

**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)**  
Campus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

**ESTRATÉGIAS PARA MODULAR A PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE ACETATO DE  
DEXAMETASONA: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PERMEAÇÃO E *IN VIVO* DA  
ATIVIDADE ANTI-NOCICEPTIVA**

Márcia Helena Oyafuso

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Araraquara – SP

2016

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

**ESTRATÉGIAS PARA MODULAR A PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE ACETATO DE  
DEXAMETASONA: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PERMEAÇÃO E *IN VIVO* DA  
ATIVIDADE ANTI-NOCICEPTIVA**

Márcia Helena Oyafuso

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marlus Chorilli  
COORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA - SP

2016

*Dedicatória*

---

Dedico este trabalho aos meus pais  
Maria Helena e  
Antônio Massao (*in memoriam*),  
e ao meu irmão Marcelo.

---

*Márcia Helena Oyafuso*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço **ao meu Deus** por todas as bênçãos que tem colocado em minha vida, sou grata à minha família, aos meus amigos, ao meu trabalho, aos meus mestres e ao meu anjo da guarda.

Agradeço **aos meus pais, Maria Helena e Antônio Massao**, que nunca mediram esforços em oferecerem a mim e ao meu irmão apoio, segurança, educação, conduta pessoal e profissional. À minha mãezinha, mulher batalhadora e determinada, meu espelho para toda minha vida. Obrigada por todo o seu amor, incentivo e ativa participação em todos os momentos de minha vida. Ao meu pai, homem batalhador que nos ensinou o quanto temos que ser fortes, mesmo nas situações mais extremas.

**Ao meu irmão, Marcelo**, pelo carinho, apoio e por ser minha referência em doçura de ser humano. Você é meu equilíbrio vital.

Em especial, agradeço **ao meu querido orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli**, pela amizade, orientação, paciência, confiança, incentivo e pela ajuda no meu crescimento profissional. Um exemplo de dedicação e amor à pesquisa. Obrigada por ser meu grande mestre e tornar meu sonho realidade.

O meu agradecimento especial à **querida coorientadora Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião**, grata por toda sua ajuda, por me receber de braços abertos, por dispor de todo apoio material, moral e intelectual. Sem dúvida, você será uma referência para toda minha vida, não só profissional como pessoal também. Grata pela sua amizade, pela sua sabedoria transmitida, confiança e dedicação.

À **querida Profa. Dra Virgínia Merino Sanjuan**, minha orientadora pela Facultat de Farmacia - Universitat de València- Espanha que me recebeu tão bem durante o período de

estágio na forma de Doutorado Sanduíche e contribuiu para que os experimentos fossem realizados com sucesso.

**Aos meus tios, tias, minha avó Maria e aos meus primos**, pelo exemplo de caráter, sabedoria e determinação e por tanto confiarem na minha capacidade para realizar mais este trabalho.

**Aos amigos do programa de pós-graduação**, Valéria, Ana Luiza, Charlene, Natália, Karisa, Bruno, Aline, Andréia, Giovana, Fabíola, Lilian, Fernanda Kolenyak, Fernanda Carbinato, Gisela, Flávio, Jéssica, Roberta, Karisa, Liliane, Gustavo, Mariana, Alice, Leonardo, André, Valquíria, Flávia, Flavio, Maíra, Camila, Karen e Bel. Obrigada pela amizade, companheirismo, ideias e contribuição nos experimentos; sem ajuda de vocês meu caminho seria bem mais difícil.

**Em especial aos amigos do laboratório** que se tornaram amigos pessoais e especiais em minha vida: Valéria Cardoso, Ana Luiza Ribeiro, Charlene Kill, Giovana Calixto e Flávio Carvalho (gnosia). Obrigada pela linda amizade, pelos momentos agradáveis em que passamos juntos, momentos de alegria e de desabafo, e pela contribuição indispensável de cada um de vocês para a realização deste trabalho.

**Às queridas amigas: Valéria Cardoso, Charlene e Ana Luiza;** sempre guardarei nossas longas conversas por telefone ou por skype enquanto estive fora do país fazendo parte do Doutorado-Sanduíche, vocês foram especialmente importantes naquele momento e também agradeço por tanto me ajudarem nos momentos finais para entrega desta tese de doutorado; que essa amizade assim perdure por longos anos.

**Aos alunos de iniciação científica**, Tatiane Takeshita, Jovan e Vitória. Agradeço em especial à Tati por tanto contribuir no auxílio dos experimentos desde meu mestrado. Obrigada pela amizade e dedicação.

## *Agradecimentos*

---

Aos **meus amigos pessoais**: Daniela Zaniolo, Carol Buzullini, Carol Autullo, Cris Henriques, Rosângela Tibana, e a minha mãezinha Maria Helena, que apesar de não participarem da minha vida acadêmica, compartilharam comigo as alegrias e angústias de cada etapa deste trabalho.

Aos **funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas** da UNESP-Araraquara, em particular às queridas Margareth, Fátima e Queila.

À **Seção de Pós-graduação**, em especial à Cláudia, Daniela e Flávia, pela atenção e apoio.

Ao **Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação e ao Serviço de Apoio** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, em particular ao Moacir por todo seu empenho na correção das referências deste trabalho.

À **Profa. Dra. Sandra Pulcinelli e ao Prof. Dr. Pedro Rocha Filho**, pelas orientações no exame geral de qualificação.

À **Profa. Dra. Daniele Ribeiro Araújo**, pela sua contribuição no ensaio *in vivo* e na discussão dos resultados.

Ao **Prof. Dr. João Aristeu da Rosa**, pela colaboração com o uso do analisador de imagens.

Aos professores: **Prof. Dr. Vitor Hugo Vitorino Sarmiento e a Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci**, pelo auxílio na realização das análises de espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS) no Laboratório Nacional de Luz Sinchrotron – LNLS, e nos esclarecimentos sobre reologia.

---

*Márcia Helena Oyafuso*

## *Agradecimentos*

---

Aos **professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos** pela ajuda, amizade e convivência, em especial Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira e à Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado.

À **Capes**, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Doutorado.

“Se não fosse imperador, desejaria ser professor. Não conheço missão maior e mais nobre que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens do futuro”

(Dom Pedro II)



## RESUMO

A administração de compostos na pele é dificultada principalmente pelo estrato córneo; dessa forma diversas técnicas químicas e físicas podem ser exploradas e combinadas de modo a vencer esta barreira. O acetato de dexametasona (DXM) é um potente antiinflamatório utilizado principalmente no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes que, embora muito utilizado, pode promover uma série de efeitos colaterais sistêmicos. Dessa forma, sua aplicação tópica pode ser conveniente, de forma a localizá-lo no seu sítio de ação. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos (SLC) estabilizados com polioxietileno 20 cetil éter como tensoativo utilizando diferentes fases oleosas: ácido oleico (AO), miristato de isopropila (MI) e N metil pirrolidona (NMP), e posterior realização de ensaios de permeação cutânea *in vitro* e atividade anti-nociceptiva *in vivo*. As amostras foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada e espalhamento de raios-X a baixo ângulo, as quais resultaram em sistemas líquido-cristalinos de mesofases lamelares e hexagonais; estes sistemas apresentaram  $G' > G''$  nos estudos reológicos, indicando um comportamento predominantemente elástico. O ensaio de perfil de textura revelou que as amostras hexagonais constituídas por NMP e MI foram as que apresentaram maior adesividade e que as amostras lamelares foram mais bioadesivas. Os ensaios de liberação demonstraram que os sistemas lamelares liberaram maior porcentagem de fármaco em relação aos hexagonais. Nos ensaios de permeação cutânea, os resultados revelaram que o fármaco não permeou, porém alcançou a epiderme e derme para as formulações DAO22, DANMP22, DANMP23, DNMP23. O estudo da iontoforese demonstrou que a presença da corrente elétrica foi capaz de impulsionar o fluxo de permeação do fármaco. O ensaio *in vivo* demonstrou que os sistemas lamelares contendo AO + NMP e os hexagonais com a presença de MI apresentaram maior eficácia anti-nociceptiva comparado à formulação comercial. Sugere-se que os SLC desenvolvidos apresentam potencial para modular a permeação cutânea do DXM e que uso da iontoforese é capaz de aumentar o fluxo da permeação deste fármaco incorporados nos sistemas.

**Palavras-chave:** acetato de dexametasona; sistemas líquido-cristalinos; promotores químicos de permeação cutânea; iontoforese; inflamação; modelos animais.

## ABSTRACT

Administration of compounds in the skin is mainly hindered by stratum corneum. Thus, various chemical and physical techniques may be exploited and combined in order to overcome this barrier. Acetate dexamethasone (DXM) is a potent anti-inflammatory and immunosuppressive primarily used in the treatment of inflammatory, autoimmune and allergic that although widely used, can promote a series of systemic side effects. Thus, topical application may be appropriate in order to find it on their site of action. The objective of this work was to develop liquid crystal systems (LCS) stabilized with polyoxyethylene 20 cetyl ether as surfactant using different oil phases: oleic acid (OA), isopropyl myristate (IM), N-methyl pyrrolidone (NMP), and subsequent testing of skin permeation in vitro and in vivo anti-noceptiva activity. The samples were characterized by polarized light microscopy and SAXS, which showed the presence of liquid crystal systems of lamellar mesophases and hexagonal. These systems showed ( $G'$  >  $G''$ ) in rheology studies, indicating a predominantly elastic behavior. The texture profile test revealed that the hexagonal samples containing in its composition NMP and IM showed the highest adhesiveness and that the lamellar samples were more bioadhesive. Release tests showed that the lamellar systems release a higher percentage of drug when compared to the hexagonal systems. In cutaneous permeation tests, the results showed that the drug does not permeate, but reached the epidermis and dermis layers to the formulation (DAO22, DANMP22, DANMP23, DNMP23). The skin permeation with iontophoresis showed the presence of electric current was able to boost the drug permeation flux. The in vivo assay showed that the lamellar systems containing OA + NMP and the hexagonal with the presence of IM had higher antinociceptive effectiveness compared to the commercial formulation. It is suggested that the LCS developed in this work have the potential to modulate the permeation of DXM and use of iontophoresis is capable of increasing the permeation flux of drug incorporated in the systems.

**Keywords:** dexamethasone acetate; liquid crystal systems; chemical permeation promoters; iontophoresis; inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos promotores de permeação (a) ácido oléico, (b) miristato de isopropila, (c) N metil pirrolidona e (d) Brij58 <sup>®</sup> .....	22
Figura 2: Ilustração esquemática (1) fase lamelar; fase hexagonal (2a) e fase hexagonal reversa (2b) (EZRAHI; ASERIN; GARTI, 1999).....	26
Figura 3: Estrutura da fase cúbica de monoleato de glicerila-água em três dimensões, com ampliação mostrando bicamada lipídica (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001). ....	26
Figura 4: Fórmula estrutural do acetato de dexametasona. ....	29
Figura 5: Equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation) e Célula de Difusão de Franz.....	36
Figura 6: Preparo do fio de prata - (A) fio de prata, (B) depósito de AgCl no fio de prata e (C) AgCl fundido. ....	38
Figura 7: Pontes salinas para utilização no experimento associado à iontoforese. ....	39
Figura 8: Célula de Franz acoplada ao banho-maria e associada à corrente elétrica (iontoforese).....	40
Figura 9: Técnica de tape stripping. ....	41
Figura 10: Diagrama de fases de sistemas estabilizados por Brij <sup>®</sup> 58, miristato de isopropila e água. (CL) cristal líquido; (EV) emulsão viscosa; (SF) separação de fases.....	45
Figura 11: Diagrama de fases pseudo-ternário de sistemas estabilizados por Brij <sup>®</sup> 58, ácido oléico + N metil pirrolidona e água. (CL) cristal líquido; (EV) emulsão viscosa; (SF) separação de fases; (SI) sistema isotrópico. ....	46
Figura 12: Diagrama de fases de sistemas estabilizados por Brij <sup>®</sup> 58, ácido oléico e água. (CL) cristal líquido; (EM) emulsão; (SF) separação de fases; (SI) sistema isotrópico; (H/L) transição de fase hexagonal/lamelar. ....	47
Figura 13: Diagrama de fases de sistemas estabilizados por Brij <sup>®</sup> 58, N metil pirrolidona e água. (CL) cristal líquido; (EM) emulsão; (SF); (SI) sistema isotrópico. ....	48
Figura 14: Fotomicrografias das amostras em estudo obtidas por microscopia de luz polarizada, logo após o preparo. Aumento de 100 vezes. ....	51

Figura 15: Reogramas das formulações em estudo com e sem fármaco. ....	53
Figura 16: Análise do perfil de textura parâmetros: adesividade, coesão, compressibilidade e dureza.....	58
Figura 17: Trabalho de Força Máxima Bioadesiva. ....	60
Figura 18: Caracterização por SAXS das amostras em estudo. ....	62
Figura 19: Fotografias das amostras em estudo.....	67
Figura 20: Curva analítica de acetato de dexametasona em metanol. ....	70
Figura 21: Perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações AO22 e AO23 contendo DXM 0,1%; experimento de 24 horas.....	71
Figura 22: Perfil de liberação <i>in vitro</i> ( $Q_{real} \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) das formulações MI22, MI23, ANMP22, ANMP23, NMP22 e NMP23, acrescidas de acetato de dexametasona a 0,1%, no período de 24 horas.....	71
Figura 23: Perfil de liberação <i>in vitro</i> de acetato de dexametasona das amostras em estudo, no período de 24 horas.....	74
Figura 24: Ajuste matemático de Weibul para mecanismo de liberação de acetato de dexametasona em sistemas líquido-cristalinos estudados (ajustados em 60% de liberação do fármaco).....	79
Figura 25: Perfil de permeação cutânea nas diferentes fases oleosas: ácido oléico, miristato de isopropila e N metil pirrolidona, acrescido de acetato de dexametasona 0,1%; após 24 horas de experimento. ....	81
Figura 26: Perfil de permeação cutânea de DXM (0,1%) incorporada na formulação DANMP23 associada à aplicação de iontoforese nas primeiras 6 horas, intervalo de tempo restante sendo ensaio apenas com difusão passiva com duração total de 24 horas.....	84
Figura 27: Ensaio de pressão de pata Randall Sellito, aplicação da força mecânica (g) sobre a região dorsal da pata esquerda traseira do camundongo (n = 7). ....	87
Figura 28: Efeito dos tratamentos com acetato de dexametasona incorporados nas diferentes formulações e em variados tempos, no estudo de hiperalgesia mecânica – teste de pressão de pata Randall-Sellito (pressão da pata (g)/tempo(h)).....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formulações selecionadas para estudo .....	50
Tabela 2: Valores de regressão linear ( $r$ ), expoente viscoelástico ( $n$ ) e da resistência do gel ( $S$ ) dos sistemas. ....	56
Tabela 3: Intensidade dos picos ( $q$ ); distância do espalhamento dos objetos ( $d$ ); razão entre as distâncias interplanares ( $d_1/d_2$ , $d_1/d_3$ , $d_1/d_4$ ) das amostras em estudo, obtidas por SAXS. ....	64
Tabela 4: Valores do potencial hidrogeniônico (pH) das amostras.....	68
Tabela 5: Valores de acetato de dexametasona liberado analisados em ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e em porcentagem (%), das formulações em estudo, no período de 24 horas. ....	73
Tabela 6: Valores de $k$ , $n$ , $r^2$ e $b$ obtidos através dos modelos matemáticos aplicados para o perfil de liberação de dexametasona, para cada amostra.....	77
Tabela 7: Quantidade de DXM retido no estrato córneo e nas diferentes camadas da pele: epiderme + derme, após 24 horas. ....	80
Tabela 8: Valores obtidos do estudo de permeação e retenção cutânea, realizados nas diferentes fases oleosas: ácido oléico, N metil pirrolidona e miristato de isopropila; acrescido de dexametasona 0,1%; após 24 horas de experimento.....	82
Tabela 9: Fluxo de acetato de dexametasona ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nas primeiras 6 horas de ensaio de permeação cutânea com o uso da iontoforese e difusão passiva no intervalo entre 6-24 h de experimento. ....	85
Tabela 10: Quantidade de acetato de dexametasona retido no estrato córneo e nas diferentes camadas da pele: epiderme + derme ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); avaliação com e sem iontoforese no ensaio de permeação cutânea e respectiva caracterização estrutural dos cristais líquidos, após 24 horas de experimento. ....	86
Tabela 11: Resultados obtidos no teste de pressão de pata - Randall & Sellito com os valores do limiar nociceptivo (g), tempo (h), desvio padrão (DP) e média dos grupos.....	90

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

A	Água
AT	Água/ tensoativo
CL	Cristal líquido
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de variação
DP	Desvio Padrão
DXM	Dexametasona
EM	Emulsão
FA	Fase aquosa
FO	Fase oleosa
O	Óleo
O/T	Óleo/tensoativo
SAXS	Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo
SF	Separação de fases
T	Tensoativo
t/o/	Tensoativo/óleo
H/L	Hexagonal / Lamelar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1. Terapia Cutânea de Fármacos.....	18
1.2. Promotores físicos (Iontoforese) e químicos de permeação cutânea.....	19
1.3. Cristais Líquidos.....	24
1.4. Terapia cutânea com glicocorticóides.....	27
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1. Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Materiais.....	31
3.1.1. Equipamentos.....	31
3.2. Métodos.....	31
3.2.1. Preparo das formulações.....	31
3.2.2. Construção do Diagrama de fases.....	32
3.2.3. Caracterização físico-química.....	32
3.2.3.1. Microscopia de luz polarizada.....	32
3.2.3.2. Comportamento reológico.....	32
3.2.3.3. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	33
3.2.3.4. Ensaio de perfil de textura.....	33
3.2.3.5. Ensaio de bioadesão <i>in vitro</i> .....	33
3.2.4. Testes de estabilidade.....	34
3.2.4.1. Avaliação visual.....	34
3.2.4.2. Teste de centrífuga.....	34
3.2.4.3. Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo.....	34
3.2.5. Determinação da solubilidade do acetato de dexametasona na formulação.....	34
3.2.6. Validação do método de doseamento de DXM por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	34

3.2.7. Ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> .....	35
3.2.7.1. Ensaios de liberação <i>in vitro</i> .....	35
3.2.7.2. Análise do perfil de liberação do fármaco através de modelos matemáticos....	36
3.2.7.3. Preparo da pele de porco para o ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i> .....	37
3.2.7.4. Ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i> .....	37
3.2.8. Ensaio de permeação cutânea associado à iontoforese.....	38
3.2.8.1. Preparo dos eletrodos Ag e AgCl para uso no ensaio de permeação cutânea associado à iontoforese.....	38
3.2.8.2. Preparo da ponte salina para o ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i> , associado à iontoforese.....	39
3.2.8.3. Protocolo <i>in vitro</i> .....	39
3.2.8.4. Ensaio de retenção cutânea <i>in vitro</i> .....	40
3.2.9. Estudo <i>in vivo</i> .....	41
3.2.9.1. Avaliação da atividade analgésica anti nociceptiva - ensaio de pressão de pata Randall-Sellito.....	42
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
4.1. Preparo das formulações.....	44
4.2. Construção do Diagrama de Fases.....	44
4.2.1. Escolha das amostras a serem estudadas.....	49
4.3. Medidas de Microscopia de Luz Polarizada.....	50
4.4. Comportamento reológico.....	52
4.5. Ensaio de perfil de textura.....	57
4.6. Ensaio de bioadesão <i>in vitro</i> .....	59
4.7. Medidas de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	61
4.8. Teste de estabilidade das formulações.....	66
4.8.1. Avaliação visual da estabilidade das amostras em estudo.....	66
4.8.2. Teste de centrifugação.....	67
4.8.3. Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH) das formulações em estudo.....	68



4.9. Validação do método de doseamento de DXM por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	69
4.10. Ensaio de liberação, permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> .....	69
4.10.1. Avaliação do perfil de liberação de fármaco através de modelos matemáticos.....	74
4.10.2. Estudo de permeação e retenção cutânea.....	79
4.10.3. Estudo de permeação e retenção cutânea associado à técnica de iontoforese.....	83
4.11. Estudo <i>in vivo</i> .....	87
4.11.1. Avaliação da atividade anti nociceptiva - ensaio de pressão de pata de Randall-Sellito.....	87
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as diversas vias de administração de fármacos, a pele tem sido frequentemente estudada (OWENS; ZINMAN; BOLLI, 2003; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). A via cutânea torna-se uma alternativa interessante para administração de fármacos, oferecendo vantagens e diversas aplicações na área cosmética e farmacêutica (KUMAR et al., 2015).

O uso da via cutânea não é apenas voltado para o tratamento de doenças cutâneas (efeito local), mas também para a obtenção de efeito sistêmico (administração transdérmica), combinando a comodidade do paciente à ausência de metabolismo hepático (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). Entretanto, a penetração de substâncias através da pele é bastante difícil devido à função barreira deste tecido, exercida principalmente por sua camada mais externa, o estrato córneo (EC) (MADISON, 2003). Dessa forma, estratégias que possibilitem a modulação da permeação de fármacos através do estrato córneo e das demais camadas da pele são interessantes no sentido de otimizar a liberação de fármacos em qualquer camada da pele que seja, podendo promover efeito local ou sistêmico.

### 1.1. Terapia Cutânea de Fármacos

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, tendo uma superfície de dois metros quadrados e pesando cerca de 5 kg em indivíduos adultos. Esse órgão atua impedindo a perda de água e a entrada de materiais estranhos (GODIN; TOUITOU, 2007; HADGRAFT, 2001); auxilia na regulação da temperatura corpórea e permite as sensações de toque, calor e frio. A pele é dividida em três camadas: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é a camada mais externa da pele e é onde está contido o estrato córneo, é composta por grande quantidade de células mortas e também por 95% de queratinócitos. A derme possui espessura maior que a epiderme, sendo constituída por colágeno e elastina. O tecido subcutâneo é também conhecido como hipoderme, é composto por gorduras e possui uma área bastante vascularizada (SINGH; KUMAR, 2014).

A liberação transdérmica permite que o fármaco atravesse as diferentes camadas da pele, podendo chegar até a corrente sanguínea, evitando assim efeito de primeira passagem hepática, observado após administração oral (ALEXANDER et al., 2012); outras vantagens também são observadas como estabilização dos níveis plasmáticos, ausência de degradação pelo trato digestivo, redução de efeitos adversos e melhora da adesão ao tratamento pelo paciente (MACHET; BOUCAUD, 2002).

No entanto, a liberação de fármacos através da pele sofre limitações devido à função de barreira exercida pelo estrato córneo. Assim, estratégias para aumentar a permeabilidade do fármaco através desta barreira estão sendo estudadas (ALEXANDER et al., 2012).

Os fatores que dificultam a permeação de fármacos na pele estão associados ao tipo de pele (etnia), espessura, tempo de contato, local de aplicação, grau de hidratação, pré-tratamento, mecanismo de penetração do fármaco através da pele, entre outros. As moléculas dos fármacos podem atravessar o estrato córneo por diferentes caminhos: seja por difusão intracelular, intercelular ou pelos folículos pilosos.

A propriedade de barreira do estrato córneo é devida principalmente às suas ligações de hidrogênio e dissulfeto encontrada na queratina presente na pele (CHOUHAN; SAINI, 2012).

Dessa forma, para vencer a barreira do estrato córneo pode ser interessante a utilização de sistemas que possibilitem o controle da liberação de fármacos e algumas estratégias como a utilização de promotores físicos e químicos, almejando melhorias na permeação cutânea de fármacos.

## **1.2. Promotores físicos (Iontoforese) e químicos de permeação cutânea**

Estratégias que diminuam a função barreira do EC são necessárias para promover uma penetração adequada de compostos na pele. Diversas técnicas químicas e físicas podem ser exploradas e combinadas, resultando na penetração de concentrações de fármacos adequadas ao tratamento tópico/transdérmico (CEVC; VIERL, 2010).

Técnicas físicas como a iontoforese têm mostrado bons resultados como promotores de permeação cutânea (KALIA et al., 2004). A aplicação de uma corrente elétrica em baixa

voltagem na pele é um dos princípios da iontoforese, técnica esta que força com que as moléculas do fármaco atravessem o estrato córneo. A corrente elétrica aplicada na pele através de eletrodos promove o aumento da liberação de fármacos ionizáveis e não ionizáveis, permite a liberação contínua ou não do fármaco, dependendo da corrente aplicada, promove a liberação do fármaco para uso sistêmico ou local, oferece controle sobre o fármaco liberado, uma vez que é dependente da quantidade de corrente aplicada, duração da corrente e região da pele exposta a aplicação (WANG et al., 2005).

