

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

**SISTEMAS LÍQUIDOS CRISTALINOS A BASE DE QUITOSANA E
POLIETILENOIMINA PARA A ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE METRONIDAZOL**

FRANCESCA DAMIANI VICTORELLI

ARARAQUARA

2016

FRANCESCA DAMIANI VICTORELLI

**SISTEMAS LÍQUIDOS CRISTALINOS A BASE DE QUITOSANA E
POLIETILENOIMINA PARA A ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE METRONIDAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista para obtenção do
grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Co- orientador: Giovana Calixto

ARARAQUARA

2016

Dedico este trabalho aos meus pais, Fausto e Márcia,
e ao meu irmão Fausto, pelo apoio e orientação
durante a minha fase acadêmica.

Agradecimentos

Agradeço à Deus por me presentear com oportunidades e pessoas que enriqueceram a minha vida.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela grande oportunidade que me cedeu de fazer parte de sua equipe, pela confiança, dedicação, compreensão, orientação, incentivos e conselhos.

À Giovana Calixto pela grande ajuda em todos os meus passos no laboratório, por me orientar e me ensinar muito.

Ao Matheus Ramos e à Prof. Dr. Taís Maria Bauab pela grande colaboração nos estudos microbiológicos do meu projeto.

À Prof. Dr. Herida Regina Nunes Salgado por possibilitar o uso do microscópio de luz polarizada do laboratório de controle da qualidade.

À Maíra Lima Gonçalez pela paciência e por me ensinar detalhadamente os processos e interpretações da validação do método.

À Roberta B. Rigon por me ensinar toda a preparação da pele de porco para os experimentos de permeação e retenção.

À minha amiga Bruna Forte Aguiar por me ajudar na difícil tarefa de dessecar as orelhas de porco.

Ao meu namorado pelo amor, paciência, companhia e por me ajudar no experimento de permeação.

A todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, pelos ensinamentos científicos durante meu curso de graduação.

Às minhas grandes amigas Ana Helena Sampar, Bruna Forte Aguiar, Evelin Martins, Gabriela Galvão, Giovanna Duarte de Souza e Stephania Mieli. Obrigada pela amizade, apoio, risadas e presença nesses inesquecíveis anos da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO	21
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. MATERIAIS.....	22
3.2. EQUIPAMENTOS	23
3.3. MÉTODOS.....	23
3.3.1. PREPARO DAS FORMULAÇÕES	23
3.3.1.1. DIAGRAMA DE FASES	24
3.3.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO - QUÍMICA	24
3.3.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA.....	24
3.3.2.2. COMPORTAMENTO REOLÓGICO.....	25
3.3.2.2.1. ANÁLISE REOLÓGICA CONTÍNUA.....	25
3.3.2.2.2. ANÁLISE REOLÓGICA OSCILATÓRIA.....	26
3.3.2.3. ESTUDO DE BIOADESÃO.....	27
3.3.2.4. ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA)	28
3.3.3. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE MTZ.....	28

3.3.3.1. DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO DE MTZ NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)	29
3.3.3.2. CURVA ANALÍTICA DO MTZ EM TAMPÃO FOSFATO E METANOL.....	29
3.3.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO <i>IN VITRO</i>	31
3.3.4.1. ESCOLHA DA SOLUÇÃO RECEPTORA	31
3.3.4.2. ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	31
3.3.4.3. ENSAIO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	33
3.3.4.4. RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	34
3.3.5 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. PREPARO DAS FORMULAÇÕES	38
4.1.1. DIAGRAMA DE FASES	38
4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO - QUÍMICA	42
4.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA	42
4.2.2. COMPORTAMENTO REOLÓGICO.....	47
4.2.2.1. ANÁLISE REOLÓGICA CONTÍNUA	47
4.2.2.2. ANÁLISE REOLÓGICA OSCILATÓRIA.....	52
4.2.3. ESTUDO DE BIOADESÃO.....	55
4.2.4. ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA)	56
4.3. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE MTZ.....	57
4.3.1. DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO DE MTZ NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS).....	57
4.3.2. CURVA ANALÍTICA DO MTZ EM TAMPÃO FOSFATO E METANOL.....	58
4.4. ENSAIO DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO <i>IN VITRO</i>	63

4.4.1. ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	63
4.4.2. ENSAIO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO <i>IN VITRO</i>	64
4.5. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	66
5. CONCLUSÃO	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

RESUMO

Os antimicrobianos de liberação sistêmica podem causar resistência bacteriana e são administrados em elevadas dosagens, causando alta toxicidade aos órgãos. O metronidazol apresenta ação potente contra a maioria das bactérias anaeróbicas gram-positivas e gram-negativas e protozoários; e sua administração cutânea pode ser vantajosa, em razão dos poucos efeitos sistêmicos. Porém, a utilização dessa via de administração apresenta um grande obstáculo, devido à dificuldade da permeação de moléculas pelo estrato córneo. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, como os sistemas líquido-cristalinos (SLC) com adjuvantes poliméricos catiônicos, para possibilitar o uso dessa via de administração com sucesso terapêutico. Esse trabalho teve como objetivo de desenvolver um SLC constituído por álcool cetílico propilado e etoxilado (Procetyl[®] AWS) como tensoativo (T), ácido oleico como fase oleosa (FO) e fase aquosa (FA) contendo dispersão polimérica de quitosana (F1), polietilenoimina (F2) ou associação dos polímeros (F3) para administração de metronidazol. Foram desenvolvidos sistemas utilizando dispersões poliméricas, Procetyl[®] AWS e ácido oleico, sendo possível delimitar regiões como: sistema líquido transparente (SLT), sistema líquido translúcido (SLTR), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso transparente (SVT), sistema translúcido de baixa viscosidade (STRBV) sistema translúcido de alta viscosidade (STRAV), sistema viscoso opaco (SVO) ou separação de fases (SF). Uma formulação de cada sistema foi selecionada para os ensaios de caracterização, fixando-se a concentração de T e de FA em 40% e de FO em 20%. As análises de microscopia de luz polarizada evidenciaram estruturas anisotrópicas na forma de estrias, características de fase hexagonal, para as formulações F1, F2 e F3. Ensaios reológicos evidenciaram comportamento

tixotrópico das formulações. O MTZ foi incorporado na concentração de 0,5% nas formulações, que passaram a ser denominadas F1-F, F2-F e F3-F. Os testes de liberação mostraram que as formulações F1-F, F2-F e F3-F liberaram o fármaco respectivamente em 43,1%, 50,9% e 29,7% e nos testes de permeação, o MTZ permeou respectivamente em 1,9%, 2,6% e 1,3% a partir dos sistemas desenvolvidos. Nos ensaios de retenção foi observada a retenção do fármaco no estrato córneo nas seguintes porcentagens 8,96% (F1-F), 4,07% (F2-F) e 12,93% (F3-F) e na epiderme + derme nas porcentagens 3,14% (F1-F), 3,09% (F2-F) e 3,26% (F3-F). No ensaio de atividade antibacteriana foi concluído que o CIM do metronidazol para as cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi de 1000 ug/ml, além disso, foi possível observar que em relação a determinação do CIM apenas F1-F e F3-F foram ativas contra *S. aureus*. A incorporação do fármaco nestes dois sistemas potencializou sua atividade antibacteriana. Todas as amostras foram ativas contra *E. coli*. A incorporação do fármaco nos sistemas F1-F e F3-F potencializou sua atividade antibacteriana. Conclui-se então que os sistemas possibilitaram maior retenção do fármaco na pele. Portanto, esses sistemas podem ser considerados promissores para a administração cutânea do MTZ.

Palavras chave: cristal líquido, metronidazol, polímeros.

ABSTRACT

The antibiotics of systemic release can cause bacterial resistance and are administered in high doses, causing high toxicity to organs. Metronidazole has potent activity against the majority of anaerobic gram-positive and gram-negative bacteria and protozoa; and its topical administration can be advantageous because of the few systemic effects. However, the use of this route of administration presents a great obstacle due to the difficulty of the permeation of molecules through the stratum corneum. Therefore, it becomes necessary to develop drug delivery systems, such as liquid-crystal systems (LCS) with cationic polymeric adjuvants, to allow the use of this route of administration with therapeutic success. This project aimed to develop an LCS constituted by cetyl alcohol ethoxylate and propylated Procetyl® AWS as surfactant (T), oleic acid as the oil phase (OF) and aqueous phase (AP) containing polymer dispersion of chitosan (F1), polyethyleneimine (F2) or association of polymers (F3) to metronidazole administration. Systems have been developed using polymer dispersions, Procetyl® AWS and oleic acid, it is possible to define regions as transparent liquid system (TLS), translucent liquid system (TRLs), opaque liquid system (OLS), transparent viscous system (TVS), translucent low viscosity system (TRLVS), translucent high viscosity system (TRHVS), opaque viscous system (OVS) or phase separation (PS). One formulation of each system was selected for the characterization tests, determining the concentration of T and AF in 40% and of OF in 20%. The analysis of polarized light microscopy showed anisotropic structures in the form of splines, characteristics of hexagonal phase, for formulations F1, F2 and F3. Rheological tests showed thixotropic behavior of the formulations. The MTZ was incorporated at 0.5% in the formulations, which are now called F1-F, F2-F and F3-F. Release tests showed that the formulations F1-F, F2-F, and F3-F released drug

respectively 43.1%, 50.9% and 29.7% and in the permeation tests, the MTZ permeated respectively 1.9%, 2.6% and 1.3% in those systems developed. In the retention trial was observed the drug retention in the stratum corneum in the following percentages 8.96% (F1-F), 4.07% (F2-F) and 12.93% (F3-F) and in the epidermis + dermis in the percentages 3.14% (F1-F), 3.09% (F2-F) and 3.26% (F3-F). In the antibacterial activity test it was concluded that the MIC of the metronidazole for strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was 1000 ug/ml, moreover, it was observed that for determining the MIC, only F1-F and F3-F are active against *S. Aureus*. The incorporation of the drug in these two systems leveraged its antibacterial activity. All samples were active against *E. Coli*. The incorporation of the drug in the F1 and F3 systems leveraged its antibacterial activity. It follows then that the systems allowed greater retention of the drug in the skin. Therefore, these systems can be considered promising for topical administration of the MTZ.

Key words: liquid crystal, metronidazole, polymers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do metronidazol.....	17
Figura 2. Estrutura da quitosana.....	19
Figura 3. Estrutura de um segmento de PEI.....	19
Figura 4. Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus	32
Figura 5. Ensaio de determinação da CIM por meio de diluição em microplacas revelada com solução de resazurina 0,01%	37
Figura 6. Diagrama de fases da formulação F1.....	39
Figura 7. Diagrama de fases da formulação F2.....	40
Figura 8. Diagrama de fases da formulação F3.....	41
Figura 9. Fotomicrografia correspondente a MLP de Cs liotrópicos anisotrópicos de mesofase hexagonal que é caracterizada pela presença de estrias. Aumento focal: 40x.....	43
Figura 10. Fotomicrografia correspondente a MLP de CLs liotrópicos anisotrópicos de mesofase lamelar que é caracterizada pela presença de cruz de malta. Aumento focal: 40x.....	43
Figura 11. Fotomicrografia correspondente a MLP de CLs liotrópicos anisotrópicos de mesofase cúbica que é caracterizada pela presença de campo escuro. Aumento focal: 40x.....	43
Figura 12. Diagrama de sistemas da formulação F1	44
Figura 13. Diagrama de sistemas da formulação F2	45
Figura 14. Diagrama de sistemas da formulação F3	46

Figura 15. Reograma de fluxo das formulações sem fármaco. Símbolos fechados representam a curva de ida e símbolos abertos representam a curva de volta	48
Figura 16. Reograma de fluxo das formulações com fármaco. Símbolos fechados representam a curva de ida e símbolos abertos representam a curva de volta	49
Figura 17. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência das formulações com fármaco	52
Figura 18. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência das formulações sem fármaco	53
Figura 19. Varredura de espectro de MTZ.....	57
Figura 20. Curva analítica para MTZ em tampão fosfato	62
Figura 21. Curva analítica para MTZ em metanol	62
Figura 22. Perfil de liberação in vitro (%), com membrana sintética de acetato de celulose 0,45 μm , de MTZ incorporada nas formulações F1-F, F2-F e F3-F e solução contendo MTZ 0,5 %.....	63
Figura 23. Perfil de permeação in vitro (%), com pele de orelha de porco, de MTZ incorporada nas formulações F1-F, F2-F e F3-F e solução contendo MTZ 0,5 %	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentrações (%) dos componentes das formulações.....	47
Tabela 2- Índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) das formulações.....	51
Tabela 3- Valores da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) para as formulações estudadas.....	54
Tabela 4- Trabalho da força bioadesiva das formulações QS, PEI, QS + PEI. Os valores representam a média ± desvio padrão, à temperatura de 25°C	55
Tabela 5- Propriedades mecânicas das formulações F1, F2, F3, F1-F, F2-F e F3-F determinadas através da análise de perfil de textura. Cada valor representa a média ± desvio padrão, à temperatura de 25°C	56
Tabela 6- Resultados de absorvância no comprimento de onda de 320 nm para cada concentração analisada e coeficientes de correlação	57
Tabela 7- Resultados da avaliação da precisão intra-dia ou reprodutibilidade.....	58
Tabela 8- Resultados da avaliação da precisão inter-dia ou intermediária.....	59
Tabela 9- Resultados do limite de detecção e de quantificação de MTZ.....	60
Tabela 10- Resultado de exatidão.	61
Tabela 11- Comparação da retenção no EC e na E + D do metronidazol entre as amostras	66
Tabela 12- Ativação contra <i>S. aureus</i> das formulações F1-F, F2-F e F3-F. Cepa utilizada: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).....	67
Tabela 13- Ativação contra <i>E. coli</i> das formulações F1-F, F2-F e F3-F. Cepa utilizada: <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC 25922 - *Escherichia coli*

ATCC 25923 - *Staphylococcus aureus*

CIM - concentração inibitória mínima

CL – Cristal Líquido

CMH – Caldo Müller-Hinton

EC - Estrato córneo

E + D - Epiderme + Derme

G' – Módulo de armazenamento

G'' – Módulo de perda

MLP - Microscopia de luz polarizada

MTZ - Metronidazol

Pa - Pascal

PBS – Tampão fosfato de sódio

PEI - Polietilenoimina

QS - Quitosana

SLC - Sistemas Líquidos Cristalinos

SLO - sistema líquido opaco

SLT - sistema líquido transparente

SLTR - sistema líquido translúcido

STRBV - sistema translúcido de baixa viscosidade

STRAV - sistema translúcido de alta viscosidade

SVT- sistema viscoso transparente

SVO - sistema viscoso opaco

TPA - análise do perfil de textura (TPA)

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos de administração cutânea têm sido bastante empregados em virtude da possibilidade de administração em elevadas concentrações para combater as bactérias resistentes sem causar efeitos colaterais (CALIXTO *et al.*, 2014).

