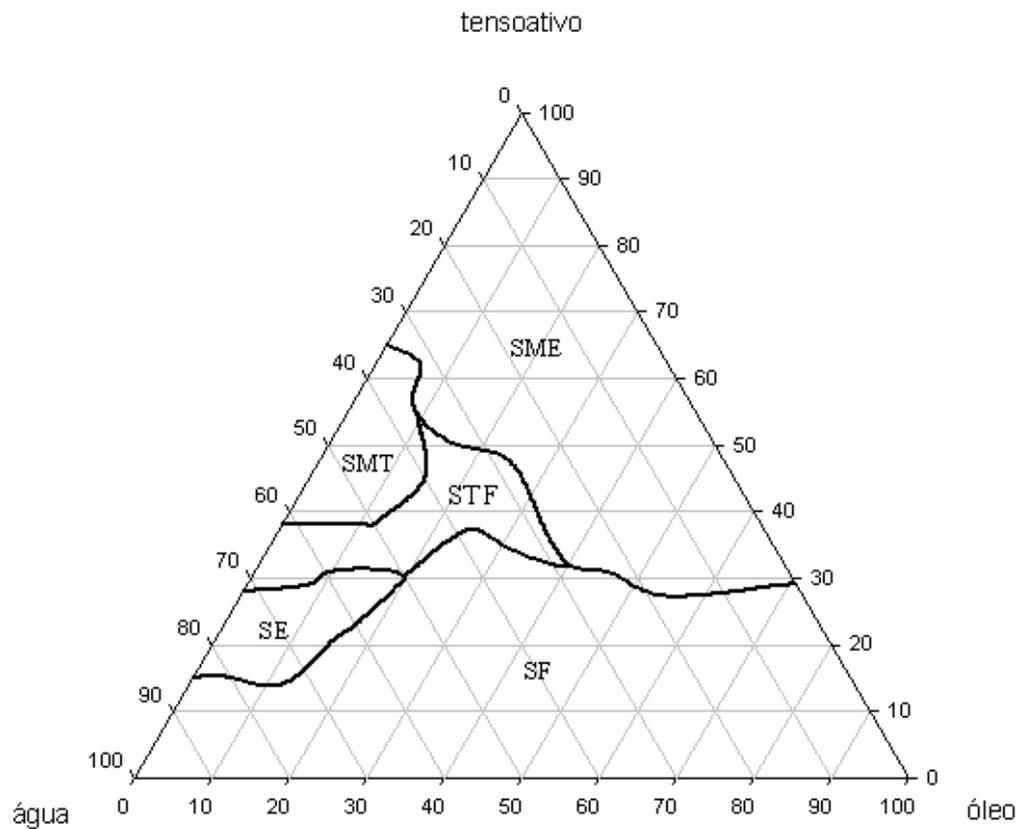


Figura 16: Diagrama de fases com as regiões de cada sistema. SME- sistema microemulsionado, SMT- sistema microestruturado, STF- sistema de transição de fases, SE- sistema emulsionado, SF- separação de fases.

As características visuais das regiões citadas anteriormente podem ser observadas nas Figuras de 17 a 19.



Figura 17: A- separação de fases, B- microemulsão, C- sistema microestruturado (líquido - cristalino), D- sistema de transição de fases e E- emulsão.



Figura 18: Separação de fases após repouso



Figura 19: sistema emulsionado após repouso

Com a construção do diagrama de fases, foi possível delimitar as regiões de formação das diferentes fases formadas pela mistura de diferentes proporções de tensoativo, água e fase oleosa, permitindo escolher a região de interesse e as formulações a serem estudadas.

Essas formulações foram escolhidas partindo-se do propósito de se veicular ER para o tratamento da pele acneica, sendo assim, foi dada atenção às formulações da região classificada como SMT, uma vez que essa região apresenta formulações com viscosidade considerável permitindo aplicação em uma área definida sem que a mesma escorra após sua aplicação e que apresentassem a menor quantidade de óleo possível para esses sistemas se

formarem, como representado na figura 20. As formulações selecionadas foram denominadas F1, F2, F3 e F4.

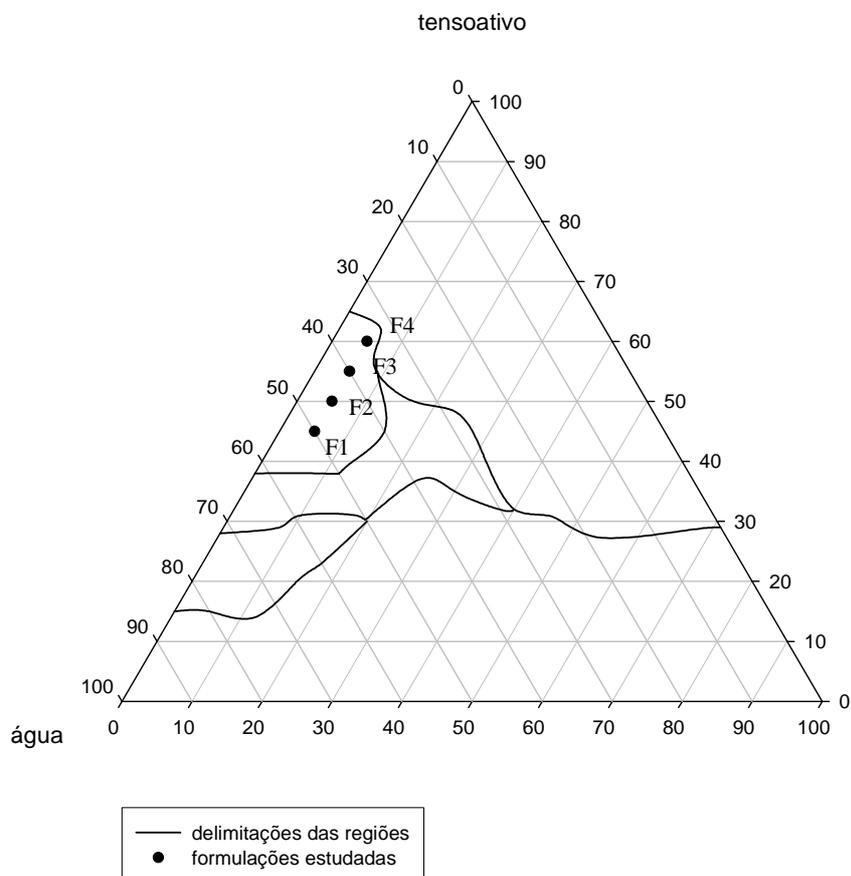


Figura 20: Diagrama com as formulações selecionadas

4.3 Incorporação da eritromicina no sistema

As amostras observadas tanto a olho nú como em microscópio óptico com aumento de 10 vezes apresentaram-se transparentes, após a incorporação, assim como no controle negativo (sem o fármaco), não havendo aparecimento de cristais, sugerindo uma solubilização total do fármaco.

4.4 Caracterização Física

4.4.1 Índice de Refração

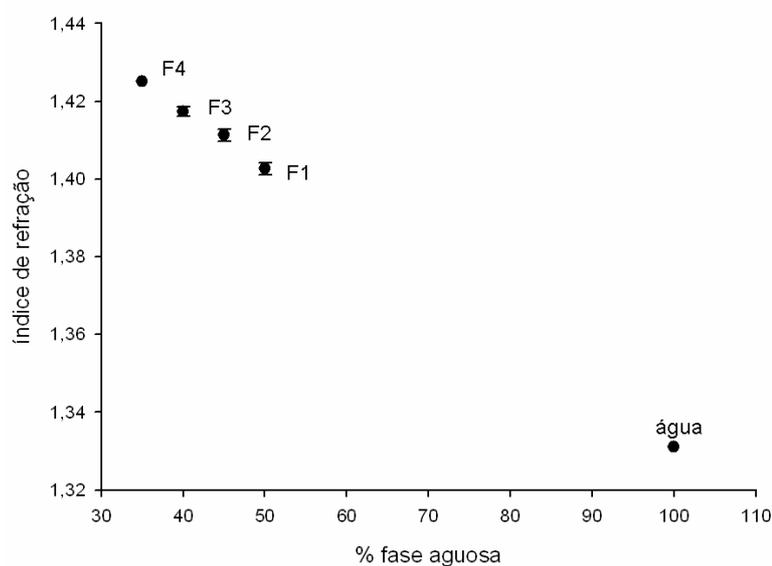
O índice de refração é uma constante física freqüentemente usada na determinação da identidade e pureza de fármacos e produtos alimentícios. Pode ser usado para determinar quantitativamente a força e a pureza das soluções ou as proporções em que certos líquidos são misturados (KOROLKOVAS, 1988).

O índice de refração de uma substância, representado por (n), é a relação entre velocidade da luz no vácuo e sua velocidade ao atravessar a substância. Ele varia com o comprimento de onda da luz empregada e com a temperatura. Portanto, é necessário especificar estas condições na prática, pois em geral é conveniente medir a refração em relação ao ar e a substância, em lugar de medir em relação ao vácuo e a substância, visto que para fins farmacopeicos, isso não apresenta influência significativa nos valores observados (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1997). Também pode ser definido como a relação entre o seno do ângulo de incidência e o seno do ângulo de refração da luz. Os índices de refração são geralmente determinados em função da incidência da luz de uma lâmpada de sódio de comprimento de onda de 589,3 nm, à temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1997).

Na tabela 4 encontram-se os valores médios do índice de refração das amostras determinados em triplicata, a figura 21 é a representação gráfica desses valores.

Tabela 4: Valores médios do índice de refração de cada formulação, em triplicata a 20 °C.

Amostras	Procetyl (%)	Adipato (%)	Água (%)	Índice de refração Encontrado (água = 1,331)
F1	45	5	50	1,402
F2	50	5	45	1,411
F3	55	5	40	1,417
F4	60	5	35	1,425

**Figura 21:** Representação gráfica do índice de refração

Os resultados obtidos sugerem que, com o aumento da quantidade de fase aquosa nas formulações, ocorre uma diminuição do índice de refração, tornando-o mais próximo do índice de refração da água.

4.4.2 Condutividade Eletrolítica

O gráfico da Figura 22 mostra os valores, realizados em triplicata, de condutividade em $\mu\text{S}/\text{cm}$ das formulações selecionadas.

Os valores encontrados para condutividade, sugerem que o sistema apresenta maior quantidade de água como fase externa (contínua) nos sistemas estudados.

Os mecanismos sugeridos para a condução na água, conforme proposta de AGMON (1995), é que há transferência de próton entre duas moléculas de água vizinhas quando uma molécula tem posição que permite que uma ligação de hidrogênio $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ se transforma em uma ligação $\text{H}\cdots\text{H}-\text{O}$.

Nos resultados obtidos observa-se que, quanto maior a quantidade de água presente na formulação, maior a condutividade, que sugere que a água encontra-se como fase contínua nesses sistemas.

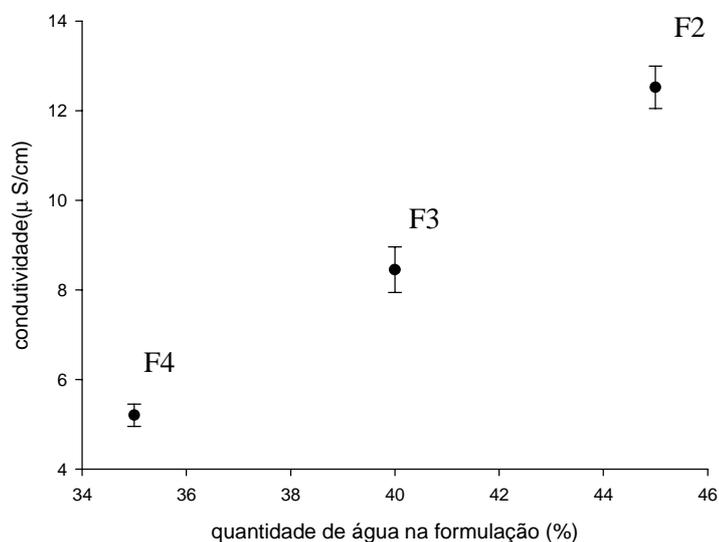


Figura 22: Efeito da variação da fase aquosa nos valores de condutividade

Devido a alta viscosidade apresentada por F1, não foi possível a realização dos ensaios de condutividade, assim como os ensaios reológicos.

4.4.3 Reologia

Os dados obtidos na análise de escoamento foram utilizados na construção de reogramas, nos quais é possível observar a relação entre tensão de cisalhamento (σ) e velocidade de cisalhamento (γ). Nas figuras 23 a 25, pode-se observar a relação entre σ e γ para os sistemas F2, F3 e F4, respectivamente. De acordo com os reogramas todos os sistemas apresentaram comportamento não-newtoniano com escoamento plástico, pois comportaram-se resistentes ao escoamento inicialmente, formando uma alça de histerese, caracterizando sua tixotropia a 25 e 37° C. O perfil das formulações continuou o mesmo com o aumento da temperatura para 37 °C. Todas as formulações apresentaram também, uma resistência inicial ao escoamento, que pode ser observada em todos os reogramas através da deformação que ocorre por volta 6000 Pa de tensão de cisalhamento para F2, 2500 Pa para F3 e 1400 Pa para F4, provavelmente devido à organização interna desses sistemas, constituídos pela presença de uma rede estrutural que aumenta sua viscosidade e impede que o mesmo flua normalmente. Ao atingir uma tensão crítica a rede é quebrada e o sistema flui normalmente.

Para o sistema F1, não foi possível sua análise pelo equipamento devido a alta viscosidade apresentada.

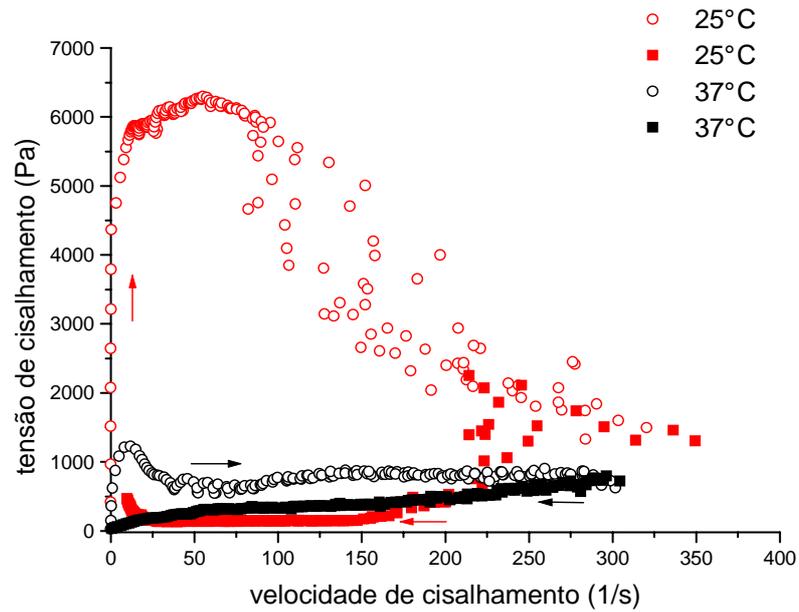


Figura 23: Representação gráfica da relação entre tensão de cisalhamento e velocidade de cisalhamento do sistema F2 a 25 e 37° C.

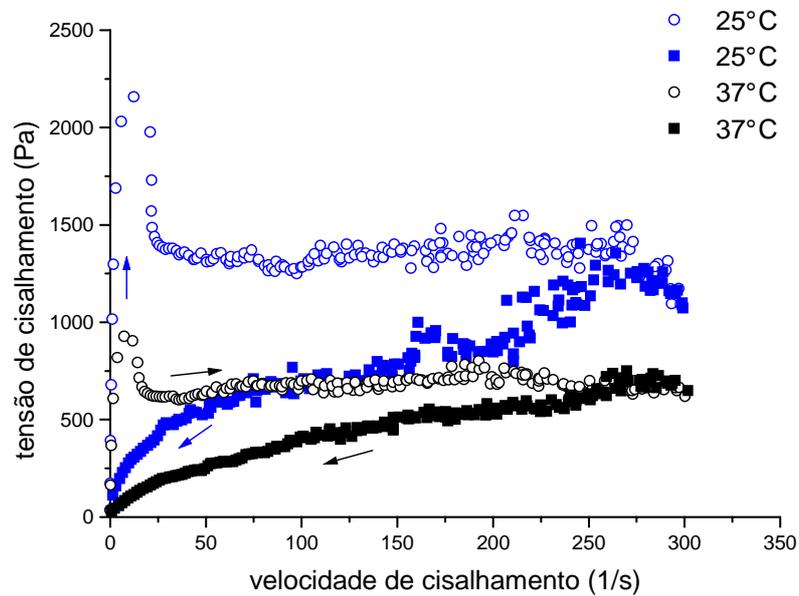


Figura 24: Representação gráfica da relação entre tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento do sistema F3 a 25 e 37° C.

