

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS ESTABILIZADOS
COM ÁLCOOL CETÍLICO ETOXILADO E PROPOXILADO PARA
ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA**

GABRIELA MARIELLI DA LUZ

ARARAQUARA – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS ESTABILIZADOS
COM ÁLCOOL CETÍLICO ETOXILADO E PROPOXILADO PARA
ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA**

GABRIELA MARIELLI DA LUZ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao programa de graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

CO- ORIENTADORA: DR^a. HILRIS ROCHA E SILVA

ARARAQUARA – SP

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Roseli Marielli!

“Mãezinha,

Enquanto o mundo te adorna a presença com legendas sublimes, abrilhantando-te o nome, quis trazer-te a homenagem de meu reconhecimento e de meu carinho, segundo as dimensões de tua bondade, e te rememorei os sacrifícios...

Revi, Mãezinha, as tuas noites longas, junto de mim, quando a febre me atormentava no berço. Anjo transformado em mulher, erguias as mãos para o Céu e o que falavas com Deus me caía no rosto em forma de lágrimas!... Tornei a encontrar-te os braços acolhedores, festejando-me o retorno à saúde, com a doçura de teus beijos.

E, vida em fora, o pensamento recuou para lembrar-te...

Com a retina da memória, contemplei-te os lábios pacientes, ensinando-me a pronunciar as preces da infância: e nesses lábios inesquecíveis, fitei os sorrisos de júbilo, quando me deste os primeiros livros da escola.

Depois, acompanhei-te, passo a passo, o calvário de renúncia em que me levantaste para a vida.

Quantas vezes me abraçaste, trocando bênçãos por aflições, não conseguiria contar... Quantas vezes te ocultaste no sofrimento para que a alegria não me fugisse, realmente, não sei...

Passou o tempo e, hoje, de alma enternecida, anseio debalde surpreender as palavras com que algo te venha a dizer de meu agradecimento; entretanto, eu que desejaria medir o meu preito de afeto pelo tamanho de teu devotamento, posso apenas calcular a extensão de meu débito para contigo, a repetir que te amo e que em ti possuo o meu tesouro do Céu.”

Meimei - Francisco Cândido Xavier

AGRADECIMENTOS

À amiga Dra. Ana Cristina Oliveira Cancoro de Matos pelo auxílio, pois sem ele não teria conseguido passar no vestibular da Unesp.

À minha família pela compreensão, conselhos e dedicação durante os longos períodos de distância e dificuldades durante a graduação.

À minha orientadora, Prof. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião pelos ensinamentos, paciência e compreensão.

À minha co-orientadora Dra. Hilris Rocha e Silva por todo o aprendizado, companheirismo, dedicação, compreensão e amizade.

Aos Profs. Drs. Marlus Chorilli, Maria Virgínia Scarpa, Ana Dóris de Castro, Anselmo Gomes de Oliveira, Raul César Evangelista, Vera Borges Isaac, Hérica Regina Nunes Salgado, Marcos Antônio Corrêa, Victor Hugo Sarmento, Leila Aparecida Chiavacci e Georgino Honorato de Oliveira pelo auxílio e ensinamentos.

Aos pós-graduandos Ana Luiza, Andréia, Charlene, Fernanda Carbinatto, Fernanda Kolenyak, Flávia, Flávio, Giovana, Gisela, Gisele, Grazielle, Gustavo, Liliane, Márcia Helena e Priscileila por todas as lições e bons momentos dentro e fora do laboratório.

Às estagiárias Daniele, Fernanda, Mariane e Natália por todo o auxílio fornecido.

Às minhas amigas Carol M., Mariana, Natália, Karol, Carol Kaori e Tati por toda a compreensão, força, ânimo, aprendizado, alegria e conselhos.

Às técnicas Margareth Modolo e Maria de Fátima Rodrigues pela colaboração e eficiência.

Gostaria de agradecer ao Pibic/CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

E a todos que colaboraram para bom andamento e concretização deste trabalho.

A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

Nas últimas décadas tem ocorrido um aumento expressivo da incidência de doenças fúngicas. Porém, o tratamento destas infecções pode não ser efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis causam sérios efeitos adversos, recorrência ou resistência. Algumas doenças fúngicas causam lesões cutâneas e o medicamento, geralmente administrado por via oral, dificulta a chegada do fármaco no local de ação. Adicionalmente, muitos antifúngicos tópicos não são eficazes, pois o tempo de residência no local de ação é curto e a solubilidade do fármaco nos sistemas é baixa. Uma alternativa muito explorada nos anos recentes é o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, e as microemulsões (ME) e os cristais líquidos (CL) mostraram-se promissores, pois podem aumentar o tempo de residência no local de aplicação e a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, como ocorre com o fluconazol (F) e o itraconazol (I). Sistemas nanoestruturados foram desenvolvidos empregando o ácido oleico (AO), álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PROC) e água. Estes sistemas foram caracterizados por microscopia de luz polarizada (MLP), comportamento reológico, análise do perfil de textura (TPA), bioadesão e capacidade de incorporação dos fármacos pelos sistemas. A MLP foi utilizada na caracterização dos sistemas quanto a isotropia e anisotropia, diferenciando as ME dos CL. O comportamento reológico das ME foi Newtoniano e viscoso, e dos CL foi pseudoplástico e elástico e a temperatura não influenciou o comportamento reológico dos sistemas. As propriedades mecânicas das formulações, como dureza, compressibilidade e adesividade, foram avaliadas utilizando um analisador de textura no modo TPA. Os CL de fase hexagonal são os mais bioadesivos. As quantidades incorporadas dos fármacos nos sistemas aumentaram, principalmente comparando-se com a solubilidade em água. O aumento foi significativo principalmente no caso do fluconazol. A formulação AO3F não apresentou toxicidade, assim como os seus componentes separadamente. Além disso, esta formulação controlou a liberação

Resumo

do fluconazol fármaco e não houve permeação do F através da pele, ficando retido na epiderme+derme. Os sistemas desenvolvidos mostraram-se promissores para a administração cutânea de antifúngicos.

Palavras-chave: sistemas nanoestruturados, antifúngicos, administração cutânea, microemulsões e cristais líquidos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia da pele.	22
Figura 2. Estrutura do fluconazol.	25
Figura 3. Estrutura do itraconazol.	26
Figura 4. Microscópio de luz polarizada utilizado na caracterização dos sistemas estudados.	32
Figura 5. Reômetro utilizado na caracterização do comportamento reológico dos sistemas estudados. Em destaque, o dispositivo de placas paralelas utilizado para a caracterização.	32
Figura 6. Ilustração esquemática do dispositivo de placas paralelas do reômetro (LONGO, 2006).	33
Figura 7. Cartucho C18 utilizado no ensaio de incorporação do fluconazol e itraconazol nas formulações.	39
Figura 8. Esquema representativo do equipamento de análise do perfil de textura.	40
Figura 9. Figura esquemática da metodologia de análise <i>in vitro</i> da bioadesão dos sistemas.	41
Figura 10. Orelhas de porco obtidas de abatedouro local (A). Orelhas dermatomizadas na espessura de 500 µm (B).	42
Figura 11. Área de 4x5 cm para aplicação dos componentes das formulações.	44
Figura 12. Proteção de nylon após aplicação da amostra.	45
Figura 13. Fotografia representativa do escore 0.	47
Figura 14. Fotografia representativa do escore 1.	47
Figura 15. Fotografia representativa do escore 2.	48
Figura 16. Fotografia representativa do escore 3.	48
Figura 17. Fotografia representativa do escore 4.	48
Figura 18. Equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation).	52
Figura 19. Figura esquemática da célula vertical de difusão (célula de Franz).	52
Figura 20. Dispositivo utilizado para retenção de substâncias líquidas durante o ensaio de liberação e permeação <i>in vitro</i>	52

Lista de Figuras

- Figura 21.** Diagrama de fases para o sistema estabilizado com álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP como tensoativo, **ácido oléico** como fase oleosa e água destilada. **ME** – microemulsão, **CL** – cristal líquido, **EM** – emulsão e **SF** – separação de fases.57
- Figura 22.** Diagrama de fases para o sistema estabilizado com álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP como tensoativo, ácido oléico como fase oleosa e água destilada. Os pontos no diagrama representam as formulações selecionadas.59
- Figura 23.** Fotomicrografias representativas das formulações: **(A)** AO4, AO4I, AO4F, AO5, AO5I e AO5F - **campo escuro**; o objeto mostrado é uma bolha de ar. **(B)** AO2, AO2I, AO2F, AO3, AO3I e AO3F – **fase lamelar**, **(C)** AO1, AO1I e AO1F – **fase hexagonal**.60
- Figura 24.** Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO1, AO1F e AO1I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.63
- Figura 25.** Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO2, AO2F e AO2I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.64
- Figura 26.** Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO3, AO3F e AO3I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.64
- Figura 27.** Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO4, AO4F e AO4I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.65
- Figura 28.** Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO5, AO5F e AO5I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.66
- Figura 29.** Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO1, AO1F e AO1I.67
- Figura 30.** Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO2, AO2F e AO2I.68
- Figura 31.** Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO3, AO3F e AO3I.68
- Figura 32.** Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO4, AO4F e AO4I.68
- Figura 33.** Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO5, AO5F e AO5I.68
- Figura 34.** Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO1, AO1F e AO1I.69
- Figura 35.** Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO2, AO2F e AO2I.70
- Figura 36.** Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO3, AO3F e AO3I.70

Lista de Figuras

Figura 37. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO4, AO4F e AO4I.	70
Figura 38. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO5, AO5F e AO5I.	70
Figura 39. Curva padrão do fluconazol obtida por análise cromatográfica em 210 nm, $y = 0,0005x + 0,0012$, $r^2 = 0,9999$	72
Figura 40. Cromatogramas da solução contendo o fármaco fluconazol e fase móvel.	73
Figura 41. Curva padrão do itraconazol obtida por análise cromatográfica em 263 nm ($n=3$), $y = 0,0009x - 0,00003$, $r^2 = 0,9994$	76
Figura 42. Cromatogramas da solução contendo o fármaco itraconazol e fase móvel.	77
Figura 43. Gráfico representativo de uma análise do perfil de textura. A compressibilidade representa: área A; dureza : pico B; adesão : área C; e coesão : relação D/A.	84
Figura 44. Dureza das formulações com e sem fármaco (média e desvio padrão das replicatas ($n=7$)).	85
Figura 45. Adesividade das formulações com e sem fármaco (média e desvio padrão das replicatas ($n=7$)).	86
Figura 46. Trabalho de compressão das formulações com e sem fármaco (média e desvio padrão das replicatas ($n=7$)).	87
Figura 47. Coesão das formulações com e sem fármaco (média e desvio padrão das replicatas ($n=7$)).	87
Figura 48. Figura representativa do gráfico de força X tempo para obtenção de valores de força bioadesiva e área de bioadesão das formulações estudadas.	89
Figura 49. Picos máximos de força bioadesiva, obtidos com diferentes tempos de contato entre as formulações estudadas e a membrana biológica ($n=7$).	89
Figura 50. Trabalho de adesão, obtidos com diferentes tempos de contato entre as formulações estudadas e a membrana biológica ($n=7$).	90
Figura 51. Fotomicrografia evidenciando epiderme de ratos após os tratamentos: (A)-controle negativo; (B) – AO; (C) – PROC.	100
Figura 52. Fotomicrografia evidenciando epiderme de ratos após os tratamentos: A- controle negativo; (B) – AO3F.	100
Figura 53. Fotomicrografia evidenciando a derme papilar de ratos após os tratamentos: (A)-controle negativo; (B)- AO3F.	102
Figura 54. Curva analítica de fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.	103

Lista de Figuras

Figura 55. Perfil de liberação <i>in vitro</i> (% de liberação) do fluconazol incorporado na formulação AO3F, na fase oleosa AOF e no PGF (propilenoglicol + 1% de fluconazol) (média de n=6).....	104
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporções dos componentes para titulação aquosa.	30
Tabela 2. Condições cromatográficas para obtenção da curva analítica de fluconazol e itraconazol.	36
Tabela 3. Composição da formulação selecionada para avaliação da toxicidade dérmica de dose repetida.	46
Tabela 4. Escores baseados nas observações realizadas durante os ensaios de toxicidade dérmica.	47
Tabela 5. Formulações selecionadas para caracterização física do sistema.	59
Tabela 6. Comportamento observado em MLP das formulações sem fármaco e contendo 1% de fluconazol ou 0,005% de itraconazol.	61
Tabela 7. Valores da média das áreas dos picos das soluções de fluconazol obtidas por análises cromatográficas no comprimento de onda de 210 nm, desvio padrão e coeficiente de variação.	71
Tabela 8. Resultados obtidos nos testes de recuperação para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol.	73
Tabela 9. Coeficientes de variação obtidos nos testes de precisão interdia para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol, nas concentrações de 20, 200, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	74
Tabela 10. Coeficientes de variação obtidos nos testes de precisão intradia para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol, nas concentrações de 20, 200, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	74
Tabela 11. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol.	75
Tabela 12. Valores das áreas dos picos das soluções de itraconazol obtidas por análises cromatográficas no comprimento de onda de 263 nm, média de três determinações, desvio padrão e coeficiente de variação.	76
Tabela 13. Resultados obtidos nos testes de recuperação para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do itraconazol.	78
Tabela 14. Coeficientes de variação obtidos nos testes de precisão interdia para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do itraconazol, nas concentrações de 0,5, 3,0, 6,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	78

Lista de Tabelas

Tabela 15. Coeficientes de variação obtidos nos testes de precisão intradia para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do itraconazol, nas concentrações de 0,5, 3,0, 6,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.	79
Tabela 16. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do itraconazol.	79
Tabela 17. Ensaio prévio da incorporação do fluconazol e a sua concentração quantificada por CLAE.	80
Tabela 18. Ensaio prévio da incorporação do itraconazol e sua concentração quantificada por CLAE.	82
Tabela 19. Escores de toxicidade dérmica aguda em ratos após administração de 2000 mg.kg^{-1} de PROP (controle negativo).	93
Tabela 20. Escores de toxicidade dérmica aguda em ratos após administração de 150 mg.kg^{-1} de CB 15% (controle positivo).	93
Tabela 21. Escores de toxicidade dérmica aguda em ratos após administração de 2000 mg.kg^{-1} de PROC.	94
Tabela 22. Escores de toxicidade dérmica aguda em ratos após administração de 2000 mg.kg^{-1} de AO.	94
Tabela 23. Escores de toxicidade dérmica de dose repetida em ratos após administração da formulação selecionada.	97
Tabela 24. Espessura da epiderme e derme (média $\pm$ DP) para os diferentes grupos experimentais (em μm).	99
Tabela 25. Contagem de leucócitos e fibroblastos (média $\pm$ DP) para os diferentes grupos experimentais.	101
Tabela 26. Quantidade de fluconazol liberado por área e porcentagem liberada, após 24h de experimento.	105
Tabela 27. Quantidade de fluconazol retido e permeado na pele, em $\mu\text{g.cm}^{-2}$ após 6 ou 12h de experimento.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO – ácido oléico