Um dos antimicrobianos para uso cutâneo mais utilizado é o metronidazol (Figura 1), que é de origem sintética e apresenta ação potente contra a maioria das bactérias anaeróbias facultativas gram-positivas e gram-negativas e protozoários (RAFII *et al.*, 2003). Além disso, ele apresenta ação anti-inflamatória para determinadas condições dermatológicas, como rosácea de grau I e IV e dermatites. Para que este fármaco exerça sua atividade biológica é essencial que ele sofra a ação nitrorredutora da bactéria, através da enzima nitroredutase. Como resultado, há formação de compostos intermediários reativos que interagem com o DNA, causando lesão caracterizada por desestabilização molecular do DNA e liberação de nucleotídeos de timidina (ZIP, 2010).

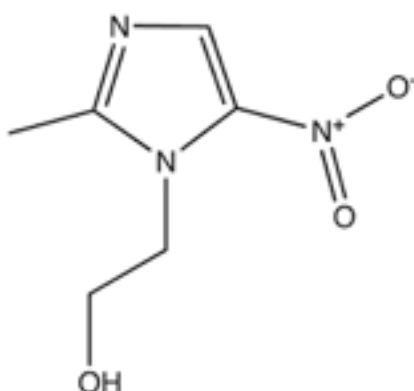


Figura 1. Estrutura do metronidazol.

A administração cutânea de fármacos é extremamente interessante, em virtude dos mínimos efeitos sistêmicos. Todavia, o estrato córneo, camada mais

superficial da pele, é um obstáculo para a entrada de muitas moléculas em níveis terapêuticos. Portanto, a fim de melhorar a absorção de moléculas através desta camada, diferentes sistemas de liberação têm sido estudados com o objetivo de controlar a liberação do fármaco e melhorar a sua eficácia (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os sistemas líquidos cristalinos (SLC) apresentam a capacidade de controlar a liberação das substâncias neles incorporados, sendo possível a sua utilização como sistemas de liberação de fármacos (GABBOUN *et al.*, 2001). Esta característica é resultado da estrutura líquido-cristalina, que devido a presença de multicamadas ao redor da gota, ocorre a diminuição do transporte interfacial do fármaco entre as gotas, atuando como uma barreira de difusão do fármaco. Além disso, eles são capazes de promoverem uma melhor estabilidade física, um amplo potencial de solubilização dos fármacos e aumento da retenção de água no estrato córneo, contribuindo para a hidratação cutânea (CHORILLI *et al.*, 2009).

A otimização do tempo de contato da formulação com a pele, com o objetivo de prolongar a liberação e diminuir a administração repetida do fármaco, pode ser alcançada utilizando polímeros carregados positivamente, como a quitosana (QS) e a polietilenoimina (PEI), como fase aquosa dos SLC. A quitosana (Figura 2), $\alpha(1-4)$ -2-amino-2- deoxi β -D-glucana, uma forma desacetilada da quitina, é um polissacarídeo catiônico biocompatível, biodegradável e com baixa citotoxicidade e tem sido empregada com sucesso em sistemas de liberação para via tópica (JERE *et al.*, 2009). Já a PEI (Figura 3) é um polímero contendo amina multifuncional solúvel em água que contém grupos básicos amina. Portanto, ambos os polímeros apresentam alta densidade de carga catiônica, assim, podendo aumentar a

interação por forças de atração da formulação com as superfícies carregadas negativamente, como a pele (GÜNTHER *et al.*, 2011).

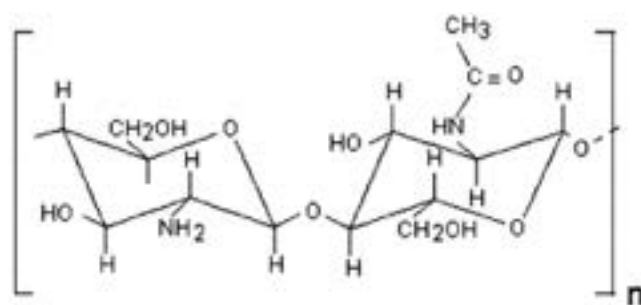


Figura 2. Estrutura da quitosana.

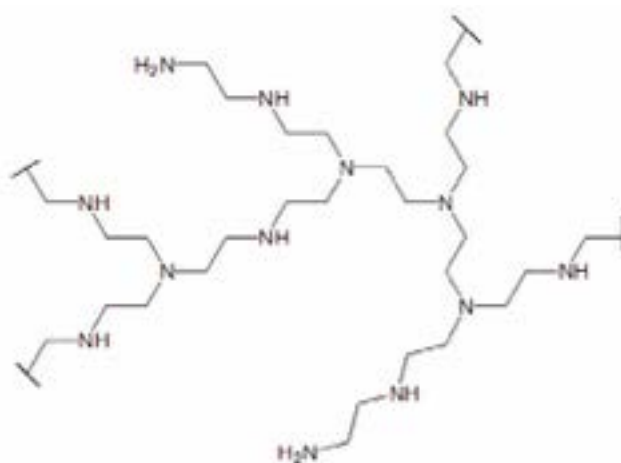


Figura 3. Estrutura de um segmento de PEI.

Desse modo, o desenvolvimento farmacotécnico de SCL com incorporação de agentes poliméricos carregados positivamente é atraente para a liberação tópica de antimicrobianos, uma vez que proporcionará vetorização do fármaco, diminuindo a frequência de sua administração e assim os efeitos colaterais. Portanto, tendo como

base o panorama atual desfavorável a administração sistêmica de antimicrobianos, sugere-se que administração cutânea de antimicrobianos incorporados SLC com polímeros catiônicos, possa oferecer uma promissora e inexplorável ferramenta nanobiotecnológica para o tratamento de doenças de pele.

2. OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar SLC, avaliar a permeação e retenção na pele do metronidazol, além de avaliar a atividade antibacteriana empregando as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sistemas líquido cristalino para incorporação do metronidazol;
- Caracterizar estruturalmente os sistemas obtidos utilizando recursos como microscopia de luz polarizada e ensaios de reologia;
- Realizar testes de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* das formulações desenvolvidas.
- Avaliar a atividade antibacteriana empregando as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

- Ácido oleico P.A (Synth[®], Brasil);
- Água ultra pura (Milli'Q Plus[®]);
- Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl[®] AWS - Croda[®], Brasil);
- Cepas *Escherichia coli*;
- Cepas *Staphylococcus aureus*;
- Cloreto de sódio (Vetec[®]);
- Discos brancos de papel filtro esterilizados (Labroclin[®]);
- Fitas adesivas (Scotch[®] 750 3M)
- Fosfato de potássio monobásico (Quimis[®]);
- Hidróxido de sódio (Quimis[®]);
- Kits seringas da BD Biosciences Pharmingen[®];
- Membrana de Acetato Celulose para tubos de diálise, 76 mm, Sigma-Aldrich;
- Metanol, J.T. Baker[®], CLAE;
- Metronidazol, Henrifarma, Brasil;
- Microplacas
- Orelhas suínas (Frigorífico Olhos d'Água[®]).
- Quitosana de baixo peso molecular – Sigma-Aldrich;
- Revelador resazurina

3.2. EQUIPAMENTOS

- Analisador de textura TA-XTplus[®] (Stable Micro Systems, Surrey, UK);
- Banho de ultrassom, Unique[®], Ultra Sonic Cleaner;
- Centrífuga, Sorval[®], modelo TC 6 Du Pont.
- Dermatômetro Nouvag[®] TMC 300;
- Espectrofotômetro Uv-Vis
- Microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena[®];
- Peagômetro MicroNal[®] B474;
- Reômetro Rheostress RS1 Rheometer[®],
- Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus (Hanson Research Corporation[®]);
- Ultra Turrax Quimis[®];
- Vortex[®];

3.3. MÉTODOS

3.3.1. PREPARO DAS FORMULAÇÕES

Preparou-se dois gramas de cada formulação compostas por tensoativo álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl) e ácido oleico e as diferentes fases aquosas (água, PEI e QS), em frascos transparentes com tampa, variando-se as

concentrações dos componentes, conforme descrito no item 3.3.1.1. As formulações foram preparadas sob pressão de 1 atm e temperatura ambiente.

3.3.1.1. DIAGRAMAS DE FASE TERNÁRIOS

Ao procetyl foi adicionada o ácido oleico, e para a obtenção do diagrama de fases foram utilizadas as relações de T/O na faixa de 1:9 até 9:1. A essa mistura, foi adicionada a fase aquosa (água, PEI e QS) com auxílio de uma micropipeta automática, realizando a pesagem de todos os componentes da formulação em balança analítica.

As transições de mistura semi-sólida para sistema líquido transparente (SLT), sistema líquido translúcido (SLTR), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso transparente (SVT), sistema translúcido de baixa viscosidade (STRBV) sistema translúcido de alta viscosidade (STRAV), sistema viscoso opaco (SVO) ou separação de fase foram detectadas visualmente contra fundo escuro (CHORILLI *et al.*, 2009). Aos sistemas selecionados foi incorporado o fármaco Metronidazol (MTZ) numa concentração de 0,5%.

3.3.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os sistemas selecionados foram caracterizados por estudos de microscopia de luz polarizada e comportamento reológico.

3.3.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Uma pequena quantidade de formulação foi colocada, cada uma, sobre uma lâmina de vidro que foi coberta com lamínula e analisada em microscópio sob luz polarizada Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena. Nesse ensaio avaliou-se a

homogeneidade da dispersão e classificou as formulações quanto ao comportamento mediante ao plano de luz incidente. A análise foi realizada a temperatura ambiente.

3.3.2.2. COMPORTAMENTO REOLÓGICO

3.3.2.2.1. ANÁLISE REOLÓGICA CONTÍNUA

Os reogramas dos sistemas foram obtidos através do reômetro modelo AR2000 – TA Instruments[®] utilizando geometria steel plate com 40 mm de diâmetro e com gap de 200 µm para os sistemas viscosos e utilizando geometria cone/placa com 40 mm de diâmetro, 2° de ângulo e gap de 52 µm para os sistemas não viscosos. A análise foi realizada em triplicata.

Uma amostra com aproximadamente três gramas dos sistemas foi colocada, cuidadosamente, na placa inferior do reômetro, e esperou-se o tempo de repouso de 3 minutos para o início da análise. A taxa de cisalhamento utilizada foi de 0 a 100 s⁻¹ para a curva ascendente e de 100 a 0 s⁻¹ para a curva descendente, durante 120 segundos cada à temperatura de 32 °C.

Os índices de consistência e fluxo foram determinados pela Equação 1 para a análise quantitativa do comportamento de fluxo:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \text{ (equação 1)}$$

onde “ τ ” é a taxa de cisalhamento, “ $\dot{\gamma}$ ” é a tensão de cisalhamento, “ k ” é o índice de consistência e “ n ” é o comportamento de fluxo (CALIXTO et al., 2015).

3.3.2.2.2. ANÁLISE REOLÓGICA OSCILATÓRIA

A análise oscilatória foi também realizada através do reômetro modelo AR2000 – TA Instruments[®] utilizando geometria steel plate com 40 mm de diâmetro e com gap de 200 µm para os sistemas poucos viscosos e utilizando geometria cone/placa com 40 mm de diâmetro, 20 de ângulo e gap de 52 µm para os sistemas mais viscosos. A análise foi realizada em seis amostras independentes, que foi o tamanho amostral estimado pelo projeto piloto.

Primeiramente, foi realizado o teste de varredura de tensão para determinação da região viscoelástica. Para esse teste foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 Hz, à temperatura de 32 °C.

Após a determinação da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, realizou-se o teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 10 Hz, à tensão de 1 Pa à temperatura de 37 °C (CALIXTO et al., 2015).

A fim de se estabelecer uma análise quantitativa da dependência de G' da frequência foi calculado o expoente n através da equação 2, o qual indica a estrutura dos sistemas obtidos (SAXENA et al. 2011).

$$G' = S \cdot \omega^n \text{ (equação 2)}$$

em que: G' é o módulo de armazenamento, ω é a frequência oscilatória e S é a resistência do gel, sendo n o expoente viscoelástico.

3.3.2.3. ESTUDO DE BIOADESÃO

Para a avaliação da força bioadesiva *in vitro* dos sistemas, primeiramente, foram obtidas peles de orelha do porco do matadouro “Olhos d’Água” localizado em Ipuã (SP) e preparadas para o teste como descrito por Carvalho et al.

As orelhas foram lavadas com água ($25 \pm 0,5$ °C) e as peles com lesão foram descartadas. As peles não danificadas foram removidas da cartilagem com um bisturi e uma camada com espessura de 400 μm do estrato córneo e epiderme foi separada do tecido adiposo com um dermatometro (Nouvag TCM 300, Goldach, Suíça).

Estas peles foram mantidas em solução salina fisiológica contendo 0,9% (m/v) de NaCl (Merck), a $25 \pm 0,5$ °C durante 30 minutos; em seguida, os pelos eram cortados com uma tesoura e, então, a pele foi fixada à extremidade inferior da sonda cilíndrico (diâmetro 10 mm) com um anel de borracha.

A força necessária para remover as formulações da pele foi avaliada *in vitro*, utilizando o analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra), no modo *Adhesion Test*. À temperatura de 32 °C, as formulações foram acondicionadas em recipientes de vidro pequenos sob a sonda. O teste foi iniciado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mm/s) até que a pele entrasse em contato com a amostra. A pele e a formulação foram mantidas em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este tempo. Em seguida, a sonda subiu a velocidade constante (0,5 mm/s) até ocorrer o destacamento entre a mucosa e a formulação. A força necessária para ocorrer esse destacamento foi

calculada pela curva força *versus* tempo. A análise foi realizada em triplicata (CALIXTO et al., 2015).

3.3.2.4. ANÁLISE DE PERFIL DE TEXTURA

O perfil de textura das formulações foi analisado utilizando um analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Inglaterra), a partir do qual é possível extrair propriedades mecânicas, tais como a dureza, compressibilidade, adesividade e coesão.