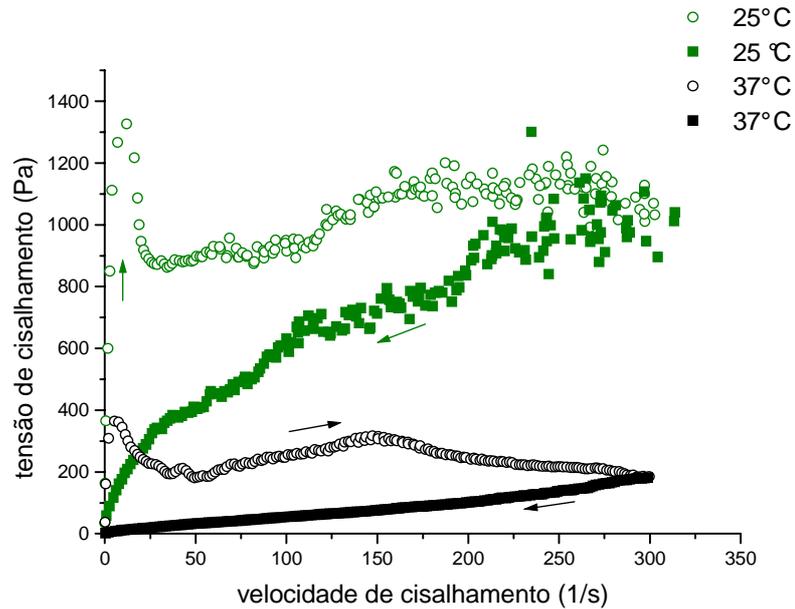


Figura 25: Representação gráfica da relação entre tensão de cisalhamento e velocidade de cisalhamento do sistema F4 a 25 e 37° C.

Os sistemas com comportamento plástico apresentam uma diminuição na viscosidade logo no início do cisalhamento, tendendo a se tornar constante após esta diminuição.

Nas figuras de 26 a 29 pode-se observar o comportamento da viscosidade em função da velocidade de cisalhamento para os sistemas F2, F3 e F4, respectivamente. Nota-se que a viscosidade diminuiu com o aumento da velocidade de cisalhamento, confirmando que esses sistemas se comportam como fluidos plásticos.

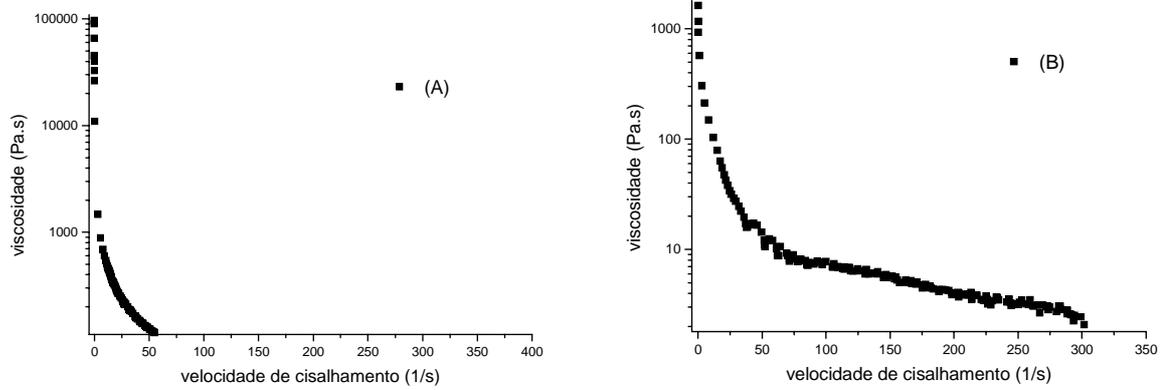


Figura 26: Representação gráfica da relação entre viscosidade e velocidade de cisalhamento do sistema F2 a 25 °C (A) e 37° C (B), respectivamente.

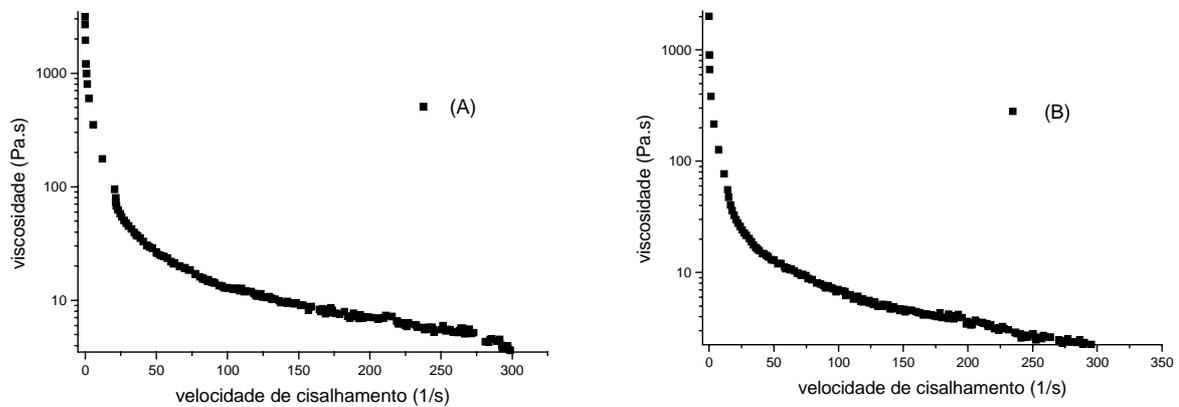


Figura 27: Representação gráfica da relação entre viscosidade e velocidade de cisalhamento do sistema F2 a 25 °C (A) e 37° C (B), respectivamente.

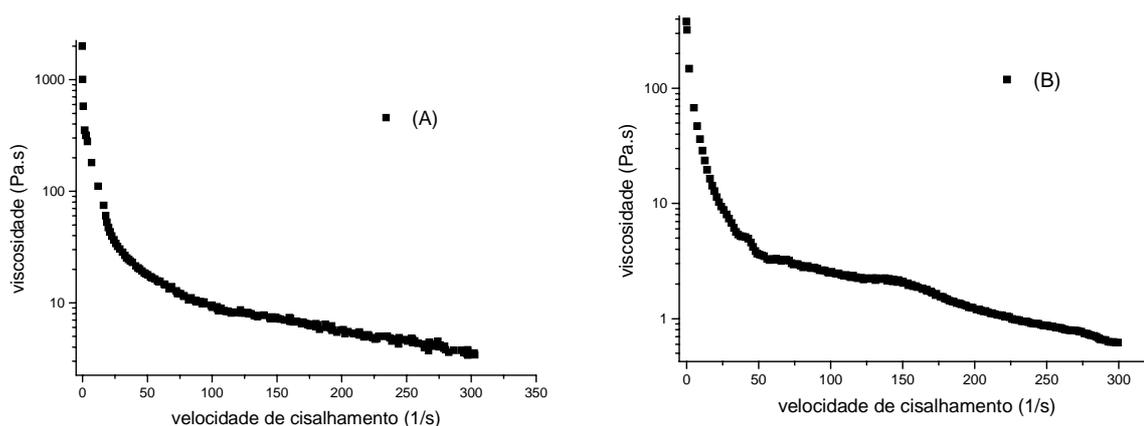


Figura 28: Representação gráfica da relação entre viscosidade e velocidade de cisalhamento do sistema F2 a 25 °C (A) e 37° C (B), respectivamente.

Quanto aos valores de viscosidade encontrados a 25 e a 37°C, observou-se que a formulação F2 tornou-se cerca de 98% menos viscosa em relação ao seu comportamento a 25°C, enquanto que a formulação F4 perdeu cerca de 81% de sua viscosidade. Para a formulação F3, os resultados foram perda de 43% aproximadamente em relação a suas medidas a 25 °C, menos da metade do comportamento apresentado pelas outras duas formulações. A formulação F2 possui maior quantidade de água na sua constituição em relação a F3 e F4, o que possivelmente torna os agregados mais densos e rígidos na presença do tensoativo.

Essa rede que se forma entre os constituintes da formulação, torna-se mais organizada à medida que a proporção de água aumenta em relação ao tensoativo, o que faz com que a viscosidade do sistema aumente, tornando possível a formação de domínios cristalinos através do tipo de rede formada. A orientação e organização dessa rede podem ser identificadas pelas técnicas de espalhamento de raios-X abaixo ângulo e microscopia de luz polarizada.

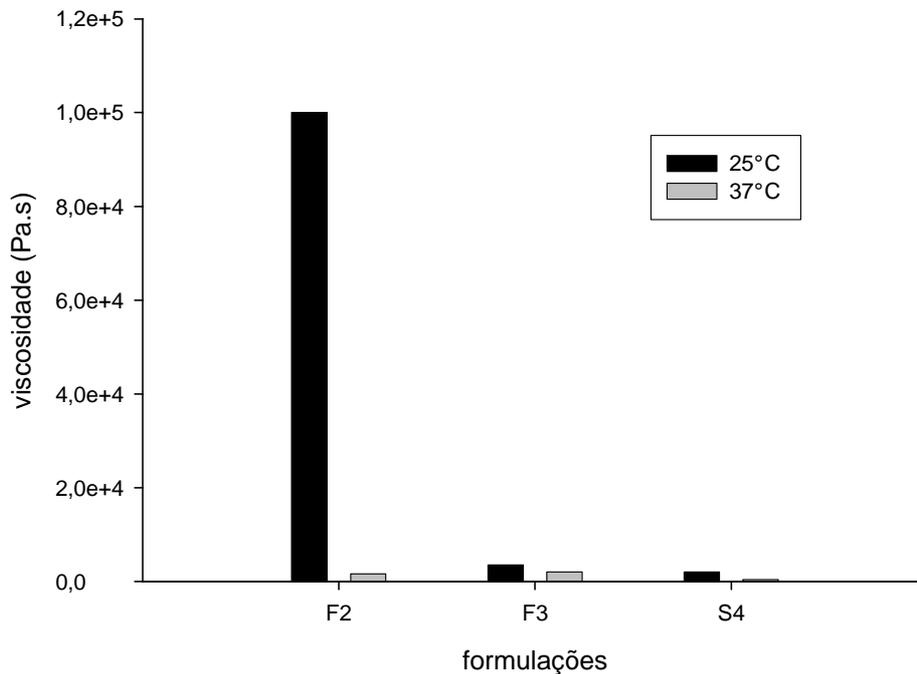


Figura 29: Viscosidade comparativa entre as formulações F2, F3 e F4, a 25 e 37° C.

O ensaio de fluência e relaxação mede as propriedades viscoelásticas dos sistemas através da aplicação de uma tensão constante de cisalhamento (fluência), e a deformação é determinada em função de tempo (relaxação). Com isso, pode-se obter a compliância que é definida pela razão de deformação pela tensão. Quanto maior a compliância menor é a componente elástica do sistema e conseqüentemente a viscosidade é mais baixa. A viscoelasticidade é usada para descrever comportamento de materiais, os quais apresentam comportamento intermediário entre os elásticos clássicos extremos, que são chamados de sólidos hookeanos e líquidos newtonianos. Materiais viscoelásticos têm simultaneamente propriedades elástica e viscosa (KORHONEN, 2003).

Este ensaio permite diferenciar de forma bastante satisfatória as respostas elásticas das respostas viscosas. E introduz um parâmetro adicional de tempo de resposta para o comportamento viscoso e elástico de sólidos e fluídos (SCHRAMM, 2006).

A Figura 30 representa a evolução das curvas de fluência e relaxação para os sistemas F2, F3 e F4. As curvas de fluência e relaxação confirmam a natureza viscoelástica destes sistemas.

A formulação F4, que apresenta maior quantidade de fase tensoativa, em relação a F2 e F3, exibiu maiores valores de compliância, indicando que esta formulação tem um caráter mais fluido quando comparada com as outras formulações. A formulação F2 apresenta valores de compliância bem inferiores, caracterizando uma formulação com componente elástica maior devido à existência de uma rede estrutural consolidada o que faz aumentar a viscosidade e a tensão crítica para o escoamento. Estes resultados corroboram com os resultados das análises de escoamento.

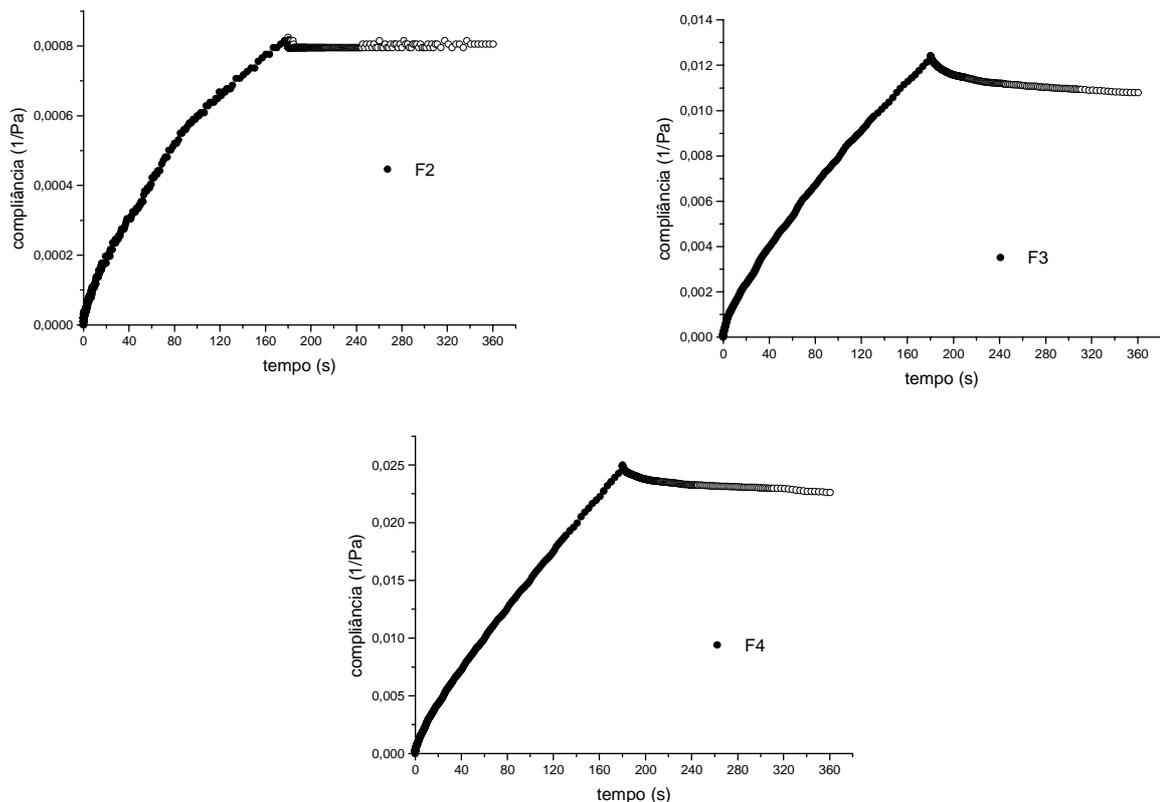


Figura 30: Curvas de fluência e relaxação das formulações F2, F3 e F4.

O comportamento viscoelásticos das formulações é coerente com os resultados encontrados nas medidas de escoamento e com a constituição das amostras, podendo-se observar a relação entre o aumento da fase aquosa na formulação, que a torna mais viscosa, ou seja, mais organizada e com o aumento da componente elástica encontrada para essas formulações. Sugere-se então, que ao se aumentar o vértice aquoso, a água organiza-se de maneira a saturar a parte de natureza hidrofílica do tensoativo, formando mesofases cristalinas, o que justifica o aumento na viscoelasticidade apresentada por essas formulações.

4.4.4 Microscopia de Luz Polarizada

Através da técnica de microscopia óptica de luz polarizada, foi possível a observação de estruturas internas nos diferentes sistemas, observadas nas fotomicrografias obtidas por esse método de visualização; em aumento de 10 000 e 20 000 (CONSTANTINIDES e SCALART, 1997).

Regiões mesofásicas, tais como fase lamelar que ao desviarem a luz polarizada revelam estruturas parecidas com cruces de malta e fase hexagonal as quais apresenta estruturas que se assemelham com estrias, podem ser classificadas através da microscopia como anisotrópicos, ou seja, sistemas que desviam o plano da luz polarizada.

Os resultados obtidos por fotomicrografias revelaram dois tipos de regiões anisotrópicas, uma contendo uma possível fase lamelar e outra contendo fase hexagonal, segundo Constantinides e Scalart, 1997, ambas as fases são características de sistemas mesofásicos.

Como pode ser observado nas figuras de 31 a 34, a organização interna desses sistemas, no caso hexagonal, pode estar relacionado com o arranjo ocorrido entre as três fases constituintes das formulações, principalmente entre a água e o tensoativo. Com o aumento da

quantidade da água e conseqüente diminuição do tensoativo, a disposição da água em torno das cabeças polares do tensoativo pode se rearranjar para outras formas. As cabeças polares do tensoativo (óxido de etileno) na presença de aumento de fase aquosa estariam sendo hidratadas pela água devido a alta hidrofília desses grupos promovendo organizações mais rígidas e mais complexas.