CB – cloreto de benzalcônio

CL – Cristal Líquido

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV – Coeficiente de Variação

DP – Desvio Padrão

EC – Estrato Córneo

EP+D – Epiderme e derme

F – fluconazol

I – itraconazol

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

ME - Microemulsão

MLP – Microscopia de Luz Polarizada

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development

PG – propilenoglicol

PROC – Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP

PROP – propanol

TPA – Análise do Perfil de Textura

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	18
II. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Etapas Cumpridas	27
III. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Reagentes	28
3.2. Equipamentos	29
3.3. Animais.....	29
3.4. Métodos	30
3.4.1. Desenvolvimento do diagrama de fases.....	30
3.4.2. Preparo das formulações.....	31
3.4.3. Caracterização física dos sistemas coloidais	31
3.4.3.1. Microscopia de luz polarizada.....	31
3.4.3.2. Comportamento reológico	32
3.4.3.2.1. Fluxo e Viscosidade	33
3.4.3.2.2. Análise Oscilatória por Varredura de Frequência	33
3.4.3.2.3. Análise Oscilatória por Varredura de Temperatura.....	34
3.4.3.3. Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação da incorporação do fluconazol e do itraconazol.....	34
3.4.3.3.1. Linearidade	35
3.4.3.3.2. Especificidade.....	36
3.4.3.3.3. Exatidão	37

Sumário

3.4.3.3.4. Precisão.....	37
3.4.3.3.5. Limite de detecção e quantificação	38
3.4.3.4. Ensaio de incorporação do fluconazol e do itraconazol nas formulações	38
3.4.3.5. TPA - Análise do perfil de textura	39
3.4.3.6. Ensaio <i>in vitro</i> de bioadesão	41
3.4.3.7. Análise estatística	43
3.4.4. Toxicidade dérmica aguda.....	43
3.4.4.1. Teste Limite.....	43
3.4.4.2. Teste de porcentagens.....	45
3.4.4.3. Toxicidade dérmica de dose repetida	45
3.4.4.4. Escala de toxicidade dérmica aguda.....	46
3.4.4.5. Análise estatística	49
3.4.4.6. Avaliação histológica	49
3.4.4.6.1. Análise histométrica	49
3.4.4.6.2. Análise histopatológica.....	50
3.4.5. Avaliação da liberação, permeação e retenção <i>in vitro</i>	50
3.4.5.1. Curva analítica de fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.....	50
3.4.5.2. Estudo de solubilidade do fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.....	50
3.4.5.3. Liberação <i>in vitro</i>	51
3.4.5.4. Permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	53
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Desenvolvimento do diagrama de fases	56
4.2. Caracterização física dos sistemas coloidais	58
4.2.1. Formulações selecionadas para caracterização física.....	58
4.2.2. Microscopia de luz polarizada.....	60

Sumário

4.2.3. Comportamento reológico	61
4.2.3.1. Fluxo e Viscosidade	62
4.2.3.2. Análise Oscilatória por Varredura de Frequência	67
4.2.3.3. Análise Oscilatória por Varredura de Temperatura.....	69
4.2.4. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol	71
4.2.4.1. Linearidade	71
4.2.4.2. Especificidade.....	72
4.2.4.3. Exatidão	73
4.2.4.4. Precisão.....	73
4.2.4.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	75
4.2.5. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para avaliação da incorporação do itraconazol.	75
4.2.5.1. Linearidade	75
4.2.5.2. Especificidade.....	77
4.2.5.3. Exatidão	77
4.2.5.4. Precisão.....	78
4.2.5.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	79
4.2.6. Ensaio de incorporação do <i>fluconazol</i> e <i>itraconazol</i> nas formulações.....	80
4.2.7. TPA - Análise do Perfil de Textura.....	83
4.2.8. Ensaio <i>in vitro</i> de bioadesão	88
4.3. Toxicidade Dérmica Aguda	91
4.3.1. Teste Limite.....	91
4.3.2. Teste de porcentagens	95
4.4. Toxicidade dérmica de dose repetida	96
4.5. Avaliação histológica	98

Sumário

4.5.1. Análise histométrica	98
4.5.2. Análise histopatológica	101
4.6. Avaliação da liberação, permeação e retenção <i>in vitro</i> do fluconazol	103
4.6.1. Curva analítica de fluconazol em solução tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.....	103
4.6.2. Estudo de solubilidade do fluconazol na solução receptora em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4	103
4.6.3. Liberação <i>in vitro</i>	104
4.6.4. Permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	105
V. CONCLUSÃO.....	107
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
VII. ANEXOS	116
7.1. Artigos	116
7.2. Trabalhos apresentados e publicados em anais de congressos	116

I. INTRODUÇÃO

A introdução de um novo fármaco no mercado pode levar vários anos de pesquisa e necessita de grande investimento financeiro. Por isso, uma das alternativas encontradas para aumentar o arsenal terapêutico tem sido o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Neste sentido, a nanotecnologia tem representado uma estratégia importante na busca de sistemas de liberação controlada de fármaco, pois se caracterizam pelo tamanho reduzido das estruturas e a compartimentalização do fármaco em ambientes restritos, podendo, com isso, alterar as propriedades biofarmacêuticas do fármaco e direcioná-lo para regiões específicas favorecendo a interação com sistemas biológicos. Atualmente, as pesquisas nesta área estão direcionadas a melhorar o tratamento de doenças que apresentam grande incidência e complexidade, como o câncer, doenças parasitárias, fúngicas e virais (MAINARDES *et al.*, 2005, MOURÃO *et al.*, 2005).

Estes sistemas possibilitam também o aumento da biodisponibilidade, estabilidade e solubilização de fármacos. Dentre os sistemas nanoestruturados, as microemulsões e os cristais líquidos têm sido intensamente pesquisados nos últimos anos (FORMARIZ *et al.*, 2005, FORMARIZ, 2008, KREILGAARD *et al.*, 2000). Microemulsões são sistemas opticamente transparentes ou translúcidos, pouco viscosos, termodinamicamente estáveis e sua formação é acompanhada pela diminuição da tensão superficial do sistema (HEUSCHKEL; GOEBEL; NEUBERT, 2007, HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008).

Além disso, podem facilitar a permeação cutânea de fármacos (PADULA; NICOLI; SANTI, 2009), provavelmente por possuírem quantidade significativa de tensoativo, que pode interagir com o estrato córneo e desestruturar a camada lipídica da pele, fazendo com que os lipídios passem de uma forma cristalina para uma forma líquida desordenada, aumentando a permeabilidade cutânea e facilitando a penetração de substâncias que normalmente não atravessariam essa barreira (KREILGAARD, 2002).

Outro fator que pode facilitar a permeação dos fármacos na pele é o aumento da sua solubilidade nestes sistemas, pois somente as porções solubilizadas do fármaco conseguem permear a pele. Este aumento da solubilização pode ser explicado pela organização estrutural única apresentada pelas microemulsões quando comparadas aos sistemas convencionais (BAROLI, 2010; KREILGAARD, 2002). Estudos também mostraram que estes sistemas conseguem aumentar a solubilidade do fármaco quando comparado aos componentes separadamente, mostrando que a estruturação destes sistemas e a seleção dos componentes da ME influenciam a solubilidade do fármaco (KREILGAARD; PEDERSEN; JAROSZEWSKI, 2000). Discute-se também, que o aumento da permeação de fármacos incorporados às microemulsões ocorre por causa do aumento da superfície de contato das micelas e a pele, quando comparadas às emulsões. O reduzido tamanho das gotículas aumenta o contato das micelas com a pele, facilitando a permeação do fármaco na pele. Além disso, os monômeros dos tensoativos têm alta capacidade de permear a pele, e como as microemulsões possuem estruturas altamente dinâmicas, esta permeação pode facilitar a permeação dos fármacos incorporados (KREILGAARD, 2002).

A organização espontânea de tensoativos em meios aquosos pode resultar em outras estruturas além de microemulsões, como por exemplo, fases líquido-cristalinas. Com a adição de um tensoativo e uma fase oleosa. Desta forma, o que caracteriza o cristal líquido é a forma com que estas moléculas interagem, formando interfaces ordenadas (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Os cristais líquidos são estruturas ordenadas com arranjo molecular contendo regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. Alterando a composição dos sistemas, podem ser formadas diferentes formas líquido-cristalinas, como lamelares, hexagonais e cúbicas. Os cristais líquidos são utilizados na liberação de fármacos devido a sua alta viscosidade, podendo prolongar a liberação destes fármacos.

Além disso, possuem uma área interfacial interna, com características físico-químicas diferentes da área externa, formando microambientes distintos, que permitem compartimentalizar fármacos lipossolúveis e hidrossolúveis (BOYD *et al.*, 2006, CARVALHO, 2009).

O fármaco e o sistema interagem e podem influenciar no controle da liberação do fármaco. Além disso, a velocidade e a extensão da liberação destes fármacos incorporados nos sistemas também dependerão da estrutura do agregado formado, assim como das características físico-químicas do fármaco (GABBOUN *et al.*, 2001, URBAN, 2004).

Por outro lado, o fato destes sistemas se tornarem mais viscosos ao absorverem água, pode resultar em uma nova estratégia que pode ser empregada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, possibilitando a administração por diversas vias, pois o contato com fluidos biológicos pode alterar a estrutura e assim modificar as propriedades do sistema (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

Os principais tensoativos utilizados na preparação de microemulsões e cristais líquidos são aqueles de natureza não iônica, como os copolímeros dos óxidos de etileno e propileno, pois apresentam maior praticidade no processo de preparação dos sistemas (MALMSTEN, 2002). Alguns tensoativos não iônicos, como a classe dos polioxietileno n-alquil éteres, são capazes de formar sistemas estáveis sem a necessidade da adição de co-tensoativo, isso é importante, pois reduzem a complexidade dos sistemas e a possibilidade de toxicidade (LAWRENCE; REES, 2000). Tensoativos com mais unidades de óxido de etileno favorecem a formação de sistemas mais estruturados, como cristal líquido, e quantidades menores de óxido de etileno favorece estruturas micelares (CARVALHO, 2009). A ausência de interações eletrostáticas repulsivas permite um maior empacotamento e auto-associação das moléculas de tensoativo, devido à baixa tensão interfacial, permitindo a formação de MEs e CLs na ausência de co-tensoativos (MALMSTEN, 2002).

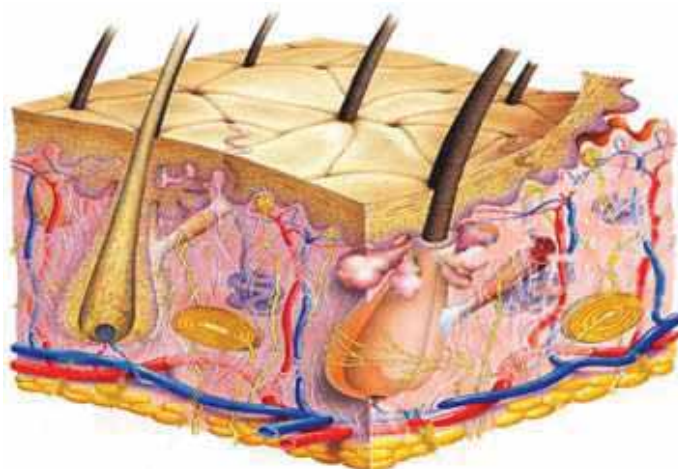
Produzido pela reação entre álcool cetílico com a mistura de óxido de etileno e óxido de propileno, o álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (CRODA DO BRASIL, 2002) foi o tensoativo não-iônico escolhido para o desenvolvimento dos sistemas.

A fase oleosa pode favorecer a formação de sistemas microestruturados estáveis e, dependendo da natureza do óleo, em particular o tamanho da cadeia hidrofóbica do tensoativo, o óleo pode penetrar em extensões variadas nas caudas apolares do tensoativo na monocamada interfacial, modificando o arranjo estrutural, ou ainda modificando a permeação pela pele (KREILGAARD, 2002, URBAN, 2004).

O ácido oleico favorece a penetração cutânea de substâncias devido à sua grande similaridade com as estruturas do estrato córneo. Uma vez incorporado ao estrato córneo, há uma torção da molécula, que ocorre devido à presença da dupla ligação do tipo *cis*, e gera poros na superfície do estrato córneo que alteram sua continuidade, o que irá diminuir a resistência difusional aos permeantes, aumentando sua permeabilidade (HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008).

A pele (figura 1) é um órgão essencial, principalmente por possuir funções importantes como termorregulação e evitar perda de água, além de importantes funções imunológicas e neurossensoriais. Embora este órgão possa enfrentar diversas injúrias, a pele possui um limiar bastante grande de tolerância. Quando este limiar é ultrapassado a pele pode apresentar sinais de toxicidade e para entender estes sinais é necessário conhecer a estrutura da pele (GUPTA, 2007).

Figura 1. Anatomia da pele.



A pele é essencialmente composta por duas camadas: a epiderme e a derme. A epiderme é uma camada epitelial de origem ectodérmica não vascularizada. A camada mais externa da epiderme é o estrato córneo, que consiste de várias camadas de células mortas completamente queratinizadas (corneócitos) incorporado em uma matriz lipídica extracelular (LAVKER; SUN, 1983; MONTEIRO-RIVIERE, 2006). O estrato córneo é considerado a principal barreira da pele contra a penetração de substâncias estranhas, além de fornecer maior resistência a penetração de compostos exógenos quando comparado com as camadas abaixo dele (MONTEIRO-RIVIERE *et al.*, 2001).

A derme é a camada mais interna e de origem mesodérmica. Possui um rico suplemento de capilares, glândulas sudoríparas e sebáceas, além de folículos pilosos (SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999). A derme consiste de tecido conjuntivo denso com colágeno, elastina e fibras reticulares em uma camada de mucopolissacarídeos. Além disso, fibroblastos, mastócitos e macrófagos são as células predominantes nesta camada (GUPTA, 2007).

Em continuidade a derme está a hipoderme, que, embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele (GUPTA, 2007). A hipoderme é uma camada de tecido conjuntivo abaixo da derme que contribui para ancorar a derme aos tecidos subjacentes, como músculo ou osso (MONTEIRO-RIVIERE, 2006), além de servir como suporte e união com outros órgãos subjacentes (SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999; LEONARDI, 2004).

A aplicação cutânea pode tanto ser usada como via de administração visando atingir a via sistêmica, como para a obtenção de um efeito local, sendo, para isso, necessário diminuir a absorção sistêmica e aumentar da retenção do fármaco no local de ação, o que pode diminuir o aparecimento de efeitos adversos ocasionados pelo fármaco (SAULNIER *et al.*, 2008).

A maioria dos tratamentos de problemas dermatológicos é limitada pela capacidade do fármaco ultrapassar a barreira da pele (MARTINS; VEIGA, 2002). Apesar disso, a administração cutânea oferece vários atrativos quando comparada às outras vias (KREILGAARD, 2002). A via cutânea é hoje amplamente reconhecida como uma das mais promissoras, devido à possibilidade de melhorar significativamente o tratamento de certas doenças, bem como o conforto do paciente (MATTEUCCI *et al.*, 2008), além de não ser invasiva e evitar o metabolismo pré-sistêmico e a degradação de fármacos peptídicos e protéicos (TANG *et al.*, 2001).

Em algumas patologias, o aumento da concentração dos fármacos na pele é mais importante para a eficácia e segurança do tratamento que o aumento da absorção percutânea (HASHIGUCHI *et al.*, 1997). Por outro lado, em algumas doenças fúngicas, como a esporotricose e a candidíase, a riqueza parasitária das lesões cutâneas pode favorecer a transmissão entre indivíduos e também dificultar a chegada do fármaco no local de ação quando este é administrado por via sistêmica.