Para a realização do teste, as formulações (15 g) foram colocados em tubos de centrífuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD®, Franklin Lakes, EUA) e centrifugados a 4000 rotações por minuto, durante 3 minutos, para eliminar as bolhas de ar e tornar a sua superfície lisa. Em seguida, esses tubos foram colocados embaixo da sonda analítica (10 mm de diâmetro) do analisador de textura, que foi programada para comprimir a amostra a velocidade de 0,5 mm/s até a profundidade pré-definida (10 milímetros) e retornar para a superfície da amostra na mesma velocidade. Após 5 segundos de repouso, uma segunda compressão inicia-se, nas mesmas condições. Todas as análises foram realizadas em triplicatas, à temperatura de 25 °C. (CALIXTO, 2015).

3.3.3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL NO FLUIDO RECEPTOR

A validação da metodologia analítica foi realizada usando os parâmetros: linearidade, precisão intra-corrída e intermediária, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, sugeridos pelos guias ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2003).

3.3.3.1 DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DE ABSORÇÃO MÁXIMA DE METRONIDAZOL NO ESPECTRO (UV-VIS), ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Uma solução de MTZ foi preparada em tampão fosfato a uma concentração de 230 ug / mL. Então, uma solução preparada a partir de 1,74 mL de tampão de fosfato pH 7,4 e 0,260 mL da solução de 230 ug / mL MTZ foi carregada para uma célula de quartzo. Depois de homogeneização, uma leitura espectrofotométrica no intervalo de comprimento de onda a partir de 200 a 400 nm foi realizada.

3.3.3.2. CURVA ANALÍTICA DE METRONIDAZOL EM TAMPÃO FOSFATO E METANOL

Para obter a curva de calibração de MTZ, preparamos uma solução estoque de 50 ml de uma solução tampão fosfato com uma concentração de 50 ug MTZ / ml em um balão volumétrico.

Em balões volumétricos de 5 ml soluções com diferentes concentrações de MTZ foram preparadas em triplicatas, adicionando volumes crescentes de solução de estoque com a ajuda de uma pipeta automática. Os balões volumétricos foram cheios até a linha do menisco com a solução tampão fosfato. A leitura das soluções foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 320 nm (demonstrado no item 3.3.3.1).

- Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas, determinada pela análise de cinco níveis de concentração diferentes de MTZ em dois dias diferentes. Como descrito acima foi realizada uma solução na concentração de 50 µg/mL (solução-mãe). A partir da solução-mãe foram preparadas cinco diluições, em triplicata, utilizando-se solução tampão fosfato pH 7,4 como diluente. A partir da média dos valores encontrados de absorbância no comprimento de onda de 320 nm e das concentrações testadas, a equação da reta foi determinada por regressão linear.

- Precisão

A precisão foi avaliada por ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada através da análise de três concentrações de MTZ (baixa, média e alta) em triplicata em um mesmo dia. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada pela análise das mesmas três concentrações de MTZ, realizadas em 2 dias distintos.

- Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando valores de desvio padrão e de inclinação das curvas analíticas obtidas em triplicata e em dois dias distintos. Os LD e LQ teóricos foram obtidos através do cálculo das equações 3 e 4, respectivamente:

$$LD = DP \times 3 / IC \text{ (equação 3)}$$

$$LQ = DP \times 10 / IC \text{ (equação 4)}$$

onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo dos y e IC é a inclinação da curva analítica.

- Exatidão

A exatidão foi avaliada pela mesma metodologia da precisão intermediária, sendo calculada pela equação, que relaciona a concentração média determinada experimentalmente, obtida utilizando a equação da reta determinada por regressão linear, com a concentração teórica correspondente.

Assim, foi possível criar um gráfico que relaciona a absorvância em função da concentração de MTZ e calcular a equação da reta e o coeficiente de regressão linear.

Também foi realizado uma curva analítica para o solvente metanol.

3.3.4. ENSAIO DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO *IN VITRO*

3.3.4.1. ESCOLHA DA SOLUÇÃO RECEPTORA

Foi utilizada como solução receptora a solução tampão fosfato pH 7,4

3.3.4.2. ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O estudo de liberação do metronidazol foi realizado utilizando membrana sintética de acetato de celulose 0,45 μm (Sigma-Aldrich), com solução receptora composta por tampão fosfato pH 7.4. O experimento foi realizado em um sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus, apresentado na Figura 4.



Figura 4. Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus.

No compartimento receptor, foi colocada solução tampão fosfato pH 7,4, as membranas sintéticas foram hidratadas e colocadas na célula de difusão. Espalhou-se, de maneira uniforme, sobre toda a área da membrana, 0,30 g das formulações contendo 0,5% de metronidazol, sendo essa massa previamente obtida utilizando um vidro de relógio que foi tarado e adicionado a quantidade desejada da formulação. O volume do meio receptor foi de sete mL e a área disponível para a difusão foi $1,77 \text{ cm}^2$ (PRIMO et al., 2008).

O sistema de agitação foi acionado e amostras de 1,8 mL da fase receptora foram coletadas nos tempos de 5, 30, 60, 120, 240, 480, 720 minutos.

A “condição sink” foi mantida repondo-se 2,0 ml da solução receptora ao sistema após cada coleta. O experimento foi realizado em hexaplicata, conduzido a $32^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$ e a solução receptora foi constantemente agitada a $300 \pm 0,2 \text{ rpm}$.

3.3.4.3. ENSAIO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

O ensaio foi realizado utilizando-se peles de orelha de porcos recém-abatidos e um sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus, apresentado na Figura 1.

As orelhas foram previamente higienizadas em água corrente e posteriormente removeu-se a cartilagem com a assistência de tesoura e bisturi. Tecidos como adiposo e pelos foram retirados e as peles foram então dermatomizadas, utilizando-se um dermatometro, na espessura de 500µm sendo isolados somente o estrato córneo, epiderme e derme.

No compartimento receptor, foi colocada solução tampão fosfato pH 7,4, as peles foram hidratadas e cortadas em tamanho apropriado para o ensaio de permeação, na sequência as peles foram colocadas na célula de difusão com o lado da derme voltado para baixo, ficando em contato com a solução receptora e a região do estrato córneo voltada para cima. Espalhou-se, de maneira uniforme, sobre toda a área da membrana, 0,30 g das formulações contendo 0,5% de metronidazol, sendo essa massa previamente obtida utilizando um vidro de relógio que foi tarado e adicionando a quantidade desejada da formulação. O volume do meio receptor foi de sete mL e a área disponível para a difusão foi 1,77 cm² (PRIMO et al., 2008).

O sistema de agitação foi acionado e amostras de 2,0 mL da fase receptora foram coletadas nos tempos de 5, 30, 60, 120, 240, 480, 720, 960, 1200 e 1440 minutos.

A “condição sink” foi mantida repondo-se 2,0 ml da solução receptora ao sistema após cada coleta. O experimento foi realizado em hexaplicata, conduzido a $32^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a solução receptora foi constantemente agitada a $300 \pm 0,2$ rpm.

De acordo com Aronson (1993) e Bentley (2002), para calcular a quantidade permeada (Q), levaram-se em consideração as diluições posteriores à primeira coleta, utilizando-se a equação 5:

$$Q_{\text{real, t}} = C_{\text{mensurado, t}} \cdot V_r + \sum_{n=1}^{n-1} C_a \cdot V_a \text{ (equação 5)}$$

onde Q representa a quantidade permeada acumulada, $Q_{\text{real, t}}$ indica o valor real no tempo t, $C_{\text{mensurada, t}}$ é a concentração mensurada da coleta no tempo t, V_r representa o volume da solução receptora da célula de difusão, C_a é a concentração da amostra removida, e V_a é o volume removido de amostra.

A quantificação de MTZ na solução tampão pH 7,4 foi feita por espectrofotometria, utilizando a curva analítica em solução tampão pH 7,4, obtida no desenvolvimento do método analítico, para determinar a concentração de metronidazol permeado. As peles submetidas ao estudo de permeação foram limpas com algodão embebido em água destilada e avaliadas quanto à retenção.

3.3.4.4. RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

O ensaio de retenção no estrato córneo (EC) foi realizado expondo a pele de porco à permeação após higienização e fixação da mesma em placa de vidro com o auxílio de fita adesiva. Foram recortados 16 pedaços de fita adesiva (Fita Scotch[®] 3M 750) com tamanho da área semelhante ao que a pele ficou em contato com a formulação durante a permeação e esses 16 pedaços de fita (Fita Scotch[®] 3M 750)

que ficaram em contato com a pele, foram dobrados e colocados em tubos de ensaio com 5mL de metanol, exceto a primeira fita que foi descartada, pois era apenas retirar algum resquício de excesso de formulação. Os tubos de ensaio foram então agitados em Vortex[®] por 2 minutos, a seguir colocados no ultrassom por 30 minutos e a solução filtrada em membrana Millipore[®] de 0,45µm.

Para o ensaio de retenção na epiderme + derme (E + D) a área de pele em contato com a formulação foi recortada em pequenas tiras e transferida para tubo de Beckman contendo 5 mL de metanol, agitada em Vortex[®] por 2 minutos e triturada com o auxílio de Turrax por 3 minutos. Com o uso de membrana Millipore[®] de 0,45 µm, o sobrenadante foi filtrado (ROSA et al., 2003).

Foi utilizada a curva analítica em metanol obtida no desenvolvimento do método analítico. A quantificação de MTZ foi realizada por espectrofotometria para os dois ensaios.

3.3.5. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

- Cepas microbianas

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram empregadas duas cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As cepas foram mantidas em caldo Mueller Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerol a -20° C, e, para o uso foram repicadas em CMH e incubadas a 37°C por 24 horas.

- Padronização dos inóculos bacterianos

As suspensões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH, adicionando-se PBS pH 7,2 estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006).

- Determinação da Concentração Inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) com modificações.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 μ L de CMH e em seguida foram acrescentados 100 μ L dos compostos avaliados (metronidazol não incorporado e incorporado na formulação) e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 μ g/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20 μ L das suspensões dos micro-organismos previamente padronizados em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi empregado o fármaco ampicilina (50 μ g/mL). Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle de esterilidade da solução do fármaco e o controle negativo (solventes e sistemas sem o fármaco). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

- Leituras

Foram realizadas leituras com o revelador resazurina (100 μ g/mL) do qual 30 μ L foram adicionados em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 horas a

presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). Como apresentado na Figura 5.

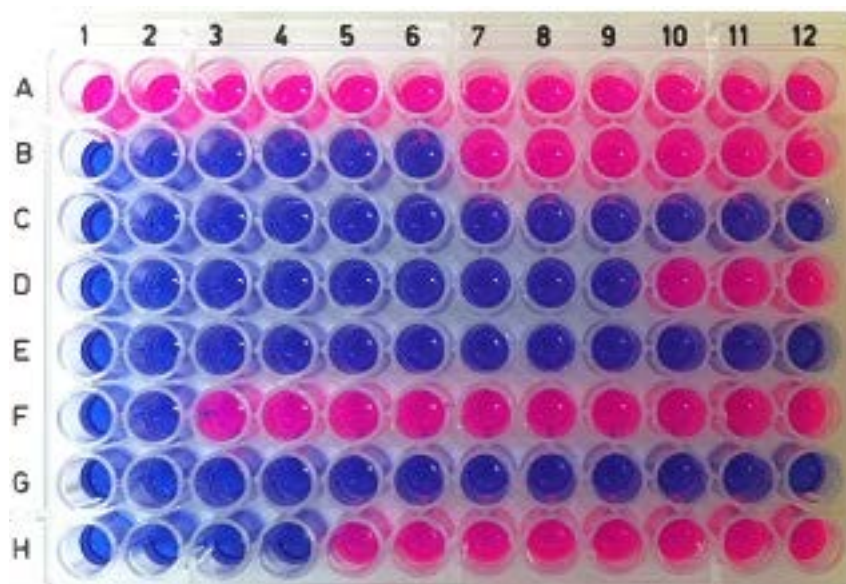


Figura 5. Ensaio de determinação da CIM por meio de diluição em microplacas revelada com solução de resazurina 0,01%

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o laboratório de microbiologia, com a grande ajuda da Prof. Dr. Taís Maria Bauab e do aluno Matheus Ramos.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PREPARO DAS FORMULAÇÕES

4.1.1. DIAGRAMA DE FASE TERNÁRIOS

Foram construídos 3 diagramas ilustrados nas Figuras 2, 3 e 4 utilizando 3 diferentes fases aquosas: água, dispersão de quitosana 5%, dispersão de polietilenoimina 5% e dispersão de quitosana 2,5% + polietilenoimina 2,5%, a fim de entender como estes se arranjarão na presença de ácido oleico como fase oleosa, e Procetyl® AWS como tensoativo sob pressão de 1 atm e temperatura ambiente.

Com a construção do diagrama de fases, foi possível caracterizar visualmente todas as formulações, obtendo-se os diagramas ilustrados nas Figuras 6, 7 e 8.