Em análises realizadas com formulações com o fármaco, a incorporação da ER não alterou a estruturação interna hexagonal das formulações F2 e F3, sugerindo dessa forma que o fármaco não influenciou na estabilidade física dessas formulações. Na formulação F4 a incorporação de 2% p/p de ER fez com que o arranjo interno passasse de hexagonal para lamelar.

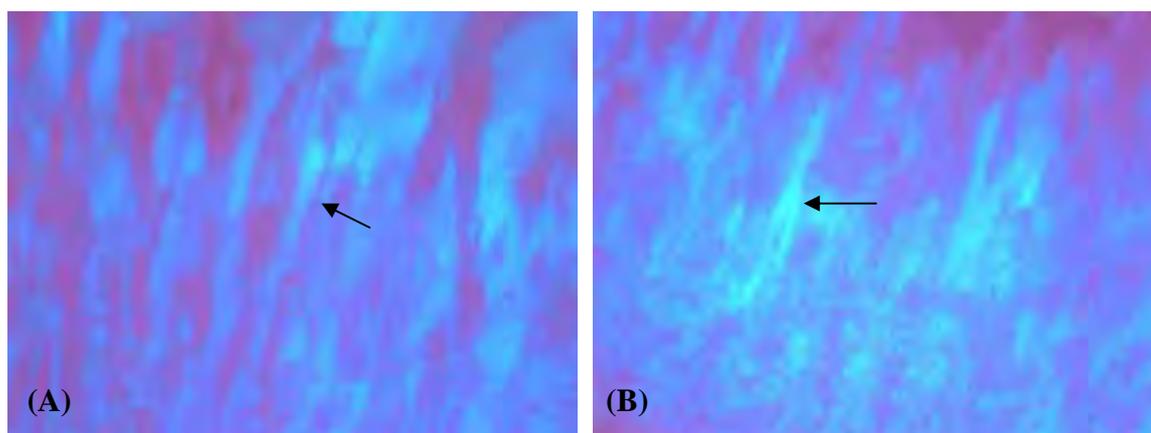


Figura 31: Fotomicrografias do sistema F1 em aumento de 20 X, as setas indicam aparecimento de estrias; A) fase hexagonal, B) fase hexagonal em sistema contendo ER.

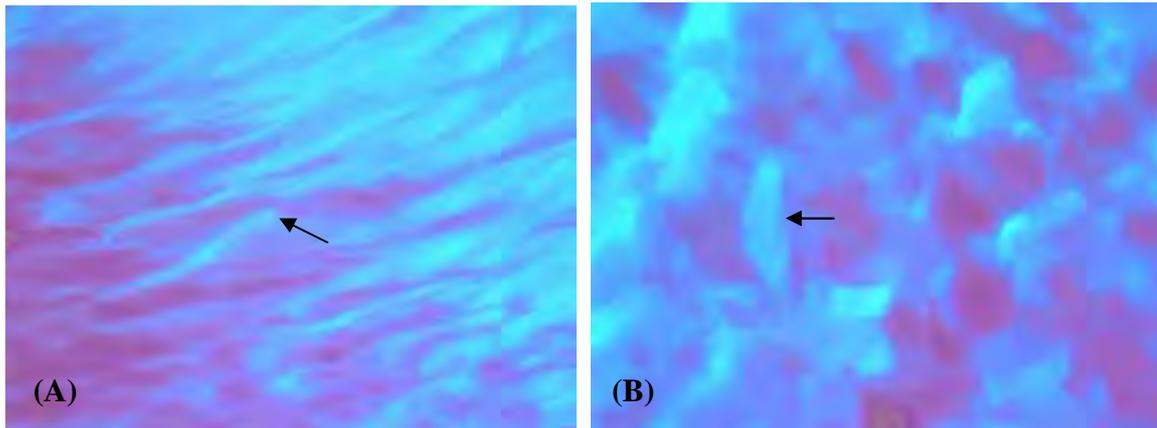


Figura 32: Fotomicrografias do sistema F2 em aumento de 20 X, as setas indicam aparecimento de estrias; A) fase hexagonal, B) mistura de fases lamelar e hexagonal em sistema contendo ER.

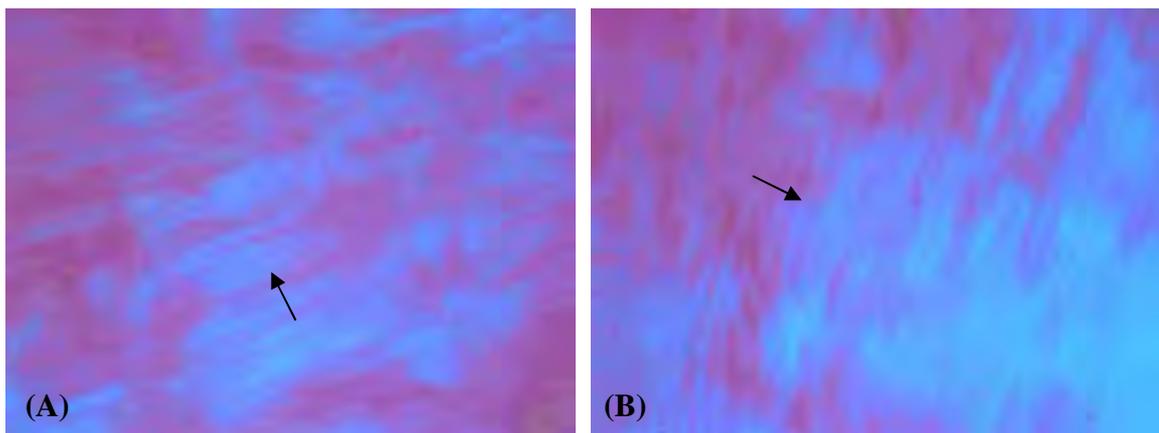


Figura 33: Fotomicrografias do sistema F3 em aumento de 20 X, as setas indicam aparecimento de estrias; A) fase hexagonal, B) fase hexagonal em sistema contendo ER.

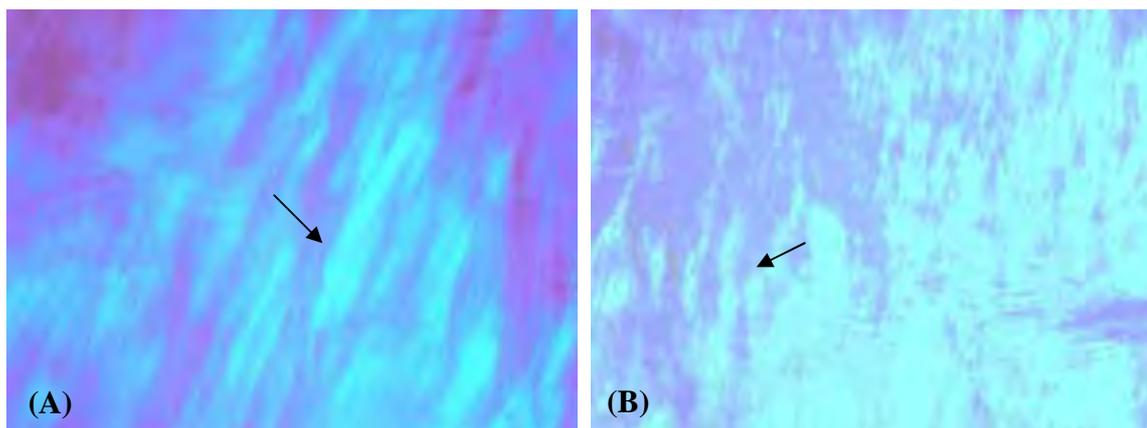


Figura 34: Fotomicrografias do sistema F4 em aumento de 20 X e 10 X respectivamente, as setas indicam aparecimento de estrias; A) fase hexagonal, B) fase hexagonal em sistema contendo ER.

4.4.5 Espalhamento de raios -X a baixo ângulo (SAXS)

As formas anisotrópicas de sistemas microestruturados como, hexagonal e lamelar apresentam características de consistência que podem ser observados diretamente através da composição entre as fases da formulação e da análise por SAXS. A técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, é usada para confirmar os resultados das diferentes regiões encontradas através da construção de um diagrama de fases e os resultados através da visualização por microscopia óptica de luz polarizada, além de identificar onde diferentes tipos de fases que podem coexistir (MEZZENGA et al., 2005).

As curvas de SAXS exibem picos, cujo número e a distância média entre eles, permitem associar com estruturas da matriz.

A posição dos picos apresentados pelas curvas de SAXS no eixo q , revelam o tipo de estrutura cristalina e sua orientação, se um número suficiente de picos, necessários para sua identificação, é observado, é possível revelar inequivocamente a periodicidade da estrutura.

Através do número de picos e a razão da distância média entre eles, pode-se observar a existência de mesofases ordenadas como fase lamelar, a qual é composta por micelas planares ou lamelas com solvente entre elas, representada por dois picos, cuja razão da distância média entre eles deve ser 2, enquanto que a fase composta por organização hexagonal de agregados cilíndricos observada pela existência de três picos, deve apresentar valores de distância média entre partículas de 1,73 e 2, respectivamente, ver tabela 5.

Podemos calcular uma distância média, d , entre partículas vizinhas (ou dois planos paralelos) a partir do valor de posição máximo (q_{\max}), empregado a relação;

$$d = \frac{2\pi}{q_{\max}}$$

Os resultados das medidas de SAXS estão coerentes com os resultados obtidos por microscopia óptica de luz polarizada dessas formulações, identificando fase hexagonal para todos os sistemas (F2, F3 e F4), através do aparecimento de estrias ao desviarem o plano da luz polarizada.

Ao correlacionar os dados de SAXS com os dados obtidos pelo comportamento reológico, nota-se que a redensificação formada pelos constituintes da formulação é proporcional a sua tixotropia. Observou-se também que apenas as formulações mais viscosas, F2 e F3, apresentaram integridade quanto sua estruturação ao incorporar a eritromicina, de acordo com as figuras 36 e 37.

O resultado da amostra F4 revelou forma hexagonal no sistema inerte e possível rearranjo observado claramente pelo alargamento do pico, sugerindo desestruturação para

forma lamelar na mesma formulação incorporada com o fármaco, como pode ser observado na figura 38.

Conclui-se que a estruturação dessas formulações é dependente da relação tensoativo/água, que torna o sistema mais redensificado à medida que se aumenta a água em relação ao tensoativo.

Para as concentrações de tensoativo nesses sistemas (F2, F3 e F4), observa-se maior estruturação, quanto menor a quantidade de tensoativo presente, e conseqüente aumento da fase aquosa. As moléculas do tensoativo agregam-se com água e formam pequenos domínios cristalinos orientados aleatoriamente. Os parâmetros de intensidade $I(q)$ do SAXS, produzidos por esses materiais, exibem picos, para valores diferentes de módulos do vetor de espalhamento q .

As curvas de intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento (q) das formulações F2, F3 e F4, podem ser observadas nas figuras 35 a38:

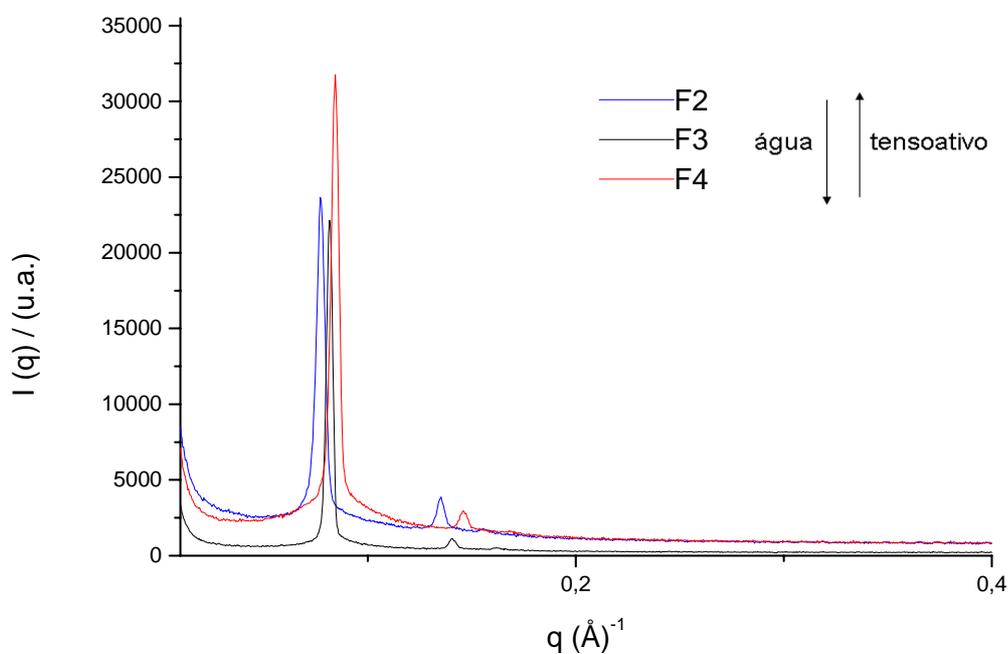


Figura 35: Comparação estrutural entre as formulações F2, F3 e F4.

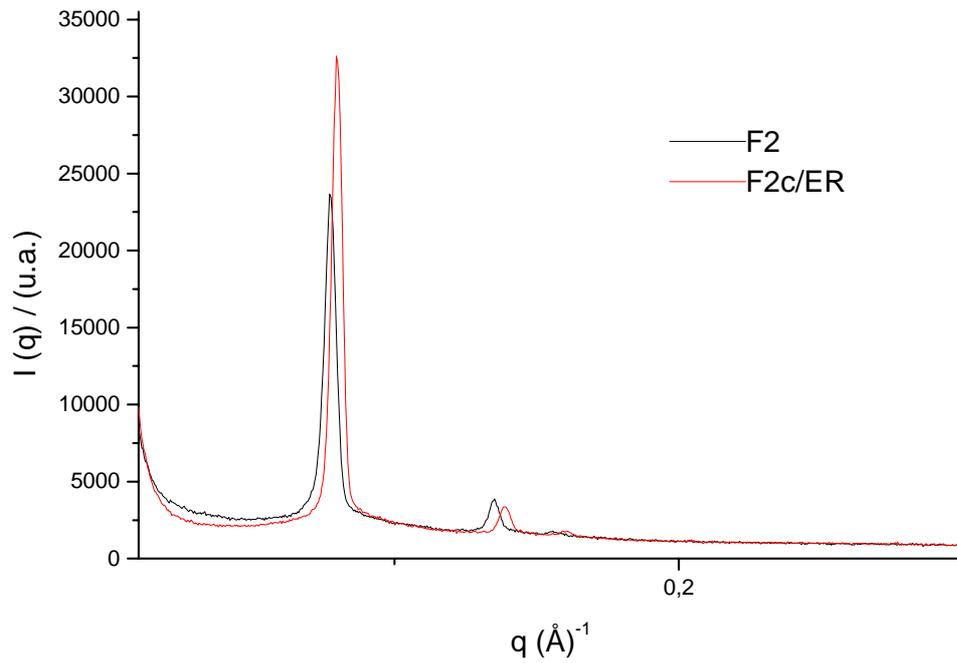


Figura 36: Evolução estrutural das formulações F2 e F2 com ER.

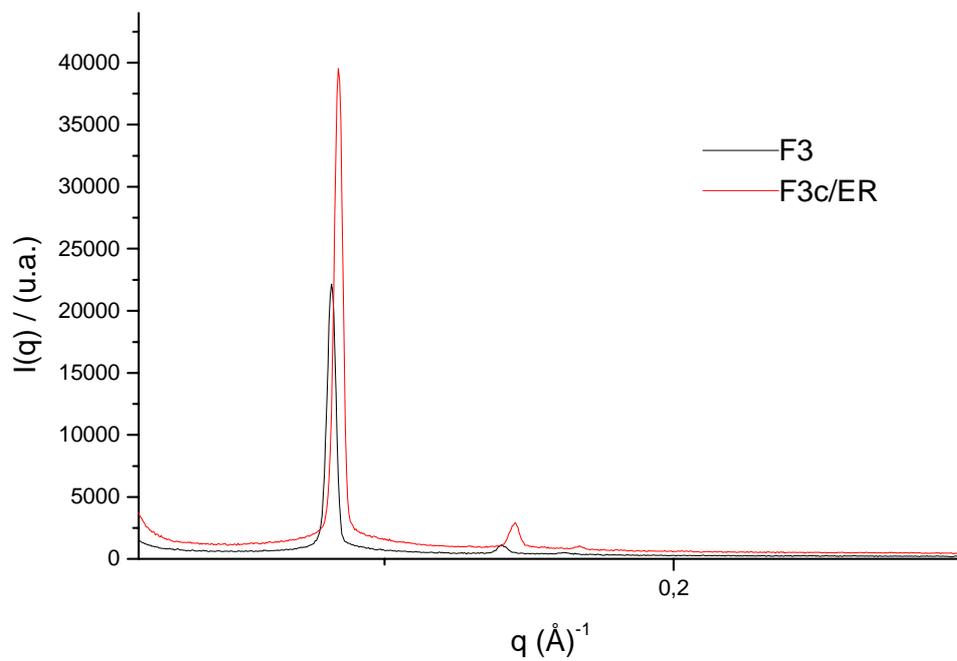


Figura 37: Evolução estrutural das formulações F3 e F3 com ER.