Eljarrat-Binstock et al. (2005) avaliaram a permeação de dexametasona incorporada em hidrogéis, através da via ocular, fazendo uso da iontoforese, e concluíram que houve um potencial aumento da permeação do fármaco nos segmentos anterior e posterior do olho.

Estudos de liberação transdérmica foram conduzidos com uso da técnica de iontoforese para promover a permeação cutânea de ranitidina, como terapia para uso pediátrico. Os resultados demonstraram que a dose terapêutica de ranitidina pode ser facilmente alcançada com a técnica de iontoforese transdérmica (DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012). Sarvaiya; Kapse e Tank (2013) estudaram a permeação cutânea de lovastatina em sistemas micelares, fazendo uso de iontoforese e concluíram que a lovastatina, sendo um fármaco lipofílico, foi liberado através da pele com eficácia.

Além dos promotores físicos, também podem ser empregados promotores químicos objetivando modular a permeação cutânea em suas diferentes camadas. Encontram-se na literatura diversos promotores químicos, dentre eles o ácido oléico, miristato de isopropila e N-1 metil 2 pirrolidona (YERRAMSETTY et al., 2010; REN et al., 2008; PILAI; NAIR; PACHAGNULA, 2003; JUNG et al., 2013; VÁVROVÁ; ZBYTOVSKÁ; HRABÁLEK, 2005).

Os promotores químicos de permeação cutânea vêm sendo utilizados desde a década de 1960 para aumentar a penetração de compostos na pele. Estes compostos apresentam estrutura química diversa e atuam no estrato córneo por mecanismos diversos, podendo ter ação reversível, resultando na fluidização do estrato córneo, alteração de polaridade, separação de fases ou extração de lipídios (BENTLEY et al., 1997; WILLIAMS; BARRY, 2004). Promotores mais potentes podem ainda atuar em desmossomos, separando o EC,

desnaturando a queratina e formando vacúolos nos corneócitos (WILLIAMS; BARRY, 2004). Os promotores de permeação, em geral, desestabilizam os lipídeos da pele, possuindo como características moleculares uma cabeça polar com uma longa cadeia alquílica, geralmente com 10 a 14 carbonos (MARTINS; VEIGA, 2002).

É importante ressaltar que os promotores químicos, quando incorporados em formulações de uso tópico, devem ser farmacologicamente inertes, atóxicos, não irritantes, não alérgicos e de ação reversível. Devem possuir a capacidade de permear ou interagir diretamente com os constituintes do estrato córneo, sendo capazes de reduzir a função de barreira da pele (WALTERS, 1989; BARRY, 1987; MARTINS; VEIGA, 2002).

Pierre et al.(2006) em seus estudos observaram que o ácido oleico teve grande potencial como promotor químico de permeação cutânea na liberação de ácido 5-aminolevulínico, prorrogando o tempo de permanência do fármaco no tecido cutâneo.

O ácido oleico atua desestabilizando os lipídeos presentes na pele, ocorrendo a formação de poros, pelos quais pode ocorrer a passagem do fármaco (ONGPIPATTANAKUL et al., 1991; MARTINS; VEIGA, 2002).

A permeabilidade através da pele pode ser alterada através do uso de excipientes que possam modificar a solubilidade do fármaco: Assim, com a solubilidade aumentada, tem-se também o aumento do fluxo. Um dos solventes que atuam deste modo é a N-metil pirrolidona, cuja fórmula molecular é  $C_5H_9NO$  (HADGRAFT, 2001).

Pesquisadores estudaram o efeito de promotores de permeação transdérmica na liberação de fluoxetina. Com os resultados obtidos foi possível concluir que o ácido oléico e o miristato de isopropila promoveram aumento significativo da liberação de fluoxetina através da pele (JUNG et al., 2013).

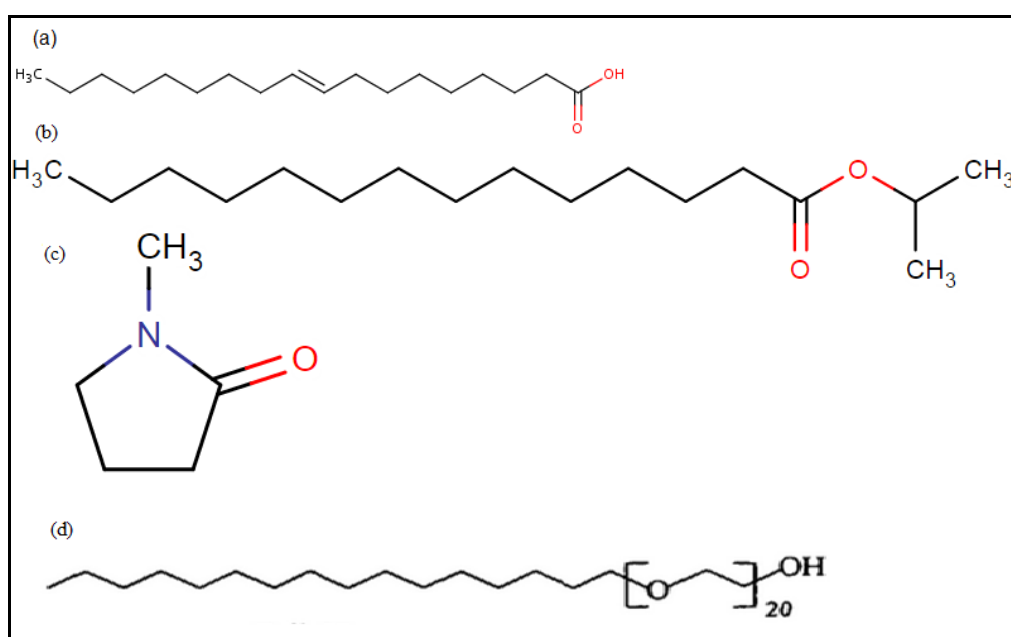
O miristato de isopropila é um emoliente bastante utilizado na indústria farmacêutica e cosmética, usado como promotor de permeação nas formulações transdérmicas e também utilizado em conjunto com a técnica de iontoforese (FANG et al., 1999)

Diferentes promotores químicos de permeação cutânea como ácido oléico, N metil pirrolidona, tolueno, dentre outros, foram estudados avaliando a liberação transdérmica de insulina. Os resultados sugeriram que nenhum grupo funcional dos promotores químicos foi

específico para o aumento da permeação da insulina e sim que as moléculas produzidas possuem valor positivo de log de K e pelo menos um hidrogênio doador ou receptor, com exceção do tolueno, dentre os demais que foram estudados no experimento. Assim, os autores informam que esta observação facilita no processo de identificação de novos promotores químicos, reduzindo encargos experimentais (YERRASETTY et al., 2010).

Os tensoativos não iônicos são considerados os menos irritantes para a pele e com isso são os mais procurados para estudo. Compostos do tipo polioxietileno alquil éter da classe dos Brij<sup>®</sup> e os ésteres de ácidos graxos, como polioxietileno de sorbitano (Tweens<sup>®</sup>), são os mais estudados nas publicações envolvendo promotores de permeação. No entanto, a maior parte dos testes foi realizada com pele de animais roedores ao invés de utilizar pele humana (LANE, 2013). Dentre os tensoativos não iônicos da classe dos Brij<sup>®</sup>, o polioxietileno20 cetil éter (Brij<sup>®</sup> 58), Figura 1, de estrutura química  $C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_n OH$  (n=20), tem sido um dos mais utilizados (GHOSH, 2011).

**Figura 1:** Estrutura química dos promotores de permeação (a) ácido oléico, (b) miristato de isopropila, (c) N metil pirrolidona e (d) Brij58<sup>®</sup>.



O uso de tensoativos como promotores químicos de permeação vem sendo estudado por vários pesquisadores. TÖRMÄ et al. (2008) avaliaram que o uso de tensoativos aniônicos, como lauril sulfato de sódio, pode causar irritações e danos na barreira da pele. Os autores sugerem que ocorre uma interação entre o lauril sulfato de sódio e os lipídeos e queratina presentes na pele, resultando em descamação. Já os tensoativos catiônicos normalmente não são utilizados como promotores de permeação, pois são considerados bastante irritantes para a pele e sua atividade promotora só foi vista quando se tinha cadeias alquílicas contendo entre 12 e 14 átomos de carbono. Na lista dos tensoativos catiônicos mais irritantes para a pele tem-se o cloreto de benzalcônio e cloreto de cetil piridínio (BASKETTER et al., 2004; LANE, 2013).

Estudos de DSC indicaram que Brij<sup>®</sup> 36T tem a capacidade de interagir com a pele desestruturando os lipídeos presentes, podendo aumentar a permeabilidade, embora este não dependa apenas do promotor químico, mas também das propriedades físico químicas do fármaco (ASHTON; HADGRAFT; STEVENS, 1986). Ainda, sabe-se que a combinação de diversas técnicas para aumentar a permeação de substâncias pela pele têm se mostrado uma alternativa interessante, através da qual um efeito sinérgico ou aditivo na permeação pode ser obtido, sem acentuar os efeitos indesejáveis e tóxicos de cada técnica. A literatura mostra a combinação de técnicas físicas com promotores químicos de permeação (SMYTH; BECKETT; MEHTA, 2002; PILLAI; NAIR; PACHAGNULA, 2003; KARANDE; JAIN; MITRAGOTRI, 2004). Também, a utilização de sistemas de liberação contendo promotores químicos de permeação cutânea na sua estrutura tem resultado em aumento da penetração de substâncias na pele (CEVC; VIERL, 2010). A associação de promotores químicos e físico contribui para um aumento da permeabilidade de fármacos através da pele, em ação sinérgica que viabiliza o tratamento ao paciente, pois são utilizadas menores quantidades de promotores químicos e menor intensidade de corrente elétrica aplicada ao sistema de liberação, resultando em menores efeitos adversos (NAIR; PANCHAGNULA, 2003; BOUNOURE et al., 2008).

Carr; Corish e Corrigan (1997) estudaram a aplicação de iontoforese em sistemas líquidos cristalinos para a liberação de nicotina e salbutamol pela via cutânea e concluíram

que a escolha do veículo associado à aplicação de iontoforese pode contribuir para um melhor desempenho na liberação de fármacos em sistemas transdérmicos.

Neste sentido, optou-se neste trabalho por escolher sistemas nanoestruturados como os cristais líquidos; pois, apresentam vantagens funcionais relacionadas ao fato de: promoverem liberação sustentada de fármacos; podem proteger os fármacos sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação e promovem aumento da retenção de água no estrato córneo proporcionando aumento na hidratação cutânea (BENITA, 2006; FERRARI, 1998; MORAIS, 2006; NESSEEM, 2001).

### 1.3. Cristais Líquidos

Um grande número de trabalhos na literatura científica tem despertado o interesse das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, os quais apresentam vantagens relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação sustentada de fármacos. Deste modo, o desenvolvimento destes sistemas de liberação de fármacos tem como objetivo estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, incluindo: hidrogéis, nanopartículas e nanocápsulas dentre outros, não só para aumentar a seletividade e eficácia dos princípios ativos, como também permitir a redução da dose total necessária, minimizando os efeitos colaterais (FORMARIZ et al., 2005). Dentre os sistemas nanoestruturados, encontram-se os cristais líquidos, os quais podem ser considerados um avanço diante de muitas limitações encontradas em formulações convencionais.

Estes sistemas foram descritos pela primeira vez em 1889, por Otto Lehmann, que descreveu que os cristais líquidos podem ser entendidos como mesofases, ou seja, apresentam uma fase intermediária com propriedades tanto de sólidos quanto de líquidos. É ainda característica desses sistemas apresentarem uma ordem orientacional (como dos cristais) e uma desordem molecular como a dos líquidos: pelo fato de possuir esta parcial ordem e desordem é possível conservar a orientação das moléculas, garantindo estabilidade mecânica semelhante à de sólidos e fluidez como a de líquidos (MULLER-GOYMANN; FRANK, 1986; CHORILLI et al., 2011). Os cristais líquidos possuem em sua composição água, óleo e são estabilizados por um tensoativo; possuem uma característica importante que é a auto

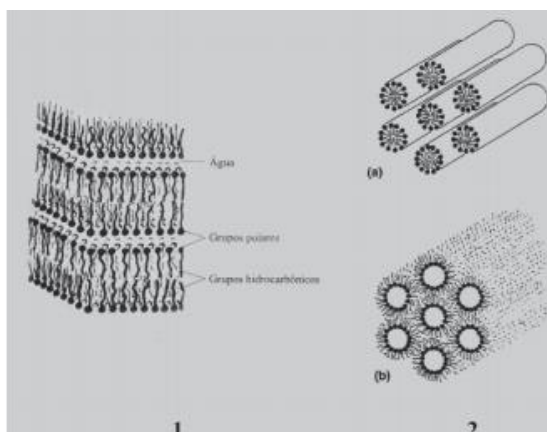


organização (pela associação das moléculas anfifílicas), podendo solubilizar simultaneamente grandes quantidades de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, incluindo aditivos de alimentos, ingredientes ativos e fármacos (FASOLIN; SANTANA; CUNHA, 2014).

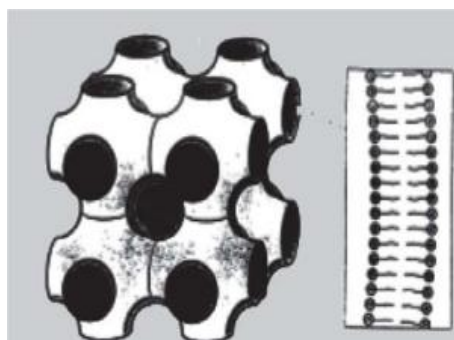
Os cristais líquidos podem ser subdivididos em duas grandes classes: liotrópicos e termotrópicos. Esta classificação depende do ambiente e das moléculas dos quais se formam. Os cristais líquidos termotrópicos são formados por moléculas que formam fluidos ordenados e sua formação é dependente da temperatura. Estes sistemas sofrem uma transição de fase. As diferentes organizações dos cristais líquidos termotrópicos são muito semelhantes às dos cristais líquidos liotrópicos em termos de orientação das moléculas (MUKHERJEE, 2013).

Quando ocorre a formação destes sistemas a partir de moléculas anfifílicas com a adição de um solvente polar (água), denominam-se cristais líquidos liotrópicos; conforme ocorre alteração da concentração de tensoativo, diferentes formas líquido-cristalinas podem ser formadas, as mesofases lamelares ( $L\alpha$ ), hexagonais e cúbicas sendo as mais comuns encontradas no grupo dos cristais líquidos liotrópico. A fase lamelar é formada por uma ou mais bicamadas paralelas e planares de tensoativos, separadas por camadas de solvente, formando uma rede unidimensional. Já na fase hexagonal, os agregados formados por misturas de moléculas anfifílicas com a água formam arranjos de cilíndricos longos, com estruturas bidimensionais, sendo classificadas em hexagonal normal (H1) e hexagonal reversa (H2) como mostra a Figura 2. Nos sistemas de fase cúbica (Figura 3) as moléculas estão arranjadas num sistema tridimensional, que consiste de duas redes congruentes de canais de água envolvidas por bicamadas lipídicas ou de tensoativo (FORMARIZ et al., 2005). A fase cúbica pode ser dividida em três distintas fases bicontínuas reversas:  $Pn3m / Q_{224}$ ;  $Im3m / Q_{229}$  e  $Ia3d / Q_{230}$ . Fármacos hidrofílicos incorporados a estes sistemas encontram-se localizados próximo ao grupamento polar do tensoativo ou nos canais de água, enquanto que fármacos lipofílicos ficam aprisionados dentro da bicamada lipídica e os fármacos anfifílicos na interface (GUO et al., 2010).

**Figura 2:** Ilustração esquemática (1) fase lamelar; fase hexagonal (2a) e fase hexagonal reversa (2b) (EZRAHI; ASERIN; GARTI, 1999).



**Figura 3:** Estrutura da fase cúbica de monoleoato de glicerila-água em três dimensões, com ampliação mostrando bicamada lipídica (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).



A elucidação da estrutura interna destes sistemas, além de ser muito importante, é também muito complexa. Assim, técnicas sofisticadas são necessárias para atingir este objetivo. Métodos como espalhamento de raios-X a baixo ângulo - SAXS (RAMAN; SUHAIMI; TIDDY, 2003), espalhamento de nêutron a baixo ângulo - SANS (REYNOLDS; HENDERSON; WHITE, 2004), espalhamento de luz (Light Scattering) (SINTOV; SHAPIRO, 2004), microscopia eletrônica de transmissão e ressonância magnética nuclear (KREILGAARD, 2002) estão sendo cada vez mais utilizadas nas últimas duas décadas. Outros métodos como a condutividade iônica (SINTOV; SHAPIRO, 2004), viscosidade (SPICLIN et al., 2003), espectroscopia de foto correlação (LEHMANN; KEIPERT; GLOOR,

2001) e microscopia de luz polarizada (KREILGAARD, 2002) também são frequentemente utilizados para o estudo do comportamento físico-químico interno dos sistemas nanoestruturados (FASOLIN; SANTANA; CUNHA, 2012).

#### 1.4. Terapia cutânea com glicocorticóides

Dentre os diversos fármacos empregados nas doenças cutâneas, destaca-se a classe dos corticóides. Os corticóides são esteróides sintetizados e secretados pelo córtex da glândula supra-renal. Os principais esteróides são aqueles com atividade mineralocorticóide e glicocorticóide. Os que afetam o equilíbrio hidroeletrolítico são os mineralocorticóides e seu principal hormônio endógeno é a aldosterona. O cortisol é o principal glicocorticóide, atuando na função cardiovascular, na regulação do metabolismo, imunidade e crescimento. Os corticosteroides sintéticos se encontram em grande parte ligados à albumina, podendo assim ficar na forma livre, estando disponível para atuar na célula alvo, sendo representados, principalmente, pela hidrocortisona, corticosterona e dexametasona (KATSUNG, 2006; RANG; DALE; RITTER, 2001).

A dexametasona (DXM) pode se apresentar nas formas de:

- 21-acetato de dexametasona, com fórmula molecular  $C_{24}H_{31}FO_6$ , massa molar de 434,50, ponto de fusão entre de 215 - 221 °C e comprimento de onda máximo de 239 nm;
- 21-(3,3-dimetilbutirato, terc-butilacetato), com fórmula molecular de  $C_{28}H_{39}FO_6$ . Há a forma de 21-(fosfato de sódio) com fórmula molecular  $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$  e peso molecular de 516,40;
- 17,21-dipropionato, com fórmula molecular  $C_{28}H_{37}O_7$ , peso molecular de 504,59; palmitato-21 com fórmula molecular de  $C_{38}H_{59}FO_6$ .

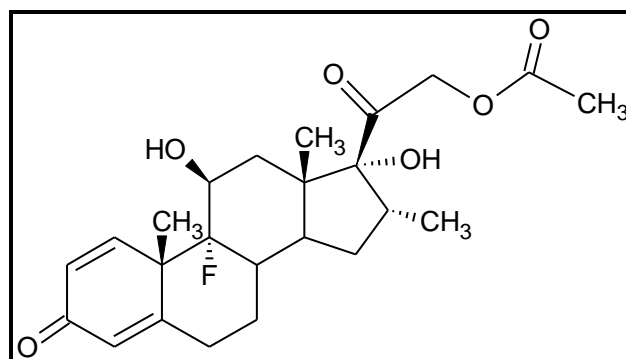
A dexametasona é solúvel em água a 25°C na concentração de 0,1 mg/mL<sup>-1</sup>, solúvel também em acetona, álcool e clorofórmio, com absorvância no UV em 239 nm (MERK, 2006). O acetato de dexametasona (DXM) é um glicocorticoide com fórmula molecular  $C_{24}H_{31}FO_6$ , peso molecular de 434,50, ponto de fusão próximo de 215 - 221 °C e UV máximo de 239 nm (FOLDVARI et al., 1999).

Este fármaco é considerado um potente antiinflamatório e imunossupressor, utilizado para o tratamento de doenças inflamatórias, autoimunes e no tratamento de alergias nasais, cutâneas e oftálmicas (BHARDWAJ; BURGESS, 2010; SCHIMMER; PARKER, 2006). Ele difunde-se através das membranas celulares formando complexos com os receptores citoplasmáticos específicos. Ao penetrar no núcleo da célula, une ao DNA e estimula a transcrição do RNAm. Como antiinflamatório inibe o acúmulo de células inflamatórias na zona de inflamação, inibindo a fagocitose e a liberação de alguns mediadores químicos da inflamação. Suas formas de administração são por via oral, intramuscular, intravenosa e tópica (AME, 2002).

Uma vez que o hormônio esteróide está livre no líquido intersticial e no plasma, ele pode penetrar na célula e assim se ligar aos receptores. Este complexo ligante receptor é transportado até o núcleo interagindo com proteínas nucleares e o DNA, obtendo resposta dos glicocorticóides (KATSUNG et al., 2006). Os receptores dos glicocorticóides encontram-se nas regiões da epiderme e derme, onde estão presentes os fibroblastos e os queratinócitos (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008; MARKS; BARLOW; FUNDER, 1982; PONEC; KEMPENAAR; DE KLOET, 1981). Neste sentido, estratégias para modular a permeação do fármaco são de grande importância, fazendo com que o mesmo consiga vencer a barreira do estrato córneo e permear até as camadas da epiderme e derme. Salienta-se que ainda não existem no mercado sistemas micro e nanoestruturados, como o caso dos sistemas propostos neste trabalho, para liberação sustentada de dexametasona.

Dostal e Gameli (1990) observaram que o uso de dexametasona e hidrocortisona proporcionaram efeitos diferenciados sobre a cicatrização de lesões, aumentam a cicatrização, em comparação ao uso de metil prednisolona minimizando problemas pós-cirúrgicos ou traumáticos da cicatrização.

A dexametasona é considerada fármaco de primeira linha no tratamento da dermatite atópica aguda e dermatite de contato (MAIA; MEHNERT; SCHÄFER-KORTING, 2000). Hughes e Rustin (1997), e Fang et al. (1999) relataram em seus estudos que o acetato de dexametasona possui cerca de 20 a 30 vezes maior potência em relação à hidrocortisona. A Figura 4 representa a fórmula estrutural do acetato de dexametasona.

**Figura 4:** Fórmula estrutural do acetato de dexametasona.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a permeação de acetato de dexametasona na pele, utilizando sistemas líquido-cristalinos estabilizados com polioxietileno 20 cetil éter (Brij58<sup>®</sup>) associado a promotores químicos (ácido oléico, miristato de isopropila ou N metil pirrolidona) e físicos (iontoforese), empregando ensaios *in vitro* (células de difusão de Franz) e *in vivo* (modelo de edema de pata induzido por carragenina).

### 2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver sistemas líquido-cristalinos de fase hexagonal ou lamelares empregando Brij<sup>®</sup> 58, água e variando a fase oleosa: ácido oleico, miristato de isopropila, N metil pirrolidona e ácido oléico associado a N metil pirrolidona;
- Incorporar e quantificar o acetato de dexametasona nos sistemas líquido-cristalinos obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Caracterizar os sistemas obtidos utilizando recursos como microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS), análise reológica, ensaio de perfil de textura e bioadesão *in vitro*;
- Avaliar a estabilidade do acetato de dexametasona nos sistemas obtidos;
- Realizar ensaios de liberação *in vitro* das formulações;
- Realizar estudos de retenção e permeação *in vitro* para as formulações em estudo empregando pele de modelo animal;
- Realizar estudos de retenção e permeação *in vitro* associados à iontoforese
- Avaliar o efeito anti nociceptivo das formulações em modelo *in vivo*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

Polioxietileno 20 cetil éter (Brij<sup>®</sup>58) (Sigma-Aldrich); miristato de isopropila (Vetec Química Fina), água purificada; ácido oléico (Synth); N metil pirrolidona (NMP) (Neon); acetato de dexametasona (Purifarma); fosfato monobásico de sódio (Quimis); Álcool cetílico propoxilado e etoxilado – Procetyl<sup>®</sup> AWS (Volp); Acetonitrila, J.T. Baker, HPLC; Metanol, J. T. Baker, CLAE; Membrana de acetato celulose 0,45 µm (Sigma-Aldrich).

##### **3.1.1. Equipamentos**

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Varian<sup>®</sup> ProStar 310; Dermatômetro, Microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena; Reômetro HAAKE, modelo RS1, com software Rheowin 3.5; sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus (Hanson Research Corporation<sup>®</sup>); Analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK); Ultra Turrax; Vortex; Lavadora ultrassônica; fitas adesivas (Scotch 750 3M).

