



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

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
PARA POTENCIAL
ADMINISTRAÇÃO NASAL DE ZIDOVUDINA

FLÁVIA CHIVA CARVALHO



ARARAQUARA

2009

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

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS
NANOESTRUTURADOS PARA POTENCIAL ADMINISTRAÇÃO
NASAL DE ZIDOVUDINA

FLÁVIA CHIVA CARVALHO

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

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

C331d Carvalho, Flávia Chiva
Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. / Flávia Chiva Carvalho. – Araraquara, 2009.
143 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião
Coorientador: Victor Hugo Vitorino Sarmento

1.AIDS. 2.Zidovudina. 3.Mucoadesão. 4.Tecnologia farmacêutica.
I.Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II.Sarmento, Vitor Hugo Vitorino, coorient.. III.Título.

CAPES: 40300005

Candidato(a): Flávia Chiva Carvalho

Título da Dissertação:

Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 18/02/2009, consideraram o(a) candidato(a):

REPROVADO

APROVADO

1) Examinadora *Profa. Dra. Rosângela Itri*

2) Examinadora *Profa. Dra. Marcela Longhi*

3) Presidente *Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião*

Dedico este trabalho aos meus pais

Fernando e Lenira

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Fernando e Lenira, que nunca mediram esforços em oferecer a mim e a minha irmã segurança, apoio e carinho, e a todo empenho em nos garantir a melhor educação, tanto acadêmica como moral. Não há como expressar toda minha felicidade e orgulho em dedicar este trabalho a vocês, como forma de agradecimento a todo o amor nos dado. Agradeço a minha querida irmã, Fernanda, por ser minha grande amiga, com quem posso contar com toda confiança e apoio, sempre. Agradeço a Alexandre por ser meu grande companheiro e por todo seu amor.

À minha querida orientadora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, por ser minha grande mestra, amiga e um exemplo pessoal e profissional a seguir. Obrigada por toda sabedoria transmitida, confiança, paciência, dedicação, e por ter tornado meu sonho realidade.

Ao meu co-orientador Victor Hugo Vitorino Sarmiento, pelo apoio, pela parceria em todos os resultados, e principalmente pelo carinho e amizade.

Aos professores do departamento de Fármacos e Medicamentos por toda ajuda e amizade. Agradeço em especial aos professores Dra. Leila Chiavacci, Dr. Marcos Bruschi e Dr. Raul Evangelista pela contribuição neste trabalho e pela amizade.

Às professoras Dra. Marcela Longhi e Dra. Rosângela Itri por terem participado de minha defesa e pela grande contribuição neste trabalho.

Aos meus grandes amigos do programa de pós-graduação, principalmente aos que convivi diariamente no laboratório, Ana Luiza, Arnóbio, Beatriz, Cristina Franzine, Cristina Terrugge, Fabrício, Flávio, Giselle, Gustavo, Joceana, Hilris, Juliana Farinelli, Kelly, Pricileila e Rubiana. Cada item deste trabalho tem a contribuição e ajuda de cada um de vocês. Obrigada pelos momentos de alegria, e por tornarem o convívio no laboratório momentos de prazer e descontração.

Aos alunos de iniciação científica, Bruna, Camila, Daniele, Edgar, Gabriela, Márcia, Charlene e Talita. Agradeço em especial à Mariana Barbi, por ter me acompanhado e me ajudado desde o princípio, e por ter se tornado minha grande amiga.

Ao professor João Aristeu da Rosa por permitir prontamente a utilização do microscópio de luz polarizada.

Ao departamento de Físico-química do Instituto de Química (UNESP) por permitir a utilização do reômetro.

À professora Dra. Flávia Maria Netto da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP por disponibilizar o analisador de textura e por toda ajuda na interpretação dos resultados.

Ao Thiago Larroca pela amizade e pela ajuda com os textos em Inglês.

A todos meus amigos que me acompanham, me apóiam e dão razão a minha vida.

À secretaria de pós-graduação, aos funcionários, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP) e a CAPES pelo suporte financeiro.

*“Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz”*

“Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira. Mas já tantos sonhos se realizaram que não temos o direito de duvidar de nenhum”

Monteiro Lobato

RESUMO

A zidovudina (AZT) é o fármaco antiretroviral mais utilizado no tratamento da AIDS, porém possui baixa biodisponibilidade, pois sofre intenso metabolismo hepático. Para alcançar concentrações plasmáticas efetivas são requeridas doses altas e freqüentes, as quais podem chegar a níveis tóxicos. A via nasal tem sido proposta como uma rota alternativa para administração de fármacos que sofrem metabolismo pré-sistêmico, pois favorece a absorção direta para circulação sanguínea; porém, ela possui mecanismos de depuração mucociliar, os quais podem eliminar rapidamente a formulação da cavidade nasal. Sistemas de liberação mucoadesivos podem promover o contato prolongado entre a formulação e os sítios de absorção da cavidade nasal, retardando a depuração mucociliar. Alguns sistemas estabilizados por tensoativos, capazes de formar diferentes estruturas liotrópicas líquido cristalinas, têm sido propostos para aumentar o tempo de contato de formulações com as mucosas. Estes sistemas, ao entrar em contato com os fluidos aquosos que compõem o muco, se ordenam em cristais líquidos (CLs), formando uma matriz de liberação do fármaco. O objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas capazes de formar CLs, como potenciais sistemas mucoadesivos para administração intranasal do AZT. A caracterização por microscopia de luz polarizada e SAXS mostrou que microemulsões (MEs) formadas por AC205/ácido oléico/água formam CLs com a adição tanto de água como de fluido nasal simulado (FNS). As MEs foram capazes de incorporar cerca de 50 mg.g^{-1} de AZT. A mucoadesão foi avaliada por ensaios de reologia oscilatória, em que a adição de fase aquosa aumentou os módulos elásticos dos sistemas, e pela medida da força para remover as formulações a partir de um disco de mucina, obtidas através de um analisador de textura. Ensaios de liberação *in vitro* em célula de difusão tipo Franz mostraram, segundo o modelo de Weibull, que a mudança de fases pode prolongar a liberação do AZT. Estes resultados sugerem que estes sistemas possuem grande potencial para administração nasal do AZT.

Palavras-chave: Sistemas de liberação de fármacos, AIDS, zidovudina, microemulsão, cristal líquido, mucoadesão.

ABSTRACT

Zidovudine (AZT) is the most widely used drug in AIDS treatment; however, AZT shows low oral bioavailability, since it suffers extensive hepatic metabolism. In order to maintain therapeutic levels, large doses have to be given frequently, which may reach toxic levels. The nasal route has been exploited as an alternative route of drugs that suffer first pass metabolism, as it ensures the direct drug absorption to blood circulation; however, the nasal route has mucociliary clearance mechanisms which can quickly remove the formulation of the nasal cavity. Mucoadhesive drug delivery systems can improve residence time of formulation in the nasal cavity absorption sites, delaying mucociliary clearance. Some surfactants systems which are able to form different lyotropic liquid crystalline structures have been explored as a strategy to increase formulation residence time on the mucosa. When these systems are placed in physiologic aqueous environment, they can form a drug delivery matrix. The aim of this work was to develop systems capable of forming CLs as potential intranasal AZT mucoadhesive systems. The polarized light microscopy and SAXS characterization showed that microemulsions (MEs) composed by AC205/oleic acid/water form CLs with the addition of either water or simulated nasal fluid (FNS). The MEs were able to incorporate about 50 mg.g^{-1} of AZT. The mucoadhesion was evaluated both by oscillatory rheology, in which aqueous phase addition increased the elastic modulus of the systems, and by measurement of the necessary force to remove the formulations from mucin disc, obtained through texture analyzer. In vitro Franz' Cell drug release assay showed, according to the Weibull model, that phase transition sustained AZT release. These results suggest that the systems in hand have great potential for nasal AZT administration.

Keywords: drug delivery systems, AIDS, zidovudina, microemulsion, liquid crystal, mucoadhesion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da zidovudina.....	10
Figura 2.	Anatomia da via nasal.....	15
Figura 3.	Representação das forças que podem ser medidas em testes de mucoadesão.....	24
Figura 4.	Seqüência teórica dos diferentes tipos de fases formadas dependendo do parâmetro de empacotamento, dado pela geometria do tensoativo, teor de água, e outros fatores como temperatura, presença de sais etc.....	28
Figura 5.	Representação esquemática da auto-organização de tensoativos em estruturas lamelares e hexagonais (HOLMQVIST; ALEXANDRIDIS; LINDMAN, 1997).....	38
Figura 6.	Fórmula estrutural de tensoativos tipo álcool graxo OE OP, alcoóis laurílico e cetílico e ácido oléico.....	40
Figura 7.	Esquema do teste de avaliação da mucoadesão. (a) Analisador de textura; (b) Prova analítica com o disco de mucina aderido; (c) Localização da formulação durante o ensaio; (d) curva força de adesão <i>versus</i> tempo.....	51
Figura 8.	Esquema da célula de difusão adaptada ao dissolutor.....	55
Figura 9.	Diagrama de fases. (AO) ácido oléico; (AL45) tensoativo; (A) água; (ME) Microemulsão.....	56
Figura 10.	Diagrama de fases. (AO) ácido oléico; (AL63) tensoativo; (A) água. (ME) Microemulsão; (CL) Cristal Líquido.....	57
Figura 11.	Diagrama de fases. (AO) ácido oléico; (AC205) tensoativo; (A) água; (ME) Microemulsão; (CL) Cristal Líquido.....	58
Figura 12.	Fotomicrografias das amostras F1 a F11 obtidas por microscopia de luz polarizada.....	61
Figura 13.	Avaliação estrutural das amostras F1 a F11 por SAXS.....	62
Figura 14.	Espectro de absorção da formulação F3 em metanol.....	67

Figura 15.	Espectro de absorção da solução de AZT ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em metanol.....	68
Figura 16.	Espectro de absorção do AZT na formulação F3 ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) diluída em metanol.....	67
Figura 17.	Quantidade de AZT incorporado em F1, F2, F3, F4 e em cada componente da formulação.....	69
Figura 18.	Fotomicrografias das amostras de F1 a F4 após incorporação do AZT (40 mg.g^{-1}) obtidas por MLP.....	70
Figura 19.	Diferenciação estrutural das formulações contendo AZT (F1A, F2A, F3A e F4A) por SAXS.....	71
Figura 20.	Reogramas de fluxo das formulações F1A, F2A, F3A e F4A a 25°C . Os símbolos fechados representam as curvas de ida, e os símbolos abertos representam as curvas de volta.....	73
Figura 21.	Índice de consistência k e índice de fluxo n das formulações com AZT a 25°C	73
Figura 22.	Diagrama de fases representando os pontos do acréscimo de 5, 10, 30, 50 e 100% de água em F1, F2, F3 e F4 (símbolos em vermelho). (AO) ácido oléico; (AC205) tensoativo; (A) água.....	76
Figura 23.	Fotomicrografias que ilustram o efeito da água na estruturação de F1 e F1A, obtidas por MLP (F1.n e F1An, $n = 5, 10, 30, 50, 100\%$ de água adicionada).....	78
Figura 24.	Fotomicrografias que ilustram o efeito da água na estruturação de F2 e F2A, obtidas por MLP (F2.n e F2An, $n = 5, 10, 30, 50, 100\%$ de água adicionada).....	79
Figura 25.	Fotomicrografias que ilustram o efeito da água na estruturação de F3 e F3.A obtidas por MLP (F3.n e F3An, $n = 5, 10, 30, 50, 100\%$ de água adicionada).....	80
Figura 26.	Fotomicrografias que ilustram o efeito da água na estruturação de F4 e F4A, obtidas por MLP (F4.n e F4An, $n = 5, 10, 30, 50, 100\%$ de água adicionada).....	81
Figura 27.	Efeito do acréscimo de 5 % (\circ), 10 % (\blacktriangle), 30 % (∇), 50 % (\blacklozenge) e 100 % (\square) de água nos módulos elásticos das amostras carregadas e não carregadas a 25°C . O G' das formulações antes da adição da água foi representado pelo símbolo (\blacksquare).....	84
Figura 28.	Efeito do acréscimo de 5 % (\circ), 10 % (\blacktriangle), 30 % (∇), 50 % (\blacklozenge) e 100 % (\square) de água nos módulos elásticos das amostras	

	carregadas e não carregadas a 32 °C. O G' das formulações antes da adição da água foi representado pelo símbolo (■).....	85
Figura 29.	Fotomicrografias que ilustram o efeito dos componentes do muco (FNS) na estruturação de F1A, obtidas por MLP a 32 °C (M1A30 = F1+30 % FNS; M1A50 = F1+50 % FNS; M1A100 = F1+ 100 % FNS).....	87
Figura 30.	Fotomicrografias que ilustram o efeito dos componentes do muco na estruturação de F2A, obtidas por MLP a 32 °C (M2A30 = F2+30 % FNS; M2A50 = F2+50 % FNS; M2A100 = F2+ 100 % FNS).....	88
Figura 31.	Fotomicrografias que ilustram o efeito dos componentes do muco na estruturação de F3A, obtidas por MLP a 32 °C (M3A30 = F3+30 % FNS; M3A50 = F3+50 % FNS; M3A100 = F3+ 100 % FNS).....	89
Figura 32.	Fotomicrografias que ilustram o efeito dos componentes do muco na estruturação de F4A, obtidas por MLP a 32 °C (M4A30 = F4+30 % FNS; M4A50 = F4+50 % FNS; M4A100 = F4+ 100 % FNS).....	90
Figura 33.	Caracterização por SAXS das formulações F1A, F2A, F3A e F4A adicionadas com 30 % (MnA30), 50 % (MnA50) e 100 % (MnA100) de FNS (n = 1, 2, 3 ou 4) a 32 °C.....	91
Figura 34.	Caracterização por SAXS das formulações F1, F2, F3 e F4 adicionadas com 50% de FNS (Mn.50, n = 1, 2, 3 ou 4) a 32 °C.....	94
Figura 35.	Efeito do acréscimo de 30 % (■), 50 % (●) e 100 % (▲) de FNS nos módulos elásticos das formulações F1A, F2A a 32 °C. Os símbolos abertos são as mesmas formulações adicionadas com 30 % (□), 50 % (○) e 100 % (△) de água.....	95
Figura 36.	Efeito do acréscimo de 30 % (■), 50 % (●) e 100 % (▲) de FNS nos módulos elásticos das formulações F3A e F4A a 32 °C. Os símbolos abertos são as mesmas formulações adicionadas com 30 % (□), 50 % (○) e 100 % (△) de água.....	96
Figura 37.	Comparação do efeito do acréscimo de 50 % de FNS entre os módulos elásticos das formulações carregadas (MnA50, n = 1, 2, 3 ou 4) e não carregadas com AZT (Mn.50, n = 1, 2, 3 ou 4).....	97
Figura 38.	Cromatogramas de (a) solução de trabalho a 1,0 µg.mL ⁻¹ , (b)	

	fluido receptor após 1,0 h de ensaio de liberação de F1A a 40 mg.g ⁻¹ , e (c) fluido receptor após 1,0 h de ensaio de liberação de F1 sem AZT.....	103
Figura 39.	Perfil de liberação das formulações F1A, F2A, F3A, F4A e SA (solução aquosa de AZT). As linhas foram plotadas pelo modelo de Weibull.....	105
Figura 40.	Testes dinâmicos de F1 e das amostras com 5 % (F1.5), 10 % (F1.10), 30 % (F1.30), 50 % (F1.50) e 100 % (F1.100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').....	128
Figura 41.	Testes dinâmicos de F1A e das amostras com 5 % (F1A5), 10 % (F1A10), 30 % (F1A30), 50 % (F1A50) e 100 % (F1A100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').....	129
Figura 42.	Testes dinâmicos de F2 e das amostras com 5 % (F2.5), 10 % (F2.10), 30 % (F2.30), 50 % (F2.50) e 100 % (F2.100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').....	130
Figura 43.	Testes dinâmicos de F2A e das amostras com 5 % (F2A5), 10 % (F2A10), 30 % (F2A30), 50 % (F2A50) e 100 % (F2A100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').....	131
Figura 44.	Testes dinâmicos de F3 e das amostras com 5 % (F3.5), 10 % (F3.10), 30 % (F3.30), 50 % (F3.50) e 100 % (F3.100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').....	132
Figura 45.	Testes dinâmicos de F3A e das amostras com 5 % (F3A5), 10 % (F3A10), 30 % (F3A30), 50 % (F3A50) e 100 % (F3A100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').....	133
Figura 46.	Testes dinâmicos de F4 e das amostras com 5 % (F4.5), 10 % (F4.10), 30 % (F4.30), 50 % (F4.50) e 100 % (F4.100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').....	134
Figura 47.	Testes dinâmicos de F4A e das amostras com 5 % (F4A5), 10 % (F4A10), 30 % (F4A30), 50 % (F4A50) e 100 % (F4A100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').....	135
Figura 48.	Testes dinâmicos de F1 e das amostras com 5 % (F1.5), 10 % (F1.10), 30 % (F1.30), 50 % (F1.50) e 100 % (F1.100) de água a	

	32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e ■ o módulo de perda (G'').....	136
Figura 49.	Testes dinâmicos de F1A e das amostras com 5 % (F1A5), 10 % (F1A10), 30 % (F1A30), 50 % (F1A50) e 100 % (F1A100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e ■ o módulo de perda (G'').....	137
Figura 50.	Testes dinâmicos de F2 e das amostras com 5 % (F2.5), 10 % (F2.10), 30 % (F2.30), 50 % (F2.50) e 100 % (F2.100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e ■ o módulo de perda (G'').....	138
Figura 51.	Testes dinâmicos de F2A e das amostras com 5 % (F2A5), 10 % (F2A10), 30 % (F2A30), 50 % (F2A50) e 100 % (F2A100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e ■ o módulo de perda (G'').....	139
Figura 52.	Testes dinâmicos de F3 e das amostras com 5 % (F3.5), 10 % (F3.10), 30 % (F3.30), 50 % (F3.50) e 100 % (F3.100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e ■ o módulo de perda (G'').....	140
Figura 53.	Testes dinâmicos de F3A e das amostras com 5 % (F3A5), 10 % (F3A10), 30 % (F3A30), 50 % (F3A50) e 100 % (F3A100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e ■ o módulo de perda (G'').....	141
Figura 54.	Testes dinâmicos de F4 e das amostras com 5 % (F4.5), 10 % (F4.10), 30 % (F4.30), 50 % (F4.50) e 100 % (F4.100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e ■ o módulo de perda (G'').....	142
Figura 55.	Testes dinâmicos de F4A e das amostras com 5 % (F4A5), 10 % (F4A10), 30 % (F4A30), 50 % (F4A50) e 100 % (F4A100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e ■ o módulo de perda (G'').....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Antiretrovirais: nome genérico, apresentação e meia vida plasmática.....	9
Tabela 2.	Formulações em que a proporção de tensoativo é fixa, e as proporções de óleo e água variam.....	45
Tabela 3.	Formulações em que a proporção de óleo é fixa, e as proporções de tensoativo e água variam.....	45
Tabela 4.	Valores de q_{max} (Å) e razão entre as distâncias interplanares para as formulações F1 a F11.....	63
Tabela 5.	Parâmetros estruturais das formulações líquido cristalinas (F4, F5, F6, F7, F9, F10 e F11).....	63
Tabela 6.	Valores das absorvâncias das soluções de AZT em metanol obtidas por espectroscopia UV, no comprimento de onda de 265 nm, e os respectivos resultados estatísticos obtidos das amostras em triplicata.....	66
Tabela 7.	Cálculo da precisão e exatidão do método de quantificação do AZT por espectrofotometria.....	68
Tabela 8.	Valores obtidos nas medidas dos limites de detecção e quantificação do AZT em metanol por espectroscopia UV.....	68
Tabela 9.	Quantidade de AZT solubilizado nas formulações F1, F2, F3, F4 e em cada constituinte, obtidos por espectroscopia UV.....	69
Tabela 10.	Valores de q_{max} (Å) e valores da razão entre as distâncias interplanares para as formulações F1A, F2A, F3A e F4A.....	71
Tabela 11.	Índices de consistência (k) e de fluxo (n) das formulações com AZT a 25 °C.....	74
Tabela 12.	Nomenclatura e proporções de fase aquosa, oleosa e tensoativo após incorporação de 5, 10, 30, 50, e 100 % de água em F1, F2, F3 e F4.....	77
Tabela 13.	Nomenclatura das formulações F1, F2, F3 e F4 com e sem AZT após a adição de 30, 50, e 100% de FNS.....	86

Tabela 14.	Valores de q_{max} (Å) e razão entre as distâncias interplanares das formulações F1A, F2A, F3A e F4A adicionadas com 30, 50 e 100 % de FNS, e das formulações F1, F2, F3 e F4 adicionadas com 50 % de FNS.....	92
Tabela 15.	Parâmetros estruturais das formulações F1 a F4 após a adição de FNS.....	93
Tabela 16.	Parâmetros de interação ou de sinergismo reológico (G'_{mis} , $\Delta G'_{absoluto}$, $\Delta G'_{relativo}$, relação $\log G'$) obtidos a 1 Hz, das formulações F1 a F4 após sua mistura com 30, 50 e 100 % de FNS. G'_f é o módulo elástico das formulações antes da adição do FNS.....	98
Tabela 17.	Força de mucoadesão das formulações F1, F2, F3, F4 e adicionadas com 50% de FNS (M1.50, M2.50, M3.50 e M4.50).....	101
Tabela 18.	Parâmetros utilizados na validação do método para quantificação do AZT no meio de liberação <i>in vitro</i> : precisão intra-dia, inter-dia e exatidão, expressa como porcentagem de recuperação.....	104
Tabela 19.	Parâmetros obtidos através da equação de Weibull, a partir dos dados de liberação <i>in vitro</i> das formulações F1A, F2A, F3A e da solução aquosa SA.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å.....	Angstrom
<i>a</i>	Parâmetro de rede (espaço entre os centros de duas lamelas ou entre dois cilindros da fase H ₁)
A.....	Água
AC205.....	Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP
AIDS.....	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida, sigla originada do Inglês: <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
AL36.....	Álcool laurílico etoxilado 3 OE e propoxilado 6 OP
AL45.....	Álcool laurílico etoxilado 4 OE e propoxilado 5 OP
AL63.....	Álcool laurílico etoxilado 6 OE e propoxilado 3 OP
AO.....	Ácido oléico
ASC.....	Área sob a curva
AZT	Zidovudina
CL.....	Cristal líquido
CLAE.....	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC.....	Concentração micelar crítica
CV.....	Coefficiente de variação
<i>d</i>	Distância entre os objetos espalhadores
ΔG'.....	Parâmetro de interação ou sinergismo reológico
DP.....	Desvio padrão
F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10 e F11.....	Formulações em que foi realizada a caracterização físico-química e estrutural
FnA.....	Formulações carregadas com AZT, n = 1, 2, 3 ou 4
Fn.5, Fn.10, Fn.30, Fn.50, Fn.100.....	Formulações adicionadas com 5, 10, 30, 50 e 100 % de água em relação à massa inicial, n = 1, 2, 3 ou 4

FnA5, FnA10, FnA30, FnA50, FnA100.....	Formulações carregadas com AZT adicionadas com 5, 10, 30, 50 e 100 % de água em relação à massa inicial, n = 1, 2, 3 ou 4
FNS.....	Fluído nasal simulado
G'.....	Módulo elástico ou de armazenamento
G''.....	Módulo viscoso ou de perda
H ₁	Fase hexagonal
H ₂	Fase hexagonal reversa
HIV.....	Vírus da imunodeficiência, sigla originada do Inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IF.....	Inibidor de fusão
II.....	Inibidor de integrase
IP.....	Inibidor de protease
ITRN.....	Inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
ITRNN.....	Inibidores da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo
L _α	Fase lamelar
LD.....	Limite de detecção
LQ.....	Limite de quantificação
Mn30, Mn50, Mn100.....	Formulações adicionadas com 30, 50 e 100 % de FNS em relação à massa inicial, n = 1, 2, 3 ou 4
MnA30, MnA50, MnA100.....	Formulações carregadas com AZT adicionadas com 30, 50 e 100 % de FNS em relação à massa inicial, n = 1, 2, 3 ou 4
ME.....	Microemulsão
MLP.....	Microscopia de luz polarizada
O.....	óleo
OE.....	Unidades de óxido de etileno
OP.....	Unidades de óxido de propileno

PEC.....	Parâmetro de empacotamento crítico
q	Vetor de espalhamento
q_{max}	Vetor de espalhamento quando a intensidade de espalhamento é máxima
r	Coefficiente de correlação linear
r^2	Coefficiente de determinação linear
R_H	Raio do cilindro da fase H ₁
$R^2_{ajustado}$	Coefficiente de determinação ajustado para ajuste de modelo matemático para liberação de fármacos
r_{pot}^2	Coefficiente de regressão linear correspondente à lei das potências
δ	Domínio apolar ou espessura da lamela
S.....	Inclinação da reta da curva de calibração
SA.....	Solução aquosa de AZT a 5,0 mg.mL ⁻¹
SAXS.....	Espalhamento de raios X a baixo ângulo
T.....	Tensoativo

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1.HIV e à AIDS.....	6
2.2.Terapia para HIV/AIDS e suas limitações.....	7
2.3.Zidovudina.....	8
2.4.Sistemas de liberação de fármacos antiretrovirais.....	11
2.5.Via de administração nasal.....	15
2.5.1Anatomia, fisiologia, mucosa e depuração mucociliar.....	16
2.5.2.Bio e Mucoadesão.....	18
2.5.2.1.Materiais mucoadesivos.....	20
2.5.2.2.Metodologias para análise da mucoadesão.....	22
2.5.2.2.1.Métodos que medem a força de mucoadesão.....	24
2.5.2.2.2.Métodos reológicos.....	25
2.6.Sistemas de liberação estabilizados com tensoativos.....	27
2.6.1.Diagrama de fases.....	29
2.6.2.Microemulsões e Cristais Líquidos.....	29
2.6.3.Caracterização físico-química.....	32
2.6.3.1.Microscopia de luz polarizada.....	32
2.6.3.2.Reologia.....	32
2.6.3.3.Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.....	34
2.6.4.Componentes.....	39
3.OBJETIVO.....	41
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1.Materiais.....	42
4.2.Métodos.....	44
4.2.1.Construção dos diagramas de fases e escolha do tensoativo.....	44
4.2.2.Caracterização físico química e estrutural das formulações.....	45
4.2.2.1.Microscopia de luz polarizada.....	45
4.2.2.2.Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.....	46
4.2.3.Avaliação da incorporação do AZT nos sistemas.....	46

4.2.3.1.Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de AZT por espectroscopia UV.....	46
4.2.3.2.Determinação da incorporação de AZT nos sistemas escolhidos e nos seus diferentes componentes.....	47
4.2.3.3.Efeito da incorporação do AZT na evolução estrutural das formulações.....	48
4.2.4.Avaliação da mucoadesão.....	49
4.2.4.1.Efeito da água na estrutura das formulações.....	49
4.2.4.2.Efeito dos componentes do muco na estrutura das formulações....	49
4.2.3.2.1.Avaliação da força mucoadesiva.....	50
4.2.5.Estudos de liberação do fármaco.....	52
4.2.5.1.Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	52
4.2.5.2.Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i>	54
5.RESULTADOS.....	56
5.1.Seleção do tensoativo.....	56
5.2.Caracterização físico química e estrutural das formulações.....	60
5.3.Escolha dos sistemas a serem estudados.....	65
5.4.Avaliação da incorporação do AZT nos sistemas.....	65
5.4.1.Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de AZT por espectroscopia UV.....	65
5.4.2.Determinação da incorporação de AZT nos sistemas selecionados e nos seus diferentes componentes.....	68
5.4.3.Efeito da incorporação do AZT na evolução estrutural das formulações.....	70
5.5.Avaliação da mucoadesão.....	75
5.5.1.Efeito da água na estrutura das formulações.....	76
5.5.2.Efeito dos componentes do muco na estrutura das formulações.....	86
5.5.2.1.Avaliação da força mucoadesiva.....	100
5.6.Estudos de liberação do fármaco.....	102
5.6.1.Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	102
5.6.2.Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i>	105

6.DISSCUSSÃO.....	109
7.CONCLUSÕES.....	113
8.PERSPECTIVAS FUTURAS.....	115
9.REFERÊNCIAS.....	116
10.ANEXO: Estudos de reologia oscilatória obtidos por varredura de frequência..	127

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O AZT, primeiro composto aprovado para uso clínico no tratamento da Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida, é o fármaco mais amplamente utilizado, tanto sozinho como em combinação com outros agentes antiretrovirais. Entretanto, o fator que limita a sua efetividade terapêutica é sua toxicidade hematológica dose-dependente (MAINARDES, 2007; OH *et al.*, 1998; THOMAS; PANCHAGNULA, 2003). A biodisponibilidade deste fármaco via oral é de somente 60% devido ao seu metabolismo hepático; é eliminado como glicuronídeo inativo, com meia-vida de aproximadamente uma hora (MANDAL; TENJARLA, 1996). Para manter níveis terapêuticos efetivos, altas doses devem ser administradas, as quais freqüentemente alcançam níveis plasmáticos tóxicos, causando uma série de efeitos adversos graves tais como granulocitopenia e anemia (BLUM *et al.*, 1988; MAINARDES, 2007). Esses efeitos são dose-dependente e uma redução da dose total administrada reduziria a severidade desta toxicidade (MANDAL; TENJARLA, 1996).

Somados a esses fatores, as atuais terapias antiretrovirais têm um esquema de administração de doses bastante complexo. O grande número de comprimidos ou cápsulas, utilizados por tempo indeterminado, dificulta a adesão do paciente ao tratamento em longo prazo. Nos casos em que são necessárias terapias combinadas, o aumento no número de comprimidos pode trazer dificuldade na compreensão das doses e severos efeitos colaterais (BRASIL, 2006). Além disso, os medicamentos disponíveis no mercado não evitam o metabolismo hepático do AZT.

A terapia hoje adotada utiliza a via oral como a principal via de administração do AZT. São inquestionáveis as vantagens que a via oral oferece, mas para fármacos

que sofrem metabolismo no trato gastrointestinal e metabolismo pré-sistêmico, outras rotas de administração devem ser exploradas. A rota transdérmica tem sido amplamente sugerida, pois garante níveis plasmáticos contínuos e evita o metabolismo hepático e gastrointestinal (NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2004a; OH *et al.*, 1998; THOMAS; PANCHAGNULA, 2003). Entretanto, tratando-se do AZT, um problema que limita o uso dessa via é a sua relativa hidrossolubilidade e a sua baixa permeabilidade transdérmica, necessitando assim do uso de técnicas físicas que melhorem a permeação, tais como iontoforese, micro-agulhas, etc. (KUMAR *et al.*, 1999).

A via nasal tem recebido especial atenção como rota promissora para liberação sistêmica de fármacos (ILLUM, 2003) e apresenta uma série de vantagens. Seu epitélio com numerosas microvilosidades e grande área de superfície facilita a absorção de fármacos. A camada subepitelial altamente vascularizada e a membrana basal com endotélio poroso podem facilitar a permeação do fármaco. Essas características podem fazer com que o fármaco seja absorvido diretamente para circulação sistêmica, evitando metabolismo pré-sistêmico, atingindo rapidamente níveis plasmáticos terapêuticos. Todos esses fatores podem favorecer a redução da dose, a diminuição de efeitos adversos e a adesão ao tratamento. Comparando-se com outras vias, a via nasal tem representado um grande avanço na administração de fármacos como hormônio do crescimento e insulina (UGWOKE, *et al.*, 2005).

O reconhecimento do potencial da via nasal tem conduzido a um grande aumento nas pesquisas neste campo nas últimas duas décadas. A lista de produtos no mercado ou em vários estágios de desenvolvimento pré-clínico e clínico está sempre em crescimento (UGWOKE *et al.*, 2005). Apesar do seu potencial, há algumas barreiras que limitam a absorção intranasal de fármacos, como os mecanismos de depuração

mucociliar, o qual remove rapidamente a formulação da cavidade nasal, a degradação enzimática, a qual pode acontecer tanto no lúmen da cavidade nasal como na passagem através da barreira epitelial, e a baixa permeabilidade do epitélio nasal que dificulta a absorção de fármacos polares ou de alto peso molecular (ILLUM, 2003; MAINARDES *et al.*, 2006).

Várias estratégias têm sido propostas para vencer estas barreiras de absorção. Por exemplo, o emprego de sistemas mucoadesivos que promovem o contato prolongado entre a formulação e os locais de absorção na cavidade nasal retardando a depuração mucociliar, aumentando a permeação e absorção do fármaco (ILLUM, 2003; UGWOKE *et al.*, 2005). Tais sistemas podem estar na forma de pós, líquidos ou géis líquidos (ILLUM, 2003). Microesferas de quitosana (GAVINI *et al.*, 2006; MARTINAC *et al.*, 2005), de poloxamers (HAN *et al.*, 2006) e de pectina (CHARLTON *et al.*, 2007), lipossomas (SHAHIWALA; MISRA, 2004), microemulsões (LI *et al.*, 2002; VYAS *et al.*, 2006a ; VYAS *et al.*, 2006b; ZHANG *et al.*, 2004), e sistemas mistos, como os sistemas de gelificação *in situ*, os quais se gelificam através da mudança de pH, temperatura e absorção de solventes quando chegam à cavidade nasal (PARK *et al.*, 2001; UGWOKE *et al.*, 2005) são exemplos de sistemas mucoadesivos. Há uma ampla variedade de materiais que podem ser utilizados na formulação de sistemas mucoadesivos, como carbômeros, quitosanas, alginatos e derivados da celulose (SMART, 2005).

Há uma nova classe de substâncias, como monoestearato e monooleato de glicerila, sendo identificada como mucoadesiva, capazes de formar cristais líquidos in situ (CLs) *in situ*, os quais podem agir como uma matriz de liberação do fármaco, e que devido sua alta viscosidade, pode permanecer por maior tempo em contato com a

mucosa (BOYD *et al.*, 2006; SHAH *et al.*, 2001). Alguns ácidos graxos e copolímeros etoxilados também são capazes de formar mesofases líquido cristalinas liotrópicas em presença de água na temperatura corpórea (MALMSTEN, 1996; URBAN, 2004). Os CLs são considerados estruturas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. Alterando a concentração de solvente, podem ser formadas diferentes estruturas líquido-cristalinas, como lamelares (L_a), hexagonais (H_1 para hexagonal e H_2 para hexagonal reversa) e cúbicas. Os CLs vêm sendo considerados uma excelente matriz de liberação de fármacos, pois devido a sua alta viscosidade, pode prolongar a liberação dos mesmos, além de possuir uma grande área interfacial interna, com características físico-químicas diferentes da área externa, formando microambientes distintos, com diferentes constantes dielétricas, permitindo compartimentalizar fármacos polares e apolares (BOYD *et al.*, 2006). Porém, a administração nasal de um CL estruturado torna-se difícil, devido sua alta viscosidade. Por isso, vários trabalhos têm proposto a administração de um sistema precursor de CL, ou seja, que se transforme nesta fase *in situ* (SHAH *et al.*, 2001). A busca por esta interessante alternativa já foi proposta para mucosas como a periodontal (BRUSCHI *et al.*, 2007) vaginal e trato gastrintestinal (SHAH *et al.*, 2001).

Nosso grupo de pesquisa tem mostrado que sistemas água/óleo estabilizados com tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (AC205) formam microemulsões (MEs) em baixas concentrações de água, e o aumento da fase aquosa resulta numa gama de diferentes tipos de mesofases líquido cristalinas com maior estruturação (CARVALHO *et al.*, 2008; KLEIN, 2007; URBAN, 2004).

A administração da fase microemulsionada seria uma vantagem, devido à alta capacidade de solubilização de fármacos, estabilidade termodinâmica e fluidez destes

sistemas, que facilita a administração nasal (LAWRENCE; REES, 2000). Ao chegar à cavidade nasal, entra em contato com os fluidos aquosos que compõe o muco, podendo transformar-se então numa fase líquido cristalina mais estruturada.

Tendo em vista as vantagens que a via nasal oferece na absorção de fármacos, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema precursor de CL para a administração intranasal do AZT. Para isso, foram desenvolvidos e caracterizados sistemas estabilizados com tensoativos tipo álcool graxo etoxilado e propoxilado, água e ácido oléico como fase oleosa, visando obter potenciais sistemas mucoadesivos. Os sistemas foram caracterizados quanto ao comportamento de fases através da construção do diagrama de fases e caracterização por microscopia de luz polarizada (MLP) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). A avaliação da mucoadesão foi estudada através de estudos reológicos, em que é possível monitorar as mudanças viscoelásticas do sistema formado pela mistura da mucina com a formulação, e através da análise da força de mucoadesão obtida a partir de um analisador de textura, o qual mede a força aplicada na remoção da formulação a partir de um disco de mucina. A diferenciação estrutural da transição ME-CL foi elucidada por medidas de SAXS e MLP. Por fim, foi realizado estudo de liberação *in vitro* em célula de difusão tipo Franz.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HIV e AIDS

O vírus da imunodeficiência humana e a Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida, comumente referidos como HIV e AIDS (siglas originadas do Inglês: *Human Immunodeficiency Virus e Acquired Immuno Deficiency Syndrome*), constitui a doença infecciosa mais séria que desafia globalmente a saúde pública. Há atualmente 33,2 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS no mundo. Mais de 6800 pessoas se tornam infectadas com o HIV e mais de 5700 pessoas morrem de AIDS por ano, principalmente pelo acesso inadequado à prevenção e tratamento. Intervenções como aconselhamento educacional e terapia com fármacos antiretrovirais têm contribuído para transformar a infecção por HIV de fatal a uma doença infecciosa crônica controlável, embora as estatísticas ainda mostrem que o número de infecções continua inaceitavelmente alto (UNAIDS, 2007).

Há atualmente duas espécies conhecidas de HIV, o HIV-1 e HIV-2, com as suas respectivas subespécies. HIV-1 é a infecção mundialmente mais comum, enquanto que a HIV-2 é mais prevalente na África do Sul, a qual demora mais tempo para evoluir para imunodeficiência que a HIV-1. A infecção humana por HIV é resultante da integração do genoma viral dentro das células hospedeiras para sua replicação. A AIDS é o estágio avançado da infecção causada pelo HIV. O vírus infecta as células hospedeiras se ligando à proteína viral gp120 em dois receptores transmembrana, o CD4+ e em uma das quimiocinas CCR5 e CXCR4. O HIV infecta os macrófagos e células T auxiliares CD4+, mas o que caracteriza a AIDS é a depleção das células

CD4+. O estágio final da doença pode ser caracterizado como um espectro de doenças, incluindo infecções oportunistas como *Pneumocystis carinii* e *Mycobacterium tuberculosis*, demência e câncer. Em adição aos macrófagos, linfonodos, medula óssea, baço e pulmões, o sistema nervoso central representa o local anatômico mais importante de alojamento do vírus. Isto causa um significativo dano neuronal e demência. Sem tratamento, a infecção por HIV-1 pode ser fatal em 5 a 10 anos (OJEWOLE *et al.*, 2008).

2.2.Terapia para HIV/AIDS e suas limitações

Embora o desenvolvimento de fármacos para infecção do HIV tenha progredido, ainda persistem numerosas incertezas a respeito da melhor maneira de se controlar a doença. Atualmente, os antiretrovirais são classificados em categorias como inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNN), inibidores de protease (IP), e mais recentemente inibidores de fusão (IF) e de integrase (II). A Tabela 1 mostra a classificação, apresentação e meia vida plasmática dos antiretrovirais. Estes medicamentos são administrados em terapia combinada. Eles adiam o início dos sintomas da doença, diminuindo o ritmo da redução das células de proteção do sistema imunológico, mas, ainda assim, não conseguem eliminar o HIV do organismo, além da terapia estar associada com vários efeitos adversos (BRASIL, 2006).

Os efeitos adversos estão associados à curta meia vida e baixa biodisponibilidade da maioria dos antiretrovirais, devido ao seu metabolismo pré-sistêmico e degradação gastrintestinal. Além disto, os locais de alojamento do vírus,

como sistema nervoso central, sistema linfático e macrófagos, são compartimentos que não podem ser acessados pela maioria dos fármacos na concentração terapêutica requerida. Como nestes locais a concentração é subterapêutica, com tempo de residência média curto, o HIV não consegue ser eliminado de seus reservatórios. Todos estes fatores fazem com que posologia dos medicamentos antiretrovirais seja alta e freqüente, o que leva a baixa adesão do paciente a terapia (OJEWOLE *et al.*, 2008).

Estratégias para superar essas limitações incluem a identificação de novas moléculas, modificação química das já existentes e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Esta última pode promover a eficácia de fármacos já existentes e explorar novas vias de administração (OJEWOLE *et al.*, 2008)

A introdução de um novo fármaco no mercado, além de levar vários anos de pesquisa, envolve custos altíssimos. Assim, a procura por novos sistemas de liberação é importante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (MAINARDES *et al.*, 2004; MAINARDES *et al.*, 2005a).

2.3.Zidovudina

A zidovudina é também conhecida como Retrovir, AZT, ZDV ou 3'-azido-3'-desoxitimidina. AZT é um análogo da timidina que possui um grupamento 3'-azido em lugar de 3'-hidroxila. A zidovudina é um sólido cristalino solúvel em água na proporção de 20 mg.mL⁻¹ (SILVA, 2006). Sua estrutura química está representada na Figura 1.

Tabela 1: Antiretrovirais: nome genérico, apresentação e meia vida plasmática.

Classe	Nome genérico	Apresentação	Meia vida plasmática
ITRN	ABACAVIR	Comprimido 300 mg	1,5 h
	DIDANOSINA	Comprimidos tamponados de 25 e 100 mg, Comprimidos revestidos para liberação entérica de 250 e 400 mg	1,6 h
	ESTAVUDINA	Cápsula 30 e 40 mg	1,4 h
	LAMIVUDINA	Comprimido 150 mg	5-7 h
		Associação com AZT 300 mg + lamivudina 150 mg	
	TENOFOVIR	Comprimido 300 mg	17 h
	ZALCITABINA	Comprimido 0,75 mg	1,2-2 h
ITRNN	ZIDOVUDINA	Cápsula 100mg e Associação de lamivudina 150 mg com AZT 300 mg	1.1 h
	DELAVIRDINA	Comprimido 100 mg	5,8 h
	EFAVIRENZ	Cápsulas de 200 e 600 mg	40-55 h
IP	NEVIRAPINA	Comprimido 200 mg	25-30 h
	AMPRENAVIR	Cápsula 150 mg	7-10,5 h
	INDINAVIR	Cápsulas 400 mg	1,5-2 h
	LOPINAVIR	Cápsula 133,3 e 33,3 mg	5-6 h
	NELFINAVIR	Comprimido 250 mg	3,5-5 h
	RITONAVIR	Cápsula 100 mg	3 – 5 h
II	SAQUINAVIR	Cápsula 200 mg	1 – 2 h
	EFUVIRTIDE	Cápsulas	3,8 h
	MARAVIROC	Comprimidos	14-18 h
	RALTEGRAVIR	Comprimidos	9 h

Fonte: BRASIL, 2006; OJEWOLE *et al.*, 2008.