Assim sendo, alguns pesquisadores têm sugerido que a administração de fármaco na lesão pode melhorar sua eficácia terapêutica. Adicionalmente, muitos antifúngicos tópicos não são eficazes, pois o tempo de residência da preparação no local de ação não é adequado ou, ainda, eles não conseguem transpor as barreiras biológicas e alcançar as camadas mais profundas da pele (KLEIN, 2007).

Por muito tempo acreditou-se que o mecanismo pelo qual algumas substâncias administradas por via sistêmica alcançavam as camadas mais superficiais da pele era a difusão da substância que era lentamente transportada para o estrato córneo pelo processo de renovação natural da pele. Este processo, entretanto, leva cerca de 3-4 semanas, o que contraria as evidências de que algumas substâncias são capazes de atingir o estrato córneo muito mais rapidamente que a renovação celular (PATZELT *et. al.*, 2008).

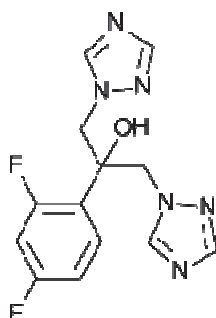
Outra evidência que o transporte destas substâncias deve ocorrer por outros mecanismos é a ausência de vasos sanguíneos na epiderme. Estes mecanismos dependem das características da substância a ser transportada, sendo que as substâncias lipofílicas tendem a utilizar fluxo do sebo para alcançar as camadas mais externas da pele, enquanto que as hidrofílicas atingiriam a pele através do suor (PATZELT *et. al.*, 2008).

Deste modo, entender como estes mecanismos ocorrem é importante para que sistemas mais adequados possam ser desenvolvidos. Principalmente no caso dos antifúngicos que, para algumas patologias, o alvo pode ser as diferentes camadas da pele ou ainda a lesão, que, em geral, apresenta um meio muito hidrofílico com uma grande riqueza de microorganismos, que poderiam não receber concentrações adequadas de fármacos (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002).

O desenvolvimento de um agente antifúngico representa um grande desafio os pesquisadores da área, uma vez que, por tratar-se de célula eucariótica, compartilha com a maior parte dos alvos potenciais de ação com as células do hospedeiro, conferindo altos níveis de toxicidade. O antifúngico ideal deve ter amplo espectro de atividade, estar disponível em formulações tópicas e orais, apresentar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ter custo acessível e não apresentar resistência microbiana (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002).

O fluconazol (figura 2) é um antifúngico de amplo espectro que tem sido usado para administração oral (KLEIN, 2007). Após a administração oral, podem ocorrer diversos efeitos adversos, principalmente por acumular-se no suor e estrato córneo (FAERGEMANN, 1999), além de favorecer o aparecimento de cepas resistentes ao fármaco (BORECKÁ-MELKUSOVÁ *et al.*, 2008). A maior concentração é alcançada no estrato córneo e ela ainda é alta uma semana depois de terminado o tratamento (FAERGEMANN, 1999).

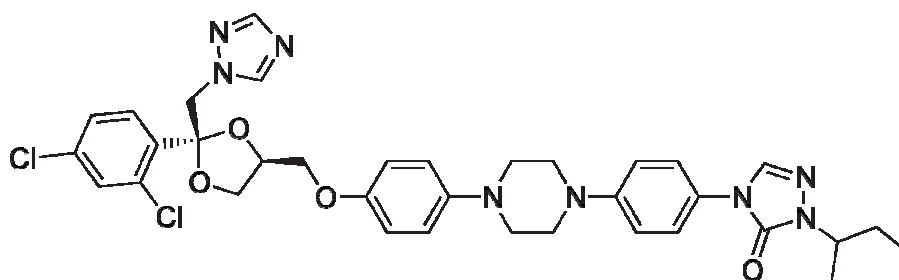
Figura 2. Estrutura do fluconazol.



A retenção prolongada do fluconazol na pele tem sido atribuída à alta afinidade ao estrato córneo devido a uma interação entre o fármaco e queratina (KLIMKE; SCHÄFER-KORTING, 1997). Este alto tropismo do fluconazol pela queratina é um importante fator para sua ação contra infecções de pele (SOBUE; SEKIGUCHI; NABESHIMA, 2004). Entretanto, a sua administração tópica tem sido pouco investigada, apesar das vantagens apresentadas.

O itraconazol (figura 3) é um fármaco antifúngico, derivado azólico, e vem sendo muito empregado no tratamento de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas. Ele age inibindo o crescimento do fungo, bloqueando a síntese de ergosterol presente nas paredes celulares do fungo, diminuindo seu crescimento e a sua reprodução (ARONSON, 2009). O itraconazol, quando administrado por via oral, tem sua absorção limitada por ser muito pouco solúvel em água tendo que aumentar a dose administrada, aumentando a possibilidade de efeitos adversos e resistência dos fungos ao fármaco (HASSAN *et al.*, 2007).

Figura 3. Estrutura do itraconazol.



Para evitar estes efeitos indesejados a via de administração cutânea é uma alternativa interessante, mas dificuldades como a insolubilidade do fármaco e o pouco tempo de permanência da preparação na lesão precisam ser contornadas. Por isso, o desenvolvimento de novos sistemas faz-se necessário como forma de otimizar a administração destes fármacos pela via cutânea.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a toxicidade dérmica aguda de sistemas contendo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PROC) como tensoativo, água e ácido oléico (AO) como fase oleosa para administração dos antifúngicos fluconazol e itraconazol.

2.2. Etapas

As etapas deste trabalho incluíram:

- Desenvolver um diagrama de fases utilizando ácido oléico como fase oleosa, água e álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP como tensoativo;
- Caracterizar os sistemas com os fármacos (fluconazol ou itraconazol) e sem fármaco, por microscopia de luz polarizada e comportamento reológico (fluxo, viscosidade, ensaios oscilatórios de frequência e temperatura);
- Desenvolver e validar metodologia analítica para avaliação da capacidade de incorporação dos fármacos nos sistemas selecionados;
- Analisar o perfil textura das formulações;
- Avaliar as propriedades bioadesivas dos sistemas selecionados;
- Avaliar o perfil de liberação, a permeação e retenção do fluconazol incorporado de um sistema contendo fluconazol;
- Avaliar a toxicidade dérmica aguda dos componentes dos sistemas;
- Avaliar a toxicidade dérmica de dose repetida de um sistema contendo fluconazol.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

- Acetonitrila grau CLAE (J. T. Backer);
- Ácido oléico (Synth[®]);
- Água deionizada Milli-Q;
- Álcool absoluto (Quemis);
- Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Procetyl AWS, CRODA);
- Carbômero homopolímero tipo B (Carbopol[®] 974P, Lubrizol, Cleveland, EUA);
- Cloreto de benzalcônio (Merck[®]);
- Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec[®]);
- Cloridrato xilazina 2% (Xilazin, Syntec[®]);
- Formaldeído 30% (Synth[®]);
- Fluconazol (Purifarma);
- Hematoxilina e eosina para coloração dos cortes histológicos;
- Meio de inclusão para histologia – Histosec[®] Pastilhas – parafina + polímeros (Merck, Germany);
- Itraconazol (EMS);
- Metanol P.A. (Quemis);
- Propanol (Synth[®]).

3.2. Equipamentos

- Analisador de textura TA-Xtplus (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra);
- Balança analítica, Mettler, H51;
- Balança semi-analítica Ohaus - AS200;
- Balança semi-analítica, Sartorius, BP210S;
- Banho de ultrassom, Unique ,Ultra Sonic Cleaner;
- Cartucho SPE Strata C18-E 1000mg/5mL, Allcrom;
- Centrífuga, Sorval, modelo TC 6 Du Pont.
- CLAE Varian, módulo de distribuição de solvente ProStar/Dynamax® 210/215, detector espectrofotométrico ProStar® 330 UV-VIS PDA e Rheodine® VS 7125, injetor automático Varian ProSar® modelo 410, coluna RP-18 (Varian® - Chromsep®) 250 mm x 4.6mm I.D. 5 µm tamanho de partícula;
- Permeador cutâneo automatizado (Hanson Corporation);
- Espectrofotômetro HP 8453;
- Microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena;
- Microscópio óptico Leica DMZ 2000 conectado a um microcomputador e ao software Motic Images Advanced 3.2;
- Monocromador do tipo Si (111);
- Peagômetro MicroNal® B474;
- Purificador de água Milli-Q Plus – Millipore;
- Reômetro HAAKE, modelo RS1 (Rheowin 3.5).

3.3. Animais

- Ratos machos Wistar adultos (250 – 300g).

3.4. Métodos

3.4.1. Desenvolvimento do diagrama de fases

Diagrama de fases ternário foi construído a partir das observações feitas nas variações de fases dos sistemas formados compostos por ácido oléico como fase oleosa e álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP como tensoativo. Estes componentes foram misturados em diferentes proporções (Tabela 1), e depois foi feita a titulação com água. Os volumes de água adicionados às preparações foram anotados e os tipos de sistemas formados e suas viscosidades foram analisados macroscopicamente.

Tabela 1. Proporções dos componentes para titulação aquosa.

<i>Amostras</i>	<i>Tensoativo (%)</i>	<i>Fase oleosa (%)</i>
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50
6	60	40
7	70	30
8	80	20
9	90	10

Terminada a titulação, foram calculadas as concentrações de cada componente na mistura, obtendo assim os pontos que foram utilizados para delimitar as diferentes regiões existentes no diagrama de fases. Os diagramas ternários foram feitos utilizando o programa SigmaPlot® 10.0.

3.4.2. Preparo das formulações

Incorporou-se 1% de fluconazol ou 0,005% de itraconazol no tensoativo, e em seguida adicionou-se os demais componentes das formulações, as quais foram mantidas sob agitação. As formulações contendo ou não fluconazol ou itraconazol, ficaram em repouso por 24 horas para posterior caracterização.

3.4.3. Caracterização física dos sistemas coloidais

3.4.3.1. Microscopia de luz polarizada

As amostras preparadas foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e observadas em microscópio sob luz polarizada.

O microscópio de luz polarizada (figura 4.A) é projetado para observar, e através de uma câmera acoplada, fotografar estruturas que são principalmente visíveis devido ao seu caráter óptico anisotrópico. Com a finalidade de realizar essa tarefa, o microscópio empregado é equipado com um polarizador (figura 4.B) posicionado no trajeto da luz, antes do material analisado, e um segundo polarizador localizado no caminho óptico entre a abertura traseira da objetiva e os tubos de observação ou o ponto da câmera. A substância birrefringente interage com a luz plano-polarizada, produzindo dois componentes individuais da onda, sendo cada um polarizado em planos mutuamente perpendiculares (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 2003).

Figura 4. Microscópio de luz polarizada utilizado na caracterização dos sistemas estudados.



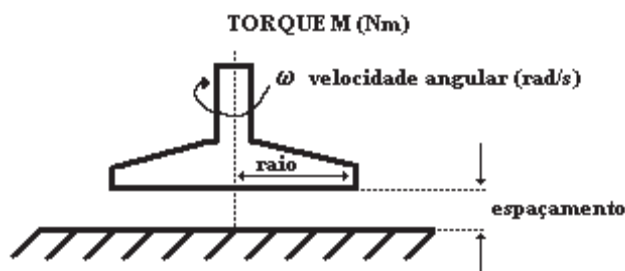
3.4.3.2. Comportamento reológico

Para o estudo do comportamento reológico, utilizou-se um reômetro (figura 5) que funciona pelo princípio de rotação de um dispositivo de placa e placa (figura 6) e oferece os valores da tensão e da taxa de cisalhamento, a partir dos quais torna-se possível avaliar a viscosidade dos materiais.

Figura 5. Reômetro utilizado na caracterização do comportamento reológico dos sistemas estudados. Em destaque, o dispositivo de placas paralelas utilizado para a caracterização.



Figura 6. Ilustração esquemática do dispositivo de placas paralelas do reômetro (LONGO, 2006).



3.4.3.2.1. Fluxo e Viscosidade

Os parâmetros empregados na análise de fluxo e viscosidade encontram-se relatados abaixo:

- Temperatura: 25 °C;
- Tipo de sensor: placa (PP35Ti);
- Distância entre as placas: 200 μm ;

3.4.3.2.2. Análise Oscilatória por Varredura de Frequência

A varredura de frequência é o modo mais comum de teste oscilatório, pois mostra como a variação das taxas de deformação e tensão podem influenciar o comportamento elástico e viscoso de um material. Nesse teste, a frequência é aumentada enquanto que a amplitude do sinal de entrada (deformação ou tensão) é mantida constante. A técnica de oscilação requer mínima perturbação do material e fornece várias informações sobre sua estrutura. Frequências mais altas deformam as ligações atômicas, enquanto que baixas frequências estão relacionadas com o estiramento ou deformação das macromoléculas. O módulo de elasticidade complexo G^* é dado pela razão entre as amplitudes de tensão e deformação, sendo seus componentes real e imaginário os módulos de estocagem, G' e de perda, G'' , respectivamente (SEARS; ZEMANSKY, 1971; GRAESSLEY, 1984).

Os parâmetros para determinação foram:

- Temperatura: 25 °C;
- Tipo de sensor: placa (PP35Ti);
- Distância entre as placas: 200 µm;
- Frequência inicial: 0,1 Hz;
- Frequência final: 100 Hz;
- Tensão: 0,5 Pa

3.4.3.2.3. Análise Oscilatória por Varredura de Temperatura

Foi feita a análise oscilatória por varredura de temperatura para avaliar se há dependência entre o comportamento reológico da formulação e a variação de temperatura.

- Temperatura: 25 °C a 37°C;
- Tipo de sensor: placa (PP35Ti);
- Distância entre as placas: 200 µm.

3.4.3.3. Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação da incorporação do fluconazol e do itraconazol.

A validação de um método analítico é definida como sendo um processo através do qual ensaios realizados em laboratório são utilizados para garantir que o método desenvolvido atenda às exigências desejadas (BRITAIN, 1998), ou seja, validar um método é torná-lo próprio para o emprego e reprodução segura dos resultados obtidos.

Os parâmetros analíticos preconizados pelas diretrizes do Comitê Internacional em Harmonização (ICH, 2005) para a validação de métodos analíticos estão descritos nos itens seguintes.

3.4.3.3.1. Linearidade

A linearidade de um método analítico é a habilidade de elucidar resultados que sejam diretamente, ou através de transformações matemáticas bem definidas, proporcionais à concentração da substância analisada na amostra, dentro de uma dada faixa. É expressa em termos de variâncias em torno da inclinação da curva, calculada através da regressão linear padrão, dos resultados obtidos através da análise de amostras contendo concentrações variadas e conhecidas da substância em análise (ICH, 2005; BRITAIN, 1998).

A linearidade foi determinada a partir da curva analítica obtida de soluções padrão de fluconazol e itraconazol.

Para a obtenção da curva analítica de fluconazol em metanol e água (50:50), partiu-se de uma solução do fármaco de concentração 1 mg.mL^{-1} . A partir dessa solução estoque, procedeu-se as diluições para obter soluções de concentrações 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e $400 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, as quais foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), nas condições apresentadas na Tabela 2. As leituras foram feitas em triplicata em $\lambda = 210 \text{ nm}$.