#### **3.2. Métodos**

##### **3.2.1. Preparo das formulações**

As formulações foram compostas pela mistura de água, polioxietileno 20 cetil éter (Brij<sup>®</sup>58) e fase oleosa: ácido oleico, miristato de isopropila, n metil pirrolidona e sistemas com N metil pirrolidona associada ao ácido oleico. Estas foram levadas ao banho-maria até atingirem a temperatura de 60 °C, suficiente para fundir o tensoativo, e homogeneizadas com auxílio de um bastão de vidro. As formulações foram preparadas em frascos transparentes e após seu resfriamento os recipientes foram tampados com tampas de borracha. As combinações testadas foram:

- 1) Água, Brij<sup>®</sup> 58 e ácido oléico (AO);
- 2) Água, Brij<sup>®</sup> 58 e miristato de isopropila (MI);

- 3) Água, Brij<sup>®</sup> 58, ácido oléico e N metil pirrolidona (ANMP);
- 4) Água, Brij<sup>®</sup> 58, água e N metil pirrolidona (NMP).

### 3.2.2. Construção do Diagrama de fases

Foram construídos quatro diagramas de fases, sendo fixado em cada um a concentração do tensoativo e da água, variando-se a fase oleosa (AO, ANMP, NMP e MI).

Para obtenção dos diagramas de fases foram trabalhados 36 pontos internos de cada diagrama utilizando as proporções de 5 a 95 % de cada componente, a saber, água, óleo e tensoativo. Também, foram estudadas as misturas binárias de água/tensoativo (A/T) e tensoativo/óleo (T/O) dos diagramas (Phelps et al., 2011; Zhang et al., 2008).

Foram utilizadas as relações de A/T na faixa de 1:9 até 9:1. O mesmo procedimento foi utilizado para a mistura binária de T/O. As regiões formadas foram plotadas no diagrama de fases, utilizando o software Sigma Plot 10.0.

### 3.2.3. Caracterização físico-química

Os sistemas selecionados foram caracterizados por microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS), quanto ao comportamento reológico, perfil de textura e bioadesão *in vitro*.

#### 3.2.3.1. Microscopia de luz polarizada

As formulações foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio sob luz polarizada Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena. Foram avaliadas a homogeneidade dos sistemas, verificando-se a presença de área de anisotropia, indicativa da presença de cristais líquidos. A análise foi realizada a temperatura ambiente (HE et al., 2015).

#### 3.2.3.2. Comportamento reológico

Os sistemas foram analisados por medidas reológicas utilizando Reômetro Haake, modelo RS1, acoplado a computador com software Rheowin 3.5, pelo princípio de rotação de



um dispositivo de placa e placa (sensor placa PP35Ti), de diâmetro de 40 mm e distância entre as placas (gap) de 0,500  $\mu\text{m}$ , sendo a temperatura mantida constante (32°C).

As propriedades reológicas dos sistemas foram avaliadas por ensaios de oscilação. No ensaio de escoamento, realizou-se um estudo da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento na região de 0 a 100  $\text{s}^{-1}$ . Nos ensaios reológicos por solicitação oscilatória, as medidas foram realizadas em função da frequência (0,1 –100 Hz), aplicando uma tensão de 5 Pa, dentro da região linear da viscoelasticidade (ZHANG et al., 2008).

#### **3.2.3.3. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)**

As formulações foram avaliadas por SAXS de acordo com sua evolução estrutural em função do teor de água e do tensoativo. Os dados foram coletados na estação de medidas SAXS (1) do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas-SP, que é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1,608 Å. O espalhamento por partículas existentes no sistema sem amostra foi subtraído da intensidade total da amostra (LUCENA et al., 2012; ZHANG et al. (2008).

#### **3.2.3.4. Ensaio de perfil de textura**

As formulações foram submetidas ao teste TPA (*Texture profile analysis*) empregando analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK). Este teste consistiu em dois ciclos de compressão da amostra, resultando numa curva força x tempo a partir da qual foi possível obter as características mecânicas do sistema, como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão (SENYIGIT et al., 2011).

#### **3.2.3.5. Ensaio de bioadesão *in vitro***

Foi utilizado o analisador de textura TAXTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK), e como membrana a pele de orelha de porco dermatomizada (500  $\mu\text{m}$ ). Com os resultados obtidos, foi construída a curva força x distância, que resultou no pico de adesão e no trabalho de adesão do sistema. Os ensaios foram realizados em triplicata (KOFFI et al., 2006).

### **3.2.4. Testes de estabilidade**

#### **3.2.4.1. Avaliação visual**

As amostras foram observadas visualmente quanto às alterações do tipo: cor, separação de fases e homogeneidade, pelo período de 6 meses e em temperatura ambiente.

#### **3.2.4.2. Teste de centrifuga**

A avaliação da estabilidade frente à centrifugação foi realizada empregando-se 5g de cada amostra em estudo, as quais foram centrifugadas a 3000 rpm, por 30 minutos.

#### **3.2.4.3. Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo**

A medida de pH foi realizada em peagômetro, utilizando-se amostras diluídas em água destilada (5%).

### **3.2.5. Determinação da solubilidade do acetato de dexametasona na formulação**

Em 5g da formulação foi adicionado o fármaco sob agitação; as amostras foram analisadas uma por vez com uso do microscópio, sendo analisada a presença de cristais de acetato de dexametasona como indicativo de saturação do sistema, tornando-o insolúvel. Assim ao determinar a presença de cristais de acetato de dexametasona para cada formulação, determinam a porcentagem de fármaco insolúvel em cada sistema. No entanto, para determinar a solubilidade máxima do fármaco em cada sistema foi considerada a última concentração solúvel, onde ainda não havia presença de cristais na microscopia.

### **3.2.6. Validação do método de doseamento de DXM por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A validação dos métodos analíticos foi feita ainda durante o mestrado (OYAFUSO, 2012), utilizando parâmetros analíticos preconizados pelas diretrizes do Comitê Internacional em Harmonização (ALLPORT-SETTLE, 2010). Os parâmetros foram: condições cromatográficas, determinação da linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limites de

detecção e quantificação e robustez. O equipamento empregado Foi um HPLC Varian, com detector espectrofotométrico ProStar<sup>®</sup> 330 UV-VIS PDA e Rheodine VS 125, auto amostrador Varian ProStar<sup>®</sup> modelo 410.

As condições experimentais utilizadas foram: fase móvel constituída por uma mistura de metanol e acetonitrila (50:50) 70%, e água 30% coluna RP-18 (Phenomenex<sup>®</sup>) com dimensões 250 mm x4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula, fluxo 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50 µl, detecção a 239 nm e temperatura do forno de 25 °C.

### **3.2.7. Ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro***

#### **3.2.7.1. Ensaios de liberação *in vitro***

A liberação da DXM das formulações foi avaliada utilizando-se equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Microette HANSON 0700-1251) (Figura 5), contendo seis células de Franz modificadas, de volume aproximado de 7 mL. A liberação do fármaco foi avaliada utilizando-se membrana sintética de acetato de celulose 0,45 µm (Sigma-Aldrich), com solução receptora composta por tampão fosfato 0,01M pH 7.4, contendo 5% de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Procetyl<sup>®</sup> AWS) garantindo a condição *sink*.

Os experimentos foram conduzidos a 37 °C e a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm. Alíquotas de 2mL foram coletadas nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas, filtradas em membrana 0,45 µm e analisadas por CLAE (PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008). As formulações foram previamente pesadas (300 mg) e transferidas com auxílio de espátula para o copo dosador, colocado sobre a membrana disposta na célula de Franz com área de exposição de 1,77 cm<sup>2</sup>.

**Figura 5:** Equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation) e Célula de Difusão de Franz.



### 3.2.7.2. Análise do perfil de liberação do fármaco através de modelos matemáticos

O perfil de liberação do fármaco a partir dos cristais líquidos foi avaliado utilizando diferentes modelos matemáticos: Primeira Ordem, Baker-Lonsdale, Higuchi, Hixon-Crowell, Peppas e Weibull, para cada sistema. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) da fração linear das curvas de liberação foram estabelecidos pela inclinação da reta obtida por regressão linear; o modelo matemático adequado para descrever o perfil de liberação do fármaco foi selecionado de acordo com o maior valor de  $r^2$  ajustado, estando mais próximo de  $r^2 = 1$ . Os modelos matemáticos foram aplicados utilizando o programa SigmaPlot<sup>®</sup> 10.0 (HIGUCHI, 1962; LARRUCEA et al., 2001).

### 3.2.7.3. Preparo da pele de porco para o ensaio de permeação cutânea *in vitro*

Para a realização do ensaio de permeação, foram utilizadas peles de orelha de porco, obtidas no Frigorífico Olhos d'Água (Ipeuna - SP) logo após o abate rotineiro de animais para o consumo. As orelhas recebidas foram lavadas e os vasos sanguíneos, gordura, tecidos e pêlos não desejados em excesso foram removidos com o auxílio de tesoura, descartando-se as orelhas nas quais foram observados danos na pele. Em seguida, as orelhas foram dissecadas com auxílio de pinça e bisturi.

As peles dissecadas foram dermatomizadas com auxílio de um dermatômetro, na espessura de 500  $\mu\text{m}$ , preservando o estrato córneo, a epiderme e a camada mais externa da derme (PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008).

#### **3.2.7.4. Ensaio de permeação cutânea *in vitro***

O estudo de permeação cutânea *in vitro* da DXM das formulações foi realizado utilizando-se equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Microette HANSON 0700-1251), contendo seis células de Franz modificadas, de volume aproximado de 7 mL. O ensaio foi realizado utilizando pele do porco como membrana biológica, a pele foi devidamente preparada, conforme descrito no item 3.2.7.3. A solução receptora foi composta por tampão de fosfato 0,01M pH 7,4, contendo 5% de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Procetyl<sup>®</sup> AWS) garantindo condição sink. A pele foi acondicionada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz de forma que o estrato córneo fosse mantido em contato com a formulação e a derme em contato com a solução receptora (PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008). As formulações foram previamente pesadas e transferidas com auxílio de espátula para o copo dosador colocado sobre a membrana disposta na célula de difusão de Franz (aproximadamente 300 mg e área de exposição de 1,77  $\text{cm}^2$ ).

Os experimentos foram conduzidos a 37°C e a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm. Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas, filtradas em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas por CLAE (PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008).

A quantificação de DXM na solução receptora foi realizada por CLAE, utilizando a curva analítica obtida na validação do método. As peles submetidas ao estudo de permeação foram limpas com algodão embebido em água destilada e avaliadas quanto à retenção do fármaco.

### 3.2.8. Ensaio de permeação cutânea associado à iontoforese

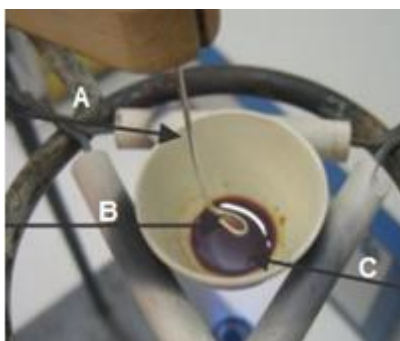
O estudo de permeação cutânea associada à iontoforese foi realizado na Universitat de València / Espanha – València, em estágio de doutorado sanduíche com a colaboração da Profa. Dra Virgínia Merino Sanjuan (Departamento de Farmacia y Tecnologia farmacêutica).

#### 3.2.8.1. Preparo dos eletrodos Ag e AgCl para uso no ensaio de permeação cutânea associado à iontoforese

Os eletrodos foram preparados de acordo com a técnica descrita por Green et al. (1991). A técnica consiste em banhar um fio de prata (Ag) de pureza 99,9% (Sigma Aldrich Chemical Company Inc., EUA) de 1 mm de espessura e 8 cm de comprimento, o fio foi lixado com a finalidade de retirar qualquer impureza e garantir uma boa aderência de cloreto de prata (AgCl) de 99% de pureza (Sigma Aldrich Chemical Company Inc., Reino Unido), o qual foi fundido em alta temperatura.

Em um cadinho foi adicionado o cloreto de prata e aquecido até fundir; logo em seguida, foi introduzido o fio de prata em contato com o cloreto de prata fundido por aproximadamente um segundo. Em seguida o fio foi retirado, seu resfriamento aguardado e o processo repetido por umas 10 vezes até que se formasse uma camada solidificada de cloreto de prata de aproximadamente 2 mm de espessura; em seguida o fio foi recoberto com um plástico isolante. O preparo do fio de prata pode ser visto na Figura 6.

**Figura 6:** Preparo do fio de prata - (A) fio de prata, (B) depósito de AgCl no fio de prata e (C) AgCl fundido.

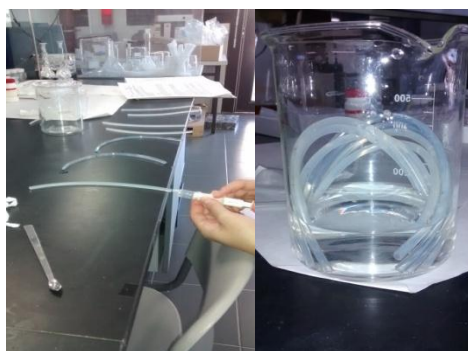


O fio de prata pura (Ag) de 0,5 mm de diâmetro foi utilizado como eletrodo ânodo e o cátodo cloreto de prata (AgCl), foi utilizado o fio de prata pura revestido com pó de cloreto de prata AgCl e colocado dentro de um recipiente com solução de NaCl 0,1M.. Ambos os eletrodos foram conectados a uma fonte de energia de 0,5 mA por 6 horas (CÁZARES-DELGADILLO et al., 2010)

### 3.2.8.2. Preparo da ponte salina para o ensaio de permeação cutânea *in vitro*, associado à iontoforese

As pontes salinas foram elaboradas partindo de uma solução de NaCl 0,1M + agarose 3% (p/v) Agarose ultrapure<sup>®</sup> (Sigma Aldrich Chemical Company Inc.,EUA); essa mistura foi aquecida com agitação constante até obtenção de um gel transparente homogêneo. Com o auxílio de seringas cirúrgicas o gel de agarose foi introduzido em tubos de silicone flexíveis (Laboratórios Levantina, S.L. (Valência/Espanha) com diâmetro interno de 2 mm e comprimento de aproximadamente 15 cm (CÁZARES-DELGADILLO et al., 2016;). Na figura 7 temos a imagem do preparo da ponte salina.

**Figura 7:** Pontes salinas para utilização no experimento associado à iontoforese.

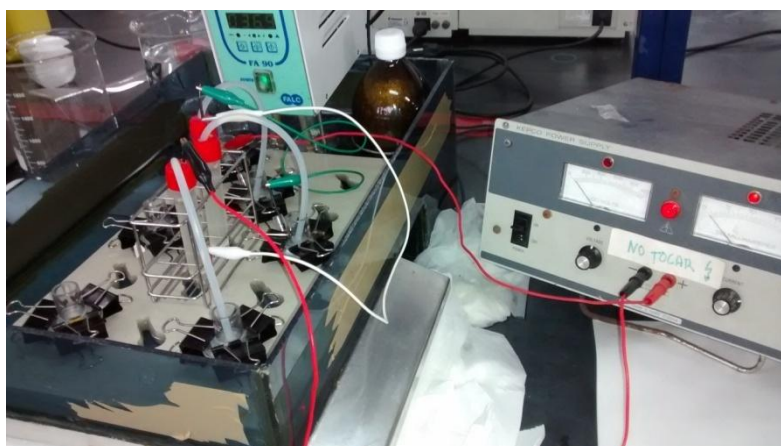


### 3.2.8.3. Protocolo *in vitro*

A técnica realizada para o experimento de permeação cutânea associado à iontoforese foi dividida em duas etapas: a aplicação da iontoforese foi realizada utilizando a corrente elétrica de 0,5 mA/cm<sup>2</sup> durante as primeiras 6 horas, fazendo uso do equipamento gerador de corrente elétrica Kepco, BHK, 0-2000V (Flushing, New York, E.U.A.) (etapa 1), o eletrodo

ânodo (Ag) foi colocado em contato com a formulação e o cátodo (AgCl) no interior da solução receptora (NaCl : HEPES 150: 20 mM) pH 7,4 e conectados a uma fonte de energia; a pele de orelha de porco que foi utilizada no experimento, foi devidamente dissecada e dermatomizada conforme metodologia descrita em 3.7.2.; a mesma foi colocada na célula de Franz no compartimento doador com o estrato córneo voltado para cima. As primeiras seis horas de experimento foram realizadas com a aplicação de corrente elétrica (iontoforese), logo em seguida a corrente elétrica foi interrompida e o experimento teve continuidade por mais 18 horas de difusão passiva, completando um total de 24 horas de experimento (etapa 2). A Figura 8 mostra imagem da célula de Franz acoplada ao banho-maria e associada à corrente elétrica (iontoforese).

**Figura 8:** Célula de Franz acoplada ao banho-maria e associada à corrente elétrica (iontoforese).



#### 3.2.8.4. Ensaio de retenção cutânea *in vitro*

Para análise de retenção cutânea *in vitro* a pele foi exposta à formulação ( $1,77\text{cm}^2$ ) por 24 horas, nas condições experimentais já citadas para o ensaio de permeação. Ao final do tempo, as peles foram retiradas da célula de Franz, removendo-se o excesso de formulação na pele com papel absorvente, sendo mantidas em vidro de relógio durante a técnica de *tape stripping* (Figura 9). O estrato córneo foi retirado com a técnica de *tape stripping*, utilizando-se 16 fitas adesivas (Scotch 750 3M), descartando-se a primeira fita (PRIMO; BENTLEY;



TEDESCO, 2008). As fitas foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL de metanol, agitado em vórtex por um minuto e posteriormente submetido ao banho de ultrassom por 15 minutos. A solução foi filtrada em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e injetada em CLAE para quantificação da DXM (KNUDSEN et al., 2011).

Após a retirada do estrato córneo foi verificada a retenção da derme e epiderme, picotando-se o restante da pele com o auxílio de uma tesoura. Os fragmentos foram colocados em tubo para centrífuga e adicionados de 5 mL da solução extratora composta por metanol, e levados ao vórtex por 2 minutos, em homogeneizador Turrax<sup>®</sup> por um minuto e em seguida para lavadora ultrassônica por 30 minutos. Ao final, todo o conteúdo foi filtrado em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e quantificado o fármaco fazendo uso de cromatografia líquida de alta eficiência (PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008; ROSA et al., 2003).

**Figura 9:** Técnica de tape stripping.



### 3.2.9. Estudo *in vivo*

O estudo *in vivo* foi realizado após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (despacho 58/2015).

Foram utilizados camundongos machos de linhagem *Swiss* com peso médio de 25-30g, e foram devidamente alojados em gaiolas no biotério do Departamento de Fármaco e Medicamentos desta faculdade, conforme o padrão sanitário do biotério recomendado pelo CEUA.

#### 3.2.9.1. Avaliação da atividade analgésica anti nociceptiva – ensaio de pressão de pata Randall-Sellito

### Cálculo do tamanho amostral

O número de animais por grupo ( $n=7$ ) foi calculado em função da variabilidade usualmente observada no teste de Randall-Selito, que é em torno de 25%. O cálculo foi realizado empregando-se a equação 1:

$$n = 1 + \left[ 2 \times C \times (s/d)^2 \right] \quad (1)$$

onde,  $C$  é a dependente dos valores escolhidos para a força ou poder do teste ( $1-\beta$ ; chance de encontrar uma diferença existente) e nível de significância ( $\alpha$ ; a chance de considerar dois grupos diferentes quando eles não o são). Para pesquisadores que consideram  $p < 0,05$  o valor de  $\alpha$  é 0,05.  $s$  é o desvio padrão aceitável de acordo com a projeção do pesquisador e  $d$  é a diferença esperada entre os grupos.

Para calcular o  $C$ , deve-se aplicar a fórmula (equação 2):

$$C = (z\alpha + z\beta)^2 \quad (2)$$

Para determinar o valor de  $z\alpha$  deve-se dividir o valor do intervalo de confiança (em geral 95 % ou 0,95) por 2. Por exemplo, para um intervalo de 0,95 o valor a se procurar na tabela de valores de  $z$  (anexo) é 0,475 e a soma dos valores da linha (1,9) com o topo da coluna (0,06) fornece um valor de  $z\alpha=1,96$ . Em experimentos na área de saúde, o poder do teste é comumente 90% para o qual o valor de  $z\beta$  é 1,282 (também observado na tabela de valores de  $z$ ). Assim, para o cálculo de  $C$  tem-se:

$$C = (1,96 + 1,282)^2, \text{ logo: } \underline{C = 10,51}$$

Dessa forma, para um alfa de 5% (0,05), desvio padrão de 25 % (0,25), e uma diferença esperada entre os grupos ( $d$ ) de 0,5 (50%), ao aplicarmos a equação 2, tem-se:

$$n = 1 + [2 \times 10,51 \cdot (0,25/0,5)^2] \text{ (equação 2)}$$

$$n = 1 + [21,02 \times 0,25]$$

$$n = 1 + 5,255$$

$$n = 6,255$$

O valor obtido foi de 6,255 (arredondado para 7). Logo, o número total de animais a serem empregados foi de 70 animais sendo 7 para cada grupo experimental de 10 grupos (JIN et al., 2015).

A atividade analgésica e antiinflamatória foi avaliada pelo limiar de remoção da pata dos animais frente a um estímulo mecânico, mediante a estimulação com carragenina. Para a execução do teste utilizou-se o analgesímetro, que gera um aumento gradual da força (em gramas) exercida por uma extremidade plástica sobre a superfície dorsal da pata do animal.

Uma hora antes da administração das formulações contendo o fármaco, a pata direita traseira do animal foi tratada com carragenina administrada por via intraplantar (1 %, 100 µL/pata). A resposta à pressão mecânica exercida pelo equipamento foi verificada em diferentes tempos, antes (leitura basal) e nos intervalos 2, 4, e 6 horas. A pata foi colocada sob a extremidade plástica do aparelho onde a pressão foi aplicada e aumentada a um ritmo constante até que o animal retirasse a pata como sinal indicativo de nocicepção (*Pain Withdrawal Threshold to Pressure – PWTP*). Foi estabelecido um valor máximo de pressão (*cut-off*) de 150 g para evitar lesões nas patas (JIN et al., 2015).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Preparo das formulações**

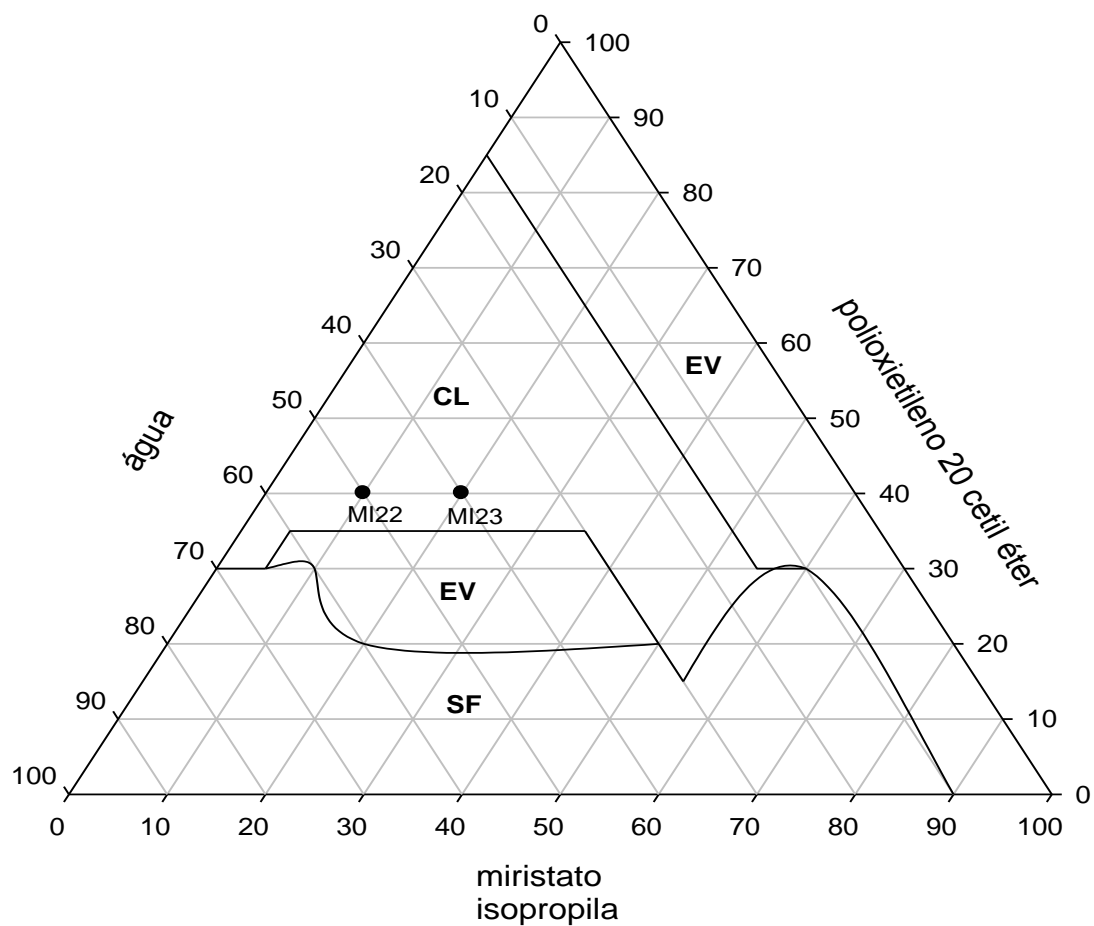
O preparo de todas as formulações foi realizado igualmente para todos os tipos de sistemas, possuindo em suas composições fase oleosa, fase aquosa e presença de tensoativo, sendo fixado em todos os sistemas a fase aquosa e a presença do tensoativo Brij<sup>®</sup>58, diferenciando-os apenas com a substituição de fase oleosa, sendo classificados em sistemas contendo: ácido oléico; ácido oléico + N metil pirrolidona; miristato de isopropila e N-metil pirrolidona. O modo de preparo das formulações foi feito através da mistura dos três componentes: água, óleo e tensoativo, os quais foram levados ao banho-maria até atingirem a temperatura de 60 °C suficiente para fundir o tensoativo; após este processo, a mistura foi homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro. As formulações foram preparadas em frascos transparentes, e após seu resfriamento, foram tampadas com tampas de borracha.