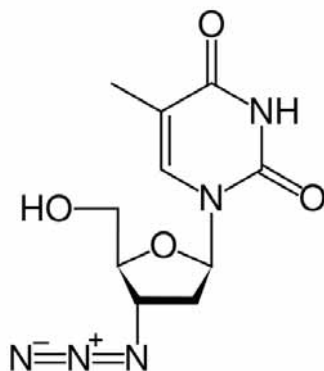


Figura 1: Estrutura química da zidovudina.

A zidovudina é rapidamente absorvida e sua biodisponibilidade varia de 60 a 70%. Nos pacientes infectados com HIV, a absorção varia amplamente e é retardada após a ingestão de alimentos. As concentrações plasmáticas máximas e mínimas são, respectivamente, de 0,4 a 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com a posologia de 400 mg de quatro em quatro horas. A meia vida plasmática de eliminação é de aproximadamente 0,9 a 1,5 horas. Sofre metabolismo hepático pré-sistêmico e é rapidamente transformada no metabólito 5'-0-glicuronídeo, que possui a mesma meia vida de eliminação, mas é destituído de atividade anti HIV (SILVA, 2006).

Em relação ao seu mecanismo de ação, após a difusão do fármaco para o interior das células do hospedeiro, a zidovudina é inicialmente fosforilada pela timidina cinase, em seguida é transformada em difosfato pela timidilato cinase, e por fim se converte na forma trifosfatada. O trifosfato de zidovudina, que tem uma meia vida intracelular de eliminação de 3 a 4 horas, inibe a transcriptase reversa em competição com o trifosfato de timidina. Como o grupamento 3'-azido evita a formação da ligação 5'-3'-fosfodiéster, a incorporação da zidovudina provoca o término da cadeia de DNA. A seletividade antiviral da zidovudina se deve a sua maior afinidade pela transcriptase

reversa do HIV do que pelas DNA polimerases humanas. Na AIDS, ela prolonga a sobrevivência, reduz as infecções oportunistas, promove ganho de peso, melhora o estado funcional geral e aumenta a contagem de linfócitos T CD4+ (SILVA, 2006).

A zidovudina foi o primeiro fármaco empregado no tratamento da AIDS, que comprovadamente proporcionou benefícios clínicos importantes. No Brasil, a associação zidovudina/lamivudina foi considerada a dupla de análogos de nucleosídeos de primeira escolha para compor o esquema terapêutico inicial. O perfil favorável de toxicidade de ambos ITRN, a facilidade de adesão à combinação e a larga experiência com ela justificam esta opção (BRASIL, 2006).

2.4. Sistemas de liberação de fármacos antiretrovirais

A ação de fármacos já existentes pode ser potencializada através do desenvolvimento de novos sistemas de liberação. A liberação controlada consiste em técnicas que tornam os agentes químicos ativos disponíveis para um alvo, com taxas de liberação e duração adequadas para produzir um efeito desejado. Assim, os sistemas de liberação controlada são tidos como aqueles que podem fornecer algum tipo de controle, seja temporal, espacial ou ambos (EVANGELISTA, 2006).

A maioria dos sistemas de liberação controlada apresenta vantagens como redução da frequência de dosagem; redução da oscilação do nível do fármaco na circulação sistêmica e fluidos biológicos; aumento da adesão do paciente; esquema terapêutico adequado às necessidades do paciente; garantia de efeito terapêutico mais uniforme; minimização de irritação de mucosas ou tecidos e outros efeitos adversos dependentes da dose e via de administração (LI; ROBINSON; LEE, 1987). A aplicação de sistemas nanoestruturados como sistemas de liberação tem sido alvo de crescente

interesse dado às inúmeras vantagens que essas formulações oferecem como aumento da solubilidade e estabilidade de fármacos, possibilidade de incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, capacidade de agir como sistemas reservatórios, diminuição da toxicidade, assim como alterar a disponibilidade de fármacos dependendo da forma de interação entre o fármaco e o sistema (EVANGELISTA, 2006).

Como a terapia utilizando análogos de nucleosídeos comumente está associada a efeitos adversos tóxicos e severos, o desenvolvimento de sistemas de liberação pode ser uma alternativa para o tratamento da AIDS. Há vários estudos envolvendo sistemas de liberação de fármaco antiretrovirais e uma boa revisão sobre este assunto pode ser encontrada em Ojewole e colaboradores (2008).

A utilização de sistemas de liberação de fármacos antiretrovirais começou em 1990, porém foram nos últimos cinco anos que o maior número de publicações começou a surgir, mas há uma falta de dados no avanço de estudos de caracterização físico-química e mecanismos de ação destas formulações (OJEWOLE *et al.*, 2008). Alguns sistemas desenvolvidos para melhorar a eficácia do AZT estão descritos a seguir.

Benghuzzi e colaboradores (1990, 1989) estudaram a administração subcutânea em ratos de implantes cerâmicos de tricálcio de fósforo contendo AZT utilizando técnicas cirúrgicas. Estes sistemas mostraram sustentar a liberação por mais de 26 dias em ratos com doses entre 20 e 60 mg de AZT. O perfil de liberação obtido indicou que as flutuações plasmáticas do AZT puderam ser eliminadas utilizando estes tipos de sistemas de liberação.

Há estudos de encapsulação de AZT em lipossomas, os quais mostraram que a administração parenteral em ratos não desenvolveu toxicidade na medula, exibindo perfis normais de leucócitos e eritrócitos, além de atingir órgãos de alojamento do vírus como pulmões e baço (PHILLIPS; SKAMENE; TSOUKAS, 1991; PHILLIPS; TSOUKAS, 1992). A aplicação de lipossomas de AZT transdérmico aumentou o fluxo do fármaco através da pele de ratos quando comparado com o fármaco livre, contribuindo para o aumento da biodisponibilidade e direcionamento do AZT para determinados sítios de ação (SUBHEET; TIWARY; JAIN, 2006). Devido à baixa eficiência de encapsulação do AZT em lipossomas, foi testado o pró-fármaco AZT-miristato, cuja eficiência de encapsulação foi 98 % e os níveis plasmáticos e cerebrais foram maiores quando comparados com o AZT em solução, mostrando que o pró-fármaco associado a um sistema lipossomal pode direcioná-lo e melhorar sua ação (JIN *et al.*, 2005).

Os sistemas nanoparticulados estão ganhando bastante destaque na busca de melhores tratamentos para a AIDS (MAINARDES, 2007). Muitos desses estudos envolvem a encapsulação de antiretrovirais para direcionar a liberação para macrófagos. Recentemente, a afinidade de nanopartículas de ácido polilático e polietilenoglicol por leucócitos polimorfonucleares mostrou ser dependente das quantidades destes polímeros (MAINARDES *et al.*, 2008). Nanocápsulas de AZT trifosfatado de poliisobutilcianoacrilato também promoveu a liberação celular *in vitro* em macrófagos (HILLAIREAU, *et al.*, 2006).

A liberação do AZT pode ser direcionada também para outros locais, como a mucosa gastrointestinal, como no estudo de Dembri e colaboradores (2000), que

desenvolveu nanopartículas de poli isohexilcianoacrilato para administração gastrintestinal.

Dentre os antiretrovirais, o AZT é o mais estudado em sistemas transdérmicos, e sua limitação é a baixa permeação cutânea (OJEWOLE *et al.*, 2008). Por isso a maioria dos estudos foca a investigação de agentes permeantes, como carvacrol, timol, linalol e mentol (KARARLI; KIRCHHOFF; PENZOTTI, 1995).

Para aplicação vaginal, D’Cruz e Uckun (2001) incorporaram um derivado do AZT em MEs, vaginal, pois este veículo mostrou ter alta capacidade para sua incorporação. Porém as MEs são fluidas, e para garantir viscosidade ideal do sistema e sua fixação na vagina foi adicionado carragena na formulação, para a ME adquirir consistência de gel (D’CRUZ; UCKUN, 2001). Há outros exemplos para aplicação vaginal do AZT, como o desenvolvimento de anéis vaginais para liberação diária do AZT composto por goma acácia, hidroxietilmetacrilato e metacrilato de sódio (HAN *et al.*, 2007), e nanogéis de aplicação intravaginal constituídos de polietilamina e polímeros PEG/Pluronic® (KOHLI *et al.*, 2007).

A via retal tem sido considerada como efetiva para liberação do AZT, pois ela evita o metabolismo hepático e degradação gástrica. Foram encontrados na literatura dois estudos que incorporaram o AZT em supositórios (KAWAGUCHI *et al.*, 1991; WINTERGERST *et al.*, 1997), porém esta via não é muito explorada pela baixa adesão, além dos pacientes com AIDS frequentemente apresentarem quadros de diarreia.

2.5. Via de administração nasal

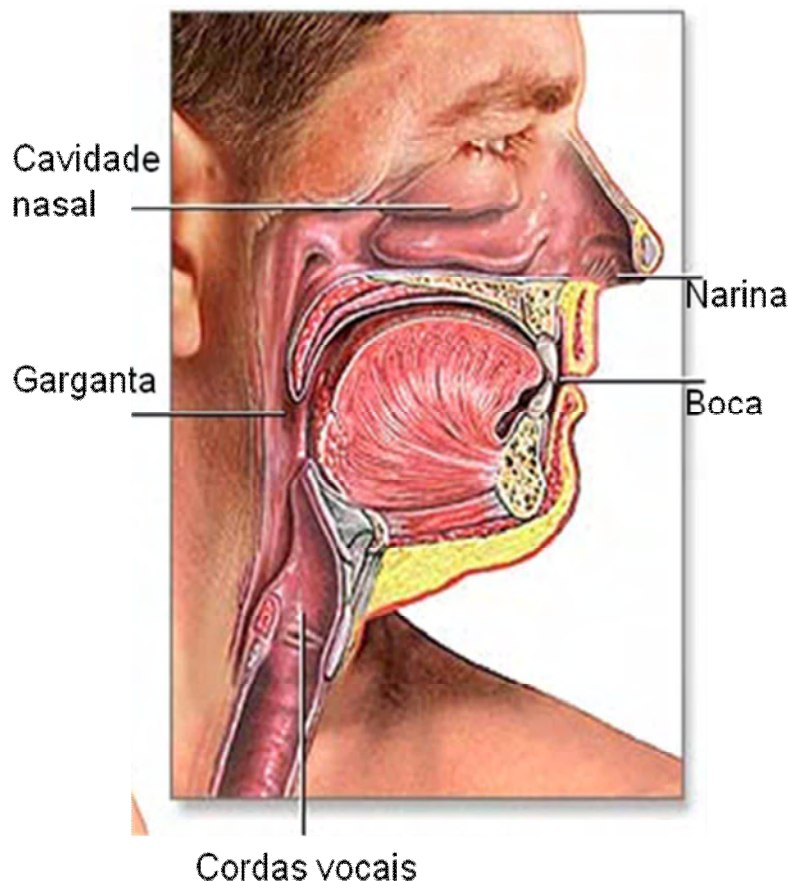


Figura 2: Anatomia da via nasal.

Até algumas décadas, a cavidade nasal tem sido considerada como uma via de administração de fármacos para terapias tópicas, como descongestionantes nasais. Recentemente, a possibilidade da cavidade nasal servir como via de administração em terapias sistêmicas, sobretudo com peptídeos e fármacos que sofrem metabolismo pré-sistêmico, como o AZT, tem tornado-se um tema importante de pesquisa (AULTON, 2005; MAINARDES *et al.*, 2006; MAINARDES, 2007).

Os medicamentos atualmente comercializados ou nos diversos estágios de investigação clínica para liberação nasal incluem a lisipressina (Sandoz), oxitocina (Sandoz), desmopressina (Ferring), busserelina (Aventis), nafarelin (Searle), calcitocina (Novartis), vitamina B12 (Nature's Bounty), nicotina, beclometasona, estradiol, progesterona, testosterona, propranolol, atenolol, metoprolol, buprenorfina, fenobarbital, nitroglicerina, penicilina, gentamicina, cocaína, diidroergotamina, leuprolida, insulina, interferon, glucagon e vacinas contra influenza, sarampo, poliomelite, etc (AULTON, 2005; ILLUM, 2003; MAINARDES *et al.*, 2006).

2.5.1. Anatomia, fisiologia, mucosa e depuração mucociliar

A região mais externa do nariz é o vestíbulo nasal, que abrange aproximadamente 15 mm, estendendo-se das narinas até a válvula nasal, com um comprimento de cerca de 60 mm e um volume de 20 mL, que chega até a nasofaringe. A cavidade nasal está dividida verticalmente, em quase toda a sua extensão, pelo septo nasal. Cada parede da cavidade nasal apresenta três dobras ou recortes denticulares conhecidos como cornetos ou conchas nasais. Essas dobras fazem com que a cavidade nasal possua uma área superficial relativamente grande (160 cm²), em comparação ao seu volume (300 µL). A elevada área superficial da cavidade nasal e abundante vascularização subjacente tornam esta via um bom lugar para absorção de fármacos (AULTON, 2005).

A parte anterior do nariz, compreendida pelo vestíbulo nasal até a concha nasal, apresenta um epitélio escamoso estratificado. A parte superior da cavidade, que abrange 5 % da superfície total, é a membrana olfativa. Esta última apresenta células sensitivas

olfativas, assim como células serosas e mucóides, que estão aí localizadas por ser esta a região que passa o ar inspirado. A maior parte da cavidade nasal, contudo, é revestida por uma membrana mucóide que contém uma mistura de células colunares, calciformes e basais. As células colunares presentes no terço anterior do epitélio são células não ciliadas, enquanto que as restantes são ciliadas. Os cílios são pequenas projeções piliformes localizadas sobre a superfície exposta das células epiteliais. Cada célula contém em torno de 300 cílios, que medem entre 5 e 10 μm de comprimento e 0,1 a 0,3 μm de diâmetro. Esses cílios ondulam em ritmo uniforme, com uma frequência de 10Hz. Sua função é facilitar o movimento do muco da cavidade nasal para a nasofaringe e, finalmente, para o trato gastrintestinal. O efeito combinado desses cílios é denominado depuração mucociliar. O tempo estimado total de reposição do muco varia de 10 a 15 minutos, aproximadamente, sendo a meia vida de depuração mucociliar estimada em 20 minutos, e a taxa de depuração em torno de 5 mm/min. A depuração mucociliar é basicamente uma função de defesa, mas que constitui uma barreira à absorção de fármacos (AULTON, 2005; HAGERSTROM, 2003; ILLUM, 2003).

A camada de muco tem, normalmente, uma espessura de 5 a 20 μm (AULTON, 2005) e consiste principalmente em 95 % de água, 2 % de mucina, 1 % de sais, 1 % de outras proteínas como albuminas, imunoglobulinas, lisozimas e lactoferrinas, e menos que 1 % de lipídeos. As moléculas de mucina são responsáveis pela característica viscosa do muco (DAVIES; VINEY, 1998). É produzido diariamente cerca de 1,5 a 2,0L de muco, o qual consiste em duas camadas, uma inferior solúvel e a superior gelificada (UGWOKE *et al.*, 2005).

2.5.2. Bio e Mucoadesão

A bioadesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, dentre os quais pelo menos um é de natureza biológica, sejam mantidos juntos por um período prolongado de tempo através de forças interfaciais (SMART, 2005). Na década de 1980 esse conceito começou ser aplicado em sistemas de liberação de fármacos. Ele consiste na incorporação de moléculas adesivas em algum tipo de formulação farmacêutica, a qual fica em contato íntimo com o tecido de absorção, liberando o fármaco perto do local de ação, com o conseqüente aumento da biodisponibilidade, promovendo efeitos locais e sistêmicos (HÄGERSTRÖM, 2003; WOODLEY, 2001).

O potencial dos sistemas mucoadesivos consiste em prolongar o tempo de residência da formulação no local de absorção e promover o contato intensificado com a barreira epitelial (HÄGERSTRÖM, 2003).

As mucosas são as principais vias de administração para os sistemas bioadesivos, embora também seja relatada a necessidade de desenvolvimento de novas formulações bioadesivas para aplicação dérmica, quando se deseja uma ação cutânea prolongada. É difícil esperar um efeito prolongado com a aplicação de cremes, soluções e loções, pois a umidade, a temperatura e os movimentos podem removê-los facilmente da pele (SHIN *et al.*, 2003).

A mucosa mais utilizada para administração e absorção de fármacos é a gastrintestinal (JUNGINGER; THANOU; VERHOEF, 2002), mas outras rotas também são estudadas, como a nasal, ocular, bucal, vaginal, retal, oral e periodontal (BRUSCHI, 2007; HÄGERSTRÖM, 2003; WOODLEY, 2001).

Sistemas bioadesivos aplicados em mucosas freqüentemente são definidos como mucoadesivos, mas os termos podem ser intercambiáveis (LEUNG; ROBINSON,

1990). Há autores que definem sistemas mucoadesivos como aqueles que se liga com as moléculas da camada de muco, mas na verdade, é difícil distinguir se a ligação se dá entre a superfície celular ou entre as moléculas da camada de muco e, além disso, muitos bioadesivos se ligam a ambas as estruturas (WOODLEY, 2001).

É possível delinear um sistema mucoadesivo nas mais variadas formas farmacêuticas, uma vez que a propriedade da adesão depende das características do material utilizado para sua preparação (EVANGELISTA, 2006). Portanto, diferentes sistemas de liberação já conhecidos podem ser formulados utilizando moléculas mucoadesivas, e tornarem-se assim, mucoadesivos. Essa estratégia para conferir mucoadesão foi empregada no desenvolvimento de vários tipos de sistemas de liberação, e alguns exemplos estão citados a seguir.

Sistemas sólidos nano e microparticulados que controlam a liberação do fármaco através da erosão da matriz, podem adicionalmente ter capacidade mucoadesiva se em sua formulação for adicionado polímeros bioadesivos (BRAVO-OSUNA *et al.*, 2007; WITTAYA-AREEKUL; KRUEENATE; PRAHSARN, 2006). As microemulsões podem ser formuladas com polímeros bioadesivos, como o polícarbofil, e manter suas características de estabilidade termodinâmica, isotropia, fluidez e solubilização de fármacos (VYAS *et al.*, 2006). As formulações para higienização bucal também podem empregar polímeros bioadesivos no desenvolvimento de dispersões coloidais para prolongar o contato com a mucosa bucal (KOCKISCH, *et al.*, 2001).

Embora os estudos dos mecanismos envolvidos na mucoadesão e o desenvolvimento de novos sistemas e polímeros mucoadesivos tenham evoluído nos últimos vinte anos, a mucoadesão ainda não é totalmente compreendida. As técnicas empregadas na quantificação e qualificação ainda são tratadas de forma isolada. Uma

ampla revisão sobre o assunto pode ser encontrada em Andrews, Laverty e Jones (2008) e Carvalho *et al.* (2009).

2.5.2.1. Materiais mucoadesivos

O primeiro trabalho que propôs a utilização de um material mucoadesivo foi desenvolvido por Nagai e colaboradores (1984), o qual promoveu a melhora do tratamento local de afta na mucosa oral, utilizando comprimidos adesivos. Adicionalmente, foi observado um aumento da biodisponibilidade sistêmica da insulina quando administrada por via nasal na forma de pó bioadesivo em cães (NAGAI, 1985). A partir de então, materiais bioadesivos passaram a ser utilizados como promotores da absorção através de várias vias de administração. As primeiras experiências utilizaram polímeros já conhecidos e encontrados no mercado, como os ácidos poliacrílicos. Atualmente, as novas pesquisas procuram desenvolver materiais que direcionam a formulação no local de ação, e que além da mucoadesão, ofereça outras funções, como, por exemplo, a modulação da permeação em tecidos epiteliais, e inativação de enzimas que possam inibir a ação do sistema de liberação (HÄGERSTRÖM, 2003).

Há uma variedade de materiais empregados no desenvolvimento desses sistemas e os mais estudados são os polímeros derivados do ácido poliacrílico, como o policarbofil e os carbômeros, polímeros derivados da celulose, como a hidroxietilcelulose e a carboximetilcelulose, os alginatos, a quitosana e derivados e, mais recentemente, os chamados sistemas multifuncionais (GRABOVAC; GUGGI; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2005; SMART, 2005). Esses novos sistemas mucoadesivos multifuncionais são classificados na literatura como polímeros de segunda geração (LEE; PARK; ROBINSON, 2000). Eles são uma alternativa aos bioadesivos não-

específicos (SMART, 2005), pois se ligam ou se aderem em estruturas químicas específicas na superfície das células ou muco. Bons exemplos dessas moléculas são as lectinas, invasinas, proteínas fimbriais (WOODLEY, 2001), anticorpos (CHOWDARY; RAO, 2004) e adição de grupos tiólicos em moléculas já conhecidas (BRAVO-OSUNA *et al.*, 2007).

Há também os hidrogéis que possuem a capacidade de se gelificar *in situ* após o contato com algum estímulo ambiental no local de ação. São os polímeros denominados sensíveis ao ambiente, classificados como termosensíveis, como os poloxâmeros e os carbômeros (BRUSCHI *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2001), sensíveis ao pH, como o ácido poliacrílico, os quais apresentam viscosidade aumentada em valores altos de pH, sensíveis à glicose, como polímeros ligados a concavalina A, sensíveis a um sinal elétrico, como ácido polimetacrílico, sensíveis à luz, como ácido hialurônico (QIU; PARK, 2001) e sensíveis à concentração iônica, como a goma gelana (HAGERSTROM; PAULSSON; EDSMAN, 2000).

Utilizando o mesmo raciocínio, há outra classe de substâncias sendo identificada como mucoadesivas, capazes de formar cristais líquidos (CLs), os quais podem agir como uma matriz de liberação do fármaco, e que devido sua alta viscosidade, pode permanecer por maior tempo em contato com a mucosa (SHAH *et al.*, 2001). Alguns ácidos graxos como os monoglicerídeos monoleato e monolinoleato de glicerila, e copolímeros etoxilados são capazes de formar mesofases líquido cristalinas em presença de água na temperatura corpórea (MALMSTEN, 1996; SHAH *et al.*, 2001; URBAN, 2004). A alta viscosidade dos CLs torna difícil sua administração, mas a administração de um sistema precursor de CL pode levar à formação da rede líquido cristalina após o contato com a mucosa, através de um estímulo orgânico, como temperatura e

concentração de líquidos (BRUSCHI *et al.*, 2007; NIELSEN; SCHUBERT; HANSEN, 1998; SHAH *et al.* 2001).

A mucoadesão tanto dos hidrogéis como das matrizes líquido cristalinas pode ser explicada pelas propriedades reológicas destes sistemas, que diminuem a depuração mucociliar e aumentam o tempo de contato da formulação com a mucosa (BRUSCHI *et al.*, 2007; NIELSEN; SCHUBERT; HANSEN, 1998).

Com o desenvolvimento de materiais mucoadesivos mais inteligentes, é possível oferecer uma característica carreadora única para muitos fármacos. Eles podem ser projetados para aderir em qualquer mucosa, como a nasal, ocular, bucal, respiratória, urinária, gastrintestinal, etc. Os materiais mucoadesivos podem melhorar a biodisponibilidade, diminuir efeitos sistêmicos indesejáveis, melhorar a absorção e transporte de fármacos. Finalmente, com esses materiais é possível empregar fármacos já conhecidos e produzir novos produtos com menores custos.

2.5.2.2. Metodologias para análise da mucoadesão

O número de metodologias empregadas para analisar a mucoadesão está constantemente em crescimento, embora o emprego dos mais diferentes métodos cause às vezes incoerência entre os resultados, os quais ficam difíceis de comparar, devido às diferenças entre os parâmetros e condições experimentais (SIGURDSSO; LOFTSSON; LEHR, 2006). Há várias metodologias propostas, e elas podem ser divididas entre testes *in vivo* e testes *in vitro/ex vivo*.

Como exemplos de testes *in vivo* podem ser citados os que utilizam gamacintilografia (SÄKKINEN *et al.*, 2006) e os que medem o tempo de trânsito gastrintestinal em animais de uma maneira não invasiva; os sistemas de liberação

podem ser formulados com radioisótopos opacos e monitorados por raios-X sem afetar a motilidade normal do trato gastrointestinal (CHOWDARY; RAO, 2004).

Os testes *in vitro/ex vivo* encontrados foram técnicas que utilizam saco intestinal de ratos (SANTOS *et al.*, 1999; TAKEUCHI *et al.*, 2005); técnicas que analisam interações moleculares envolvidas na mucoadesão, como a utilização da espectroscopia dielétrica de baixa frequência (HÄGERSTRÖM; EDSMAN; STRØMME, 2003) e potencial zeta (TAKEUCHI *et al.*, 2005); métodos de escoamento de líquidos que simulam a depuração em mucosas (NIELSEN; SCHUBERT; HANSEN, 1998; RANGO RAO; BURI, 1989); métodos que utilizam imagem, como a microscopia eletrônica (MATHIOWITZ; CHICKERING; LEHR, 1999), microscopia de força atômica (CLEARY; BROMBERG; MAGNER, 2004; MATHIOWITZ; CHICKERING; LEHR, 1999), microscopia de fluorescência e microscopia confocal com varredura a laser (KEELY *et al.*, 2005). Há também os testes que medem a força de mucoadesão e que utilizam reologia, os quais são objetos de pesquisa neste trabalho, e que serão detalhados no próximo item.

Os testes *in vitro/ex vivo* são importantes durante o desenvolvimento do sistema bioadesivo de liberação controlada, pois contribuem para estudos de permeação, liberação, compatibilidade, estabilidade mecânica e física das formulações, análise da interação superficial da formulação com a mucosa e força da ligação bioadesiva. Estes testes podem simular as mais diferentes mucosas, como nasal, oral, bucal, periodontal, vaginal, nasal, gastrointestinal, vaginal e retal (BRUSCHI; FREITAS, 2005), e diminuir assim o uso de animais.

2.5.2.2.1. Métodos que medem a força de mucoadesão

A maioria das metodologias *in vitro/ex vivo* encontradas na literatura baseia-se na avaliação da força de mucoadesão, ou seja, da força requerida para quebrar a ligação entre a membrana modelo e o mucoadesivo. Dependendo da direção em que o mucoadesivo é separado do substrato, pode-se obter a força de destacamento, a força de cisalhamento e a força de tensão à ruptura (HÄGERSTRÖM, 2003), conforme indicado na Figura 3.



Figura 3: Representação das forças que podem ser medidas em testes de mucoadesão.

O tipo de força mais avaliado nesses testes é a tensão à ruptura (BROMBERG *et al.*, 2004; BRUSCHI *et al.*, 2007; HÄGERSTRÖM, 2003). O equipamento é normalmente um analisador de textura ou uma máquina universal de ensaios, o qual mede a força aplicada na remoção da formulação a partir de uma membrana modelo, que pode ser um disco de mucina (BRUSCHI *et al.*, 2007) ou um pedaço de mucosa animal, como mucosa nasal suína (HÄGERSTRÖM, 2003) e mucosa de intestino de rato (BROMBERG *et al.*, 2004). A partir dos resultados obtidos, pode ser construída a curva força-distância, em que são obtidos a força de separação e o tempo de contato (BRUSCHI *et al.*, 2007), o trabalho de tração (área sob a curva durante a retirada da mucosa), o pico de força e a deformação do sistema até a ruptura (HÄGERSTRÖM, 2003). Esse método é mais utilizado para analisar sistemas sólidos, como microesferas

(CHOWDARY; RAO, 2004), embora haja também estudos de materiais semi-sólidos (BROMBERG *et al.*, 2004; BRUSCHI *et al.*, 2007).

2.5.2.2. Métodos reológicos

Essa categoria de métodos é realizada totalmente *in vitro* e foi proposta primeiramente por Hassan e Gallo (1990), utilizando ensaios viscosimétricos para analisar macroscopicamente a interação formulação-mucina. A partir desse teste, é possível obter a força de mucoadesão através do monitoramento das mudanças viscosimétricas do sistema formado pela mistura da mucina e o do sistema escolhido.

A maior desvantagem desse método é quebra das cadeias formadas pelo sistema e a mucina sob escoamento contínuo. Para evitar esse problema, adaptou-se método viscosimétrico utilizando a reologia oscilatória (CALLENS, *et al.*, 2003; HÄGERSTRÖM, 2003). Partindo do mesmo pressuposto de que a resposta reológica da mistura sistema-mucina deve ser maior que as contribuições da formulação e da mucina isolados, pode ser obtido o parâmetro denominado sinergismo reológico ou parâmetro de interação. Esse método é mais vantajoso em relação ao de origem, pois a reologia oscilatória é uma técnica não destrutiva, a qual mede, simultaneamente, tanto a viscosidade como o comportamento viscoelástico e pode ser usada para determinar mucoadesão entre o sistema mucoadesivo e mucina (CALLENS *et al.*, 2003).

Nos ensaios oscilatórios podem ser obtidos os módulos elástico (G') e viscoso (G'') e a magnitude destes módulos é uma indicação qualitativa da estrutura do sistema. Se $G' \gg G''$, pode-se sugerir que o sistema está interligado quimicamente, ou se $G' > G''$ o sistema está estruturado por ligações secundárias, mas se $G' \leq G''$, diz-se que as moléculas do sistema estão ligadas apenas por interações físicas (CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIG, 2002).

A medida quantitativa do sinergismo reológico ($\Delta G'$) pode ser calculada tanto em relação ao G' como ao G'' (CALLENS *et al.*, 2003; CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIG, 2002), como segue na Equação 1.

$$\Delta G' = G'_{mistura} - [G'_{sistema} + G'_{mucina}] \quad (\text{Eq. 1})$$

Sob uma tensão constante e em baixas frequências, sistemas mais estruturados apresentam o módulo elástico G' maior que o viscoso G'' e ambos são independentes da frequência. Num gráfico duplo logarítmico são representados por uma reta constante. Para sistemas mais fracamente estruturados, os módulos dinâmicos são dependentes da frequência e é observada nesse mesmo gráfico uma inclinação da curva (CALLENS *et al.*, 2003; CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIG, 2002).

Hägerström (2003) expõe um parâmetro de sinergismo reológico alternativo, denominado parâmetro de sinergismo reológico relativo ($\Delta G'_{relativo}$), calculado a partir da Equação 2 e com o qual é possível comparar quantitativamente a força da mistura sistema-mucina em relação ao sistema isolado:

$$\Delta G'_{relativo} = \frac{\Delta G'}{G'_s} = \frac{(G'_{mistura} - G'_s)}{G'_s} \quad (\text{Eq. 2})$$

em que $\Delta G'$ é o sinergismo reológico, dado pela diferença do módulo elástico da mistura ($G'_{mistura}$) e o módulo elástico do sistema (G'_s). Com essa relação, pode ser consideradas quantas vezes a mistura da formulação com a mucina é mais forte ou mais fraca que a formulação sozinha.

Entretanto, $\Delta G'_{relativo}$ tem a desvantagem de ter um limite negativo até -1, enquanto que os valores positivos vão até o infinito. Por isso, a magnitude dos valores positivos não pode ser comparada com os negativos. É proposto então um novo parâmetro relativo, chamado relação logarítmica do módulo elástico ($\log G'$), dado pelo

logaritmo da divisão do módulo elástico da mistura (G'_{mis}) pelo módulo elástico do sistema (G'_s), indicado na Equação 3.

$$\log G' = \log \left(\frac{G'_{mis}}{G'_s} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

O uso desse parâmetro oferece a vantagem dos valores positivos e negativos terem a mesma magnitude e poderem ser comparados. Por exemplo, o valor 1 significa que o G' da mistura é 10 vezes maior que do sistema isolado. Esta relação pode ser feita desde que não atinja valores na escala negativa (HÄGERSTRÖM, 2003).

2.6. Sistemas de liberação estabilizados com tensoativos

Moléculas de tensoativos podem se auto-agregar na presença de água formando uma rica variedade de estruturas. Quando são incorporados em misturas imiscíveis de óleo e água, eles podem se localizar na interface óleo/água, resultando em diferentes estruturas de escala macroscópica ou microscópica, como as MEs e CLs. A Figura 4 dá uma indicação das possíveis estruturas que os tensoativos podem formar na presença de água, óleo, ou na combinação de ambos (LAWRENCE; REES, 2000). Esse fenômeno comum de auto-organização molecular para atingir a estabilidade termodinâmica é a base para a aplicação tecnológica dos tensoativos como potencial sistema de liberação de fármacos.

A mistura de componentes de diferentes polaridades, com diferentes constantes dielétricas, como óleo e água, na presença do tensoativo, agregam-se de tal forma a possibilitar diferentes regiões adicionais de solubilização (KREILGAARD, 2002). Essa propriedade possibilita compartimentalizar o fármaco, podendo direcioná-lo para os

sítios onde deverá exercer o efeito farmacológico, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada, sendo considerados, portanto sistemas reservatórios. Nestes tipos de sistemas, o fármaco encontra-se separado do meio de dissolução através de um revestimento, uma membrana, ou uma interface, devendo transpor essa barreira para ser liberado do meio. As MEs e CLs são sistemas reservatórios, nos quais a face interna constitui um microambiente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

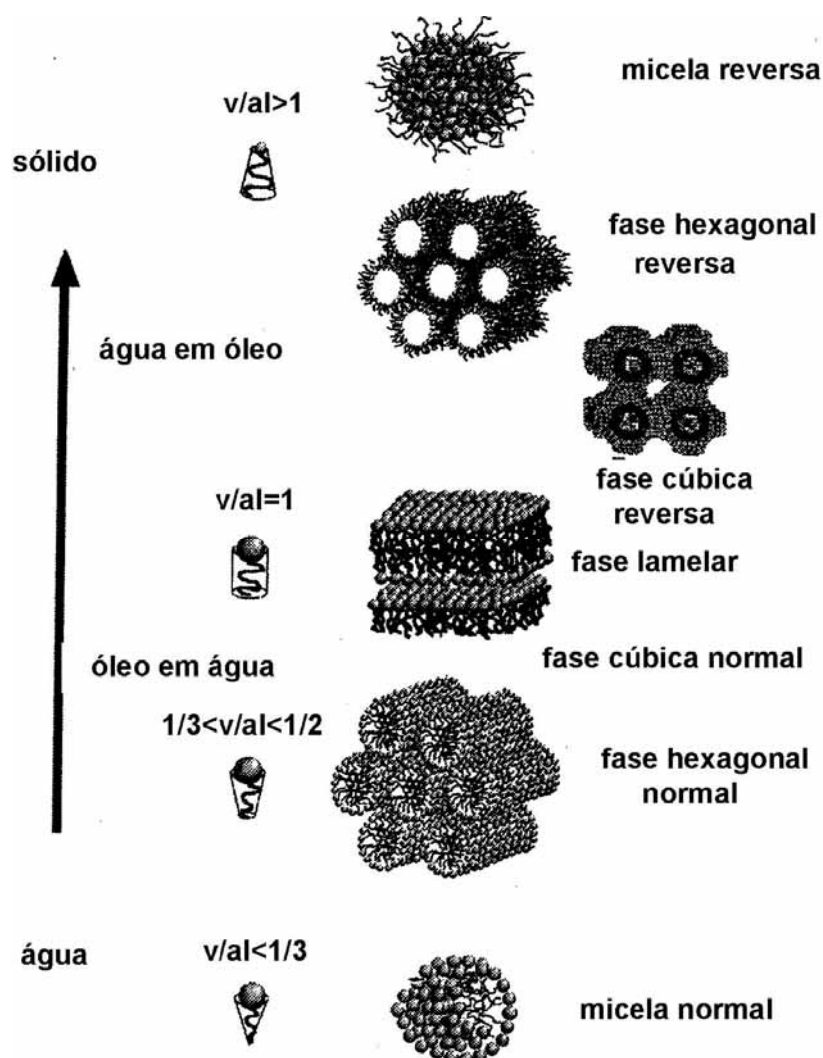


Figura 4: Seqüência teórica dos diferentes tipos de fases formadas dependendo do parâmetro de empacotamento, dado pela geometria do tensoativo, teor de água, e outros fatores como temperatura, presença de sais etc.

Fonte: LOPES, 2005.

2.6.1.Diagrama de fases

Como a existência dos diferentes tipos de agregados é decorrente do comportamento termodinâmico exibido pelas diferentes combinações dos componentes do sistema, pode ser utilizado um diagrama ternário para avaliar o comportamento de fases de sistemas dessa natureza. Eles são constituídos na forma de triângulos equiláteros, onde os lados são usados como eixos, correspondendo aos constituintes. Geralmente, a proporção de cada componente é representada como porcentagem de peso total da formulação, e assim, cada vértice corresponde a 100% do componente indicado.

No interior do triângulo, o comportamento termodinâmico é descrito delimitando-se as regiões em que ocorrem MEs, CLs, emulsão ou separação de fases. Tais diagramas possibilitam a visualização simultânea entre a quantidade relativa dos constituintes e o decorrente comportamento físico-químico do sistema obtido. Desta forma, os diagramas são como ferramentas capazes de identificar as regiões em que ocorrem as MEs e CLs e, através deles os pesquisadores podem escolher sistemas com viscosidade e características apropriadas aos seus propósitos (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

2.6.2.Microemulsões e Cristais Líquidos

As MEs são definidas como sistemas transparentes, caracterizados pela mistura de óleo, água, tensoativo e co-tensoativo, formando um sistema isotrópico, termodinamicamente estável e que se forma espontaneamente. São geralmente caracterizados como agregados esféricos com diâmetro muito pequeno, na faixa de 5 nm a 140 nm, enquanto que o diâmetro das gotículas de uma emulsão estável é da ordem de 0,1 μm a 100 μm . As MEs são classificadas como sistemas coloidais com

diâmetro de partícula menor que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente e, portanto, não espalham luz. Este fato explica porque as MEs são sistemas opticamente transparentes. As MEs diferem das emulsões comuns não só por serem transparentes, mas essencialmente pela estabilidade termodinâmica. A utilização de co-tensoativos em MEs não é obrigatória, e sistemas microemulsionados formados na sua ausência têm sido descritos na literatura (AULTON, 2005; LAWRENCE; REES, 2000). Dados da literatura sugerem que microemulsões A/O possam ser usadas para aumentar significativamente a absorção de moléculas hidrossolúveis (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Os CLs são sistemas cujas características físicas os posicionam entre sólidos e fundidos, com parcial ordem/desordem das espécies atômicas. Por esse motivo, são também chamados de mesofases (HYDE, 2001). Podem ser consideradas estruturas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. Conforme altera a concentração de tensoativo, diferentes formas líquido-cristalinas podem ser formadas, como lamelares, hexagonais e cúbicas. Materiais que formam CLs pela adição de solventes são chamados CLs liotrópicos, enquanto CLs termotrópicos têm sua estrutura dependente da temperatura. A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede unidimensional. Já na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bidimensionais. Nos sistemas de fase cúbica, as moléculas estão arranjadas numa estrutura tridimensional, a qual consiste de duas redes congruentes de canais de água envolvidos por bicamadas lipídicas ou de tensoativo (FORMARIZ *et al.*, 2005, URBAN, 2004). Vários autores reportam que estruturas líquido cristalinas apresentam baixas velocidades de liberação de fármacos, já que os CLs possuem microestruturas altamente organizadas e alta viscosidade (MUELLER-GOYMANN; HAMENN, 1993; TROTTA *et al.*, 1995).

Para entender a formação destas estruturas, deve-se levar em consideração a composição do sistema, presença de sais, óleos e co-tensoativos, temperatura e estrutura do tensoativo. Para formação de lamelas, os tensoativos normalmente têm a forma cilíndrica, e para formação da fase hexagonal e micelar, ele ocupa a área de um cone. Para entender qual tipo de estrutura do tensoativo é preferida para formar determinado sistema, pode ser considerado o parâmetro de empacotamento crítico (PEC), definido como $PEC = v/a.l$, em que v é volume da cadeia hidrofóbica, a é área da cabeça polar e l o comprimento da cadeia hidrofóbica. Como pode ser visto na Figura 4, há uma correlação direta entre os valores de PEC e o tipo de agregado formado (MALMSTEN, 1999).

Na literatura são reportadas inúmeras maneiras de se aplicar estes sistemas na liberação de fármacos, mas em particular, para a via nasal, não há muitos relatos. Como exemplos, podem ser citados os estudos que utilizam a via nasal como rota para atingir o sistema nervoso central, como MEs compostas de polioxietileno-35-ricinoleato como tensoativo e polisorbato 80 como co-tensoativo para liberação do clonazepam (VYAS *et al.*, 2006a), e compostas pelo tensoativo glicerídeo macrogol caprilcaproil, mistura de dietilenoglicol éter monoetílico como fase oleosa e polietilenoglicol como co-tensoativo para liberação do sumatriptam (VYAS *et al.*, 2006b). Foi encontrado também ME composta por Tween 80 como tensoativo e pela mistura de propilenoglicol e etanol como co-tensoativos para rápida liberação nasal do diazepam (LI; NANDI; KIM, 2002).

2.6.3. Caracterização físico química

Para identificar as fases ou investigar as suas microestruturas, deve-se garantir primeiramente que elas estejam quimicamente estáveis, em equilíbrio (MALMSTEN, 1999).

2.6.3.1. Microscopia de Luz Polarizada

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

Alguns CLs exibem estruturas anisotrópicas, e com isso são obtidas imagens característica do tipo de fase formada. Por exemplo, a fase lamelar pode ser identificada através da visualização das “cruzes de malta” e a fase hexagonal através da presença de estrias ou estruturas parecidas com fibras. Já as estruturas isotrópicas como as MEs e as fases cúbicas, por não desviarem a propagação da luz polarizada, são visualizadas como campo escuro.

2.6.3.2. Reologia

Na década de 1990 houve aumento no interesse em estudos reológicos de CLs liotrópicos devido à semelhança desses sistemas coloidais com sistemas em organismos

vivos. Além disso, dependendo da concentração do solvente (água ou soluções aquosas) e da polaridade do solvatado, os CLs podem submeter-se a várias transformações e modificações estruturais (MAKAI *et al.*, 2003). Essa resposta reológica durante o processo está diretamente relacionada com as mudanças na microestrutura, a qual pode contribuir significativamente para benefícios funcionais. A reologia ajuda a estabelecer um entendimento teórico das relações entre as propriedades viscoelásticas e as microestruturas do sistema (SIDDIG; RADIMAN; MUNIANDY, 2006).

A correlação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento que define o comportamento de fluxo de um líquido é mostrada graficamente em diagramas chamados de curvas de fluxo. Os diferentes tipos de curva de fluxo têm seus correspondentes tipos de curva de viscosidade. As curvas de fluxo representam duas partes do experimento, a curva ascendente que indica o aumento da taxa de cisalhamento, e a curva descendente, quando a taxa de cisalhamento é reduzida continuamente (SCHRAMM, 2006).

A curva ascendente representa o comportamento do fluxo, que pode ser comportamento de fluxo newtoniano, pseudoplástico, plástico e dilatante. O fluxo newtoniano é representado por uma reta, e a razão de todos os pares de valores de tensão e taxa de cisalhamento pertencentes a essa reta é constante. Isso significa que a viscosidade não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento, já que ela é a tangente do ângulo α . O fluxo é pseudoplástico quando sofre diminuição de viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta. Esse aumento favorece a reorientação das partículas rígidas na direção do fluxo, e as interações intermoleculares que causam resistência ao fluxo tornam-se menores, provocando o afinamento do fluxo, conhecido por *shear thinning*. O fluxo plástico é descrito como os líquidos pseudoplásticos, mas com limite

de escoamento, e na curva intercepta a ordenada não na origem, mas no ponto crítico (*yield point*). O comportamento de fluxo dilatante é caracterizado pelo aumento da viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta (SCHRAMM, 2006).