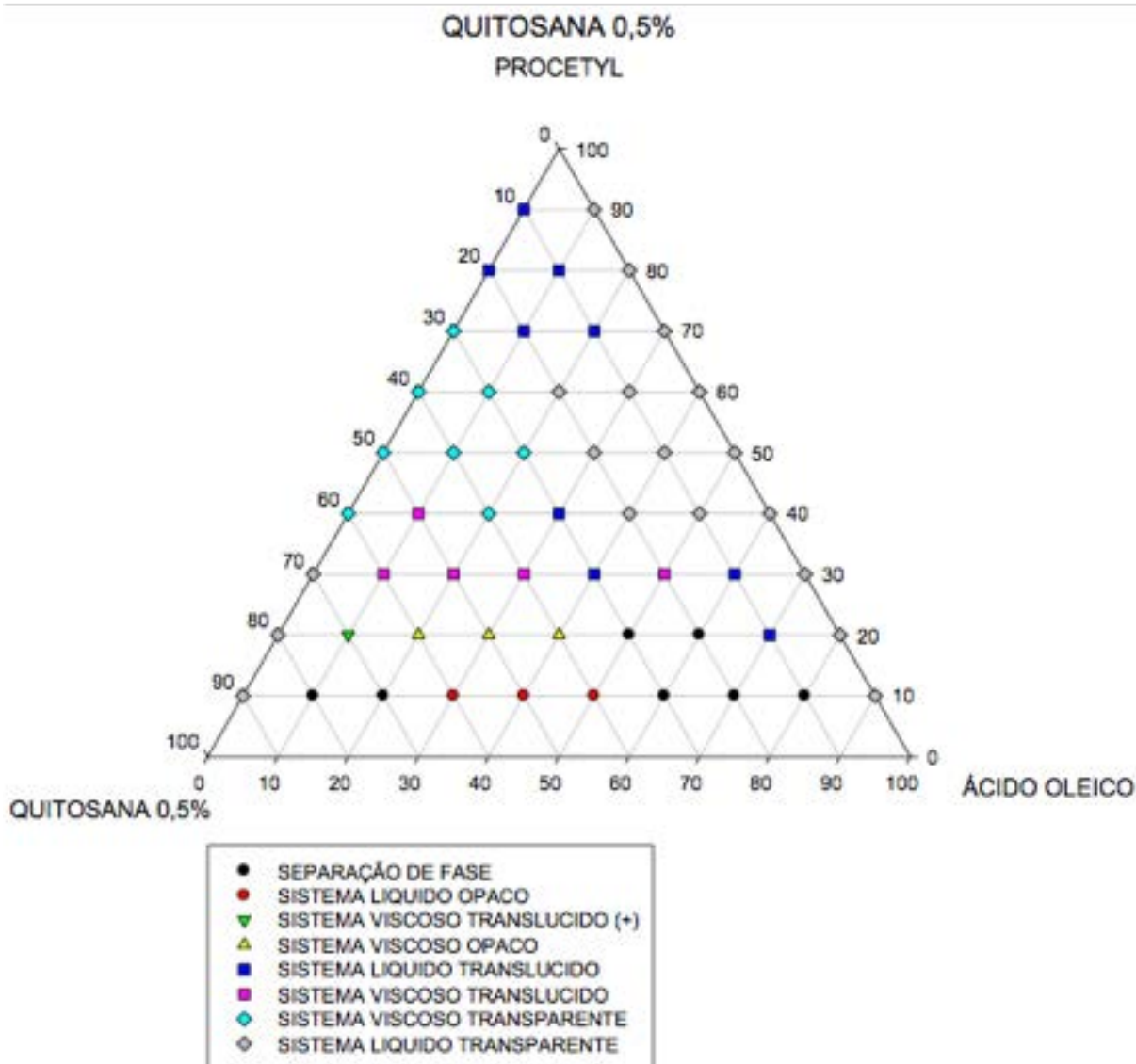


Figura 6. Diagrama de fases da formulação F1.

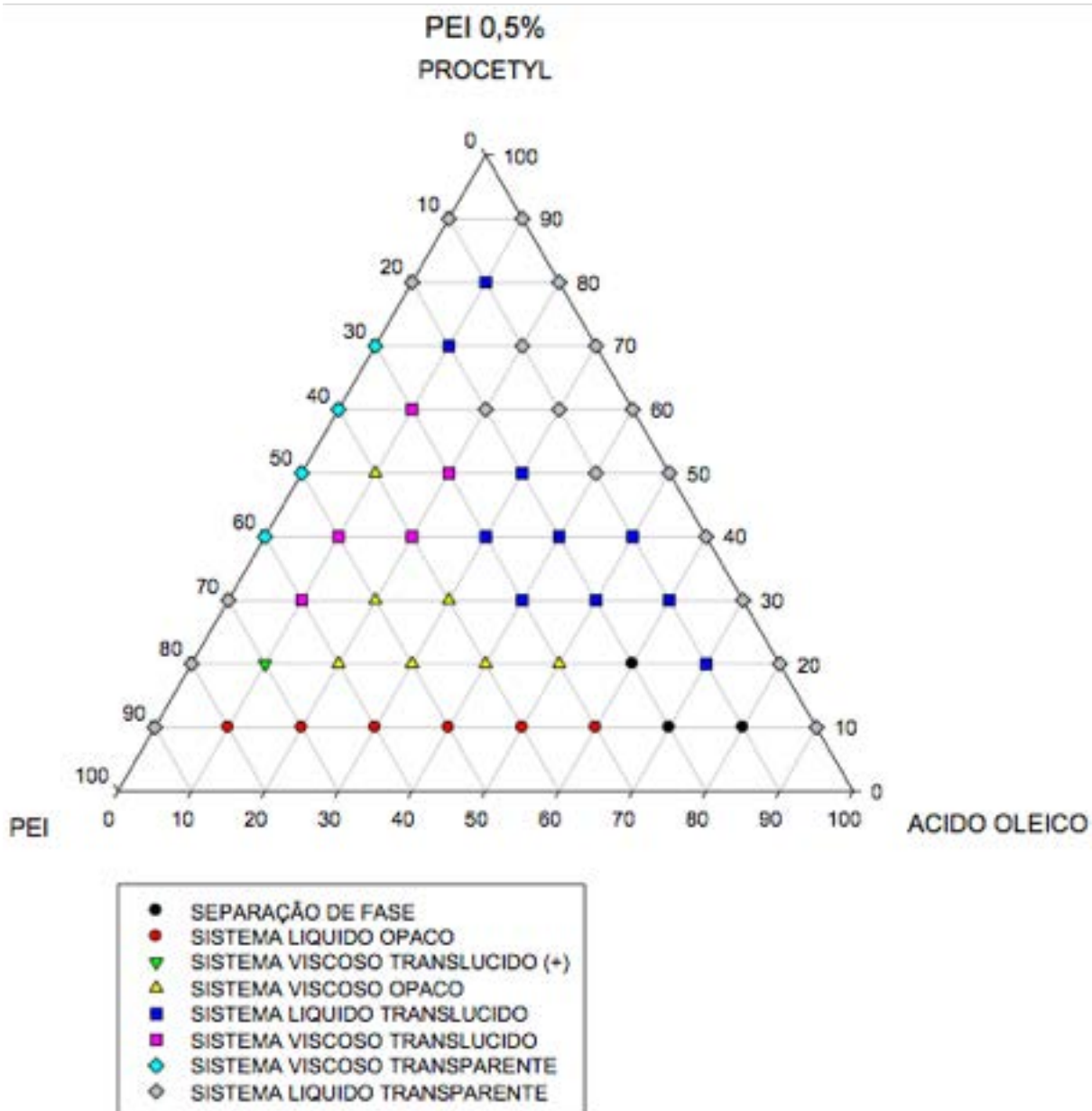


Figura 7. Diagrama de fases da formulação F2.

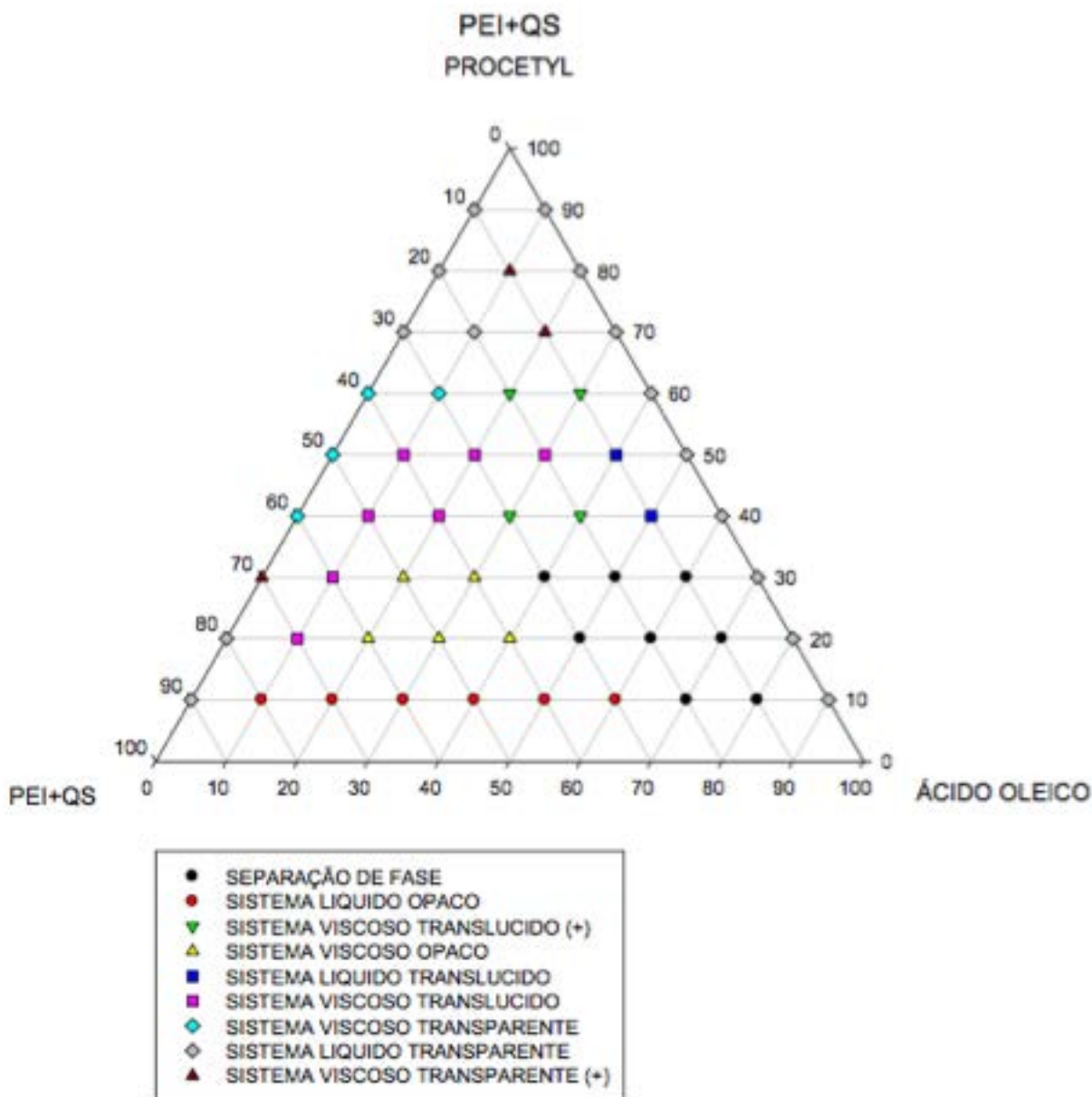


Figura 8. Diagrama de fases da formulação F3.

As formulações, que se apresentaram como sistema líquido opaco ou sistema viscoso opaco, foram descartadas da análise microscópica de luz polarizada, pois sua opacidade descaracteriza a presença de cristais líquidos. As formulações que apresentaram separação de fase também foram descartadas da análise microscópica de luz polarizada, pois representa instabilidade. Todos os demais

sistemas foram analisados. O tensoativo escolhido (Procetyl) possui uma extensa cadeia carbônica e caracteriza-se por ser um tensoativo não iônico. Esse tipo de tensoativo é ideal para aplicações farmacêuticas e formulações nanoestruturadas, pois é mais estável frente a mudanças de pH e força iônica, além de minimizar problemas de toxicidade (FORMARIZ, 2005; CRUZ, UCKUN, 2001).

Foi possível observar nos diagramas, que a partir de 40% de tensoativo houve uma estruturação da formulação o que indica uma possível formação de cristal líquido.

As formulações foram analisados por microscopia de luz polarizada (MLP) a procura de estruturas que caracterizassem cristais líquidos (anisotropia e isotropia).

4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Através da MLP, foi realizada uma análise estrutural das formulações e posterior confirmação de características de CLs. Os CLs foram identificados pela presença de estrias, característico da mesofase hexagonal, presença de cruz de malta, característico da mesofase lamelar e presença de campo escuro, característico da mesofase cúbica como mostrado nas Figuras 9, 10 e 11.

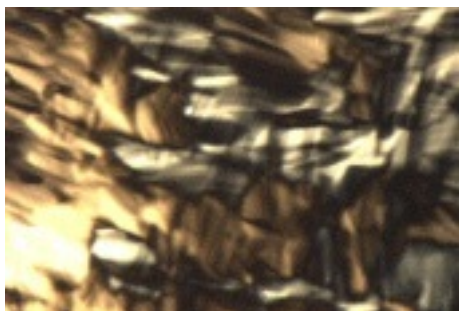


Figura 9. Fotomicrografia correspondente a MLP de CLs liotrópicos anisotrópicos de mesofase hexagonal que é caracterizada pela presença de estrias. Aumento focal: 40x.

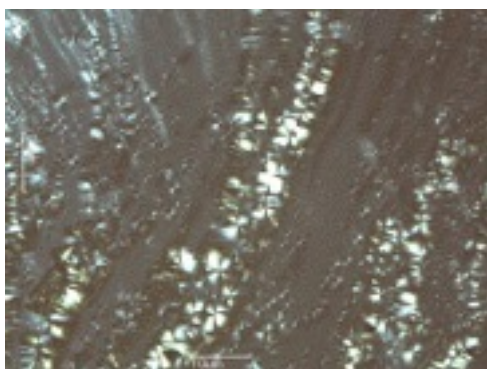


Figura 10. Fotomicrografia correspondente a MLP de CLs liotrópicos anisotrópicos de mesofase lamelar que é caracterizada pela presença de cruz de malta. Aumento focal: 40x.



Figura 11. Fotomicrografia correspondente a MLP de CLs liotrópicos anisotrópicos de mesofase cúbica que é caracterizada pela presença de campo escuro. Aumento focal: 40x.

As lâminas foram preparadas como descrito no 3.3.2.1, sendo obtido o diagrama de sistemas apresentados nas Figuras 12, 13 e 14.