Os sistemas foram nomeados com o uso de siglas: os que continham em sua fase oleosa o ácido oléico foram denominados sistemas AO; sistemas compostos por fase oleosa sendo ácido oléico + N metil pirrolidona levaram a sigla ANMP; sistemas com miristato de isopropila foram denominados MI e os com N metil pirrolidona apenas deu-se o nome de NMP. Os sistemas acrescidos de acetato de dexametasona (DMX) na concentração usual do fármaco (0,1%) obtiveram como prefixo a letra D.

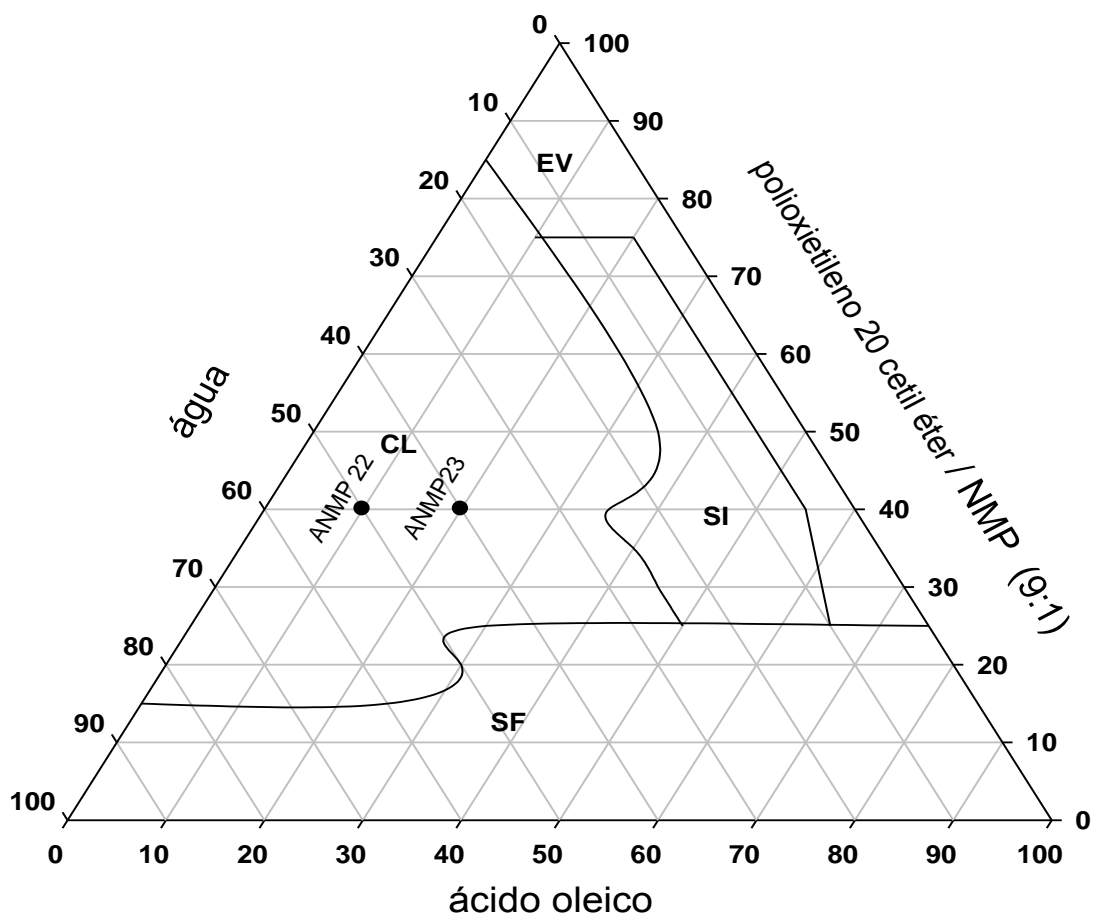
### **4.2. Construção do Diagrama de Fases**

Foram elaborados quatro diagramas de fases, sendo o primeiro diagrama ternário composto por: água, miristato de isopropila e Brij<sup>®</sup>58; o segundo diagrama foi composto por uma mistura de Brij<sup>®</sup>58, água e ácido oléico + N-metil pirrolidona, recebendo o nome de diagrama pseudo-ternário. O terceiro diagrama foi composto por ácido oléico, Brij<sup>®</sup>58 e água; já o quarto diagrama foi composto por N-metil pirrolidona, Brij<sup>®</sup>58 e água. Estes diagramas encontram-se dispostos nas Figuras 10, 11, 12 e 13.

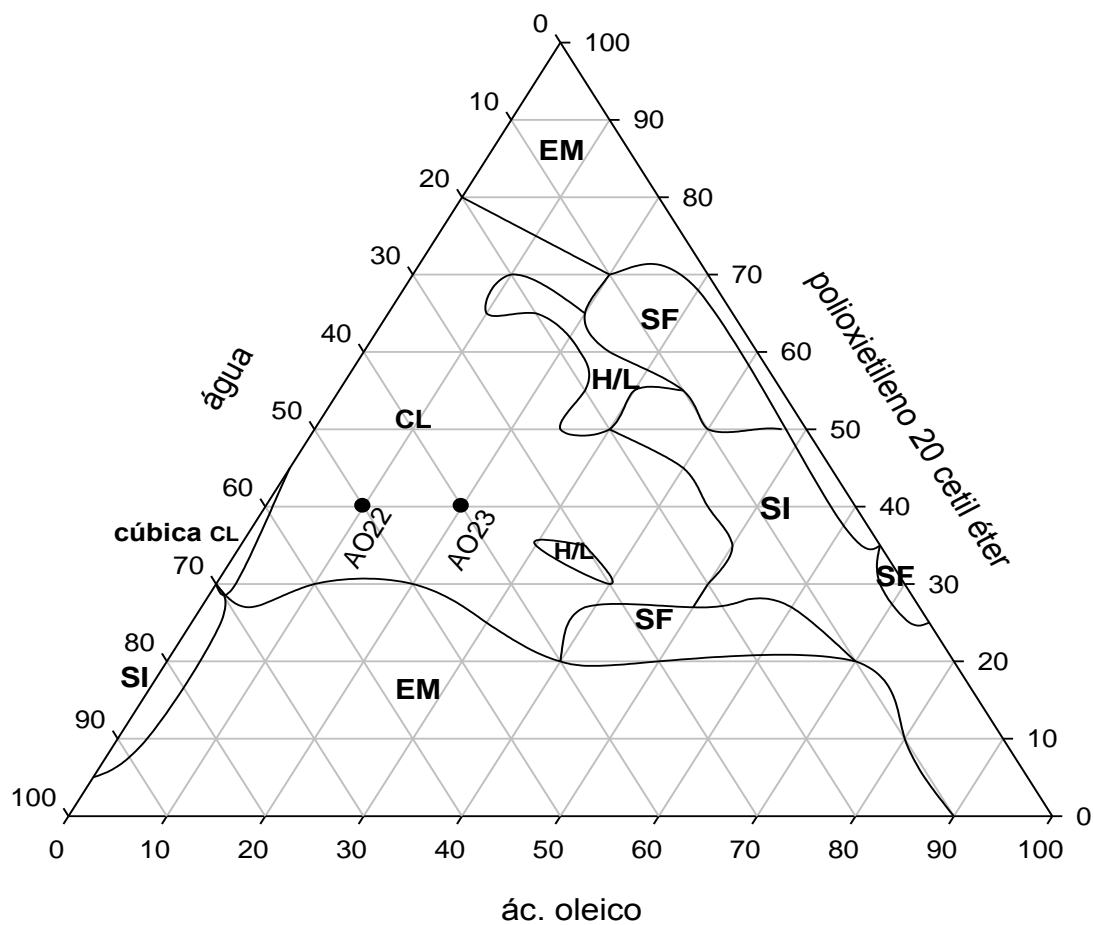
**Figura 10:** Diagrama de fases de sistemas estabilizados por Brij<sup>®</sup>58, miristato de isopropila e água. (CL) cristal líquido; (EV) emulsão viscosa; (SF) separação de fases.



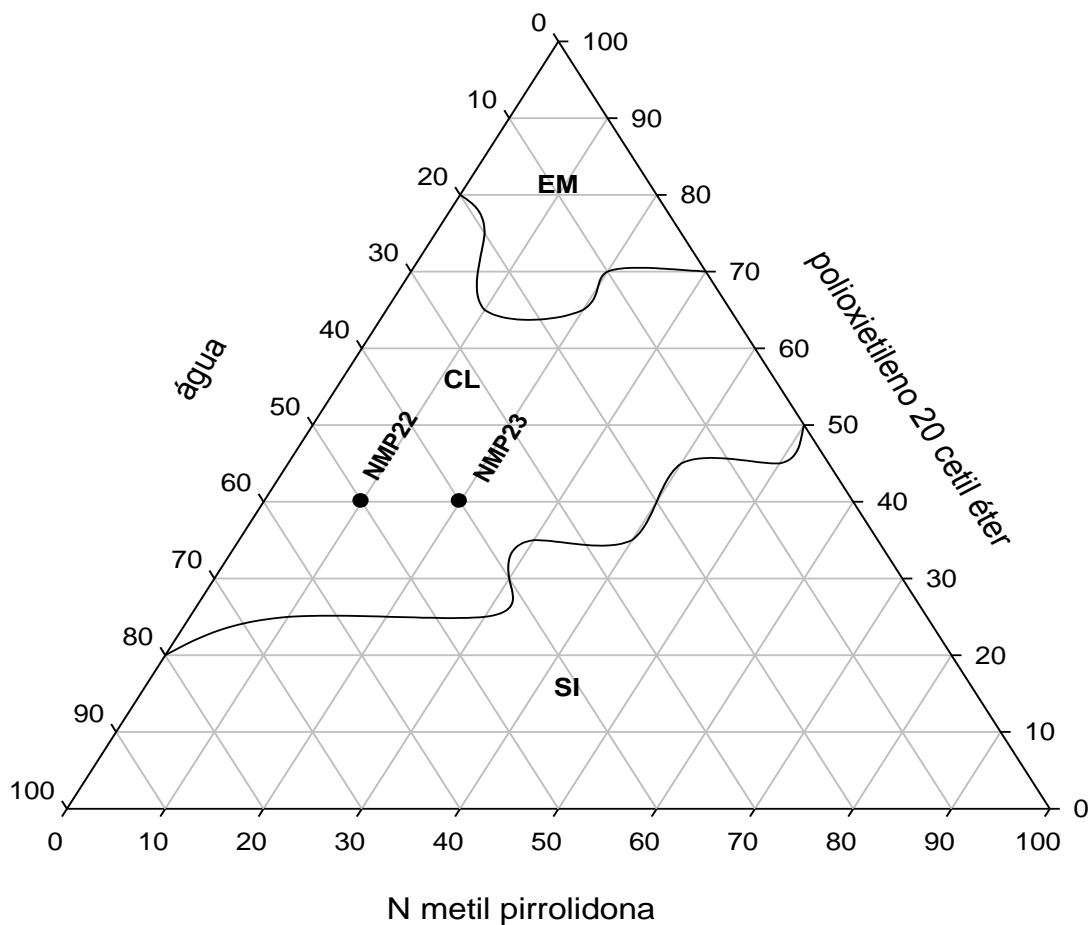
**Figura 11:** Diagrama de fases pseudo-ternário de sistemas estabilizados por Brij<sup>®</sup>58, ácido oléico + N metil pirrolidona e água. (CL) cristal líquido; (EV) emulsão viscosa; (SF) separação de fases; (SI) sistema isotrópico.



**Figura 12:** Diagrama de fases de sistemas estabilizados por Brij<sup>®</sup> 58, ácido oléico e água. (CL) cristal líquido; (EM) emulsão; (SF) separação de fases; (SI) sistema isotrópico; (H/L) transição de fase hexagonal/lamelar.



**Figura 13:** Diagrama de fases de sistemas estabilizados por Brij<sup>®</sup> 58, N metil pirrolidona e água. (CL) cristal líquido; (EM) emulsão; (SF); (SI) sistema isotrópico.



Para a obtenção dos diagramas de fases foram trabalhados os 36 pontos internos do diagrama utilizando as proporções de 5 a 95% de cada componente, a saber, água, óleo e tensoativo. Também, foram estudadas as misturas binárias de água/tensoativo (A/T) e tensoativo/óleo (T/O) dos diagramas. Foram usadas as relações de A/T na faixa de 1:9 até 9:1. O mesmo procedimento foi utilizado para a mistura binária de T/A.



A obtenção do diagrama de fases partindo dos componentes miristato de isopropila, polioxietileno 20 cetil éter e água (Fig. 10), resultou em uma interessante região de cristais líquidos, formado nas proporções de tensoativo entre 30 a 70%, fase oleosa entre 5 a 50% e água nas quantidades de 15 a 60%. Assim, sugere-se que, com a formação de cristais líquidos dentro do intervalo de 40% de tensoativo, seja um sistema promissor para a administração cutânea de fármacos, pois em concentrações maiores podem causar irritação (OYAFUSO et al., 2015). Neste sentido, optamos em selecionar amostras dentro do intervalo dos 40% de tensoativo, as quais estão indicadas em cada diagrama de fases.

No diagrama pseudo-ternário (Fig. 11), foi possível delimitar a região de cristais líquidos, sendo formadas nas proporções de 10 a 70% de água, 10 a 40% de fase oleosa e tensoativo entre 20 a 80%. A região que compreende entre 20 a 80% de água, até 50% de fase oleosa, e no intervalo de 20 a 70% de tensoativo; foram delimitadas no diagrama composto por ácido oléico, água e Brij<sup>®</sup>58 (Fig. 12), sendo sistemas considerados como promissores para o desenvolvimento dos cristais líquidos.

O quarto e último diagrama (Fig. 13) elaborado foi constituído por polioxietileno 20 cetil éter (Brij<sup>®</sup> 58), água e N metil pirrolidona. A região delimitada dos cristais líquidos foi observada na região entre 20 a 80% de água, sendo formada nas proporções de 25 a 70% de tensoativo e em qualquer proporção de n metil pirrolidona. Entende-se que com o acréscimo de água até 80% ocorre formação de cristais líquidos; já acima de 80% de água o sistema deixa de ser cristal líquido e assume características de sistemas isotrópicos, sugerindo a formação de microemulsão e não apenas uma diluição aquosa.

A construção do diagrama de fases foi importante no sentido de visualizar as regiões delimitadas, constituídas por cristais líquidos, tornando possível avaliar a formação destes sistemas, para os quais o comportamento foi semelhante permitindo-nos concluir que o acréscimo de água para os quatro sistemas favoreceu a formação de cristais líquidos.

#### **4.2.1. Escolha das amostras a serem estudadas**

O critério de escolha das amostras selecionadas levou em conta características visuais, sendo preferidos sistemas transparentes de alta ou baixa viscosidade, pois a transparência dos

sistemas remete a características de sistemas líquido cristalinos, e a quantidade de tensoativo, optando-se por regiões com baixas proporções, podendo assim minimizar possíveis irritações ao tecido cutâneo. Após esta seleção, as amostras foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada e pela técnica de espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS), para obter uma maior precisão nos resultados quanto a sua caracterização estrutural. As formulações selecionadas para estudo encontram-se esquematizadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Formulações selecionadas para estudo.

<b>Amostras</b>	<b>ácido oléico (%)</b>	<b>miristato de isopropila (%)</b>	<b>N metil pirrolidona (%)</b>	<b>água (%)</b>	<b>polioxietileno 20 cetil éter (Brij®58) (%)</b>
<b>AO22</b>	10	-	-	50	40
<b>AO23</b>	20	-	-	40	40
<b>ANMP22</b>	9	-	1	50	40
<b>ANMP23</b>	19	-	1	40	40
<b>NMP22</b>	-	-	10	50	40
<b>NMP23</b>	-	-	20	40	40
<b>MI22</b>	-	10	-	50	40
<b>MI23</b>	-	20	-	40	40

#### 4.3. Medidas de Microscopia de Luz Polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma ferramenta de grande importância para a identificação e classificação dos materiais líquido-cristalinos. As fotomicrografias são provas de texturas observadas, normalmente pelo uso de luz polarizada (FERRARI, 1998). Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano de luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas são isotrópicas (FORMARIZ et al., 2005; MORAIS., 2006; URBAN, 2004).

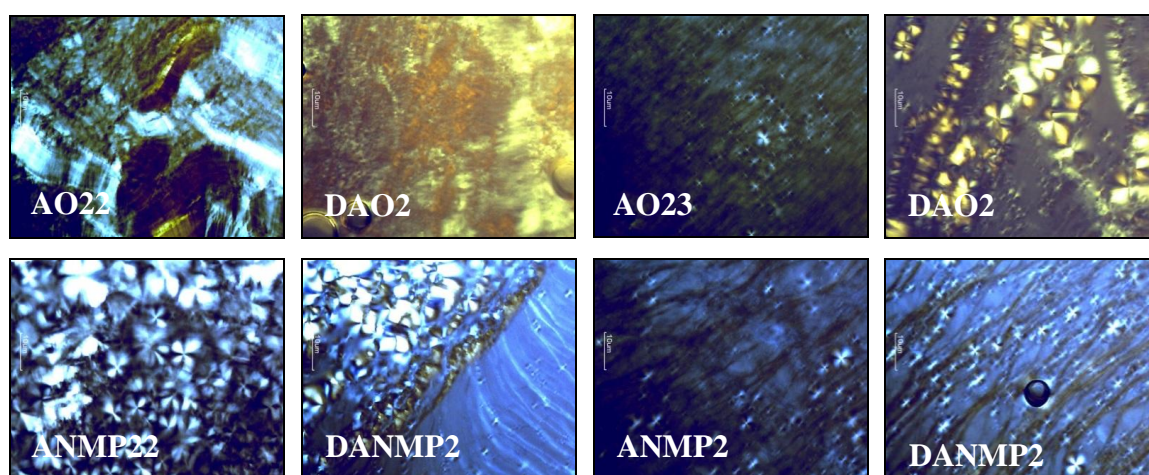
As amostras foram analisadas sob o plano de luz polarizada, sendo possível realizar a caracterização estrutural dos sistemas. As formulações AO23, ANMP22 e ANMP23 foram identificadas como sistemas anisotrópicos, apresentando características de mesofase lamelar, com estruturas do tipo “cruz de malta”, tanto na ausência quanto na presença de dexametasona.

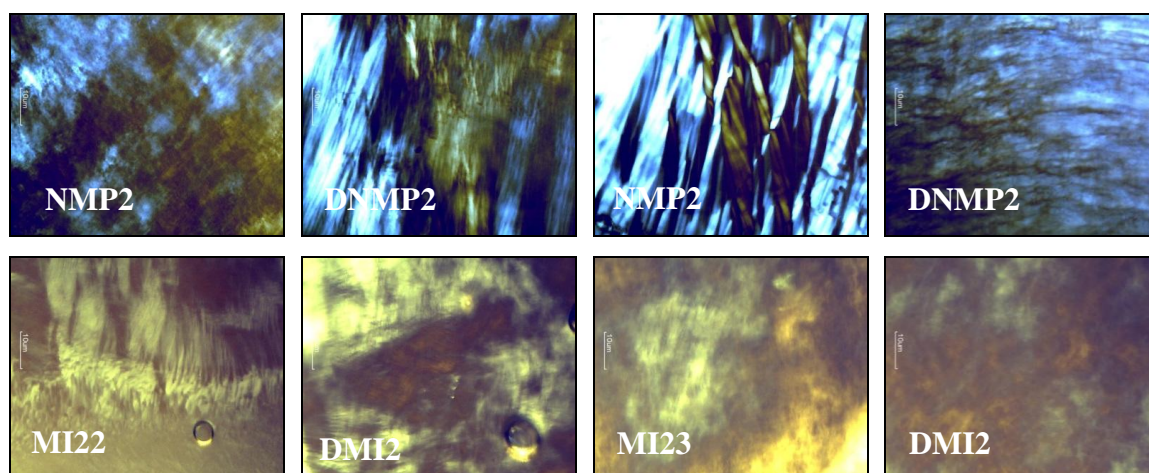
Já para as demais amostras foram observadas a presença de “estrias”, características de mesofase hexagonal de cristais líquidos. Para as formulações contendo dexametasona, a presença do fármaco não alterou a estrutura dos sistemas.

Ao avaliar a microscopia de luz polarizada e os dados obtidos do diagrama de fases, observou-se que o aumento da porcentagem de ácido oléico modifica a estrutura do sistema, fazendo com que o sistema deixe de ter características de mesofase hexagonal, tornando-se lamelar, como é evidente na microscopia de luz polarizada das amostras AO22 (hexagonal) e AO23 (lamelar). Para as demais amostras o acréscimo de fase oleosa, observado entre os pontos 22 e 23, não foi suficiente para promover alterações na estrutura do sistema.

Estão representadas na Figura 14, as fotomicrografias das formulações com e sem fármaco, obtidas por microscopia de luz polarizada. As amostras acrescidas do fármaco estão identificadas com o prefixo D em suas siglas.

**Figura 14:** Fotomicrografias das amostras em estudo obtidas por microscopia de luz polarizada, logo após o preparo. Aumento de 100 vezes.





#### 4.4. Comportamento reológico

Análises reológicas compreendem o estudo do comportamento da deformação de um material quando submetido a uma dada tensão, podendo resultar em deformações do tipo viscosa ou elástica, ou seja, conforme o tipo de tensão aplicada sobre o material, este irá apresentar comportamento de um sólido elástico ou de um líquido viscoso (SCHRAMM, 2006).