A partir da curva descendente obtemos informações quanto à tixotropia do sistema. Um líquido tixotrópico é definido pelo seu potencial de ter uma estrutura reversível, sempre que a amostra for mantida em repouso, e essa mudança deve ser reproduzível diversas vezes. A reconstrução pode ser tempo independente quando as curvas de ida e de volta se sobrepõem, indicando que o sistema reverte rapidamente para sua estrutura original. Será tempo dependente quando a viscosidade retorna a aumentar mais lentamente do que diminuiu inicialmente com o *shear thinning*, e entre as duas curvas forma uma área de histerese, que define a magnitude da tixotropia. Essa área indica a energia necessária para quebrar a estrutura tixotrópica. Graficamente, a histerese da curva de fluxo gira no sentido horário (SCHRAMM, 2006).

2.6.3.3. Espalhamento de raios X a baixo ângulo

A utilização da técnica de Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) na caracterização de sistemas é explicada pela possibilidade de se determinar o tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada.

Ao irradiar uma amostra bifásica numa plaqueta relativamente fina, com um feixe de luz monocromático (luz visível, raios-x, nêutrons, elétrons), observa-se o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. O espalhamento de raios X deve-se às heterogeneidades na densidade eletrônica das

estruturas do sistema. Considerando uma partícula de tamanho e forma qualquer, a intensidade espalhada $I(q)$ é proporcional ao fator de forma $P(q)$ desta partícula, em que q é o vetor de espalhamento (NIELSEN *et al.*, 1993).

É possível observar diferentes regiões na curva de intensidade do feixe espalhado em função do vetor de espalhamento q , as quais são exploradas na técnica de SAXS, como a região de Porod para altos valores de q , e para valores em baixos limites de q tem-se a região de Guinier. Nessas regiões é onde ocorre o espalhamento de raios-X a baixo ângulo, que fornece informações a respeito da morfologia e mecanismos de agregação estrutural (CHIAVACCI, 1996).

Num sistema diluído, em que as partículas são isoladas uma das outras e não interagem entre si, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma $P(q)$ (GUINIER, 1964). Sistemas formados pela associação de água, óleo, estabilizados com quantidades de tensoativo abaixo da concentração micelar crítica (CMC) requerida, a intensidade obtida pelo SAXS pode ser similar à observada em partículas diluídas ou monodispersas. A intensidade resultante é a soma das contribuições de cada partícula, de modo que, para n partículas distribuídas ao acaso têm-se:

$$I(q) \propto \sum_n P_n(q) \quad (\text{Eq. 4})$$

Em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si, e o espalhamento medido refletirá sua geometria e arranjo. Sistemas cuja concentração de tensoativo é superior à CMC, as interações entre as moléculas de tensoativo começam a ocorrer em diferentes graus de organização. O padrão de espalhamento poderá então ser similar ao observado em partículas dispersas numa matriz homogênea (FORMARIZ *et al.*, 2007). Para N partículas idênticas, distribuídas

ao acaso, a intensidade espalhada é descrita pela Equação 5, em que $S(q)$ é o fator de estrutura do conjunto:

$$I(q) = N \cdot P_{(q)} \cdot S_{(q)} \quad (\text{Eq. 5})$$

Entretanto $S_{(q)}$ pode assumir formas muito variadas, de acordo com o arranjo das entidades espalhadoras, e será difícil separar as contribuições de $P_{(q)}$ e $S_{(q)}$. De modo geral, quando a curva de espalhamento apresenta um máximo de espalhamento a baixos ângulos, pode relacioná-la com a presença de correlações entre as posições dos centros espalhadores. Pode-se deduzir uma distância média d , entre duas gotículas ou planos vizinhos, a partir do valor da posição do vetor de espalhamento quando a intensidade é máxima (q_{max}), empregando a relação:

$$d = \frac{2\pi}{q_{max}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Em sistemas como micelas e MEs, as curvas de SAXS apresentam uma banda ou pico amplo, associado com a baixa correlação espacial 3D (BEAUCAGE *et al.*, 1995). Para estes casos, é proposto um modelo de intensidade de espalhamento produzido por partículas esféricas e densas:

$$I(q) = G \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) + B \left\{ \frac{\left[\text{erf}\left(\frac{q R_g}{\sqrt{6}}\right) \right]^3}{q} \right\}^P * S(q) \quad (\text{Eq. 7})$$

sendo G a intensidade para q tendendo a zero relacionada à Lei de Guinier, B é a constante de Porod, uma constante específica ao tipo de lei de potência descrita por Porod e o expoente P , conhecido como expoente de Porod é associado à morfologia da

superfície das partículas (por exemplo, no caso de partículas de superfície lisa $P = 4$) e $S(q)$ é o fator de estrutura. Com esse modelo é possível determinar parâmetros estruturais como o raio de giro (R_g) e a distância média d entre as gotículas. No caso de sistemas em que existe correlação entre gotículas esféricas, o fator de estrutura pode ser descrito pela seguinte equação:

$$S(q) = \frac{1}{1 + k \left[3 \frac{\text{sen}(qd) - qd \cos(qd)}{(qd)_3} \right]} \quad (\text{Eq. 8})$$

k é o fator de compactação, relacionado ao grau de empacotamento das gotículas. Quanto maior o valor de k , mais próximas as gotículas estão,

Já sistemas cristalinos randomicamente orientados podem também se agregar formando domínios exibindo estruturas uni, bi e tridimensionais. A intensidade $I(q)$ produzida exibe forma máxima (ou picos de Bragg) para valores específicos do vetor de espalhamento q . Se a curva de espalhamento contiver vários picos, suas posições no eixo q revelam o tipo de estrutura cristalina, e permite calcular parâmetros estruturais (KLUG, 1954).

A estrutura hexagonal, lamelar e cúbica de cristais líquidos liotrópicos pode ser aferida de acordo com a posição dos picos de difração no eixo do vetor de espalhamento q . Para estruturas lamelares, a posição relativa dos picos (em relação ao primeiro pico mais intenso) deve obedecer a relação $1 \div 2 \div 3 \dots$, enquanto que, para estruturas hexagonais a relação esperada é $1 \div \sqrt{3} \div 2 \div \sqrt{7} \dots$ (HOLMQVIST; ALEXANDRIDIS; LINDMAN, 1997).

O parâmetro espacial d da Equação 6 para estruturas lamelares mede a distância entre duas lamelas adjacentes, e para estruturas hexagonais mede a distância entre o centro de dois cilindros (Figura 5).

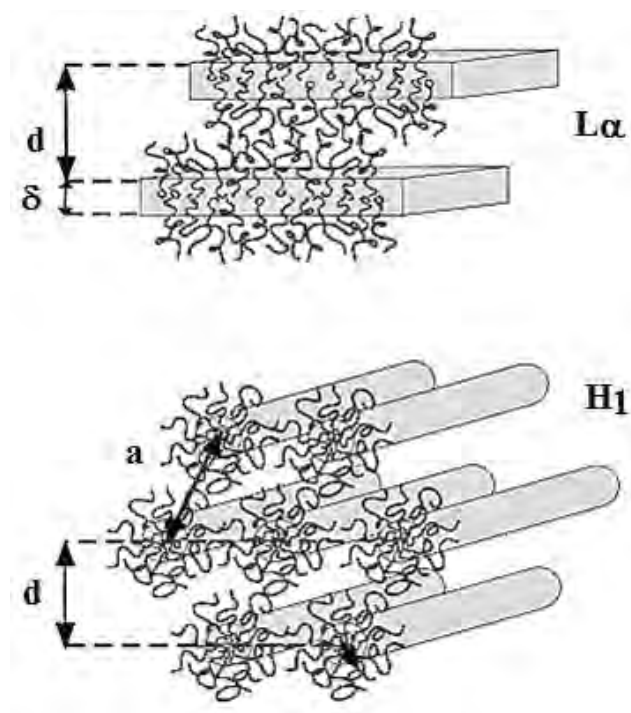


Figura 5: Representação esquemática da auto-organização de tensoativos em estruturas lamelares e hexagonais (HOLMQVIST; ALEXANDRIDIS; LINDMAN, 1997).

A partir do espaçamento estrutural entre lamelas e cilindros, é possível calcular a espessura do domínio apolar das lamelas δ e raio do cilindro R_H , caso seja um sistema hexagonal normal (H_1).

$$\delta = fD \quad (\text{Eq. 9})$$

$$R_H = \sqrt{\frac{2f}{\pi\sqrt{3}}} d \quad (\text{Eq. 10})$$

em que f é o volume da fração apolar dos componentes do sistema água – óleo – tensoativo.

O espaço entre o centro de duas lamelas ou dois cilindros é chamado de parâmetro de rede a . Para estruturas lamelares, pode ser calculado segundo a equação:

$$a = \frac{2\pi n}{q_{\max}} \quad (\text{Eq. 11})$$

Em que n é o período lamelar. Para mesofases hexagonais, a partir da medida do vetor de espalhamento q , o cálculo se dá pela seguinte equação:

$$a = \frac{4\pi}{q_{\max}} \times \frac{1}{\sqrt{3}} \quad (\text{Eq. 12})$$

2.6.4. Componentes

Embora muitas microemulsões tenham sido descritas na literatura, um grande desafio para o pesquisador farmacêutico é predizer quais os óleos e tensoativos mais adequados para uma determinada aplicação, levando em conta sua aceitabilidade e o seu potencial tóxico.

Os tensoativos não iônicos são os mais aplicados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, pois sua concentração micelar crítica é geralmente muito menor que dos tensoativos ionicamente carregados, e por isso são menos irritante e mais tolerados (MALMSTEN, 1999).

Os tensoativos empregados neste trabalho foram do tipo álcool graxo etoxilado e propoxilado, cuja fórmula geral está na Figura 6. O radical R representa a cadeia graxa tipo álcool graxo que se liga às unidades de OE (Y) e OP (X). Os alcoóis graxos utilizados foram o álcool laurílico e álcool cetílico. Os tensoativos testados foram o álcool laurílico etoxilado 6 OE e propoxilado 3 OP (AL63, X=3, Y=6), álcool laurílico

etoxilado 3 OE e propoxilado 6 OP (AL36, X=6, Y=3), álcool laurílico etoxilado 4 OE e propoxilado 5 OP (AL45, X=5, Y=4) e álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (AC205, X=5, Y=20).

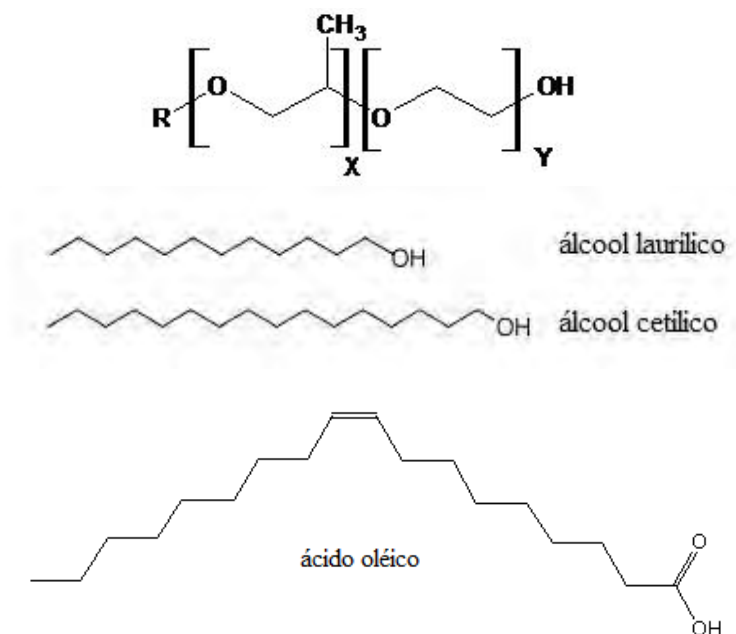


Figura 6: Fórmula estrutural de tensoativos tipo álcool graxo OE OP, alcoóis laurílico e cetílico e ácido oléico.

O AC205, cujo INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) é PPG-5-CETETH-20 e nome comercial é Procetyl AWS[®], apresenta-se como líquido incolor, odor leve característico, EHL=16, pH (sol. aquosa 3%, 25°C) = 5,5-7,5, densidade relativa = 1,050 e completamente solúvel em água e etanol. Não é irritante para pele e DL₅₀ (oral, ratos) de 3050 mg.kg⁻¹ (CRODA, 2002).

O ácido oléico é um óleo líquido incolor, insolúvel em água, obtido pela hidrólise de óleos vegetal e animal, e com densidade relativa = 0,895. Na presença de ar, oxida-se e adquire coloração amarela e odor rançoso (MERCK, 1996). É conhecido como agente de permeação (MARTINDALE, 2007), e já foi utilizado com esta finalidade em sistemas de liberação transdérmica do AZT incorporado em gel de hidroxipropilmetilcelulose (NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2004a).

OBJETIVO

3. OBJETIVO

Desenvolver um sistema coloidal para administração intranasal do AZT, a fim de diminuir seus problemas relacionados à toxicidade e a baixa meia vida. Para isso, foram desenvolvidos e caracterizados sistemas estabilizados com tensoativos tipo álcool graxo etoxilado e propoxilado, ácido oléico como fase oleosa e água, visando obter um sistema que, ao absorver fluidos fisiológicos na cavidade nasal, se converta numa mesofase líquido cristalina de alta viscosidade, promovendo maior mucoadesão.

Objetivos específicos

- Construção dos diagramas de fases;
- Caracterização físico-química dos sistemas de interesse;
- Ensaio de incorporação e quantificação do AZT nas formulações;
- Análises da mucoadesão;
- Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinação do perfil de liberação do fármaco *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Matérias Primas

- Acetonitrila, J.T. Baker, HPLC;
- Ácido oléico, Synth, Brasil;
- Água deionizada Milli Q;
- Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP, Procetyl[®], Croda;
- Álcool laurílico etoxilado 3 OE e propoxilado 6 OP, Alkomol 306, Oxyteno;
- Álcool laurílico etoxilado 4 OE e propoxilado 5 OP, Alkomol 405, Oxyteno;
- Álcool laurílico etoxilado 6 OE e propoxilado 3 OP, Alkomol 603, Oxyteno;
- Cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio dihidratado;
- Metanol, Synth, Brasil;
- Mucina tipo II crua de estômago suíno, Sigma-Aldrich;
- Zidovudina, Fundação para o Remédio Popular, FURP.

Equipamentos

- Analisador de imagem Leica;
- Analisador de textura TAXTplus, Stable Micro System[®], localizado no Laboratório Central Analítico da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP;
- Balança digital Ohaus;
- Banho de ultrassom, Branson, modelo 1210;
- Bomba a vácuo, Tecnal – TE – 058;

- Centrífuga Sorval, modelo TC 6 Du Pont;
- Cubetas de quartzo para espectrofotometria, capacidade 5 mL, caminho óptico de 1 cm – Spectrocell;
- Espectrofotômetro de UV-VIS, Hewlett Packard 8453, com HP UV-Visible ChemStation Software;
- Estação de dissolução Dissolution SRO plus, Hanson Research, Chatsworth, USA;
- Filtros descartáveis para seringas, porosidade 0,22 µm, Corning[®] Incorporated;
- Fita adesiva dupla face;
- Homoginizador de tubos, modelo AP22, Phoenix;
- HPLC Varian, módulo de distribuição de solvente ProStar/Dynamax[®] 210/215, detector espectrofotométrico ProStar[®] 330 UV-VIS PDA e Rheodine[®] VS 7125, válvula de injeção com um *loop* de 100µL, coluna RP-18 (Varian[®] - Chromsep[®]) 250 mm x 4.6mm I.D. 5µm tamanho de partícula
- Membrana de diálise de acetato de celulose 12 kDa cutt-off;
- Micro pipeta de 100 e 1000 mL Pipetman, Gilson;
- Microscópio Leitz DMRXE;
- Microscópio de Luz Polarizada, Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena;
- Peleteira Pellet Press, Parr Instrument Company, Moline, IL, USA;
- Pipeta de Pasteur;
- Pipetador automático Gilson capacidade 10 – 1000 µL;
- Pipetas graduadas 1,0 a 10 mL;
- Provetas 500 e 1000 mL;

- Reômetro, Carri Med, modelo CSL100, instalado no departamento de Físico-Química, Instituto de Química – UNESP – Araraquara;
- Seringas 5 mL;
- Sistema de purificação de água Millipore, Milli-Q Plus;

4.2.MÉTODOS

4.2.1.Construção dos diagramas de fases e escolha do tensoativo

Foi construído o diagrama de fases ternário através da titulação com água utilizando o ácido oléico como fase oleosa e alcoóis graxos etoxilado e propoxilado como tensoativos.

As alterações ocorridas nos sistemas a cada alíquota de água adicionada foram analisadas visualmente. Calculou-se a porcentagem de cada componente após esse acréscimo de água, obtendo-se pontos os quais delimitaram as diferentes regiões existentes no diagrama.

Os tensoativos testados foram:

- Álcool laurílico etoxilado 4 OE e propoxilado 5 OP (AL45)
- Álcool laurílico etoxilado 3 OE e propoxilado 6 OP (AL36)
- Álcool laurílico etoxilado 6 OE e propoxilado 3 OP (AL63)
- Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (AC205)

4.2.2. Caracterização físico química e estrutural das formulações.

Foram analisados dois conjuntos de formulações no diagrama do tensoativo AC205 para caracterização do comportamento de fases conforme se muda a razão água/ óleo e água/ tensoativo.

No primeiro grupo, a percentagem de tensoativo foi fixada em 55% e variou-se a razão água/ óleo (Tabela 3). Na segundo, manteve-se fixa a percentagem de fase oleosa em 15% e variou-se a razão água/ tensoativo (Tabela 4).

Tabela 2: Formulações em que a proporção de tensoativo é fixa, e as proporções de óleo e água variam.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
% ácido oléico	35	30	25	20	15	10	5
% AC205	55	55	55	55	55	55	55
% água	10	15	20	25	30	35	40

Tabela 3: Formulações em que a proporção de óleo é fixa, e as proporções de tensoativo e água variam.

	F8	F9	F10	F11
% ácido oléico	15	15	15	15
% AC205	70	65	60	50
% água	15	20	25	35

4.2.2.1. Microscopia de luz polarizada

As amostras foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena) sob luz polarizada.

4.2.2.2. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

O arranjo estrutural das mesofases e das MEs foi analisado a partir de medidas de SAXS a temperatura ambiente. Os dados foram coletados em uma estação de medidas do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas na estação D11A, equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1,608 Å. A intensidade de espalhamento $I(q)$ foi expressa em unidades arbitrárias, e o espalhamento do parasita (espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra) foi subtraído da intensidade total da amostra.

4.2.3. Avaliação da incorporação do AZT nos sistemas

4.2.3.1. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de AZT por espectroscopia UV.

- **Curva de calibração:** foi conduzida segundo as condições preconizadas na Farmacopéia Americana (USP XXVI) – solvente: metanol, solução estoque de AZT em metanol 1 mg/mL, comprimento de onda 265 nm. A partir da solução estoque prepararam-se soluções padrões na faixa de concentração de 1,0 a 40,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e as leituras das absorbâncias foram realizadas no espectrofotômetro HP 8453.
- **Linearidade:** confirmada através do coeficiente de determinação (r^2) obtido a partir da regressão linear.
- **Especificidade:** avaliada através da obtenção dos espectros de absorção da formulação F3 sem AZT em metanol, da solução de AZT na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e da formulação F3 com AZT incorporado na mesma concentração diluída em metanol.

- **Precisão e exatidão:** testados pelas leituras da absorbância das soluções padrões em triplicata, nas concentrações de 5, 15 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, correspondendo a concentrações baixa, média e alta, dentro da faixa de concentração da curva de calibração. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV) e a exatidão pela porcentagem de recuperação. As amostras utilizadas para o teste de exatidão foram as mesmas usadas para o teste de precisão.
- **Limite de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ):** foram determinados obtendo-se as leituras das absorbâncias das soluções padrões nas concentrações de 1,0, 1,3 e 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, as quais correspondem às concentrações mais baixas dentro da faixa de concentração utilizada na construção da curva de calibração. Através das absorbâncias obtidas, com a equação da reta calcularam-se as correspondentes concentrações. Estes valores foram substituídos nas equações para o cálculo de LQ e LD.

4.2.3.2. Determinação da incorporação do AZT nos sistemas selecionados e nos seus diferentes componentes.

A incorporação de AZT nas formulações F1, F2 e F3, e em cada componente – ácido oléico, AC205 e água, foram determinadas adicionando em 3 g de cada amostra um excesso de fármaco. Elas foram lacradas, protegidas da luz e submetidas à agitação constante sob temperatura controlada a 25 °C, por 48 h. Finalizada a agitação, as formulações foram centrifugadas (centrífuga Du Pont – Sorvall TC 6) a 3800 rpm por 20 min. O sobrenadante foi adequadamente diluído em metanol para quantificação por espectrofotometria em comprimento de onda 265 nm. Os valores de concentração de AZT foram calculados através da equação da reta, a partir dos valores de absorbância obtidos

Para a formulação F4, devido a sua alta viscosidade, não foi possível a agitação e nem a centrifugação, e a determinação da sua incorporação do AZT foi modificada. A 3 g de formulação, acrescentou-se concentrações crescentes de AZT (30 a 50 mg.g⁻¹), em triplicata. Após uma semana em repouso sob temperatura controlada (25 °C), cada amostra representando uma concentração foi visualizada no microscópio (Jenamed 2, Carl Zeiss, Jena) para a observação da presença ou ausência de cristais insolúveis de AZT. A concentração máxima em que foi possível solubilizar o AZT em F4 foi confirmada pelos valores de absorbância obtidos.

A comparação entre as quantificações foi analisada pela ferramenta estatística Análise de Variância (ANOVA) fator único.

4.2.3.3. Efeito da incorporação do AZT na evolução estrutural das formulações

As formulações F1, F2, F3 e F4 foram incorporadas com 40 mg.g⁻¹ de AZT e caracterizadas por MLP, SAXS e ensaio de escoamento. As formulações carregadas com o fármaco foram nomeadas como F1A, F2A, F3A e F4A.

O ensaio de escoamento foi realizado variando a velocidade de cisalhamento de 0 a 500 s⁻¹. O reômetro utilizado foi Carrimed CSL 100. As formulações foram testadas à temperatura controlada de 25 °C ± 5 °C. Cada amostra foi cuidadosamente aplicada à placa inferior ou dentro do estator do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão induzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação.

4.2.4.Avaliação da mucoadesão

4.2.4.1.Efeito da água na estrutura das formulações

Nas formulações F1, F2, F3, F4 e F1A, F2A, F3A, F4A foi acrescentado 5, 10, 30, 50 e 100% de água em relação à massa inicial. As amostras representativas de cada porcentagem de água adicionada foram caracterizadas por MLP e reologia oscilatória.

A análise oscilatória foi realizada nas temperaturas de 25 e a 32 °C, para simular a temperatura nasal (CALLENS *et al.*, 2003), utilizando um reômetro Carrimed CSL 100 (TA Instruments) no modo oscilatório, com geometria de placas paralelas de 2,0 cm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,2 mm. O teste de oscilação realizado foi o de varredura de frequência. As formulações foram estudadas com solicitações oscilatórias para determinar a evolução dos módulos de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência (0,01 Hz a 30 Hz) a uma tensão de amplitude oscilatória fixa (1,00 Pa) obtida a partir da região viscoelástica linear. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior, assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo de repouso de 2 minutos antes de cada determinação.

4.2.4.2.Efeito dos componentes do muco na estrutura das formulações.

Nas formulações F1A, F2A, F3A, F4A foi acrescentado 30, 50 e 100% de fluido nasal simulado (FNS) em relação à massa inicial. Amostras representativas de cada porcentagem adicionada foram analisadas através da MLP, SAXS, reologia oscilatória e força de mucoadesão. Todos estes ensaios foram realizados a 32 °C para simular a temperatura nasal.

A composição da dispersão de mucina foi: 8 % (p/v) mucina (Mucina tipo II crua de estômago suíno, Sigma-Aldrich) em FNS (pH 5,7) composto por 7,45 mg.mL⁻¹ NaCl, 1,29 mg.mL⁻¹ KCl e 0,32 mg.mL⁻¹ CaCl₂·2H₂O (MELON, 1968 *apud* CALLENS *et al.*, 2003).

4.2.3.2.1. Avaliação da força mucoadesiva

A força mucoadesiva das formulações foi avaliada através da medida da força necessária para remover a formulação a partir de um disco de mucina, utilizando um analisador de textura TAXT *plus* (Stable Micro Systems[®]) no modo *Adesive Test* (Figura 7a). As análises foram realizadas no Laboratório Central Analítico da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Inicialmente, o disco de mucina foi preparado pela compressão de mucina suína crua (250 mg) umedecida com 50 µL de dispersão de mucina 8% (p/p), utilizando uma peleteira com diâmetro de 123 mm. O disco obtido foi aderido com fita adesiva horizontalmente em uma prova com mesmo diâmetro (Figura 7b). Antes do teste, o disco de mucina foi hidratado pela submersão em uma solução aquosa de mucina 8% (p/p) por um tempo de 30 s. O excesso de líquido na superfície do disco foi removido através de um papel absorvente macio. Após atingir a temperatura de 32 °C em banho maria, uma amostra da formulação, previamente acondicionada em frasco plástico cilíndrico e raso (4 cm de diâmetro e 1 cm altura), foi colocada abaixo da prova analítica (Figura 7c), a qual foi então abaixada até que o disco de mucina entrasse em contato com a superfície da amostra. Instantaneamente, uma força para baixo de 0,1 N foi aplicada por um tempo definido (30 s) para assegurar o contato íntimo entre a amostra e o disco de mucina. A prova foi então levantada com uma velocidade

constante de 1,0 mm/s e a força necessária para remover o disco de mucina da superfície da formulação foi determinada como o valor resultante da curva força pelo tempo (Figura 7d). Os ensaios foram repetidos sete vezes. As formulações submetidas a este ensaio foram a F1, F2, F3 e F4. Para avaliar a força de mucoadesão após o contato com FNS, foi adicionado nestas formulações 50 % de FNS (M1.50, M2.50, M3.50 e M4.50).

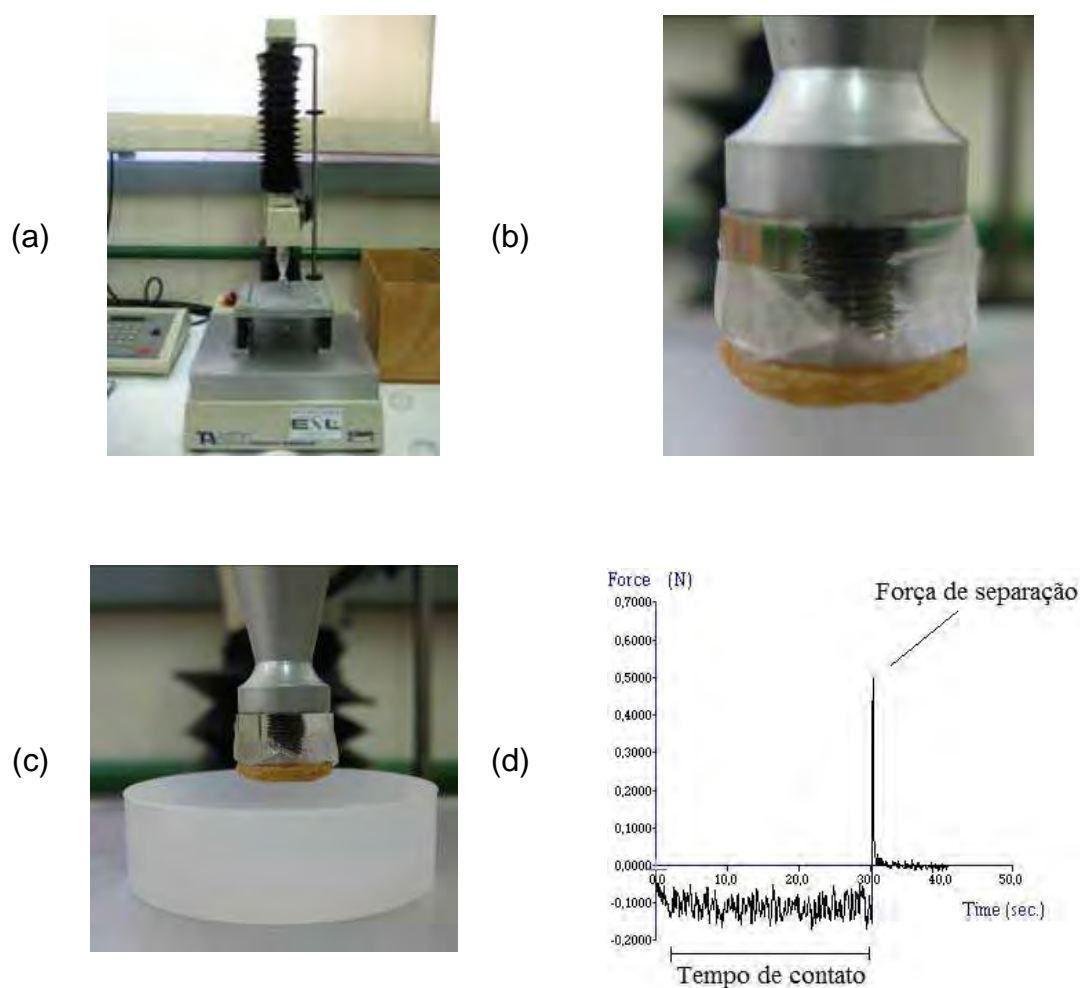


Figura 7: Esquema do teste de avaliação da mucoadesão. (a) Analisador de textura; (b) Prova analítica com o disco de mucina aderido; (c) Localização da formulação durante o ensaio; (d) curva força de adesão *versus* tempo.

4.2.5. Estudos de liberação do fármaco

Estudos de liberação *in vitro* dos sistemas desenvolvidos foram realizados utilizando uma célula de Franz adaptada. Para quantificar o fármaco nesses estudos, foi validado e desenvolvido um método de quantificação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.2.5.1. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Condições Cromatográficas

O sistema de CLAE utilizado foi o Varian, composto por: módulo de distribuição de solvente ProStar/Dynamax[®] 210/215, detector espectrofotométrico ProStar[®] 330 UV-VIS PDA (a 265nm) e Rheodine[®] VS 7125, válvula de injeção com um *loop* de 100 μ L, coluna RP-18 (Varian[®] - Chromsep[®]) 250 mm x 4.6mm I.D. 5 μ m tamanho de partícula. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila:água 15:85 (v/v) com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

Preparo das soluções de trabalho

A solução estoque foi preparada na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹, em que o AZT foi cuidadosamente pesado e dissolvido na fase móvel. Esta solução foi diluída em água para obter soluções de trabalho na faixa de concentração de 0,6 – 100,0 μ g.mL⁻¹.

Validação do método.

- *Curva de calibração:* foram injetadas as soluções de trabalho em triplicata contendo o AZT na faixa de concentração de 0,6 a 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As áreas sob os picos foram determinadas e plotadas *versus* a concentração do AZT.
- *Linearidade:* foi calculada a regressão linear para as três curvas de calibração obtidas pelo método dos mínimos quadrados. Para a linearidade ser aceita, o coeficiente de correlação (r) deve ser no mínimo 0,99, e o CV da média tanto do intercepto com o eixo y como da inclinação da equação da regressão linear das três curvas não devem ultrapassar 5% (ANVISA, 2003; ICH, 1996)
- *Especificidade:* foi demonstrada pela comparação do cromatograma de uma amostra contendo concentração conhecida de AZT (solução de trabalho a 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com cromatograma de amostra contendo AZT e contaminada com componentes da formulação (fluido receptor após 1,0 h de ensaio de liberação de F1A a 40 mg.g^{-1}).
- *Seletividade:* Para ser possível selecionar o fármaco entre os componentes que poderão estar presentes no ensaio de liberação, foi comparado um cromatograma de um resultado positivo (fluido receptor após 1,0 h de ensaio de liberação de F1A a 40 mg.g^{-1}) com um cromatograma de um resultado negativo (fluido receptor após 1,0 h de ensaio de liberação de F1 sem AZT)
- *Precisão e exatidão:* a precisão intra dia foi analisada injetando-se soluções de trabalho em triplicata nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, correspondendo a concentrações baixas, médias e altas da curva de calibração. A precisão inter dia foi analisada injetando-se amostras nas mesmas concentrações

em três dias consecutivos. Foi calculado então o desvio padrão (DP) e CV para cada solução. O CV não deve ser maior que 5% (ANVISA, 2003; ICH, 1996)

- *LD e LQ*: foram determinados a partir de curva de calibração, utilizando as equações 13 e 14:

$$LD = 10\sigma/S \quad (\text{Eq. 13})$$

$$LQ = 3.3\sigma/S \quad (\text{Eq. 14})$$

Em que σ é o DP do intercepto com o eixo y das três curvas de calibração e S é a inclinação da reta obtida com a média das três curvas de calibração.

4.2.5.2. Determinação do perfil de liberação *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* do AZT a partir dos sistemas de liberação desenvolvidos foi determinado utilizando células de difusão tipo Franz adaptada ao equipamento Dissolution SRO (Figura 8). O equipamento foi utilizado para determinar o perfil de AZT liberado das formulações F1A, F2A, F3A e F4A, comparando-as com solução aquosa de AZT como controle (SA).

A célula apresenta uma tampa com três aberturas, sendo uma para coleta da amostra e reposição da solução receptora, outra (central) para a entrada do dispositivo de agitação e a terceira para anexar a membrana, a qual é colocada em uma das extremidades de um tubo de ensaio aberto (1,24 cm de diâmetro) e presa com o auxílio de um anel de borracha. O modelo de membrana utilizado foi de membrana de diálise de acetato de celulose previamente hidratada (12000 *cut off*) e a área de exposição calculada foi de 1,21 cm².

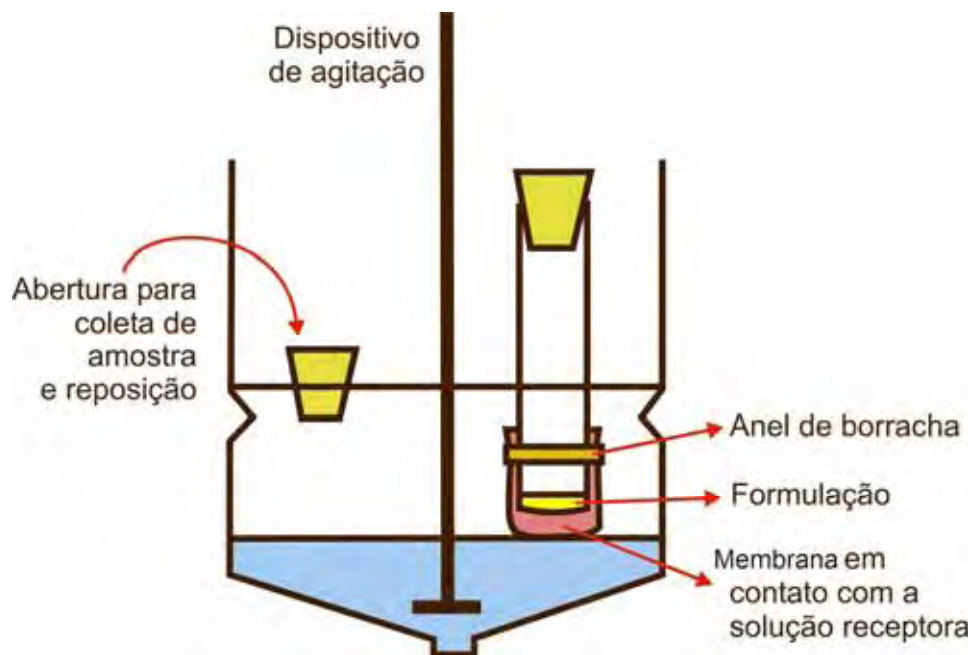


Figura 8: Esquema da célula de difusão adaptada ao dissolutor.

A solução receptora utilizada foi a água (15,0 mL) a $37 \pm 0,58$ °C (USP, 2002). Os experimentos foram conduzidos sob agitação constante a 200 rpm. As formulações (0,5 g) contendo o AZT ($40,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram colocadas dentro da célula de difusão, sobre a membrana. O ensaio foi realizado sob condições *sink*, utilizando-se um grande volume de meio de dissolução, para a concentração do soluto não ultrapassar mais que 10-15% de sua solubilidade máxima. Em intervalos pré-determinados (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 e 24 horas), foram coletadas amostras da solução receptora (0,5mL) e analisadas por CLAE; o mesmo volume foi repostado com solução receptora fresca. Cada formulação foi analisada em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado para o controle (AZT em solução aquosa $5,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Cada formulação foi analisada em triplicata. O AZT foi quantificado por CLAE a 265 nm. Os valores da área sob a curva (ASC) obtidos foram aplicados na equação da curva de calibração em água, a fim de se obter as concentrações de AZT nas amostras.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Seleção do tensoativo

Foram construídos os diagramas de fases para os tensoativos tipo álcool graxo OE OP (AL45, AL63, AL36 e AC205), a fim de se entender como esta classe de tensoativos arranja-se em diferentes estruturas conforme se varia a proporção de ácido oléico e água.

O diagrama obtido para o tensoativo AL45 está na Figura 9, para o tensoativo AL63 na Figura 10, e para o tensoativo AC205 na Figura 11. Não foi possível obter um diagrama com o tensoativo AL36, pois sua mistura com ácido oléico e água, em qualquer proporção, não formou nenhum tipo de sistema homogêneo, ocorrendo apenas separação de fases.

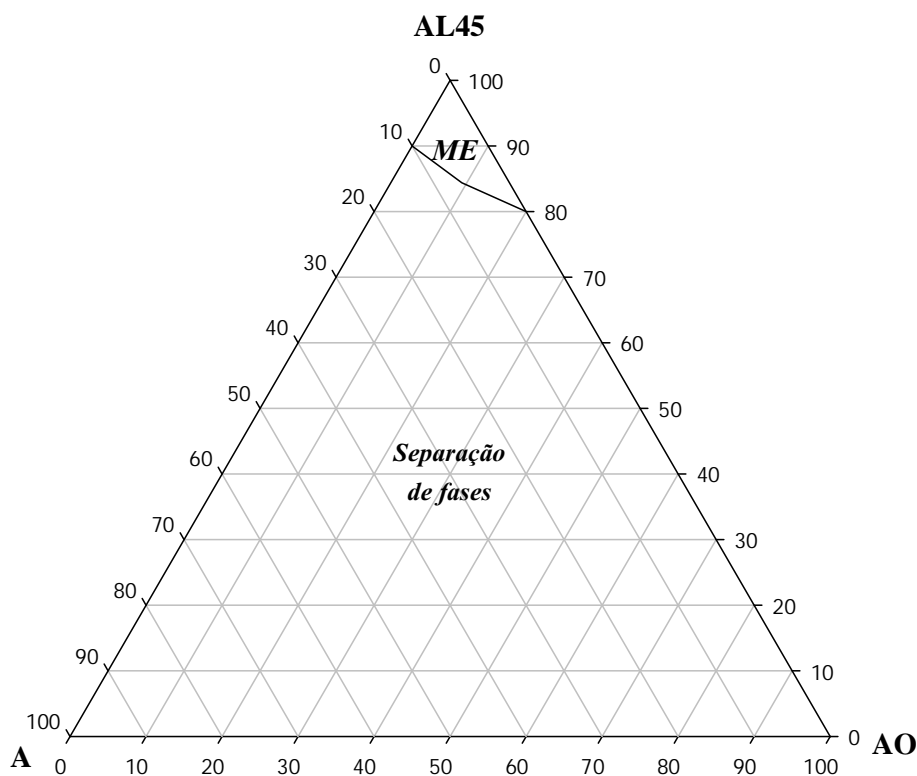


Figura 9: Diagrama de fases. (AO) ácido oléico; (AL45) tensoativo; (A) água. (ME) Microemulsão.

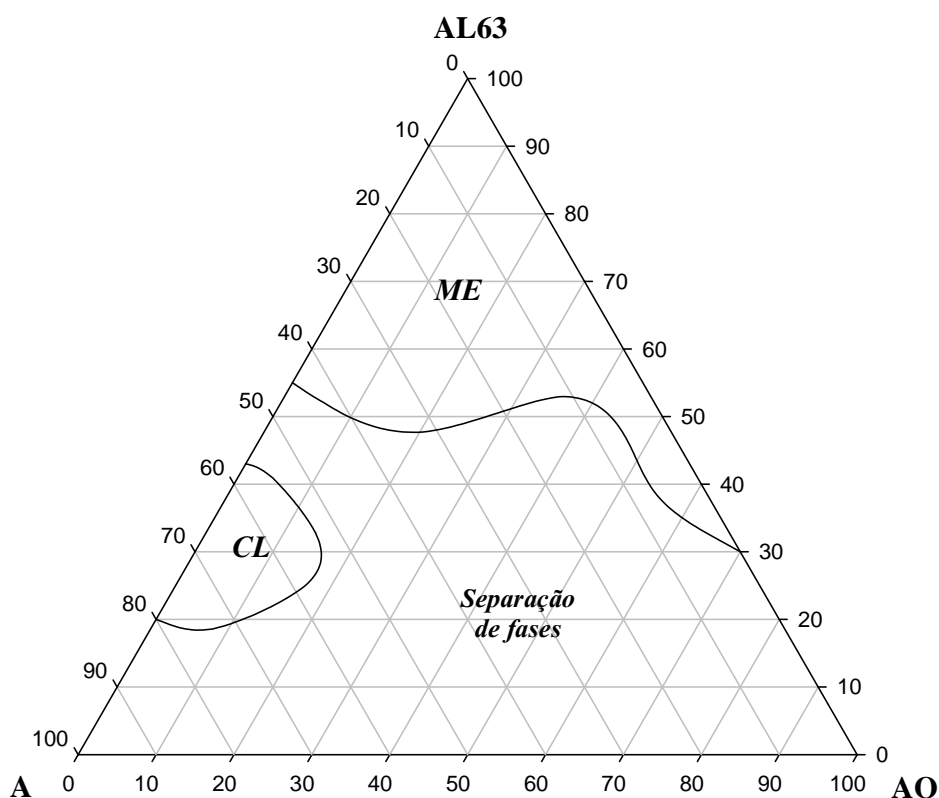


Figura 10: Diagrama de fases. (AO) ácido oléico; (AL63) tensoativo; (A) água. (ME) Microemulsão; (CL) Cristal Líquido.

Com o tensoativo AL45 foi possível formar sistemas homogêneos apenas em concentrações acima de 80 % de tensoativo. Como essa concentração é muito alta, pode ser que estes sistemas sejam apenas uma diluição das moléculas da água e do óleo no tensoativo. Abaixo dessa concentração houve apenas separação de fases.