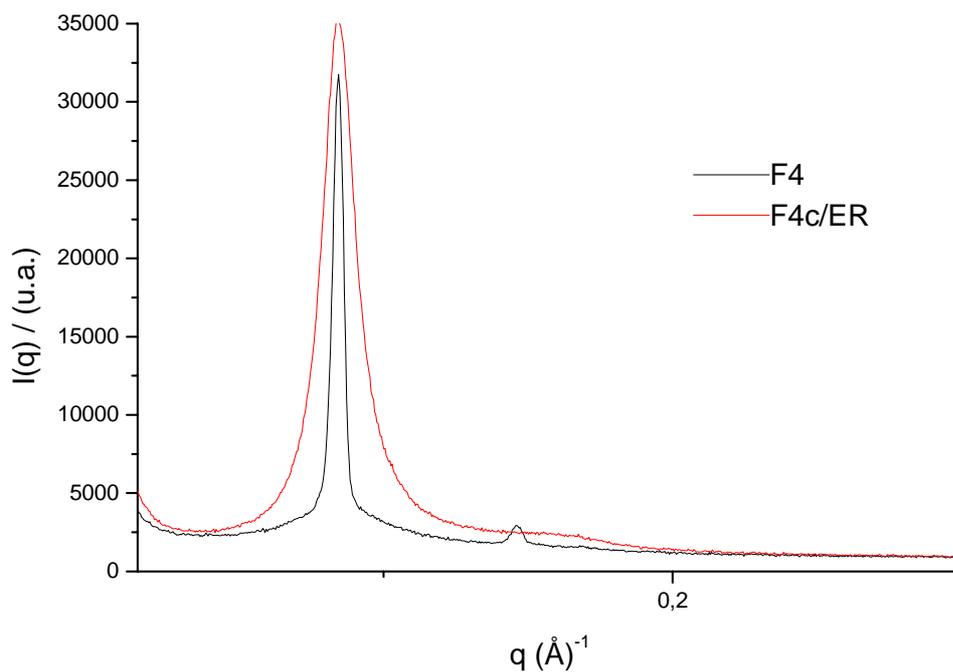


Figura 38: Evolução estrutural das formulações F4 e F4 com ER

Tabela 5: Valores dos parâmetros obtidos a partir das curvas de SAXS.

Formulações	qmax 1	qmax 2	qmax 3	d2/ d1	d3/ d1	Tipo de estrutura
F2	0,0774	0,1353	0,1557	1,748	2,011	hexagonal
F3	0,0812	0,1405	0,1614	1,730	1,987	hexagonal
F4	0,0843	0,1462	0,1691	1,734	2,003	hexagonal
F2 c/ ER	0,0800	0,1392	0,1605	1,739	2,006	hexagonal
F3 c/ ER	0,0842	0,1450	0,1675	1,722	2,162	hexagonal
F4 c/ ER	0,0842	0,1670	—	1,983	—	lamelar

q = vetor de espalhamento

d = distância média entre os picos

A combinação de diferentes métodos como, espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) e técnica de microscopia de luz polarizada, são bastante usadas como complementação uma da outra, no estudo de cristais líquidos. (MEZZENGA et al., 2005).

4.5 Estabilidade Física dos Sistemas

4.5.1 Teste de Prateleira e Estabilidade Preliminar das Formulações

A estabilidade de formas plásticas depende, praticamente, da natureza da base empregada na formulação e do fármaco que se pretende veicular. Assim, estudos de compatibilidade são primordiais no desenvolvimento de formulações semi-sólidas (GIL, et al.,2005).

Entre os principais problemas envolvidos está, além da decomposição química, a perda de consistência e endurecimento. Por sua vez, as formas sólidas são em geral, bastante estáveis, mas merecem cuidados, quanto à formulação e estocagem (GIL, et al.,2005).

Avaliação física das formulações F2, F3 e F4 inertes e incorporadas c/ ER foram submetidas a centrifugação após exposição a temperaturas de 25, 45 e 60 °C por períodos de 1, 45 e 90 dias e logo após a preparação das mesmas. As formulações permaneceram estáveis a qualquer sinal de instabilidade quanto à separação de fases, podendo ser submetidas aos demais testes de estabilidade.

O estudo de estabilidade preliminar consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem de formulações (GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004).

Durante o estudo da estabilidade preliminar, o potencial hidrogeniônico (pH) das formulações foi medido nas amostras com e sem a presença do fármaco. Esse parâmetro é importante quando se veicula fármacos que apresentam atividade pH dependente (BRISAERT et al., 2000). Visto que a eritromicina é um antibiótico que apresenta sua atividade terapêutica essencialmente em faixa de pH 7 e é relativamente estável em faixa de pH de 4 a 10 (DIETRICH et al., 1998), realizou-se a medida desse parâmetro durante 90 dias, com o intuito de observar possíveis variações de pH no decorrer do estudo.

A eritromicina quando exposta a valores de pH maiores que 10 e especialmente iguais ou menores que 3, apresenta grande quantidade de produto de degradação (DIETRICH et al., 1998).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 6, apesar das formulações inertes apresentarem valores de pH abaixo dos valores adequados para que o fármaco exerça sua atividade antimicrobiana, ainda encontram-se numa faixa de pH relativamente estável para a ER. Observou-se que após a incorporação da ER, essas formulações apresentaram valores de pH estáveis na faixa da neutralidade, mesmo após

o período de 90 dias tanto em temperatura de 25 °C, quanto em temperatura de 45 °C, tornando o sistema um veículo interessante para transporte desse fármaco.

Tabela 6: Valores de pH das amostras sob as temperaturas; 25, 45 e a 60°C, respectivamente.

amostras	pH (25°C)			pH (45°C)			pH (60°C)		
	dias			dias			dias		
	T:0	T:45	T:90	T:0	T:45	T:90	T:0	T:45	T:90
F2	5,0	4,0	4,0	5,0	4,0	4,0	5,0	4,0	3,0
F3	5,0	4,0	4,0	5,0	4,0	4,0	5,0	4,0	3,0
F4	5,0	4,0	4,0	5,0	4,0	4,0	5,0	4,0	4,0
F2 c/ ER	7,0	7,0	6,0	7,0	6,0	5,0	7,0	5,0	4,0
F3 c/ ER	7,0	6,0	6,0	6,0	6,0	5,0	6,0	5,0	4,0
F4 c/ ER	7,0	6,0	7,0	7,0	6,0	5,0	7,0	5,0	4,0

A instabilidade física das formulações também pode ser detectada, em alguns casos, por uma mudança na aparência como, por exemplo, na textura e consistência. O estudo científico desse tipo de estabilidade vem sendo feito principalmente através da reologia (LEONARDI, 2004).

Realizou-se o estudo reológico das formulações F2, F3 e F4 com e sem ER, a partir de ensaios de escoamento e de fluência-relaxação sob diferentes condições de tempo e temperatura. As figuras 39 a 57 mostram a relação entre tensão e a velocidade de cisalhamento nos ensaios de escoamento e tempo e compliância nos ensaios de fluência e relaxação.

Através desses ensaios foi possível observar que tanto as formulações contendo ER quanto as que não a continham, quando expostas à temperatura de 25°C por 90 dias, mantiveram o mesmo perfil reológico, com característica de fluidos plásticos com uma tensão limite para escoamento com diminuição na tixotropia (figuras 39, 43, 47 a 50 e 54) e apresentaram ainda propriedades elásticas representadas pelas figuras 40 a 42, 44, 45, 47 a 49, 51 a 53, 55 a 57, onde se pode observar o perfil viscoelástico e medir a elasticidade da amostra de acordo com os valores de compliância conseguidos. Assim pode-se afirmar que quanto menor a compliância na região de relaxação, mais elástico é o sistema.

O mesmo resultado de escoamento foi observado para todas as formulações quando expostas a 60°C por 45 dias, exceto F2 e F4 com ER, que apresentaram-se como líquidos (figura 39 e 50), entretanto o deslocamento da curva para valores inferiores de tensão de cisalhamento, sugerem que as formulações nestas condições são menos viscosas, indicando uma nova organização dos três constituintes presentes no sistema.

De acordo com os gráficos, a incorporação de 2% de ER nas formulações F2, F3 e F4, não alterou consideravelmente o comportamento dessas formulações em relação as mesmas formulações inertes, exceto aquelas expostas a 60° C.

Quanto a elasticidade, todas as formulações quando expostas a 60°C perderam sua característica elástica, apresentando perfil de líquidos newtonianos, porém com diferenças de viscosidade representadas pelos valores de compliância (figura 40 a 42, 44 a 46, 51 a 53, 55 a 57).

Decorridos os 90 dias a temperatura de 25°C, todas as formulações exceto F4 inerte, mantiveram comportamento viscoelástico.

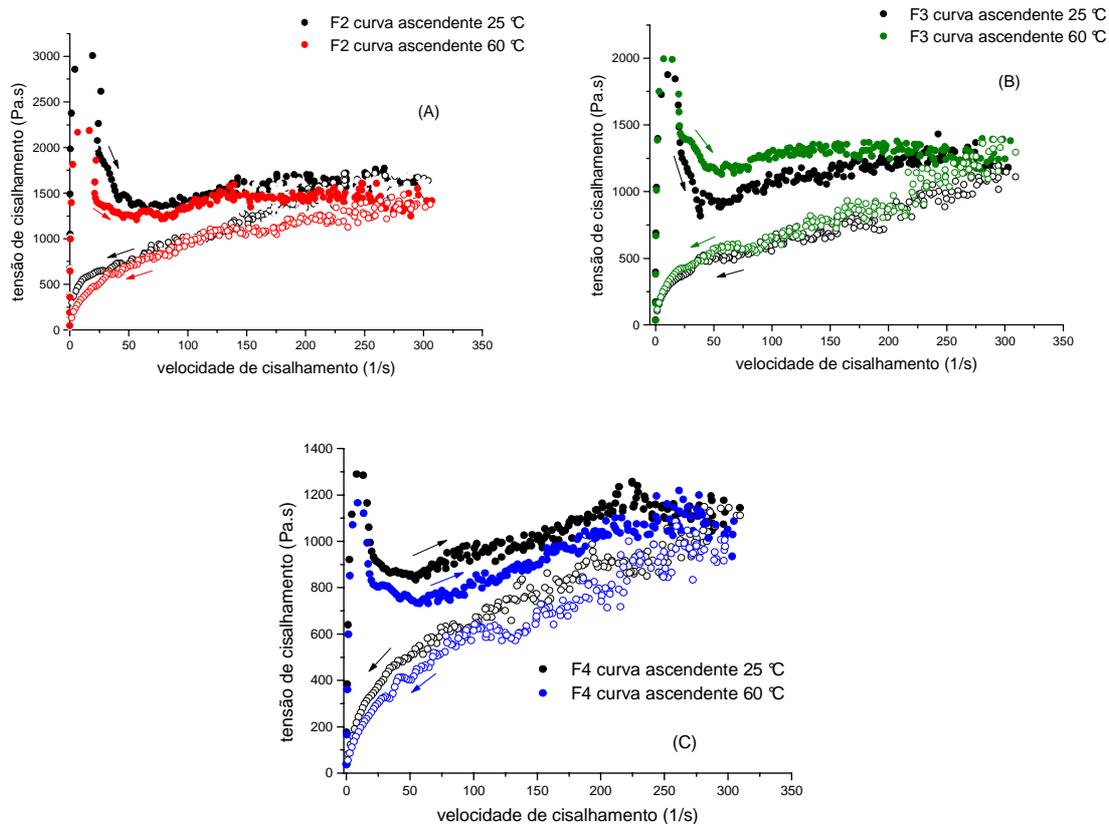


Figura 39: Relação entre tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento após 45 dias em estufa sob diferentes temperaturas (25 °C e 60 °C) para as formulações F2 (A), F3 (B) e F4 (C).

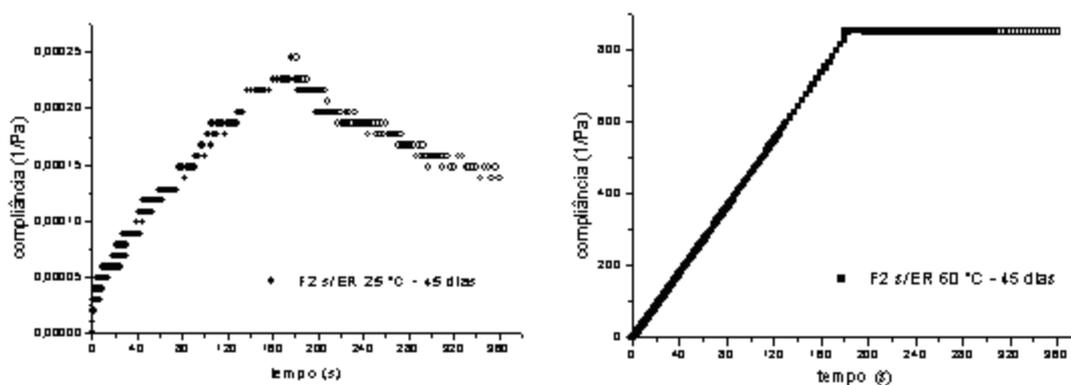


Figura 40: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F2 sem o fármaco após 45 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.

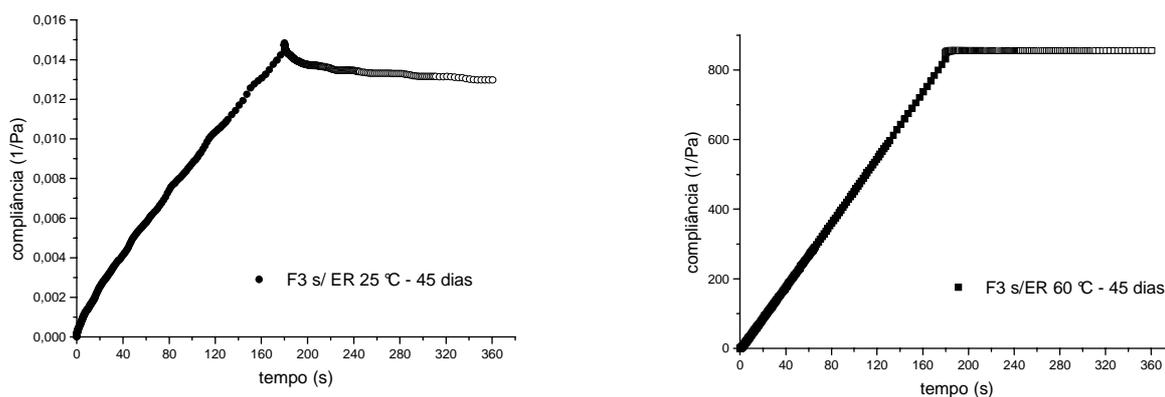


Figura 41: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F3 sem o fármaco após 45 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.

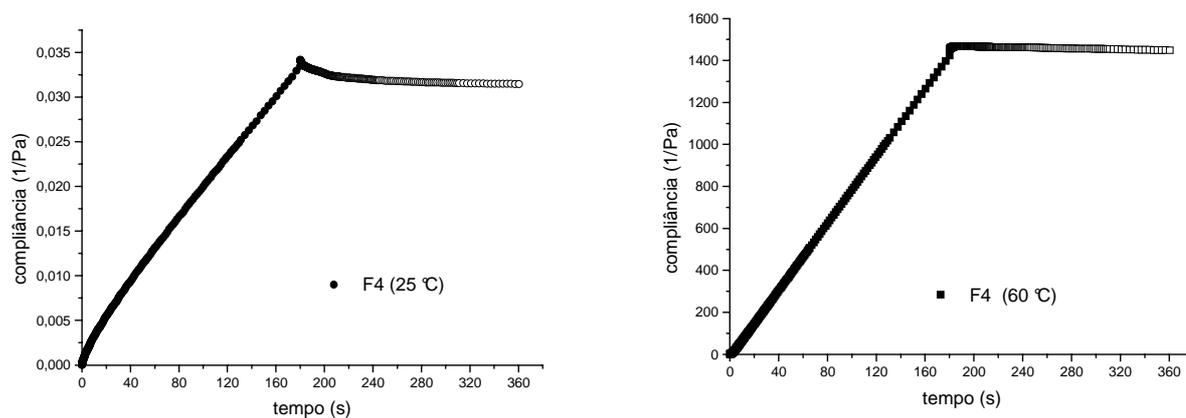


Figura 42: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F4 sem o fármaco após 45 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.