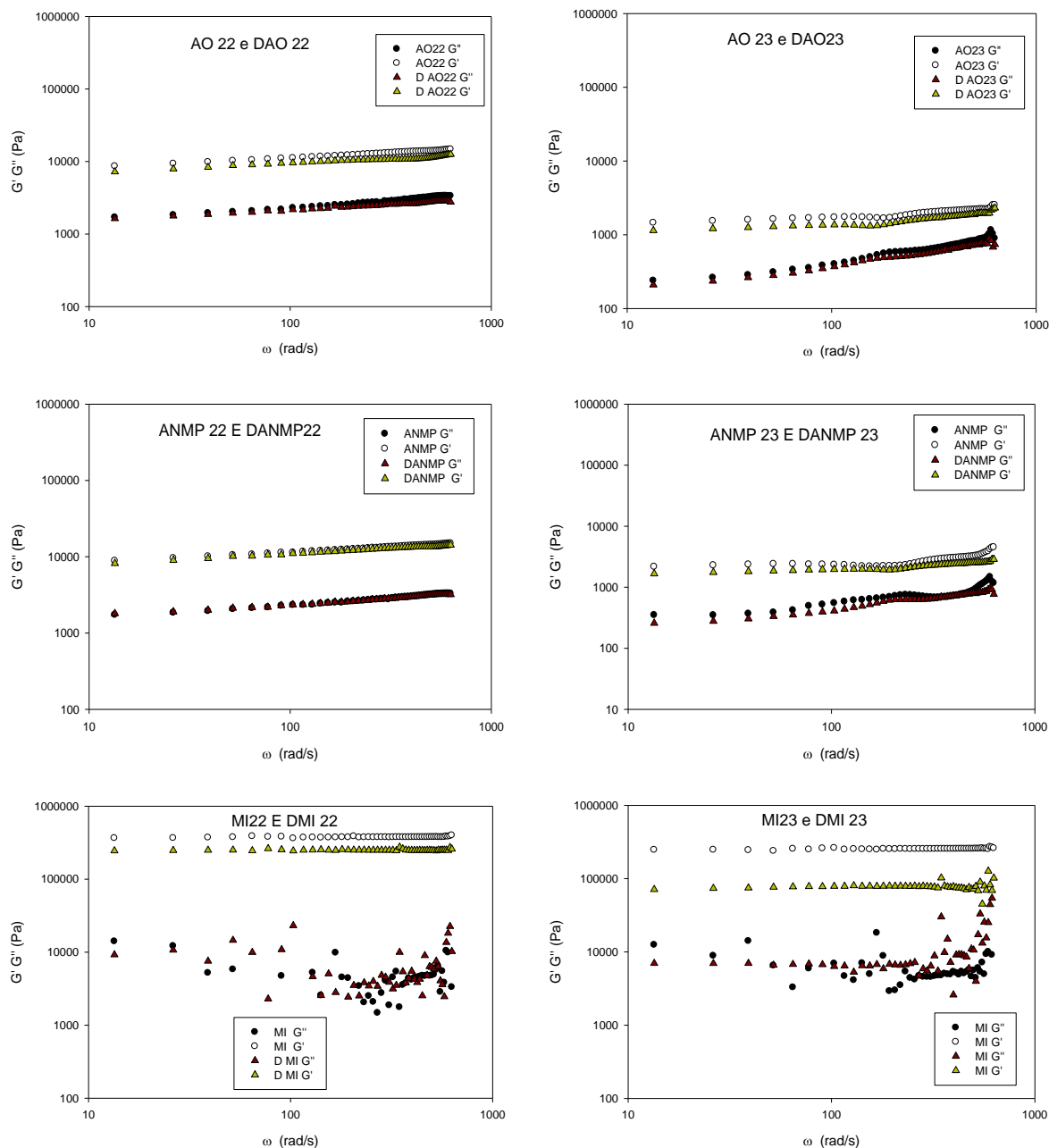
O estudo reológico representa uma técnica eficiente para caracterizar propriedades estruturais de diferentes materiais (AMORIN, 2012; DINU et al., 2012). As propriedades reológicas influenciam no processo de desenvolvimento de produtos, seja na área farmacêutica, cosmética ou química, sendo possível avaliar o comportamento destes materiais em relação aos parâmetros de escoamento, remoção da embalagem e aplicação no local de ação. (LEE et al., 2009).

As caracterizações reológicas foram feitas nos módulos de armazenamento ou elástico ( $G'$ ) e módulo de perda ou viscoso ( $G''$ ), em função da frequência. Quando ocorre predomínio do módulo elástico ( $G'$ ) sobre o módulo viscoso ( $G''$ ) compreende-se que o sistema possui uma maior estruturação, e fortes interações entre as moléculas (YARIV et al., 2010).

As amostras foram estudadas em relação ao seu comportamento viscoelástico, com objetivo de avaliar as características estruturais das formulações. Foram realizados ensaios de varredura de tensão na faixa de 0 -100 Pa , com frequência fixa em 100Hz. Após análise dos

gráficos de varredura de tensão concluiu-se que a faixa de viscoelasticidade linear ocorreu em regiões de baixa tensão e a melhor tensão para realizar os espectro mecânicos foi a de 5Pa. Os reogramas obtidos encontram-se na Figura 15.

**Figura 15:** Reogramas das formulações em estudo com e sem fármaco.



Nas formulações AO22 e AO23 o módulo de armazenamento ( $G'$ ) foi maior que o módulo de perda ( $G''$ ). Estes resultados são característicos de um comportamento predominantemente elástico, sugerindo que os sistemas estão bem estruturados e possuem fortes interações entre as moléculas (YARIV et al., 2010). A adição do fármaco nas formulações não causou desestruturação no sistema.

Embora ambos os sistemas sejam bem estruturados, notou-se que os valores de  $G'$  e  $G''$  da amostra AO23 eram menores que os de AO22, dados coerentes com a característica visual e estrutural revelada por microscopia de luz polarizada (MLP). Os sistemas AO22 com e sem fármaco foram caracterizados como mesofases hexagonais e apresentaram maior viscosidade em relação aos sistemas AO23, os quais foram caracterizados como sistemas lamelares.

As amostras AO22 e ANMP22 apresentaram comportamento reológico bastante semelhante com praticamente os mesmos valores de  $G'$  e  $G''$ . Entende-se que a única diferença para estas formulações é a adição de N metil pirrolidona na formulação ANMP22, sugerindo então que a presença de N metil pirrolidona não modifica parâmetros reológicos das formulações (Fig.15).

As amostras ANMP 22 e ANMP 23, apresentaram  $G'$  e  $G''$  praticamente coincidentes demonstrando um certo equilíbrio entre os compostos viscosos e elásticos. O mesmo ocorreu para os sistemas contendo fármaco (Fig. 15).

As formulações ANMP 22 e ANMP 23 resultaram em estruturas lamelares quando avaliadas sob plano de luz polarizada. Ao comparar os parâmetros reológicos destas amostras, observou-se que a amostra ANMP 23 apresentou menores valores de  $G'$  e  $G''$  (Fig. 15). Assim, sugere-se que a redução destes parâmetros seja atribuída aos componentes da formulação, pelo fato de possuírem maior quantidade de fase oleosa e redução na fase aquosa comparada a amostra ANMP22.

A amostra ANMP23 resultou em menores valores de  $G'$  e  $G''$ , quando comparado ao sistema ANMP22. Mesmo que estes valores sejam menores, observou-se que ocorreu domínio do módulo de armazenamento ( $G'$ ), considerando ser um sistema bem estruturado, sendo caracterizado por fortes interações entre as moléculas.

Dentre os sistemas, os denominados MI 22 e MI 23 foram os que apresentaram os mais elevados valores de  $G'$  e  $G''$ , ocorrendo o predomínio do módulo de armazenamento ( $G'$ ); sendo assim, sugere-se que a presença do miristato de isopropila nas formulações MI 22 e MI 23 favorece a estruturação dos cristais líquidos, apresentando fortes ligações intermoleculares (Fig.15).

Os resultados obtidos através dos reogramas corroboram com os resultados obtidos em microscopia de luz polarizada e com as regiões de cristais líquidos delimitadas no diagrama de fases. Assim, o acréscimo de água favoreceu a formação de cristais líquidos e os reogramas indicaram que os valores de  $G'$  e  $G''$  são sempre superiores para as amostras identificadas com a numeração 22. Estas possuem maior quantidade de água e menor quantidade de fase oleosa e resultam em sistemas mais viscosos e com fortes ligações entre as moléculas sendo sistemas bem estruturados.

Com o intuito de estabelecer uma análise quantitativa estrutural dos sistemas obtidos, foi possível calcular a dependência de ( $G'$ ) pela frequência, utilizando regressão linear ( $r$ ) dos dados do comportamento reológico das formulações. Além disso foi calculado o expoente ( $n$ ) através da “Lei da Potência” utilizando a equação 3:

$$G' = S\omega^n \quad (3)$$

em que:  $G'$  corresponde ao módulo de armazenamento;  $\omega$  = frequência oscilatória; ( $S$ ) = resistência do gel e ( $n$ ) expoente viscoelástico.

Os parâmetros ( $S$ ) e ( $n$ ) são indicativos de densidade de reticulação no interior do gel. Quanto mais alto o valor de ( $S$ ) mais reticulada e forte será a estrutura do gel, inversamente o valor de ( $n$ ) diminui com o aumento da reticulação, tal que valores elevados de ( $n$ ) são indicativos de estruturas mais fracas de gel (SAXENA; KALOTI; BOHIDAR, 2011). Na tabela 2 estão listados os parâmetros reológicos, indicando os valores de resistência do gel ( $S$ ), expoente viscoelástico ( $n$ ) e regressão linear ( $r$ ).

**Tabela 2:** Valores de regressão linear ( $r$ ), expoente viscoelástico ( $n$ ) e da resistência do gel ( $S$ ) dos sistemas.

<b>Amostra</b>	<b><math>R</math></b>	<b><math>S</math></b>	<b><math>N</math></b>
<b>AO22</b>	0,9991	5812,9481	0,1421
<b>DAO22</b>	0,9794	5158,5303	0,1299
<b>AO23</b>	0,9385	883,9309	0,1454
<b>DAO23</b>	0,9372	542,8587	0,2013
<b>ANMP22</b>	0,9993	5934,8845	0,1420
<b>DANMP22</b>	0,9962	5635,8357	0,1434
<b>ANMP23</b>	0,8011	839,0593	0,2197
<b>DANMP23</b>	0,9413	994,3662	0,1478
<b>MI22</b>	0,7573	341187,3895	0,0177
<b>DMI22</b>	0,4718	236255,9703	0,0109
<b>MI23</b>	0,8135	228389,4041	0,0194
<b>DMI23</b>	0,2598	65997,6349	0,0194

Os resultados obtidos mostraram valores de ( $S$ ) bastante elevados, principalmente para as formulações do tipo MI. Estes resultados só confirmam o que foi avaliado e discutido sobre os reogramas obtidos, como consta na Figura 15. Quanto maior os valores de  $S$ , maior serão as interações intermoleculares e mais estruturado os sistema. Observou-se também que os valores do expoente viscoelástico ( $n$ ), em nenhuma das amostras ultrapassou o valor da resistência do gel ( $S$ ), indicando que nenhuma amostra possui interações bastante fracas a ponto de superar valores de  $S$ .

Conclui-se, com estes resultados, que as formulações contendo miristato de isopropila (cristal líquido de fase hexagonal) foram as que apresentaram maiores interações fortes entre as moléculas, resultando em sistemas bem estruturados.



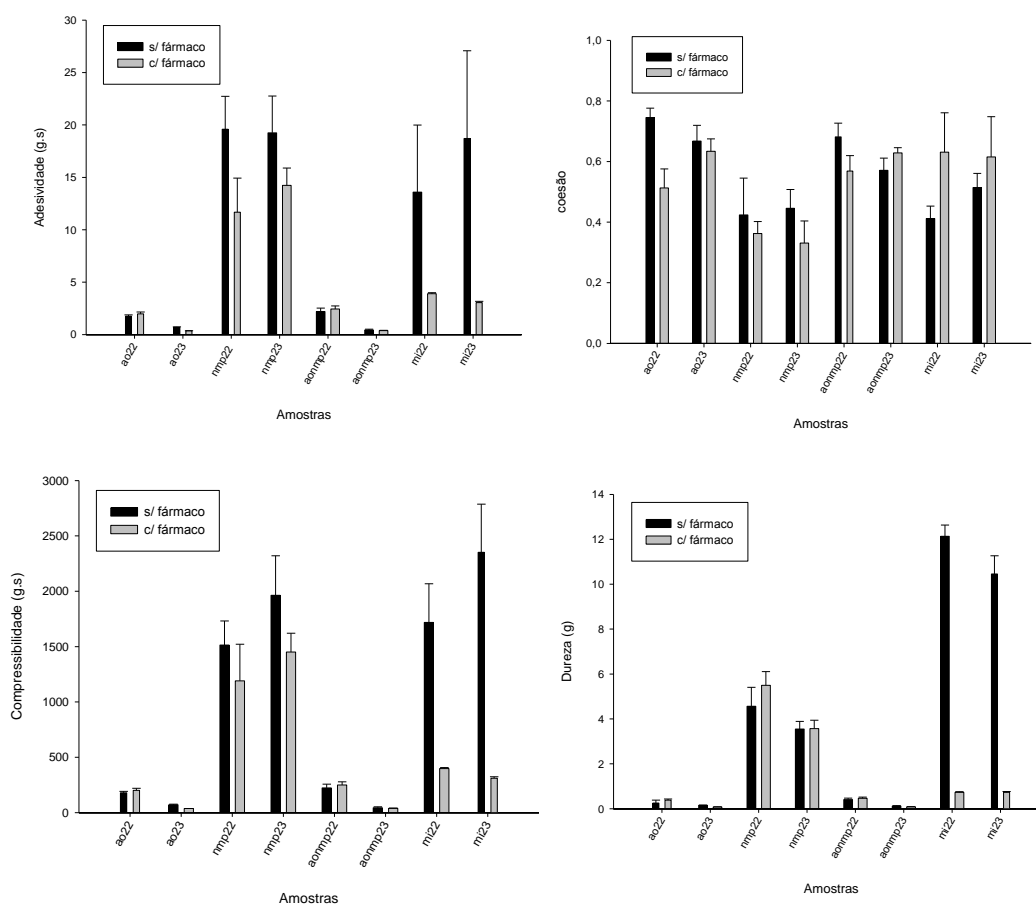
#### **4.5. Ensaio de perfil de textura**

Neste ensaio, utilizou-se o equipamento para ensaio do perfil de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Surrey, UK), onde a sonda do equipamento entra em contato com a formulação. Foram avaliados diversos parâmetros como: dureza, adesividade, compressibilidade e coesão. Os valores de dureza e compressibilidade estão relacionados à facilidade de aplicação das formulações; sendo que a dureza é considerada a resistência máxima à deformação compressional; já a compressibilidade está relacionada com o trabalho necessário para comprimir uma formulação; também é possível avaliar sua ejeção da embalagem e espalhabilidade na pele, através destes parâmetros (SENYIGIT et al., 2011).

O parâmetro da adesividade está relacionada à força de destacamento necessária para separar as ligações que ocorrem entre a formulação e a sonda do equipamento; e finalmente o parâmetro de coesão está relacionado à força existente entre as moléculas relacionado à recuperação estrutural da formulação para uma segunda aplicação (TAN; PEH; AL-HANBALI, 2000).

Neste sentido, o ensaio de perfil de textura das formulações é considerado muito importante, podendo revelar parâmetros para que se tenha uma boa aplicação das formulações pela via cutânea, otimizando assim a aceitação pelo paciente (SENYIGIT et al., 2011). Na Figura 16 encontram-se os gráficos de perfil de textura das formulações em estudo.

**Figura 16:** Análise do perfil de textura parâmetros: adesividade, coesão, compressibilidade e dureza.



Com os resultados obtidos nos ensaios de perfil de textura nota-se que ocorreram diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) para os valores dos parâmetros de adesividade, compressibilidade e dureza encontrados para as amostras NMP22, NMP23, MI22 e MI23 comparados às demais amostras, ocorrendo o mesmo com a adição do fármaco; sugere-se que este comportamento seja devido a propriedades características do N metil pirrolidona e do miristato de isopropila, pois quando comparados com as formulações que foram compostas por ácido oleico na mesma concentração, apresentaram valores de adesividade, compressibilidade e dureza bastante superiores.

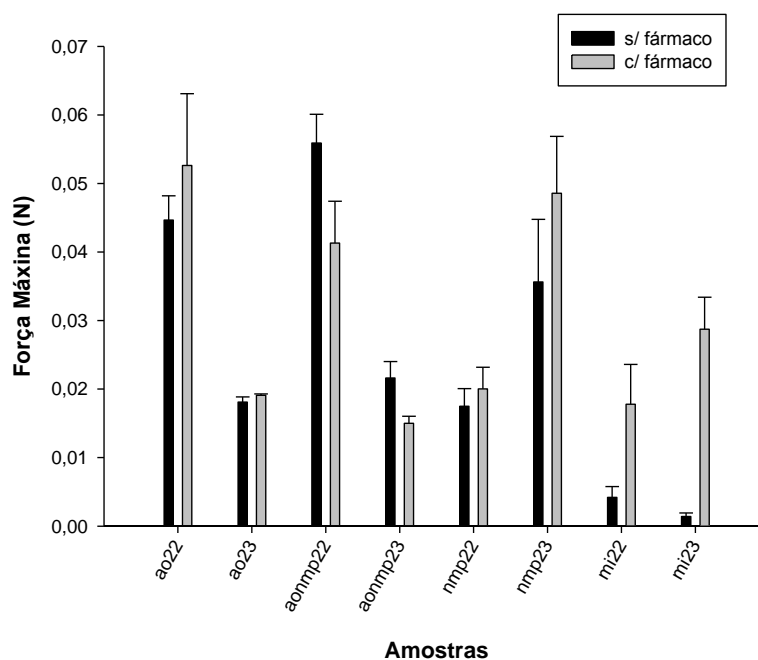
Quando se compara a viscosidade dos sistemas, as formulações NMP22, NMP23, MI22 e MI23 foram as que apresentaram maior viscosidade em relação às demais, características estas avaliadas na construção do diagrama de fases, sendo denominados sistemas transparentes de alta viscosidade. Nota-se que estes sistemas mais viscosos requerem maior força para espalhabilidade na pele e ejeção do produto do frasco; assim, estas características corroboram os valores elevados de compressibilidade e de dureza, os quais estão relacionados diretamente com a espalhabilidade e ejeção da formulação (SENYIGIT et al., 2011). É interessante ressaltar também que estas mesmas amostras, quando aplicadas na pata traseira de camundongos no teste *in vivo* de Randall & Sellito, foram as que apresentaram maior dificuldade de aplicação e espalhabilidade nos animais.

O parâmetro coesividade evidenciou que todas as amostras são bastante coesas, ou seja, apresentam fortes ligações entre as moléculas, ocorrendo uma recuperação estrutural das formulações mesmo após a aplicação (TAN; PEH; Al-HANBALI, 2000).

Com os resultados obtidos do ensaio do perfil de textura das formulações em estudo, sugere-se que as formulações de estruturas hexagonais contendo em sua composição N metil pirrolidona e miristato de isopropila, foram as que apresentaram maior adesividade sendo promissoras para administração cutânea.

#### **4.6. Ensaio de bioadesão *in vitro***

No ensaio de bioadesão, utilizou-se o mesmo equipamento no ensaio de perfil de textura; porém a sonda do equipamento foi acoplada à pele de porco, devidamente dissecada e dermatomizada, conforme metodologia descrita no item (3.2.7.3). A sonda juntamente com a pele de porco, entrou em contato com a formulação contida em um recipiente específico, fixado na base do equipamento. Os valores de bioadesão foram determinados empregando-se o software acoplado ao programa. A Figura 17 revela o trabalho de força máxima bioadesiva, para cada formulação.

**Figura 17:** Trabalho de Força Máxima Bioadesiva.

Os resultados obtidos para o trabalho de força máxima bioadesiva revelaram que as amostras AO22 e AONMP22 foram as que apresentaram maiores valores de força máxima para o teste de bioadesão, quando comparadas às demais formulações ( $p < 0,05$ ). Uma característica interessante avaliada é que as formulações NMP22, NMP23, MI22 e MI23 (estruturas hexagonais) no ensaio de análise de perfil de textura apresentaram maiores valores de adesividade, quando comparadas com AO22 e ANMP22 (estruturas lamelares). Os sistemas de mesofases hexagonais tendem a ser mais bioadesivos que as mesofases lamelares devido a suas propriedades reológicas, no entanto há estudos que demonstram comportamento contrário, podendo ser atribuído as suas características estruturais interagindo com a membrana biológica diminuindo os valores de bioadesão (SALMAZI et al., 2015; TAKEUCHI et al., 2005).

Assim, tentando compreender estes resultados, sugere-se que as formulações lamelares são mais bioadesivas que as hexagonais e que a presença de ácido oleico (10%) juntamente

com água (50%) nos sistemas líquido cristalinos, podem promover maiores interações entre a formulação e a pele, favorecendo a bioadesão. (SALMAZI et al., 2015).

#### **4.7. Medidas de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)**

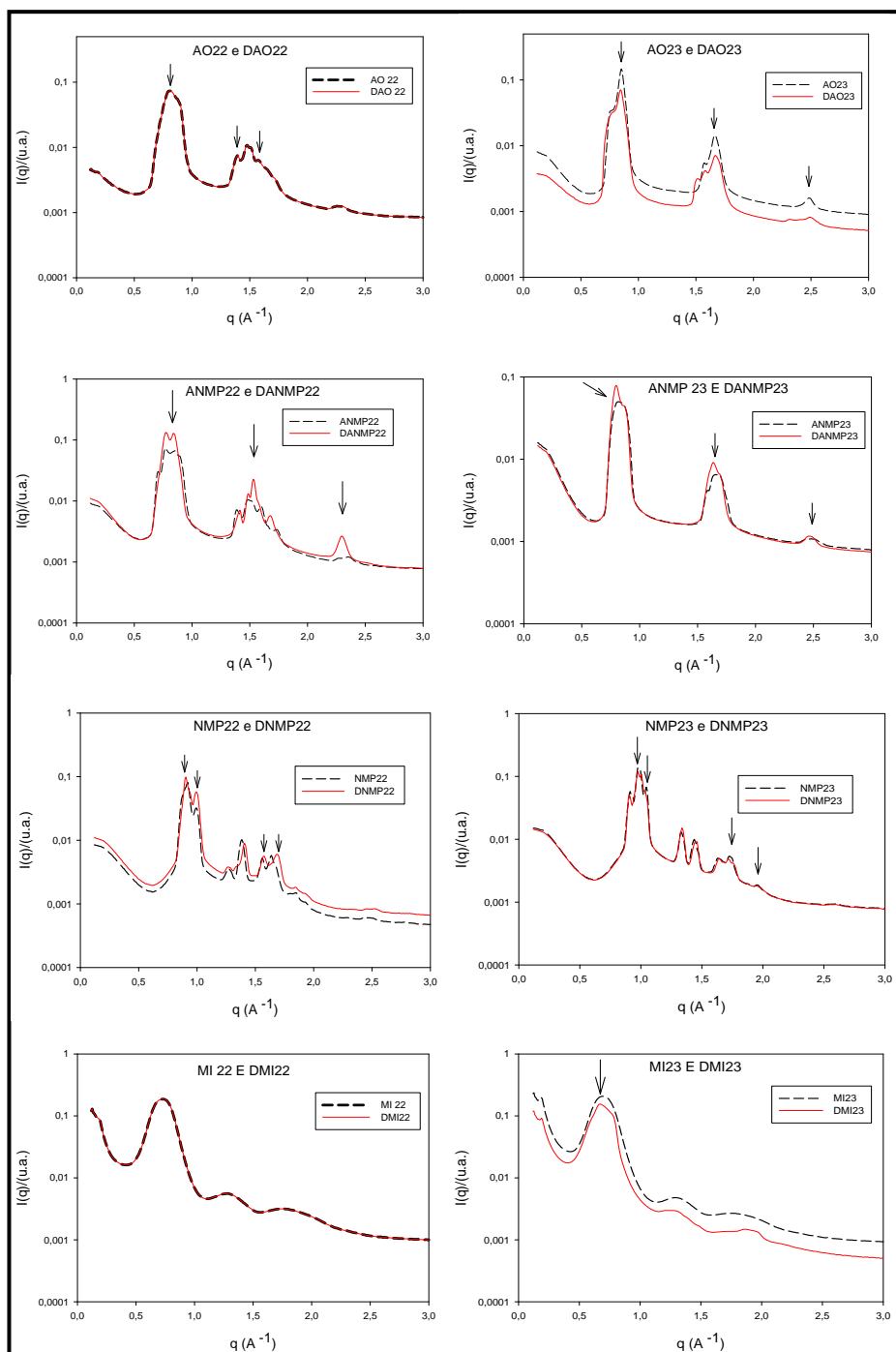
As formulações foram avaliadas por SAXS de acordo com sua evolução estrutural em função do teor de água e do tensoativo. Os dados foram coletados na estação de medidas SAXS (1) do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas-SP, que é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1,608 Å. O espalhamento por partículas existentes no sistema sem amostra foi subtraído da intensidade total da amostra.

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos pela microscopia de luz polarizada, as medidas de SAXS foram realizadas, podendo assim fornecer resultados mais sensíveis e informações sobre as nanoestruturas de forma mais conclusiva.

Os sistemas foram caracterizados verificando-se a posição dos picos ( $q_1$ ,  $q_2$ ,  $q_3$  ...) e assim foi calculada a razão entre os ( $q$ ) obtidos, em função da posição do primeiro pico ( $q_1$ ). Com os valores obtidos foi possível caracterizar os sistemas em hexagonais e lamelares.

A Figura 18 revela a intensidade de espalhamento,  $I(q)$ , em função do vetor espalhamento ( $q$ ) para os sistemas estudados.

Figura 18: Caracterização por SAXS das amostras em estudo.



Para determinar o tipo de estrutura de cada sistema verificou-se a posição dos picos ( $q_1, q_2, q_3, \text{etc.}$ ), determinou-se a razão entre os diversos ( $q$ ) em função da posição do primeiro pico ( $q_1$ ) e identificou-se também os valores obtidos da distância do espalhamento dos objetos ( $d$ ). A partir dos valores obtidos foi possível identificar quais foram as mesofases das estruturas líquido-cristalinas presentes (hexagonal e lamelar). Na Tabela 3 encontram-se os valores de razão entre as distâncias interplanares para as formulações, obtidos por SAXS.