No diagrama do tensoativo AL63, a fase microemulsionada começa a ser formada a partir de 30 % de tensoativo com porcentagens de água e de óleo abaixo de 45 % e 70 % respectivamente. Uma pequena região isolada líquido cristalina foi formada entre os intervalos de 0 a 18 % de óleo, 55 a 80 % de água e 20 a 40% de tensoativo.

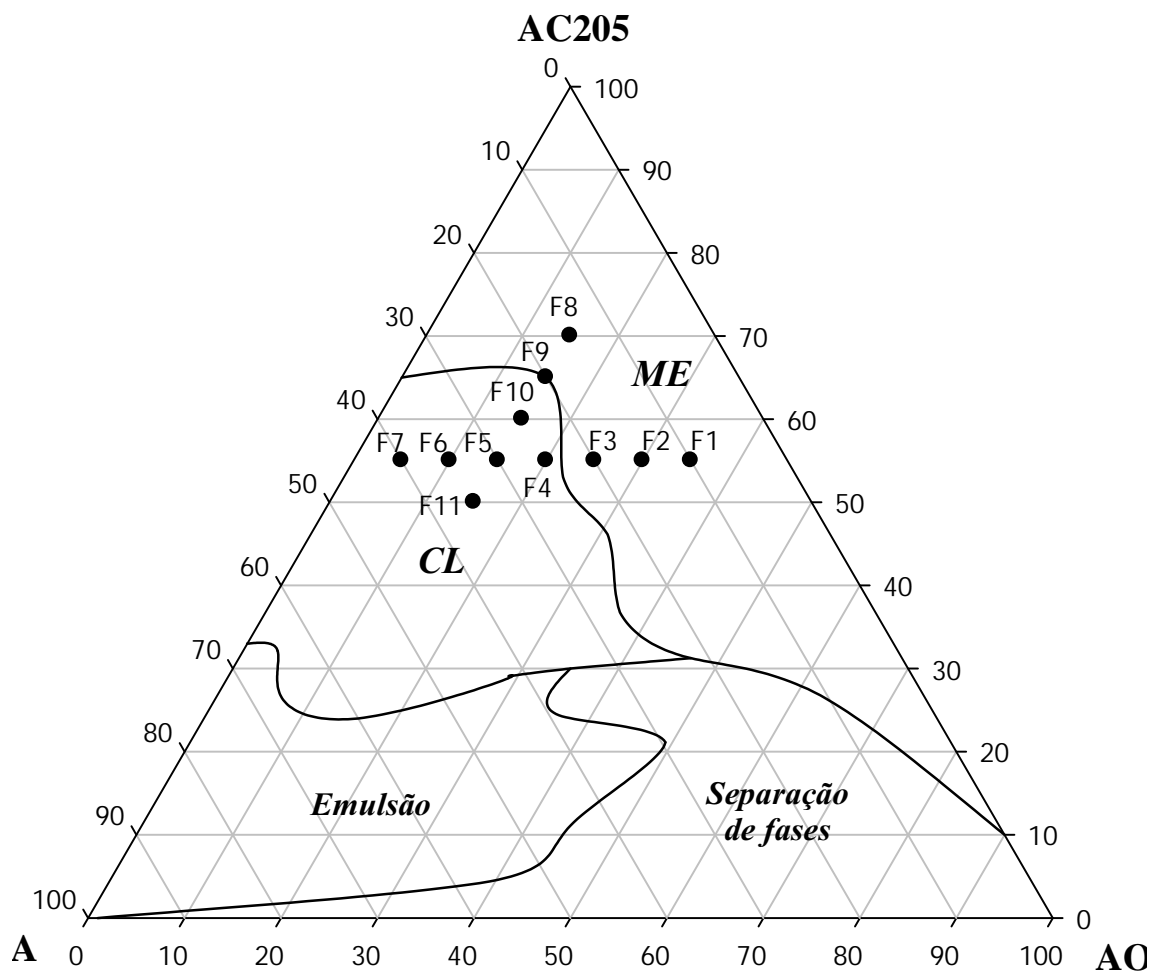


Figura 11: Diagrama de fases. (AO) ácido oléico; (AC205) tensoativo; (A) água. (ME) Microemulsão; (CL) Cristal Líquido.

No diagrama do tensoativo AC205, a região de ME formou-se em baixas concentrações de água (abaixo de 35%), mas abrangendo quase todo o eixo do tensoativo e do óleo. A região de CL se encontra em concentrações intermediárias de água e tensoativo (25 a 75% para ambos), e abaixo de 40% de óleo. Em baixas concentrações de tensoativo, quando a concentração de água é alta (acima de 70%) formam-se sistemas emulsionados O/A, e quando a concentração de óleo é alta, a baixa concentração de tensoativo promove a separação de fases.

Analisando visualmente o comportamento de fases destes sistemas, pode ser inferido que os tensoativos com maior número de unidades de OE apresentam faixas mais amplas de sistemas estruturados e que não separam fases. O tensoativo com menor número de unidades de OE (AL36) não formou nenhum tipo de estrutura. Foi observado que quanto maior o número de unidades de OE, maior a formação de cristais líquidos, e quantidades menores de OE favorecem a formação de estruturas micelares.

O diagrama obtido com o tensoativo AL45 não mostrou grande aplicabilidade para o desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados, devido à pequena região microemulsionada obtida, com concentrações altíssimas de tensoativo. Já o tensoativo AL63 se organizou em estruturas microemulsionadas numa ampla faixa do diagrama, numa região com concentrações abaixo de 50 % de ácido oléico com até 40 % de água. Esse diagrama seria interessante no desenvolvimento de MEs com menores concentrações de tensoativo e ácido oléico, ou de MEs que não se convertem em estruturas mais organizadas com o aumento da fase aquosa, pois é visto no diagrama que o aumento de água faz a região microemulsionada transitar para uma região de separação de fases. Esse comportamento é desejável para sistemas de liberação imediata. Além disso, neste diagrama também se formou uma região líquido cristalina com altas porcentagens de água (até 80 %), maiores que as porcentagens do diagrama do tensoativo AC205. A exploração dessa região seria interessante para sistemas tópicos, pois além da baixa concentração de tensoativo e óleo, o que faz diminuir o potencial tóxico da formulação, os CLs oferecem melhores características de viscosidade para aplicação por esta via. Porém, para o objetivo proposto neste trabalho, o tensoativo AL63 não formou sistemas estabilizados e fluídos precursores de CLs.

No diagrama do tensoativo AC205 é observado as regiões microemulsionada, emulsionada e líquido cristalina, assim como previamente descrito nos estudos de

Urban (2004), Klein (2007) e Carvalho *et al.* (2008), e todas essas regiões podem ser exploradas de acordo com a aplicabilidade procurada para o desenvolvimento de sistemas de liberação. A região líquido cristalina pode ser adaptada para sistemas de liberação prolongada, para sistemas tópicos ou transdérmicos, a região microemulsionada pode ser adequada para promover o aumento da incorporação de fármacos com problemas de solubilidade, ou como veículo para formas farmacêuticas *per os*, ocular e nasal.

O tensoativo escolhido para estudo neste trabalho foi o AC205, pois a região de ME pode ser precursora de CL com o aumento da fase aquosa. Este comportamento é desejado para o sistema proposto no objetivo deste trabalho. O muco na cavidade nasal poderá estruturar os sistemas escolhidos, resultando na transição destes em CLs, formando uma matriz de liberação do fármaco na cavidade nasal, a qual poderá resistir por maior tempo aos mecanismos de depuração mucociliar.

5.2. Caracterização Físico-Química e estrutural das formulações

Na Figura 12 estão representadas as fotomicrografias obtidas através da observação das amostras F1 a F11 sob a luz polarizada, logo após o preparo. As formulações localizadas na região de ME (F1, F2, F3, F8) mostraram ser isotrópicas, ou seja, sob o plano de luz polarizada, não desviaram a luz. Os objetos presentes nessas figuras são bolhas de ar. As formulações localizadas na região de CL (F4, F5, F6, F9, F10 e F11) desviam o plano de luz polarizada, resultando no aparecimento das “cruzes de malta”, características de estruturas de fase lamelar. A formulação F7 apresenta “estrias”, característica de fase hexagonal.



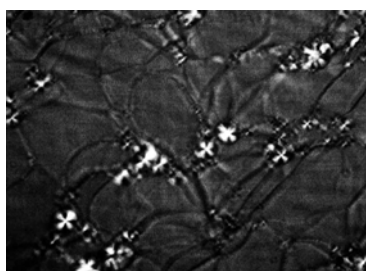
F1: Campo escuro
Sistema isotrópico



F2: Campo escuro
Sistema isotrópico



F3: Campo escuro
Sistema isotrópico



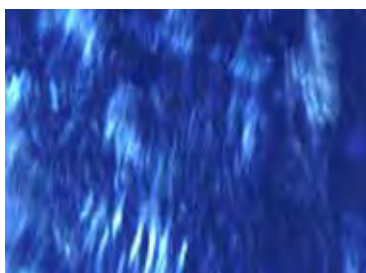
F4: "Cruzes de Malta"
Sistema anisotrópico



F5: "Cruzes de Malta"
Sistema anisotrópico



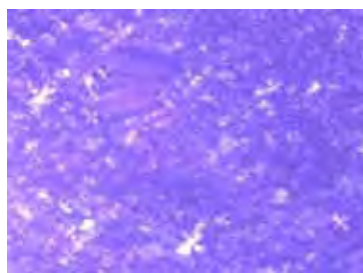
F6: "Cruzes de Malta"
Sistema anisotrópico



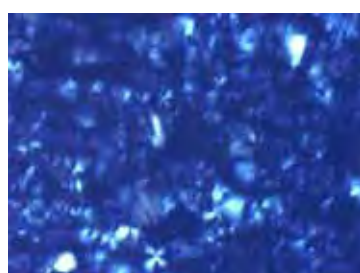
F7: "Estrias"
Sistema anisotrópico



F8: Campo escuro
Sistema isotrópico



F9: "Cruzes de Malta"
Sistema anisotrópico



F10: "Cruzes de Malta"
Sistema anisotrópico



F11: "Cruzes de Malta"
Sistema anisotrópico

Figura 12: Fotomicrografias das amostras F1 a F11 obtidas por microscopia de luz polarizada.

Os dados obtidos por SAXS permitem confirmar a estrutura dos sistemas. A Figura 13 mostra as curvas das intensidades de espalhamento em função do vetor de espalhamento q . Os valores de espalhamento q_{max} , periodicidade lamelar e hexagonal das formulações líquido cristalinas estão descritos na Tabelas 4. As distâncias d entre os objetos espalhadores, parâmetro de rede a , raio do cilindro R_H ou espessura da lamela δ estão na Tabela 5.

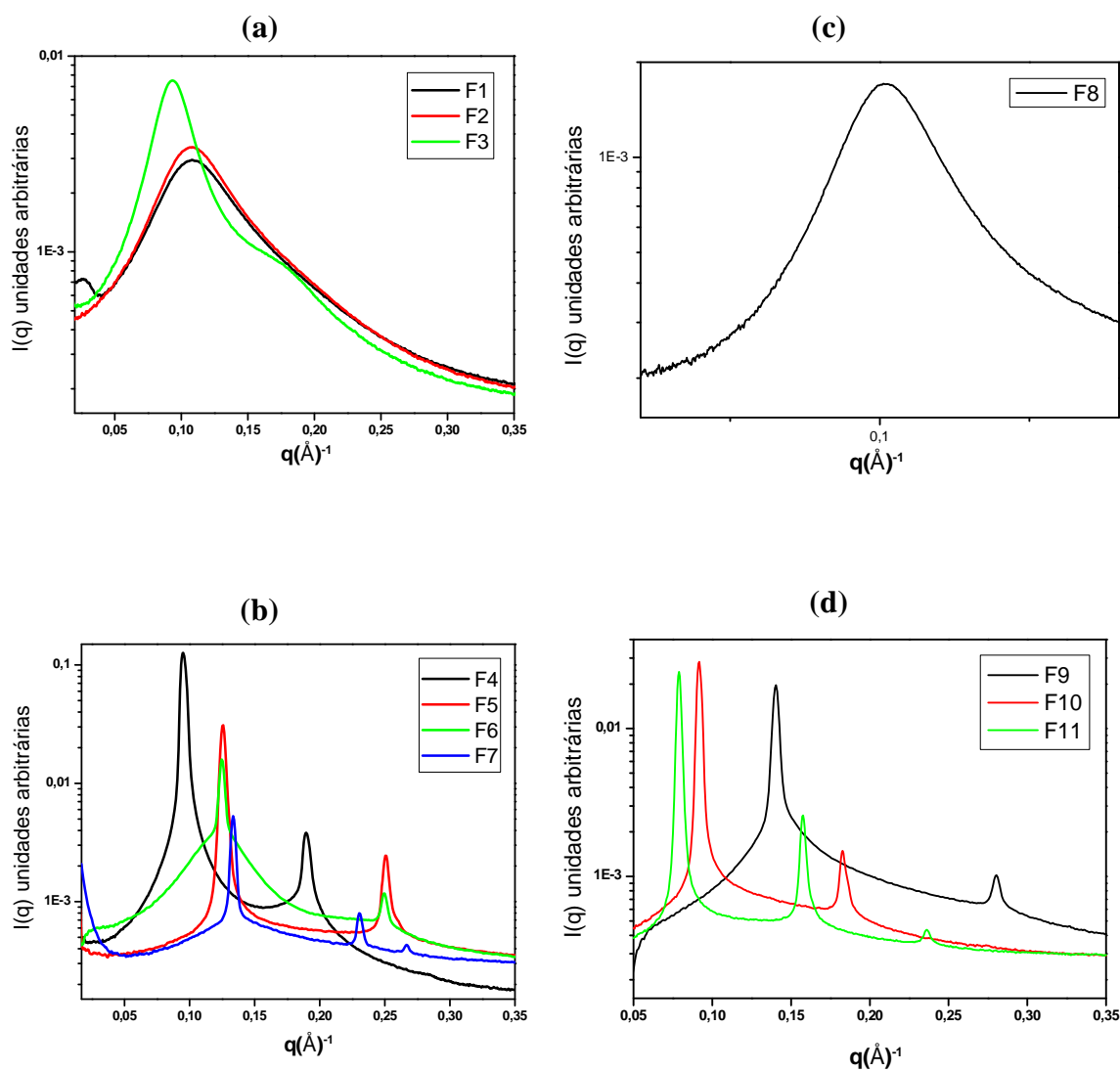


Figura 13: Avaliação estrutural das amostras F1 a F11 por SAXS.

Tabela 4: Valores de q_{max} (Å) e razão entre as distâncias interplanares para as formulações F1 a F11.

	q_{max_1}	q_{max_2}	q_{max_3}	d_1/d_2	d_1/d_3
F1	0,11	-	-	-	-
F2	0,11	-	-	-	-
F3	0,09	-	-	-	-
F4	0,09	0,19	-	2	-
F5	0,13	0,25	-	2	-
F6	0,13	0,25	-	2	-
F7	0,13	0,23	-	2	-
F8	0,10	-	-	-	-
F9	0,14	0,28	-	2	-
F10	0,09	0,18	-	2	-
F11	0,08	0,16	0,24	2	3

Tabela 5: Parâmetros estruturais das formulações líquido cristalinas (F4, F5, F6, F7, F9, F10 e F11).

	Estrutura	d (Å)	a (Å)	δ (Å)	R_H (Å)
F4	$L\alpha$	66,1	66,0	13,2	-
F5	$L\alpha$	50,3	50,2	7,5	-
F6	$L\alpha$	50,0	50,0	5,0	-
F7	H_1	46,8	54,0	-	6,3
F9	$L\alpha$	44,6	44,6	6,7	-
F10	$L\alpha$	68,6	68,6	10,3	-
F11	$L\alpha$	79,7	79,6	12,0	-

No gráfico da Figura 13a, podem ser observados os picos alargados de F1, F2 e F3 característico de estruturas micelares, confirmada pela MLP que mostrou isotropia para essas formulações. Quando a concentração de água atinge 25% (F4), as moléculas de tensoativo na curvatura interfacial água-óleo passam a estabilizar o sistema em mesofases lamelares. No gráfico de F4 na Figura 13b, não é mais observado picos alargados, e sim picos bem definidos com grande intensidade de espalhamento, característicos de estruturas mais ordenadas. Os valores de q para as intensidades máximas de espalhamento se dão em 0,1 e 0,2 \AA^{-1} . Ela pode ser classificada como uma mesofase lamelar devido à relação $d_1/d_2=2$, confirmada pelas “cruzes de malta” observadas na MLP. A mudança de fase pode ser observada já na curva de SAXS de F3, devido ao estreitamento do pico e o aparecimento de um segundo pico mais alargado, sugerindo uma maior estruturação do sistema em relação à F1 e F2.

As formulações F5 e F6 apresentam-se como mesofases lamelares devido à relação $d_1/d_2=2$ (ver Tabela 4), e na MLP ser observado as “cruzes de malta”.

Quando a concentração de água atinge 40 % em F7, as moléculas de tensoativo se organizam numa mesofase hexagonal, confirmada pela relação $d_1/d_2=1,73$ e pela presença de “estrias” nas fotomicrografias.

As formulações em que a concentração de óleo é fixa em 15 %, e a relação água/tensoativo é aumentada (F8, F9, F10, F11 - Tabela 3) serão analisadas a seguir.

A formulação F8 apresentou um pico alargado e de baixa intensidade (Figura 13c), característico de estruturas micelares, assim como F1, F2 e F3. A diminuição da concentração de tensoativo para 65 % em F9 faz com que o tensoativo estabilize a interface óleo/água numa mesofase lamelar, confirmada pela relação $d_1/d_2=2$ e pelas “cruzes de malta” visualizadas na MLP. O mesmo ocorre para F10 e F11.

5.3. Escolha dos sistemas a serem estudados

Para vencer as barreiras da absorção nasal, como a rápida depuração mucociliar, é proposto um sistema precursor de CL. A transformação de um sistema fluido em CL *in situ* pode promover o contato prolongado entre a formulação e os locais de absorção na cavidade nasal, retardando a depuração mucociliar.

Para escolha destes sistemas, levou-se em conta a proporção de tensoativo, pois há estudos que a correlacionam com danos causados à membrana nasal (ILLUM, 2003).

As formulações escolhidas para os ensaios de incorporação do fármaco, de mucoadesão e de liberação foram F1, F2, F3 e F4. A formulação F8 foi descartada pela alta concentração de tensoativo, e F5, F6, F7, F9, F10 e F11 pela alta viscosidade, o que dificulta a administração nasal da formulação.

5.4. Avaliação da incorporação do AZT nos sistemas

5.4.1. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de AZT por espectroscopia UV

Com o objetivo de padronizar um método de quantificação do AZT presente nas diferentes formulações selecionadas, foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por espectroscopia UV. Uma metodologia é considerada validada quando os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limite de detecção ou sensibilidade e limite de quantificação estão dentro das especificações exigidas (ANVISA, 2003).

As leituras de absorbâncias obtidas correspondentes a cada concentração analisada estão na Tabela 6.

Tabela 6: Valores das absorvâncias das soluções de AZT em metanol obtidas por espectroscopia UV, no comprimento de onda de 265 nm, e os respectivos resultados estatísticos obtidos das amostras em triplicata.

AZT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média	DP \pm	CV (%)
1,0	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$0,2 \cdot 10^{-2}$	5
1,3	$4,2 \cdot 10^{-2}$	$0,1 \cdot 10^{-2}$	3
2,5	$8,2 \cdot 10^{-2}$	$0,1 \cdot 10^{-2}$	5
5,0	$17,7 \cdot 10^{-2}$	$0,01 \cdot 10^{-2}$	3
10,0	$36,3 \cdot 10^{-2}$	$0,7 \cdot 10^{-2}$	1
15,0	$54,5 \cdot 10^{-2}$	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0
20,0	$74,7 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^{-2}$	2
30,0	1,1	$3,8 \cdot 10^{-2}$	1
40,0	1,5	$4,8 \cdot 10^{-2}$	3

Elaborou-se um gráfico relacionando as absorvâncias em função da concentração de AZT. Com os valores experimentais, calculou-se a equação da reta e o coeficiente de determinação, representados por $y = 0,0374 x - 0,0089$, $r^2 = 0,9999$. A linearidade pode ser observada no intervalo de concentração utilizado ($1-40 \mu\text{g.mL}^{-1}$), constatada pelo coeficiente de determinação (r^2), garantindo confiança no uso da equação da reta obtida.

As Figuras 14, 15, 16 ilustram os espectros de absorção da formulação F3 em metanol, da solução de AZT, e da formulação F3 com AZT (F3A). É possível identificar os picos referentes à absorção do AZT separadamente dos outros picos correspondentes aos componentes da formulação ou do solvente.

Os resultados dos cálculos dos CVs e porcentagem de recuperação estão contidos na Tabela 7. Eles indicam que o método é preciso, pois os valores de CVs são inferiores a 5 %, e também apresentam exatidão, pois os limites de recuperação não foram inferiores a 80 % e nem superiores a 120% (ANVISA, 2003).

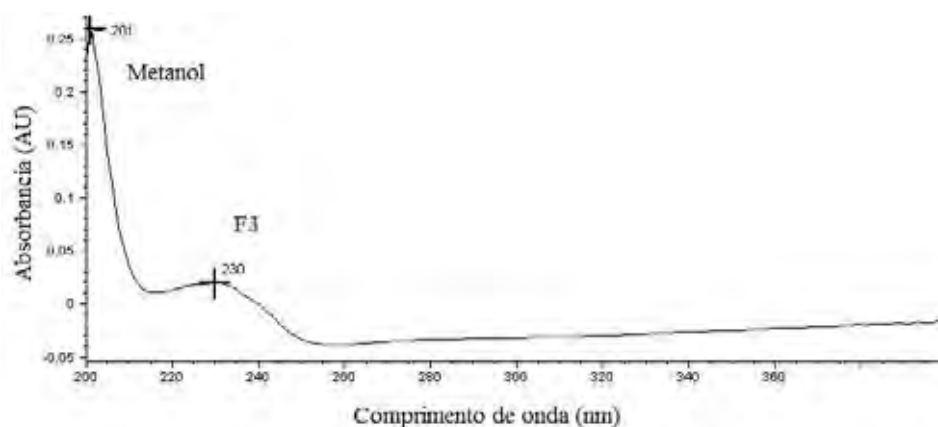


Figura 14: Espectro de absorção da formulação F3 em metanol.



Figura 15: Espectro de absorção da solução de AZT (20 µg.mL⁻¹) em metanol.

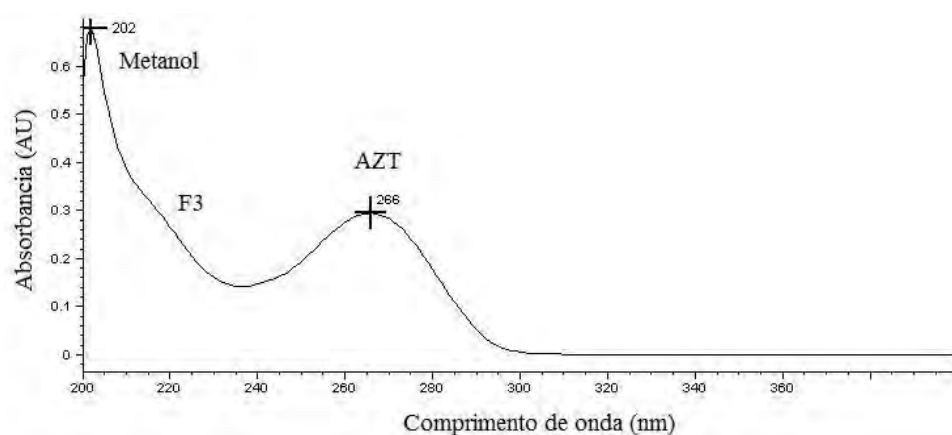


Figura 16: Espectro de absorção do AZT na formulação F3 (20 µg.mL⁻¹) diluída em metanol.

Tabela 7: Cálculo da precisão e exatidão do método de quantificação do AZT por espectrofotometria.

	Concentrações teóricas		
	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Valores de absorvância	0,18	0,54	1,06
	0,17	0,52	1,09
	0,17	0,54	1,05
Média	0,17	0,53	1,07
DP	$\pm 0,006$	$\pm 0,013$	$\pm 0,020$
CV (%)	3	2	2
Recuperação (%)	97	97	96

A Tabela 8 ilustra os resultados obtidos para análise dos LD e LQ. O LD obtido foi 2,38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o LQ foi de 7,92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A quantificação do fármaco nas formulações será precisa e exata acima destes limites.

Tabela 8: Valores obtidos nas medidas dos limites de detecção e quantificação do AZT em metanol por espectroscopia UV.

	Concentrações teóricas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	1,0	1,3	2,5
Média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,1	1,3	2,4
DP	$\pm 0,04$	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$
CV (%)	4	2	1

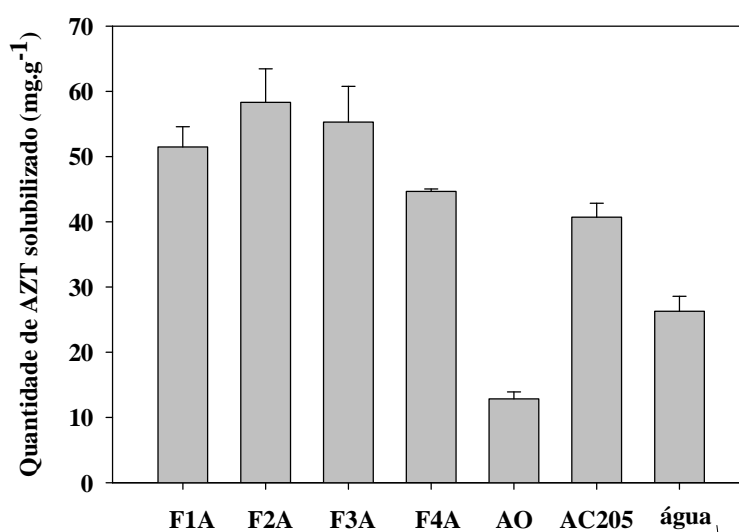
5.4.2. Determinação da incorporação do AZT nos sistemas selecionados e nos seus diferentes componentes.

A partir da equação da reta e dos valores da absorvância obtidos, calculou-se a quantidade máxima de fármaco incorporada nas formulações F1, F2, F3 e F4 e em cada componente – ácido oléico, AC205 e água (Tabela 9). O gráfico da Figura 17 compara todos os resultados obtidos.

Tabela 9: Quantidade de AZT solubilizado nas formulações F1, F2, F3, F4 e em cada constituinte, obtidos por espectroscopia UV.

	AZT incorporado (mg.mL ⁻¹)						
	F1A	F2A	F3A	F4A	AO	AC205	A
Média*	51,5	58,3	55,3	44,6	12,8	40,7	26,3
DP	3,1	5,1	5,5	0,4	1,1	2,1	2,3
CV (%)	6	9	9	1	8	5	8

*Valores representando a média de quatro determinações

**Figura 17:** Quantidade de AZT incorporado em F1, F2, F3, F4 e em cada componente da formulação. Valores representando a média e \pm desvio padrão de quatro determinações

A análise estatística feita pelo ANOVA foi avaliada pela comparação do *p* valor. Uma diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o *p* valor foi menor que o nível de significância 0,05. Os resultados mostram que a quantificação do AZT em F1A, F2A e F3A não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$). F4A mostrou dificuldade de incorporação do AZT, quando comparada com F1A ($P = 0,0047$), F2A ($P = 0,0013$) e F3A ($P = 0,0082$). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de F4A não ser uma ME, e sim uma mesofase lamelar, conhecida por possuir maior organização estrutural e maior viscosidade, o que pode ter dificultado a incorporação do fármaco.

Comparando a média da incorporação do AZT das quatro formulações com cada constituinte, o ácido oléico foi o componente que incorporou a menor quantidade ($P = 4,33E-10$) e o AC205 a maior quantidade de AZT ($P = 0,0022$), porém os valores de incorporação obtidos pelo óleo, tensoativo e água foram estatisticamente menores que os valores das formulações.

5.4.3. Efeito da incorporação do AZT na evolução estrutural das formulações

A Figura 18 representa as fotomicrografias das formulações F1A, F2A, F3A, e F4A obtidas por MLP.

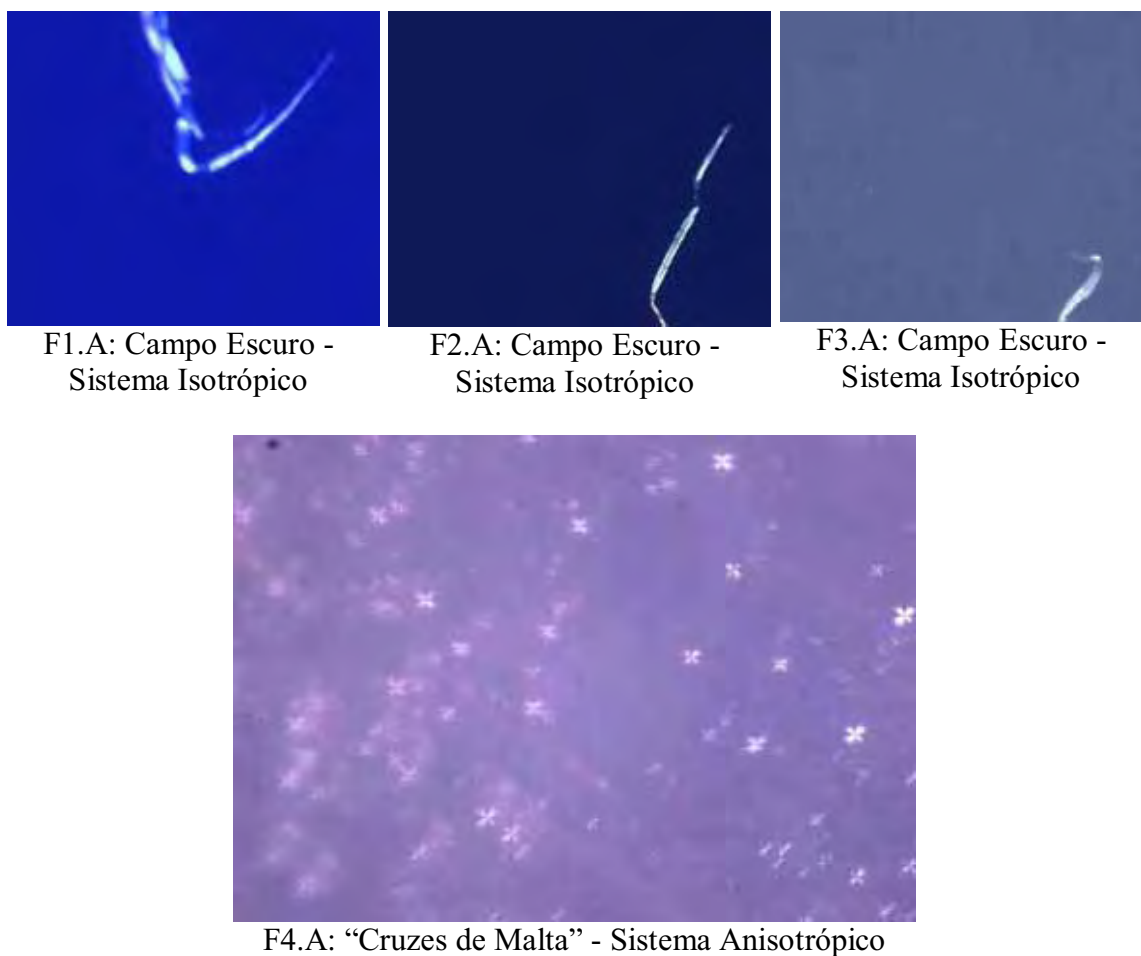


Figura 18: Fotomicrografias das amostras de F1 a F4 após incorporação do AZT (40 mg.g^{-1}) obtidas por MLP.

A Figura 19 mostra as curvas de intensidades de espalhamento em função do vetor de espalhamento q a fim de analisar se a incorporação do AZT causa alguma diferenciação estrutural nas formulações F1, F2, F3 e F4.

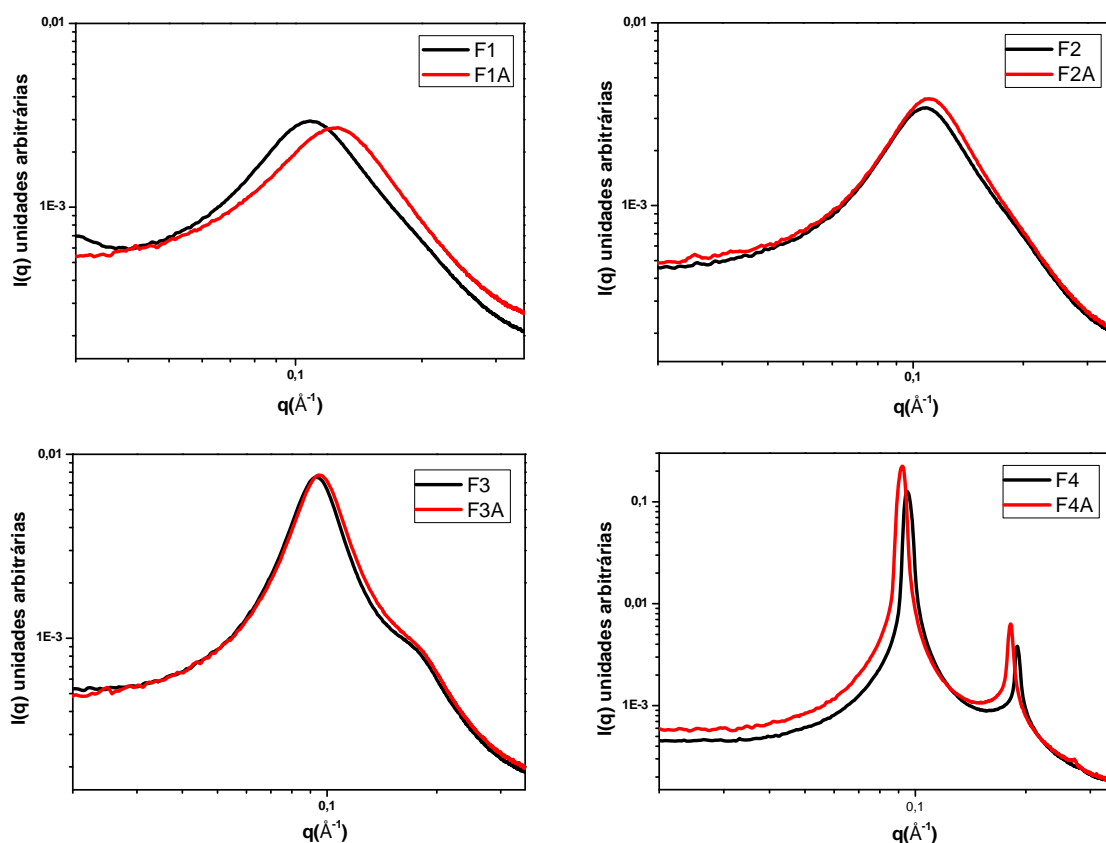


Figura 19: Diferenciação estrutural das formulações contendo AZT (F1A, F2A, F3A e F4A) por SAXS.

Tabela 10: Valores de q_{max} (\AA^{-1}) e valores da razão entre as distâncias interplanares para as formulações F1A, F2A, F3A e F4A.

	q_{max_1}	q_{max_2}	q_{max_3}	d_1/d_2	d_1/d_3
F1A	0,12	-	-	-	-
F2A	0,11	-	-	-	-
F3A	0,10	-	-	-	-
F4A	0,10	0,18	0,27	2	3

No gráfico da Figura 19, podem ser observados os picos alargados de F1A, F2A e F3A característico de estruturas micelares, confirmadas pelas imagens de MLP, as quais exibem campo escuro para estas formulações. Pode ser observado para estas formulações que a incorporação do AZT provocou leve deslocamento dos picos para maiores valores de q , logo, o fármaco diminui a distância entre os objetos espalhadores. No gráfico de F3 e F3A é observado um ombro ou um segundo pico mais alargado. Isto indica que a formulação F3 está no início de uma transição de fases, já que a localização de F3 no diagrama da Figura 11 está próximo da região de CL. Os valores de q de F4A para as intensidades máximas de espalhamento se dão em 0,09, 0,18 e 0,27 Å⁻¹ (Tabela 10). A adição do AZT em F4 faz aparecer um terceiro pico, o que indica maior grau de estruturação em F4A do que em F4. Portanto, comparando as formulações carregadas e não carregadas com AZT, é possível concluir que a incorporação do fármaco provoca leve estruturação das formulações, porém não altera o tipo de fase formada.

O ensaio que melhor oferece os parâmetros de fluxo são os ensaios de escoamento (SCHRAMM, 2006). Os ensaios de fluxo foram realizados com as formulações carregadas com o fármaco. O reograma de fluxo das formulações está disposto na Figura 20 para as análises realizadas a 25°C.

Observando o gráfico da Figura 20, F4A exibe comportamento pseudoplástico, o qual pode ser comprovado pela lei das potências, descrita pela equação:

$$\tau = k.\gamma^n \quad (\text{Eq. 15})$$

Em que k é um parâmetro relacionado à consistência (índice de consistência) e n é o índice de escoamento. Neste modelo, $n > 1$ representa um fluido dilatante, $n < 1$ representa fluido pseudoplástico, e $n = 1$ fluido newtoniano.

A Figura 21 representa graficamente k e n , e na Tabela 11 estão os seus valores, em que r_{pot}^2 representa o coeficiente de regressão linear. Os valores obtidos para F1A e

F2A apresentam índices de consistência próximos, indicando que a viscosidade desses sistemas é aparentemente similar. Para F3 este índice aumenta, indicando aumento da viscosidade. Para estas três formulações, o índice de fluxo é aproximadamente um, indicando comportamento reológico próximo do newtoniano. F4 apresentou um considerável aumento de k e redução do valor de n , indicativo de comportamento pseudoplástico devido a um maior grau de estruturação desta formulação.

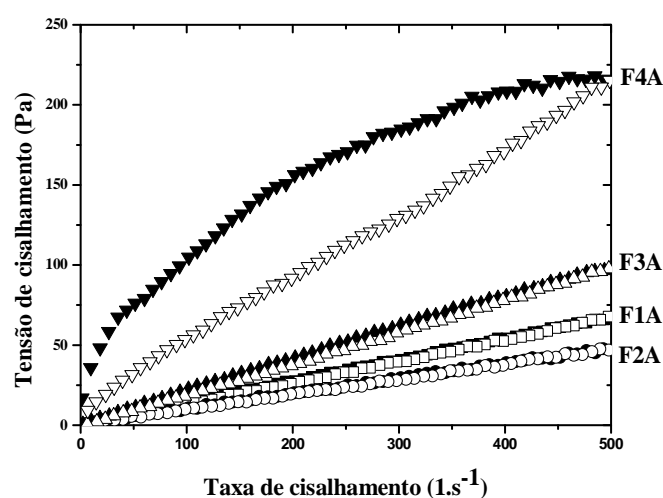


Figura 20: Reogramas de fluxo das formulações F1A, F2A, F3A e F4A a 25°C. Os símbolos fechados representam as curvas de ida, e os símbolos abertos representam as curvas de volta.

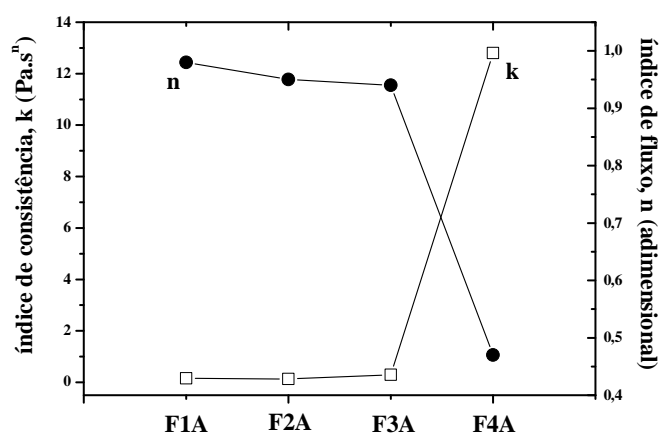


Figura 21: Índice de consistência k e índice de fluxo n das formulações com AZT a 25°C.

Tabela 11: Índices de consistência (k) e de fluxo (n) das formulações com AZT a 25 °C.

<i>Formulação</i>	<i>K (Pa.s)</i>	<i>N</i>	<i>r_{pot}²</i>
F1A	0,15	0,98	0,999
F2A	0,13	0,95	0,997
F3A	0,29	0,94	0,999
F4A	12,8	0,47	0,998

A tixotropia destas formulações também foi avaliada, através da observação do gráfico da taxa pela tensão de cisalhamento na Figura 20. Sistemas que exibem tixotropia recuperam sua estrutura após a remoção do cisalhamento ou tensão. Para materiais newtonianos, a deformação é recuperada instantaneamente, e por isso a curva descendente é sobreposta à ascendente, como é observado em F1A, F2A e F3A. Para materiais pseudoplásticos, a viscosidade diminui sob aplicação de uma tensão de cisalhamento, propriedade conhecida como *shear thinning*, mas sua estrutura é gradualmente recuperada quando esta é removida. Na curva de fluxo, a curva descendente não se sobrepõe à ascendente, apresentando uma área de histerese, a qual define a magnitude da tixotropia, como apresentada na curva de F4A. Portanto, para quebrar a estrutura tixotrópica de F4, é necessária uma energia maior (SCHARAMM, 2006). Embora F4A tenha maior índice de consistência e menor índice de fluxo, o *shear thinning* garante a capacidade desta formulação ser adequada para administração nasal, pois o cisalhamento no momento da administração causa o afinamento do fluxo. As interações moleculares que antes causavam sua resistência são removidas com o cisalhamento, facilitando assim a administração. A pseudoplasticidade de F4A é devida sua estrutura líquido cristalina, a qual causa maior resistência ao fluxo do que as MEs, que são sistemas coloidais (KUMAR; MITTAL, 1999).

5.5.Avaliação da mucoadesão

Para avaliar o efeito precursor de CL das formulações, avaliou-se *in vitro* seu comportamento quando entram em contato com o meio fisiológico nasal. A mudança de fases dos sistemas em estudo ocorre com a alteração da fase aquosa, e, tendo isto em vista, foi realizada uma análise comparativa entre o efeito da água pura em contato com as formulações, e o efeito do FNS, o qual, além da água, possui mucina e sais minerais na sua composição. Esta análise foi realizada a fim de examinar se a mudança de fases das formulações sofre influência dos componentes do muco, ou se sua capacidade precursora de CL depende apenas da água.

5.5.1.Efeito da água na estrutura das formulações

Nas amostras F1, F2, F3 e F4, com e sem AZT, foi acrescentado alíquotas crescentes de água de 5, 10 30, 50 e 100 %, e a mudança estrutural foi observada por MLP e reologia oscilatória. Para visualização desses pontos no diagrama (Figura 22), foi calculada a proporção de cada constituinte da formulação após o acréscimo de água (Tabela 12).