Para a obtenção da curva analítica de itraconazol em metanol, partiu-se de uma solução metanólica do fármaco de concentração $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A partir dessa solução estoque, procedeu-se as diluições para obter soluções de concentrações 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, $6,0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando metanol como solvente, as quais foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), nas condições apresentadas na Tabela 2. As leituras foram feitas em triplicata em $\lambda = 263 \text{ nm}$.

Elaborou-se um gráfico relacionando a área do pico em função da concentração de cada fármaco. Com os valores experimentais, calculou-se a equação da reta e o coeficiente de determinação.

Tabela 2. Condições cromatográficas para obtenção da curva analítica de fluconazol e itraconazol.

<i>Parâmetro</i>	<i>fluconazol</i>	<i>itraconazol</i>
<i>Equipamento</i>	<i>HPLC Varian Pro Star</i>	<i>HPLC Varian Pro Star</i>
Detector / Comprimento de onda	DAD / 210 nm	DAD / 263 nm
Coluna / Comprimento / Tamanho de partícula	C18 / 250 x 4,6 mm / 5 µm	C18 / 250 x 4,6 mm / 5 µm
Fase móvel	metanol / água 50:50	acetonitrila / água 70:30
Fluxo	1 mL.min ⁻¹ .	1 mL.min ⁻¹ .
Volume injetado	20 µL	20 µL

3.4.3.3.2. Especificidade

A especificidade de um procedimento analítico representa sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em análise na presença de componentes que poderiam interferir na sua determinação em uma mistura complexa, por exemplo, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 2005; BRITAIN, 1998). O ICH (2005) preconiza que quando procedimentos cromatográficos são utilizados, os cromatogramas representativos devem ser usados para demonstrar o grau de seletividade e os picos devem ser apropriadamente classificados (USP, 2006).

A especificidade da metodologia analítica do fluconazol foi avaliada através da análise comparativa dos cromatogramas da solução contendo fluconazol e a fase móvel, assim como a especificidade da metodologia analítica do itraconazol também foi avaliada comparando-se os cromatogramas da solução contendo itraconazol e a fase móvel.

3.4.3.3.3. Exatidão

A proximidade dos resultados obtidos através do método analítico é avaliada em relação ao valor verdadeiro (rotulado), aceito como referência. Pode ser expressa como porcentagem de recuperação, pelo ensaio de adição de uma quantidade conhecida de analito a amostra (ICH, 2005). Os resultados foram determinados seguindo a equação 1:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\text{valor encontrado na análise da amostra simulada}}{\text{quantidade real do padrão}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

A exatidão da metodologia analítica para determinação do fluconazol foi determinada pela recuperação com amostras simuladas de concentrações 20, 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A exatidão da metodologia analítica para determinação do itraconazol foi determinada pela recuperação com amostras simuladas de concentrações 0,5, 3,0 e 6,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os experimentos de recuperação foram feitos em triplicata para cada concentração.

3.4.3.3.4. Precisão

A precisão de um procedimento analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma amostra homogênea, em idênticas condições de testes. A precisão é geralmente expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo dos resultados obtidos (ICH, 2005; BRITAIN, 1998).

Neste trabalho, a precisão da metodologia analítica para determinação do fluconazol foi determinada pela repetibilidade, sendo feitas três determinações de três amostras diferentes (20, 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e os resultados foram expressos como desvio padrão e coeficiente de variação (CV).

Para o itraconazol, a precisão também foi determinada pela repetibilidade, sendo feitas três determinações de três amostras diferentes (0,5, 3,0 e 6,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e os resultados foram expressos como desvio padrão e coeficiente de variação (CV).

3.4.3.3.5. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a mais baixa concentração da substância em análise presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto o limite de quantificação (LQ) de um método representa a mais baixa concentração da substância em exame presente na amostra que pode ser quantificada com adequada precisão e exatidão, os dois parâmetros sendo determinados sob as condições experimentais estabelecidas.

Eles podem ser calculados com base no desvio padrão médio da resposta (σ) e a inclinação da curva analítica (S) (ICH, 2005; BRITAIN, 1998), embora utilizando equações diferentes, apresentadas abaixo:

$$\text{LD} = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad (\text{Eq. 3})$$

Os limites de detecção e quantificação foram determinados em triplicata, e foram calculados utilizando as concentrações 20, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o fluconazol e utilizando as concentrações 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o itraconazol.

3.4.3.4. Ensaio de incorporação do fluconazol e do itraconazol nas formulações

Foi feito um ensaio prévio de incorporação do fluconazol e do itraconazol para ter como base a quantidade de fármaco possível de se dispersar nas formulações. Esta metodologia foi utilizada devido à alta viscosidade das formulações.

Além disso, realizou-se o mesmo ensaio prévio na fase oleosa e no tensoativo separadamente, para avaliar a influência destes componentes na capacidade de incorporação dos fármacos pelos sistemas estudados.

A partir dos resultados obtidos no ensaio prévio de incorporação, incorporou-se fármaco nas formulações e foram agitadas. Após 24 horas, as amostras foram pesadas e adequadamente diluídas em 10 mL das respectivas fases móveis.

Uma alíquota desta solução foi submetida à *clean-up* em cartucho C18-E 500mg/3mL (figura 4), previamente condicionado com fase móvel (metanol:água para formulações contendo fluconazol, e acetonitrila:água para formulações contendo itraconazol).

Após condicionamento, aplicou-se 2,5 mL da diluição no cartucho, coletou-se 1 mL de volume morto (correspondente a conteúdo ocupado pela sílica) e em seguida coletou-se a alíquota final que foi filtrada em membrana 0,45 µm para quantificação por CLAE conforme metodologia validada para cada fármaco.

Figura 7. Cartucho C18 utilizado no ensaio de incorporação do fluconazol e itraconazol nas formulações.



3.4.3.5. TPA - Análise do perfil de textura

Algumas características mecânicas de sistemas semi-sólidos podem ser obtidas através do teste conhecido como *TPA* (*Texture profile analysis*) utilizando analisador de textura TAXTplus.

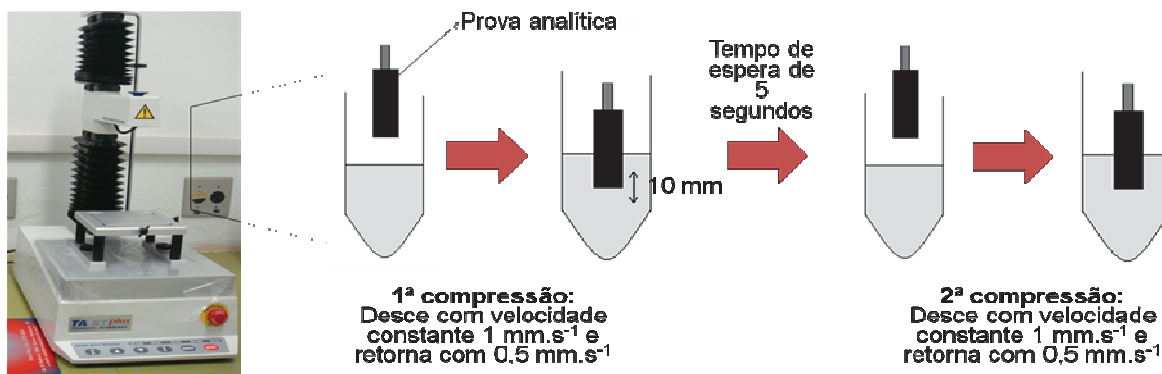
Este teste consiste em dois ciclos de compressão da amostra, resultando numa curva força $\times$ tempo com a qual é possível obter algumas características mecânicas de textura da amostra, como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão.

As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 3 minutos, para eliminação das bolhas de ar e tornar suas superfícies retas.

No modo TPA, a prova analítica (10 mm de diâmetro) desce a uma velocidade constante de 1 mm.s^{-1} , entra na amostra a uma profundidade definida (10 mm), e volta até a superfície a uma velocidade de $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$. Após este primeiro ciclo, a prova permanece em repouso por 5 segundos, quando então inicia a segunda compressão.

O ensaio foi realizado com as formulações sem fármaco, e nas mesmas formulações contendo 1% de fluconazol ou 0,005% de itraconazol, conforme o esquema representado na figura 8.

Figura 8. Esquema representativo do equipamento de análise do perfil de textura.

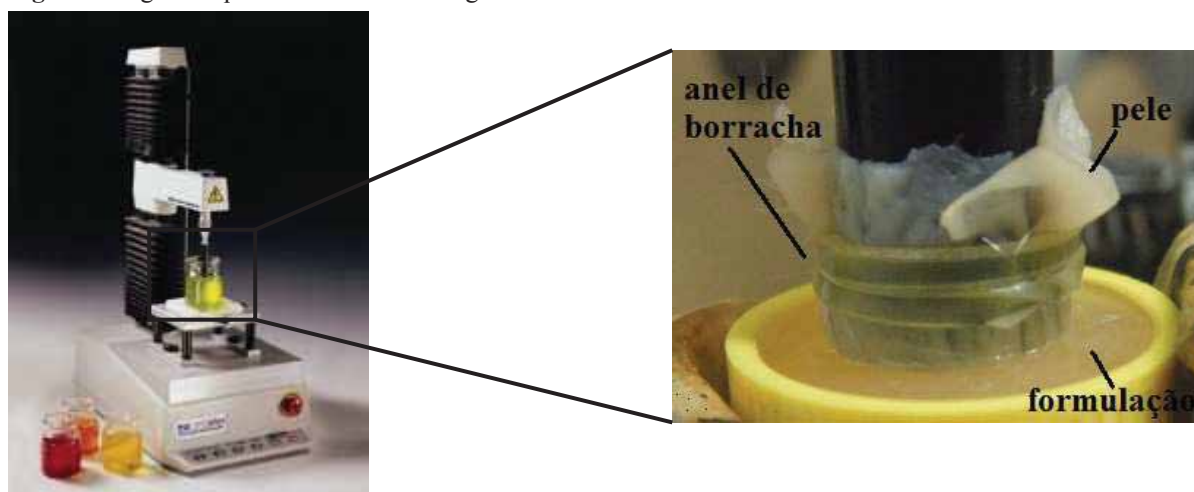


Para efeito de comparação, foi preparado um gel contendo o polímero Carbopol 974P[®] na concentração de 5% (C974P 5%), usando dispersor Ultra-Turrax[®], onde foi possível obter o gel de Carbopol na concentração pretendida, e a análise dos mesmos parâmetros foi feita, por ser um gel já muito utilizado e estudado (BLANCO-FLUENTE *et al.*, 1996).

3.4.3.6. Ensaio *in vitro* de bioadesão

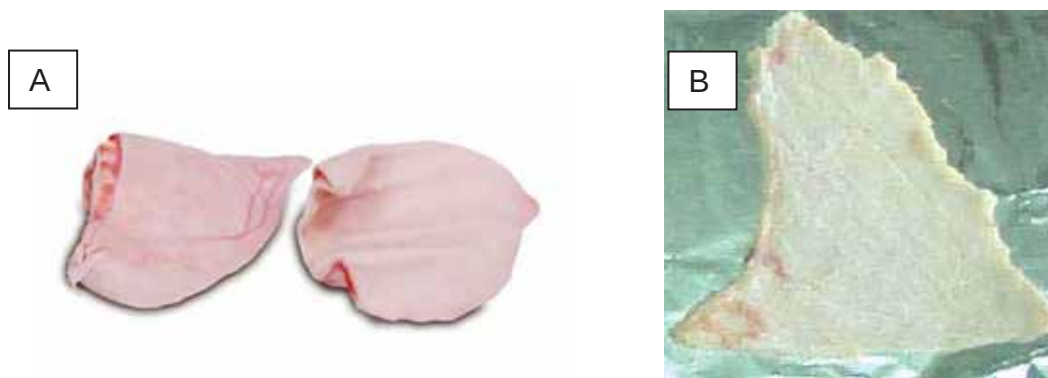
A bioadesão dos sistemas foi avaliada através da medida da força necessária para destacar a formulação mantida em contato com uma pele animal, utilizando para isso um analisador de textura TAXT *plus*.

Figura 9. Figura esquemática da metodologia de análise *in vitro* da bioadesão dos sistemas.



A pele utilizada foi obtida de porcos domésticos provenientes de abatedouro local (Figura 10.A.) e preparada segundo a metodologia adaptada de Dick e Scott (1992), em que as orelhas foram limpas e observadas quanto a presença de danos na pele. Após esta avaliação, a pele foi dissecada, separando-se a mesma da cartilagem, e depois separada do tecido adiposo dermatomizando a pele com auxílio de um dermatômetro, na espessura de 500 μm , retirando apenas o estrato córneo, epiderme e a camada mais externa da derme (Figura 10.B.). As peles foram congeladas por no máximo 4 semanas. Antes do ensaio, as peles foram hidratadas, os pêlos foram removidos com auxílio de uma tesoura, e foram fixadas na prova com o auxílio de um anel de borracha.

Figura 10. Orelhas de porco obtidas de abatedouro local (A). Orelhas dermatomizadas na espessura de 500 μm (B).



As formulações foram colocadas em recipientes e com auxílio de espátula, a superfície da formulação foi mantida lisa. A pele foi colocada na prova cilíndrica superior.

O teste para formulações viscosas foi feito com o sensor superior descendo até encontrar a amostra (detectada por uma força de gatilho de 2 mN) a uma velocidade constante de 1 mm.s^{-1} , e permanecendo em contato com a pele por 30 segundos. Nenhuma força foi aplicada durante a fase de contato. O sensor foi lentamente removido a uma velocidade constante de $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$ e a força necessária para destacar a amostra da pele foi determinada através da curva força *versus* tempo.

O teste para formulações líquidas foi feito com o sensor superior descendo uma altura pré-determinada (180 mm) até encontrar a amostra a uma velocidade constante de 1 mm.s^{-1} , e permanecendo em contato com a pele por 30 segundos. Nenhuma força foi aplicada durante a fase de contato. O sensor foi lentamente removido a uma velocidade constante de $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$ e a força necessária para destacar a amostra da pele foi determinada através da curva força pelo tempo. Esta técnica foi utilizada para medir o pico de força bioadesiva e o trabalho de adesão das microemulsões, cristais líquidos de fase lamelar, da fase oleosa separadamente (AO) e do tensoativo (PROC).

Os ensaios foram feitos utilizando também um tempo de contato de 60 segundos, a fim de avaliar a influência do tempo de contato sobre a força bioadesiva e do trabalho de adesão.

Para efeito de comparação, foi preparado um gel contendo o polímero Carbopol 974P[®] na concentração de 5% (C974P 5%), preparado conforme explicado no item anterior, por ser um gel já muito utilizado e estudado, além de ser reconhecidamente um material adesivo (BLANCO-FLUENTE *et al.*, 1996).

3.4.3.7. Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa Origin[®] versão 8.0. Os resultados do ensaio de incorporação, análise do perfil de textura e bioadesão foram comparados pelo teste estatístico de análise de variância (ANOVA) fator único, com nível de significância menor que 0,05. Para comparações individuais, foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey.

3.4.4. Toxicidade dérmica aguda

3.4.4.1. Teste Limite

O teste limite dos componentes das formulações foi feito com objetivo de avaliar a toxicidade dérmica aguda (TDA) destas substâncias em ratos machos Wistar adultos (250 – 300g), conforme *guideline* OECD 402. Estes testes foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara) conforme parecer nº 15/2009.