**Tabela 3:** Intensidade dos picos ( $q$ ), distância do espalhamento dos objetos ( $d$ ) e razão entre as distâncias interplanares ( $d_1/d_2$ ,  $d_1/d_3$ ,  $d_1/d_4$ ) das amostras em estudo, obtidas por SAXS.

(continua)

Formulação	$q_{\max 1}$	$q_{\max 2}$	$q_{\max 3}$	$q_{\max 4}$	$d$ (Å)	$d_1/d_2$	$d_1/d_3$	$d_1/d_4$	Estrutura (SAXS)	Microscopia luz polarizada
<b>AO22</b>	0,799	0,38	1,58	-	7,86	1,73	2,0	-	Hexagonal	Hexagonal
<b>DAO22</b>	0,799	1,38	1,58	-	7,86	1,73	2,0	-	Hexagonal	Hexagonal
<b>AO23</b>	0,84	1,65	2,47	-	7,48	1,96	2,94	-	Lamelar	Lamelar
<b>DAO23</b>	0,83	1,66	2,48	-	7,57	2,0	3,0	-	Lamelar	Lamelar
<b>ANMP22</b>	0,76	1,52	2,29	-	8,26	2,0	3,0	-	Lamelar	Lamelar
<b>DANMP22</b>	0,77	1,53	2,29	-	8,15	1,98	2,97	-	Lamelar	Lamelar
<b>ANMP23</b>	0,80	1,65	2,49	-	7,85	2,0	3,1	-	Lamelar	Lamelar
<b>DANMP23</b>	0,78	1,63	2,41	-	8,0	2,0	3,0	-	Lamelar	Lamelar
<b>NMP22</b>	0,90	0,99	1,55	1,64	6,98	1,1	1,72	1,82	Hexagonal	Hexagonal
<b>DNMP22</b>	0,89	0,99	1,54	1,70	7,05	1,1	1,73	1,91	Hexagonal	Hexagonal
<b>NMP23</b>	0,99	1,04	1,72	1,96	6,34	1,0	1,73	2,0	Hexagonal	Hexagonal
<b>DNMP23</b>	0,99	1,04	1,72	1,96	6,34	1,0	1,73	2,0	Hexagonal	Hexagonal



**Tabela 3:** Intensidade dos picos ( $q$ ), distância do espalhamento dos objetos ( $d$ ) e razão entre as distâncias interplanares ( $d_1/d_2$ ,  $d_1/d_3$ ,  $d_1/d_4$ ) das amostras em estudo, obtidas por SAXS.

(conclusão)

Formulação	$q_{\max 1}$	$q_{\max 2}$	$q_{\max 3}$	$q_{\max 4}$	$d$ (Å)	$d_1/d_2$	$d_1/d_3$	$d_1/d_4$	Estrutura (SAXS)	Microscopia luz polarizada
<b>MI22</b>	0,72	1,25	1,90	-	8,72	1,73	2,63	-	Hexagonal	Hexagonal
<b>DMI22</b>	0,72	1,25	1,90	-	8,72	1,73	2,63	-	Hexagonal	Hexagonal
<b>MI23</b>	0,68	1,31	1,79	-	9,23	1,92	2,63	-	Hexagonal	Hexagonal
<b>DMI23</b>	0,68	1,30	1,80	-	9,23	1,91	2,64	-	Hexagonal	Hexagonal

Os valores de espalhamento do vetor  $q$ , correspondentes aos picos que são correlacionados ( $q_1: q_2: q_3: q_4 = 1: 1,73: 2: 2,64$ ), mostram valores de espalhamento característicos de periodicidade de fase hexagonal, indicando que a amostra é um cristal líquido de mesofase hexagonal. Já os valores de ( $q$ ) dos picos que se correlacionam  $q_1:q_2:q_3 = 1:2:3$ , exibem comportamento de cristais líquidos lamelares (ZANG et al., 2008), e para os cristais líquidos de fase cúbica, correlacionam-se os valores 1,41: 1,73: 2,82: 3 (YARIV et al., 2010).

O cálculo da correlação da distância entre o espalhamento dos objetos ( $d$ ) foi feito através da equação 4:

$$d = 2\pi / q_{\max} \quad (4)$$

onde  $q_{\max}$  corresponde ao valor de intensidade do pico 1;  $d$  = espaço entre duas camadas adjacentes para sistemas de fase lamelar e para sistemas de fase hexagonal  $d$  é a distância entre as camadas adjacentes das estruturas cilíndricas dos sistemas hexagonais (P. HOLMQVIST; PEH; AL-HANBALI, 1997).

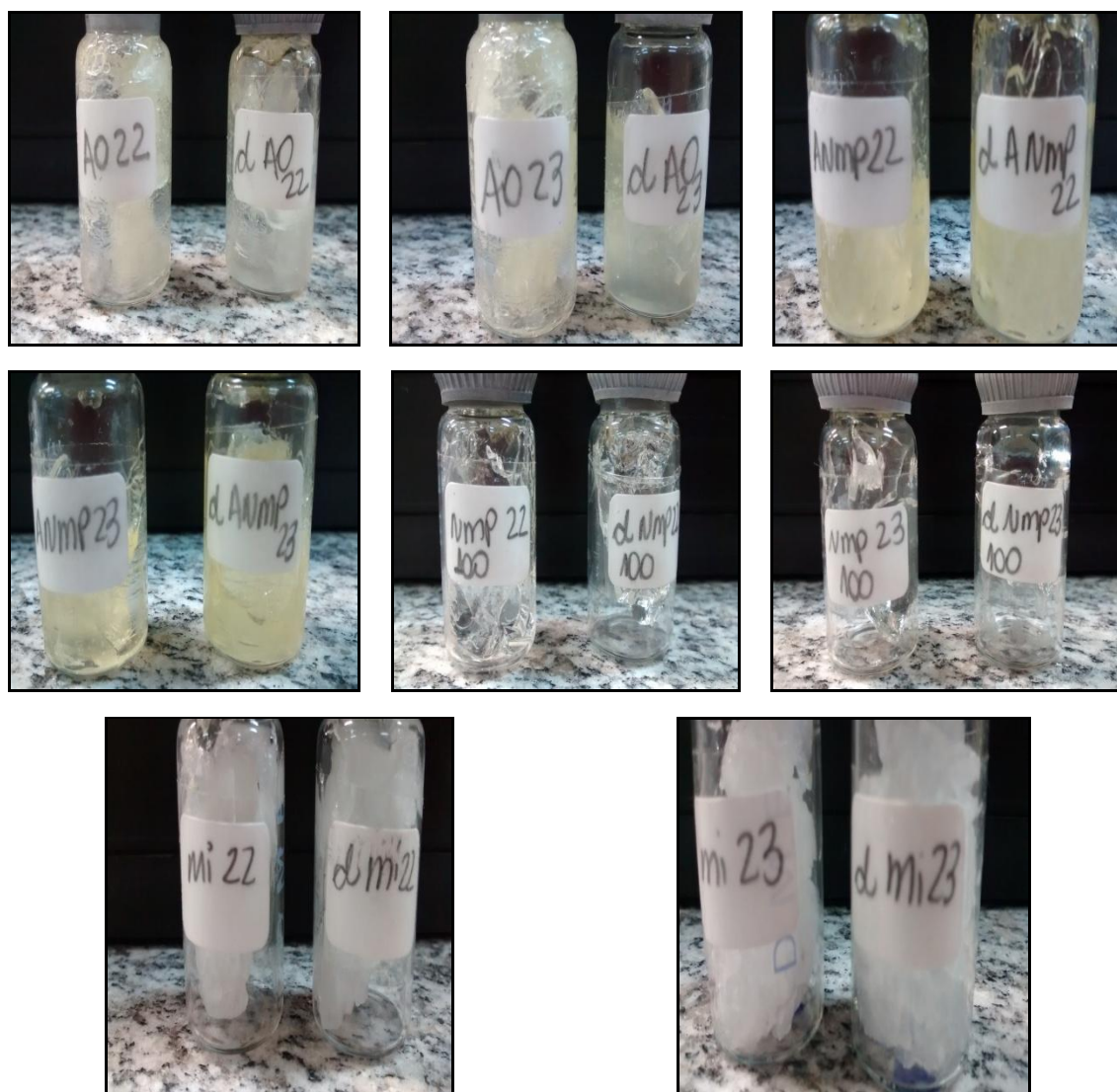
Os valores calculados de  $d$  para as formulações indicam que a distância  $d$  entre os objetos espalhados são da ordem da escala nanométrica, sendo  $1\text{\AA} = 0,1\text{ nm}$ , sendo considerados os cristais líquidos, sistemas nanoestruturados.

As medidas de SAXS não foram conclusivas para identificação da estrutura das amostras MI22, MI23 e mesmo na presença do fármaco, pois os dados não revelaram valores de picos característicos de sistemas hexagonais, os quais foram identificados pela microscopia de luz polarizada.

#### **4.8. Teste de estabilidade das formulações**

##### **4.8.1. Avaliação visual da estabilidade das amostras em estudo**

Após o preparo das formulações as mesmas foram armazenadas em temperatura ambiente no período de seis meses. Os sistemas não apresentaram qualquer tipo de alteração física, como separação de fases, precipitação mudança de cor e odor. Na Figura 19 estão as fotografias das amostras em estudo.

**Figura 19:** Fotografias das amostras em estudo.

#### 4.8.2. Teste de centrifugação

A força da gravidade atua sobre a amostra fazendo com que suas partículas se movam no seu interior. O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades, que podem ser observadas na forma de precipitação, ou separação de fases, entre outras (BRASIL, 2004).

Foram centrifugadas 5 g de cada amostra por 30 minutos a 3000 rpm e na temperatura ambiente, em seguida avaliou-se visualmente as amostras e nenhuma alteração quanto a separação de fases ou precipitação foi observada, demonstrando que as amostras mantiveram-se estáveis.

#### 4.8.3. Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH) das formulações em estudo

Os valores de pH obtidos para as diferentes formulações estão dispostos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Valores do potencial hidrogeniônico (pH) das amostras.

<b>Formulações</b>	<b>pH</b>
<b>AO22</b>	4,45
<b>AO23</b>	4,15
<b>ANMP22</b>	4,16
<b>ANMP23</b>	4,14
<b>NMP22</b>	4,02
<b>NMP23</b>	4,91
<b>MI22</b>	4,15
<b>MI23</b>	3,51
<b>DAO22</b>	4,14
<b>DAO23</b>	3,86
<b>DANMP22</b>	4,00
<b>DANMP23</b>	3,72
<b>DNMP22</b>	3,98
<b>DNMP23</b>	3,89
<b>DMI22</b>	3,95
<b>DMI23</b>	3,68

Quando observados os valores obtidos do potencial hidrogeniônico das formulações, notou-se que ocorreu uma pequena redução nos valores de pH para as amostras contendo o

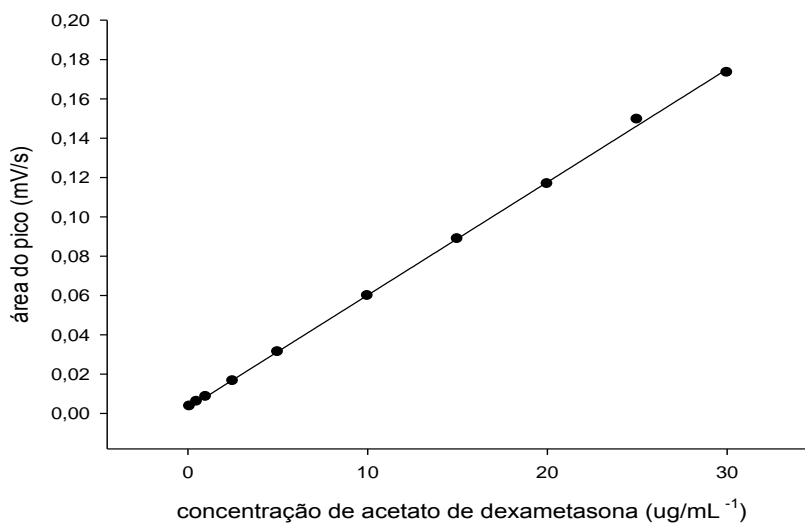
fármaco: esta redução é atribuída ao próprio fármaco, na forma de acetato de dexametasona. Estes valores não ocasionam nenhum obstáculo para que as formulações sejam administradas através da via cutânea; pois a pele naturalmente apresenta pH levemente ácido (4,0-5,8), contribuindo para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

#### **4.9. Validação do método de doseamento de DXM por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A metodologia foi validada durante o curso do mestrado (OYAFUSO, 2012) e teve como objetivo demonstrar que o método foi apropriado para tal finalidade, ou seja, o método garantiu a determinação quantitativa do acetato de dexametasona dentro das exigências das aplicações analíticas preconizadas pelas diretrizes do Comitê Internacional em Harmonização (ALLPORT-SETTLE, 2010). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

#### **4.10. Ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro***

Os ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A linearidade do método foi determinada através da construção da curva analítica para acetato de dexametasona em metanol (Figura 20); as áreas médias dos picos do fármaco *versus* a área de concentração foram obtidos por regressão linear.

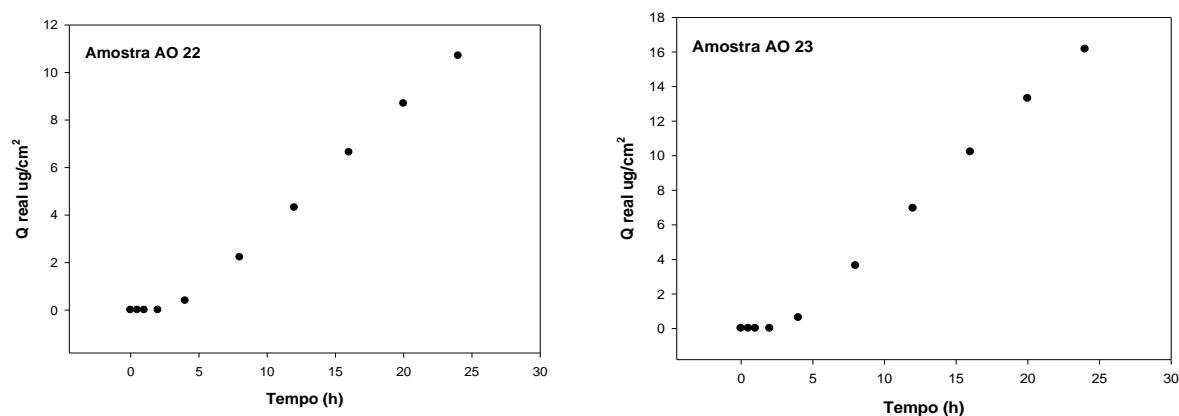
**Figura 20:** Curva analítica de acetato de dexametasona em metanol.

O desvio padrão para inclinação e intercepto da curva analítica foi calculado. A curva apresentou-se linear, com equação  $y = 0,005x + 0,002$  e coeficiente de regressão linear = 0,999; encontrando-se dentro do preconizado pela literatura (ALLPORT-SETTLE, 2010).

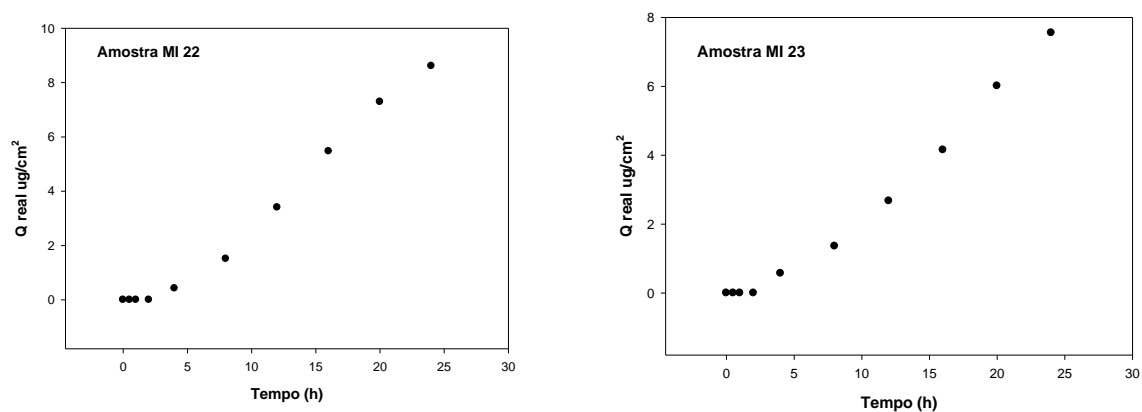
O perfil de liberação *in vitro* das amostras foi avaliado, como representado nas Figuras 21 e 22.

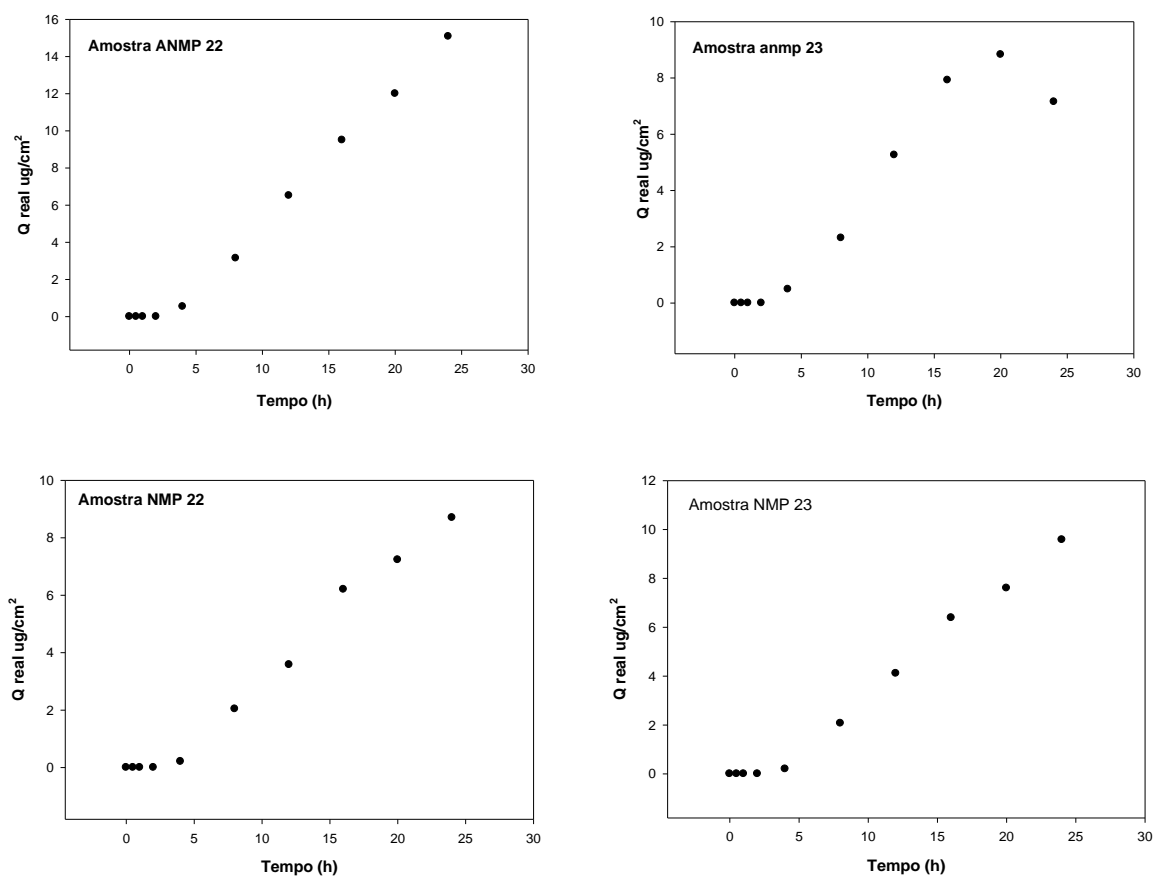
Com o estudo do perfil de liberação das formulações, foi possível avaliar o quanto de fármaco foi liberado da sua matriz. Estes resultados nos levam a entender e a relacionar o perfil às características de cada sistema, pois a liberação de um fármaco pode estar associada também ao tipo de veículo utilizado, aos componentes presentes na formulação, ao tipo de sistema e sua própria estruturação, dentre outros (COSTA; LOBO, 2001; SANTOS, 2012).

**Figura 21:** Perfil de liberação *in vitro* das formulações AO22 e AO23 contendo DXM 0,1%; experimento de 24 horas.



**Figura 22:** Perfil de liberação *in vitro* ( $Q$  real  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) das formulações MI22, MI23, ANMP22, ANMP23, NMP22 e NMP23, acrescidas de acetato de dexametasona a 0,1%, no período de 24 horas.





De maneira geral observou-se início da liberação do fármaco após 4 horas de experimento, que se manteve em escala crescente, contínua e de forma semelhante para todos os sistemas.

As formulações que apresentaram maior porcentagem de fármaco liberado foram DAO 22, DAO 23 e DANMP22, que liberaram, respectivamente, 10,57 % 9,53% e 8,89 % de fármaco. A Tabela 5 representa os valores liberados de fármaco em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  e o valor da porcentagem liberada.



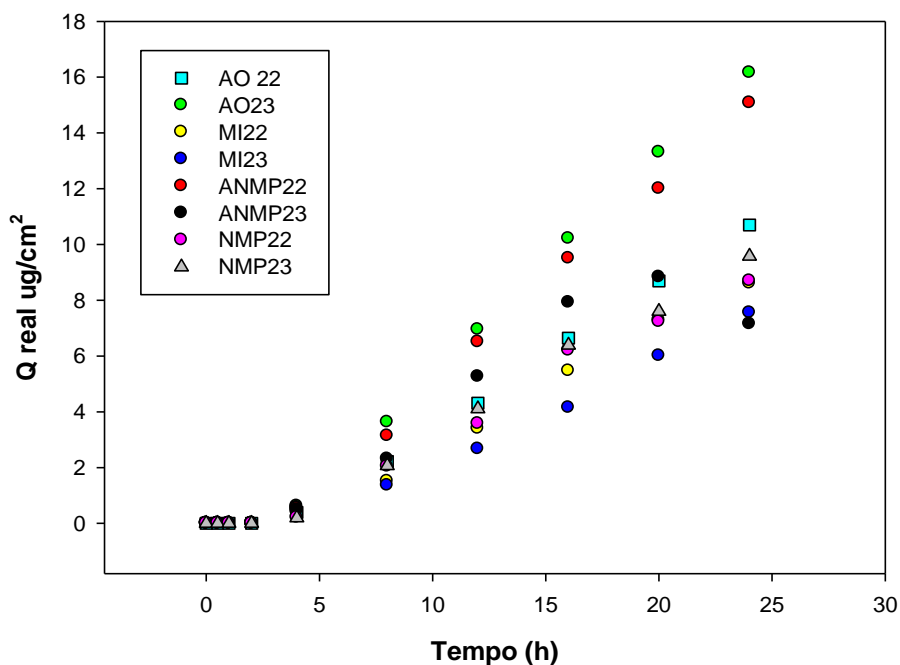
**Tabela 5:** Ensaio de liberação *in vitro*: valores de acetato de dexametasona liberado analisados em ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e em porcentagem (%), das formulações em estudo, após período de 24 horas.

<b>Amostras</b>	<b>DXM liberada (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>DXM liberada (%)</b>	<b>Cristal líquido (mesofase)</b>
<b>DAO22</b>	18,14	10,7	Lamelar
<b>DAO23</b>	16,16	9,53	Lamelar
<b>DANMP22</b>	15,08	8,89	Lamelar
<b>DANMP23</b>	7,15	4,21	Lamelar
<b>DNMP22</b>	8,70	5,13	Hexagonal
<b>DNMP23</b>	9,58	5,65	Hexagonal
<b>DMI22</b>	8,61	5,08	Hexagonal
<b>DMI23</b>	7,55	4,45	Hexagonal

Sugere-se que a presença de ácido oleico nas formulações (lamelares) favorece a liberação de DXM, notando-se valores praticamente dobrados quando comparados às formulações sem ácido oléico (hexagonais); ou seja, a liberação de acetato de dexametasona pode estar sofrendo influência da mesofase.

A Figura 23 apresenta a evolução do perfil de liberação de todas as formulações.