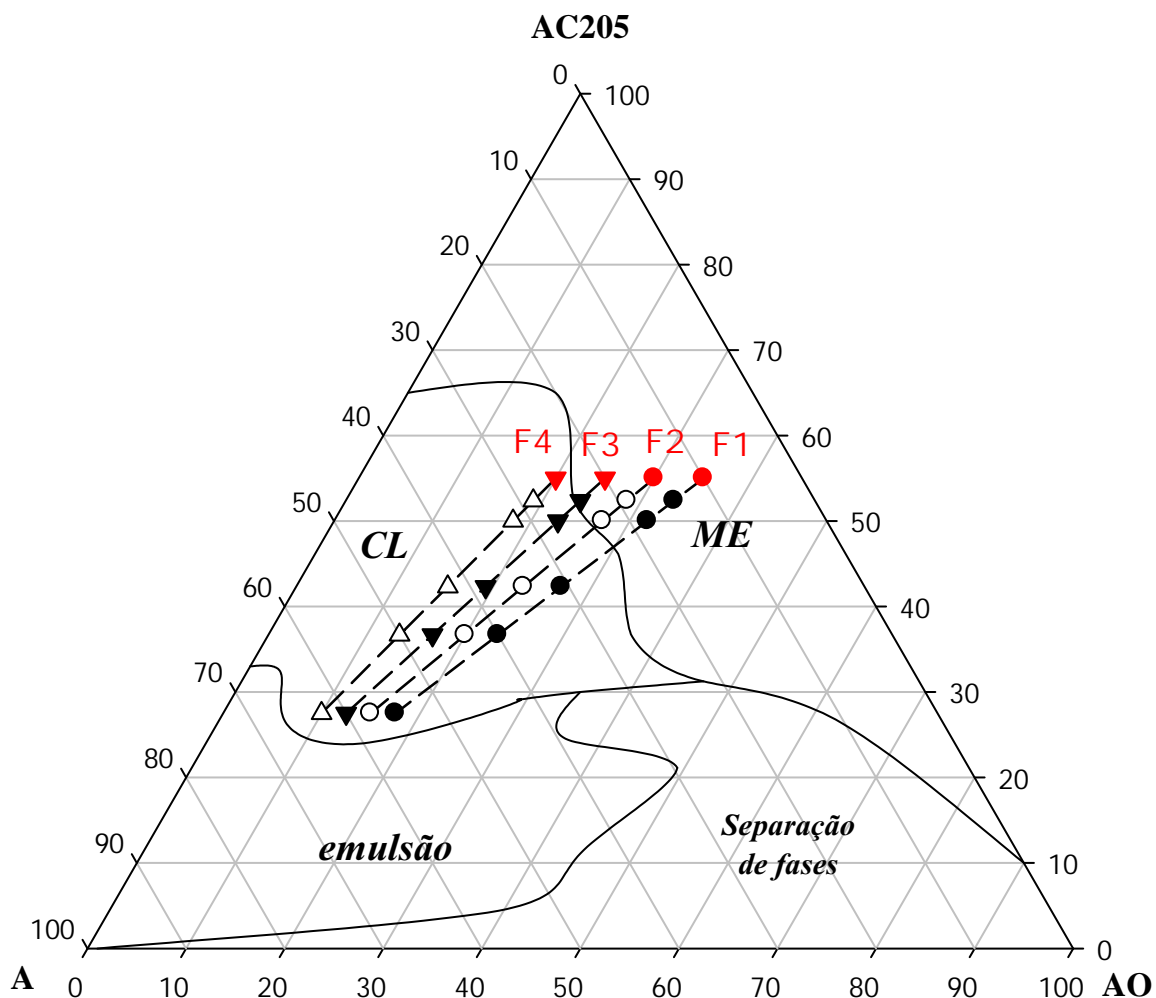


Figura 22: Diagrama de fases representando os pontos do acréscimo de 5, 10, 30, 50 e 100 % de água em F1, F2, F3 e F4 (símbolos em vermelho). (AO) ácido oléico; (AC205) tensoativo; (A) água.

Tabela 12: Nomenclatura e proporções de fase aquosa, oleosa e tensoativo após incorporação de 5, 10, 30, 50, e 100 % de água em F1, F2, F3 e F4.

Nomenclatura das formulações sem AZT	Nomenclatura das formulações com AZT	Água acrescentada (%)	AO (%)	AC205 (%)	Água (%)
F1	F1.A	0	35,00	55,00	10,00
F1.5	F1.A.5	5	33,33	52,38	14,29
F1.10	F1.A.10	10	31,82	50,00	18,18
F1.30	F1.A.30	30	26,92	42,31	30,77
F1.50	F1.A.50	50	23,33	36,67	40,00
F1.100	F1.A.100	100	17,50	27,50	55,00
F2	F2.A	0	30,00	55,00	15,00
F2.5	F2.A.5	5	28,57	52,38	19,05
F2.10	F2.A.10	10	27,27	50,00	22,73
F2.30	F2.A.30	30	23,08	42,31	34,61
F2.50	F2.A.50	50	20,00	36,67	43,33
F2.100	F2.A.100	100	15,00	27,50	57,50
F3	F3.A	0	25,00	55,00	20,00
F3.5	F3.A.5	5	23,81	52,38	23,81
F3.10	F3.A.10	10	22,73	50,00	27,27
F3.30	F3.A.30	30	19,23	42,31	38,46
F3.50	F3.A.50	50	16,67	36,67	46,66
F3.100	F3.A.100	100	12,50	27,50	60,00
F4	F4.A	0	20,00	55,00	25,00
F4.5	F4.A.5	5	19,05	52,38	28,57
F4.10	F4.A.10	10	18,18	50,00	31,82
F4.30	F4.A.30	30	15,40	42,30	42,30
F4.50	F4.A.50	50	13,33	36,67	50,00
F4.100	F4.A.100	100	10,00	27,50	62,5

As Figuras 23, 24, 25 e 26 mostram as fotomicrografias obtidas por MLP de F1, F2, F3 e F4 e de F1A, F2A, F3A e F4A, após a incorporação de 5, 10, 30, 50 e 100 % de água em ambos os grupos.



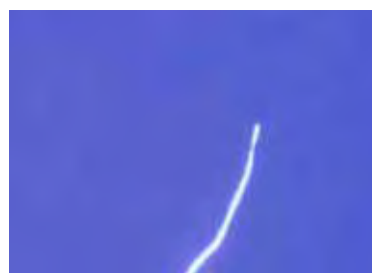
F1.5: campo escuro



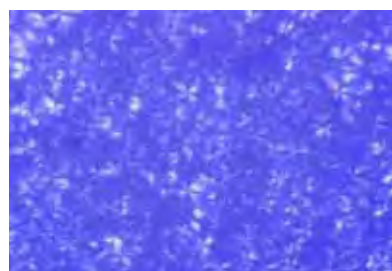
F1A5: campo escuro



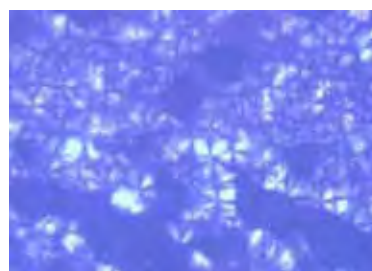
F1.10: campo escuro



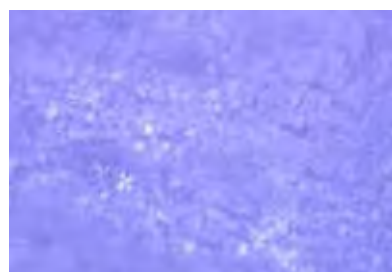
F1A10: campo escuro



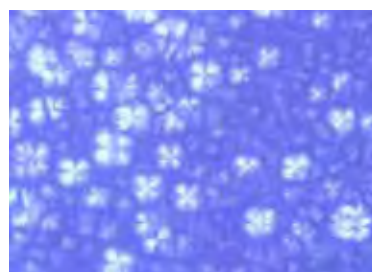
F1.30: "cruzes de malta"



F1A30: "cruzes de malta"



F1.50: "cruzes de malta"



F1A50: "cruzes de malta"



F1.100: "estrias"

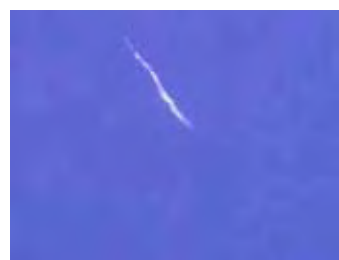


F1A100: "estrias"

Figura 23: Fotomicrografias que ilustram o efeito da água na estruturação de F1 e F1A, obtidas por MLP (F1.n e F1An, n = 5, 10, 30, 50 100 % de água adicionada).



F2.5: campo escuro



F2A5: campo escuro



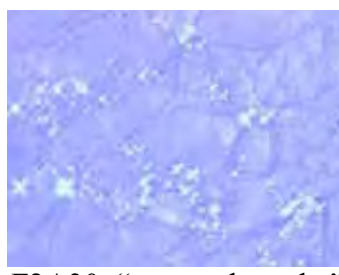
F2.10: campo escuro



F2A10: "cruzes de malta"



F2.30: "cruzes de malta"



F2A30: "cruzes de malta"



F2.50: "cruzes de malta"



F2A50: "cruzes de malta"

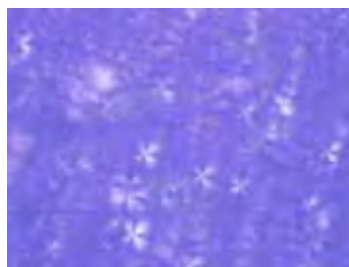


F2.100: "estrias"



F2A100: "estrias"

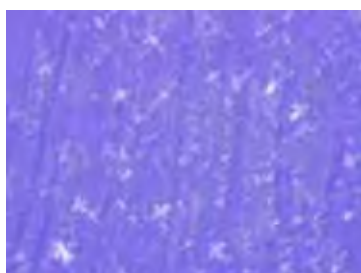
Figura 24: Fotomicrografias que ilustram o efeito da água na estruturação de F2 e F2.A, obtidas por MLP (F2.n e F2An, n = 5, 10, 30, 50 100 % de água adicionada).



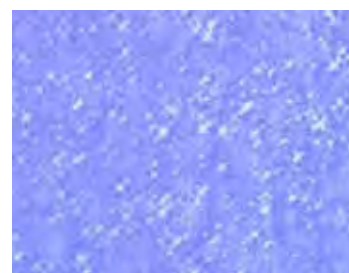
F3.5: "cruzes de malta"



F3A5: "cruzes de malta"



F3.10: "cruzes de malta"



F3A10: "cruzes de malta"



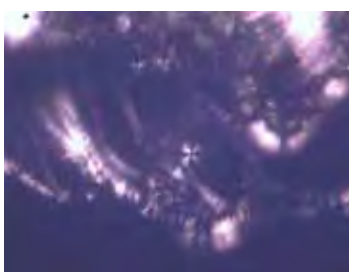
F3.30: "cruzes de malta"



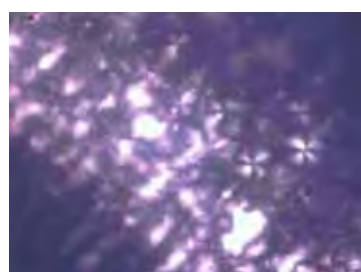
F3A30: "cruzes de malta"



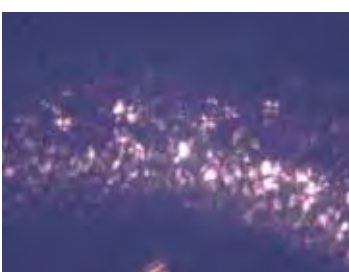
F3.50: "cruzes de malta"



F3A50: "cruzes de malta"

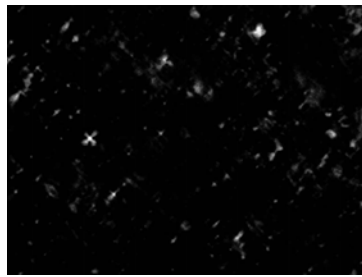


F3.100: "cruzes de malta"

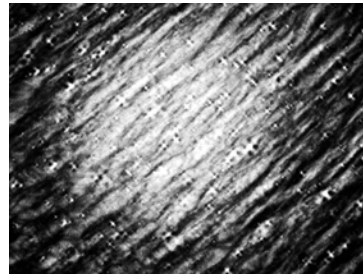


F3A100: "cruzes de malta"

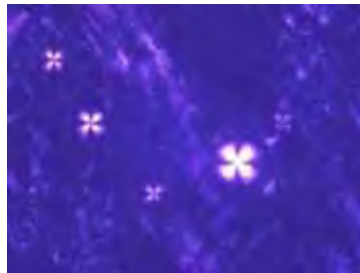
Figura 25: Fotomicrografias que ilustram o efeito da água na estruturação de F3 e F3A obtidas por MLP (F3.n e F3An, n = 5, 10, 30, 50 100 % de água adicionada).



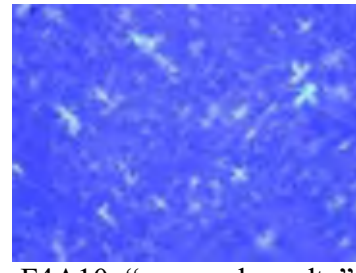
F4.5: "cruzes de malta"



F4A5: "cruzes de malta"



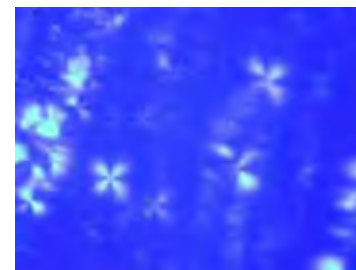
F4.10: "cruzes de malta"



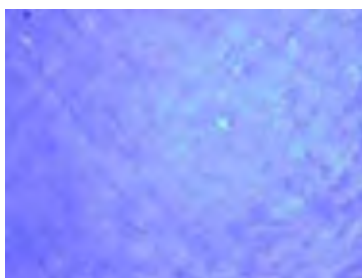
F4A10: "cruzes de malta"



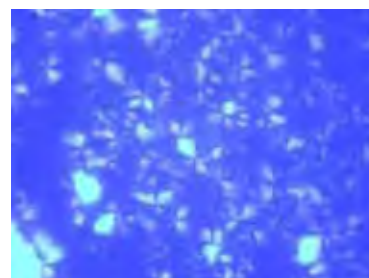
F4.30: "cruzes de malta"



F4A30: "cruzes de malta"



F4.50: "cruzes de malta"



F4A50: "cruzes de malta"



F4.100: "estrias"



F4A100: "estrias"

Figura 26: Fotomicrografias que ilustram o efeito da água na estruturação de F4 e F4A, obtidas por MLP (F4.n e F4An, n = 5, 10, 30, 50 100 % de água adicionada).

Pode ser observado nas fotomicrografias que a adição de água provocou a mudança dos sistemas isotrópicos em sistemas anisotrópicos. Em F1 e F1A (Figura 23), a partir da adição de 30 % de água as “cruzes de malta” começam a surgir. Em F2 e F2A (Figura 24), o AZT parece ter contribuído para maior estruturação do sistema, pois em F2A houve a transição CL com adição de 10 % de água. Já para F2 não carregado, a formação de sistema lamelar ocorreu a partir da adição de 30 % de água. Nas formulações F3 e F3A (Figura 25) a transição de fases ocorreu já com a adição de 5 % de água, devido sua localização no diagrama (Figura 22) ser próxima da linha de transição de fases. F4 e F4A (Figura 26) são sistemas lamelares, e a adição até 50 % de água não provocou mudança de fases, permanecendo as “cruzes de malta”. A adição de 100% de água nas formulações F1, F1A, F2, F2A, F3 e F3A provocou a mudança para fase hexagonal, indicada pela textura fibrosa ou estrias observadas nas fotomicrografias. A adição de 100 % de água em F3 e F3A faz permanecer as “cruzes de malta”.

Através do ensaio de varredura de frequência foi possível observar as mudanças nas propriedades oscilatórias das formulações após a adição de água. Nos gráficos indicados nas Figuras 27 e 28 foi plotado o módulo de armazenamento G' em função da frequência. No Anexo I, os gráficos de cada amostra obtida pela adição de água comparam o G' com o módulo de perda G'' .

Pode ser observado na Figura 27 que a 25 °C, o grau de estruturação de F1, F2, F3 e F4 aumenta quando se adiciona as porcentagens crescentes de água, pois há uma diminuição da inclinação do módulo G' , o qual fica cada vez mais independente da frequência. O mesmo comportamento ocorre com as formulações incorporadas com o AZT (F1A, F2A, F3A, F4A), e na temperatura nasal de 32 °C (Figura 28). Além disso, para as amostras adicionadas com quantidades maiores de água (50 e 100 % em relação

à massa inicial), todas mostraram o módulo armazenamento G' maior que o módulo de perda G'' (ver Anexo I)

Pode ser observado que a magnitude dos valores de G' das amostras sem fármaco em com fármaco, nas temperaturas de 25 °C e 32 °C, não é alterada. Logo o AZT parece não alterar o comportamento viscoelástico dos sistemas. Já analisando em diferentes temperaturas, é possível observar que os valores de G' a 32 °C sofrem leve diminuição em relação aos valores de G' a 25 °C. Porém, os valores de G' nas amostras com 30 % ou mais de água adicionada exibem valores ainda altos (na ordem de 1000 Pa) e independentes da frequência. Portanto, embora a temperatura provoque leve desestruturação dos sistemas, ela não impede a formação de uma matriz mais viscosa após o contato das formulações com a água, a 32 °C.

Neste ensaio ainda foi possível confirmar que F3 e F3A, adicionadas com 100 % de água, formam uma estrutura menos rígida que as outras formulações adicionadas com a mesma quantidade de água. Na MLP foi visto que F3.100 e F3A100 na Figura 25 exibem “cruzes de malta”, enquanto que as outras formulações adicionadas com 100 % de água (F1.100 e F1A100 – Figura 23; F2.100 e F2A100 – Figura 24; F4.100 e F4A100 – Figura 26) exibem “estrias”. Os G' de F3.100 e F3A100 em 25 e 32 °C foram em torno de 100 Pa, enquanto que para as outras formulações foi em torno de 1000 Pa.

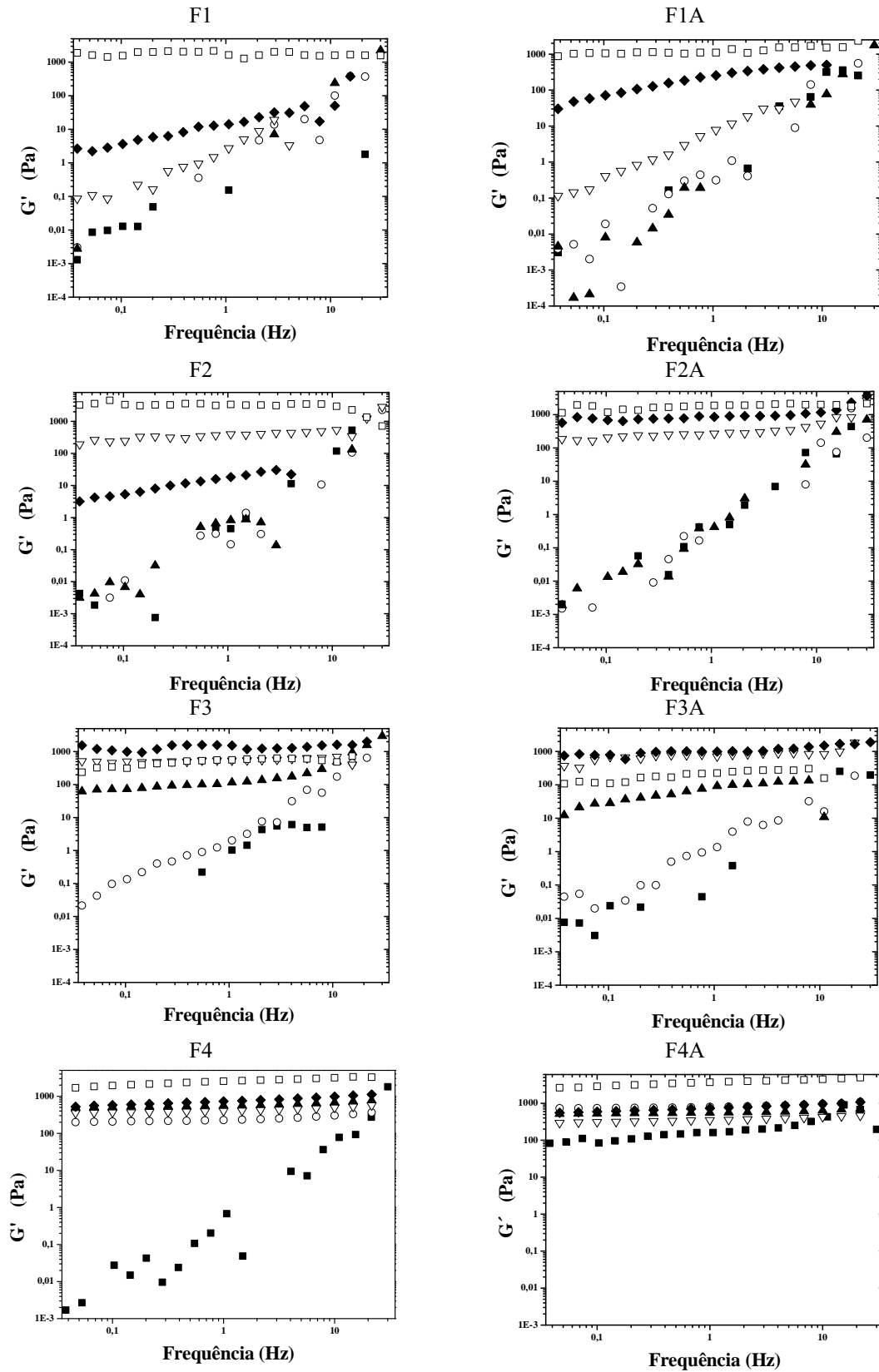


Figura 27: Efeito do acréscimo de 5 % (○), 10 % (▲), 30 % (▽), 50 % (◆) e 100 % (□) de água nos módulos elásticos das amostras carregadas e não carregadas a 25 °C. O G' das formulações antes da adição da água foi representado pelo símbolo (■).

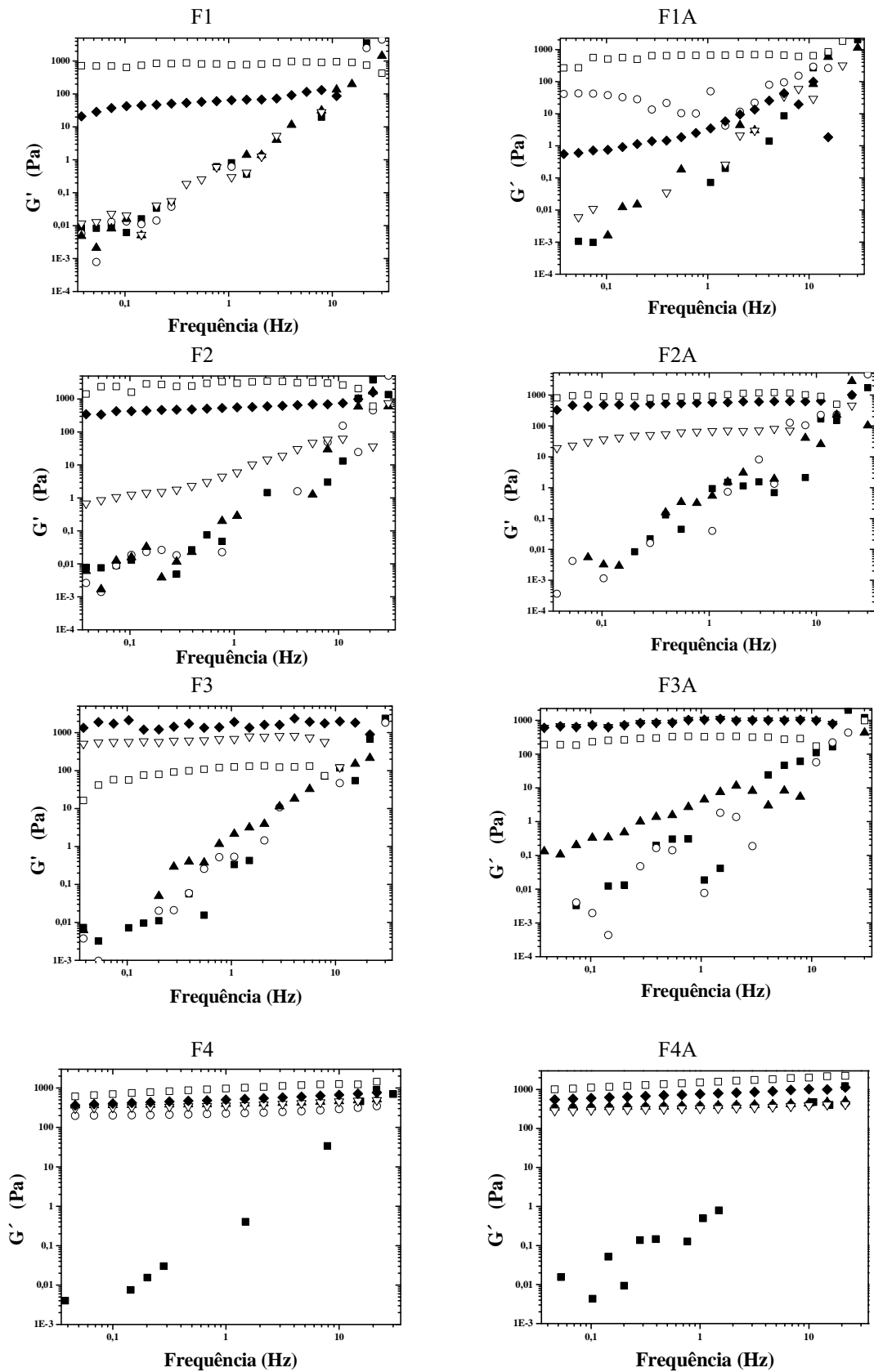


Figura 28: Efeito do acréscimo de 5 % (○), 10 % (▲), 30 % (▽), 50 % (◆) e 100 % (□) de água nos módulos elásticos das amostras carregadas e não carregadas a 32 °C. O G' das formulações antes da adição da água foi representado pelo símbolo (■).

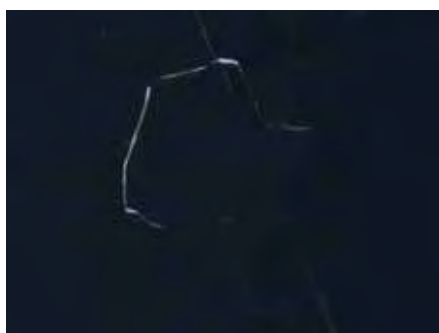
5.5.2.Efeito dos componentes do muco na estrutura das formulações.

Para analisar o efeito dos componentes do muco na estruturação das formulações, elas foram adicionadas com FNS e analisadas por MLP, SAXS, reologia oscilatória, além da análise da força de mucoadesão. A nomenclatura para as formulações F1, F2, F3 e F4 carregadas e não carregadas adicionadas com 30, 50 e 100% de FNS estão dispostas na Tabela 13. Para simular o efeito *in vivo*, nesta etapa as análises foram realizadas na temperatura nasal de 32 °C.

Tabela 13: Nomenclatura das formulações F1, F2, F3 e F4 com e sem AZT após a adição de 30, 50, e 100% de FNS.

	Nomenclatura das formulações sem AZT	Nomenclatura das formulações com AZT
F1 ou F1A + 30 % FNS	M1.30	M1A30
F1 ou F1A + 50 % FNS	M1.50	M1A50
F1 ou F1A + 100 % FNS	M1.100	M1A100
F2 ou F2A + 30 % FNS	M2.30	M2A30
F2 ou F2A + 50 % FNS	M2.50	M2A50
F2 ou F2A + 100 % FNS	M2.100	M2A100
F3 ou F3A + 30 % FNS	M3.30	M3A30
F3 ou F3A + 50 % FNS	M3.50	M3A50
F3 ou F3A + 100 % FNS	M3.100	M3A100
F4 ou F4A + 30 % FNS	M4.30	M4A30
F4 ou F4A + 50 % FNS	M4.50	M4A50
F4 ou F4A + 100 % FNS	M4.100	M4A100

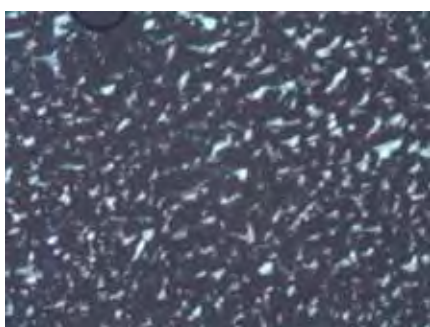
Nas Figuras 29, 30, 31 e 32 estão dispostas as fotomicrografias obtidas por MLP das amostras representativas de cada porcentagem de FNS adicionado nas formulações F1A, F2A, F3A e F4A.



M1A5: campo escuro



M1A10: campo escuro



M1A30: "cruzes de malta"



M1A50: "cruzes de malta"



M1A100: "cruzes de malta"

Figura 29: Fotomicrografias que ilustram o efeito dos componentes do muco (FNS) na estruturação de F1A, obtidas por MLP a 32 °C (M1A30 = F1+30 % FNS; M1A50 = F1+50 % FNS; M1A100 = F1+ 100 % FNS).



M2A5: campo escuro



M2A10: "cruces de malta"



M2A30: "cruces de malta"



M2A50: "cruces de malta"

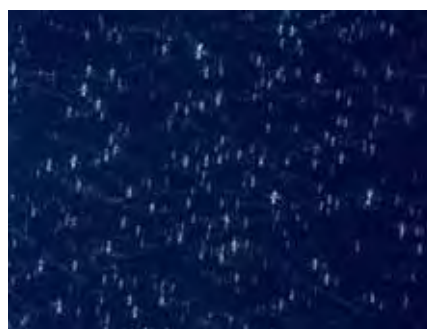


M2A100: "cruces de malta"

Figura 30: Fotomicrografias que ilustram o efeito dos componentes do muco na estruturação de F2A, obtidas por MLP a 32 °C (M2A30 = F2+30 % FNS; M2A50 = F2+50 % FNS; M2A100 = F2+ 100 % FNS).



M3A5: “cruzes de malta”



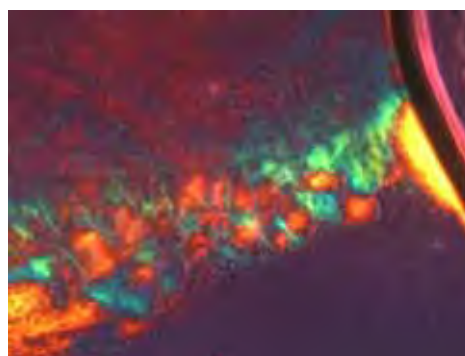
M3A10: “cruzes de malta”



M3A30: “cruzes de malta”

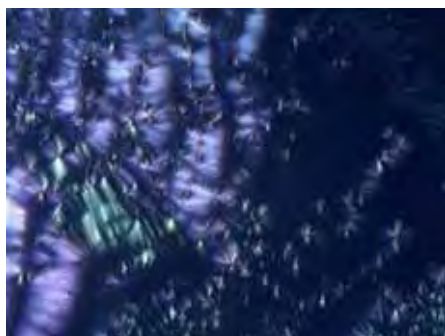


M3A50: “cruzes de malta”



M3A100: “cruzes de malta”

Figura 31: Fotomicrografias que ilustram o efeito dos componentes do muco na estruturação de F3A, obtidas por MLP a 32 °C (M3A30 = F3+30 % FNS; M3A50 = F3+50 % FNS; M3A100 = F3+ 100 % FNS).



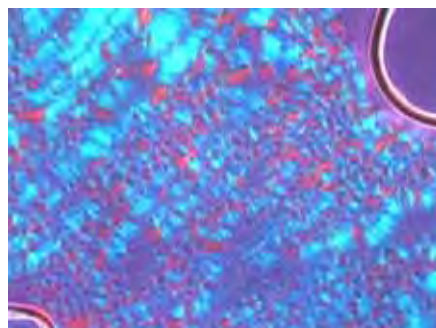
M4A5: “cruzes de malta”



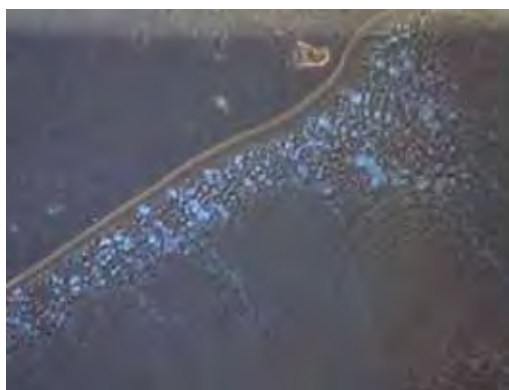
M4A10: “cruzes de malta”



M4A30: “cruzes de malta”



M4A50: “cruzes de malta”



M4A100: “cruzes de malta”

Figura 32: Fotomicrografias que ilustram o efeito dos componentes do muco na estruturação de F4A, obtidas por MLP a 32 °C (M4A30 = F4+30 % FNS; M4A50 = F4+50 % FNS; M4A100 = F4+ 100 % FNS).

Os resultados obtidos por MLP foram constatados pelas análises de SAXS. As curvas de intensidade de espalhamento obtidas estão na Figura 33, e os valores de q_{max} e razão entre as distâncias interplanares estão na Tabela 14.

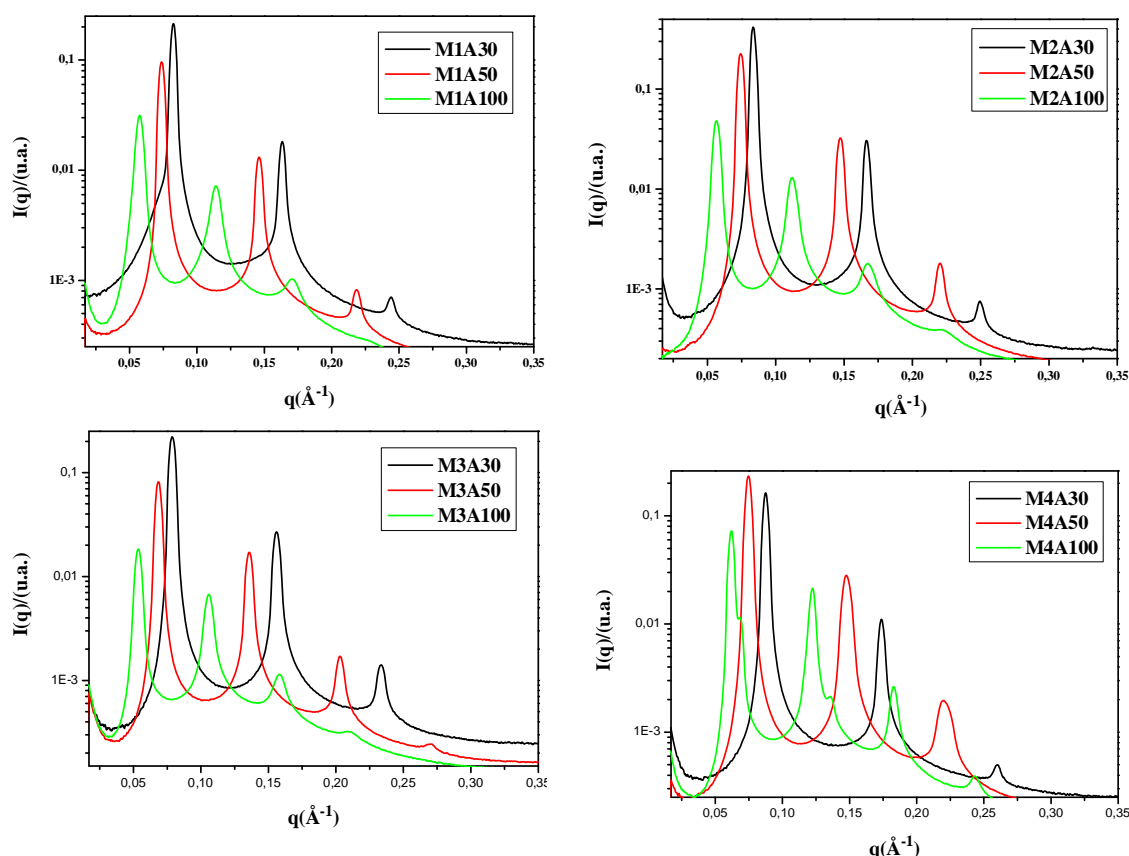


Figura 33: Caracterização por SAXS das formulações F1A, F2A, F3A e F4A adicionadas com 30 % (MnA30), 50 % (MnA50) e 100 % (MnA100) de FNS ($n = 1, 2, 3$ ou 4) a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Primeiramente, pode ser confirmado que quando se adiciona 30, 50 e 100% de FNS nas formulações F1A, F2A, F3A e F4A, todas exibem estrutura líquido cristalina lamelar, devido à relação d_1/d_2 e d_1/d_3 ser respectivamente 2 e 3. Para algumas formulações, aparece até um terceiro pico (ver Tabela 14), mantendo a periodicidade lamelar de 2:3:4. É observado na Figura 33 que os picos deslocam-se para menores

valores de q , e, portanto é possível inferir que as distâncias entre os objetos espalhadores (lamelas) estão aumentando. A adição de FNS aumenta o domínio hidrofílico das lamelas em F1A, F2A, F3A e F4A e causa o distanciamento entre elas. Este fato pode ser constatado pelo cálculo do parâmetro de rede a (Tabela 15), com o qual se pode chegar à conclusão que a distância entre os centros das lamelas está aumentando. Na Tabela 15 é possível observar que δ diminui com o aumento de fase aquosa.

Tabela 14: Valores de q_{max} (Å) e razão entre as distâncias interplanares das formulações F1A, F2A, F3A e F4A adicionadas com 30, 50 e 100 % de FNS, e das formulações F1, F2, F3 e F4 adicionadas com 50 % de FNS.

	q_{max_1}	q_{max_2}	q_{max_3}	q_{max_4}	d_1/d_2	d_1/d_3	d_1/d_4
M1A30	0,08	0,16	0,24	-	2	3	-
M1A50	0,07	0,15	0,22	-	2	3	-
M1A100	0,06	0,11	0,17	-	2	3	-
M2A30	0,08	0,17	0,25	-	2	3	-
M2A50	0,07	0,15	0,22	-	2	3	-
M2A100	0,06	0,11	0,17	0,22	2	3	4
M3A30	0,08	0,15	0,23	-	2	3	-
M3A50	0,07	0,14	0,20	0,27	2	3	4
M3A100	0,05	0,10	0,16	0,21	2	3	4
M4A30	0,09	0,17	0,26	-	2	3	-
M4A50	0,07	0,15	0,22	0,29	2	3	4
M4A100	0,06	0,12	0,18	0,24	2	3	4
M1.50	0,07	0,14	0,22	-	2	3	-
M2.50	0,07	0,15	0,22	-	2	3	-
M3.50	0,07	0,13	0,20	0,27	2	3	4
M4.50	0,07	0,13	0,20	0,26	2	3	4

Tabela 15: Parâmetros estruturais das formulações F1 a F4 após a adição de FNS.

	<i>Estrutura</i>	<i>d</i> (Å)	<i>a</i> (Å)	<i>δ</i> (Å)
M1A30	Lα	76,1	76,1	20,5
M1A50	Lα	86,5	86,4	20,2
M1A100	Lα	110,0	110,0	19,2
M2A30	Lα	75,6	75,5	17,5
M2A50	Lα	84,0	84,0	16,8
M2A100	Lα	111,0	111,0	16,7
M3A30	Lα	80,4	80,4	15,5
M3A50	Lα	92,1	92,1	15,4
M3A100	Lα	118,0	118,0	14,7
M4A30	Lα	71,8	71,7	11,1
M4A50	Lα	84,6	84,6	11,3
M4A100	Lα	102,2	102,2	10,2
M150	Lα	85,3	85,2	19,9
M250	Lα	85,3	85,2	17,1
M350	Lα	93,3	93,6	15,6
M450	Lα	95,3	95,2	12,7

Para analisar se a presença do AZT interfere na interação das formulações com o FNS, foi feita uma análise de SAXS (Figura 34) da mistura de 50% de FNS nas formulações sem o fármaco (M1.50, M2.50, M3.50 e M4.50), a fim de comparar com as análises já realizadas com as mesmas incorporadas com AZT. Observando a Tabela 15, os valores das distâncias *d* e parâmetro de rede *a* são praticamente os mesmos das respectivas amostras com AZT (M1A50, M2A50, M3A50, M4A50), idem para a espessura do domínio polar das lamelas *δ*. Portanto, nesta análise, o fármaco não causou nenhuma alteração na estruturação das formulações.

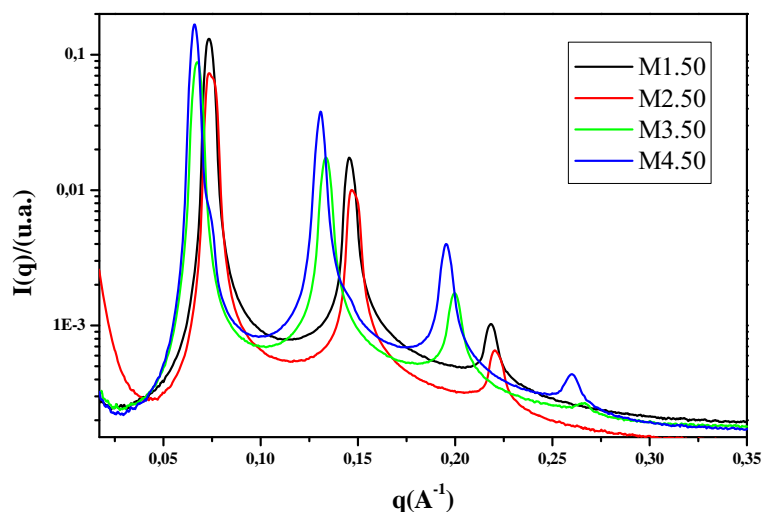


Figura 34: Caracterização por SAXS das formulações F1, F2, F3 e F4 adicionadas com 50% de FNS (Mn.50, n = 1, 2, 3 ou 4) a 32 °C.

A temperatura parece ter provocado mudança no comportamento de fases das amostras com 100 % de FNS. A análise por MLP e SAXS a 32 °C mostra que estas amostras possuem estruturas lamelares. Nas imagens de MLP das Figuras 23, 24 e 26 é visto que as amostras com 100 % de água possuem estrutura hexagonal, devido a presença de “estrias”, porém estas fotomicrografias foram obtidas a 25 °C. Portanto, no ambiente nasal, é possível que as formulações transitem apenas para a fase lamelar, não chegando a formar a mesofase hexagonal.

Com análises por SAXS foi possível concluir que as formulações em estudo podem, em presença de água ou FNS, serem precursoras de CL, e que os componentes do muco e nem o fármaco interferiram neste comportamento.