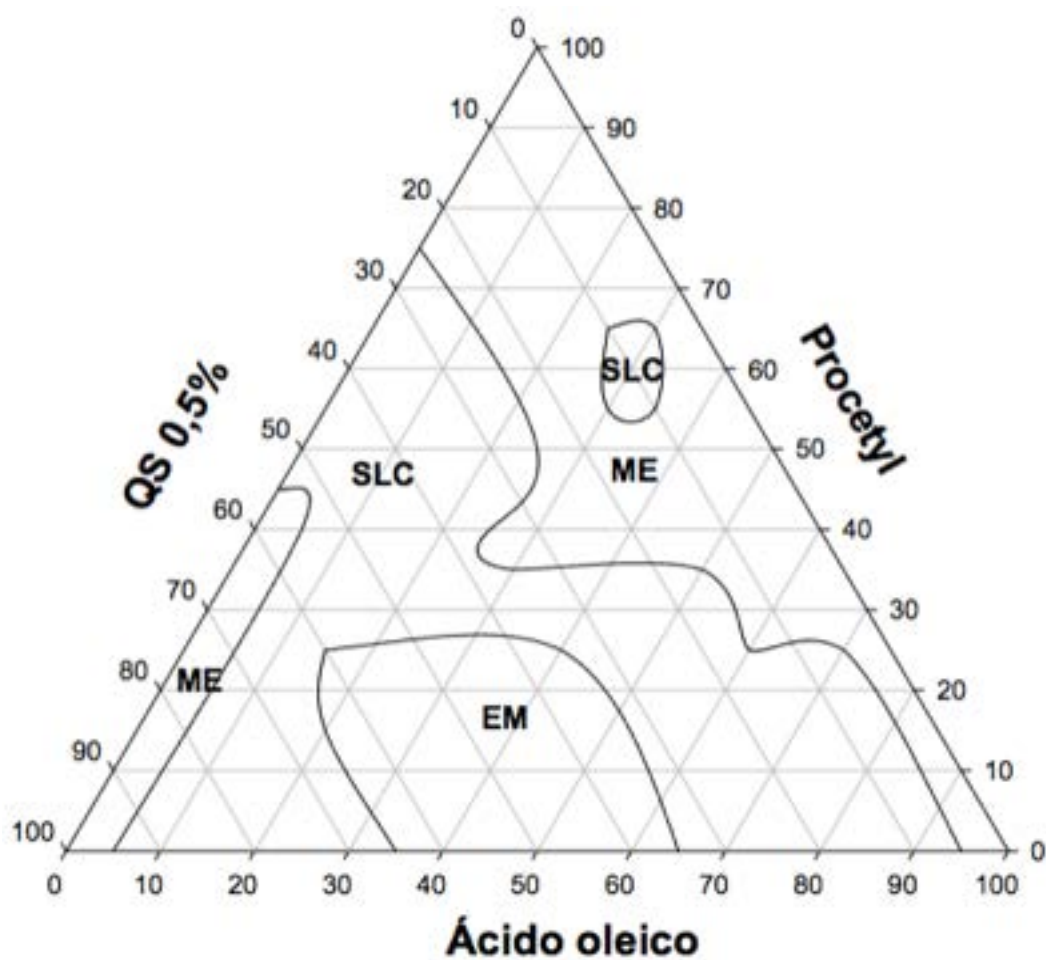


Figura 12. Diagrama de sistemas da formulação F1-F.

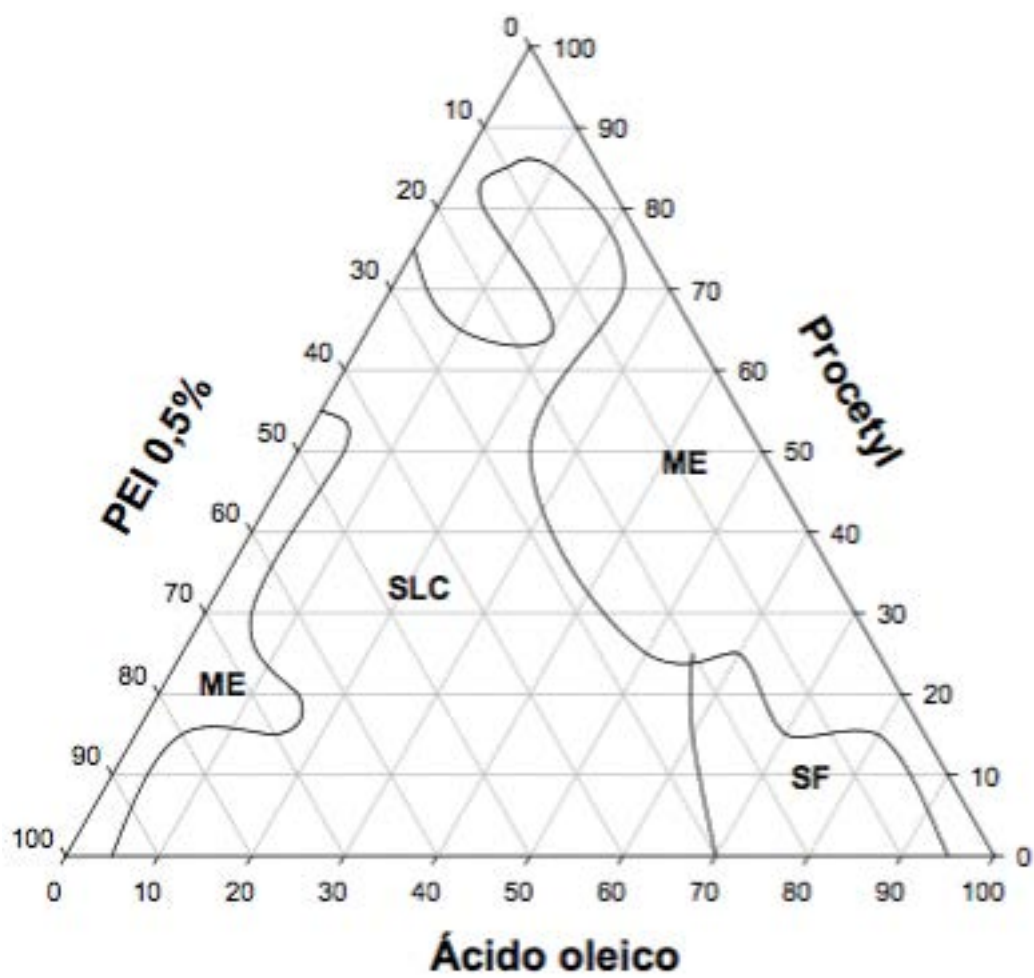


Figura 13. Diagrama de sistemas da formulação F2-F.

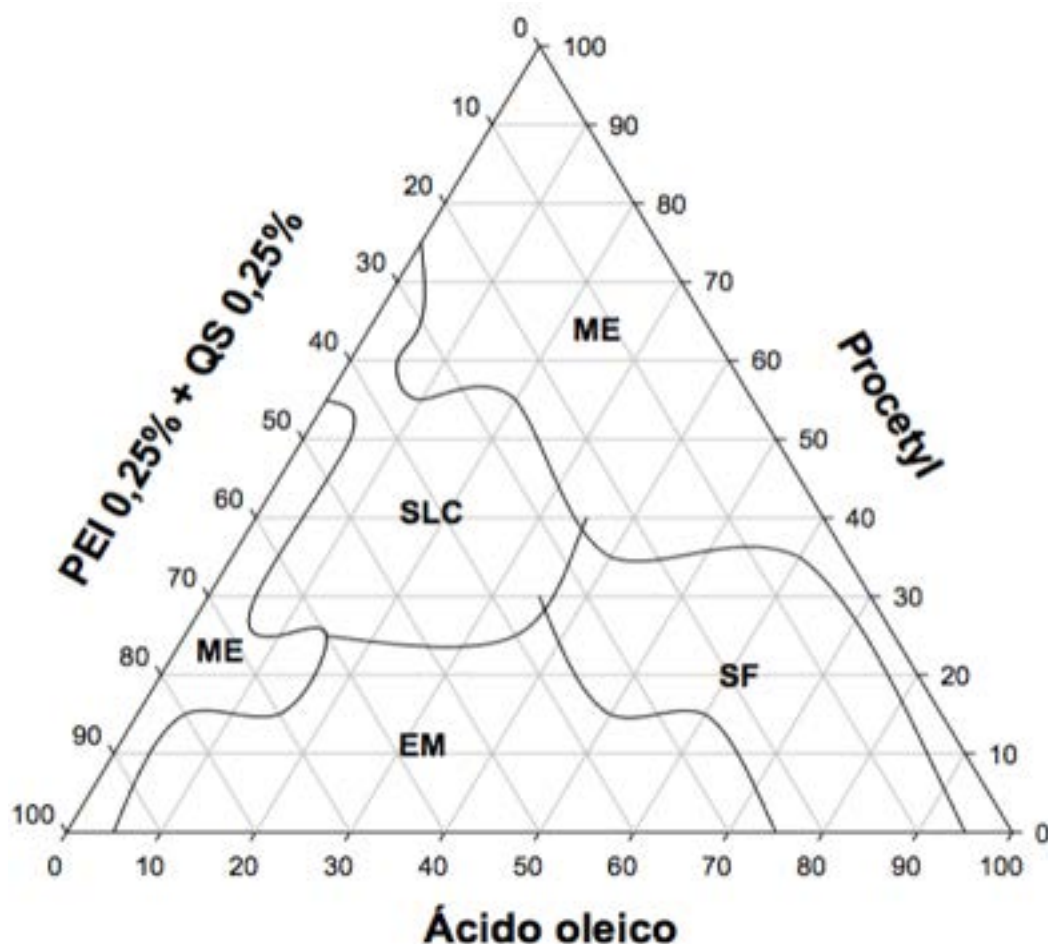


Figura 14. Diagrama de sistemas da formulação F3-F.

Através do diagrama de fases, selecionou-se formulações mais apropriadas para a incorporação do MTZ, as quais foram posteriormente submetidas a testes de caracterização físico-química, estabilidade e permeação cutânea *in vitro*.

Selecionou-se três formulações, as quais as concentrações dos componentes estão apresentadas na Tabela 1. As formulações contendo MTZ tiveram seu nome acrescido de um F (ex.: F1-F, F2-F, F3-F).

Tabela 1- Concentrações (%) dos componentes das formulações.

Amostras	Sistemas	Fase oleosa (%)	Tensoativo (%)	Fase aquosa (%)
F1	QS 5%	20	40	40
F2	PEI 5%	20	40	40
F3	QS + PEI 2,5%	20	40	40

4.2.2 COMPORTAMENTO REOLÓGICO

A reologia é um estudo que descreve as características de fluxo de sistemas líquidos, semi-sólidos e sólidos. Ela também pode ser definida como o estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria (AULTON, 2005; LAHOUD, 2009).

Sendo assim, o ensaio reológico se torna útil na avaliação de sistemas nanoestruturados, pois estes também são submetidos a tensões durante a aplicação dos mesmos na pele.

Avaliou-se o comportamento reológico das formulações, sem e com metronidazol, através do ensaio de escoamento utilizando-se reômetro com velocidade controlada – CR.

4.2.2.1 ANÁLISE REOLÓGICA CONTÍNUA

Foram obtidos diagramas que correlacionam tensão (τ) e taxa de cisalhamento (λ), também conhecidos como diagramas de curva de fluxo (SCHRAMM, 2006).

A seguir, seguem os diagramas nas Figuras 15 e 16:

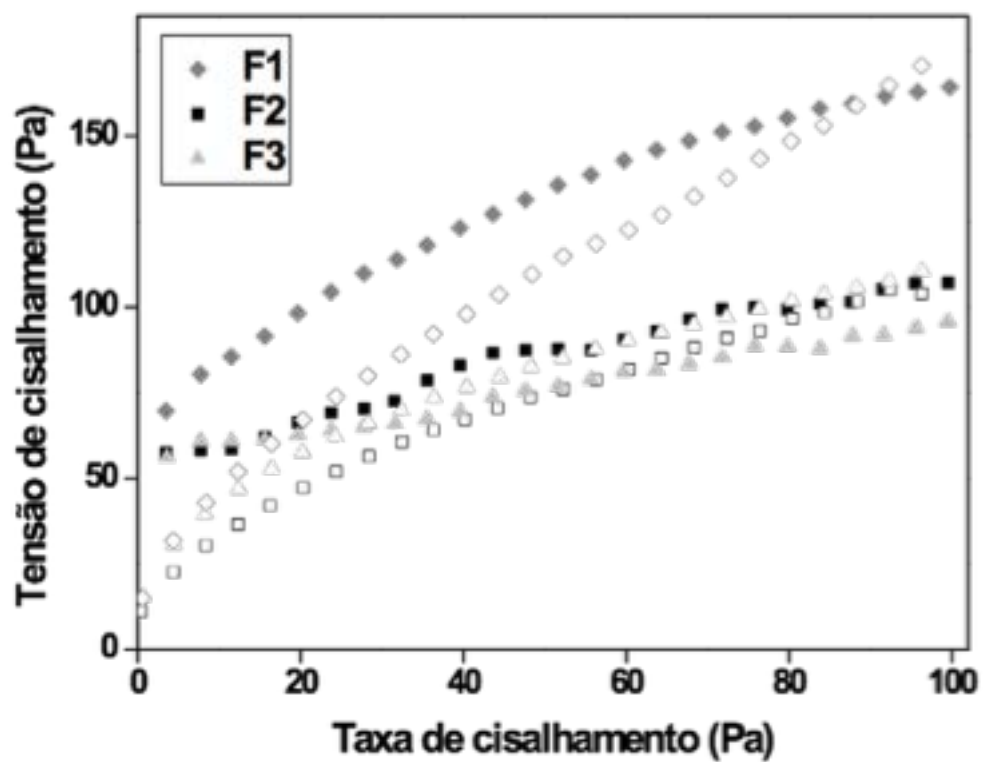


Figura 15. Reograma de fluxo das formulações sem fármaco. Símbolos fechados representam a curva de ida e símbolos abertos representam a curva de volta.

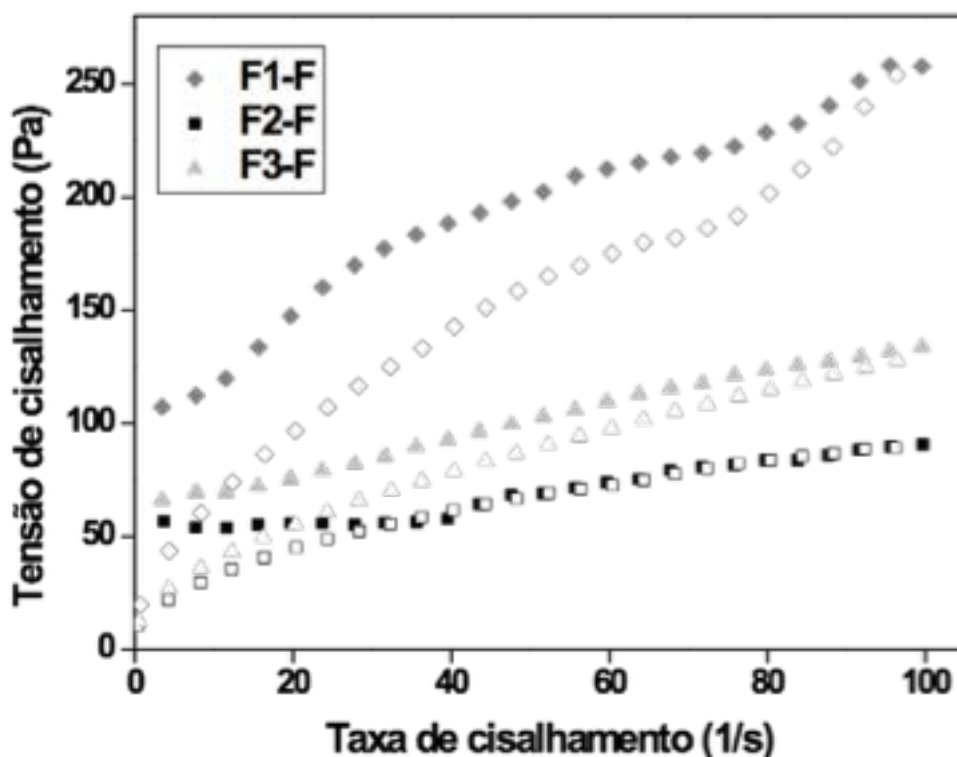


Figura 16. Reograma de fluxo das formulações com fármaco. Símbolos fechados representam a curva de ida e símbolos abertos representam a curva de volta.