Para cada componente da formulação foram usados 5 animais; exceto para o controle positivo cloreto de benzalcônio, que foram usados 2 ratos, uma vez que o objetivo era observar a ocorrência de irritação e fazer uma comparação com os animais para os quais foram administrados os componentes das formulações.

Os animais foram mantidos 1 semana no biotério onde seria realizado o experimento para adaptação ao novo ambiente, a fim de que reações não relacionadas ao experimento ocorressem. Após este período os animais foram pesados e anestesiados com cetamina/xilasina (8:3) para facilitar a retirada dos pêlos da região dorso-caudal, procurando-se obter uma área de 4x5 cm (Figura 11).

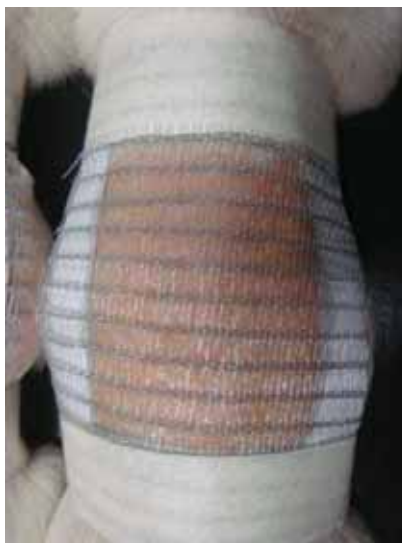
Figura 11. Área de 4x5 cm para aplicação dos componentes das formulações.



Os animais foram observados por um período de 24 horas para verificação da inexistência de qualquer descontinuidade na pele. Após este período, aplicou-se uniformemente a amostra, variando-se o volume conforme a massa do animal e a densidade da substância. As amostras foram: ácido oléico (AO), álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PROC), controle negativo propanol (PROP) e controle positivo cloreto de benzalcônio 15% (CB). Como as amostras são líquidas, foram administradas sem diluição com o auxílio de uma seringa, correspondendo à dose preconizada para o teste limite.

Após a aplicação da amostra, a região foi protegida por uma tela de nylon, evitando que o animal pudesse lamber a substância aplicada (Figura 12). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, por 14 dias, para observações de possíveis sinais de toxicidade.

Figura 12. Proteção de nylon após aplicação da amostra.



Durante este período, foram efetuadas observações periódicas no comportamento dos animais e, verificada a ocorrência de alterações na pele, de erupções e vermelhidão, olhos, membranas mucosas e também alterações respiratórias e na atividade somato-motora. Outros sinais como presença de tremor, convulsão, salivação, diarreia, letargia e coma foram observadas e devidamente registradas.

3.4.4.2. Teste de porcentagens

A toxicidade dérmica aguda de AO e PROC na concentração de 60% (600 mg.kg^{-1}) foi avaliada, pois apresentou leve alteração dos resultados na avaliação histológica do teste limite, sendo necessária uma diminuição da dose aplicada, na tentativa de verificar se haveria possibilidade de surgimento de toxicidade. A metodologia empregada foi a mesma do teste limite e foram utilizados 5 animais por grupo.

3.4.4.3. Toxicidade dérmica de dose repetida

A toxicidade dérmica de dose repetida foi avaliada com o objetivo de verificar se haveria o aparecimento de sinais de toxicidade após aplicações diárias da formulação.

Escolheu-se para este teste e os de liberação, permeação e retenção uma formulação com concentração intermediária de fase oleosa (AO3F) e contendo fluconazol como fármaco modelo. A formulação foi aplicada em ratos machos Wistar adultos (250 – 300g), conforme *guideline* OECD 410. Os procedimentos iniciais para a realização do ensaio foi relaizado conforme descrito no item 3.4.4.1.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, e este procedimento foi repetido por 21 dias, aplicando-se a formulação diariamente. Após este período, os animais foram mantidos em observação por mais 14 dias, a fim de se avaliar se os possíveis sinais de toxicidade são reversíveis ou não.

Além disso, durante este período, observou-se o comportamento dos animais e, verificou-se a ocorrência de alterações na pele, como erupções e vermelhidão, também alterações respiratórias e na atividade somato-motora. Outros sinais como presença de tremor, convulsão, salivação, diarreia, letargia e coma também foram observados.

Tabela 3. Composição da formulação selecionada para avaliação da toxicidade dérmica de dose repetida.

Componente	Composição da formulação selecionada (%)
Tensoativo	40,0
Ácido oléico	30,0
fluconazol	1,0
Água destilada	30,0

3.4.4.4. Escala de toxicidade dérmica aguda

Para classificações dos sinais clínicos de TDA, foi criada uma escala levando em conta, principalmente os escores baseados nas observações realizadas durante os experimentos.

Tabela 4. Escores baseados nas observações realizadas durante os ensaios de toxicidade dérmica.

Escores	Observações
0	Normal; animal com pele intacta, presença de pequenas manchas características da pele; constituição do epitélio sem alterações
1	Coceira, pele áspera e mais escurecida que as outras regiões ou com manchas
2	pequenas feridas formando escaras leves
3	escaras moderadas, feridas maiores e escurecidas
4	escaras graves, com aparente desprendimento de pele e ferida exposta

Figura 13. Fotografia representativa do escore 0.**Figura 14.** Fotografia representativa do escore 1.

Figura 15. Fotografia representativa do escore 2.



Figura 16. Fotografia representativa do escore 3.



Figura 17. Fotografia representativa do escore 4.



3.4.4.5. Análise estatística

As diferenças entre os dados observados (escores de toxicidade dérmica) foram analisadas estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney utilizando o programa Bioestat 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.4.4.6. Avaliação histológica

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina/cloridrato de ketamina e eutanasiados em câmara de CO_2 . As áreas tratadas nos ensaios de toxicidade aguda e dose repetida foram removidas, com tamanhos de cerca de 1 cm, e fixadas em solução de formaldeído 10% por 48 horas. As peças foram convenientemente tratadas para inclusão em parafina. Foram obtidos 5 cortes histológicos de 6 μm de profundidade para cada lâmina, sendo 5 lâminas por grupo. As lâminas foram processadas de forma a obter uma coloração em hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise histométrica e histopatológica.

3.4.4.6.1. Análise histométrica

Para a análise histométrica, imagens aleatórias foram captadas de cada corte por meio de um microscópio óptico. Trinta áreas foram escolhidas aleatoriamente e as espessuras da epiderme e da derme foram medidas. As áreas da epiderme escolhidas para análise eram planas, e a medida foi feita através da distância entre a membrana basal até a borda externa da camada córnea (POLACOW *et al.*, 2004). A partir dessas medidas, a correção do coeficiente micrométrico foi feita, considerando que foi utilizada objetiva de 20X, e obtida a média e o desvio padrão de cada grupo experimental. A análise estatística foi realizada utilizando-se teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido de Teste de Duns, usando software GraphPad Prism 5.0. O nível de significância considerado nos testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

3.4.4.6.2. Análise histopatológica

Esta análise permitiu quantificar o número de fibroblastos e leucócitos, utilizando-se um microscópio óptico. Obteve-se 5 cortes não seriados para cada grupo experimental, sendo obtidas 3 lâminas.

Quantificou-se 6 áreas por grupo experimental, sempre na região da derme papilar. Portanto, por animal, em cada tratamento, obteve-se uma área total de $30000 \mu\text{m}^2$. Obteve-se a média e o desvio padrão de cada tipo celular para cada tratamento. A análise estatística foi realizada utilizando-se teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido de Teste de Duns, usando software GraphPad Prism 5.0. O nível de significância considerado nos testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

3.4.5. Avaliação da liberação, permeação e retenção *in vitro* do fluconazol

3.4.5.1. Curva analítica de fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4

Para a obtenção da curva analítica, uma solução estoque contendo 1 mg.mL^{-1} de fluconazol em tampão fosfato monobásico 0,01M pH 7,4 foi preparada.

Diferentes alíquotas foram retiradas desta solução estoque, a fim de se obter concentrações finais de 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 150, 200 e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida, as soluções foram filtradas e analisadas por CLAE, usando todos os parâmetros cromatográficos do experimento relatado no item 3.4.3.3.1.1. A partir destes valores, construiu-se uma curva analítica, verificando-se a relação linear e o coeficiente de determinação.

3.4.5.2. Estudo de solubilidade do fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4

Este estudo foi realizado com o objetivo de garantir a condição *sink* do meio receptor durante os ensaios de liberação e permeação *in vitro*.

A concentração do soluto no meio nunca deve alcançar mais que 10 a 15 % de sua solubilidade máxima. Se tal parâmetro é mantido, o teste é dito estar sendo conduzido sob a condição *sink*, o que significa não estar sob influência do gradiente de concentração do fármaco na solução (GENNARO, 2000). Desta forma, foi feito este ensaio para comprovar a solubilidade do fluconazol em tampão fosfato monobásico 0,01 M pH 7,4.

Assim, soluções saturadas de fluconazol foram preparadas adicionando-se excesso de fármaco em 5 mL de tampão. As soluções foram agitadas em homogeneizador de sangue por 48 horas e em seguida foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos. Retirou-se uma alíquota de 100 µL das soluções e transferiu-se para um balão de 10 mL completando com tampão. Filtrou-se em membrana filtrante de 0,45 µm e avaliou-se as amostras contendo o fluconazol solubilizado por CLAE. Este experimento foi realizado em triplicata.

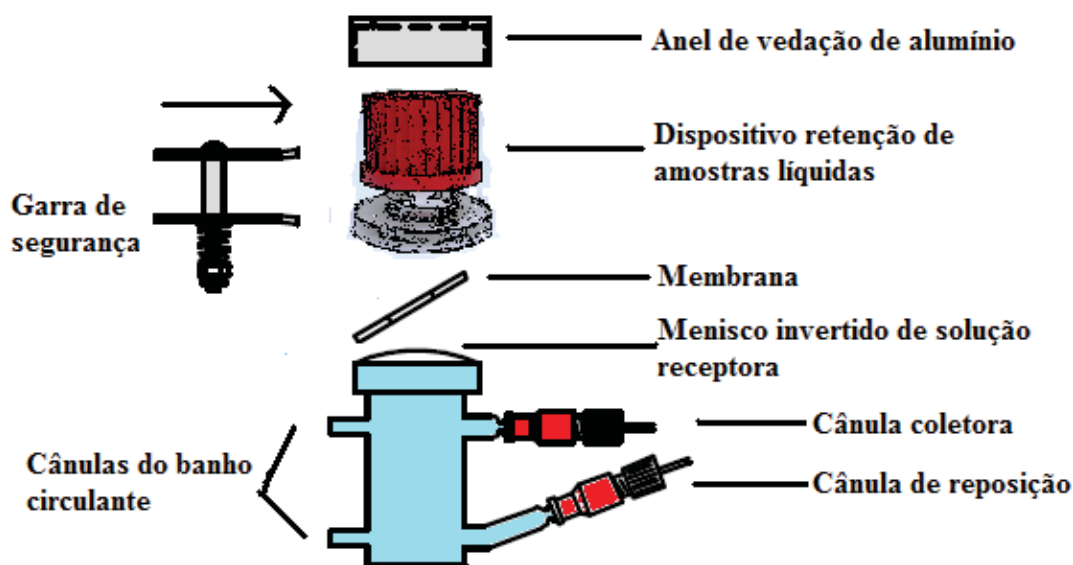
3.4.5.3. Liberação *in vitro*

A liberação do fluconazol a partir da formulação AO3 (Tabela 4) foi avaliada utilizando-se equipamento automatizado de permeação cutânea (Figura 18) e célula de difusão vertical (Figura 19). A solução receptora foi o tampão fosfato monobásico 0,01M pH 7,4 e a membrana utilizada foi a de acetato de celulose 0,45 µm. Foi feita também a liberação do fluconazol a partir de propilenoglicol e ácido oléico para efeito de comparação com a formulação selecionada, todas contendo 10 mg.g⁻¹ de fluconazol.

Figura 18. Equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation).



Figura 19. Figura esquemática da célula vertical de difusão (célula de Franz).



Todas as amostras selecionadas eram pouco viscosas, por isso utilizou-se um dispositivo para formulações líquidas como pode ser observado na figura 20. A quantidade de formulação adicionada foi aproximadamente 400 mg e a área de exposição de $1,77\text{cm}^2$.

Figura 20. Dispositivo utilizado para retenção de substâncias líquidas durante o ensaio de liberação e permeação *in vitro*.



Os experimentos foram conduzidos a 32°C e a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm, por meio de um placa magnética agitadora onde as células ficaram dispostas.

Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas, filtradas em membrana 0,45 µm e analisadas por CLAE para quantificação do fármaco liberado por tempo.

Um volume de 0,8 mL foi desprezado antes do início de cada coleta com a finalidade de evitar coleta de resquícios das coletas realizadas nos tempos anteriores do experimento. As alíquotas da coleta e os volumes desprezados foram repostos automaticamente e os valores utilizados nos cálculos da quantidade real liberada por tempo em função da área de exposição.

A equação 4 (USP, 2006), demonstrada abaixo, foi utilizada para calcular a quantidade real liberada/permeada (Q real) em determinado tempo:

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad (\text{Eq. 4})$$

Na qual:

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

C t = concentração obtida referente ao tempo t;

Vr = volume da solução receptora (7 mL)

Cc = concentração da amostragem anterior

Vc = volume amostrado (coletado + limpeza)

3.4.5.4. Permeação e retenção cutânea *in vitro*

Os ensaios de permeação e retenção cutânea *in vitro* do fluconazol nas amostras foram realizados usando pele de orelha de porco.

A metodologia de preparo da pele está descrita no item 3.4.3.6. As amostras utilizadas foram a formulação AO3F e a fase oleosa ácido oléico, ambas contendo 10 mg.g^{-1} de fluconazol.

Antes do ensaio, as peles foram hidratadas, e recortadas em tamanhos adequados para os ensaios de permeação cutânea. Em seguida, foram colocadas na célula de difusão, com o lado da derme voltado para baixo, ficando em contato com a solução receptora. Na região superior da pele foi adicionada a formulação ficando em contato com o estrato córneo.

Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições descritas no ensaio de liberação *in vitro*. Entretanto, a avaliação da permeação cutânea *in vitro* foi realizada durante 6 ou 12 horas. Os experimentos foram realizados em sextuplicata.

No experimento de retenção cutânea, após a realização do ensaio de permeação cutânea, utilizou-se a pele que ficou exposta por 6 ou 12 horas. Ao final do tempo, as peles foram retiradas da célula de difusão, removeu-se o excesso de formulação na pele com papel absorvente, e estas peles foram fixadas em superfície lisa e a área exposta à formulação ($1,44 \text{ cm}^2$) foi submetida à técnica de *tape stripping* (HOSMER *et al.*, 2009; LOPEZ *et al.*, 2003) para remoção do estrato córneo (EC) usando 16 fitas adesivas (Scotch 750 3M), para cada pele (ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2008).

As fitas foram colocadas em um tubo de ensaio contendo 5 mL de metanol, agitado em vórtex por 2 minutos e posteriormente colocado em lavadora ultrassônica por 30 minutos. A solução foi filtrada em membrana $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e avaliada por CLAE para quantificação do fármaco retido no EC.