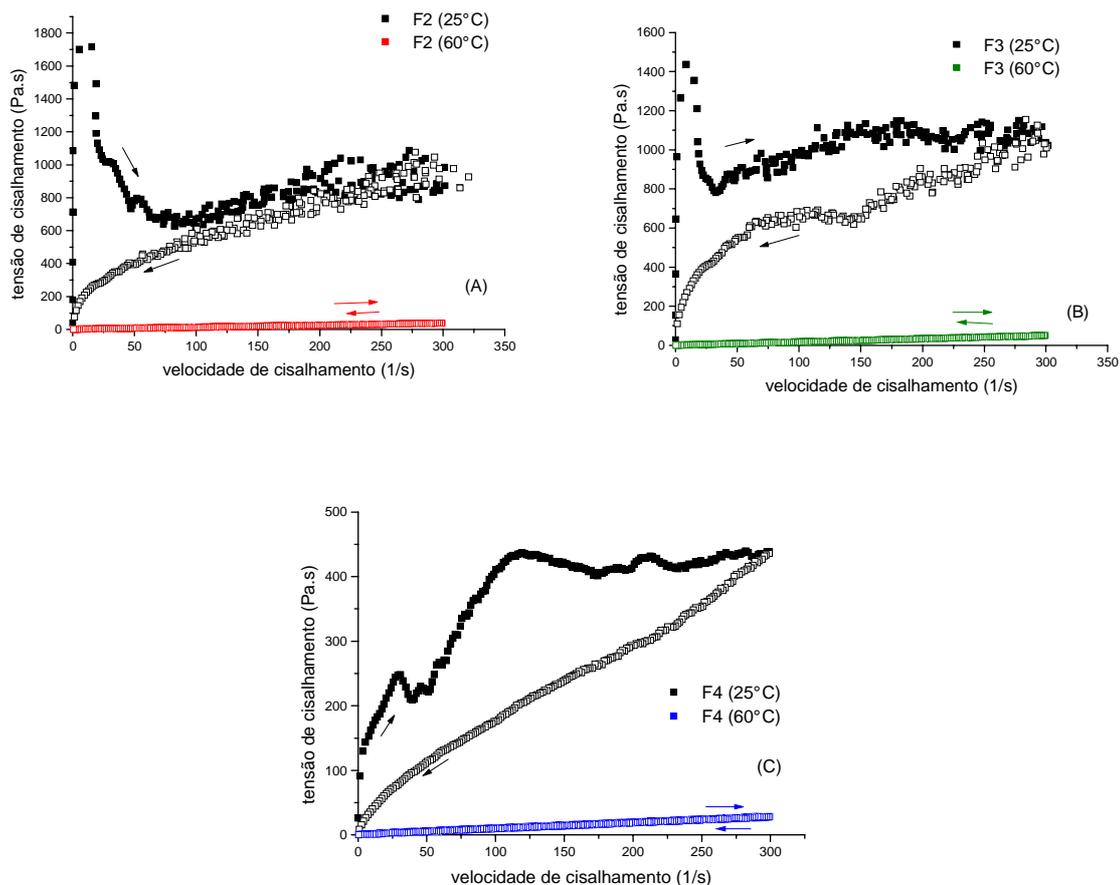


Figura 43: Relação entre tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento após 90 dias em estufa sob diferentes temperaturas (25 °C e 60 °C) para as formulações F2 (A), F3 (B) e F4 (C).

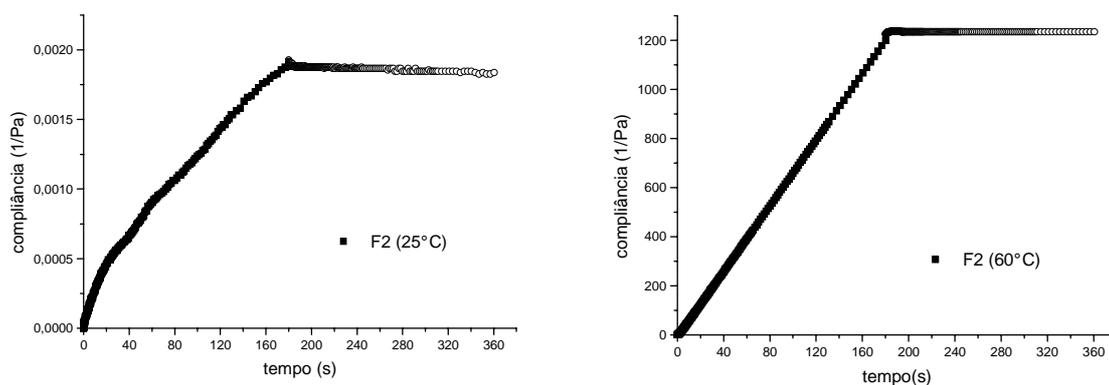


Figura 44: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F2 sem o fármaco após 90 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.

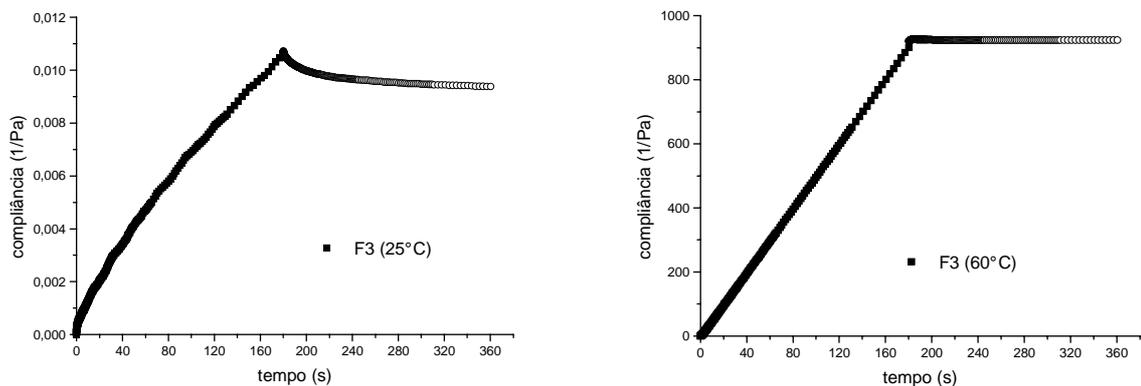


Figura 45: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F3 sem o fármaco após 90 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.

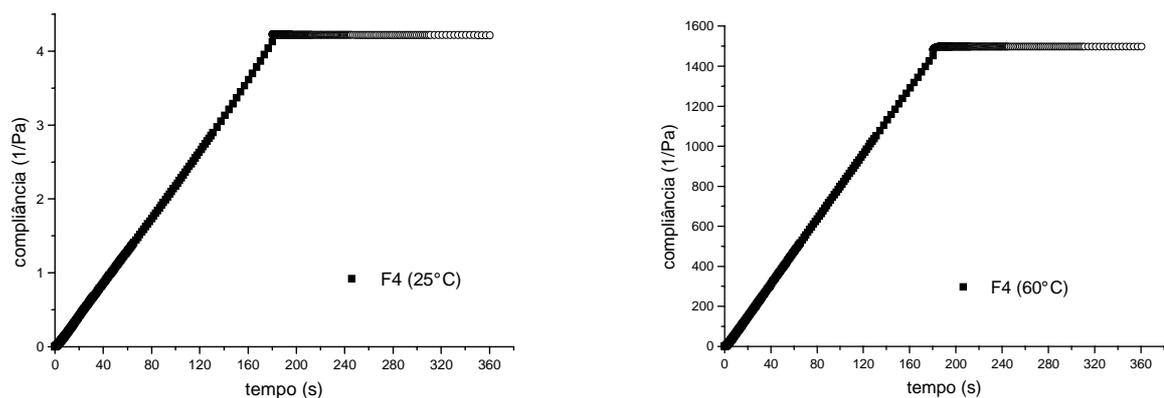


Figura 46: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F4 sem o fármaco após 90 dias em estufas sob diferentes temperaturas, ambiente (25 °C) e 60 °C.

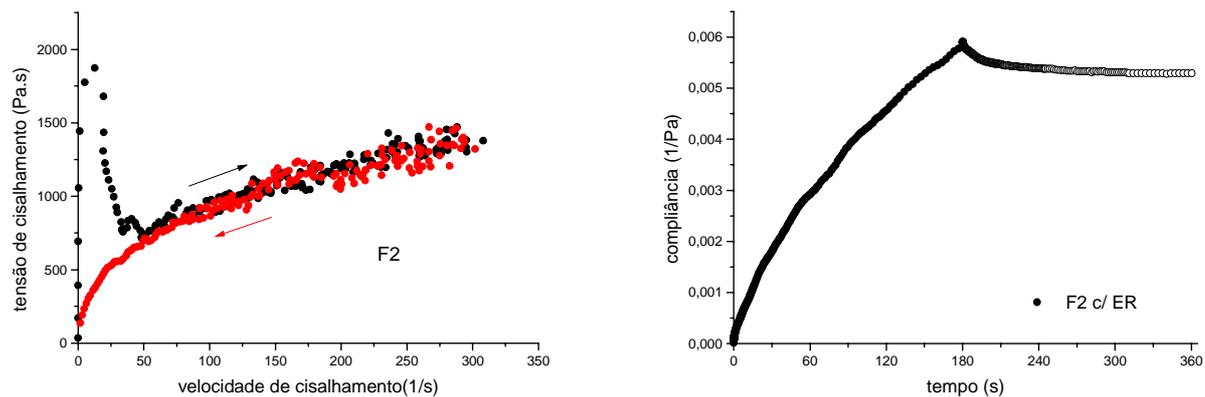


Figura 47: Reogramas de escoamento e, fluência e relaxação da formulação F2 contendo o fármaco após o preparo sob temperatura ambiente (25 °C).

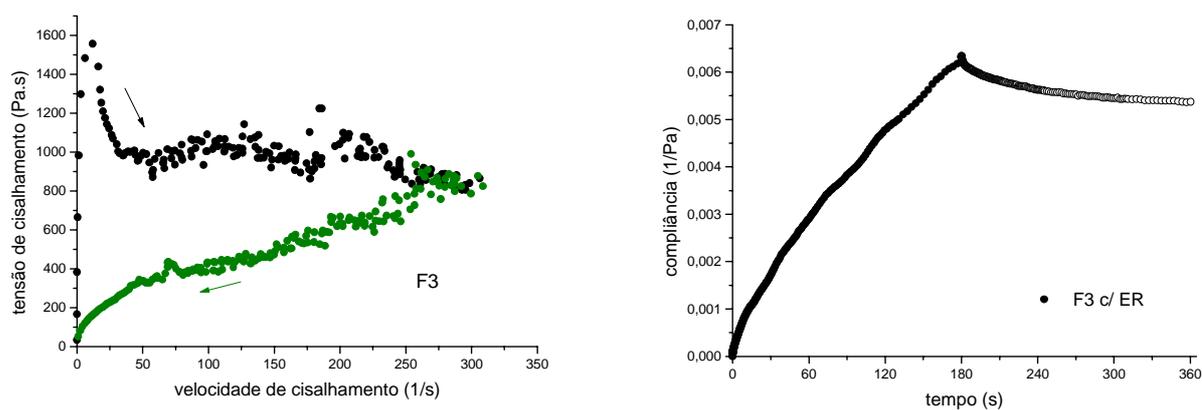


Figura 48: Reogramas de escoamento e, fluência e relaxação da formulação F3 contendo o fármaco após o preparo sob temperatura ambiente (25 °C).

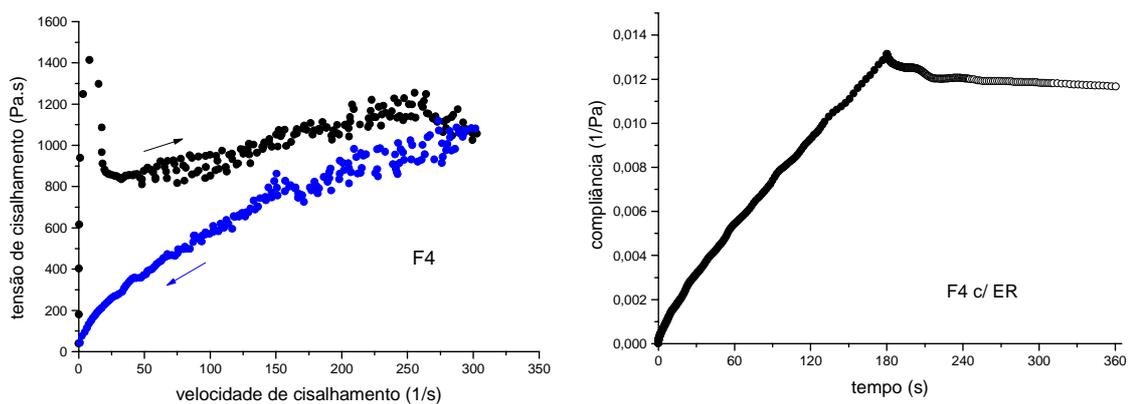


Figura 49: Reogramas de escoamento e, fluência e relaxação da formulação F4 contendo o fármaco após o preparo sob temperatura ambiente (25 °C).

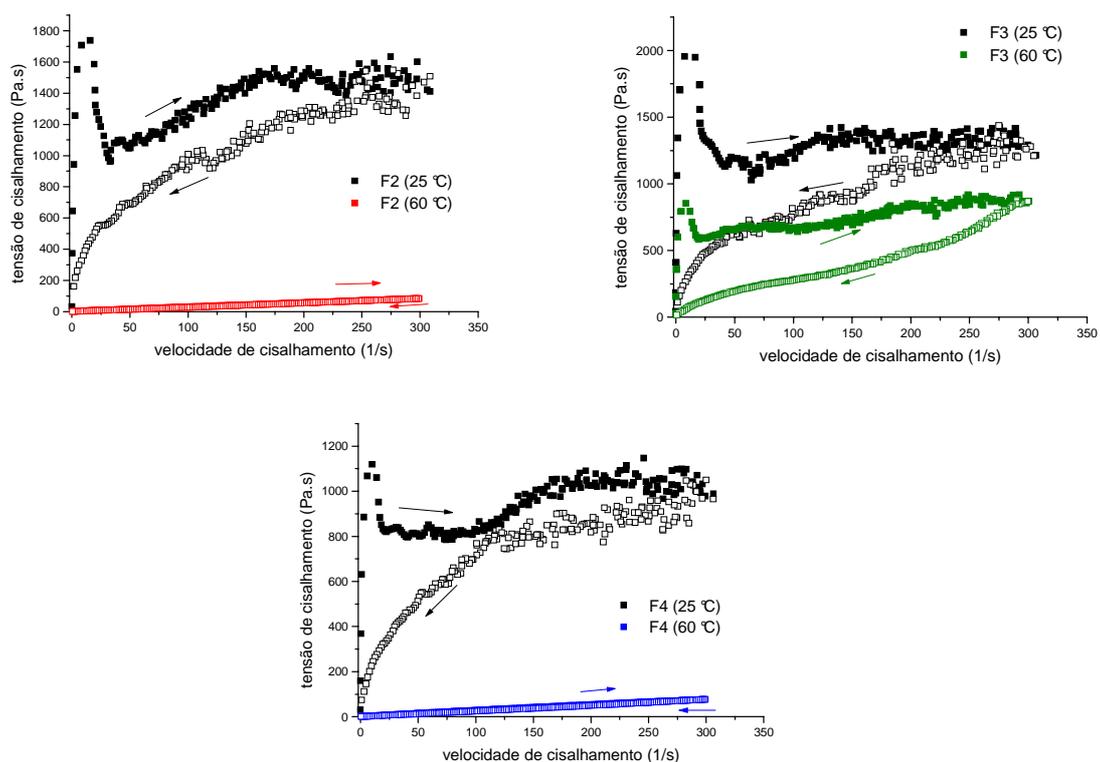


Figura 50: Reogramas de escoamento da formulação F2, F3 e F4 contendo o fármaco após 45 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.

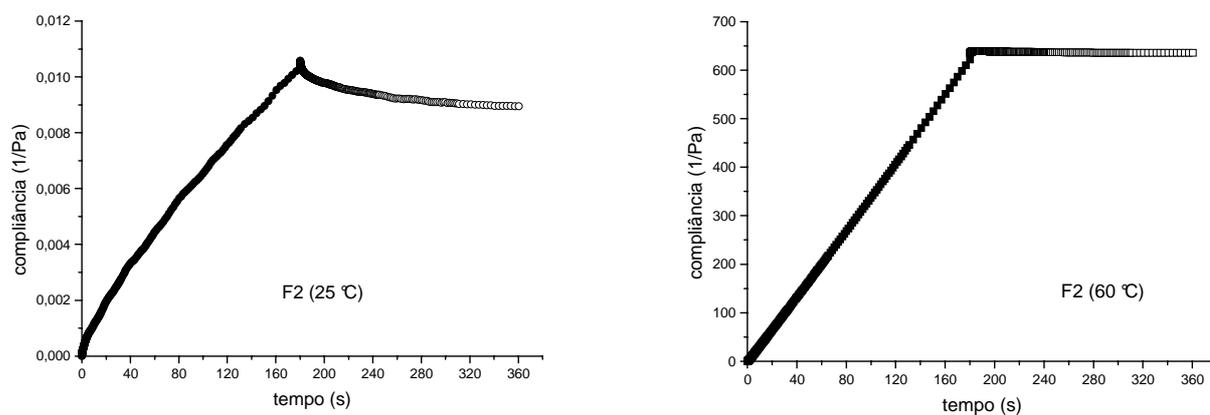


Figura 51: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F2 contendo o fármaco após 45 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.