Todas as amostras apresentavam comportamento não newtoniano, ou seja, não apresentavam linearidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento. A diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento que ocorreu nos sistemas estudados é uma característica de fluidos pseudoplásticos. (SCHRAMM, 2006). Além disso, há variáveis temporais da viscosidade. Sob uma tensão constante, a viscosidade pode se reduzir (fluidos tixotrópicos) ou aumentar (reopéticos). São ainda chamados viscoelásticos os fluidos que recuperam sua forma original, pelo menos parcialmente, depois de cessada a força a qual estavam submetidos. (HARLEY, 2003).

Os reogramas evidenciaram a presença de tixotropia nos sistemas, ou seja, a curva de volta (descendente), encontra-se desarticulada em um plano inferior à curva ascendente. (FORMARIZ, 2006). A tixotropia está associada a uma lenta recuperação do arranjo e consistência do sistema que fora perdida durante o cisalhamento.

Essa característica é importante para produtos de aplicação tópica, pois após a aplicação da tensão a formulação apresenta facilidade para fluir, levando a um bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na superfície cutânea, além disso permite o fácil escoamento do produto para o exterior do frasco. (CHORILLI, 2007).

Todos os reogramas apresentados indicam presença de tixotropia nesses sistemas, com perfil de reconstrução tempo dependente, ou seja, com área de histerese, a qual indica a energia necessária para desestruturar a estrutura tixotrópica (SCHRAMM, 2006).

De acordo com a equação $\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$, $n > 1$ representa um fluido dilatante, $n < 1$ representa um fluido pseudoplástico e $n = 1$ representa um fluido newtoniano. Além disso, o grau de “pseudoplasticidade” pode ser medido pelo comportamento de fluxo (n), que aumenta com a diminuição da pseudoplasticidade (FORMARIZ, 2008).

Já a viscosidade dinâmica das formulações pode ser avaliada com o índice de consistência (K) que aumenta com a viscosidade da formulação.

Os valores de n e k estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2- Índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) das formulações.

Formulações	Índice de fluxo (n)	Índice de consistência (k)
F1	0,300 ± 0,010	41,5 ± 1,16
F2	0,260 ± 0,010	32,2 ± 1,80
F3	0,200 ± 0,020	35,5 ± 2,28
F1-F	0,320 ± 0,001	59,8 ± 2,56
F2-F	0,240 ± 0,030	28,4 ± 3,18
F3-F	0,300 ± 0,020	32,8 ± 2,40

Em relação ao índice de fluxo pode-se constatar que todas as formulações apresentam um fluido pseudoplástico ($n < 1$). Em relação ao índice de consistência, a formulação F1-F apresenta o maior valor, apresentado uma maior viscosidade, seguida da F3-F e da F2-F.

A pseudoplasticidade é devido à estrutura líquido-cristalina, a qual causa maior resistência ao fluxo (CARVALHO, 2008). Essa propriedade é desejável para as formulações desenvolvidas para a administração cutânea, por exemplo, durante a aplicação, em altas taxas de cisalhamento, ocorrerá desentrelaçamento das cadeias poliméricas e, subsequente afinamento do fluxo, facilitando, assim, a administração da formulação. Contudo, ao se retirar essa tensão, a formulação recuperará sua viscosidade inicial, permanecendo por mais tempo na pele.

4.2.2.2 ANALÍSE REOLÓGICA OSCILATÓRIA

As Figuras 17 e 18 apresentam a dissipação de energia das formulações F1, F2, F3, F1-F, F2-F e F3-F.

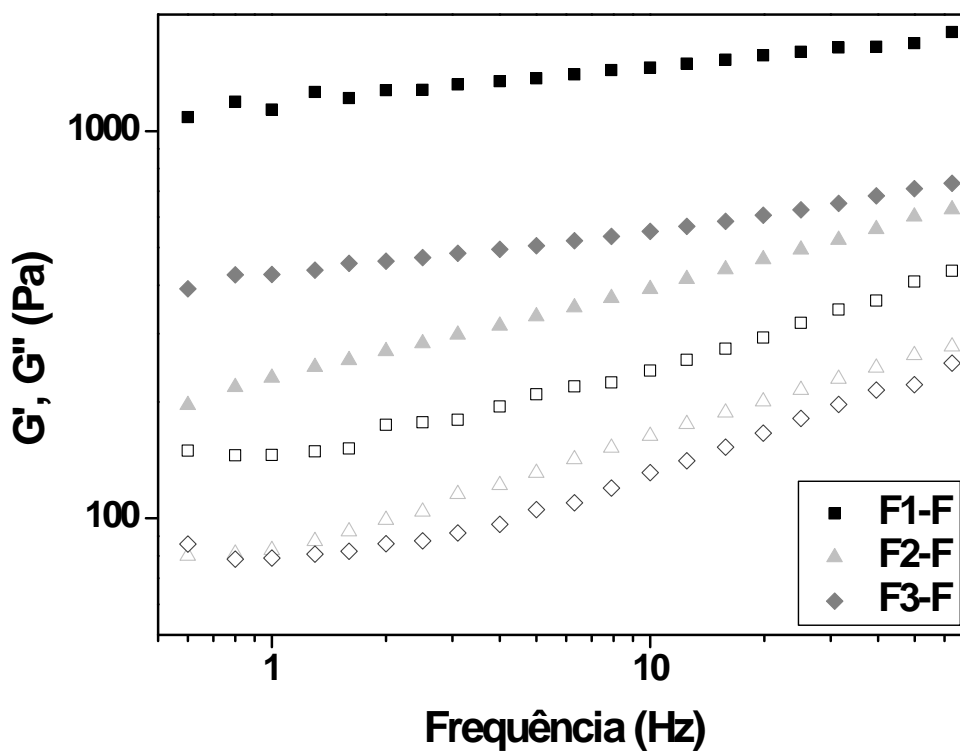


Figura 17. Variação do módulo de armazenamento G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência das formulações com fármaco.

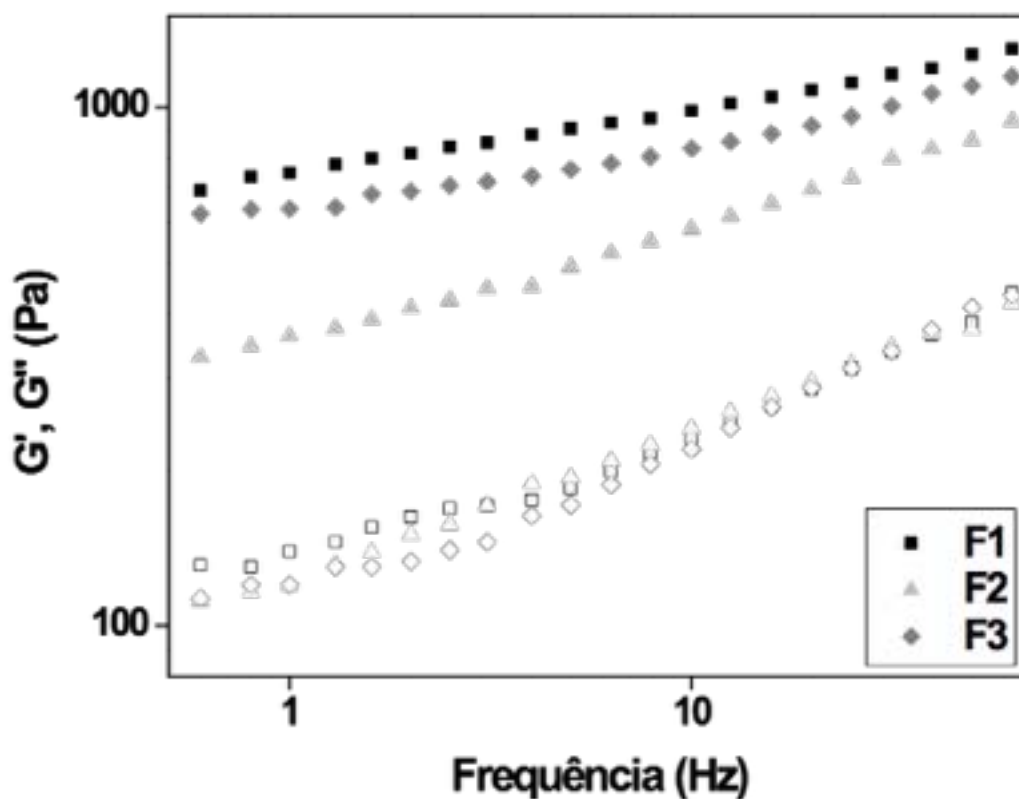


Figura 18. Variação do módulo de armazenamento G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência das formulações sem fármaco.

Todas as formulações apresentaram G' maior que G'' , indicando que as formulações são elásticas e portanto, apresentam características de sólido.

Segundo Saxena e colaboradores (2011), os parâmetros S e n são indicativos da densidade de reticulação no interior da amostra, sendo que quanto mais alto for o valor de S , mais reticulada e forte será a estrutura da amostra. Contrariamente, o valor de n diminui com o aumento da densidade de reticulação. Assim, valores de n altos indicam formulações com estruturas mais fracas.

Os valores de S e n estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3- Valores da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) para as formulações estudadas.

Formulações	Resistência do gel (S)	Expoente viscoelástico (n)
F1	739,47 ± 4,49	0,130 ± 0,0023
F2	344,19 ± 4,32	0,236 ± 0,0040
F3	621,01 ± 7,98	0,139 ± 0,0047
F1- F	1175,8 ± 8,67	0,096 ± 0,0028
F2- F	224,7 ± 1,45	0,246 ± 0,0022
F3- F	418,0 ± 3,60	0,129 ± 0,0032

Analisando os dados da Tabela 3, nota-se que as formulações F1-F apresenta valor de S maior, o que significada que a estrutura da formulação é mais reticulada e forte, seguida de F3-F e F2-F. Evidenciando, mais uma vez, que a adição de quitosana 5% na fase aquosa contribui para a formação de sistemas mais organizados, o que está em concordância com os indicativos dos gráficos de G' e G''.

4.2.3. ESTUDO DE BIOADESÃO

A Tabela 4 apresenta os valores do ensaio de bioadesão in vitro das formulações com e sem Metronidazol, utilizando pele de orelha de porco.

Tabela 4- Trabalho da força bioadesiva das formulações QS, PEI, QS + PEI. Os valores representam a média \pm desvio padrão, à temperatura de 25°C.

Sistemas	Trabalho da força Bioadesiva (mN.s)
F1	0,0328 \pm 0,0037
F2	0,0434 \pm 0,0127
F3	0,0464 \pm 0,0273
F1-F	0,0303 \pm 0,0141
F2-F	0,0435 \pm 0,0095
F3-F	0,0421 \pm 0,0054

Foi possível observar que os três polímeros contribuem similarmente para a viscosidade do cristal líquido e que a incorporação não alterou a força bioadesiva das formulações.

4.2.4. ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA)

A partir do resultado de força por tempo e força por distância foi possível calcular a dureza (força necessária para chegar a uma dada deformação), compressão (trabalho necessário para deformar o produto durante a compressão), adesividade (trabalho necessário para superar a forças de atração entre as

superfícies da amostra e sonda) e coesão (força que liga as moléculas). Usando esta técnica, foi possível realizar uma avaliação prévia da capacidade do material adesivo, evidenciando as propriedades de mucoadesão (BRUSCHI, 2006).

A Tabela 5 apresenta os parâmetros obtidos na análise do perfil de textura (dureza, compressibilidade, adesividade e coesão) para os cristais líquidos com diferentes polímeros.

Tabela 5- Propriedades mecânicas das formulações F1, F2, F3, F1-F, F2-F e F3-F determinadas através da análise de perfil de textura. Cada valor representa a média \pm desvio padrão, à temperatura de 25°C.

Sistemas	Dureza (mN)	Compressibilidade (mN.s)	Adesividade (mN.s)	Coesão
F1	0,07 \pm 0,01	0,44 \pm 0,07	0,002 \pm 0,00	0,6575 \pm 0,0341
F2	0,06 \pm 0,00	0,36 \pm 0,03	0,001 \pm 0,00	0,6626 \pm 0,0398
F3	0,04 \pm 0,00	0,27 \pm 0,04	0,001 \pm 0,00	0,6556 \pm 0,0294
F1-F	0,06 \pm 0,02	0,43 \pm 0,13	0,002 \pm 0,00	0,7146 \pm 0,0182
F2-F	0,04 \pm 0,01	0,31 \pm 0,07	0,18 \pm 0,03	0,6960 \pm 0,0434
F3-F	0,05 \pm 0,09	0,31 \pm 0,04	0,19 \pm 0,02	0,6676 \pm 0,0216

De acordo com a Tabela 5, observa-se que as formulações F1 e F1-F tem valores de dureza, trabalho de compressão superior as demais, revelando que as moléculas de quitosana são mais fortemente ligadas, necessitando de força maior para chegar a uma dada deformação. Além disso pode-se observar que a

incorporação do metronidazol nas formulações F2 e F3 modificou consideravelmente a adesividade.

4.3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE MTZ

4.3.1 DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO DE MTZ NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

A Figura 19 ilustra a varredura de espectro de MTZ, o que pode observar que o MTZ tem uma maior absorção no comprimento de onda igual a 320 nm.