A pele remanescente (epiderme+derme, E+D) foi cortada em tamanhos muito pequenos e colocadas num tubo de centrifuga contendo 5 mL de metanol, agitado em vórtex por 2 minutos, levado ao homogeneizador Turrax[®] por um minuto e em seguida para lavadora ultrassônica por 30 minutos.

Ao final, filtrou-se em membrana de 0,45 µm e quantificou-se por CLAE utilizando metodologia analítica descrita no item 3.4.5.1.

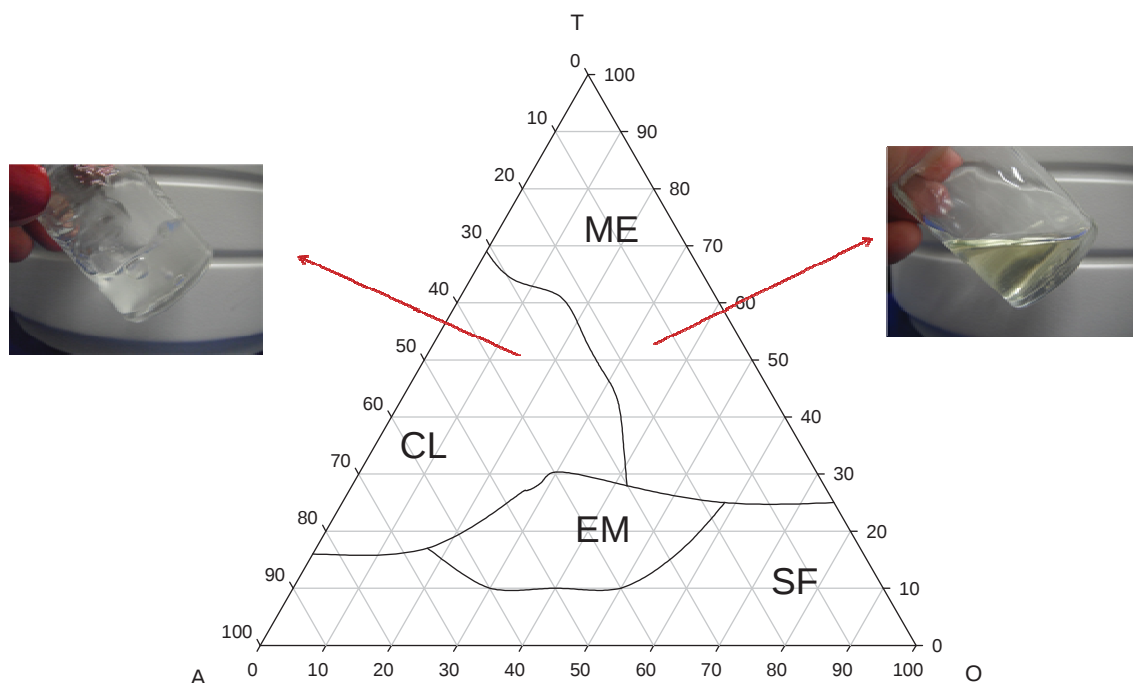
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do diagrama de fases

O diagrama de fases é uma ferramenta de fundamental importância na definição da composição da formulação que apresenta as propriedades mais apropriadas para um sistema de liberação. O diagrama ternário é constituído por três eixos que formam os três lados de um triângulo equilátero, cada qual representando de 0 a 100% de um dos componentes. Cada ponto corresponde a uma única composição, a qual é obtida pela sua extrapolação nos respectivos eixos (FORMARIZ *et al.*, 2005). As concentrações de cada componente da formulação em que se observou macroscopicamente a formação dos diferentes sistemas foram empregadas para delimitar as diferentes regiões existentes no diagrama.

Após a observação feita visualmente dos comportamentos de fases das formulações, foram feitos os cálculos das porcentagens de concentração de cada componente, e um diagrama ternário foi construído a partir destes dados. Primeiramente, obteve-se um diagrama de pontos e depois as regiões foram delimitadas, e obteve-se o diagrama de fases (Figura 21).

Figura 21. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP como tensoativo, ácido oléico como fase oleosa e água destilada. **ME** – microemulsão, **CL** – cristal líquido, **EM** – emulsão e **SF** – separação de fases.



Com os resultados, pode-se observar que utilizando apenas o álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PROC) como tensoativo foi possível obter sistemas com os mais variados tipos de organização, em ampla faixa de combinação de componentes. Neste trabalho, os sistemas opticamente transparentes líquidos foram considerados microemulsões, que são sistemas caracterizados pela presença de concentrações significativas de tensoativo. Os sistemas transparentes ou translúcidos com maior viscosidade foram considerados cristais líquidos, e os sistemas opacos foram identificados como emulsões. Sendo a formação desses sistemas dependente diretamente da concentração de tensoativo, pode-se observar que em pequenas concentrações, o tensoativo não consegue estabilizar a mistura dos componentes e ocorre separação das fases.

Com maiores concentrações do tensoativo, as misturas ficam mais estáveis e sistemas emulsionados passam a ser formados. Para a formação de microemulsões a adição de concentrações maiores de tensoativo, quando comparadas às concentrações utilizadas para estabilização de emulsões, foi necessária.

Em uma mesma concentração de tensoativo, variando apenas as concentrações dos outros componentes, diversas estruturas foram formadas, como na concentração de 40% de tensoativo, por exemplo, foi possível observar a formação de microemulsões com altas concentrações de ácido oleico, cristais líquidos em concentrações baixas e intermediárias de fase oleosa (10%).

4.2. Caracterização física dos sistemas coloidais

4.2.1. Formulações selecionadas para caracterização física

As formulações selecionadas para caracterização física encontram-se assinaladas no diagrama de fases apresentado na Figura 22. Foram selecionadas formulações com concentrações de tensoativo 40% com diferentes proporções de fases aquosa e oleosa (Tabela 5). As formulações contendo fluconazol (1%) foram denominadas apenas acrescentando um “F” (por exemplo, AO1F) e as formulações contendo itraconazol (0,005%) foram denominadas apenas acrescentando um “I” (por exemplo, AO1I).

Figura 22. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP como tensoativo, ácido oléico como fase oleosa e água destilada. Os pontos no diagrama representam as formulações selecionadas.

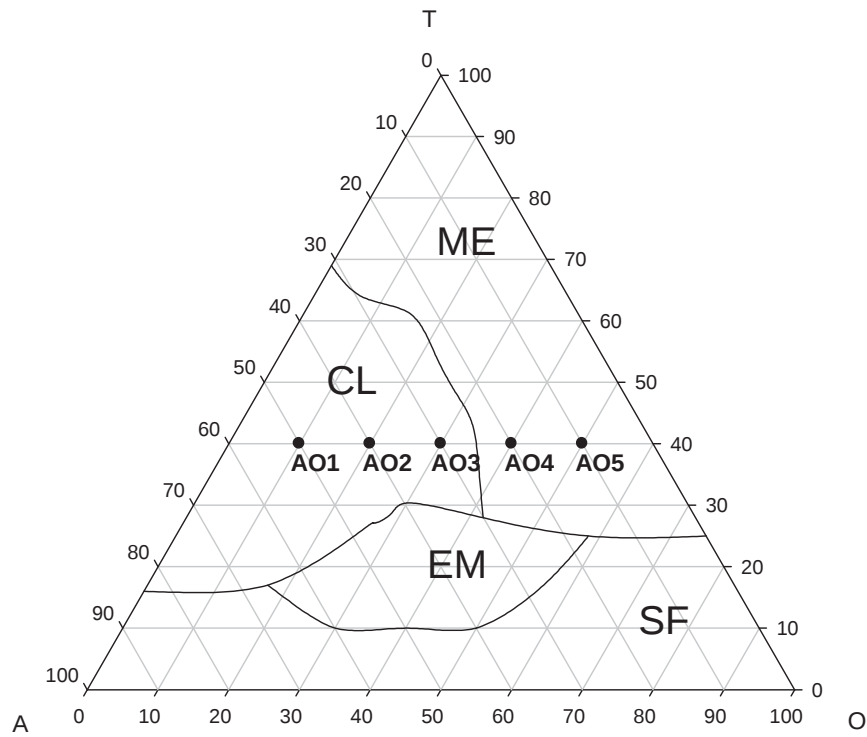


Tabela 5. Formulações selecionadas para caracterização física do sistema.

Composição (%)	AO1	AO2	AO3	AO4	AO5
Tensoativo	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Ácido oléico	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0
Água destilada	50,0	40,0	30,0	20,0	10,0

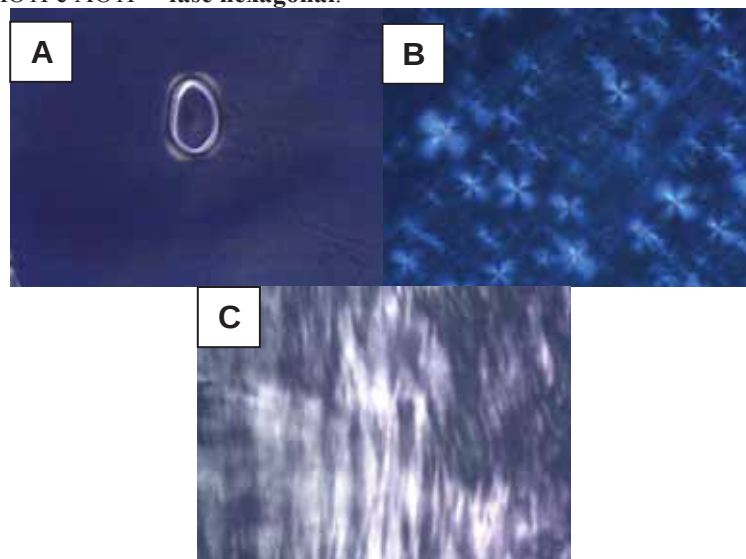
Estas formulações foram selecionadas, principalmente, por estarem em uma região de baixa concentração de tensoativo para evitar possíveis sinais de toxicidade que podem ser apresentados pelos tensoativos, além de ser uma região que ainda apresenta estabilidade.

4.2.2. Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma técnica que possibilita a classificação quanto à isotropia e anisotropia dos sistemas, permitindo diferenciar microscopicamente os tipos de estruturação. Os sistemas isotrópicos são aqueles que não desviam luz sob o plano de luz polarizada, e os anisotrópicos desviam luz sob o plano de luz polarizada (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 2003).

A figura 23 (A) representa o comportamento isotrópico (campo escuro) apresentado pela formulação AO4, AO4I, AO4F, AO5, AO5I e AO5F. Como as ME, emulsões e CL de fase cúbica apresentam comportamento isotrópico, puderam ser diferenciados visualmente visto que, as ME são sistemas transparentes, as emulsões apresentam-se opacas, e os sistemas de estrutura cúbica apresentam-se transparentes ou translúcidos e muito viscosos. A figura 23 (B) mostra o comportamento anisotrópico das formulações AO2, AO2I, AO2F, AO3, AO3I e AO3F, apresentando cruzes de malta, característica de fase lamelar. Na fotomicrografia referente às formulações AO1, AO1I e AO1F observa-se a presença de estrias, característica de fase hexagonal (Figura 23 C).

Figura 23. Fotomicrografias representativas das formulações: (A) AO4, AO4I, AO4F, AO5, AO5I e AO5F - **campo escuro**; o objeto mostrado é uma bolha de ar. (B) AO2, AO2I, AO2F, AO3, AO3I e AO3F – **fase lamelar**, (C) AO1, AO1I e AO1F – **fase hexagonal**.



Observou-se que independentemente da adição do fluconazol ou do itraconazol, não houve alteração estrutural aparente nas formulações estudadas, como pode ser melhor visualizado na tabela 6.

Tabela 6. Comportamento observado em MLP das formulações sem fármaco e contendo 1% de fluconazol ou 0,005% de itraconazol.

<i>Formulações</i>	<i>Comportamento observado em MLP</i>		
	Sem fármaco	Contendo 1% de fluconazol	Contendo 0,005% de itraconazol
AO1	estrias*	estrias	estrias
AO2	cruzes de Malta**	cruzes de malta	cruzes de malta
AO3	cruzes de Malta	cruzes de malta	cruzes de malta
AO4	isotrópico***	isotrópico	isotrópico
AO5	isotrópico	isotrópico	isotrópico

*CL de fase hexagonal; ** CL de fase lamelar; *** ME ou CL de fase cúbica

A manutenção estrutural destes sistemas quando o fármaco foi incorporado é de grande importância, pois mostra que o fármaco não interferiu nas características do sistema, facilitando o desenvolvimento de uma plataforma para a liberação destes fármacos.

4.2.3. Comportamento reológico

O comportamento reológico descreve a deformação ou o escoamento de um sólido, líquido ou gás quando submetido a uma tensão, sob determinadas condições termodinâmicas ao longo de um intervalo de tempo (SCHRAMM, 2006).

As características reológicas de um produto estão associadas a aspectos de absorção e biodisponibilidade de um fármaco, bem como a escolha dos equipamentos a serem usados na sua produção e embalagens utilizadas no acondicionamento (NETZ; ORTEGA, 2002).

Na área farmacêutica, os comportamentos reológicos são utilizados para caracterizar a facilidade com que o material pode ser retirado de um frasco, o bombeamento de um produto do equipamento em um processo industrial, o espalhamento de um creme ou loção sobre a pele, entre outras (ALMEIDA; BAHIA, 2003; SCHOTT, 2000; WOOD, 2001).

4.2.3.1. Fluxo e Viscosidade

A avaliação da viscosidade e do comportamento reológico de produtos semi-sólidos permite compreender a natureza físico-química do sistema, controla a qualidade de produtos acabados, e ainda, através desses estudos pode-se verificar o efeito da consistência do produto nas características de liberação e penetração cutânea de substâncias ativas (LEONARDI, 2004).

A viscosidade representa a resistência do fluido ao fluxo, quanto maior a viscosidade, maior a resistência, e esta é dada pela razão entre a tensão de cisalhamento aplicada e o gradiente de cisalhamento, sendo diretamente proporcional à temperatura (WOOD, 2001).

Quando há uma relação linear direta entre a tensão e taxa de cisalhamento, os fluidos são chamados de Newtonianos, isto é, não é afetado pelas alterações da taxa de cisalhamento. Quando não há proporcionalidade entre tais parâmetros, os fluidos são não-Newtonianos, podendo ser plásticos, pseudoplásticos ou dilatantes (SCHRAMM, 2006).

Estes resultados foram empregados na construção de gráfico de taxa de cisalhamento vs. tensão de cisalhamento. A tensão de cisalhamento é uma força que aplicada tangencialmente na interface entre a placa e o líquido gera um fluxo. O fluxo laminar é uma camada fina de líquido que desliza sobre a outra, e o gradiente de velocidade de escoamento é chamado de taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2006).

As figuras 24 a 28 apresentam os resultados do comportamento reológico das formulações selecionadas descritas na tabela 5, com e sem fármacos.

Figura 24. Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO1, AO1F e AO1I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.