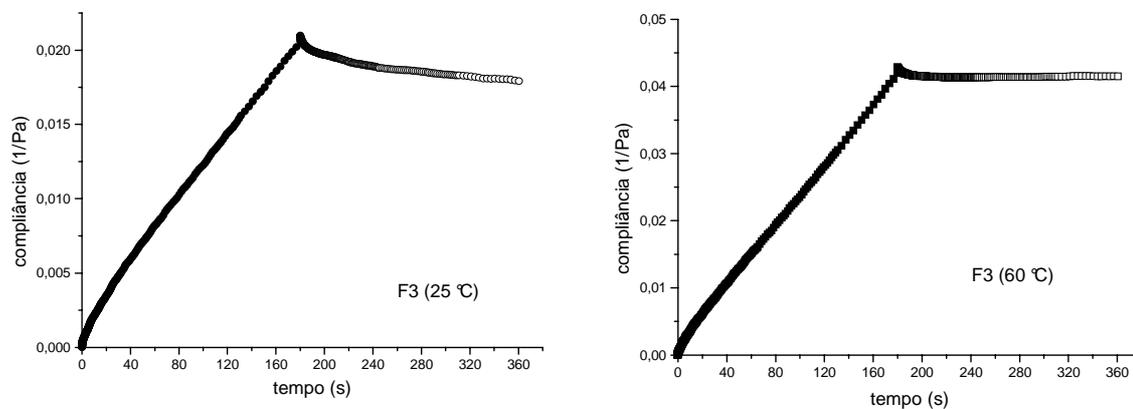


Figura 52: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F3 contendo o fármaco após 45 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.

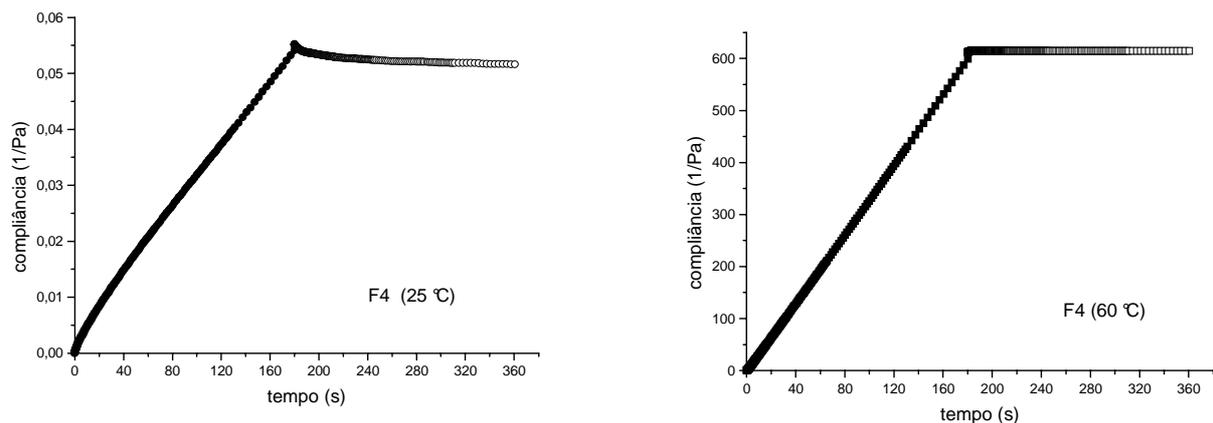


Figura 53: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F4 contendo o fármaco após 45 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.

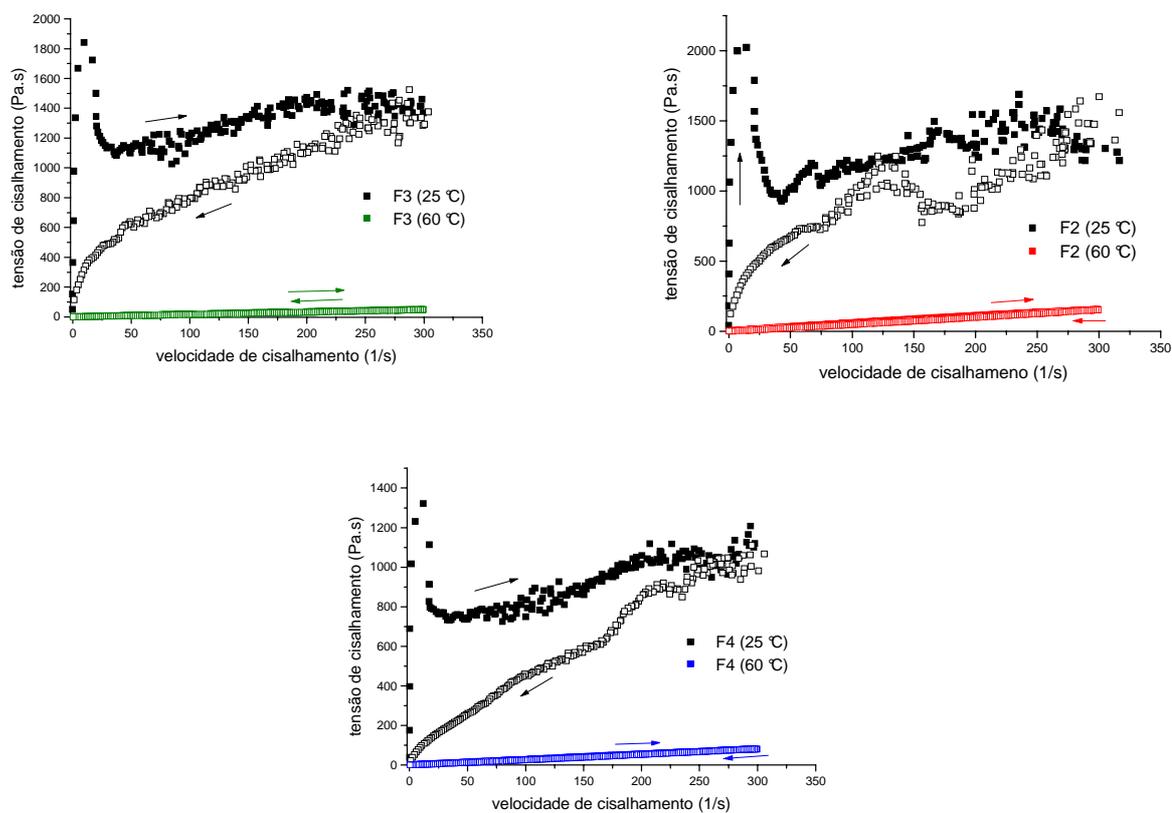


Figura 54: Reogramas de escoamento da formulação F2, F3 e F4 contendo o fármaco após 90 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.

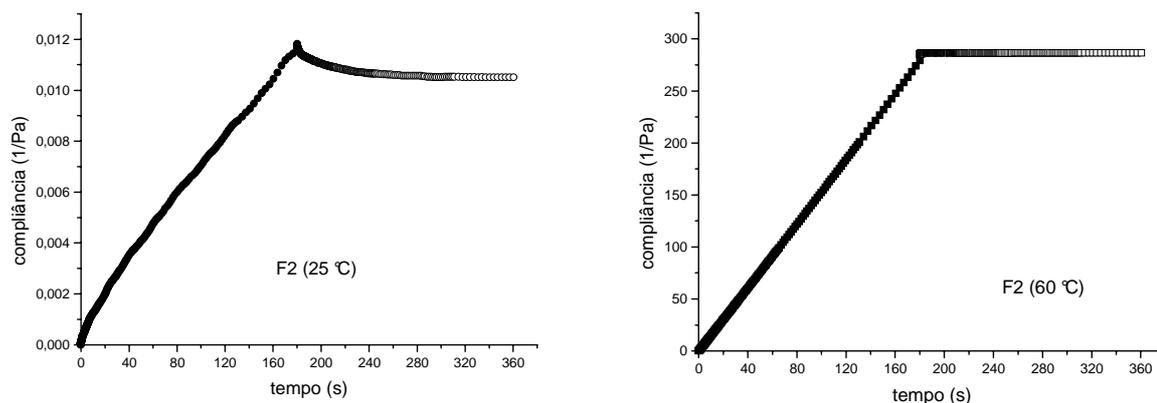


Figura 55: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F2 contendo o fármaco após 90 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.

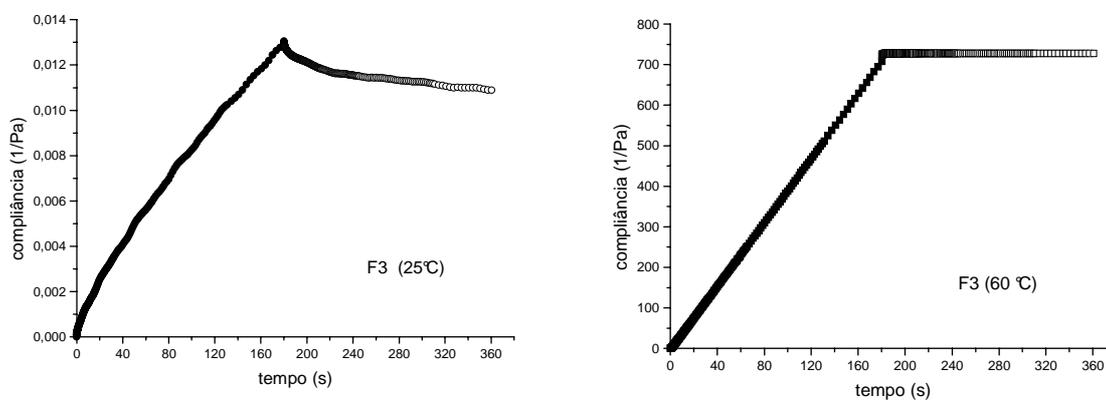


Figura 56: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F3 contendo o fármaco após 90 dias em estufas à temperaturas de 25 ° (ambiente) e 60 °C.

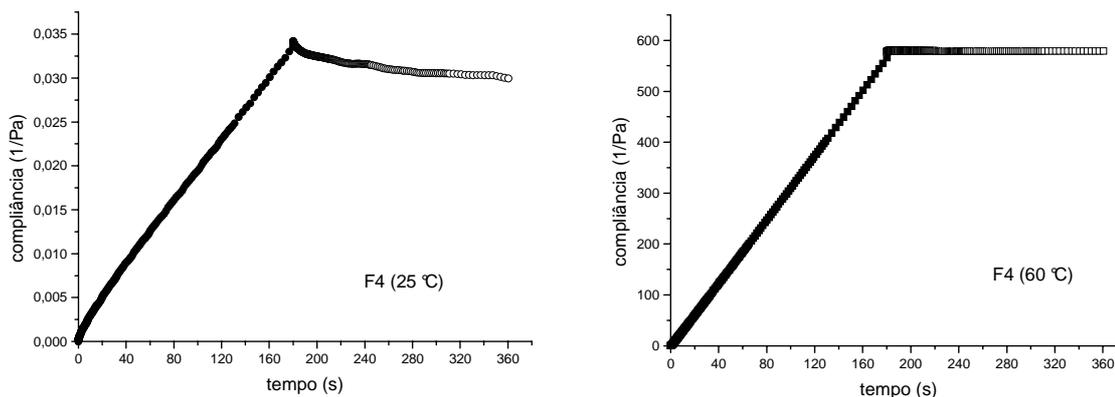


Figura 57: Reogramas de fluência e relaxação da formulação F4 contendo o fármaco após 90 dias em estufas à temperaturas de 25° (ambiente) e 60 °C.

As características organolépticas desses sistemas contendo ou não a ER, também foram estudadas e permaneceram estáveis decorridos 90 dias à temperatura de 25°C, ou seja, apresentaram-se transparentes e incolores, com odor característico do tensoativo e agradáveis ao toque. Enquanto que decorrido 90 dias a 45 e 60°C as formulações sem fármaco apresentaram amarelamento leve em relação às formulações contendo a ER, que se tornaram moderadamente amareladas após 45 dias, e muito amareladas após 90 dias sob temperatura de 45°C. As formulações expostas a 60°C tornaram-se muito amareladas decorrido os primeiros 45 dias e apresentaram ainda, forte odor de óleo oxidado. Ao término dos 90 dias essas formulações tornaram-se líquidas, ou seja, perderam sua elasticidade inicial, decorrente da desestruturação da rede que se forma e torna o sistema estável.

Quanto ao estudo de microscopia de luz polarizada, todas as formulações incorporadas ou não com ER, apresentaram estruturas estriadas ao desviarem o plano da luz. Porém aquelas que se tornaram líquidas decorrente a exposição a alta temperatura,

mesmo após a retirada do calor, apresentaram isotropia, caracterizada pelo campo escuro como pode ser observado na Figura 58;



Figura 58: Fotomicrografia do campo escuro característico de isotropia.

A mudança de estrias pra campo escuro observada na fotomicrografia (Fig. 58), confirma os resultados encontrados nos parâmetros reológicos do estudo da estabilidade preliminar.

O Teste de Prateleira ou Estabilidade de Longa Duração ou ainda *Shelf life*, tem como objetivo validar os limites de estabilidade do produto e comprovar o prazo de validade estimado. Consiste em um estudo realizado no período de tempo equivalente ao prazo de validade e utilizado para avaliar o comportamento do produto em condições normais de armazenamento, ou seja, condições ambientais (GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004).

Esse teste foi realizado para as formulações F2, F3 e F4, com e sem ER, e obteve-se resultado favorável, ou seja, as formulações apresentaram características como, transparência, permaneceram incolores, com odor característico do tensoativo e

agradáveis ao tato. Ao término do estudo ainda apresentaram comportamento plástico com tixotropia e fase hexagonal como forma de estruturação do sistema. O pH como descrito anteriormente (ver tabela 6), manteve-se na faixa da neutralidade, necessária para a preservação do fármaco.

4.6 Metodologia analítica

4.6.1 Variação do Tempo de Retenção (tr)

Segundo a Farmacopéia Britânica (2001), o tempo de retenção da eritromicina pode ser manipulado com a modificação da concentração de álcool butílico terciário na constituição da fase móvel.

Dessa forma, foi construído um gráfico, relacionando-se tempo de retenção da eritromicina em função da variação da porcentagem de álcool butílico terciário na solução A da fase móvel.

De acordo com a Figura 59, pode se relacionar à diminuição no tempo de retenção da ER, com variação causada na constante dielétrica da fase móvel à medida que se aumenta a proporção do álcool butílico terciário na constituição da FM. Sugere-se que o aumento do álcool cause diminuição na constante dielétrica da fase eluente, permitindo que o fármaco fique por menos tempo retido pela fase estacionária.

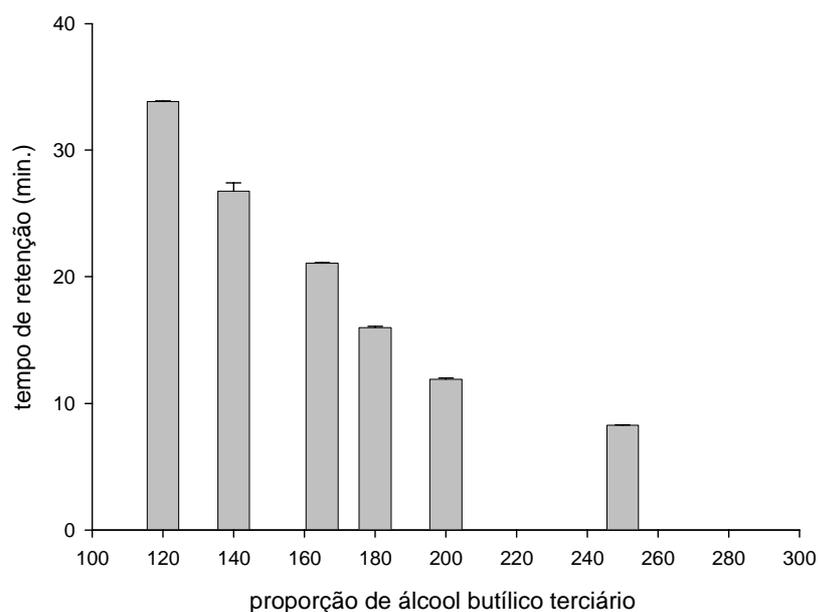


Figura 59: Tempo de retenção da eritromicina (em minutos) em função da proporção de álcool butílico terciário presente na solução A da fase móvel.

4.6.2 Constante dielétrica

Analisou-se a constante dielétrica da fase móvel a 25°C com cada uma das seis variações da solução A, relacionando-as com as proporções de álcool butílico terciário presente em cada uma delas, de acordo com a tabela 7.