**Figura 23:** Perfil de liberação *in vitro* de acetato de dexametasona das amostras em estudo, no período de 24 horas.



#### 4.10.1. Avaliação do perfil de liberação de fármaco através de modelos matemáticos

O perfil de liberação de DXM *in vitro* foi analisado segundo os modelos matemáticos: Baker-Lonsdale, Primeira-Ordem, Weibull, Peppas, Higuchi e Hixon-Crowell e ajustados com o auxílio do software Sigma Plot® 10.0. A seguir uma breve descrição dos modelos matemáticos utilizados:

O modelo matemático Baker-Lonsdale (1974), foi desenvolvido a partir do modelo matemático de Higuchi, representando o perfil de liberação de fármacos de matrizes esféricas, pela seguinte equação (5):

$$\frac{3}{2} \left[ 1 - \left( 1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = K_t \quad (5)$$

onde  $M_t$  é a quantidade de fármaco liberada pelo tempo (t),  $M_\infty$  é a quantidade de fármaco liberado em um tempo infinito e k é a constante de liberação (COSTA; LOBO, 2001).

O modelo matemático de primeira ordem foi proposto inicialmente por Gibaldi e Felman (1967), e descreve que a liberação do fármaco ocorre de forma proporcional à quantidade restante em seu interior, ou seja, a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002), como mostra a equação (6):

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t \quad (6)$$

onde  $Q_t$  é a quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ,  $Q_0$  quantidade inicial e  $K_1$  a constante de liberação.

O perfil de liberação de fármacos através do modelo matemático de Hixson-Crowell considera que a velocidade de liberação limita-se à velocidade de dissolução das partículas e não pela difusão que possa ocorrer através da matriz (COSTA; LOBO, 2001), como descreve a equação (7):

$$(1 - f_t)^{1/3} = 1 - K_b t \quad (7)$$

em que  $K_b$  é constante de liberação,  $t$  = tempo e  $f$  é a fração de fármaco dissolvido (COSTA; LOBO, 2001).

O modelo matemático de Higuchi (1961, 1963), foi desenvolvido para estudar a liberação de fármacos em sistemas semi-sólidos ou sólidos, incorporados de fármacos com diferente solubilidade em água, desde baixa solubilidade até muito solúvel. A equação simplificada de Higuchi pode ser usada para diversos sistemas tais como transdérmicos e comprimidos matriciais com fármacos hidrossolúveis (MANDADAS; PINA; VEIGA, 2002; COSTA; LOBO, 2001). A equação 8 descreve o modelo de Higuchi:

$$f_t = k_h t^{1/2} \quad (8)$$

sendo,  $f_t$  a quantidade de fármaco dissolvido no tempo  $t$  e  $K_h$  a constante de Higuchi.

O perfil de liberação de fármacos através do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas (1983) é baseado na lei das Potências, onde se tem uma relação exponencial da liberação do fármaco com o tempo. Este modelo matemático tem sido usado para descrever a liberação de fármacos em sistemas contendo polímeros, quando o perfil de liberação não é bem conhecido ou quando se tem mais de um mecanismo de liberação envolvido

(MANDADAS; PINA; VEIGA, 2002). A equação 9 representa o modelo matemático de Peppas:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (9)$$

onde:  $M_t$  é a quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ,  $M_\infty$  a quantidade de fármaco liberada no tempo infinito,  $k$  constante cinética e  $n$  expoente de liberação, sendo o indicativo do mecanismo de liberação do fármaco.

O modelo matemático descrito por Weibull (equação 10) em 1951 é considerado um dos mais utilizados, pois pode ser aplicado a quase todos os tipos de liberação de fármacos (COSTA & LOBBO, 2001):

$$\frac{Mt}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b) \quad (10)$$

Na equação de Weibull  $Mt$  e  $M_\infty$  são a quantidade de fármaco cumulativa no tempo  $t$  e no tempo infinito, respectivamente;  $b$  é o parâmetro de forma e  $1/a$  o parâmetro de escala. O valor de  $b$  está associado também a caracterização da curva de liberação, sendo que  $b = 1$  caracteriza curva com liberação exponencial,  $b > 1 =$  sigmóide e  $b < 1 =$  parabólica. Ainda com relação ao mecanismo de transporte de fármacos, quando temos:  $b = 1$  ocorre liberação de primeira ordem, conforme lei de difusão de Fick;  $b \leq 0,75$  indica difusão Fickiana de caso I e a difusão Fickiana de caso II acontece quando se tem valores de  $b$  no intervalo de 0,75 a 1. Quando  $b > 1$  ocorre mecanismo complexo de liberação (PAPADOPOULOU et al., 2006).

Na Tabela 6 encontram-se os valores obtidos de  $k$ ,  $n$ ,  $r^2$  e  $b$ ; para avaliação do perfil de liberação.

**Tabela 6:** Valores de  $k$ ,  $k_1$ ,  $k_h$ ,  $k_\beta$ ,  $k_p$ ,  $n$ ,  $r^2$  e  $b$  obtidos através dos modelos matemáticos aplicados nos dados de perfil de liberação de dexametasona, para cada amostra.

(continua)

Modelo matemático	Parâmetro	DAO22	DAO23	DAONMP22	DAONMP23	DNMP22	DNMP23	DMI22	DMI23
<b>Baker</b>	<b>K</b>	0,00004	0,7749	0,00008	0,00003	0,00003	0,00003	0,00002	0,00001
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,7661	0,0001	0,7711	0,7844	0,7747	0,7720	0,7579	0,7517
<b>Primeira ordem</b>	<b>k<sub>1</sub></b>	0,0043	0,0068	0,0062	0,0040	0,0036	0,0039	0,0035	0,0029
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,9628	0,9659	0,9639	0,9077	0,9636	0,9642	0,9576	0,9544
<b>Higuchi</b>	<b>k<sub>h</sub></b>	1,5982	2,4584	2,2635	1,5078	1,3525	1,4511	1,2977	1,0823
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,7703	0,7813	0,7770	0,7874	0,7781	0,7757	0,7613	0,7545
<b>Hixon</b>	<b>k<sub>β</sub></b>	0,2014	0,0022	0,0020	0,0013	0,0012	0,0013	0,0012	0,0010
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,9644	0,9681	0,9661	0,9071	0,9646	0,9654	0,9589	0,9557

**Tabela 6:** Valores de  $k$ ,  $k_1$ ,  $k_h$ ,  $k_\beta$ ,  $k_p$ ,  $n$ ,  $r^2$  e  $b$  obtidos através dos modelos matemáticos aplicados nos dados de perfil de liberação de dexametasona, para cada amostra.

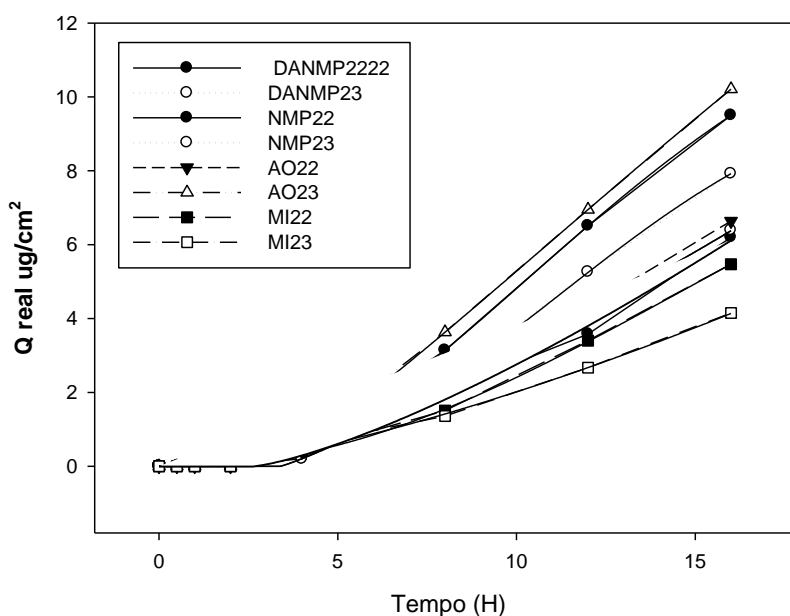
(conclusão)

Modelo matemático	Parâmetro	DAO22	DAO23	DAONMP22	DAONMP23	DNMP22	DNMP23	DMI22	DMI23
<b>Peppas</b>	<b><math>k_p</math></b>	0,0647	0,2364	0,2070	0,0643	0,0401	0,0516	0,0360	0,0520
	<b><math>r^2</math></b>	0,9964	1,0000	0,9969	0,9957	0,9948	0,9943	0,9986	0,9976
	<b>N</b>	1,6757	1,3389	1,3563	1,7435	1,8184	1,7439	1,8154	1,5808
<b>Weibull</b>	<b>K</b>	0,2500	0,5000	0,2500	0,2500	0,2500	0,2500	0,2500	0,3077
	<b><math>r^2</math></b>	1,0000	1,0000	1,0000	0,9999	0,9969	1,0000	0,9996	0,9982
	<b>B</b>	2244,27	29,5211	13,1504	13,51	1673,75	2105,69	20,1315	1046,73

Com base nos resultados obtidos a partir dos modelos matemáticos, verificou-se que o modelo de Weibull, foi o que apresentou os maiores valores de  $r^2$ , ajustado para todas as amostras, indicando que as amostras apresentaram curva de liberação do tipo sigmóide e mecanismo complexo de liberação, pois todas as amostras apresentaram valores de  $b$  maiores que 1 (PAPADOPOULOU et al., 2006). Referencia peppas retirada

A curva fitada para liberação de acetato de dexametasona a partir da equação de Weibull (Figura 24) indicou ótima correlação (valores de  $r^2$ , Tabela 6) para todas as amostras.

**Figura 24:** Ajuste matemático de Weibul para mecanismo de liberação de acetato de dexametasona em sistemas líquido-cristalinos estudados (ajustados em 60% de liberação do fármaco).



#### 4.10.2. Estudo de permeação e retenção cutânea

No sentido de avaliar as interações de cada formulação com a pele, os estudos de permeação e retenção cutânea foram realizados, com 0,1% de acetato de dexametasona permitindo avaliar como se dá a difusão do fármaco nas diferentes camadas da pele; analisar a

penetração do fármaco, retenção ou não no estrato córneo distribuição nas diferentes camadas da pele (epiderme e derme).

Os resultados obtidos nos estudo permeação não demonstraram indícios de fármaco permeado em nenhum intervalo de tempo e este comportamento foi igual pra todas as formulações. Foram observadas diferenças nos valores obtidos entre as amostras no estudo de retenção no estrato córneo e na epiderme e derme. Os resultados obtidos estão listados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Quantidade de DXM retido no estrato córneo e nas diferentes camadas da pele: (epiderme + derme), após 24 horas.

<b>Amostras</b>	<b>DXM retido no estrato córneo (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>DXM retido na epiderme + derme (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>
<b>DAO22</b>	12,28	11,75
<b>DAO23</b>	0,84	0,00
<b>DANMP22</b>	1,57	0,28
<b>DANMP23</b>	0,00	1,41
<b>DNMP22</b>	0,85	0,00
<b>DNMP23</b>	0,00	0,75
<b>DMI22</b>	1,53	0,00
<b>DMI23</b>	0,00	0,00

Com o estudo de retenção cutânea, observou-se que para as amostras DAO23, DNMP22 e DMI22 o fármaco não foi capaz de atravessar a principal barreira cutânea, o estrato córneo, ou seja, estes sistemas não foram capazes de induzir alterações estruturais nos lipídeos do estrato córneo, que por muitas vezes acontecem através de interações eletrostáticas entre a pele e o sistema, os quais determinam a permeabilidade (PEIRA et al., 2014).

Uma observação importante foi feita em relação ao sistema DAO22. Este foi o que apresentou o maior valor de liberação de fármaco e também o que mais reteve no estrato

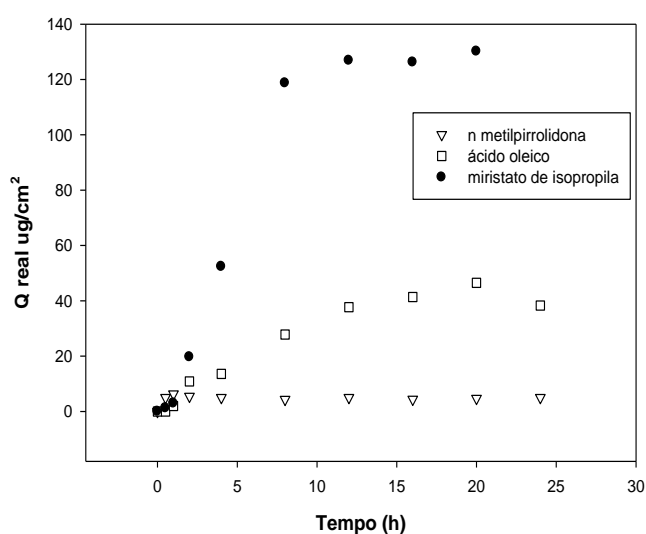


córneo e na epiderme e derme, ou seja, quanto maior a liberação de fármaco, maior a quantidade de fármaco retido no estrato córneo e a maior quantidade que pode chegar até a epiderme e derme. Comportamento semelhante aconteceu nos estudos realizados por ANDRADE et al. (2014), que avaliaram a liberação de genisteína em nanopartículas lipídicas sólidas para o tratamento de câncer de pele e avaliaram que estes sistemas aumentam a retenção do fármaco na pele.

Entende-se que os sistemas associados a diferentes tipos de fase oleosa podem atravessar ou não o estrato córneo e alcançar as demais camadas da pele, mas estes sistemas não são capazes de atingir a corrente sanguínea.

Para verificar se o próprio sistema estava interferindo na permeação do fármaco, um estudo de permeação foi realizado para a DXM solubilizada nos diferentes promotores químicos de permeação - ácido oleico, miristato de isopropila e N metil pirrolidona (MARTINS; VEIGA, 2002; JUNG et al., 2013). Na Figura 25 encontra-se o perfil de permeação realizado em cada fase oleosa.

**Figura 25:** Perfil de permeação cutânea nas diferentes fases oleosas: ácido oléico, miristato de isopropila e N metil pirrolidona, acrescido de acetato de dexametasona 0,1%; após 24 horas de experimento.



Quando realizado o estudo de permeação para a DXM solubilizada nos diferentes promotores de permeação, observou-se que o miristato de isopropila foi o que apresentou maior quantidade de fármaco permeado, ou seja, o miristato de isopropila foi capaz de induzir alterações estruturais, reduzindo a ordem intermolecular dos lipídeos e alterando a forma do seu empacotamento no estrato córneo, sendo considerado um bom promotor de permeabilidade (PEIRA et al., 2014); porém, tal comportamento não foi observado quando incorporado miristato de isopropila às formulações, pois não ocorreu permeação em nenhuma formulação contendo miristato de isopropila, e para a formulação MI22, o fármaco ficou retido no estrato córneo.

Sugere-se que a própria formulação promova fracas interações com a pele à ponto de não conseguir ultrapassar o estrato córneo, tampouco alcançar epiderme e derme. Os valores obtidos do estudo de permeação e de retenção cutânea foram descritos na Tabela 8.

**Tabela 8:** Valores obtidos do estudo de permeação e retenção cutânea, realizados nas diferentes fases oleosas: ácido oléico, N metil pirrolidona e miristato de isopropila; acrescido de dexametasona 0,1%; após 24 horas de experimento.

<b>Fase oleosa</b>	<b>DXM retido no estrato córneo (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>DXM retido na epiderme + derme (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>DXM permeado (solução receptora) (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>
<b>ácido oléico</b>	1,64	0,0	38,28
<b>N metil pirrolidona</b>	0,4	0,74	5,06
<b>miristato de isopropila</b>	2,44	0,96	130,13

Observa-se com os resultados obtidos, que as fases oleosas, considerados promotores químicos (FANG, et al., 1999; YERRAMSETTY et al., 2010), têm sim a ação de promover a permeação cutânea, podendo romper a barreira do estrato córneo, atravessar epiderme e derme e alcançar a circulação sistêmica; sendo atribuída maior ação promotora ao miristato de

isopropila. Estes estudos realizados por Jung et al. (2013) para liberação transdérmica de fluoxetina corroboram com esta pesquisa.

Embora as fases oleosas promovam a permeação, não foi observada tal ação quando incorporados aos sistemas líquidos cristalinos. Notou-se que miristato de isopropila foi o que apresentou maior valor de fármaco permeado na solução receptora, e mesmo com características elevadas para promotor de permeação, quando incorporado ao sistema líquido cristalino DMI22 e DMI23 para o ensaio de permeação cutânea, não houve vestígios de fármaco na solução receptora e tampouco na epiderme e derme. Pode-se sugerir também, que estes sistemas (DMI22, DMI23, DNMP22 e DNMP23) não conseguiram alcançar as camadas da pele: epiderme e derme, devido às características reduzidas de força de bioadesão quando comparados aos demais sistemas acrescidos de ácido oleico.

Assim, explorando um pouco mais as estratégias para modular a permeação cutânea do fármaco, fizemos uso de promotores físicos de permeação utilizando a técnica da iontoforese; a qual tem sido empregada por vários pesquisadores; para aumentar a liberação de fármacos no estrato córneo. Carr; Corish e Corrigan (1997) pesquisaram o uso da iontoforese associada a cristais líquidos liotrópicos contendo nicotina e salbutamol para verificar a liberação dos fármacos através do estrato córneo; o estudo concluiu que ocorreu aumento significativo do transporte dos fármacos através do estrato córneo.

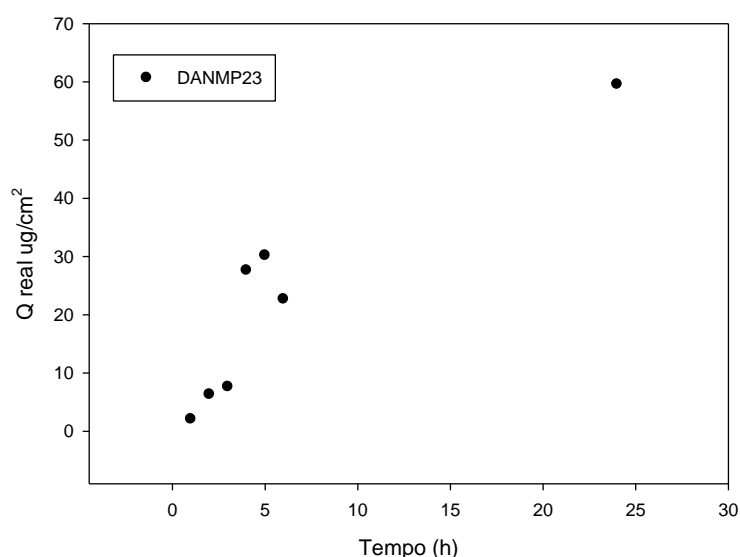
#### **4.10.3. Estudo de permeação e retenção cutânea associado à técnica de iontoforese**

Os estudos de iontoforese forneceram dados interessantes sobre a permeação cutânea, sendo que apenas para uma formulação (DANMP23) foi identificada a presença de fármaco na solução receptora.

O fato de identificar o fármaco na solução receptora apenas na formulação DANMP23 pode ser explicado pela associação de ácido oleico e N metil pirrolidona, por possuir características específicas capazes de desestabilizar a barreira do estrato córneo e permitir aprofundamento de dexametasona nas diferentes camadas da pele, até alcançar a corrente sanguínea (solução receptora). Estes dados corroboram as características de bioadesão da formulação DANMP23, sendo que as formulações mais bioadesivas foram as que continham

ácido oléico ou associação de ácido oleico e N metil pirrolidona. A Figura 26 mostra o perfil de permeação cutânea de DXM realizado em pele de porco, com associação da iontoforese nas primeiras seis horas.

**Figura 26:** Perfil de permeação cutânea de DXM (0,1%) incorporada na formulação DANMP23 associada à aplicação de iontoforese nas primeiras 6 horas, intervalo de tempo restante sendo ensaio apenas com difusão passiva com duração total de 24 horas.



Nota-se que após cessar a corrente elétrica aplicada (6 horas), a taxa de fluxo de fármaco por difusão passiva diminuiu gradativamente, estabilizando o fluxo em  $J=1,47 \mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$  e coeficiente de permeabilidade  $K_p= 0,004\text{cm}^2/\text{h}$  até o término do experimento de 24 horas; com esse resultado, foi possível comparar os dados com o estudo de permeação cutânea (difusão passiva) realizado anteriormente (sem aplicação da corrente elétrica), no qual não ocorreu permeação de fármaco na solução receptora para nenhuma formulação. Desta forma sugere-se que o uso da iontoforese impulsiona o fluxo de permeação de fármacos mesmo após o término da corrente elétrica, dando continuidade na difusão passiva, porém em níveis reduzidos.

Na tabela 9, encontram-se os valores da taxa de fluxo de fármaco para difusão com iontoforese e de difusão passiva após a aplicação da iontoforese.

**Tabela 9:** Fluxo de acetato de dexametasona ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nas primeiras 6 horas de ensaio de permeação cutânea com o uso da iontoforese e difusão passiva no intervalo entre 6-24 h de experimento.

<b>Amostras</b>	<b>Fluxo (J) de DXM entre 0-6 horas de iontoforese (<math>\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2</math>) e coeficiente de permeabilidade <math>K_p(\text{cm}^2/\text{h})</math></b>	<b>Fluxo (J) de DXM no intervalo de tempo de 6 à 24 horas de experimento por difusão passiva (<math>\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2</math>)</b>
<b>AO22</b>	-	-
<b>AO23</b>	-	-
<b>ANMP22</b>	-	-
<b>ANMP23</b>	J = 5,07 ; $K_p = 0,036$	J = 1,47; $K_p = 0,004$
<b>NMP22</b>	-	-
<b>NMP23</b>	-	-
<b>MI22</b>	-	-
<b>MI23</b>	-	-

O estudo de permeação cutânea com associação da iontoforese quando comparado com o ensaio de permeação cutânea apenas por difusão passiva, mostra que menor quantidade de fármaco ficou retida no estrato córneo quando associado à iontoforese; neste sentido, sugere-se que a iontoforese facilita o transporte de fármacos através do estrato córneo e também na epiderme e derme; porém, o fármaco não alcança a corrente sanguínea tão facilmente, sendo notada a presença de fármaco na solução receptora apenas para uma formulação (DANMP23). Na Tabela 10 encontram-se as quantidades de acetato de dexametasona retidas no estrato córneo e na epiderme e derme, nos experimentos com e sem aplicação de iontoforese.

**Tabela 10:** Quantidade de acetato de dexametasona retido no estrato córneo e nas demais camadas da pele: (epiderme + derme) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), com e sem iontoforese no ensaio de permeação cutânea, em pele de orelha de porco e respectiva caracterização estrutural dos cristais líquidos, após 24 horas de experimento.

<b>Amostras</b>	<b>DXM retido no estrato córneo <math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math> (difusão passiva)</b>	<b>DXM retido no estrato córneo <math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math> (iontoforese)</b>	<b>DXM retido na epiderme + derme (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>) (difusão passiva)</b>	<b>DXM retido na epiderme + derme (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>) (iontoforese)</b>	<b>DXM permeada (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>) (iontoforese)</b>	<b>Mesofase</b>
<b>AO22</b>	12,28	0,08	11,75	0,06	-	Hexagonal
<b>AO23</b>	0,84	0,47	0,00	0,04	-	Lamelar
<b>ANMP22</b>	1,57	0,68	0,28	0,03	-	Lamelar
<b>ANMP23</b>	0,00	0,15	1,41	0,17	59,56	Lamelar
<b>NMP22</b>	0,85	0,00	0,00	0,00	-	Hexagonal
<b>NMP23</b>	0,00	0,00	0,75	0,00	-	Hexagonal
<b>MI22</b>	1,53	1,53	0,00	0,09	-	Hexagonal
<b>MI23</b>	0,00	0,05	0,00	0,03	-	Hexagonal

#### 4.11. Estudo *in vivo*

O ensaio *in vivo* foi realizado após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

##### 4.11.1. Avaliação da atividade anti nociceptiva – ensaio de pressão de pata de Randall-Sellito

A eficácia anti nociceptiva foi avaliada empregando-se o teste de pressão da pata em camundongos, sendo inicialmente medido o limiar da dor basal, antes da administração de carragenina e das formulações.

A inflamação foi induzida através da injeção de carragenina a 1%, na região intraplantar da pata esquerda traseira.; após uma hora da administração de carragenina, foram medidos o limiar da dor e anotados os resultados para cada grupo. Logo em seguida, foram tratados com as formulações em estudo acrescidas de acetato de dexametasona exceto para o grupo controle. A força (g) aplicada na superfície dorsal da pata inflamada foi determinada a partir do mínimo peso (g) que causou a retirada da pata do animal do aparelho analgesímetro (KANG et al., 2010). A Figura 27 representa a imagem do ensaio de pressão de pata Randall-Sellito.

**Figura 27:** Ensaio de pressão de pata Randall Sellito, aplicação da força mecânica (g) sobre a região dorsal da pata esquerda traseira do camundongo (n = 7).