Nos ensaios reológicos para avaliação da mucoadesão, realizado através do ensaio de varredura de frequência, foi possível observar as mudanças nas propriedades oscilatórias das formulações após a adição de FNS. Nos gráficos indicados nas Figuras 35 e 36, foi plotado o módulo de armazenamento G' em função da frequência, pois com este parâmetro é possível observar o aumento das propriedades elásticas dos sistemas.

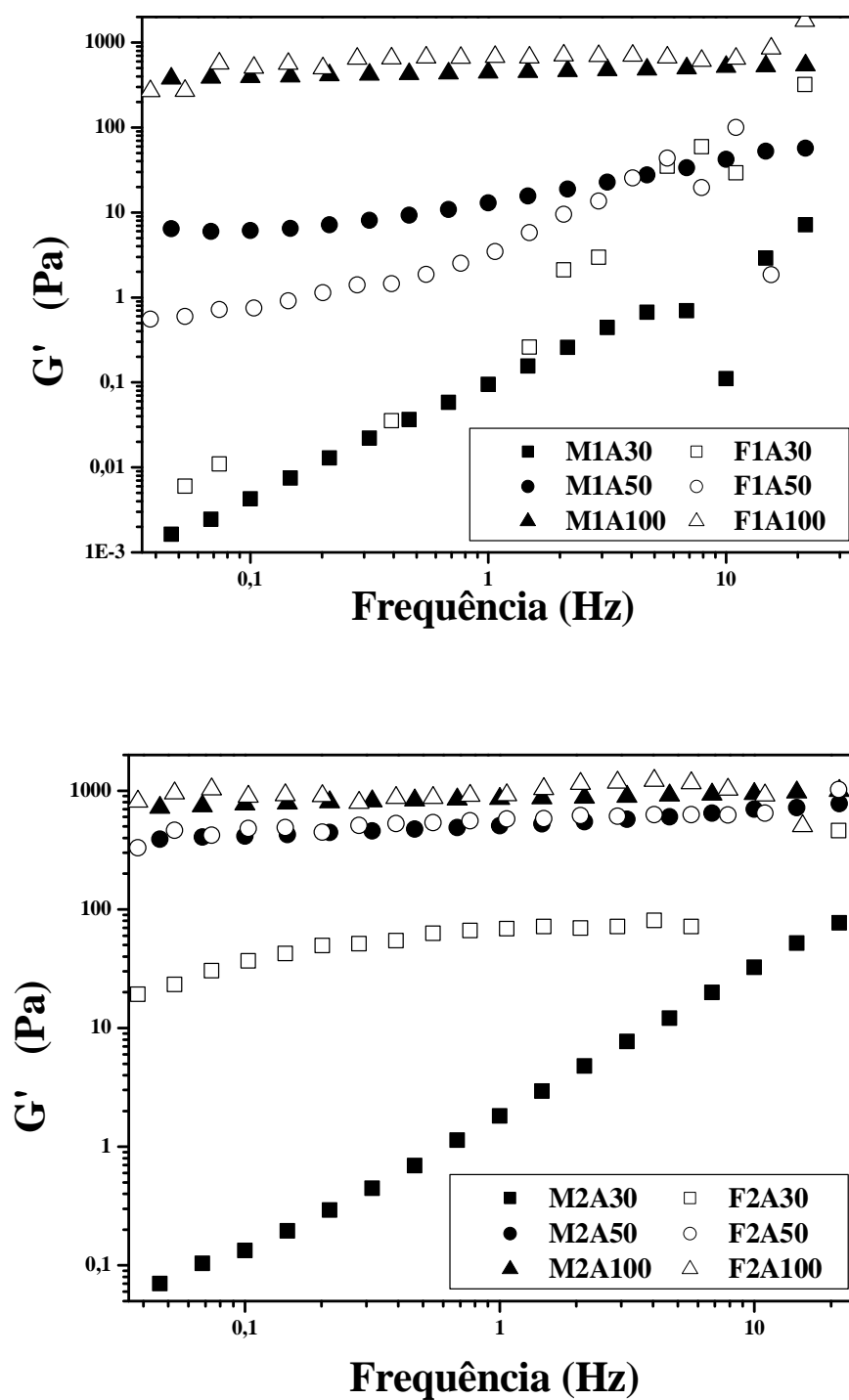


Figura 35: Efeito do acréscimo de 30 % (■), 50 % (●) e 100 % (▲) de FNS nos módulos elásticos das formulações F1A, F2A a 32 °C. Os símbolos abertos são as mesmas formulações adicionadas com 30 % (□), 50 % (○) e 100 % (△) de água.

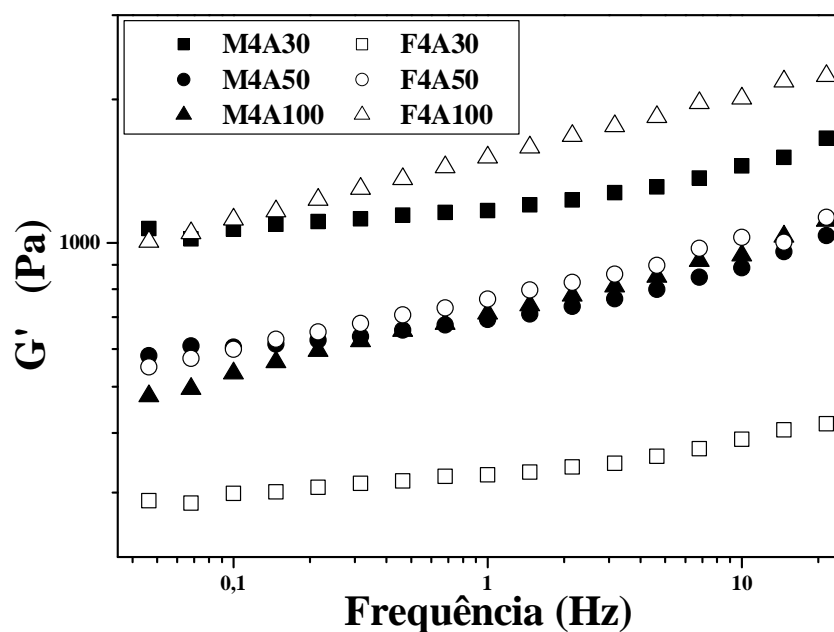
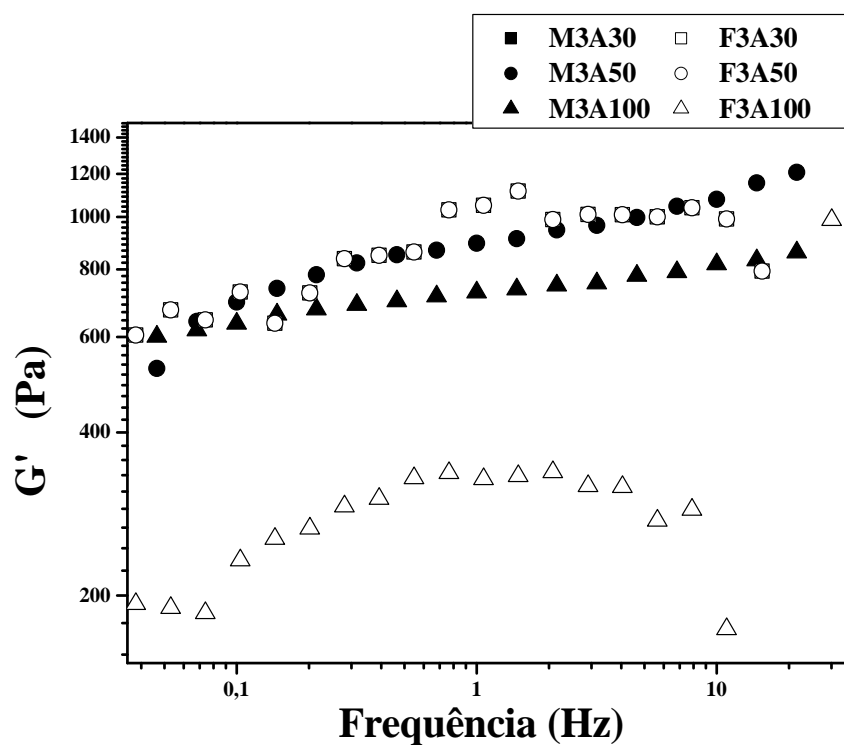


Figura 36: Efeito do acréscimo de 30 % (■), 50 % (●) e 100 % (▲) de FNS nos módulos elásticos das formulações F3A e F4A a 32 °C. Os símbolos abertos são as mesmas formulações adicionadas com 30 % (□), 50 % (○) e 100 % (△) de água.

Nos gráficos apresentados nas Figuras 35 e 36, há a comparação dos módulos elásticos das amostras adicionadas com 30, 50 e 100 % (símbolos fechados) de FNS com as mesmas adicionadas apenas de água (símbolos abertos). Observa-se que o comportamento reológico tanto da adição de FNS como de água nas formulações foi o mesmo. Para ambos os grupos, o módulo de armazenamento aumenta e fica independente da frequência conforme se aumenta a porcentagem de FNS ou água. Isto sugere que a estruturação dos sistemas independe dos componentes do muco, e a transição de fases das formulações é devida apenas à água.

Para analisar se o comportamento reológico da interação mucina-formulações é alterado pela presença do AZT, foi realizada a varredura de frequência das formulações carregadas e não carregadas adicionadas com 50 % de FNS. Neste estudo (Figura 37) ambos os grupos exibiram o mesmo comportamento, ou seja, altos valores de G' independentes da frequência, sugerindo que as amostras com 50 % de FNS possuem forte estruturação. As formulações com fármaco e sem fármaco exibiram o mesmo comportamento reológico, e, portanto o AZT não influenciou na interação dos sistemas com a mucina.

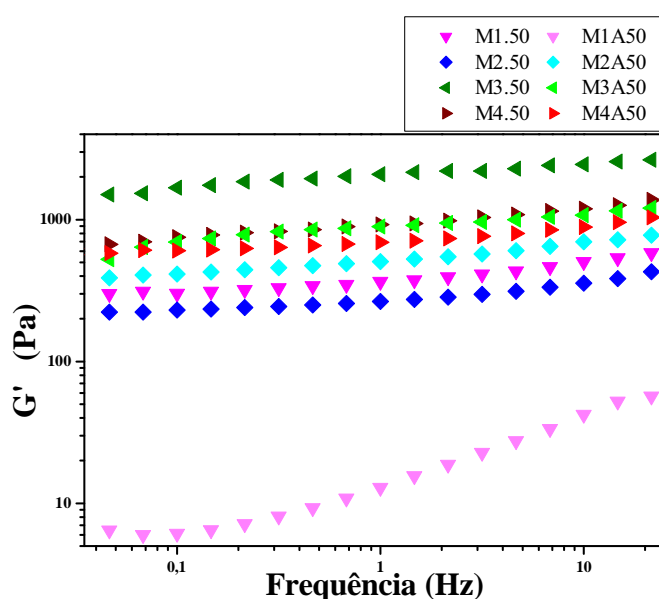


Figura 37: Comparação do efeito do acréscimo de 50 % de FNS entre os módulos elásticos das formulações carregadas (MnA50, n = 1, 2, 3 ou 4) e não carregadas com AZT (Mn.50, n = 1, 2, 3 ou 4).

A interação mucina-sistema pode ser matematicamente calculada, e o parâmetro obtido neste cálculo é chamado de parâmetro de interação ou sinergismo reológico. A resposta reológica da mistura da formulação com o FNS deve ser maior que a resposta da formulação ou do FNS isolados, para um sistema ser considerado mucoadesivo. Este parâmetro foi calculado através dos valores do módulo elástico na frequência oscilatória de 1,0 Hz.

São propostas várias relações para o cálculo do sinergismo reológico, como já discutido na revisão bibliográfica. Na Tabela 16, estão dispostos os resultados dos parâmetros $\Delta G'_{\text{absoluto}}$, $\Delta G'_{\text{relativo}}$ e relação $\log G'$, obtidos através das Equações 3, 4 e 5 respectivamente.

Tabela 16: Parâmetros de interação ou de sinergismo reológico (G'_{mis} , $\Delta G'_{\text{absoluto}}$, $\Delta G'_{\text{relativo}}$, relação $\log G'$) obtidos a 1 Hz, das formulações F1 a F4 após sua mistura com 30, 50 e 100 % de FNS. G'_f é o módulo elástico das formulações antes da adição do FNS.

<i>Formulação</i>	G'_f (Pa)	G'_{mis} (Pa)	$\Delta G'$ <i>absoluto</i>	$\Delta G'$ <i>relativo</i>	<i>Relação</i> $\log G'$
M1A30	0,02	0,1	0,02	0,3	0,1
M1A50	0,02	12,9	12,8	177,7	2,3
M1A100	0,02	442,8	442,7	6132,8	3,8
M2A30	0,90	1,8	0,9	0,9	0,3
M2A50	0,90	506,9	506,0	544,0	2,7
M2A100	0,90	854,0	853,1	917,2	3,0
M3A30	0,02	339,1	339,1	18318,8	4,3
M3A50	0,02	892,9	892,9	48237,8	4,7
M3A100	0,02	725,0	725,0	39167,0	4,6
M4A30	0,5	1168,0	1167,5	2340,2	3,4
M4A50	0,5	691,5	691,0	1385,0	3,1
M4A100	0,5	712,0	711,5	1426,1	3,2

G'_{mis} = módulo elástico da mistura da formulação com FNS; $\Delta G'$ = sinergismo reológico.

O muco em condições fisiológicas é uma matriz estruturada, cuja reologia é governada pelas moléculas de mucina (DAVIES; VINEY, 1998). O $\Delta G'_{absoluto}$ leva em consideração a reologia da solução de mucina isolada, a qual nestes estudos foi insignificante. Por isso a discussão será feita através dos parâmetros $\Delta G'_{relativo}$ e *relação $\log G'$* , os quais levam em consideração a reologia do sistema e de sua mistura com a mucina. O primeiro parâmetro tem a desvantagem de não ser possível comparar a magnitude dos resultados positivos e negativos. Com a *relação $\log G'$* é possível verificar que cada aumento de uma unidade em seu valor, o módulo elástico aumenta num fator de 10 vezes. Portanto, observando na Tabela 16, as formulações F1A, F2A, F3A e F4A misturadas com 100% de FNS têm o G' cerca de 30 vezes maior que estas formulações na ausência de FNS. A maior *relação* foi obtida por M3A50 (4,68), mas isso não significa que seu módulo elástico foi o maior, e sim a sua diferença em *relação* à formulação original, que no caso é a F3A. Para F1A e F2A, conforme se aumenta a porcentagem de FNS, os valores dos parâmetros de interação $\Delta G'_{relativo}$ e *relação $\log G'$* foram crescentes. Para F3A e F4A, a adição tanto de 30, 50 ou 100 % de FNS não alterou significativamente seus valores de interação, os quais ficaram constantes em torno de 4,5 para F3A e 3,2 para F4A. Isso pode ser explicado pelos estudos de MLP realizados previamente com a água. A transição para fase lamelar em F1A e F2A ocorreu em torno de 30 % de água (Figura 23 e 24). Já para F3A (Figura 24) a transição ocorreu com 5 % de água, e F4A (Figura 25) já era uma fase lamelar antes da adição da água. Logo F1A e F2A necessitam de mais água para se estruturarem do que F3A e F4A, e esse comportamento reflete na reologia, em que as amostras F1A e F2A com 30 e 50% de FNS possuem menor módulo elástico que F3A e F4A adicionadas com as mesmas quantidades de FNS. Pode-se concluir então que a interação do muco com as formulações F3A e F4A ocorrem mais rapidamente.

5.5.2.1. Avaliação da força mucoadesiva

A força necessária para remover cada sistema a partir do disco de mucina está apresentada na Tabela 17. O número de repetições neste ensaio foi maior (n=7), pois suas condições experimentais são muito mais, com muitas variáveis (camada da amostra, hidratação, tempo de hidratação, carregamento da amostra, tempo de carregamento, etc.), as quais devem ser aprimoradas e fixadas para obter resultados reprodutíveis. A reprodutibilidade das medidas reológicas é razoavelmente boa, já que as medidas são realizadas com a mistura das formulações com a mucina já equilibrada; a composição e a temperatura podem ser cuidadosamente controladas e, por isso, é necessário um número menor de repetições para obter dados estatisticamente significantes.

Os valores de força obtidos neste ensaio possuem a mesma magnitude dos valores obtidos em alguns estudos descritos na literatura que utilizaram a mesma metodologia. Bruschi e colaboradores (2007) testaram sistemas compostos por poloxamer 407 e carbopol 934P para administração na mucosa periodontal, e as forças de mucoadesão obtidas no ensaio utilizando a mesma metodologia aqui empregada foram da ordem de 0,28 a 0,39 N. Andrews e Jones (2006) desenvolveram sistemas para aplicação tópica em mucosas compostos por hidroxietilcelulose e policarbofil, e as forças de mucoadesão obtidas foram da ordem de 0,07 a 0,39 N. Em ambos os estudos, os ensaios de obtenção da força de mucoadesão foram realizados em conjunto com outros ensaios *in vitro*, como a obtenção do parâmetro reológico de interação.

Tabela 17: Força de mucoadesão das formulações F1, F2, F3, F4 e adicionadas com 50% de FNS (M1.50, M2.50, M3.50 e M4.50).

	Força (N)							
	F1	F2	F3	F4	M1.50	M2.50	M3.50	M4.50
	0,311	0,266	0,289	0,284	0,217	0,265	0,239	0,282
	0,338	0,278	0,234	0,298	0,207	0,270	0,330	0,280
	0,245	0,250	0,273	0,314	0,269	0,333	0,291	0,281
	0,361	0,346	0,219	0,345	0,316	0,308	0,249	0,315
	0,307	0,259	0,253	0,278	0,265	0,359	0,230	0,270
	0,280	0,305	0,230	0,220	0,280	0,261	0,320	0,280
	0,300	0,250	0,230	0,220	0,280	0,335	0,320	0,320
Média	0,306	0,279	0,247	0,280	0,262	0,304	0,283	0,290
DP	0,038	0,035	0,026	0,046	0,038	0,040	0,043	0,019
CV (%)	12	13	10	17	15	13	15	7

Pode ser observado que a adição de 50 % de FNS nas formulações F1, F2, F3 e F4 não aumentou a força de adesão. A análise de variância (ANOVA – fator único) mostrou que os oito grupos não possuem diferença estatisticamente significativa, utilizando nível de significância igual a 0,05 (valor $P = 0,0638$). Embora estas amostras tenham apresentado maior sinergismo reológico (Tabela 16), a adesividade não foi influenciada pelas suas características viscoelásticas. Com isso, pode ser deduzido que a adesão está ligada mais às propriedades do material que compõe a amostra do que a com suas características viscoelásticas.

5.6. Estudos de liberação do fármaco

5.6.1. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A composição dos sistemas de liberação como o tensoativo e a fase oleosa, pode interferir na quantificação do fármaco, e por isso se torna necessário adequar o método para quantificá-lo a partir destes sistemas.

A validação foi desenvolvida para confirmar se o método proposto para quantificação do AZT nos ensaios de liberação apresenta linearidade na faixa de concentração utilizada, especificidade, precisão e exatidão. Os parâmetros de validação utilizados foram os estipulados pela ANVISA (2003) e ICH (1996).

A equação da regressão linear obtida pela média das três curvas de calibração foi $y = 1231898,81 x - 99764,73$, $r = 0.9993$. O CV da inclinação e do intercepto com o eixo y foi 0,21 % e 5,00 %, respectivamente. Portanto, de acordo com o critério adotado, o método é linear na faixa de concentração utilizada.

A especificidade, definida como a capacidade do método em mensurar o AZT no ambiente real de ensaio, especialmente na presença do fluido receptor e dos componentes das formulações, foi confirmada pela comparação dos cromatogramas ilustrados na Figura 38. Os picos mostram boa resolução, indicando alta especificidade e seletividade do método. O cromatograma utilizado como referência (Figura 38a) exibe o pico do AZT no tempo de retenção de 7,6 min. O baixo tempo de retenção é conveniente para procedimentos de controle de qualidade. A metodologia é seletiva porque os picos do fluido receptor estão situados antes de 6,0 min., e, portanto não interfere na detecção do AZT.

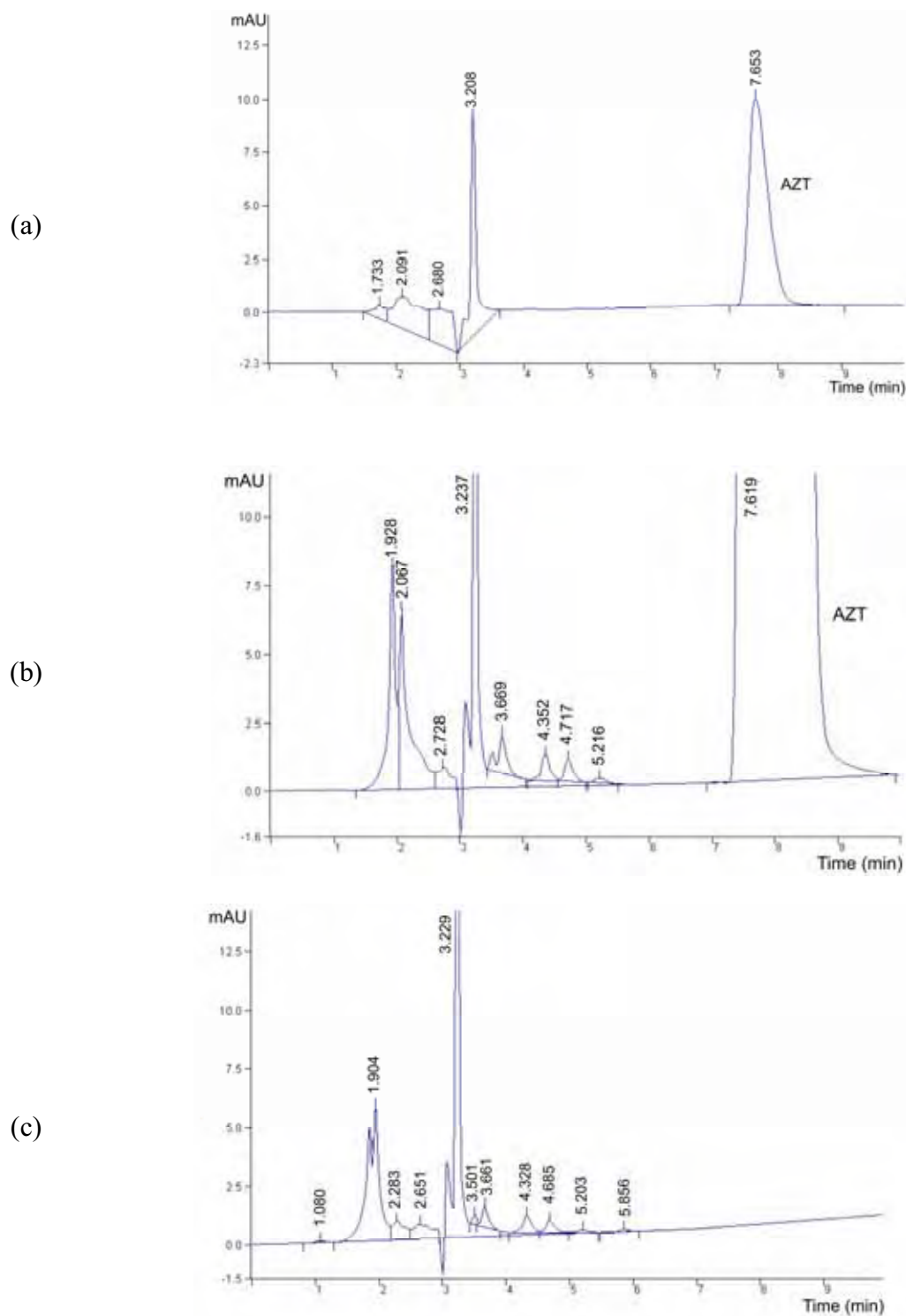


Figura 38: Cromatogramas de (a) solução de trabalho a $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, (b) fluido receptor após 1,0 h de ensaio de liberação de F1A a 40 mg.g^{-1} , e (c) fluido receptor após 1,0 h de ensaio de liberação de F1 sem AZT.

O cromatograma do controle negativo (Figura 38c) mostrou ausência de qualquer pico na região de retenção do AZT. O cromatograma do controle positivo (Figura 38b) mostra além dos picos presentes no controle negativo, o pico isolado do AZT. Portanto o fluido receptor e os componentes das formulações não interferiram na análise.

A recuperação foi calculada pela relação da concentração de AZT testada com a teórica, através da injeção de soluções de trabalho nas concentrações de 5, 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AZT, em triplicata. Os valores das porcentagens de recuperação estão na Tabela 18. Eles estão dentro da faixa limite preconizada pela ANVISA (2003).

A precisão representa a variabilidade dos resultados em séries repetidas de análises, sob as mesmas condições experimentais. Os resultados (veja Tabela 18) mostram baixa variabilidade, devido aos CVs menores de 5 %.

Tabela 18: Parâmetros utilizados na validação do método para quantificação do AZT no meio de liberação *in vitro*: precisão intra-dia, inter-dia e exatidão, expressa como porcentagem de recuperação.

	Concentrações Teóricas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentrações encontradas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	CV (%)	Exatidão (%)
Intra-dia	1,0	0,88	0,01	1,3	88,1
	10,0	10,98	0,11	1,0	109,8
	100,0	101,36	0,67	0,7	101,4
Inter-dia	1,0	1,00	0,03	2,9	99,6
	10,0	9,70	0,42	4,3	97,0
	100,0	96,00	2,33	2,4	96,0

Os LD e LQ, particularmente neste estudo, são muito importantes, porque os sistemas de liberação podem liberar quantidades muito baixas de fármaco. O LD foi $0,012 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and LQ foi $0,041 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.6.2. Determinação do perfil de liberação *in vitro*

A célula de difusão tipo Franz permite a análise *in vitro* do movimento do fármaco através de uma membrana, utilizando um modelo com dois compartimentos. O compartimento doador contém a formulação, e uma membrana semipermeável que separa este compartimento da solução receptora, e que suporta o sistema de liberação (REMINGTON, 2006).

Para quantificar o AZT liberado, foi desenvolvida e validada em Carvalho, Barbi e Gremião (2009) uma metodologia para quantificação do AZT por CLAE. A média dos valores da ASC obtidas para cada formulação foi aplicada na equação da curva de calibração obtida em água, para determinação da quantidade de AZT liberada. Os perfis de liberação foram determinados pela relação percentual das concentrações de AZT liberadas em função do tempo. Os resultados após 24 h de ensaio estão apresentados na Figura 39.

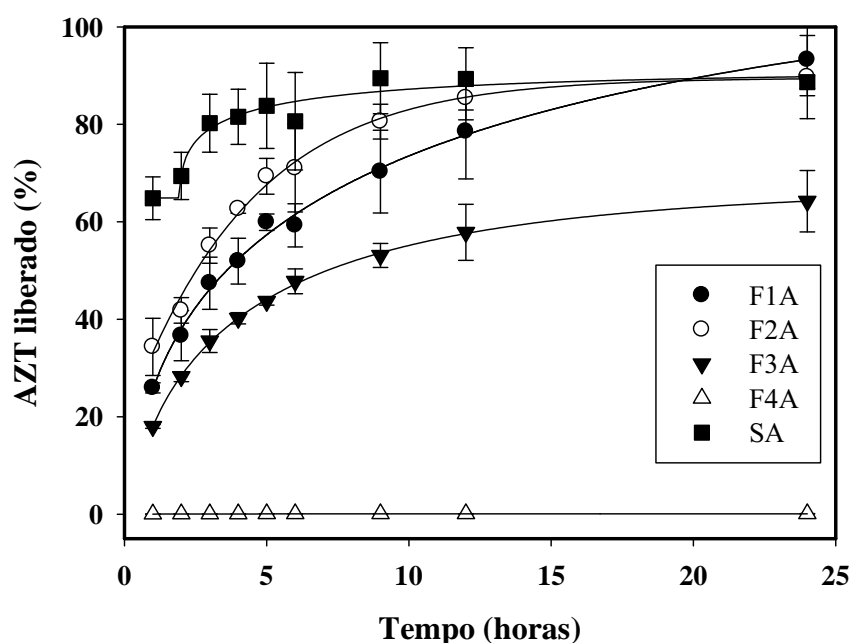


Figura 39: Perfil de liberação das formulações F1A, F2A, F3A, F4A e SA (solução aquosa de AZT). As linhas foram plotadas pelo modelo de Weibull.

Pela análise do gráfico (Figura 39), pode ser observado que as formulações F1A, F2A e F3A prolongam a liberação do fármaco. Somente após 10 horas é que mais de 60 % do fármaco foi liberado, enquanto que a SA em uma hora já havia liberado além deste valor. F1A e F2A liberaram 100 % do AZT incorporado em 24 h. A liberação de F2A foi levemente mais acentuada que F1A. Para F3A, a retenção do fármaco foi maior ainda, sendo que 60 % foi a quantidade máxima liberada em 24 horas. Na análise de SAXS foi sugerido que nesta formulação está havendo maior estruturação do sistema, e isto pode ter diminuído a difusão do fármaco para o meio externo. Além disso, o índice de consistência k de F3A foi quase o dobro de F1A e F2A (Tabela 11), o que também deve ter contribuído para uma leve retenção do AZT. Já para F4A, a liberação não ocorreu em 24 horas. A estrutura líquido cristalina dessa formulação deve ter contribuído para a retenção do fármaco no modelo *in vitro* utilizado.

Os perfis de liberação foram analisados através da utilização de modelos matemáticos com o objetivo de descrever a liberação do fármaco a partir da formulação. Um método bastante utilizado para escolher o melhor modelo de liberação de fármacos é o coeficiente de determinação R^2 . Contudo, este valor tende a tornar-se maior com a adição de mais parâmetros. Por isso, quando se compara modelos com vários parâmetros, é mais correto utilizar o coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{ajustado}$), descrito na Equação 16. (COSTA; LOBO, 2001).

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)}(1 - R^2) \quad (\text{Eq. 16})$$

Em que n é o número de pontos dos dados da dissolução e p é o número de parâmetros do modelo. O modelo matemático que melhor descreve o perfil de liberação será aquele que apresentar o maior coeficiente de determinação ajustado.

Há vários modelos descritos na literatura, como Hixson–Crowell, Weibull, Higuchi, Baker–Lonsdale, Korsmeyer–Peppas e Hopfenberg. O critério utilizado para a escolha de um modelo é a determinação do $R^2_{ajustado}$ que melhor se ajuste ao perfil de liberação obtido (COSTA; LOBO, 2001). O modelo que mais se adequou à liberação das formulações foi o de Weibull (PAPADOLOU *et al.*, 2006). A equação empírica genérica descrita por este modelo foi adaptada para os processos de liberação de fármacos por Langenbucher (1972). Esta equação foi empregada em estudos de formas farmacêuticas sólidas e hidrogéis (CASAULT, SLATER, 2008). Quando aplicada à liberação do fármaco a partir de formas farmacêuticas a equação de Weibull exprime a fração cumulativa do fármaco na solução ao tempo t :

$$m = 1 - \exp\left[\frac{-(t - T_i)^b}{a}\right] \quad (\text{Eq. 17})$$

Em que a define a escala temporal do processo, T_i representa o intervalo de tempo antes do início do processo de liberação (na maioria das vezes é zero), b é o parâmetro de forma que caracteriza a curva como sendo exponencial ($b=1$; cinética de primeira ordem), sigmóide ($b>1$; cinética rápida) ou parabólica ($b<1$; cinética lenta).

Neste modelo, o valor do expoente b é o indicador do mecanismo de transporte do fármaco através da matriz. Estimativas para valores de b menores que 0,75 indicam difusão segundo Fick. Para valores de b entre 0,75 e 1 estão associados dois mecanismos, a difusão Fickiana e o transporte caso II (através do intumescimento), e finalmente, para valores maiores que 1, o transporte do fármaco se deve a um complexo mecanismo de liberação, em que vários processos, como difusão, intumescimento e erosão (degradação), podem ocorrer simultaneamente (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006).

A Tabela 19 relaciona os parâmetros obtidos através da equação de Weibull nos ensaios de liberação *in vitro*. Os dados mostram que os valores de b obtidos para F1 e F3 são menores que 0,75, e, portanto o mecanismo de liberação está associado com a difusão de Fick. O valor de b obtido para F2 está entre 0,75 e 1,00 e, portanto o mecanismo de liberação segue o modelo de difusão fickiana e intumescimento. Como F4A não liberou o fármaco no modelo *in vitro* utilizado, o modelo de Weibull não foi aplicado nesta formulação.

Tabela 19: Parâmetros obtidos através da equação de Weibull, a partir dos dados de liberação *in vitro* das formulações F1A, F2A, F3A e da solução aquosa SA.

Formulações	$R^2_{ajustado}$	b
F1	0,992	0,53
F2	0,990	1,04
F3	0,999	0,65
SA	0,906	0,44

Como F1A a transição para fase lamelar é mais demorada (em F1A a transição para CL ocorre com 30% de água – ver Figura 23), pode ser que a liberação ocorra a partir do sistema ainda na fase de ME por difusão. Como a transição para CL após o contato com a fase aquosa em F2A é mais rápida que F1A (F2A muda para fase lamelar com 10% de água – ver Figura 24), pode ser que durante o ensaio de liberação tenha ocorrido a mudança de fase, e isto tenha causado o mesmo efeito observado no intumescimento de sistemas sólidos ou hidrogéis. Nestes sistemas, a liberação ocorre por difusão antes do intumescimento, e após o intumescimento a liberação torna-se mais prolongada. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para F2A, ou seja, na fase microemulsionada a liberação é mais rápida, e após a mudança de fase a liberação torna-se mais lenta. Como a mudança de fase em F3A é imediata, o fármaco é liberado mais lentamente durante todo o tempo de ensaio.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nosso grupo de pesquisa tem verificado que sistemas compostos pelo tensoativo AC205 são capazes de formar MEs com baixas concentrações de água, e o aumento da fase aquosa resulta numa gama de diferentes tipos de mesofases líquido cristalinas com maior estruturação (URBAN, 2004; KLEIN, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008). Estas propriedades foram exploradas neste presente trabalho, no desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para a potencial administração nasal do AZT. O AZT possui baixa biodisponibilidade, pois sofre metabolismo pré-sistêmico, e a via nasal é conhecida por promover a absorção direta de fármacos para circulação sanguínea. Porém a via nasal apresenta mecanismos de depuração mucociliar que podem remover rapidamente a formulação da cavidade nasal, e para prolongar o tempo de permanência das formulações nesta via, foi proposto o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos estabilizados com tensoativos tipo álcool graxo etoxilado e propoxilado.

O tensoativo que estabilizou uma maior região de CL nos diagramas de fases construídos foi o AC205 (Figura 11), possivelmente devido ao maior número de unidades de óxido de etileno desta molécula (Figura 6). A construção do diagrama de fases é importante, pois com ela é possível prever o comportamento de fases dos sistemas quando seus constituintes são alterados. As formulações F1, F2, F3 e F4 (ver composição na Tabela 2) foram escolhidas porque primeiramente possuem baixa viscosidade, e segundo, porque o contato com concentrações crescentes de água muda suas estruturas para CLs de maior viscosidade.

Estas formulações foram capazes de incorporar mais AZT do que seus componentes isolados (Tabela 9), porque a mistura de solventes de diferentes polaridades, como óleo e água, na presença de um tensoativo agregam-se de tal forma a

possibilitar diferentes regiões adicionais de solubilização (KREILGAARD, 2002). Além disso, a incorporação do AZT não alterou o comportamento estrutural dos sistemas (Figuras 18 e 19). O ensaio de fluxo mostrou que as quatro formulações são capazes de fluir, e, portanto, são adequadas para administração nasal. Mas vale ressaltar que as MEs F1A, F2A e F3A incorporaram mais fármaco que a formulação lamelar F4A, logo, para se ter a mesma dose nas quatro formulações, é necessário maior volume de F4A. Se tratando da via nasal, o volume administrado é muito importante, pois ela é uma via que limita a quantidade de formulação a ser aplicada. Seu volume disponível para administração é em torno de 300 μ L (AULTON, 2005). Portanto, neste caso, a ME teria vantagem na administração nasal.

Os testes reológicos foram realizados em associação com o método de obtenção da força de mucoadesão, para que as duas metodologias em conjunto pudessem oferecer maiores informações a respeito da caracterização da mucoadesão. Foi constatado através de análises de MLP e SAXS, que sistemas formados por AC205 e ácido oléico como fase oleosa podem se estruturar em CL na presença de muco artificial (FNS) na temperatura nasal. Sistemas contendo 55% de AC205 (F1A, F2A, F3A e F4A), quando são misturados com volumes crescentes de muco artificial, mudam para uma mesofase lamelar com propriedades viscoelásticas de um sistema fortemente estruturado (Figuras 35 e 36). Essa mudança de estrutura pode contribuir para a formação de uma matriz que permanecerá por mais tempo na cavidade nasal, evitando a rápida depuração mucociliar. Além da formação de uma matriz, foi constatado através de análises que medem a força de mucoadesão, que estes sistemas podem ficar aderidos na mucosa (Tabela 17). Portanto, as duas técnicas avaliaram duas diferentes características, a viscoelasticidade e a adesividade dos sistemas no ambiente nasal, as quais foram importantes e complementares no estudo da capacidade mucoadesiva das formulações. Dentre os

sistemas estudados, para escolha do mais mucoadesivo, levamos em conta o estudo estrutural e reológico das formulações no ambiente nasal, já que no ensaio de força mucoadesiva todos os sistemas obtiveram a mesma capacidade de adesão (Tabela 17). As formulações F3A e F4A, portanto, seriam as mais mucoadesivas, porque se estruturaram e formaram uma matriz viscosa mais rapidamente que F1A e F2A. Como F4A incorporou menos AZT, o emprego da formulação F3A seria mais promissor. Os sistemas precursores de CL mais adequados, portanto, foram MEs, as quais oferecem vantagens como alta capacidade de solubilização de fármacos, estabilidade termodinâmica e fluidez, a qual facilita a administração nasal.

O ensaio de liberação utilizado foi um teste de dissolução simples, utilizando membrana de acetato de celulose sintética. Os testes *in vitro* são importantes para o entendimento do comportamento físico-químico dos sistemas. No ensaio de liberação foi sugerido que a mudança de fase dos sistemas provocou maior retenção do fármaco. A liberação prolongada não é desejável para via nasal, devido ao pequeno tempo de permanência que essa via oferece para formulação permanecer na cavidade nasal (cerca de 20 minutos). Porém, deve-se levar em consideração que os sistemas biológicos são mais complexos, e envolve mecanismos de permeação que favorecem a absorção do fármaco, os quais os componentes aqui utilizados potencialmente podem promover, como o ácido oléico, o qual é muito conhecido como agente permeante. No ambiente nasal, teoricamente, os sistemas possivelmente estarão estruturados em CL após a administração. Considerando que o volume disponível para administração nasal seja em torno de 300 μL , e a quantidade de muco encontrada seja o mesmo volume, as formulações iriam entrar em contato com o muco numa relação 1:1. Localizando estes pontos no diagrama da Figura 11, eles estão situados no limite de transição de fases para sistemas emulsionados, que não são termodinamicamente estáveis, e facilmente

separam fases. Se a liberação ocorrer a partir desse ponto, o fármaco possivelmente será liberado mais rapidamente.

Associando as características mucoadesivas das formulações em estudo com a capacidade delas liberarem o fármaco, os sistemas nanoestruturados compostos por AC205, ácido oléico e água podem ser potenciais sistemas de liberação nasal do AZT.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível obter as seguintes conclusões:

- O tensoativo AC205 estabilizou regiões mais amplas de MEs e CLs no diagrama de fases, o que leva a crer que quanto maior o número de unidades de óxido de etileno, maior as regiões de MEs e CLs. A caracterização físico química mostrou que a mistura de AC205, ácido oléico e água é capaz de formar MEs e CLs tipo lamelar e hexagonal. O grau de estruturação dos sistemas mostrou ser dependente da água, sendo que o maior grau de estruturação foi encontrado em concentrações acima de 20 % da mesma;
- Os sistemas escolhidos (F1, F2, F3 e F4) para incorporação do AZT foram capazes de incorporar mais fármaco que o tensoativo, óleo e água isolados. A incorporação do fármaco provocou leve estruturação dos sistemas, porém não alterou o tipo de fase formada. O ensaio de fluxo mostrou que as quatro formulações fluem e são tixotrópicas, propriedades importantes para a administração nasal;
- A avaliação estrutural envolvida na mucoadesão mostrou que tanto a adição de água como de FNS nas formulações F1A, F2A, F3A e F4A provocou a mudança de fases para sistemas líquidos cristalinos mais estruturados, tanto na temperatura ambiente como na temperatura nasal. A análise da mucoadesão pela reologia mostrou que a adição tanto de FNS como água, nas temperaturas ambiente e nasal, fez os sistemas exibirem módulos de armazenamento altos, maiores que os módulos de perda, e independentes da frequência, características de sistemas fortemente estruturados. A análise da força de mucoadesão mostrou

- que os sistemas possuem força de adesão. A alta viscosidade, somada a capacidade de adesão, pode fazer os sistemas resistirem por mais tempo à depuração mucociliar;
- O ensaio de liberação mostrou que as microemulsões F1A, F2A e F3A liberaram acima de 60% do AZT incorporado em 24 h, já a F4 não foi capaz de liberar o fármaco no modelo *in vitro* utilizado. O modelo matemático que mais se ajustou ao perfil de liberação das formulações foi o modelo de Weibull, o qual sugere que os sistemas liberaram o AZT por difusão;
 - Associando a capacidade das formulações em liberarem o fármaco com as suas características mucoadesivas, os sistemas desenvolvidos podem potencialmente promover a liberação nasal do AZT.

PERSPECTIVAS FUTURAS

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista os resultados promissores obtidos neste trabalho, como continuidade, os sistemas aqui desenvolvidos serão otimizados através da incorporação de substâncias mais biocompatíveis, como a fosfatidilcolina, ou que possam contribuir para maior estabilização e desempenho das formulações, como os co-tensoativos. Serão realizados estudos de liberação *ex vivo* utilizando mucosa animal adaptada em célula de difusão tipo Franz, e também serão realizados os estudos de liberação *in vivo* através da administração nasal dos sistemas escolhidos em ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOWITZ, M.; PARRY-HILL, M. J.; DAVIDSON, M. Polarized light microscopy. The Florida State University and Olympus American Inc. Disponível em: <http://www.microscope.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index.html>. Acesso em 19 fev. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Disponível em: <http://www.anvisa.org.br>. Acesso em 12 mar. 2008.

ANDREWS, G.P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 2008.

AGMON, N. The grotthuss mechanism. **Chem. Phys. Let.**, v.47, p. 456-462, 1995.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

BEAUCAGE, G.; ULIBARRI, T.,A.; BLACK, E. P.; SCHAEFER, D. W. Hybrid organic inorganic composites, Washington DC, American Chemical Society, 1995. Cap. 9.

BENGHUZZI, H.A.; BARBARO, R.M.; BAJPAI, P.K. Sustained delivery of 3Hthymidine by means of ceramic capsules in rats. **Biomed Sci Instrum.** v.25, p.169-177, 1989.