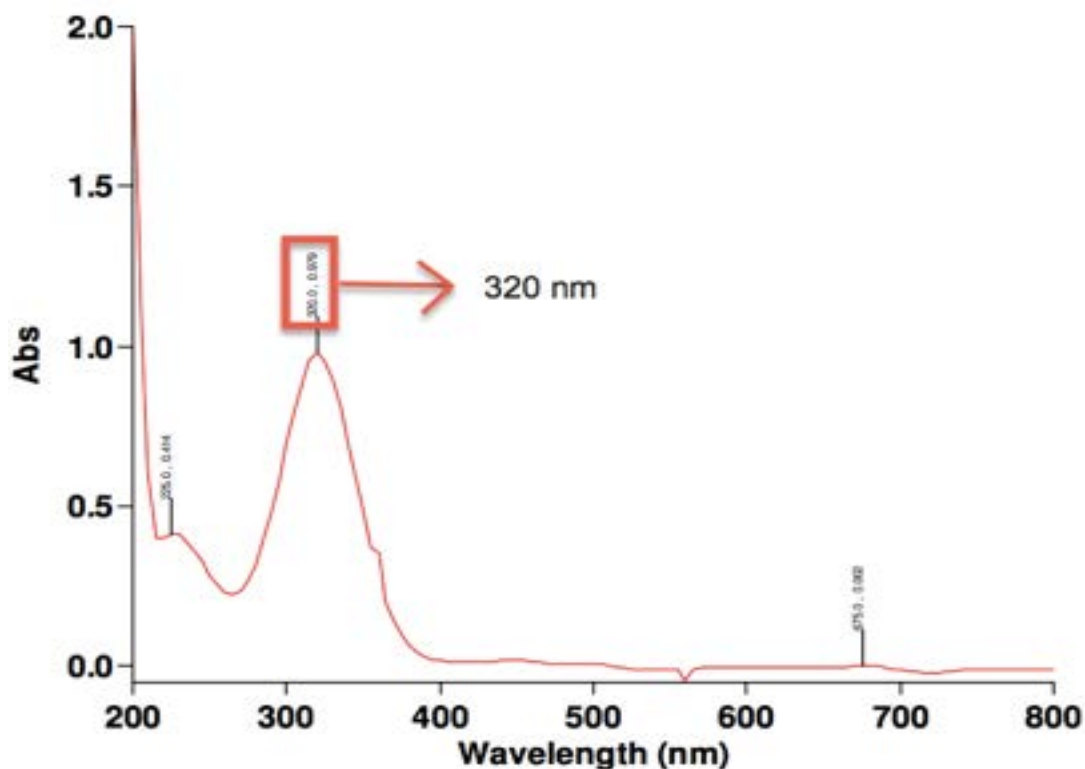


Figura 19. varredura de espectro de MTZ.

4.3.2 CURVA ANALÍTICA DO MTZ EM TAMPÃO FOSFATO E METANOL

A curva analítica do MTZ em uma solução tampão fosfato foi realizada para analisar os resultados de liberação do MTZ das formulações e permeação da pele, já que a solução tampão fosfato foi utilizada como solução receptora.

- Linearidade

A curva analítica foi realizada nas concentrações de 5 a 30 µg de MTZ /mL de solução tampão, que é um solvente em que o MTZ é solúvel. Empregou-se a concentração máxima de 30 ug/mL, pois nessa concentração a absorvância foi próxima de 1, que é o máximo de absorvância indicada pelo fornecedor do equipamento, em que há precisão e exatidão de medida.

A Tabela 6 mostra os valores de absorvância para cada concentração definida.

Tabela 6- Resultados de absorvância no comprimento de onda de 320 nm para cada concentração analisada e coeficientes de correlação.

Concentração (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3
5	0,2423	0,2404	0,2618
10	0,4881	0,5214	0,5139
15	0,7307	0,7579	0,7652
20	0,9962	1,0622	1,0359
30	1,4524	1,4964	1,5194
	r = 0,9994	r = 0,9966	r = 0,9997
Média de r ± dp = 0,9985 ± 0,00170			

- Precisão

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos da repetibilidade do método, a qual foi verificada através da análise de 3 concentrações (5, 15 e 30 µg/mL) em triplicata (n=3) de cada concentração no em 2 dias diferentes, sendo em triplicata em apenas um deles.

Tabela 7- Resultados da avaliação da precisão intra-dia ou reprodutibilidade.

Concentração teórica	1° Dia		
	5 µg/mL	15 µg/mL	30 µg/mL
N=1	0,2423	0,7307	1,4524
N=2	0,2404	0,7579	1,4964
N=3	0,2618	0,7652	1,5194
Média	0,2482	0,7513	1,4894
Desvio Padrão	0,0118	0,0181	0,0340
DPR	4,7729	2,4200	2,2857

2° Dia		
5 µg/mL	15 µg/mL	30 µg/mL
0,2574	0,7901	1,5548

Na Tabela 8 está apresentado o resultado de precisão intermediária.

Tabela 8- Resultados da avaliação da precisão inter-dia ou intermediária.

Concentração teórica	5 µg/mL	15 µg/mL	30 µg/mL
1° dia	0,2482	0,7513	1,4894
2° dia	0,2574	0,7901	1,5548
Média	0,2528	0,7707	1,5221
Desvio Padrão	0,0065	0,0274	0,0462
DPR	2,5733	3,5598	3,0382

O desvio padrão relativo (DPR) obtido na avaliação da precisão intra-dia e intermediária do método é adequado, podendo atribuir ao método analítico alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo (ANVISA, 2003).

- Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os valores calculados para o limite de detecção e de quantificação demonstram alta sensibilidade e especificidade do método para a determinação de MTZ. Foram encontrados 0,4413 µg/mL para o limite de detecção e 1,4711 µg/mL para o limite de quantificação (Tabela 9).

Tabela 9- Resultados do limite de detecção e de quantificação de MTZ.

	Equação da reta	a (inclinação)	b (intercepto)
1º dia	$y = 0,0499x + 0,0078$	0,0499	0,0078
2º dia	$y = 0,052x - 0,0028$	0,052	-0,0028
	média	0,05095	0,0025
	DP	0,0014	0,0074
LD	0,4413 µg/mL		
LQ	1,4711 µg/mL		

- Exatidão

Para o ensaio de exatidão é necessário conhecer o valor de absorvância real calculado a partir da equação da reta, que utiliza a média dos valores de “a” e “b” obtidos a partir das curvas do ensaio de precisão intermediária, a qual está descrita abaixo (equação 6).

$$y = 0,05095 x + 0,0025 \text{ (equação 6)}$$

Na tabela 10 está apresentado o resultado de exatidão

Tabela 10. Resultado de exatidão.

Concentração teórica	5 µg/mL	15 µg/mL	30 µg/mL
Absorbância média (obtida no teste de precisão intermediária)	0,2528	0,7707	1,5221
Concentração real	4,9126 µg/mL	15,0775 µg/mL	29,8253 µg/mL
Exatidão	98,2531	100,5168	99,4177

A exatidão obtida foi adequada, estando entre a faixa de 95 a 105% (ANVISA, 2003), podendo atribuir ao método analítico alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo.

A curva analítica em tampão de fosfato é ilustrada na Figura 20. A curva analítica do MTZ em metanol foi realizada para analisar a retenção cutânea da droga já que o MTZ pode ser extraído dos tecidos com metanol, a equação da reta esta descrita a abaixo (equação 7).

$$y = 0,0473 x - 0,0092 \text{ (equação 7)}$$

A curva analítica em metanol é ilustrado na Figura 21.

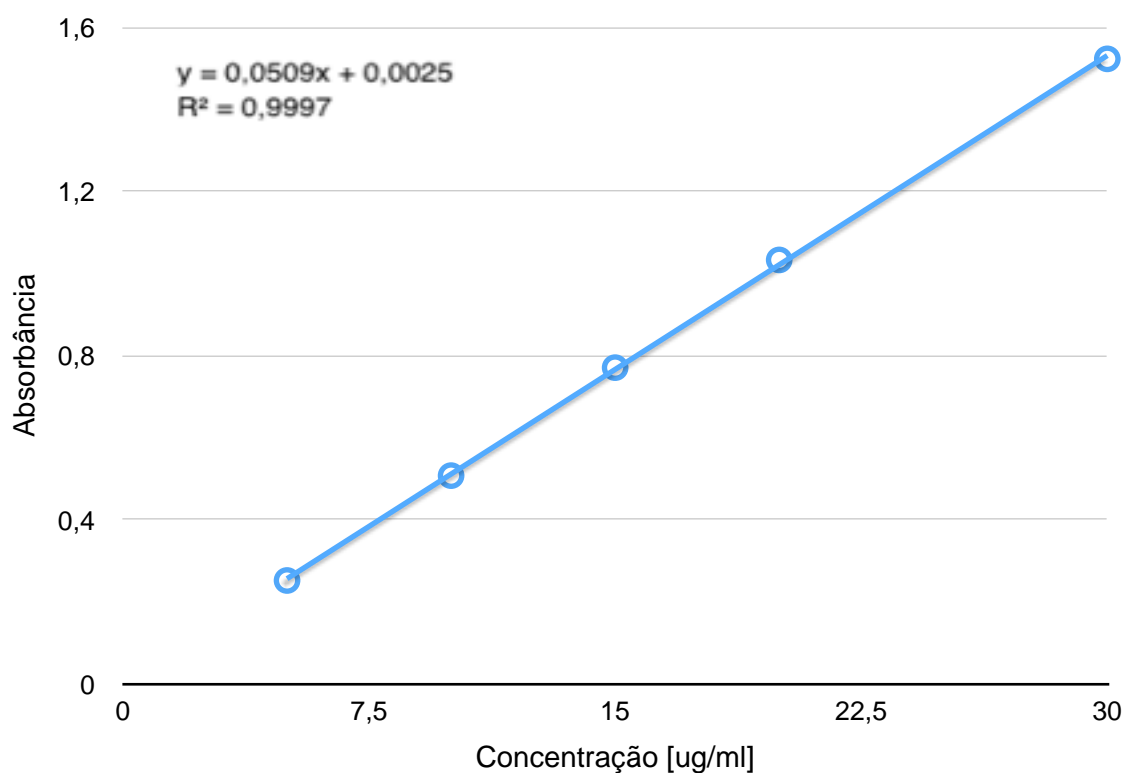


Figura 20. Curva analítica para MTZ em tampão fosfato.

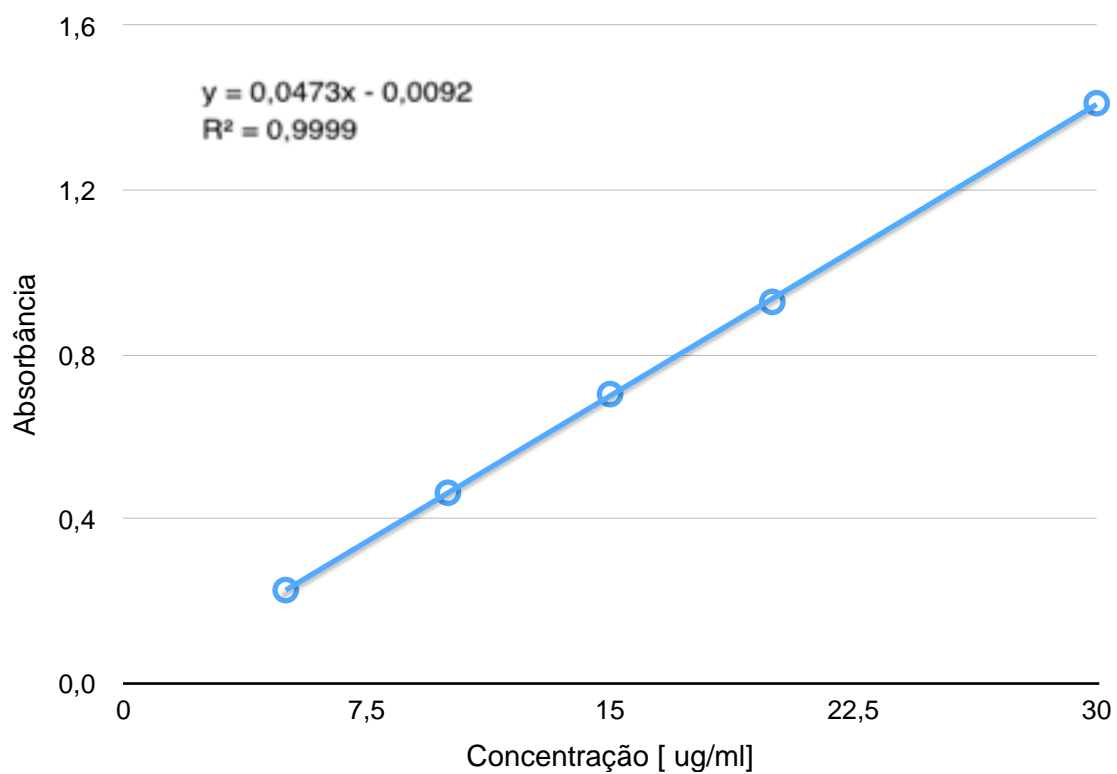


Figura 21. Curva analítica para MTZ em metanol.

4.4. ENSAIO DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO *IN VITRO*

4.4.1. ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os testes de liberação *in vitro* foram realizados nas formulações F1-F, F2-F e F3-F contendo 0,5 % de MTZ e em solução. O intuito deste experimento foi de avaliar o perfil de liberação do MTZ a partir das formulações e livre através de membrana sintética de acetato de celulose 0,45 μm e pele de orelha de porco.

A Figura 22 representa a liberação do Metronidazol das formulações e em solução.