Assim como Silva (2004), o estudo apresentou diferentes t_r para ER. O aumento do álcool causou diminuição na constante dielétrica e diminuição no tempo que o fármaco ficou retido pela fase estacionária.

Como a ER é hidrofóbica e muito pouco hidrofílica, tem assim, maior afinidade por solventes apolares do que polares, dessa forma, é arrastada mais facilmente por eles. A medida que a concentração do álcool butílico terciário aumenta na fase móvel, menor

é a constante dielétrica. Sugere-se que o aumento do álcool butílico terciário na fase móvel, torne a fase móvel mais apolar.

A solubilidade de uma substância está diretamente relacionada com a natureza do solvente. A constante dielétrica (ϵ) pode ter efeito significativo sobre a intensidade das interações dos íons em solução (ATKINS, 1999), uma vez que essas interações ocorrem de maneira mais intensa quando há semelhança entre as polaridades.

Tabela 7: Valores da constante dielétrica e temperatura do estudo

Fase móvel	Constante dielétrica (ϵ)	% de álcool butílico terciário
Varição de FM 1	69,1378	12
Varição de FM 2	68,1647	14
Varição de FM 3	66,9482	16
Varição de FM 4	66,2184	18
Varição de FM 5	65,2453	20
Varição de FM 6	62,8125	25

4.6.3 Validação da metodologia analítica

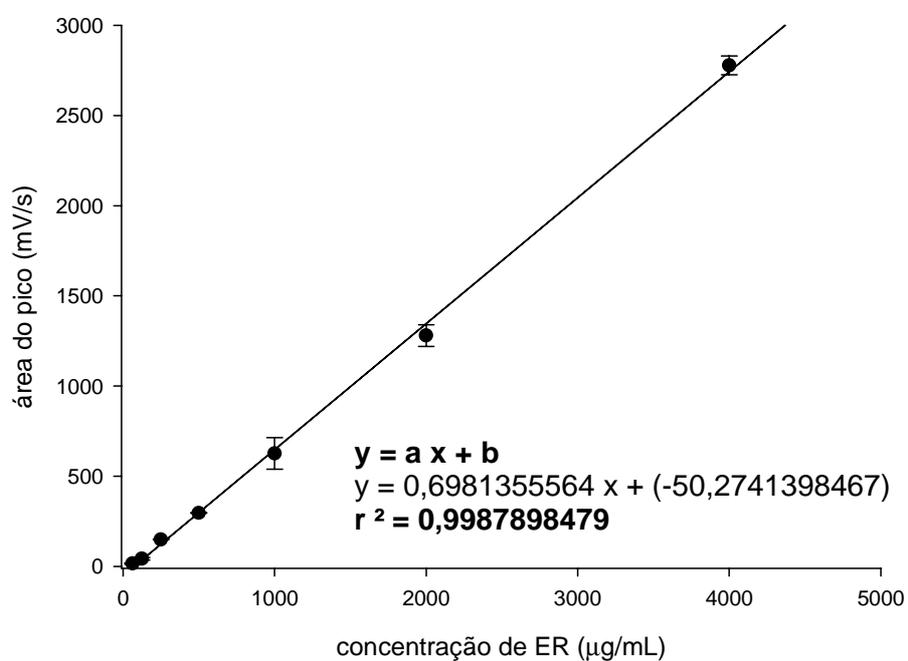
A validação de um método analítico pode ser definida como um processo formal, com o objetivo de se obter documentação e análise de dados. A linearidade do método de quantificação da ER foi analisada por CLAE.

A tabela 8 apresenta os valores obtidos para a curva analítica da ER (figura 60). A curva analítica foi construída com base na variação das áreas dos picos, característicos da ER. ($t_{r \text{ médio}} = 10,985 \text{ min.}$).

Tabela 8: Relação das concentrações de ER em fase móvel e área do pico obtida

ER ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas dos picos (mV/s)*	Coefficiente de variação (%)
4000	2778,69	1,88
2000	1280,20	4,71
1000	626,64	13,89
500	296,09	0,52
250	149,57	1,01
125	42,67	16,53
62,5	15,64	18,34

(*n=3)

**Figura 60:** Curva analítica da eritromicina obtida em 215 nm, em fase móvel: acetonitrila álcool butílico terciário e fase aquosa (3:20:77).

Com a construção da curva analítica da ER em fase móvel (acetonitrila 3%, álcool butílico terciário 20% e fase aquosa 77%) (figura 60), foi possível separar o pico do fármaco dos demais picos presentes no eluente e no veículo proposto.

Quando o procedimento foi realizado com a fase móvel (acetonitrila 3%, álcool butílico terciário 16,5 % e fase aquosa 80,5%) proposta pela USP (2006), o pico da ER, apresentava tempo de retenção muito grande, o que dificultava os demais estudos. As figuras 61 e 62, mostram os cromatogramas do eluente e da formulação sem a ER e com ER com os respectivos tempos de retenção, refletindo em um cromatograma aceitável.

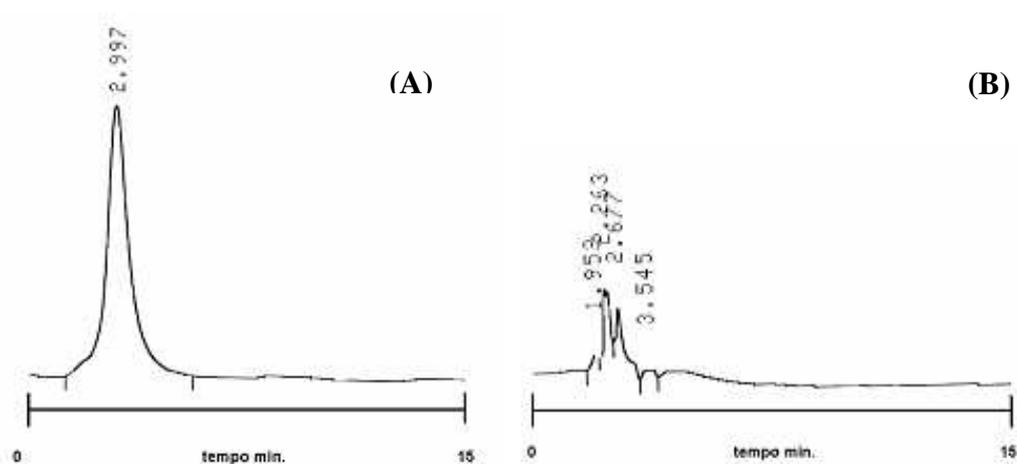


Figura 61: (A) cromatograma da fase móvel (variação: acetonitrila 3%, álcool butílico terciário 20% e fase aquosa 77%), (B) cromatograma do sistema micro estruturado sem o fármaco.

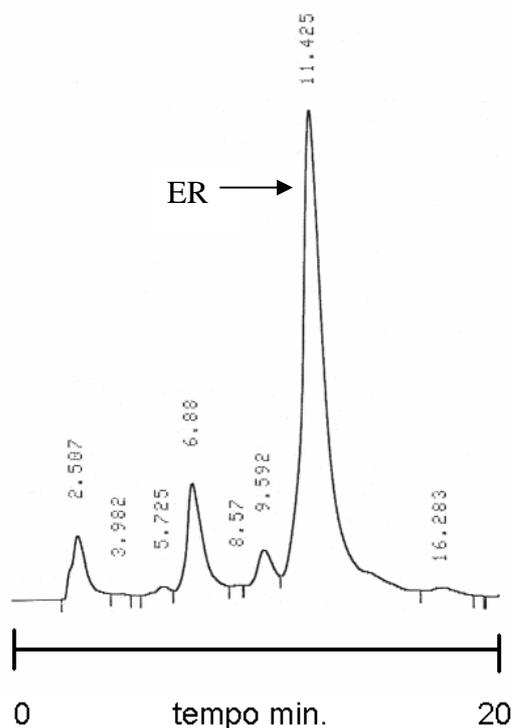


Figura 62: Cromatograma da solução padrão de eritromicina.

O método de CLAE no comprimento de onda 215 nm utilizado mostrou-se bastante efetivo e seletivo na determinação da eritromicina, pois nenhum componente da amostra interferiu na sua detecção.

O LD, dado como a menor concentração da substância na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada foi de 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A menor quantidade de ER na amostra que pode ser quantificada (LQ) com precisão e exatidão foi de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A seletividade do método foi avaliada através da análise dos cromatogramas, os quais apresentaram boa resolução dos picos, indicando que o método proposto pode ser aplicado na quantificação e controle da ER.

A amostra preparada contendo uma quantidade conhecida de ER determinou a exatidão do método através de ensaios de recuperação.

A valores encontrados da recuperação da ER adicionada encontram-se na tabela 9. São resultados referentes à média de 3 determinações e estão de acordo com os valores de referência, de 80 – 120% (ICH, 1996, ANVISA).

Tabela 9: Valores de recuperação encontrados

Soluções (amostras)	Concentração lida, encontrada através das áreas.	Recuperação %
2000 µg/ mL.	1905,7666	95,2883
500 µg/ mL.	496,1355	99,2271
125 µg/ mL.	133,1366	106,5093

4.7 Estabilidade da Eritromicina no Sistema

Os fármacos estão sujeitos a alguma forma de decomposição química ou física. Condições externas envolvidas na deterioração de fármacos e medicamentos são tidas como fatores extrínsecos ou ambientais, afetando a estabilidade física de medicamentos e acelerando processos de decomposição química do fármaco (GIL, et al.,2005).

A eritromicina é um antibiótico que pode ser administrado tanto por via oral como por via tópica. O fato de ser frequentemente veiculada em formas farmacêuticas de uso tópico, como géis e cremes para o tratamento da acne, torna muito importante o conhecimento de sua estabilidade em diferentes veículos. Muitas formulações não trazem um prazo de validade oficial, sugerindo que se faça uso da medicação em um prazo de aproximadamente 3 meses (PAESEN et al., 1998; VERMEULEN et al., 1999).

Sabe-se que a eritromicina não é muito estável, principalmente em solução ou em formulações com considerável constituição de fase aquosa (BRISAERT et al.,2000). A degradação da eritromicina é caracterizada por picos de metabólitos formados a partir da eritromicina A e detectados em análises por CLAE (PAESEN et al., 1998). Uma das principais causas da instabilidade da ER é a variação no pH, o que torna sua estabilidade pH dependente (BRISAERT et al.,2000).

Sendo assim, estudou-se a estabilidade da ER incorporada em matrizes líquido - cristalinas a 25 e 60° C por 90 dias.

Como pode ser observado na figura 63, o método analítico foi capaz de identificar a degradação da ER na formulação F2 até o quinquagésimo sétimo dia, após esse período, nota-se que o método não foi eficiente em separar o pico correspondente da ER, com seu possível metabólito de degradação formado. Esse fato é identificado por uma queda brusca na concentração encontrada do fármaco após cerca de 9 semanas (65dias) exposto a 25° C. Enquanto que, a 60° C , a ER só pode ser identificada e quantificada com certeza, ate vigésimo segundo dia, nas três formulações (figuras 64 e 65), apresentando também uma queda brusca de concentração encontrada a partir da quarta semana (29dias).

Quanto a ER veiculada na formulação F3 e F4 a 25° C, pode se observar seletividade do método para a quantificação até quinquagésimo dia e trigésimo sexto, respectivamente. Na figura 65, é possível ainda identificar um segundo metabólito depois de decorridos 71 dias. Isso significa que apesar da formulação F2 apresentar maior proporção de fase aquosa, é a formulação em que a ER apresenta maior estabilidade.

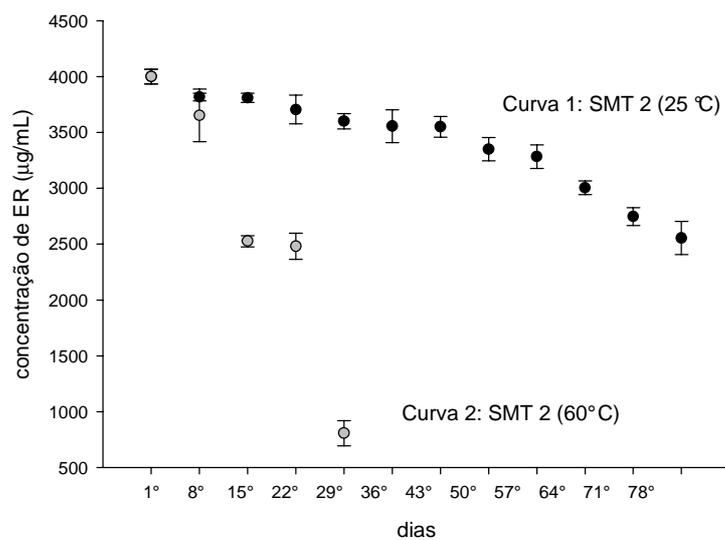


Figura 63: Gráfico referente à estabilidade da ER nas formulações F2, submetida à temperatura de 25 °C e 60 °C.

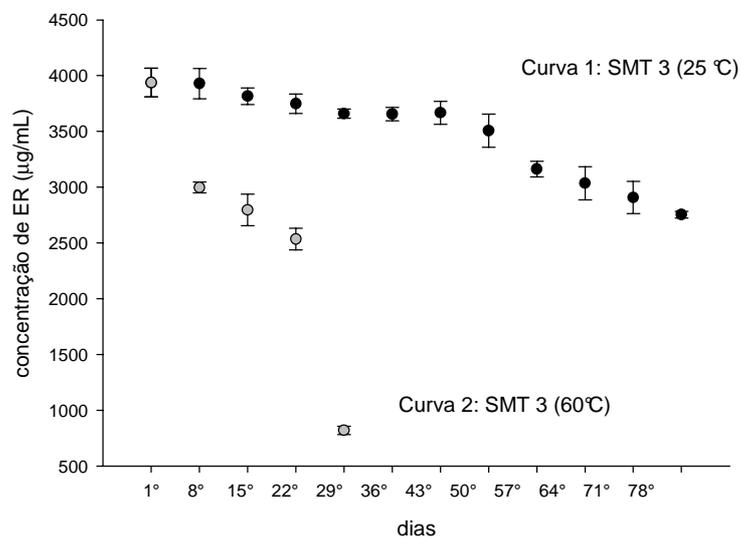


Figura 64: Gráfico referente à estabilidade da ER nas formulações F3, submetida à temperatura de 25 °C e 60 °C.

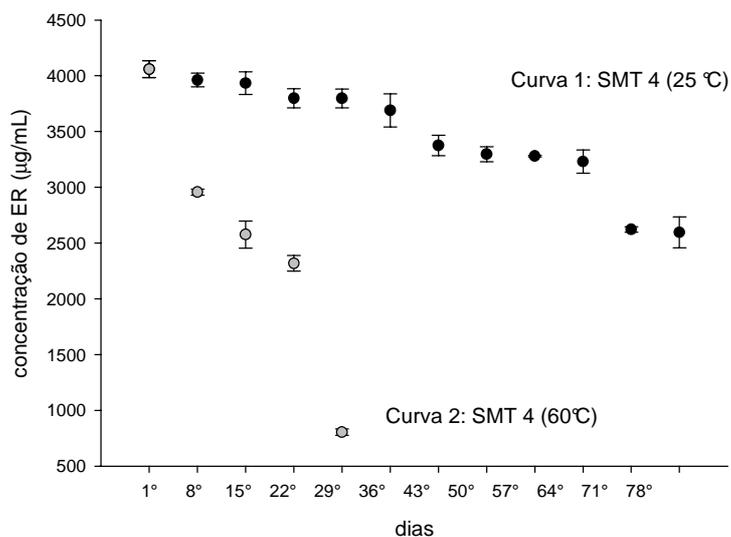


Figura 65: Gráfico referente à estabilidade da ER nas formulações F4, submetida à temperatura de 25 °C e 60 °C.

Podemos relacionar a formação de produtos de degradação da ER tanto a 25° como a 60° C, com a diminuição nos valores de pH apresentado pelas mesmas no decorrer dos 3 meses.

Alterações na coloração das formulações também foram constatadas, e podem ser relacionadas com produtos de degradação formados, uma vez que os decréscimos de concentração aparecem concomitantemente com o amarelamento das formulações, Figura 66.



Figura 66: Mudança de coloração dos sistemas após exposição à temperatura constante de 60°C.

4.8 Coeficiente de Partição óleo/água

Estudos sobre distribuição de solutos em sistemas líquidos bifásicos tornou-se um campo de estudo essencial desde o século XIX. O sistema de distribuição de soluto, octanol/água, é uma propriedade físico-química aceitável, considerando a hidrofobicidade de substâncias químicas (BERTHOD, et al.; 2004).

Após o equilíbrio e centrifugação, a concentração relativa em cada fase foi determinada utilizando-se a técnica de CLAE (BERTHOD, et al.; 2004).

As concentrações antes da partilha (C_1) e após a partilha (C_2) foram calculadas a partir da equação da reta da curva analítica, (figura 67).