BENGHUZZI, H.A.; BARBARO, R.M.; BAJPAI, P.K. In vitro release of azidothymidine(AZT) by ceramic drug delivery systems. **Biomed Sci Instrum.** v. 26, p. 151-156, 1990.

BHARGAVA. H. N., NARURKAR, A. LIEB, L. M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharm. Technol.**, p. 45-54, 1987.

BOYD, B. J.; WHITTAKER, D. V.; KHOOB, S. M.; DAVEY, G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **Int. J. Pharm.** v.309, p. 218–226, 2006.

BOELSMA, E.; TANOJO, H. H. E.; BODD, M. Assessment of the Potential Irritancy of Oleic Acid on Human Skin: Evaluation In Vtro and In Vivo, **Toxicol. In Vitro**, v. 10, p. 129-142, 1996.

BLUM, M.R.; LIAO, S.H.T.; GOOD, S.S.; MIRANDA, P. Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine in humans. **Am. J. Med.**, v. 85, p. 189–194, 1988.

BRASIL. MS: Ministério da Saúde. Tratamento da AIDS. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS3B800322PTBRIE.htm>. Acesso em: 25 set. 2006.

- BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; FARABOLLINI, A.; PALMIERI, G. F.; PONCHEL, G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **Biomaterials**, v. 28, p. 2233-2243, 2007.
- BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery Office, 2001, A173
- BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery Office, 2003, v.4.
- BROMBERG, L.; TEMCHENKO, M.; ALAKHOV, V.; HATTON, T. A. Bioadhesive properties and rheology of polyether-modified poly(acrylic acid) hydrogels. **Int. J. Pharm.**, v. 282, p. 45–60, 2004.
- BRUSCHI, M. L.; JONES, D.S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.D.; FREITAS, O.; LARA, E.H.G. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **J. Pharm. Sci.**, v. 96, p. 2074–2089, 2007.
- BRUSHI, M.L.; PANZERI, H.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G.; GREMIÃO, M.P.D. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.42, n.1, p. 31-47, 2006.
- CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J.P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 55, p. 323-328, 2003.
- CARVALHO F.C., BARBI M.S., GREMIÃO M.P.D. Evaluation of the in vitro Release of AZT-Microemulsions by LC. **Chromatographia**, 2009. DOI 10.13665/s10337-009-1015-1.
- CARVALHO, F. C., SARMENTO, V. H. V., BARBI, M. S., GREMIÃO, M. P. D. Rheologic Evaluation of Mucoadhesive Drug Delivery Systems. In: IV Brazilian Conference on Rheology, 2008, Rio de Janeiro - RJ. **Abstracts of IV Brazilian Conference on Rheology**, 2008, v.4, p.11 – 12.
- CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L. B.; EVANGELISTA, R. C; GREMIÃO, M. P. D. sistemas mucoadesivos para liberação de fármacos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, 2009. *In press*.
- CASAULT, S.; SLATER, G. W. Systematic characterization of drug release profiles from finite-sized hydrogels. **Physica A** v. 387, 5387–5402, 2008.
- CEGNAR, M.; PREMZL, A.; ZAVASNIK-BERGANT, V.; KRISTL, J.; KOS, J. Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as a carrier system for delivering cysteine protease inhibitor cystatin into tumor cells. **Exp. Cell. Res.** v. 301(2), p. 223-31, 2004.
- CENTIFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise instrumental. Rio de Janeiro: Interciência. p. 285-293.

CEULEMANS, J.; VINCKIER, I.; LUDWIG, A. The use of xantan gum in an ophthalmic liquid dosage form: rheological characterization of the interaction with mucin. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, p. 1117-1127, 2002.

CHARLTON, S.; JONES, N. S.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Distribution and clearance of bioadhesive formulations from the olfactory region in man: Effect of polymer type and nasal delivery device. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 3, p. 295-302, 2007.

CHIAVACCI, L.A. Formação de sóis e géis a partir de soluções aquosas de oxicloreto de zircônio: efeito da modificação por sulfato na termoreversibilidade da transição sol-gel.1996.88f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.

CHONG, C.S.; CAO, M.; WONG, W.W.; FISCHER, K.P.; ADDISON, W.R.; KWON, G.S.; TYRRELL, D.L.; SAMUEL, J. Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. **J. Control. Release**, v.102(1), p.85-99, 2005.

CHOWDARY, C. P. R.; RAO, Y. S. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. **Biol. Pharm. Bull.** v. 27, n. 11, p. 1717-1724, 2004.

CIOLA, R. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho. São Paulo: Edgard Blucher. p.8-41.

CLEARY, J. BROMBERG, L.; MAGNER, E. Adhesion of Polyether-Modified Poly(acrylic acid) to Mucin. **Langmuir**, v. 20, p. 9755-9762, 2004.

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

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.13, p. 123-133, 2001.

CRODA DO BRASIL. Folha de informações de segurança de produto químico – FISPQ. **Procetyl AWS**: revisão nº1 de 29/01/2002 de acordo com NBR 14725. Campinas, 2002. 3p.

DAVIES, J. M.; VINEY, C. Water-mucin phases: conditions for mucus liquid crystallinity. **Thermochim. Acta**, v. 315, p. 39-49, 1998

D'CRUZ, O. J.; UCKUN, F. M. Lack of Adverse Effects on Fertility of Female CD-1 Mice Exposed to Repetitive Intravaginal Gel-Microemulsion Formulation of a Dual-function Anti-HIV Agent: Aryl Phosphate Derivative of Bromo-methoxy-zidovudine (Compound WHI-07). **J. Appl. Toxicol.**, v.21, p. 317-322, 2001.

DEMBRI, A.; MONTISCI, M. J.; GANTIER, J. C.; CHACUN, H.; PONCHEL, G. Targeting of 3-Azido-3-Deoxythymidine (AZT)-Loaded Poly(Isohexylcyanoacrylate) Nanospheres to the Gastrointestinal Mucosa and Associated Lymphoid Tissues. **Pharm. Res.**, v. 18, n. 4, 2001.

ESPOSITO, E.; BORTOLOTTI, F.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Amphiphilic association systems for amphotericin B delivery. **Int. J. Pharm.**, v.260, p. 249-260, 2003.

EVANGELISTA, R. C. **Sistemas de liberação controlada de fármacos.** Araraquara:Tese (Livre Docência), 2006, 345 f. (Texto sistemático apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos do concurso para obtenção do Título de Livre-Docente em Farmacotécnica).

FORMARIZ, T. P. URBAN, M. C. C.; SILVA JUNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.41, no.3, p.301-313, 2005

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A; SARMENTO, V. H. V.; SANTILLI, C. V.; TABOSA DO EGITO E. S.; OLIVEIRA, A. G. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 60, p. 28–35, 2007

GAVINI, E.; HEGGE, A. B.; RASSU, G., SANNA, V.; TESTA, C.; PIRISINO,G.; KARLSEN, J.; GIUNCHEDI, P. Nasal administration of Carbamazepine using chitosan microspheres: In vitro/in vivo studies. **Int. J. Pharm.**, v. 307, p. 9–15, 2006.

GOODMAN, L. S. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica.** 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. 1821p.

GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 57, p. 1713-1723, 2005.

GUINIER, A. Th'éorie et technique de la radiocristallographie, Paris: Dunod, 1964. Cap.1.

HÄGERSTRÖM, H. **Polymer Gels as Pharmaceutical Dosage Forms: Rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery.** Upsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2003. n. 293, 76p. (Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy).

HAGERSTROM, H.; PAULSSON, M.; EDSMAN, K. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.9, p. 301–309, 2000.

HAN, I. K.; KIM, Y. B.; KANG, H. S.; SUL, D.; JUNG, W. W.; CHO, H. J.; OH, Y. K. Thermosensitive and mucoadhesive delivery systems of mucosal vaccines. **Methods**, v. 38, p. 106–111, 2006.

HAN, Y. A.; SINGH, M.; SAXENA, B. B. Development of vaginal rings for sustained release of nonhormonal contraceptives and anti-HIV agents. **Contraception**, v. 76, p. 132–138, 2007.

HASSAN, E.E.; GALLO, J.M. A simple rheological method for the invitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. **Pharm. Res.**, v. 7, p. 491-495, 1990.

HILLAIREAU, H.; DOAN, T. L.; APPEL, M.; COUVREUR, P. Hybrid polymer nanocapsules enhance in vitro delivery of azidothymidine-triphosphate to macrophages. **J. Control. Rel.**, v. 116, p. 346–352, 2006.

HOLMQVIST, P.; ALEXANDRIDIS, P.; LINDMAN, B. Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer-Water-“Oil” Systems by Varying the “Oil” Type. **Macromolecules**, v. 30, p. 6788-6797, 1997

HUANG, Y.; LEOBANDUNG, W.; FOSS, A.; PEPPAS, N. A. Molecular aspects of muco- and bioadhesion: Tethers structures and site-specific surfaces. **J. Control. Rel.**, v. 65, p. 63-71, 2000.

HYDE, S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K. (Ed.) **Handbook of applied surface and colloid chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 16, p. 299-332.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: methodology, 1996, p. 1-8.

ILLUM, E. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. **J.Control. Rel.**, 87, p. 187-198, 2003.

JASTI, B.; LI, X.; CLEARY, C. Recent Advances in mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Del. Pol. Business Briefing: Pharmatech**, p. 194-196, 2003

JIN, S.X.; BI, D.Z.; WANG, J.; WANG, Y.Z.; HU, H.G.; DENG, Y.H. Pharmacokinetics and tissue distribution of zidovudine in rats following intravenous administration of zidovudine myristate loaded liposomes. **Pharmazie** v.60, p. 840-843, 2005.

JUNGINGER, H. E.; THANOU, M.; VERHOEF, J. C. Drug Delivery: Mucoadhesive Hydrogels. : Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3. ed. **Informaworld**. Disponível em: <http://www.informaworld.com/smpp/content~db=all~content=a758558230~tab=conten>. Acesso em: 31 out. 2007.

KARARLI, T. T.; KIRCHHOFF, K. F.; PENZOTTI Jr, S. C. Enhancement of transdermal transport of azidothymidine (AZT) with novel terpene and terpene-like enhancers: in vivo-in vitro correlations. **J. Control. Rel.**, v. 34, p. 43-51, 1995.

KAWAGUCHI, T.; HASEGAWA, T.; JUNI, K.; SEKI, T. Rectal absorption of Zidovudine. **Int. J. Pharm.** v.77, p. 71-74, 1991.

KEELY, S.; RULLAY, A.; WILSON, C.; CARMICHAEL, A.; CARRINGTON, S.; CORFIELD, A.; HADDLETON, D. M.; BRAYDEN, D. J. *In vitro* and *ex vivo* intestinal tissue models to measure mucoadhesion of poly (methacrylate) and N-trimethylated chitosan polymers. **Pharm. Res.**, v. 22, n. 1, 2005.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2007. 114f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

KLUG, H. P. X-ray Diffraction Procedures. New York: John Wiley & Sons, 1954. Cap. 1.

KOCKISCH, S.; REES, G. D.; YOUNG, S. A.; TSIBOUKLIS, J.; SMART, J. D. A direct-staining method to evaluate the mucoadhesion of polymers from aqueous dispersion. **J. Control. Rel.**, v. 77, p. 1-6, 2001.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Adv. Colloid Interface Sci.**, 123–126, p. 369–385, 2006.

KOHLI, E.; HAN, H. Y.; ZEMAN, A. D.; VINOGRADOV, S. V. Formulations of biodegradable nanogel carriers with 5'-triphosphates of nucleoside analogs that display a reduced cytotoxicity and enhanced drug activity. **J. Control. Rel.**, v. 121, p. 19–27, 2007.

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

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

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

KUMAR, P.N.; SWEET, D.E.; MCDOWELL, J.A.; SYMONDS, W.; LOU, Y.; HETHERINGTON, S., LAFON, S. Safety and pharmacokinetics of abacavir (1592U89) following oral administration of escalating single doses in human immunodeficiency virus type 1-infected adults. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 603–608, 1999.

LANGENBUGHER, F. Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 24, p. 979-981, 1972.

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

LEE, J.W.; PARK, J.H.; ROBINSON, J.R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. **J. Pharm. Sci.**, v. 89, p. 850-866, 2000.

LEUNG, S. H. S.; ROBINSON, J. R. Polymer structure features contributing to mucohesion II. **J. Control. Release** v.12, p. 187-194, 1990.

LI L., NANDI I.; KIM, H. K. Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam. **Int. J. Pharm.**, 237, p.77-85, 2001

LI, V. H. K.; ROBINSON, J. R.; LEE, V. H. L. Influence of drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems. In: ROBINSON, J. R.; LEE, V. H. L. **Controlled drug delivery: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1987, 716p. p.3-94.

LOPES, L. B. **Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídicos: avaliação *in vitro* e *in vivo* de sistemas de liberação e moléculas carreadoras**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2005. 198f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

LU, Z.; YEH, T.K.; TSAI, M.; AU, J.L.; WJENJES, M.G. Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy. **Clin. Cancer Res.** v.10(22), p.7677-7784, 2004.

MADSEN, F.; EBERTH, K.; SMART, J.D. A rheological assessment of the nature of interactions between mucoadhesive polymers and a homogenized mucus gel. **Biomaterials**, n. 19, p. 1083-1092, 1998.

MAINARDES, R.M.; EVANGELISTA, R.C. PLGA Nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **Int. J. Pharm.**, v.290, p.137-144, 2005b.

MAINARDES, R.M.; SILVA, L.P. Drug delivery systems: past, present and future. **Curr. Drug Targets**, v.5 (5), p.389-406, 2004.

MAINARDES, R.M.; URBAN, M.C.C.; CINTO P.O.; CHAUD, M.V.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. **Curr. Drug Delivery**, 3, p.275-285, 2006.

MAINARDES, R.M.; URBAN, M.C.C.; CINTO, P.O.; KHALIL, N.M.; CHAUD, M.V.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. **Curr. Drug Targets**, v.6(2), 2005a

MAINARDES, M. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2007. 137f. Tese (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

MAINARDES, R.M.; GREMIÃO, M.P.; BRUNETTI, I.L.; FONSECA, L.M.; KHALIL, N.M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **J. Pharm. Sci.** (2008) PMID: 18425813. *In press*.

MAKAI, M.; CSANYI, E.; NÉMETH, Z.; PÁLINKÁS, J.; EROS, I. Structure and drug release of lamellar liquid crystal containing glycerol. **Int. J. Pharm.**, v. 256, p. 95-107, 2003.

- MALMSTEN, M. **Surfactants and polymers in drug delivery**. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. New York: Marcel Dekker, 2002, 348p.
- MANDAL, T.K.; TENJARLA, S. Preparation of biodegradable microcapsules of zidovudine using solvent evaporation: Effect of the modification of aqueous phase. **Int. J. Pharm.**, v. 137, p.187-197, 1996.
- MARTINAC, A.; FILIPOVIC-GRICIC J.; VOINOVICH, D.; PERISSUTTIB, B.; FRANCESCHINISB, E. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 291, p. 69–77, 2005.
- MARTINDALE, The complete drug reference. 35th.ed. London: Pharmaceutical Press, 2007. V.1.
- MATHIOWITZ, E.; CHICKERING, D. E.; LEHR, C. M. Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development. **Drug Pharm. Sci.**, v. 98, 1999. 670p.
- MERK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological. 12th.ed. Withhouse Station, 1996.
- MORTAZAVI, S.A. An in vitro assessment of mucus/mucoadhesive interactions. **Int. J. Pharm.**, v. 124, p. 173-182, 1995.
- MOURÃO, S.C.; COSTA, P.I.; SALGADO, H.R.M.; GREMIÃO, M.P.D. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. **Int. J. Pharm.**, 2005 (no prelo).
- MULLER, E. A.; KOVARIK, B. van B.; GREVEL, J.; LÜCKER, P. W.; KUTZ, K. Influence of a fat-rich meal on the pharmacokinetics of new oral formulation of cyclosporine in a crossover comparison with the market formulation. **Pharm. Res.**, v. 11, n.1, 1994.
- NAGAI, T.; NISHIMOTO, Y.; NAMBU, N.; SUZUKI, Y.; SEKINE, K. Powder dosage form of insulin for nasal administration. **J. Control. Release**, v.1, p. 15-22, 1984.
- NAGAI, T. Adhesive topical drug delivery system. **J. Control. Release**, v.2, p. 121-134, 1985
- NARISHETTY, S.T.K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. **J. Control. Release**, v.95, p.367– 379, 2004a
- NARISHETTY, S. T. K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal Delivery System for Zidovudine: in vitro, ex vivo and in vivo Evaluation. **Biopharm. Drug Disposition**, v. 25, p. 9–20, 2004b

- NIELSEN, J.A. IN: BARUCHEL, J.; HODEAN, J.L.; LECHMAN, M.S.; REGNARD, J.R.; SCHLENKER, C. **Diffraction, refraction and absorption of x-rays and neutrons: a comparative exposition**. Paris: Spring Verlag, 1993. p. 3-21.
- NIELSEN, L. S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterization of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 6, p. 231-239, 1998.
- OH, S.Y.; JEONG, S.Y.; PARK, T.G.; LEE, J.H. Enhanced transdermal delivery of AZT (zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer. **J. Control. Release**, v.51, p.161-168, 1998.
- OJEWOLE, E.; MACKRAJ, I.; NAIDOOA, P.; GOVENDER, T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 2008. DOI 10.1016/j.ejpb.2008.06.020
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.
- PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **Int. J. Pharm.**, v. 309, p. 44-50, 2006.
- PARK, J.S.; OH, Y.K.; JUNG, H.Y.; KIM, J.M.; KIM, C.K. *In situ* gelling and mucoadhesive polymer vehicles for controlled intranasal delivery of plasmid DNA. **J. Biomed. Master Res.**, v. 59, p. 144-151, 2001.
- PHILLIPS, N.C.; SKAMENE, E.; TSOUKAS, C. Liposomal encapsulation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) results in decreased bone marrow toxicity and enhanced activity against murine AIDS-induced immunosuppression. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** v.4, p. 959-966, 1991.
- PHILLIPS, N.C.; TSOUKAS, C. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. **Blood**. v.79, p. 1137-1143, 1992.
- QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 53. p. 321-339, 2001.
- RANGO RAO, K.V.; BURI, P. A novel *in situ* method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion. **Int. J. Pharm.** n. 52, p. 265-270, 1989.
- REMYNGTON: The Science and practice of pharmacy. 21 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. **Dissolution**. p. 684, 2006.
- SÄKKINEN, M.; MARVOLA, J.; KANERVA, H.; LINDEVALL, K.; MARTTI MARVOLA, A. A. Are chitosan formulations mucoadhesive in the human small intestine? An evaluation based on gamma scintigraphy. **Int. J. Pharm.**, v. 307, p. 285-291, 2006.

SANTOS, C. A.; JACOB, J. S.; HERTZOG, B. A.; FREESMAN, B. D.; PRESS, D. L.; HARNPICHARNCHAI, P.; MATHIOWITZ, E. Correlation of two bioadhesion assays: the everted sac technique and the CAHN microbalance. **J. Control. Rel.**, v. 61, p. 113–122, 1999.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicilin G: nanoemulsions and nanocapsules. **Int. J. Pharma.**, v.208, p.71-80, 2000.

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

SHAH, J.C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv. Drug Del.**, 47, p.229-250, 2001.

SHAHIWALA, A.; MISRA, A. Nasal delivery of levonorgestrel for contraception: an experimental study in rats. **Fertility and sterility**, v. 81, suppl. 1, 2004

SHIN, S. C.; LEE, J. W.; YANG, K. H.; LEE, C. H. Preparation and evaluation of bioadhesive benzocainegels for enhanced local anesthetic effects. **Int. J. Pharm.** v. 260, p. 77-81, 2003.

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

SIGURDSSON, H. H.; LOFTSSON, T.; LEHR, C.M. Assessment of mucoadhesion by a resonant mirror biosensor. **Int. J. Pharm.**, v. 325, p. 75–81, 2006.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7.ed. 2006. p.1081

SMART, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Del. Rev.**, n. 57, p. 1556-1568, 2005.

SUBHEET, J.; TIWARY, A.K.; JAIN, N.K. Sustained and targeted delivery of an anti-HIV agent using elastic liposomal formulation: Mechanism of Action. **Curr. Drug Deliv.** v.3, p. 157-166, 2006.

TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, YAMAMOTO, H. H.; KAMASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 57, p. 1583– 1594, 2005.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 25th. ed., Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2002. p. 2256-2259.

THOMAS, N.S.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.18, p.71-79, 2003.

TROTTA, M.; CAVALLI, R.; UGAZIO, E.; GASCO, M. R. Phase behavior of microemulsion system containing lecithin na lysolecithin as surfactants. **Int. J. Pharm.** v. 143, p. 67-73, 1996.

TÜRKER, S., ONUR, E., ÖZER, Y. Nasal route and drug delivery systems. **Pharm. World Sct.**, v.26, p.137-142, 2004

UGWOKE, M.I.; AGU R.U.; VERBEKE, N.; KINGET R. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. **Adv. Drug Del. Rev.**, 57, p. 1640-1665, 2005.

UNAIDS : AIDS epidemic update, 2007. [online]

Disponível em: http://www.unaids.org/en/HIV_data/2007EpiUpdate/default.asp. Acesso em: 06 out. 2008.

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona.** Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

WINTERGERST, U.; ROLINSKI, B.; BOGNER, J.R.; NOTHEIS, G.; GOEBEL, F.D.; ROSCHER, A.A.; BELOHRADSKY, B.H. Pharmacokinetics of zidovudine after rectal administration in human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.41, p. 1143-1145, 1997.

WITTAYA-AREEKUL, S.; KRUEENATE, J.; PRAHSARN, C. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. **Int. J. Pharm.**, v. 312, p. 113-118, 2006.

WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? **Clin. Pharmacokinet.** v.40(2), p. 77-84, 2001.

VYAS, T. K.; BABBAR, A.K.; SHARMA, R. K.; SINGH ,S.; MISHA, A. Intranasal mucoadhesive microemulsions of clonazepam: preliminary studies on brain targeting. **J. Pharm. Sci.** 95, no.3, p.570-580, 2006a

VYAS, T. K.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K.; SINGH, S., MISRA, A.; Preliminary brain-targeting studies on intranasal mucoadhesive microemulsion of sumatriptan. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** 7, artigo 8, 2006b

ZHANG, Q.; JIANG, X.; JIANG, W.; LU, W.; SU, L.; SHI, Z. Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. **Int. J. Pharm.**, 275, p.85-96, 2004.

ANEXO

10. ANEXO

Estudos de reologia oscilatória obtidos por varredura de frequência.

Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') obtidos pela análise oscilatória por varredura de frequência tanto a 25 °C como a 32 °C estão representados nos gráficos a seguir

Nos gráficos estão plotados o G' e G'' de cada amostra obtida pela adição de 5, 10, 30, 50 e 100% de água nas formulações sem fármaco (F1, F2, F3, F4) e com fármaco (F1A, F2A, F3A, F4A) em ambas as temperaturas, a fim de comparar as propriedades viscoelásticas de cada amostra.

Os testes dinâmicos obtidos a 25°C estão ilustrados nas Figuras 40 a 47 e os testes obtidos a 32 °C nas Figuras 48 a 58.

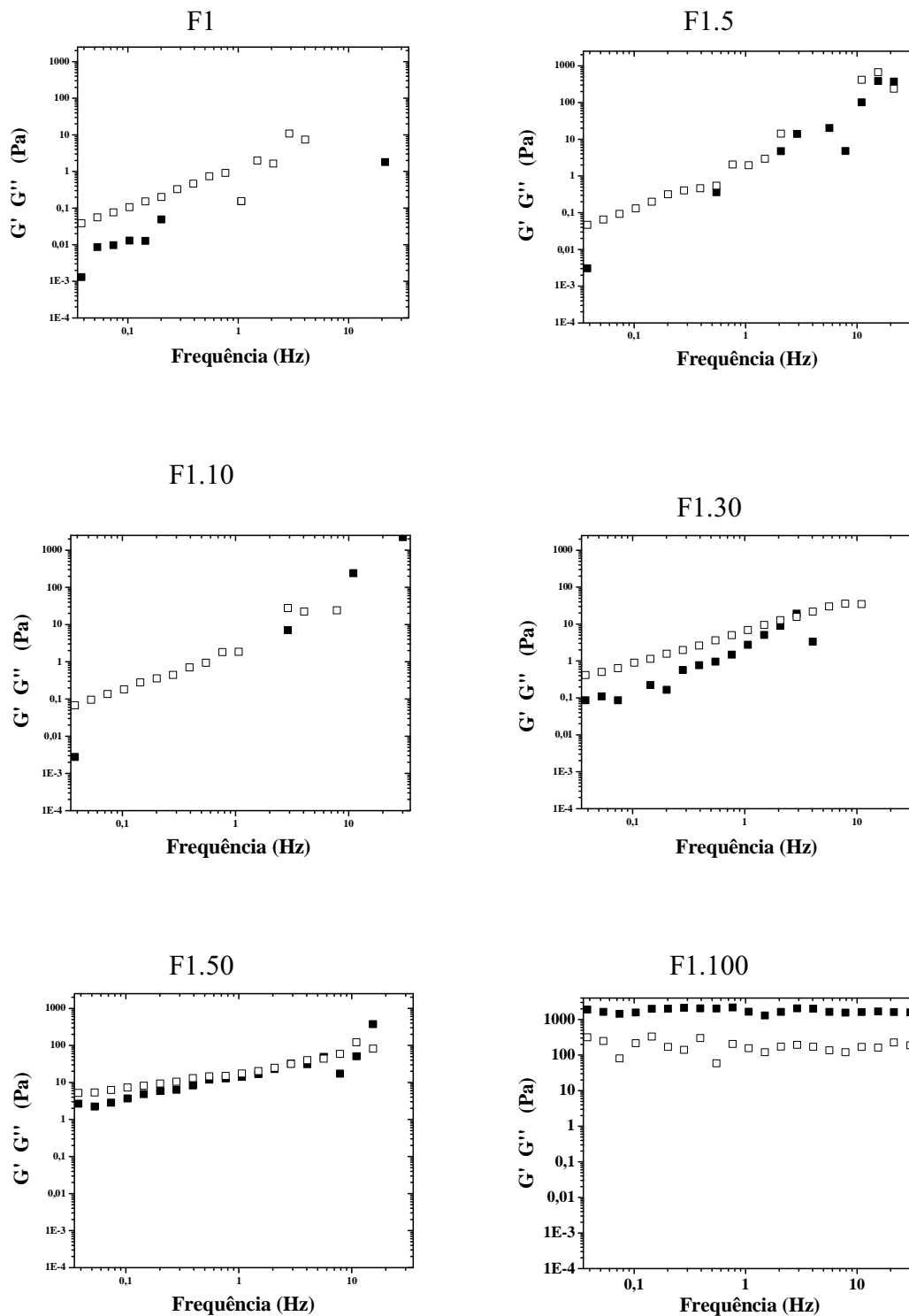


Figura 40: Testes dinâmicos de F1 e das amostras com 5 % (F1.5), 10 % (F1.10), 30 % (F1.30), 50 % (F1.50) e 100 % (F1.100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

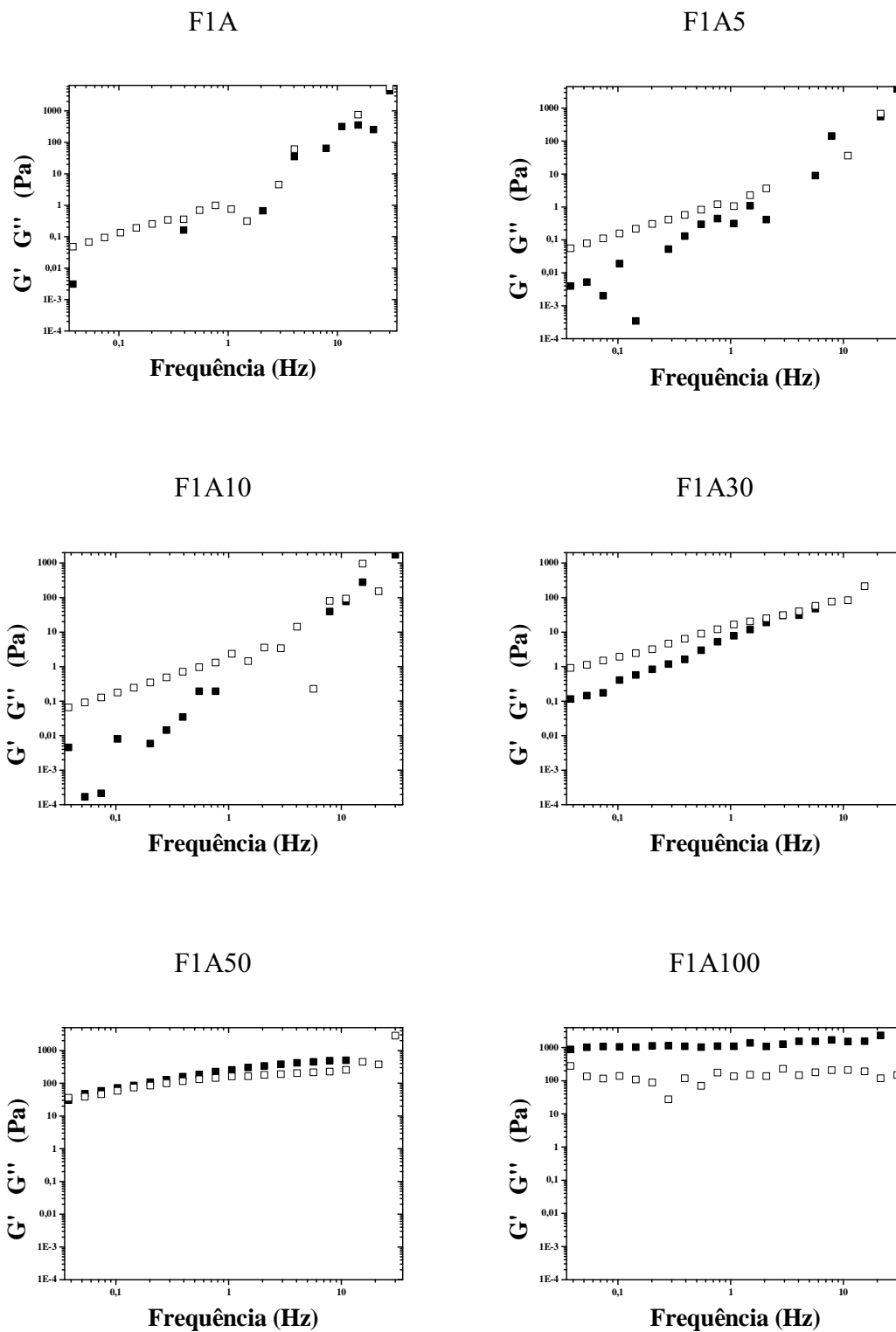


Figura 41: Testes dinâmicos de F1A e das amostras com 5 % (F1A5), 10 % (F1A10), 30 % (F1A30), 50 % (F1A50) e 100 % (F1A100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

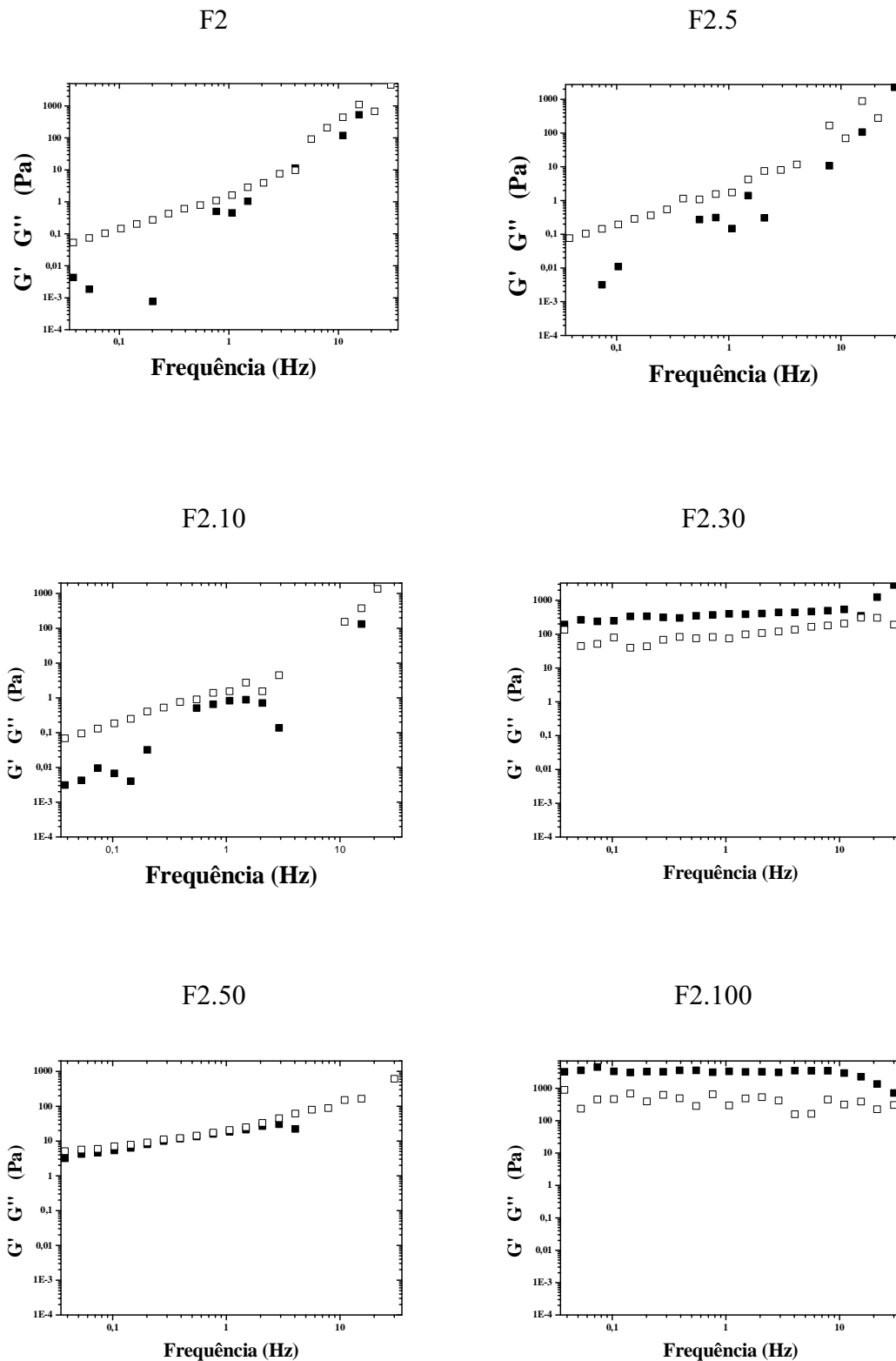


Figura 42: Testes dinâmicos de F2 e das amostras com 5 % (F2.5), 10 % (F2.10), 30 % (F2.30), 50 % (F2.50) e 100 % (F2.100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e ■ o módulo de perda (G'').

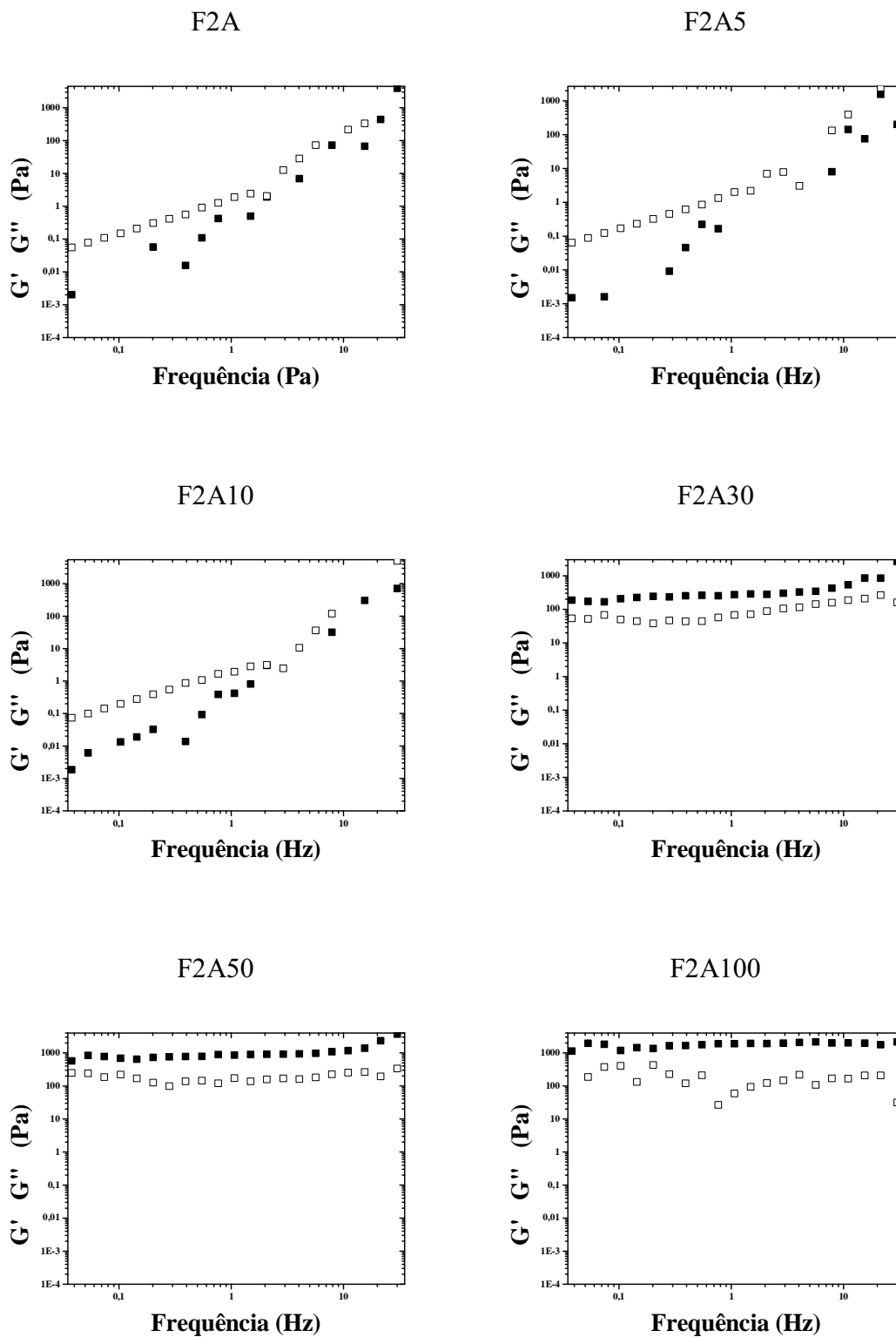


Figura 43: Testes dinâmicos de F2A e das amostras com 5 % (F2A5), 10 % (F2A10), 30 % (F2A30), 50 % (F2A50) e 100 % (F2A100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

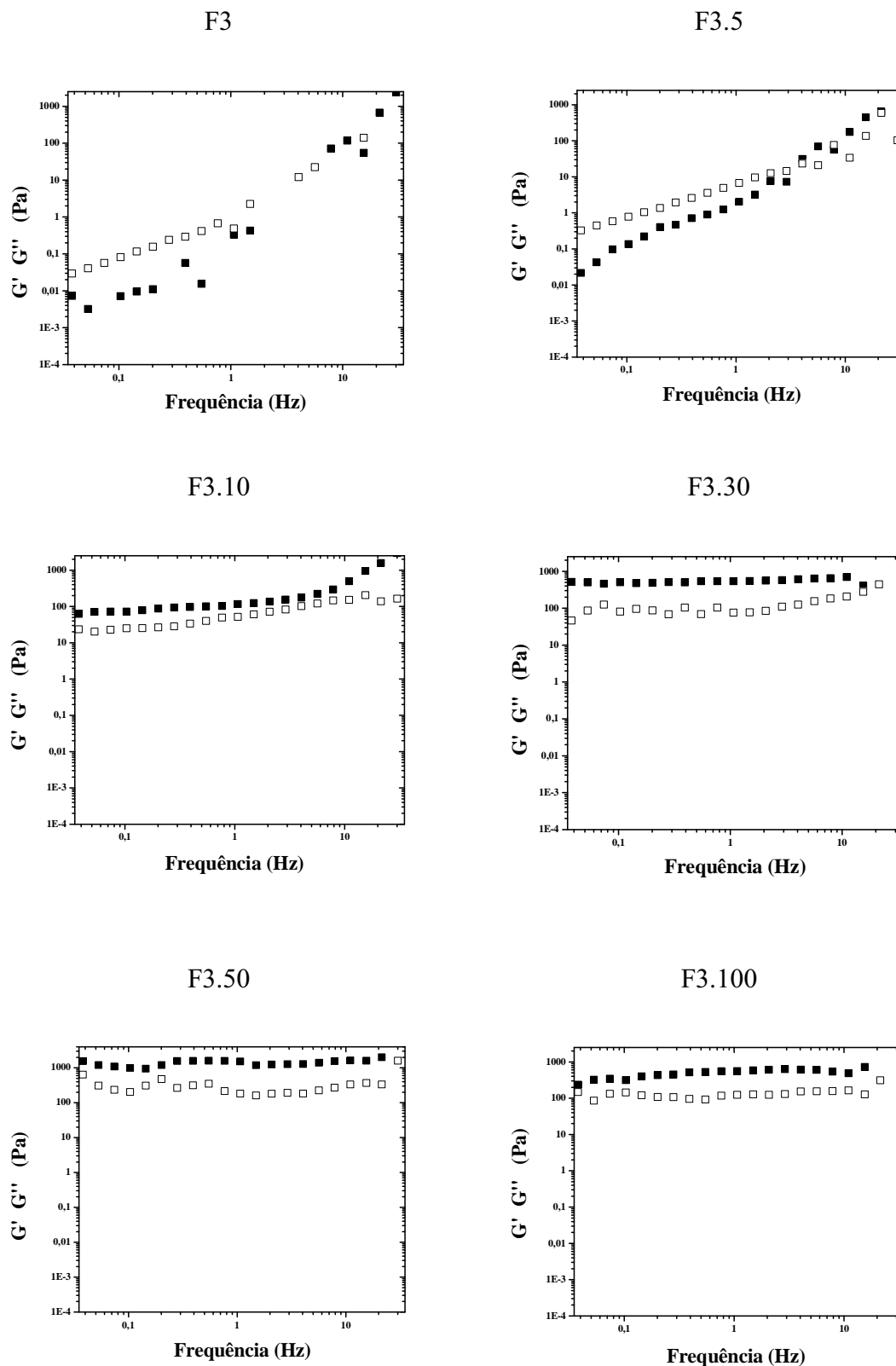


Figura 44: Testes dinâmicos de F3 e das amostras com 5 % (F3.5), 10 % (F3.10), 30 % (F3.30), 50 % (F3.50) e 100 % (F3.100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