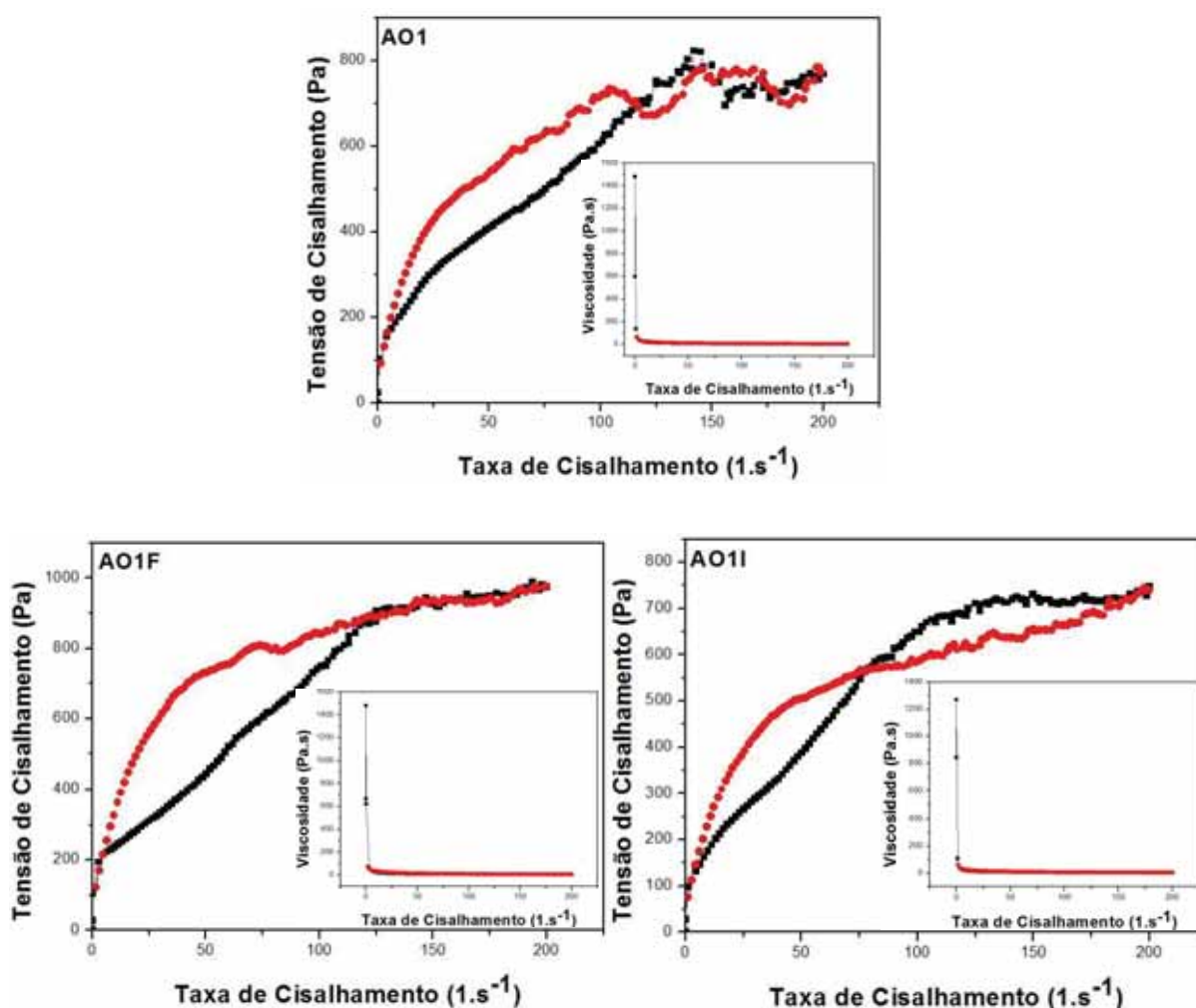


Figura 25. Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO2, AO2F e AO2I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.

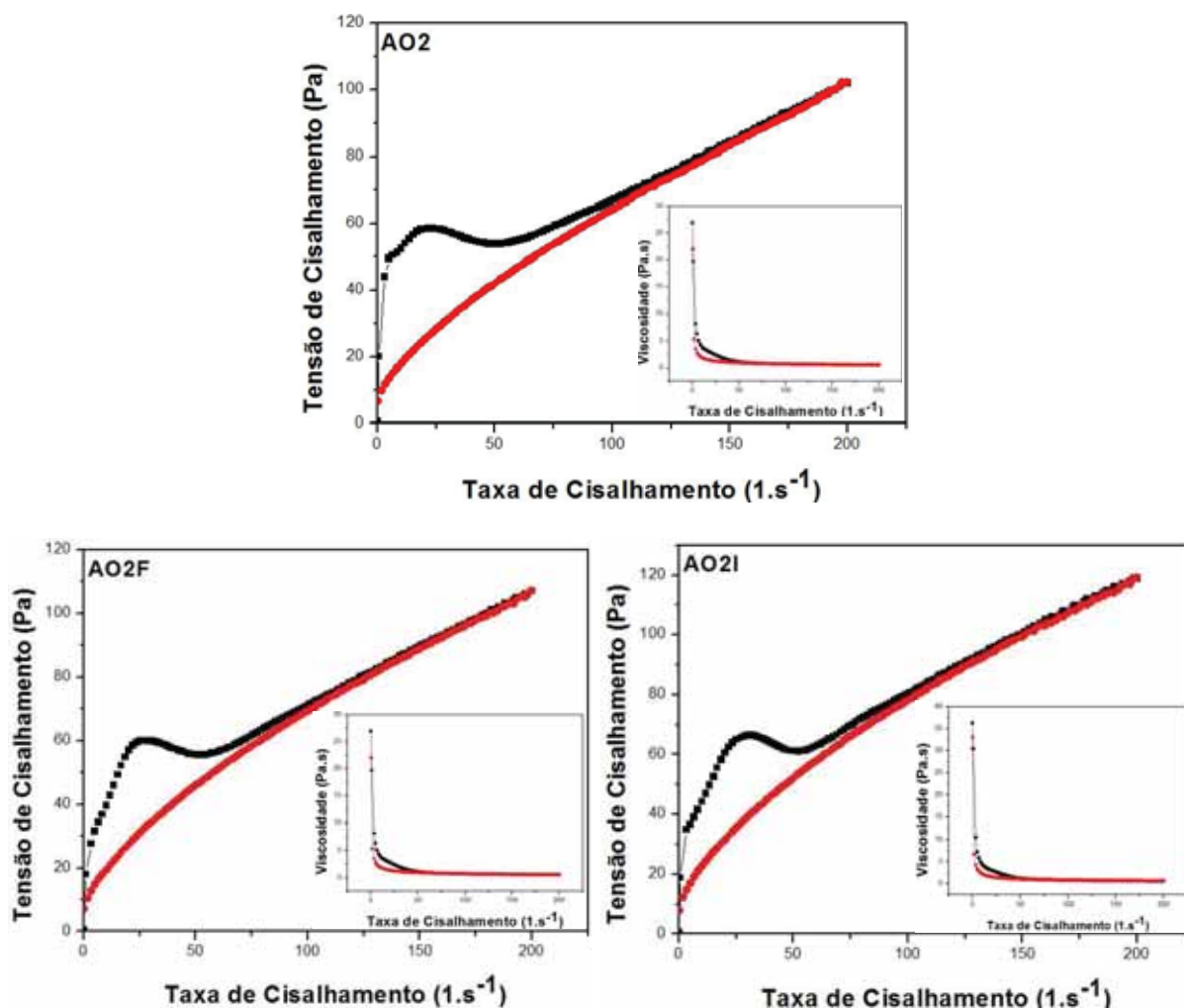


Figura 26. Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO3, AO3F e AO3I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.

The figure shows a single subplot for formulation AO3. The y-axis is 'Tensão de Cisalhamento (Pa)' ranging from 0 to 80. The x-axis is 'Taxa de Cisalhamento (1.s⁻¹)' ranging from 0 to 200. The plot includes an inset showing 'Viscosidade (Pa.s)' on the y-axis (0 to 40) versus 'Taxa de Cisalhamento (1.s⁻¹)' on the x-axis (0 to 200). The main plot shows two curves: a black curve with square markers (■) for the 'ida' (upward) curve and a red curve with circle markers (●) for the 'volta' (downward) curve. The black curve starts at approximately 10 Pa at 0 s⁻¹ and rises to about 80 Pa at 200 s⁻¹. The red curve starts at 0 Pa at 0 s⁻¹ and rises to about 80 Pa at 200 s⁻¹.

Gabriela Marielli da Luz

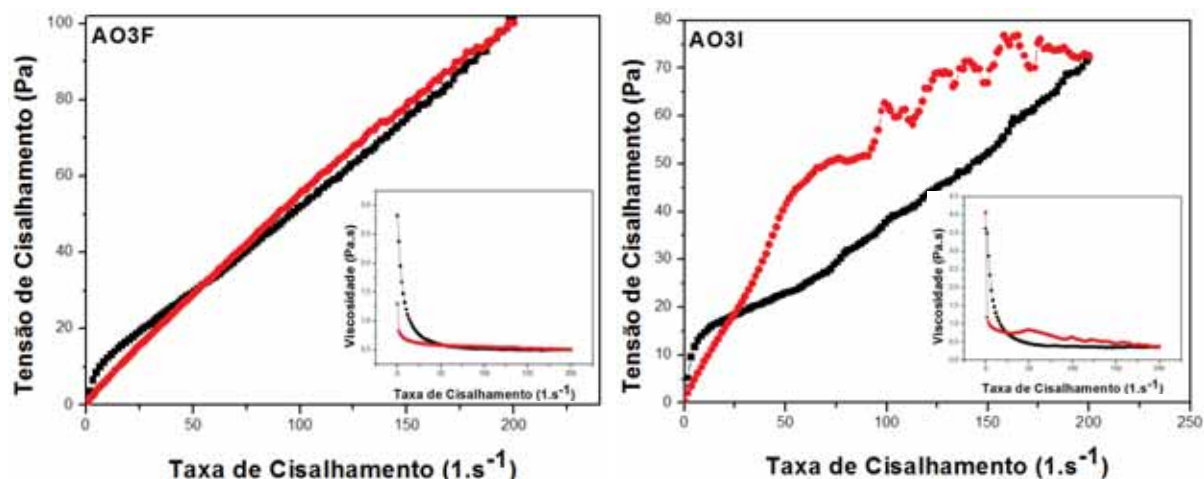


Figura 27. Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO4, AO4F e AO4I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.

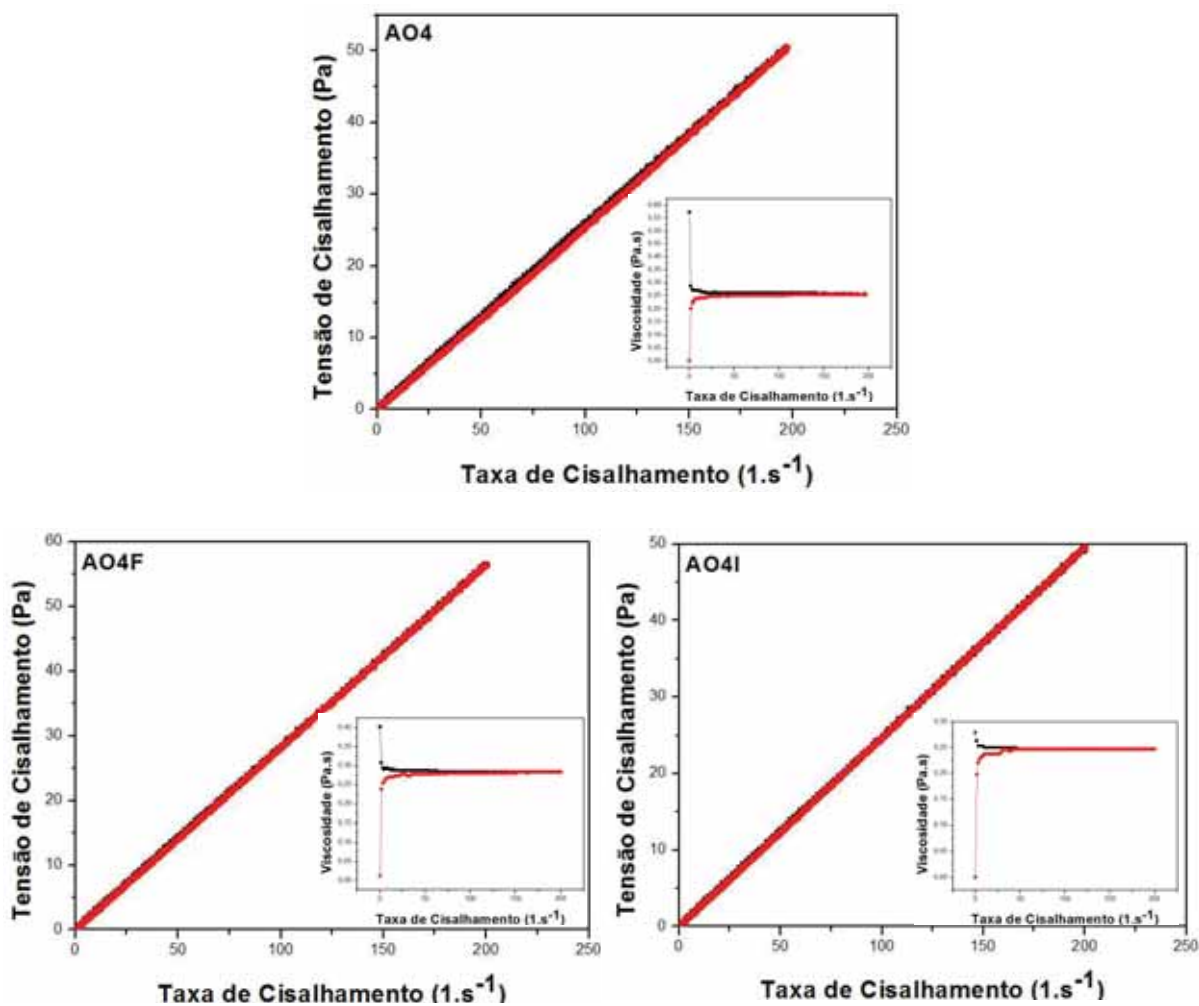
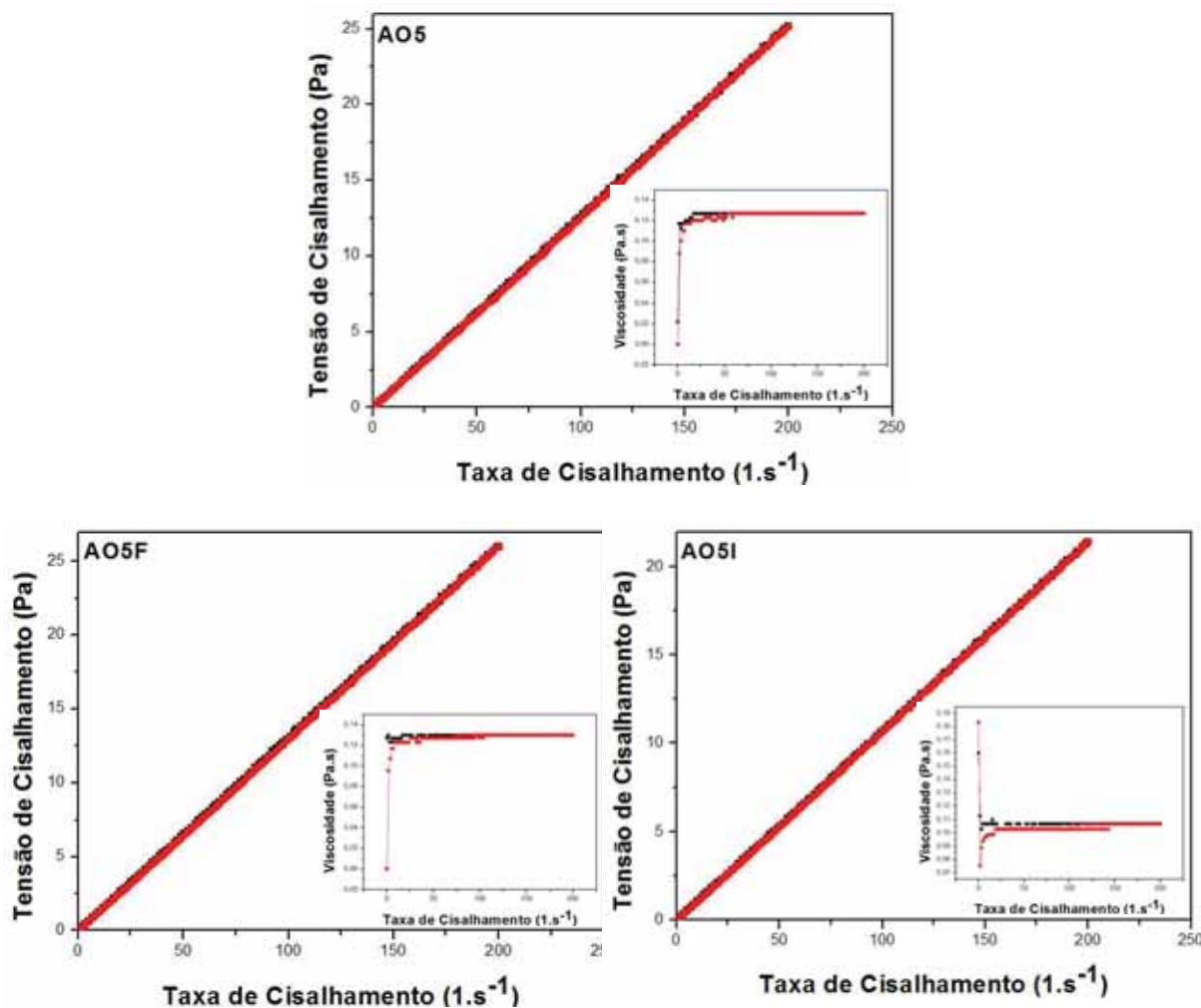