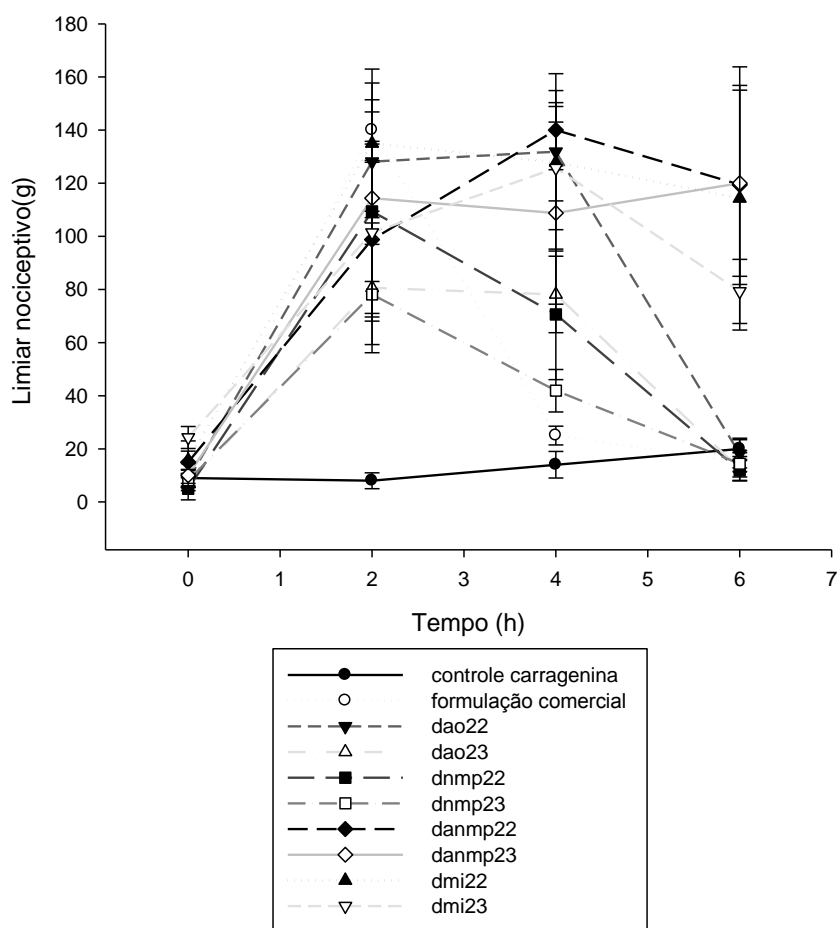


Os tratamentos feitos com a formulação comercial ou com as demais formulações em estudo registraram eficácia antinociceptiva similar e diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) no intervalo de tempo de 2 horas; no intervalo de 4 horas foi possível observar que a formulação comercial apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) da eficácia anti nociceptiva, chegando a valores similares ao do grupo controle não tratado. Os grupos tratados com as formulações DAO22, DAO23, DNMP22 e DNMP23 apresentaram redução na eficácia anti nociceptiva no intervalo de 6 horas, com valores similares ao do grupo controle.

As amostras que apresentaram melhor eficácia anti nociceptiva foram dos grupos tratados com as formulações DANMP22 e DANMP23 (sistemas lamelares), MI22 e MI23 (sistemas hexagonais) apresentaram prolongamento da ação do fármaco, sendo observados neste último intervalo de tempo (6 horas) valores do limiar nociceptivo ainda bastante elevados, resultando em formulações mais efetivas que a formulação comercial, quando avaliados no intervalo de tempo de 4 a 6 horas (Figura 28).



**Figura 28:** Efeito dos tratamentos com acetato de dexametasona incorporados nas diferentes formulações e em variados tempos, no estudo de hiperalgesia mecânica – teste de pressão de pata Randall-Sellito (pressão da pata (g)/tempo(h)).



O estudo em que se aplica uma força mecânica, tal que a pressão exercida sobre a região dorsal da pata, causa dor no animal, tem grande importância na área de pesquisa, sendo avaliado através do teste nociceptivo, onde se tem um reflexo do estímulo nocivo (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Na Tabela 11, encontram-se os resultados obtidos no teste de pressão de pata – Randall & Sellito.

**Tabela 11:** Resultados obtidos no teste de pressão de pata - Randall & Sellito com os valores do limiar nociceptivo (g), tempo (h), desvio padrão (DP) e média dos grupos.

	Grupos								Fórmula comercial	Controle carragenina
	AO22	AO23	ANMP22	ANMP23	NMP22	NMP23	MI22	MI23		
<b>t (2h)</b>										
<b>Média</b>	128	80	98	114	109	78	135	101	136	8
<b>DP</b>	18	30	29,1	43,3	26	18	27,9	33,3	11,4	3
<b>t (4h)</b>										
<b>Média</b>	131	78	140	108	70	41	127	125	20	14
<b>DP</b>	18	14	14,8	34,3	24	7,9	33,3	23,2	3,53	5
<b>t(6h)</b>										
<b>Média</b>	18	12	119	120	11	14	114	79	15	20
<b>DP</b>	5,3	4,6	37,4	35,0	3,7	4,9	49,5	12,0	3,53	4

A formulação DANMP22 apresentou melhor eficácia anti nociceptiva. Sugere-se que este resultado se deve a este sistema apresentar em sua composição a associação de ácido oleico e N metil pirrolidona, pois estes foram os sistemas que apresentaram melhores propriedades bioadesivas, podendo assim permanecer por mais tempo em contato com a pele, favorecendo a absorção do fármaco.

Podemos sugerir que o DXM incorporado em um veículo nanoestruturado como os cristais líquidos é mais efetivo que a formulação comercial (emulsão), os sistemas foram capazes de aumentar a eficácia terapêutica do fármaco, prolongando seu tempo de ação e aumentando seu efeito anti nociceptivo, podendo ser administradas doses reduzidas com minimização de possíveis efeitos colaterais.

## 5. CONCLUSÃO

Com o uso do diagrama de fases foi possível delimitar as regiões formadas por cristais líquidos e assim escolher os pontos de estudo.

Através da microscopia de luz polarizada, nos pontos selecionados na região dos 40% de tensoativo no diagrama de fases, compreendendo a região dos cristais líquidos; registrou-se a presença de estruturas de fase lamelar e hexagonal, permitindo escolher as formulações AO22, AO23, ANMP22, ANMP23, NMP22, NMP23, MI22 e MI23 descritas neste trabalho.

Nos estudos reológicos as formulações apresentaram-se como sistemas bem estruturados, com fortes ligações entre as moléculas, sendo predominante o módulo de armazenamento ( $G'$ ) e a presença do fármaco não alterou a estrutura dos sistemas.

O ensaio de perfil de textura demonstrou que as amostras NMP22, NMP23, MI22 e MI23 apresentaram maiores valores de adesividade, porém as amostras com valores elevados de adesividade não necessariamente foram as mais bioadesivas, sendo atribuída a qualidade de mais bioadesiva para as amostras contendo ácido oléico.

Nos resultados de SAXS pelos valores de espalhamento do vetor  $q$ , correspondentes aos picos plotados, revelou-se periodicidade referente a mesofases hexagonais e lamelares. As utilizações de técnicas diferentes e complementares (MLP e SAXS) foram fundamentais na identificação estrutural dos sistemas.

No estudo de perfil de liberação, a amostra AO22 foi a que apresentou maior quantidade de fármaco liberada, porém ela não foi capaz de promover a permeação cutânea, mas conseguiu atravessar o estrato córneo e alcançar as camadas da epiderme e derme, onde ficam localizados os receptores de dexametasona.

O ensaio de permeação cutânea com aplicação da corrente elétrica (iontoforese) foi capaz de impulsionar o fluxo de permeação do fármaco, significativamente quando comparado com ensaio feito apenas por difusão passiva.

O estudo *in vivo* com o teste de Randall & Selitto demonstrou que os cristais líquidos são veículos promissores para administração cutânea de acetato de dexametasona, levando a

maior eficácia anti nociceptiva em relação a formulação comercial genérica de acetato de dexametasona (0,1%).

Os resultados sugerem que é possível modular a permeação cutânea da DXM incorporada a sistemas líquido-cristalinos, acrescidos de promotores químicos de permeação e empregando-se a iontoforese.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **J. Control. Release.**, Saint Paul, USA, v. 164, n. 1, p. 26-40, nov. 2012.

ALLPORT-SETTLE, M. J. (Ed.). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). In: \_\_\_\_\_. **International Conference on Harmonisation (ICH) Quality Guidelines: pharmaceutical, biologics, and medical device guidance documents - concise reference**. Willow Springs, NC: PharmaLogika, 2010, p.105-125.

**AME - Dicionário de Administração de Medicamentos na Enfermagem**. 3. ed. Rio de Janeiro: EPUB, 2002.

AMORIM, A. A. P. O. **Caracterização reológica da mistura de Carboximetilcelulose com amido de milho e avaliação da microestrutura para estudo de viabilidade em aplicações tecnológicas**. 2012. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Polímeros) - Centro Universitário da Zona Oeste UEZO, Rio de Janeiro, 2012.

ANDRADE, L. M. et al. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 88, n. 1, p. 40-47, Sep. 2014.

ASHTON, P.; HADGRAFT, J.; STEVENS, J. Some effects of a non-ionic surfactant on topical availability. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 38, n. S12, p. 70P, Dec. 1986.

BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 85-97, Dec. 1987.

BASKETTER, D. A. et al. Strong Irritants Masquerading As Skin Allergens: The Case Of Benzalkonium Chloride. **Contact Dermat.**, Copenhagen, v. 50, n. 4, p. 213-217, Apr. 2004.

BENITA, S. (Ed.). **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2nd. ed. New York: Taylor and Francis, 2006. 756 p. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 158).

BENTLEY, M. V. et al. Characterization of the influence of some cyclodextrin on the stratum corneum from hairless mouse. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 49, n. 4, p. 397-402, Apr. 1997.

- BHARDWAJ, U.; BURGESS, D. J. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 388, n. 1-2, p. 181-189, Mar. 2010.
- BOUNOURE, F. et al. Effect of iontophoresis and penetration enhancer on transdermal absorption of metopimazine. **J. Dermatol. Sci.**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 170-177, Dec. 2008.
- BRAND, D. D. Rodent models of rheumatoid arthritis. **Comp. Med.**, Memphis, v. 55, n. 2, p. 114-122, Apr. 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos: cosméticos**. Brasília, 2004. (Série Qualidade em Cosméticos, v. 1).
- CARR, M. G.; CORISH, J.; CORRIGAN, O. I. Drug delivery from a liquid crystalline base across Visking and human stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 157, n. 1, p. 35-42, Nov. 1997.
- CÁZARES-DELGADILLO, J. et al. Controlled transdermal iontophoresis for poly-pharmacotherapy: simultaneous delivery of granisetron, metoclopramide and dexamethasone sodium phosphate *in vitro* and *in vivo*. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 85, p. 31-38, Mar. 2016.
- CÁZARES-DELGADILLO, J. et al. Transdermal iontophoresis of dexamethasone sodium phosphate *in vitro* and *in vivo*: effect of experimental parameters and skin type on drug stability and transport kinetics. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 75, n. 2, p. 173-178, Jun. 2010.
- CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 141, n. 3, p. 277-299, Feb. 2010.
- CHORILLI, M. et al. Structural characterization and *in vivo* evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids Surf. B.**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 182-188, Jul. 2011.
- CHOUHAN, P.; SAINI, T. R. Hydration of nail plate: a novel screening model for transungual drug permeation enhancers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, NL, v. 436, n. 1-2, p. 179-182, Oct. 2012.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 123-133, May. 2001.

DINU, M. V. et al. Comparative rheological study of ionic semi-IPN composite hydrogels based on polyacrylamide and dextran sulphate and of polyacrylamide hydrogels. **Colloid Polym. Sci.**, Darmstadt, DE, v. 290, n. 16, p. 1647-1657, Nov. 2012.

DJABRI, A.; GUY, R. H.; DELGADO-CHARRO, M. B.; Transdermal iontophoresis of ranitidine: an opportunity in paediatric drug therapy. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 435, n. 1, p. 27-32, Oct. 2012.

DOSTAL, G. H.; GAMELLI, R. L. The differential effect of corticosteroids on wound disruption strength in mice. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 125, n. 5, p. 636-640, May. 1990.

ELJARRAT-BINSTOCK, E. et al. Transcorneal and transscleral iontophoresis of dexamethasone phosphate using drug loaded hydrogel. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 386-390, Sep. 2005.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K. L. (Ed.). **Handbook of Microemulsion Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 1999. cap. 7, p. 185-246.

FANG, J. Y. et al. Effect of low frequency ultrasound on the *in vitro* percutaneous absorption of clobetasol 17-propionato. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 191, n. 1, p. 33-42, Nov. 1999.

FASOLIN, L. H.; SANTANA, R. C.; CUNHA, R. L.; Influence of organic acids on surfactant self-assemblies in surfactant/oil/water systems. **Colloids Surf.**, Amsterdam, v. 459, p.290-297, Oct. 2014.

FASOLIN, L. H.; SANTANA, R. C.; CUNHA, R. L.; Microemulsions and liquid crystalline formulated with triacylglycerols: Effect of ethanol and oil unsaturation. **Colloids Surf.**, Amsterdam, v. 415, p. 31-40, Dec. 2012.

FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba e copaíba**. 1998. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

FOLDVARI, M. et al. Dermal and transdermal delivery of protein pharmaceuticals: lipid-based delivery systems for interferon  $\alpha$ . **Biotechnol. Appl. Biochem.**, San Diego, v. 30, pt. 2, p.129-137, Oct. 1999.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 301-313, Sep. 2005.



- GHOSH, S. Comparative studies on brij reverse micelles prepared in benzene/surfactant/ethylammonium nitrate systems: effect of head group size and polarity of the hydrocarbon chain. **J. Colloid. Interf. Sci.**, New York, v. 360, n. 2, p. 672-680, Aug. 2011.
- GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 59, n. 11, p. 1152-1161, Sep. 2007.
- GREEN, P.G. et al. Iontophoretic delivery of amino acids and amino acids derivatives across the skin *in vitro*. **Pharm. Res.**, v. 8, n. 9, p.1113 -11120, Sep. 1991.
- GUO, C. et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discov. Today**, Oxford, v. 15, n. 23-24, p. 1032-1040, Dec. 2010.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 224, n. 1-2, p. 1-18, Aug. 2001.
- HIGUCHI, W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 51, n. 8, p. 802-804, Aug. 1962
- HOLMQVIST, P.; PEH, K. K.; AL-HANBALI, B. Modification of the microstructure in poloxamer block copolymer-water-“oil” systems by varying the “oil” type. **Macromolecules**, Washington, v. 30, n. 22, p. 6788–6797, Nov. 1997.
- HUGHES, J.; RUSTIN, M. Corticosteroids. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 715-721, Sep. 1997.
- JIN, S. G. et al. Mechanical properties, skin permeation and in vivo evaluations of dexibuprofen-loaded emulsion gel for topical delivery. **Arch. Pharm. Res.**, Seoul, v. 38, n. 2, p. 216-222, Feb. 2015.
- JUNG, E. et al. Effect of permeation enhancers on transdermal delivery of fluoxetine: in vitro and in vivo evaluation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 456, n. 2, p. 362-369, Nov. 2013.
- KALIA, Y. N. et al. Iontophoretic drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 56, n. 5, p. 619-658, Mar. 2004.
- KANG, M. et al. The analgesic and anti-inflammatory effect of WIN-34B, a new herbal formula for osteoarthritis composed of *Lonicera japonica* Thunb and *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE in vivo. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick , USA, v. 131, n. 2, p. 485–496, Sep. 2010.

- KARANDE, P., JAIN, A., MITRAGOTRI, S. Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening. **Nat. Biotechnol.**, New York, v. 22, n. 2, p.192-197, Feb. 2004.
- KNUDSEN, N. O. et al. Targeting of liposome-associated calcipotriol to the skin: effect of liposomal membrane fluidity and skin barrier integrity. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 416, n. 2, p. 478-485, Sep. 2011.
- KOFFI, A. A. et al. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 328-335, Mar. 2006.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 54, supl. 1, p. S77-S98, Nov. 2002.
- KUMAR, S. et al. Peptides as skin penetration enhancers: Mechanisms of action. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 199, p. 168-178, Feb. 2015.
- LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 447, n. 1-2, p. 12-21, Apr. 2013.
- LARRUCEA, E. et al. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 52, n. 2, p.113-119, Sep. 2001.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.** Baltimore, v. 53, n. 4, p. 597-652, Dec. 2001.
- LEE, K. W. et al. of liquid crystalline matrix determines in vitro sustained release and in vivo oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 365, n. 1-2, p. 190-199, Jan. 2009.
- LEHMANN, L.; KEIPERT, S.; GLOOR, M. Effects of microemulsion on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Baltimore, v. 52, n. 2, p. 129-136, Sep. 2001.
- LEONARDI, G.R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Study of pH variation on the skin using cosmetic formulations with and without vitamins A, E or ceramide: by a non-invasive method. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 563-569, set/out. 2002.
- LUCENA, I. L et al. Characterization of nonionic surfactant micellar structures in organic solvents by small angle X-ray scattering (SAXS). **Colloids Surf.**, Amsterdam, v. 408, p. 48-56, Aug. 2012.

MACHET, L.; BOUCAUD, A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 243, n. 1-2, p. 1-15, Aug. 2002.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: “La Raison d’etre” of the epidermis. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 121, n. 2, p. 231-241, Aug. 2003.

MAIA, C. S.; MEHNERT, W.; SCHÄFER-KORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 196, n. 2, p. 165-167, Mar. 2000.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 375-399, Oct/Dec. 2002.

MARKS, R.; BARLOW, V. J.; FUNDER, V. Steroid-induced vasoconstriction: glucocorticoid antagonist studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, v. 54, n. 5, p. 1075-1077, May. 1982.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 33-54, Jan/Mar. 2002.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofiaginóide (celulite)**. 2006. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MUKHERJEE, P. K. Isotropic micellar to tilted lamellar phase transition in lyotropic liquid crystals. **J. Mol. Liq.**, v. 187, p. 90-93, Nov. 2013.

MULLER-GOYMANN, C. C.; FRANK, S. G. Interaction of lidocaine and lidocaine-HCl with the liquid crystal structure of topical preparations. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 29, n. 2-3, p. 147-159, Apr. 1986.

NAIR, V. B.; PANCHAGNULA, R. Effect of iontophoresis and fatty acids on permeation of Arginine Vasopressin through rat skin. **Pharmacol. Res.**, London, v. 47, n. 6, p. 563-569, Jun. 2003.

NESSEEM, D. I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 387-399, Oct. 2001.

ONGPIPATTANAKUL, B. et al. Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. **Pharm. Res.**, New York, v. 8, n. 3, p. 350-354, Mar. 1991.

OWENS, D. R., ZINMAN, B., BOLLI, R. Alternative routes for insuline delivery. **Diabet. Med.**, Chichester, v. 20, n. 11, p. 886-898, Nov. 2003.

OYAFUSO, M. H. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas micro e nanoestruturados para a administração cutânea de acetato de dexametasona**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

OYAFUSO, M. H. et al Design and Characterization of Silicone and Surfactant Based Systems for Topical Drug Delivery. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, Stevenson Ranch, USA, v. 15, n. 1, p. 1-10, Jan. 2015.

PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 309, n. 1-2, p.44–50, Feb. 2006.

PEIRA, E. et al. The influence of surface charge and photo-reactivity on skin-permeation enhancer property of nano-TiO<sub>2</sub> in ex vivo pig skin model under indoor light. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 467, n. 1-2, p. 90-99, Jun. 2014.

PILLAI, O., NAIR, V., PACHAGNULA, R. Transdermal iontophoresis of insulin: IV. Influence of chemical enhancers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 269, n. 1, p. 109-120, Jan. 2004.

PONEC, M.; KEMPENAAR, J. A.; DE KLOET, E. R. Corticoids and cultured human epidermal keratinocytes: specific intracellular binding and clinical efficacy, **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 76, n. 3, p. 211–214, Mar. 1981.

PRAUSNITZ, M. R., MITRAGOTRI, S., LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Rev. Drug Discov.**, London, v. 3, n. 2, p. 115-124, Feb. 2004.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of foscan/nanoemulsion (NE) applicable to PDT skin cancer treatment. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, Stevenson Ranch, USA, v. 8, n. 1, p. 340-347, Fev. 2008.

RAMAN, I. A.; SUHAIMI, H.; TIDDY, G. J. T. Liquid crystals and microemulsions formed by mixtures of a non-ionic surfactant with palm oil and its derivatives. **Adv. Colloid Interface Sci.**, Amsterdam, v. 106, n. 1-3, p. 109-127, Dec. 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 713 p. ISBN: 85-277-0609-1.

REN, C. et al. Effect of permeation enhancers and organic acids on the skin permeation of indapamide. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 350, n. 1-2, p. 43-47, Feb. 2008.

REYNOLDS, P. A.; HENDERSON, M. J.; WHITE, J. W. A small angle neutron scattering study of the interface between solids and oil-continuous emulsions and oil-based microemulsions. **Colloid. Surf.**, Amsterdam, v. 232, n. 1, p. 55-65, Jan. 2004.

ROSA, F. S. et al. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 261-269, Apr. 2003.

SALMAZI, R. et al. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **Int. J. Nanomed.**, Auckland, v. 10, p. 4815-4824, Jun. 2015.

SANTOS, G. J. F. L. **Ensaio de Dissolução das Formas Farmacêuticas: aplicações na investigação científica e na indústria farmacêutica**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

SARVAIYA, J. I.; KAPSE, G. K.; TANK, C. J. Iontophoresis of micellar composition of Lovastatin: study of affecting factors and in-vitro permeation. **J. Pharm. Res.**, v. 7, n. 4, p. 327-330, Apr. 2013.

SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H. B. Rheological properties of binary and ternary protein-polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, GB, v. 48, n. 2, p. 263-270, Mar. 2011.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotropic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogues; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11 ed. New York: McGraw-Hill, 2006. p. 1587-1612.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006. 232 p. ISBN 8588098342.

SENYIGIT, T. et al. Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for itopical use: in vitro and in vivo evaluation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 403, n. 1-2, p. 123-129, Jan. 2011.

SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 47, n. 2-3, p. 229-250, Apr. 2001.

SINGH, S.; KUMAR, S. Numerical study on triple layer skin tissue freezing using dual phase lag bio-heat model. **Int. J. Therm. Sci.**, v. 86, p. 12-20, Dec. 2014.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 95, n. 2, p. 173-183, Mar. 2004.

SMYTH, H., BECKET, G., MEHTA, S. Effect of permeation enhancer pretreatment on the iontophoresis of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) through human epidermal membrane (HEM). **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 91, n. 5, p. 1296-1307, May. 2002.

SPICLIN, P. et al. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 256, n. 1-2, p. 65-73, Apr. 2003.

TAKEUCHI, H. et al. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 57, n. 11, p. 1583-1594, Nov. 2005.

TAN, Y. T. F.; PEH, K. K.; AL-HANBALI, O. Effect of Carbopol and polyvinylpyrrolidone on the mechanical, rheological, and release properties of bioadhesive polyethylene glycol gels. **AAPS PharmSciTech.**, Arlington, USA, v. 1, n. 3, p. 69-78, Sep. 2000.

TÖRMÄ, H.; LINDBERG, M.; BERNE, B. Skin barrier disruption by sodium lauryl sulfate-exposure alters the expressions of involucrin, transglutaminase 1, profilaggrin, and kallikreins during the repair phase in human skin in vivo. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 128, n. 5, p. 1212-1219, Mai. 2008.

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. 2004. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2004.

VÁVROVÁ, K.; ZBYTOVSKÁ, J.; HRABÁLEK, A. Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. **Curr. Med. Chem.**, Schiphol, NL, v. 12, n. 19, p. 2273-2291, 2005.

WALTERS, K. A. Penetration enhancers and their use in transdermal therapeutic systems. In: HADGRAFT, J., GUY, R. H. **Transdermal drug delivery: developmental issues and research initiatives**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 197-246.

WANG, Y. et al. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 60, n. 2, p. 179-191, Jul. 2005.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 68, n. 3, p. 453-466, Mar. 2008.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 56, n. 5, p. 603-618, Mar. 2004.

YARIV, D. et al. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids Surf. B.**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 185-192, Jul. 2010.

YERRAMSETTY, K. M. et al. Effect of different enhancers on the transdermal permeation of insulin analog. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 398, n. 1-2, p. 83-92, Oct. 2010.

ZHANG, J. et al. Lyotropic liquid crystalline phases formed in ternary mixtures of 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide/*p*-xylene/water: A SAXS, POM, and rheology study. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 321, n. 1, p. 159-165, May. 2008.