Os valores de concentração da ER antes (C_1) e após a partilha (C_2) com octanol. $K_{\text{octanol/água}}$ encontrado para eritromicina, foram respectivamente: 639,12 e 234,03 $\mu\text{g/mL}$

O valor obtido no estudo foi de 1,73. Segundo Urban 2004, para uma penetração eficaz de fármacos na pele é necessário que o coeficiente de partição seja igual ou maior que 1 (URBAN,2004).

4.9 Perfil de solubilidade *in vitro* da ER

A farmacopéia Norte-Americana (USP, 2004), prescreve como meio de dissolução para ER veiculada em comprimidos, tampão fosfato 0,05M pH 6,8.

Foi realizado o estudo da solubilidade máxima da ER no meio de dissolução, para que o ensaio de liberação *in vitro* pudesse ser realizado sob as condições *sink*. A solubilidade máxima da ER a temperatura ambiente foi determinada através da curva analítica em tampão fosfato 0,05M pH 6,8, e obteve-se como resultado 2560 $\mu\text{g/mL}$.

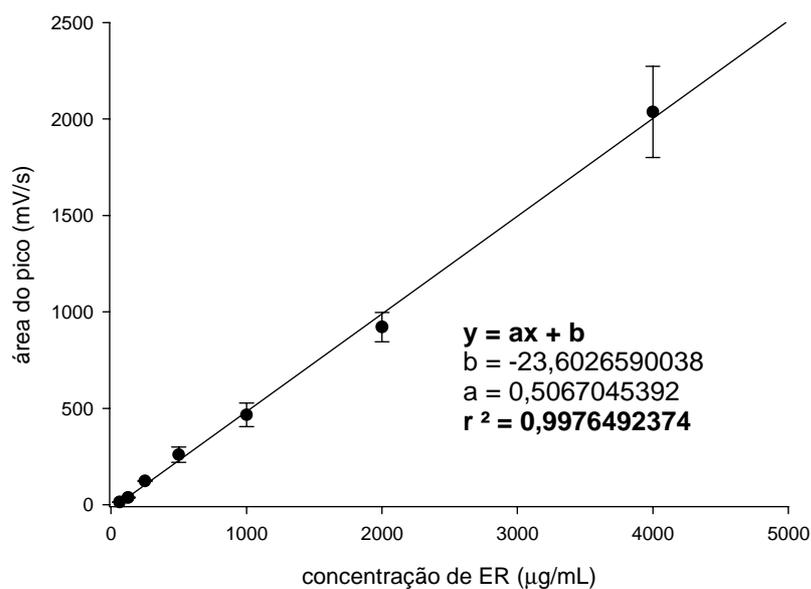


Figura 67: Curva analítica da ER em tampão fosfato pH 6,8

4.9.1 Perfil de liberação *in vitro* da ER

Para a realização do ensaio de liberação *in vitro* foi necessária a adaptação do sistema da célula de difusão ao dissolutor. A agitação constante foi mantida durante todo o experimento, para evitar a formação de camada estagnante de fármaco próxima à membrana difusora. Em intervalos de tempo pré-determinados, 50µL de amostra foram coletados e analisados por CLAE em comprimento de onda de 215 nm. A média dos valores da área do pico obtida foi aplicada na equação da reta, a fim de obter-se a quantidade de ER liberada. Os perfis de liberação das preparações foram determinados pelas concentrações de ER liberadas em função do tempo. O resultado encontra-se na figura 68, respectivamente.

Os resultados do ensaio de liberação demonstraram que em todos os casos estudados houve um pronunciado prolongamento de tempo de liberação do fármaco contido nos CLs em relação ao fármaco livre. Enquanto que 100% de ER livre encontrava-se em solução em aproximadamente 15 minutos de ensaio, para a formulação F3 e F4 ocorreu a liberação completa do fármaco após 7 horas de ensaio. A formulação F2 apresentou tempo de retenção da ER muito maior que as formulações F3 e F4, pouco mais da metade do total do fármaco incorporado foi dissolvido nesse mesmo tempo.

As características de liberação de fármacos contidos em CLs são importantes, devido o propósito de sua aplicação como sistema de liberação controlada de fármacos. Alguns fatores podem afetar a taxa de liberação do fármaco incorporado em CL.

Em relação à organização da matriz líquido-cristalina, os domínios cristalinos tendem a reter o fármaco, por apresentarem uma rede consolidada dificultando a migração do fármaco, causando um aumento no tempo de liberação da ER.

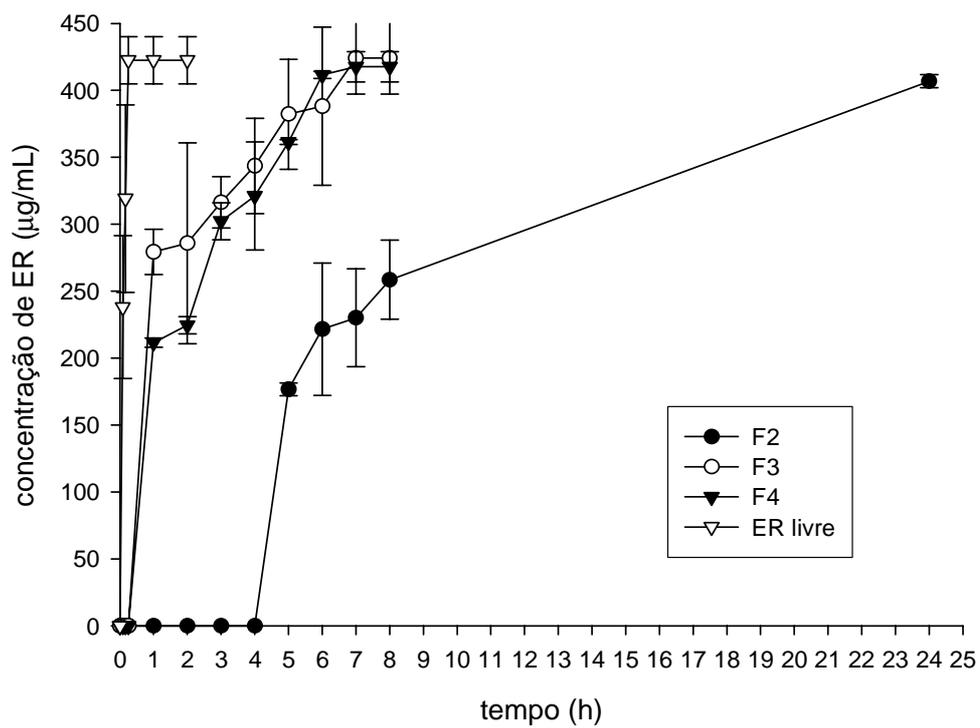


Figura 68: Perfil de liberação *in vitro* dos CL contendo ER.

5. Conclusões

- Quanto à reação de identificação, o fármaco analisado foi considerado como eritromicina.
- Com a construção do diagrama ternário de fases, foi possível identificar as regiões de formação dos diferentes sistemas, em função da variação da quantidade de procetyl e água na fórmula.
- Nos estudos de reologia, o sistema líquido cristalino apresentou comportamento não newtoniano do tipo plástico com tixotropia, e viscoelasticidade.
- O sistema líquido-cristalino foi capaz de veicular mais do que 2% de ER.
- As técnicas de microscopia de luz polarizada e SAXS, permitiram evidenciar a organização interna dos sistemas e classifica-lo como cristal líquido com fase hexagonal.
- O coeficiente de partição apresentou-se propício à penetração da ER através da pele.
- O método usado na análise por CLAE foi bastante efetivo e parcialmente seletivo na determinação quantitativa da ER.
- A constante dielétrica interfere no tempo de retenção da ER, porque reflete na polaridade do eluente.
- A ER é estável em faixa de pH próxima da neutralidade
- Os cristais líquidos prolongam a liberação de 100% da ER em no mínimo 7 horas.
- Dentre as formulações usadas para o ensaio do perfil da liberação *in vitro* da ER, F3 foi considerada a melhor formulação, pois apresentou liberação rápida na primeira hora em relação a F4 e que se manteve por um total de sete horas. A formulação F2

apresentou retenção muito grande do fármaco, que começou a ser liberado somente após 4 horas de ensaio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M. H.; CHADHA, H.S.; MITCHELL, R.C. The factors that influence skin penetration of solutes. **J.Pharm. Pharmacol.** v. 47, p. 8-16, 1995.

ABRAMOWITZ, M.; PARRY-HILL, M. J.; DAVIDSON, M. W. Polarized light microscopy. The Florida State University and Olympus American Inc. www.microscope.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index.html. Acessado em 24 ago. 2005.

AGMON, N. The Grotthuss mechanism. **Chem. Phys. Let.**, 244, p. 456-462, 1995.

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

AMARAL, L. Q.; GULIK, A.; ITRI, R.; MARIANI, P. Micellar hexagol phases in lyortopic liquid crystals. **Physical. Rev. A.**, v.46, n. 6, p.3548-3550,1992.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. **Farmacotécnica formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 6° ed., p. 288-291, 307, 2000.

ANVISA. Validação de metodologia analítica. Disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em 2007.

ATKINS, P.W. **Físico-química**. Rio de Janeiro: LTC, 6 ed., v. 2, 1999.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookmam. 3ed., p 293-295, 300-302, 2006.

BECHTOLD, I. H. Liquid crystals: A complex system of simple application. **Rev. Bras. Ensino Física**. p. 333-342, 2005.

BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. **J. Chromatog. A. Rev.**, 1037, p.3-14, 2004.

BRISAERT, M.; GABRIËLS, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Investigation of chemical stability of an erythromycin-tretinoin lotion by the use of an optimization system. **Int. J. Pharm.**, v.197, p. 153-160, 2000.

BRITISH pharmacopoeia. 2001. London: The Stationery Office, 2001, v.1, p. 650-651.

CONSTANTINIDES, P. P.; SCALART, J. Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long-versus medium-chain glycerides. **Int. J. of Pharm.**, v.158, p.57-68, 1997.

CRAIEVICH, A. F. Synchrotron SAXS studies of nanostructured materials and colloidal solutions. **Materials Research Rev**, v .5, n. 1, p. 1-11, 2002.

CRODA DO BRASIL. **Procetyl AWS**. Campinas,1994.

DEAN, J. A. **Lenge's handbook of chemistry**. 14th ed. New York : McGraw-Hill,inc.1992.

DEGITZ, K.; PLACZEK, M.; BORELLI, C.PLEWIG,G. Pathophysiology of acne. **JDDG**, v. 4, p. 316 – 323, 2007.

DIETRICH, A. V.; HUI, J. P. M. Study of erythromycin A decomposition products in aqueous solution by solid-phase microextraction / liquid chromatography / tandem mass spectrometry. **Rapid commun. Mass spectrum**. v.12, p. 123 – 129, 1998.

Dp Union-TA instruments. II Jornada de reologia, 2003.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.;MITTAL, K. L. **Handbook of Microemulsion Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Andrei, 3 ed., 1997.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Andrei, 4 ed., 1988.

FORMARIZ,T. P.; WANCZINSKI, B.J.; SILVA JR, A. A.; SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A.G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicados na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento de câncer. **Infarma**, v.16, n.1-2, jan/ fev, 2004.

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

GIL, E.S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: Editora Uniderp, 2005.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 9 ed., 1996.

GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS. Séries Temáticas. Brasília : ANVISA. 1ªed., 2004.

GUYTON, A. C., HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 918, 919, 1997.

HADGRAFT, J. Skin, the Final Frontier. **Int. J. Pharm.** v. 27, p. 1-18, 2001.

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

ICH-Q2B **Validation of analytical procedures: Metodology**. November 1996.

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

KORHONEN, M. **Rheological Properties of Pharmaceutical Creams Containing Sorbitan Fatty Acid Ester Surfactants**. Academic dissertation. Department of Pharmacy. Helsinki, 2003.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 18.78, 18.79, 2001.

KOROLKOVAS, A; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.35, 1988.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.54. n.1, p.77-98, 2002.

KUMAR, P.; MITTAL, K. L. **Handbook of Microemulsion Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 1999.

Laboratório Nacional de Luz Sincroton. www.lnls.br. acessado em 2007.

LAGNER, A.; SHEEHAN-DARE, R.; LAYTON, A. A randomized single-blind comparison of topical clindamycin + benzoyl peroxide (Duac[®]) and erythromycin + zinc acetate (Zineryt[®]) in the treatment of mild to moderate facial acne vulgaris. **JEADV**. v. 21, p. 311-319, 2007.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsions-based Media as Novel Drug Delivery Systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.45, p. 89-114, 2000.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo : Editora Medfarma, 2004.

LONGO, D. P. **Obtenção, caracterização e estudos de liberação *in vitro* e permeação *in vivo* de sistemas microestruturados contendo cafeína**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

MACIAN, M.; SEGUER, J.; INFANTE, M. R.; SELVE, C.; VINARDELL, M. P. Preliminary studies of the toxic effects of derived from lysine non-ionic surfactants. *Apud*: LONGO, D. P. **Obtenção, caracterização e estudos de liberação *in vitro* e permeação *in vivo* de sistemas microestruturados contendo cafeína**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

MAINARDES, R. M. **Preparação e caracterização de nanopartículas de ácido poli (D, L-lático-co-glicólico) contendo praziquantel**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2004.

MARTINDALE, W. **The Complete drug reference**. 32nd ed. Massachusetts: The Pharmaceutical Press, p. 204-207, 1072-1073, 1999.

MEZZENGA, R.; MEYER, C.; SERVAIS, C.; ROSMOCANU, A. I.; SAGALOWICZ, L.; HAYWARD, R. C. Shear rheology of lyotropic liquid crystals: A case study. **Langmuir**.v.21, p. 3322-3333, 2005.

MOFFAT, A. C.; JACKSON, J. V.; MOSS, M. S.; WIDDOP, B. **Clarke's Isolation and Identification of Drugs**: In Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-mortem Material. London: The Pharmaceutical Press, 2nd edition, 1986.

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

MÜLLER, B.; KASPER, M.; SURBER, C.; IMANIDIS, G. Permeation, metabolism and site of action concentration of nicotinic acid derivatives in human skin correlation with topical pharmacological effect. **Pharm. Sci.** v. 20, p. 181-195, 2003.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de Físico-química**: Uma Abordagem Conceitual para as Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre : Artmed, 2002.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Microemulsões I: Fundamentos Teóricos da Formação do Sistema Microemulsionado. **Infarma**, v. 13, n. 9/10, p. 73-79, 2001.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicação como sistema de liberação de fármacos. **Quím. Nova**, v. 27, n.1. p. 131-138, 2004.

PAESEN, J.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Study of the stability of erythromycin in hydrophilic creme basis by liquid chromatography. **J. Pharm. Biomedical Analysis**. v. 17, p. 53-56, 1998.

REMGINGTON. The science and practice of pharmacy. 20 ed., p. 1535, 2000.

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

ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6 ed., p.1079 – 1081, 2000.

ROMÁN, R. A.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; FESSI, H.; GUY, R. H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 58, p. 301- 316, 2004.

SAMPAIO, S. A.P. **Dermatologia**. São Paulo: Artes médicas. 2 ed., p.291-294, 2001.

SCHEINFELD, N.S.; TUTRONE, W.D.; TORRES, O.; WEINBERG, J.M. Macrolides In Dermatology. **DisMon**, v.50, p, 350-368, 2003.

SCHOTT, H. Reology. In: **Remington: The science and Praticce of Pharmacy**. Eston (Pennsylvania): Mack Publishing Company, 19 ed., v.1, 1995.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber Editora. 2 ed., 2006.

SILVA, E. J. **Obtenção e caracterização de pellets para liberação prolongada de triancinolona a aprtir de micropartículas de ácido-co-glicólico**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2004.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC. 5 ed., 1994.

SOLANS, C.; KUNIEDA, H. **Industrial Applications of Microemulsions**. New York: Marcel Dekker. p. 1-15, 1997.

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

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos**. São Paulo: Atheneu. 2 ed., p. 464- 471, 1996.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 26. ed. (Ed.) Rockville: United States Pharmacopeical Convention, p. 663-676, 2006.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 24. ed. (Ed.) Rockville: United States Pharmacopeical Convention, 2000.

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

VERMEULEN, B.; REMON, J. P.; NELIS, H. the formulation and stability of erythromycin-benzoyl peroxide in topical gel. **Int. J. Pharm.** v.178, p. 137-141, 1999.

WANG, Z.; DIAO, Z.; LIU, G. ZHANG, G. Microstruture and rheological preoperties of líquid crystallines formed in Brij 97/ water / IPM system. **J. Colloid and Interface Sci.** p.813-818, 2006.

WENNINGER, J. A. **International cosmetic ingredient dictionary and handbook.** 7th. ed., Washington: The Cosmetic, Toiletry and fragrance Association, 1997.

ZOUBOULIS, C. C. Acne and sebaceous gland function. **Clinic. Dermatol.** v.22, p. 360-366, 2004.

WOOD, J.H. Reologia Farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, M.A.;

KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste

Gulkenkian, v.1, p. 211-253, 2001.

KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação

Calouste Gulkekian, v.1, p. 211-253, 2001.