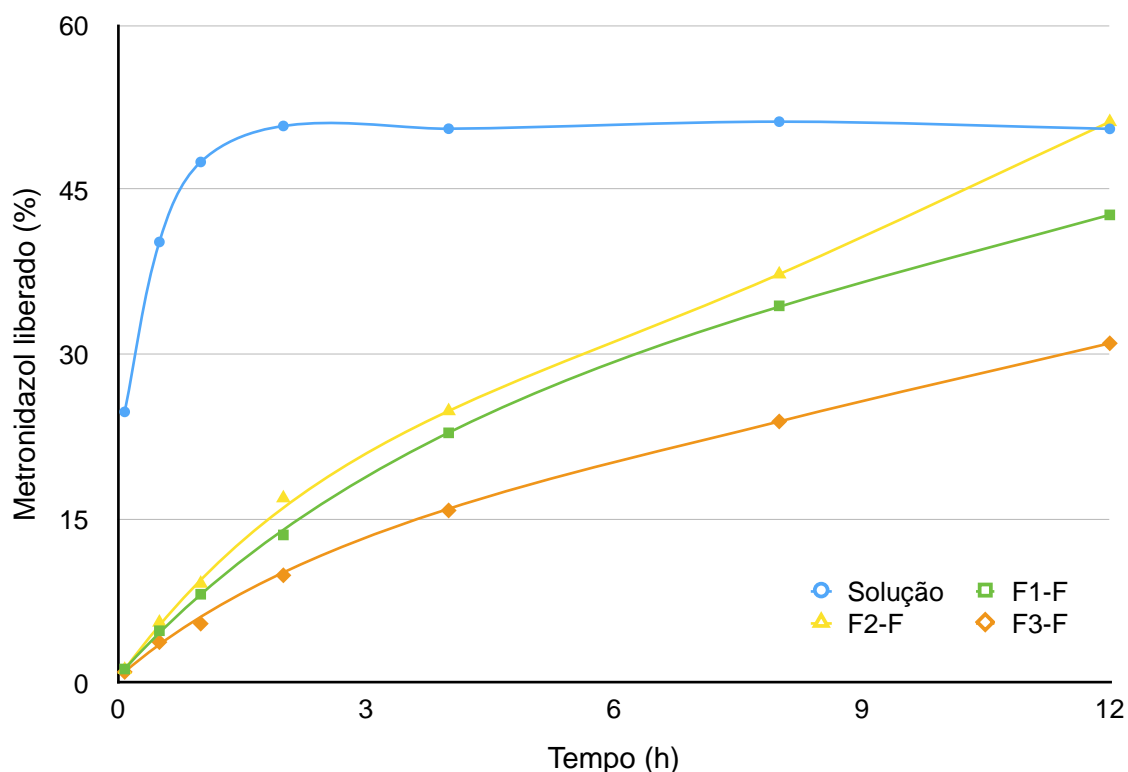


Figura 22. Perfil de liberação *in vitro* (%), com membrana sintética de acetato de celulose 0,45 μm , de MTZ incorporada nas formulações F1-F, F2-F e F3-F e solução contendo MTZ 0,5 %.

A liberação de Metronidazol em solução foi crescente em até 2 horas e depois permaneceu em equilíbrio. Já nos sistemas F1-F, F2-F e F3-F, a liberação de

Metronidazol foi crescente até as 12 horas. O sistema que obteve a maior porcentagem de metronidazol liberada foi o sistema F2-F com 51,2% de liberação máxima. A seguir, foi o sistema F1-F com 42,7% e por fim, F3-F com 31,0%. O experimento acima sugere que todas as formulações (F1-F, F2-F e F3-F) podem auxiliar na liberação controlada de metronidazol, visto que as formulações liberaram o fármaco até 12 horas após a aplicação.

4.4.2. ENSAIO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO *IN VITRO*

Os experimentos de permeação e retenção são válidos para estimar as interações que a formulação constitui com a pele, mostrando como se dará a difusão do fármaco nas diferentes camadas da pele, se o fármaco ficará retido ou não no estrato córneo (camada mais externa da pele) e se o fármaco atingirá camadas mais profundas desse órgão.

A Figura 23 representa a permeação do MTZ incorporado nas formulações e em solução

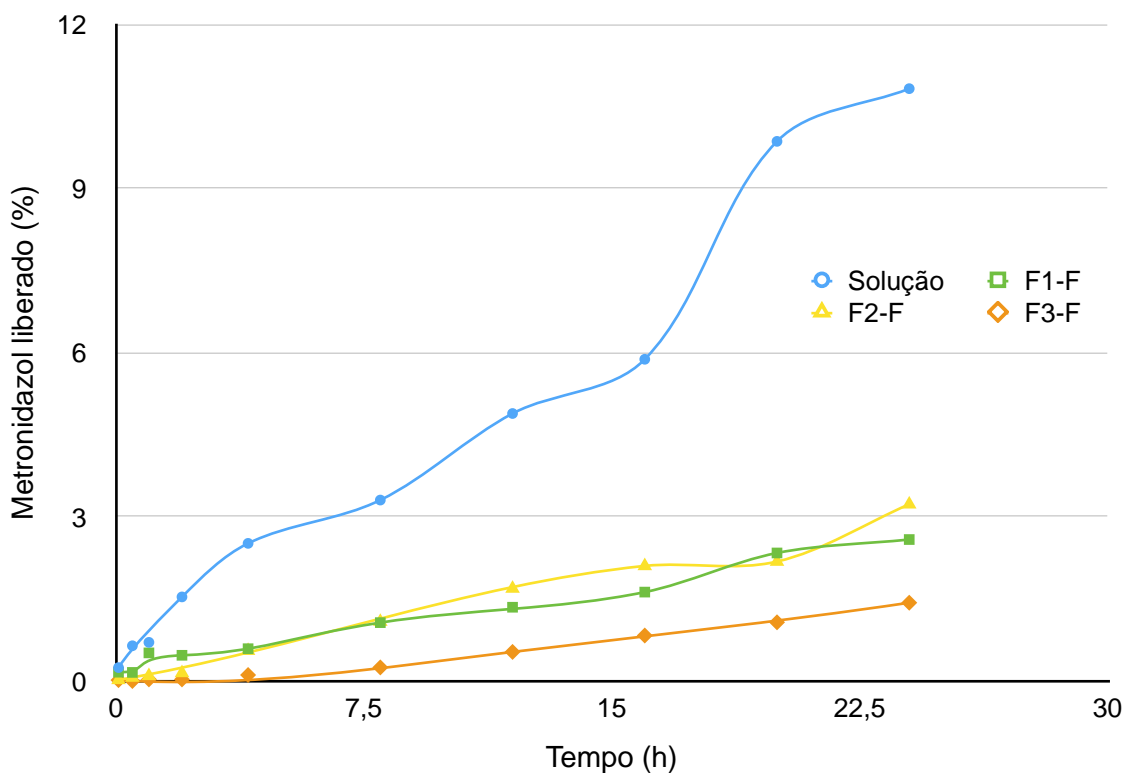


Figura 23. Perfil de permeação in vitro (%), com pela de orelha de porco, de MTZ incorporada nas formulações F1-F, F2-F e F3-F e solução contendo MTZ 0,5 %.

A permeação do Metronidazol em solução e nos sistemas F1-F, F2-F e F3-F foi crescente até as 24 horas. O sistema que obteve a maior porcentagem de metronidazol permeado foi o sistema F2-F com 3,2% de permeação máxima. A seguir, foi o sistema F1-F com 2,5% e por fim, F3-F com 1,4%.

A Tabela 11 apresenta a quantidade de fármaco ($\mu\text{g/ml}$) que ficou retida no estrato córneo e na epiderme + derme.

Tabela 11- Comparação da retenção no EC e na E + D do metronidazol entre as amostras.

Sistemas	Retenção EC [µg/ml]	Retenção E + D [µg/ml]
F1-F	9,74	3,37
F2-F	7,05	3,30
F3-F	14,98	3,34
Solução	1,42	4,97

Os estudos de retenção mostraram que o metronidazol ficou mais retido no estrato córneo do que na epiderme + derme. As formulações F1-F, F2-F e F3-F, retiveram a mesma quantidade de fármaco retidos na epiderme + derme. A formulação F3-F reteve uma maior quantidade de fármaco no estrato córneo, seguido da formulação F1-F e por fim a formulação F2-F. Com isso podemos concluir que todas as formulações são adequadas para a utilização via tópica, onde se deseja um efeito local do fármaco, como o metronidazol.

4.5 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

O CIM do metronidazol foi 1000 ug/ml para as cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

De acordo com as Tabelas 12 e 13 foi possível observar que em relação a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) apenas F1-F e F3-F foram ativas contra *S. aureus*. A incorporação do fármaco nestes dois sistemas

potencializou sua atividade antibacteriana, já em F2-F a ação foi retardada. Todas as amostras foram ativas contra *E. coli*. A incorporação do fármaco nos sistemas F1-F e F3-F potencializou sua atividade antibacteriana, já em F2-F a ação manteve-se a mesma.

Nenhuma das formulações ISENTA de fármaco apresentou atividade antibacteriana.

Tabela 12- Ativação contra *S. aureus* das formulações F1-F, F2-F e F3-F. Cepa utilizada: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Sistemas	CIM em ug/mL
F1	> 1000
F2	> 1000
F3	> 1000
F1-F	125
F2-F	> 1000
F3-F	250

Tabela 13- Ativação contra *E. coli* das formulações F1-F, F2-F e F3-F. Cepa utilizada: *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Sistemas	CIM em ug/mL
F1	> 1000
F2	> 1000
F3	> 1000
F1-F	250
F2-F	1000
F3-F	500

5. CONCLUSÃO

O diagrama de fases é um excelente instrumento para analisar estruturalmente as diversas formulações geradas a partir das diferentes concentrações de tensoativo, fase oleosa e fase aquosa, bem como os diferentes perfis de liberação de fármaco.

A microscopia de luz polarizada foi imprescindível para caracterizar os sistemas formados, sugerindo que as formulações F1-F, F2-F e F3-F, pela anisotropia e presença de “estrias”, “cruz de malta e campo escuro, fossem cristais líquidos de fase hexagonal.

Os estudos reológicos caracterizaram que as formulações possuem perfil tixotrópico e essa é uma importante característica para formulações tópicas, pois com a tensão de cisalhamento exercida durante a aplicação do produto, a formulação fica menos viscosa, facilitando a aplicação e quando a tensão é retirada, a formulação recupera gradativamente a consistência, aderindo assim na pele. Também foi possível concluir que o polímero quitosana contribui para a formação de uma rede estrutural mais forte, facilitando a sua incorporação no sistema.

O estudo de bioadesão demonstrou que as três formulações apresentam bioadesividade semelhante.

Na análise do perfil de textura (TPA) foi possível verificar que as formulações com quitosana 5% apresentam valores de dureza, trabalho de compressão superior as demais, revelando que as moléculas de quitosana são mais fortemente ligadas, necessitando de força maior para chegar a uma dada deformação.

Os ensaios de liberação mostraram que as formulações F1-F, F2-F e F3-F liberam respectivamente 42,7%, 51,2% e 31,0% do fármaco, o que sugere que todas as formulações (F1-F, F2-F e F3-F) podem auxiliar na liberação controlada de metronidazol. A formulação F2-F liberou estatisticamente maior quantidade de fármaco, o que sugere que o sistema composto por polietilenoimina facilita a liberação do MTZ.

Os ensaios de permeação indicaram que as formulações F1-F, F2-F e F3-F permitiram a permeação do fármaco respectivamente em 2,5%, 3,2% e 1,4%, o que sugere que todas as formulações (F1-F, F2-F e F3-F) podem contribuir para a liberação controlada de metronidazol. A formulação F2-F permitiu uma permeação estatisticamente maior de quantidade de fármaco, o que sugere que o sistema composto por polietilenoimina facilita a permeação do MTZ.

Todas as formulações estudadas apresentaram retenção de MTZ no estrato córneo em maior quantidade e na epiderme + derme em menor quantidade, demonstrando que estas são potenciais formulações a serem utilizadas via tópica, pois permitiram a retenção local do fármaco, minimizando eventuais efeitos adversos e a permeação do MTZ para camadas mais profundas.

O ensaio microbiológico demonstrou que a formulação F1-F e F3-F foram ativas contra *S. aureus* e que a atividade bacteriana foi diminuída na formulação F2-F. Além disso, foi possível observar que todas as formulações foram ativas contra *E. coli*.

A escolha da formulação ideal vai depender do objetivo desejado. Todas as formulações apresentam estruturas bem organizadas mas a mais bem estruturada é a F1-F. A formulação que apresenta maior permeação é a F2-F, já a que apresenta a

maior porcentagem de fármaco retido no estrato córneo é a F3-F. Em relação a atividade bacteriana a formulação que mais potencializou a ação do metronidazol contra *S. aureus* e *E. coli* foi a F1-F.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. *Cosmetics & Toiletries* (ed. Port.), v.15, n. 3, p. 96-100, 2003.

ARONSON, H. Correction factor for dissolution profile calculations. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 82, n. 11, 1993.

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

BERTH-JONES J., THOMPSON J., PAPP K. A study examining inter- and intra-rater reliability of a novel instrument for assessment of psoriasis: The Copenhagen psoriasis severity index (CoPSI). *Br J Dermatol* 2008; 159: 407–12.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília, 2003.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J-T., COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens form liquid crystalline phases. *J. Control. Rel.*, Arlington, v.60, p.67-76, 1999.

BRUSCHI, M.L., et al. Semisolids systems containing própolis for the treatment of periodontal disease: In Vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. *J. Phram. Sci.*, v. 96, p. 2074 – 2089, 2007.

CALIXTO, G. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. *Pharmaceutical Development and Technology*, p. 1-7, 2014.

CHORILLI, M. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. *Química nova*, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6^a ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CONSTANTINIDES, P.P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm. Res.*, Arlington, v. 12, p.1561-1572, 1995.

CRUZ, D'J.O.; UCKUN, M.F. Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. *Contraception*, Stoneham, v. 64, p.113-123, 2001.

CONSTANTINIDES, P.P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm. Res.*, Arlington, v. 12, p.1561-1572, 1995.

FORMARIZ, T. P.; O, 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.

FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

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

GÜNTHER, M. et al. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. *Eur J Pharm Sci*, v.77, p. 438-449, 2011.

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.

JERE, D. et al. Chitosan-graft-polyethylenimine for Akt1 siRNA delivery to lung cancer cells. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v. 378, p. 194-200, 2009.

JONES, DS. et al. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *Int. J. Pharm.*, v. 372, p. 49-58, 2009.

LAHOUD, Mateus Humber1; CAMPOS, Ranieri. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.11, p. 65-73, n.1, Jan. - Jun./2010.

KOFFI, A. A. et al. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 328-335, 2006.

MARTINS, M.R.F.M. VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 38, n. 1, Jan./mar., 2002.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

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

PYTEL, R.F.; SILVA, L.V.N.; NUNES, A.S.; GESZTESI, J.L.; COSTA, f. Estudo in vivo de atividade antirradicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.80, sup.3, p.S323-328, 2005.

P.S. PRESTES, M. CHORILLI, L.A. CHIAVACCI, M.V. SCARPA, G.R. LEONARDI, J. *Dispersion Sci. Technol.* 31 (2010) 117.

RAFII, Fatemeh; WYNNE, Rebecca; HEINZE, Thomas M.; PAINE, Donald D. Mechanism of metronidazole-resistance by isolates of nitroreductase-producing *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* from the human intestinal tract. *FEMS microbiology letters* 225, Federation of European Microbiological Societies. p. 195-200, 2003.

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

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

VENDRUSCOLO, C.W. Goma xantana e galactomanana (*M. scabrella*): desenvolvimento de matrizes hidrofílicas para liberação modificada de teofilina. Itajaí, 2005. 112p. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí].

ZIP, M. C. Innovative use of topical metronidazole. **Dermatologic Clinics**, v. 28, p. 525-534, 2010.