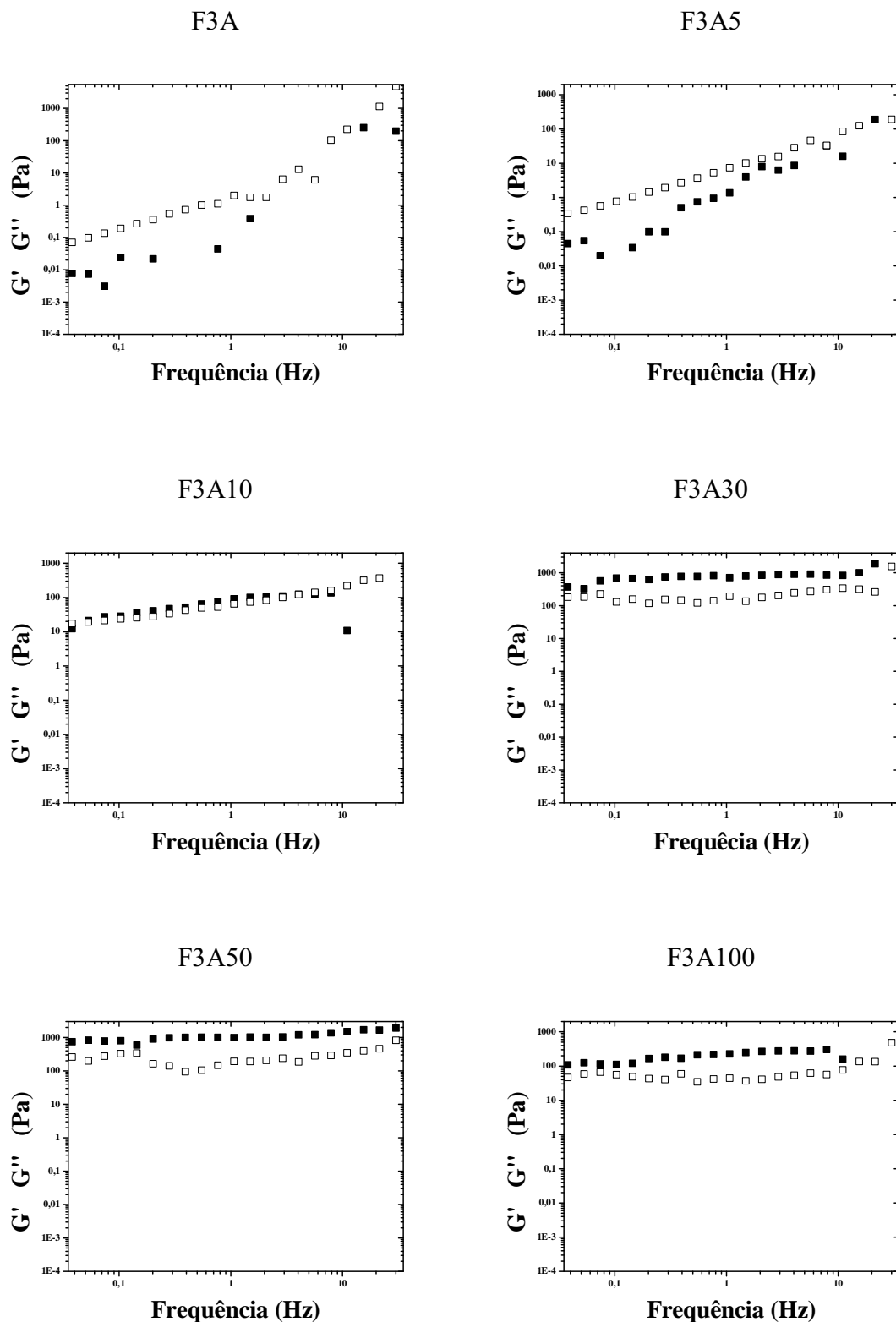


Figura 45: Testes dinâmicos de F3A e das amostras com 5 % (F3A5), 10 % (F3A10), 30 % (F3A30), 50 % (F3A50) e 100 % (F3A100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

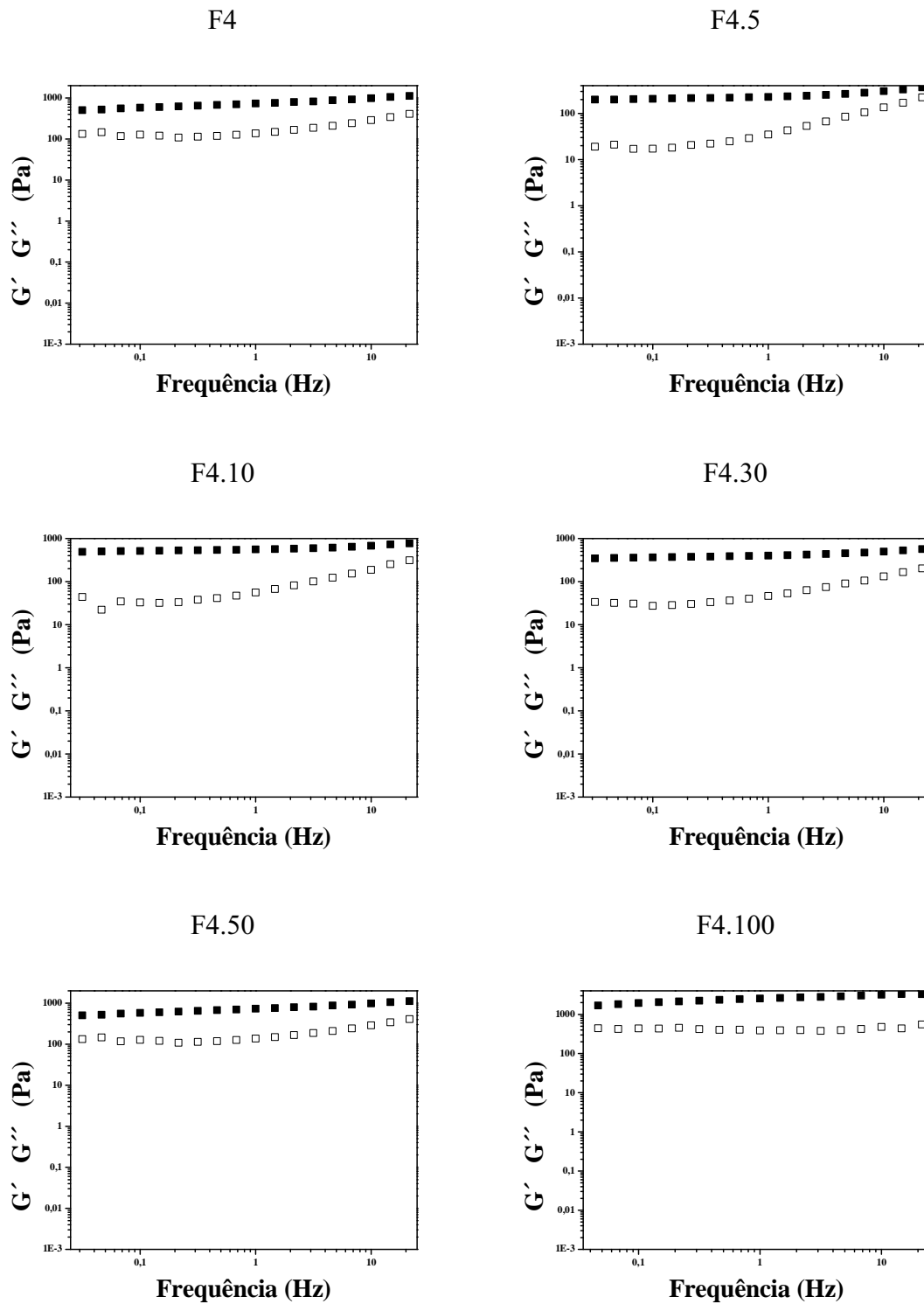


Figura 46: Testes dinâmicos de F4 e das amostras com 5 % (F4.5), 10 % (F4.10), 30 % (F4.30), 50 % (F4.50) e 100 % (F4.100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

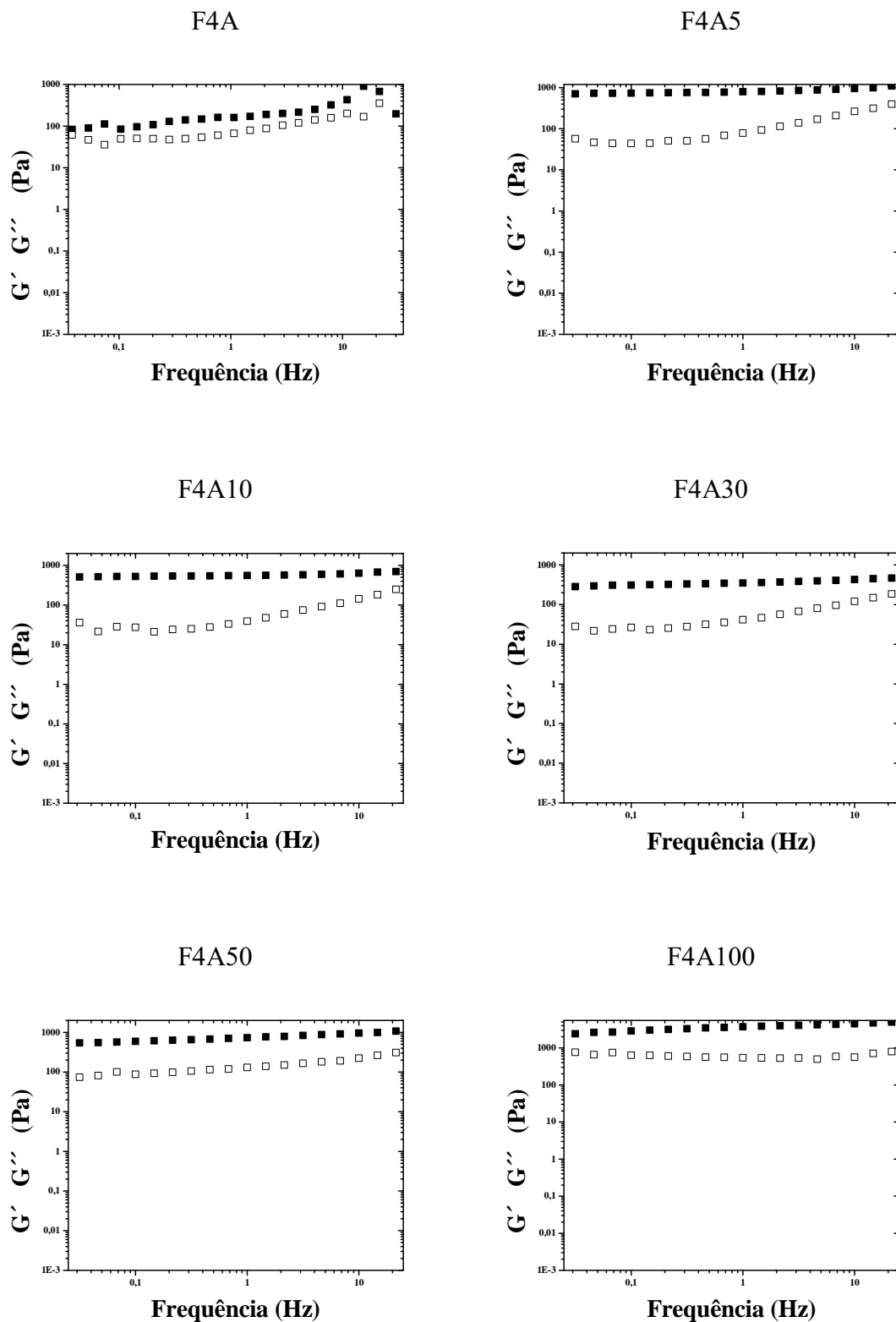


Figura 47: Testes dinâmicos de F4A e das amostras com 5 % (F4A5), 10 % (F4A10), 30 % (F4A30), 50 % (F4A50) e 100 % (F4A100) de água a 25 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

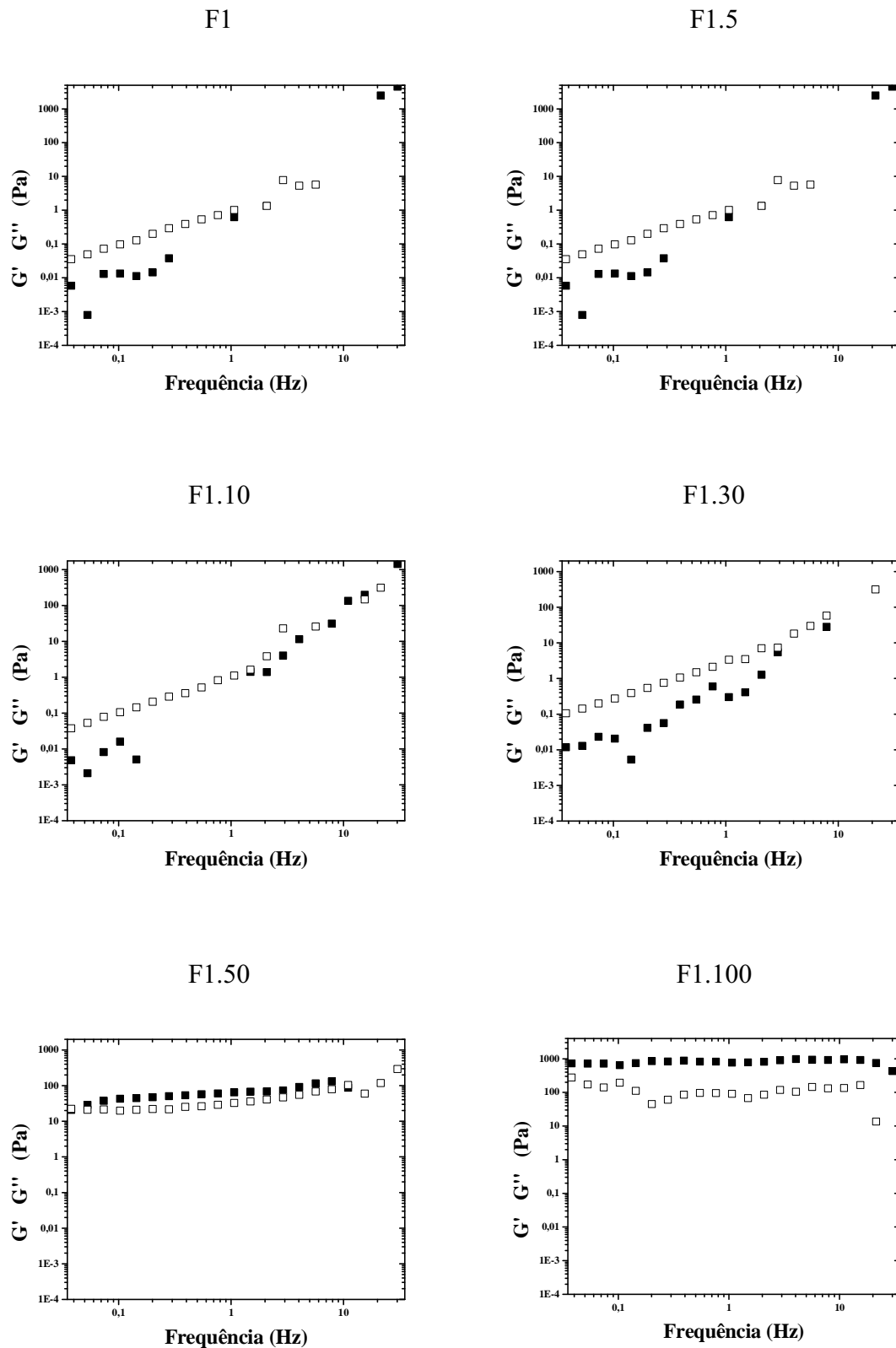


Figura 48: Testes dinâmicos de F1 e das amostras com 5 % (F1.5), 10 % (F1.10), 30 % (F1.30), 50 % (F1.50) e 100 % (F1.100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

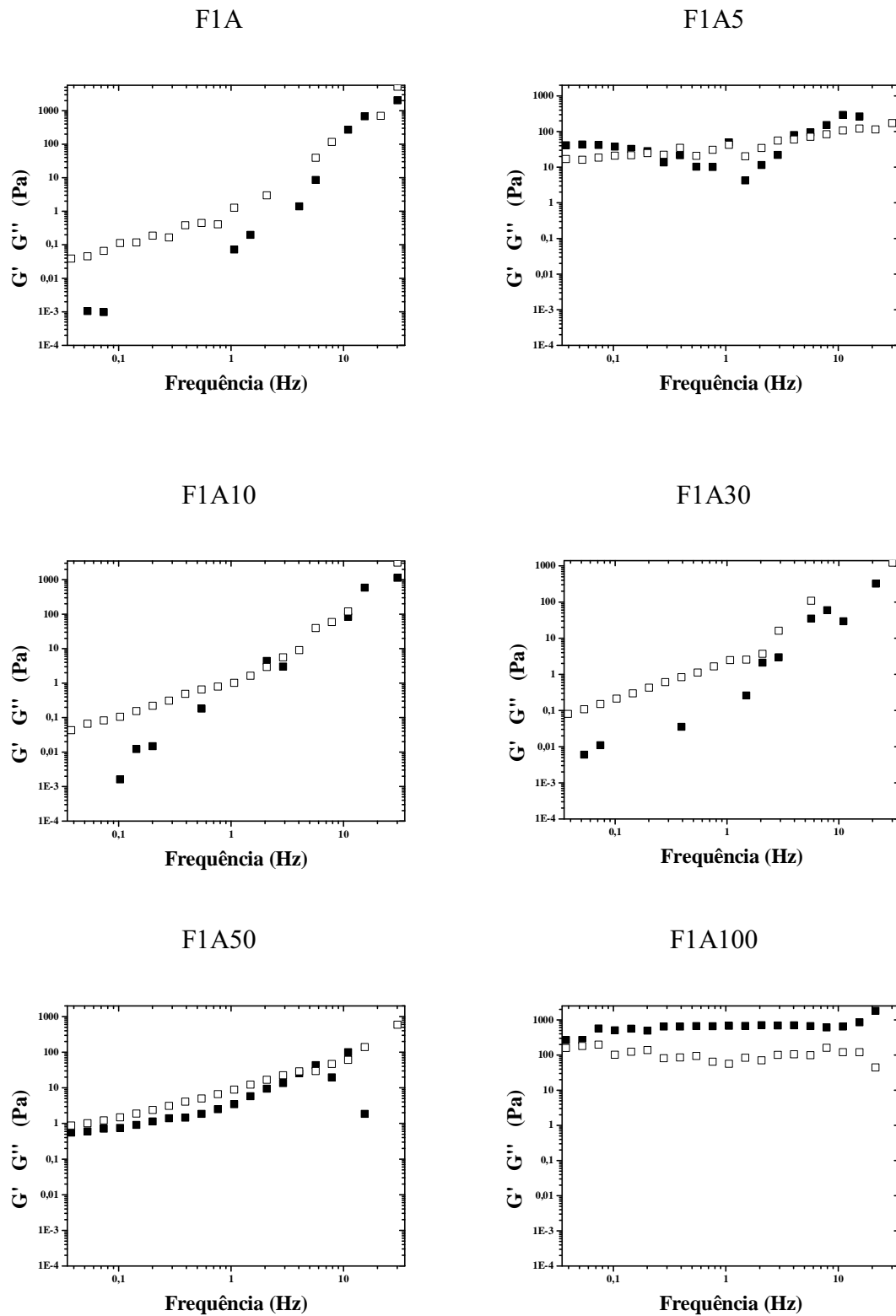


Figura 49: Testes dinâmicos de F1A e das amostras com 5 % (F1A5), 10 % (F1A10), 30 % (F1A30), 50 % (F1A50) e 100 % (F1A100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

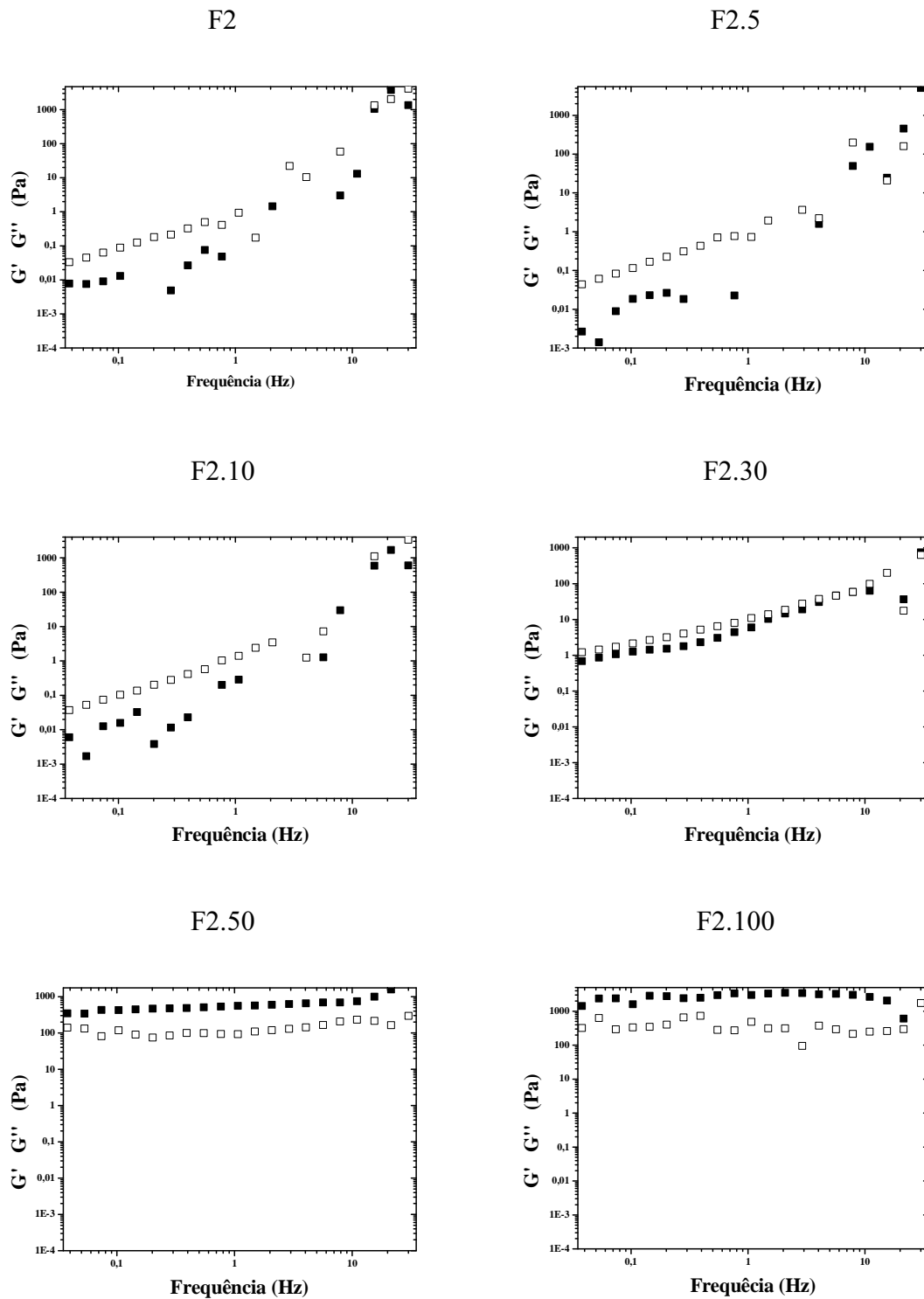


Figura 50: Testes dinâmicos de F2 e das amostras com 5 % (F2.5), 10 % (F2.10), 30 % (F2.30), 50 % (F2.50) e 100 % (F2.100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

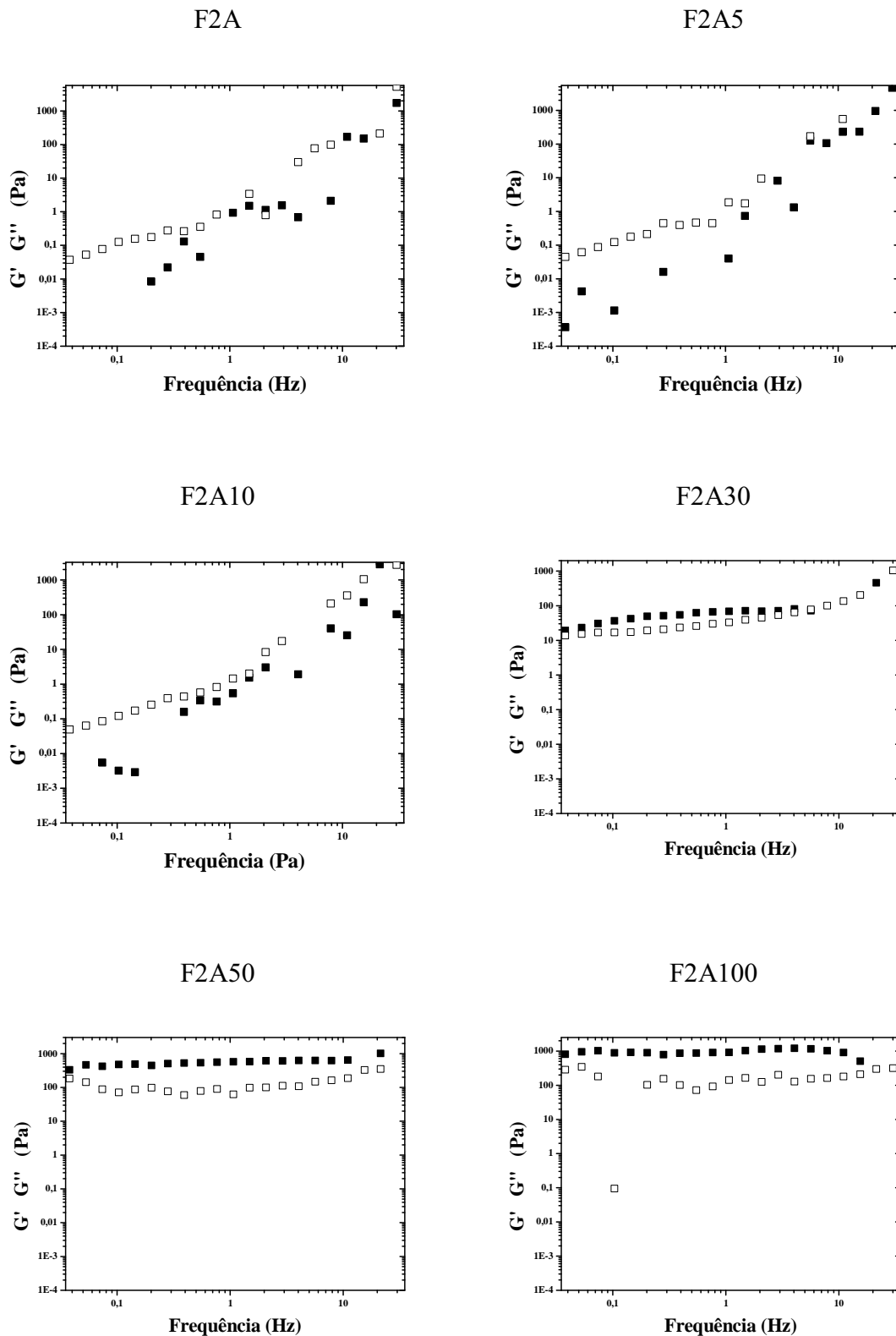


Figura 51: Testes dinâmicos de F2A e das amostras com 5 % (F2A5), 10 % (F2A10), 30 % (F2A30), 50 % (F2A50) e 100 % (F2A100) de água a 32 °C. O símbolo \blacksquare representa o módulo de armazenamento (G') e \bullet o módulo de perda (G'').

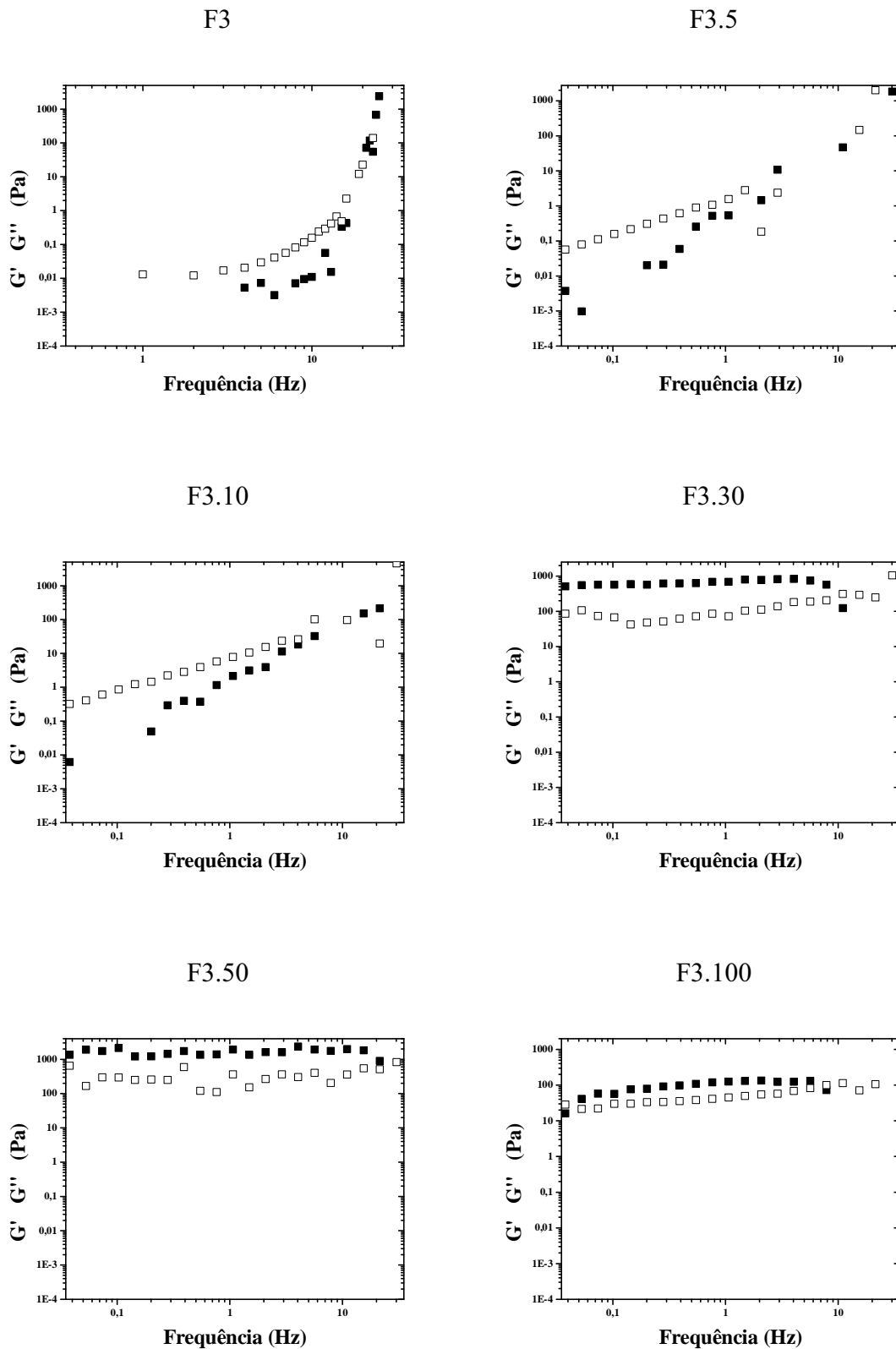


Figura 52: Testes dinâmicos de F3 e das amostras com 5 % (F3.5), 10 % (F3.10), 30 % (F3.30), 50 % (F3.50) e 100 % (F3.100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

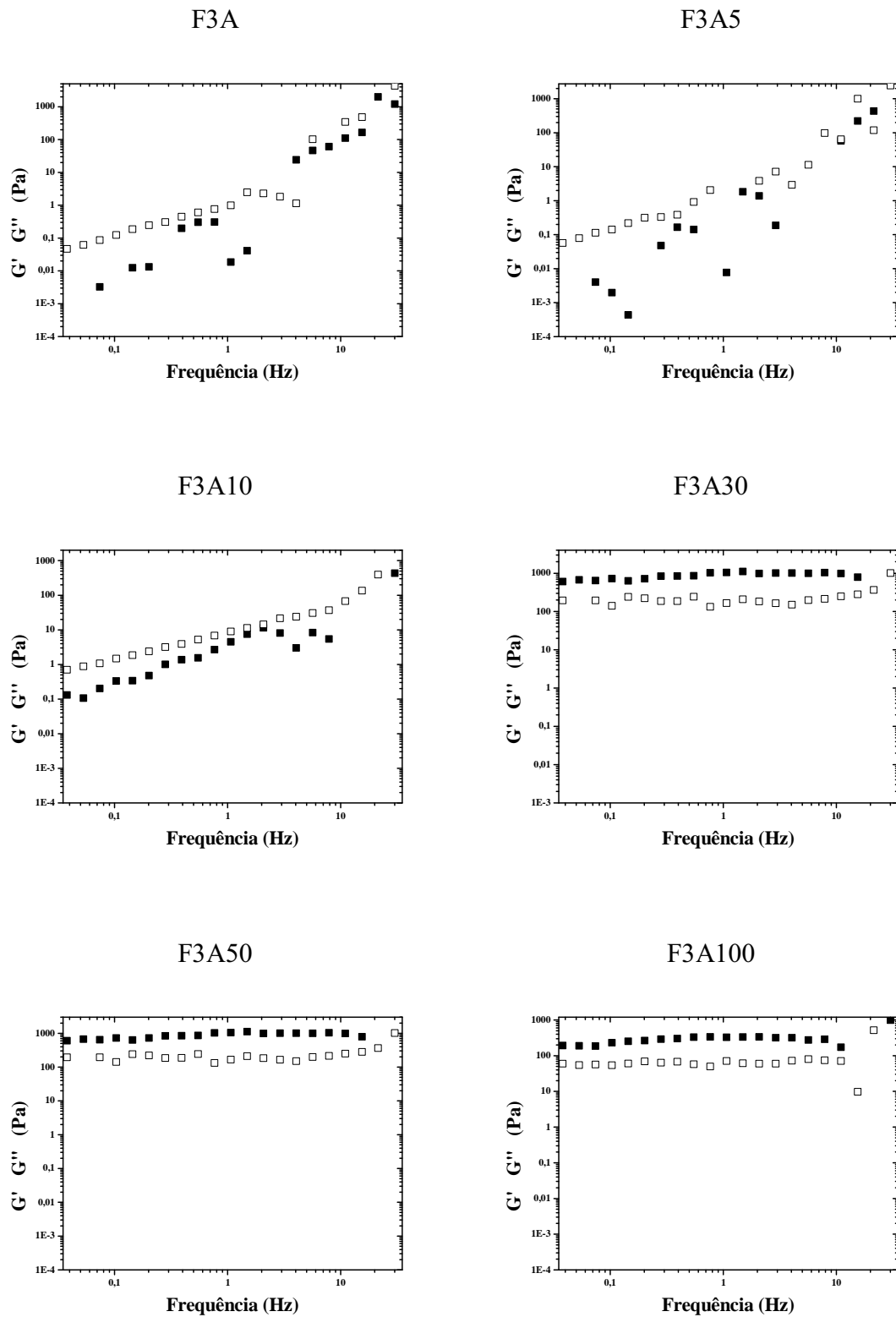


Figura 53: Testes dinâmicos de F3A e das amostras com 5 % (F3A5), 10 % (F3A10), 30 % (F3A30), 50 % (F3A50) e 100 % (F3A100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

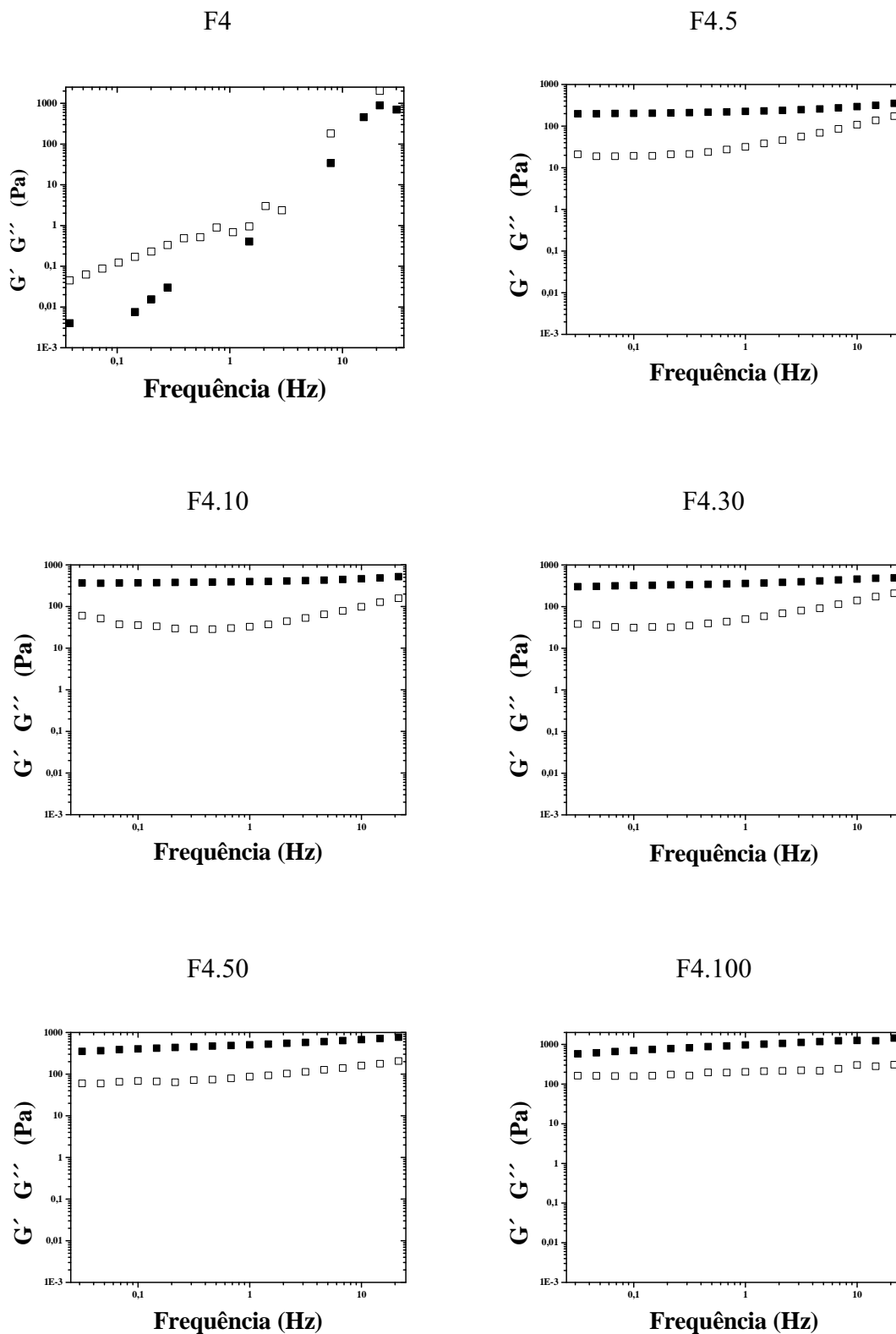


Figura 54: Testes dinâmicos de F4 e das amostras com 5 % (F4.5), 10 % (F4.10), 30 % (F4.30), 50 % (F4.50) e 100 % (F4.100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').

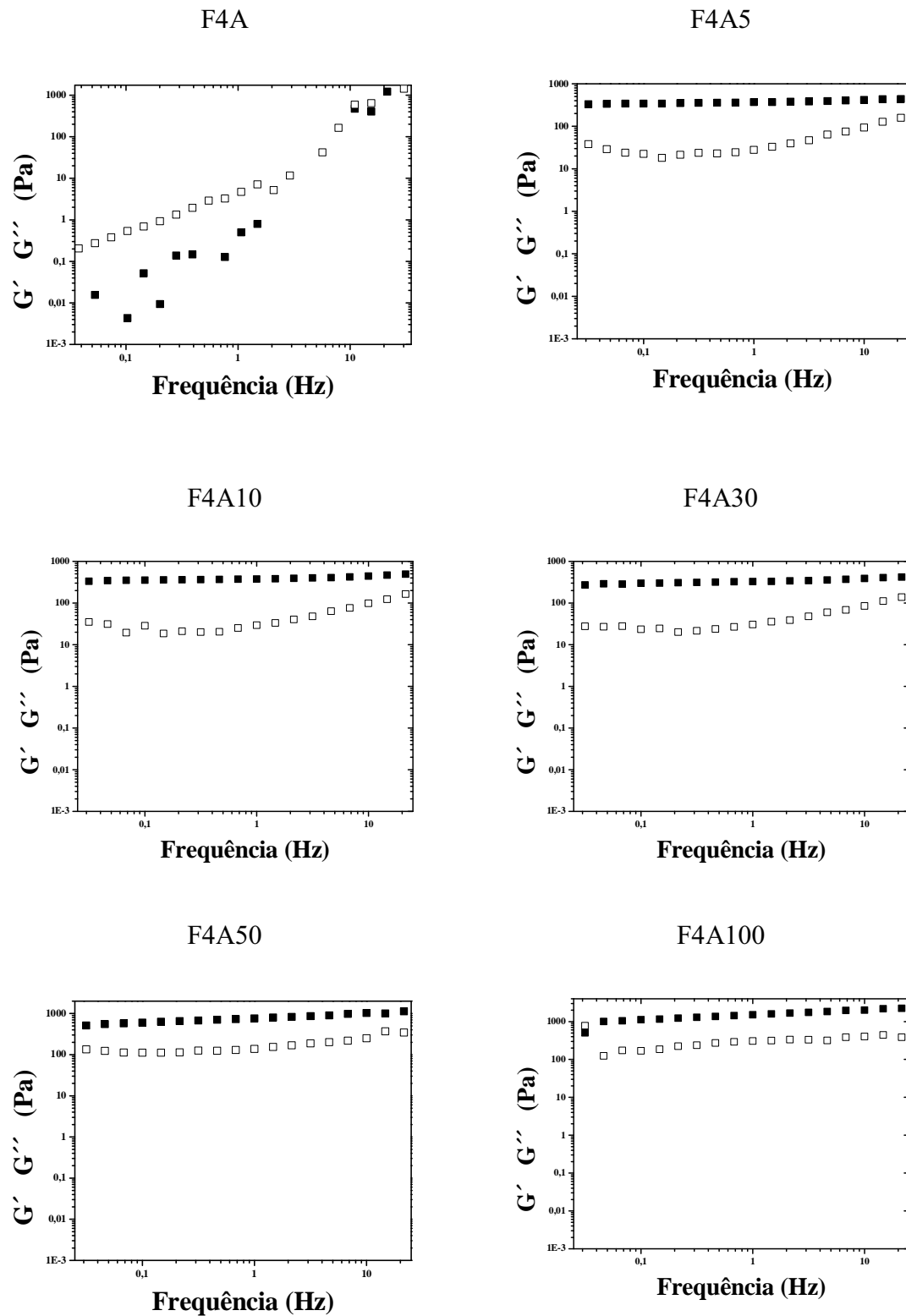


Figura 55: Testes dinâmicos de F4A e das amostras com 5 % (F4A5), 10 % (F4A10), 30 % (F4A30), 50 % (F4A50) e 100 % (F4A100) de água a 32 °C. O símbolo ■ representa o módulo de armazenamento (G') e □ o módulo de perda (G'').