Figura 28. Reogramas de fluxo e viscosidade das formulações AO5, AO5F e AO5I. O símbolo ■ representa a curva de ida e o símbolo ● representa a curva de volta.



Pode-se observar que as formulações com comportamento Newtoniano, que são todas as microemulsões (AO4, AO4F, AO4I, AO5, AO5F e AO5I) não apresentaram alteração do comportamento com a adição do fármaco. Também observou-se que as viscosidades destas formulações permaneceu constante com o aumento da taxa de cisalhamento.

As formulações AO3, AO3F e AO3I são cristais líquidos de fase lamelar, e que apresentam baixa viscosidade e comportamento semelhante ao Newtoniano, no entanto apresentaram tixotropia. As formulações AO2, AO2F e AO2I apresentaram resistência ao fluxo ("yield value"), isto é, comportam-se como sólido quando em repouso, mas fluem após a aplicação de uma força.

Já, as formulações AO1, AO1F e AO1I também são formulações pseudoplásticas, cuja viscosidade diminui durante a aplicação de uma tensão, mas recuperam as suas características após cessada a tensão. Esta característica é interessante para aplicação na área farmacêutica, pois facilita a saída do produto através do frasco de acondicionamento.

4.2.3.2. Análise Oscilatória por Varredura de Frequência

A análise oscilatória por varredura de frequência oferece diversas informações sobre a estrutura do material através de uma deformação mínima do mesmo (SEARS; ZEMANSKY, 1971; GRAESSLEY, 1984). A relação de fase entre as ondas de tensão aplicada e a deformação resultante fornece informações sobre os tipos de resposta (elástica ou viscosa) da amostra (GRAESSLEY, 1984, SEARS; ZEMANSKY, 1971).

O termo viscoelasticidade é usado para descrever comportamento de materiais, os quais apresentam comportamento intermediário entre os elásticos clássicos extremos, que são chamados de sólidos Hookeanos e líquidos Newtonianos (SEARS; ZEMANSKY, 1971).

Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') obtidos pela análise oscilatória por varredura de frequência estão representados nas Figuras 29 a 33. Nos gráficos são apresentados os valores de G' e G'' de cada amostra obtidos nas formulações sem fármaco e com fármaco, a fim de comparar as propriedades viscoelásticas de cada amostra.

Figura 29. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO1, AO1F e AO1I.

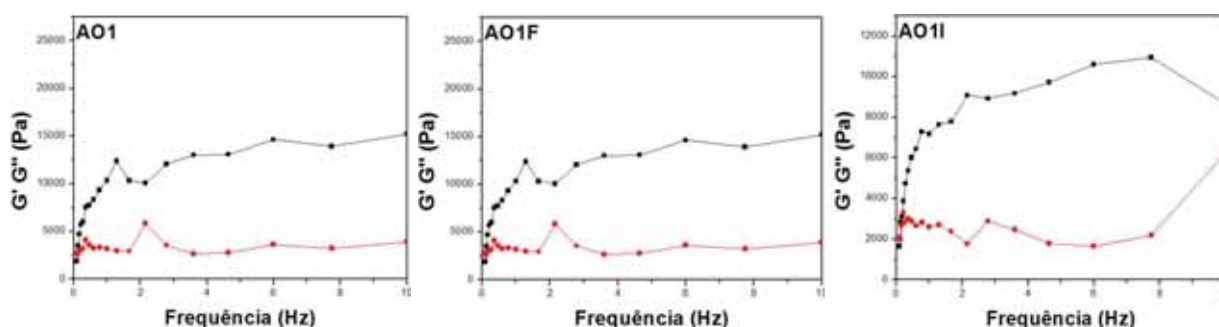


Figura 30. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO2, AO2F e AO2I.

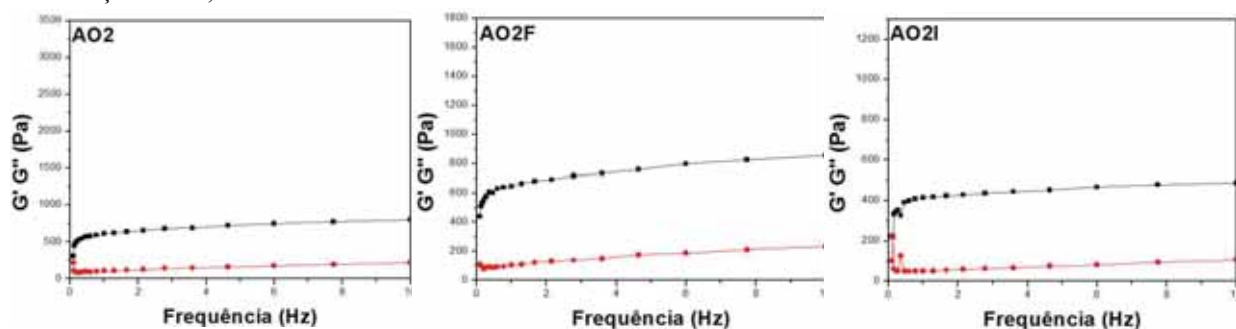


Figura 31. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO3, AO3F e AO3I.

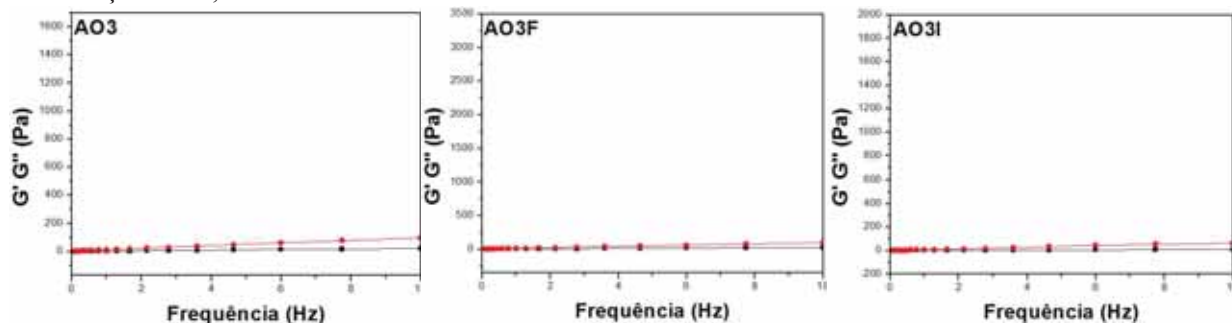


Figura 32. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO4, AO4F e AO4I.

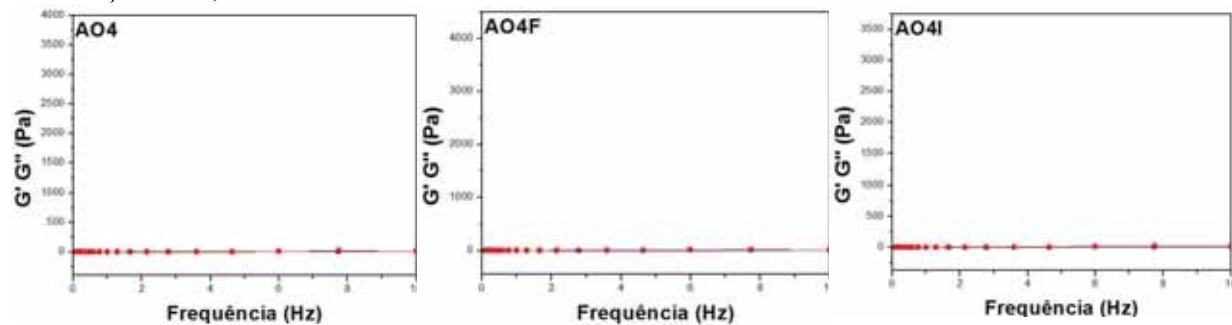
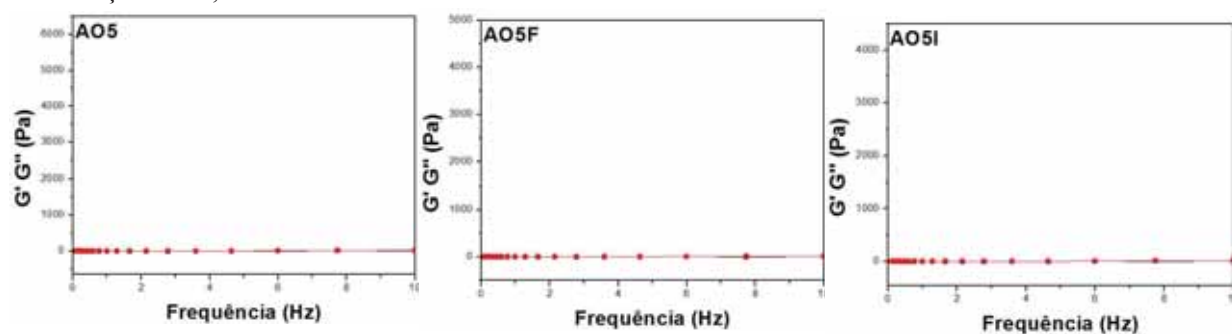


Figura 33. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO5, AO5F e AO5I.



Todos os cristais líquidos apresentaram comportamento elástico predominante, representado por valores de G' maiores que G'' . Este predomínio significa que toda a energia é armazenada durante a deformação e é liberada quando a tensão é cessada. Esta característica pode facilitar a aplicação cutânea da formulação, pois com a deformação facilita-se a aplicação destes sistemas, e com a reestruturação, esta formulação é mantida em contato com a pele.

Observando os reogramas obtidos, verificou-se que as formulações com estruturas micelares (AO4, AO4F, AO4I, AO5, AO5F e AO5I), não tiveram diferença entre os módulos viscoso e elástico, além disso, a magnitude destes módulos foi zero, sugerindo o equilíbrio entre os módulos, o que também pode ser utilizado para confirmação do comportamento Newtoniano destas formulações. Observou-se que a adição dos fármacos não alterou o comportamento reológico dos sistemas.

4.2.3.3. Análise Oscilatória por Varredura de Temperatura

A varredura de temperatura foi feita a fim de que o comportamento do sistema seja avaliado em diferentes temperaturas. Os resultados estão apresentados nas Figuras 34 a 38.

Figura 34. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO1, AO1F e AO1I.

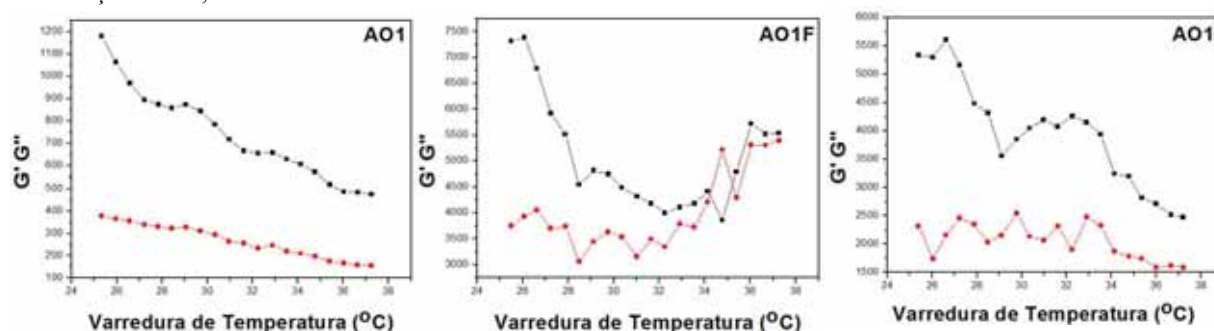


Figura 35. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO2, AO2F e AO2I.

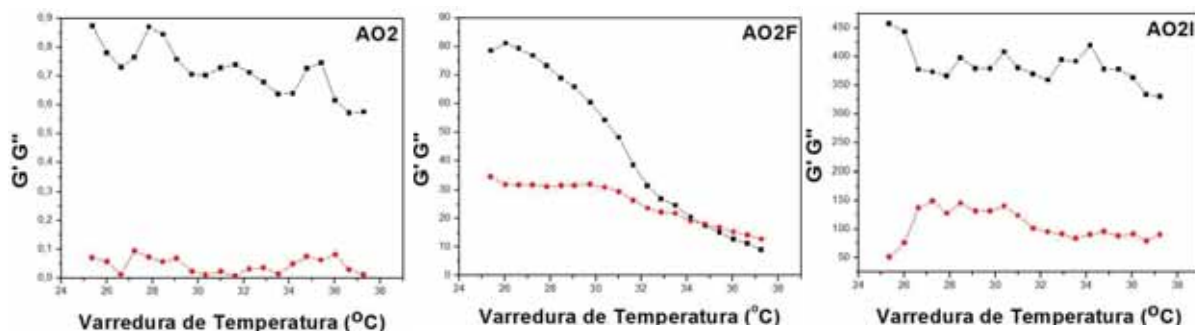


Figura 36. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO3, AO3F e AO3I.

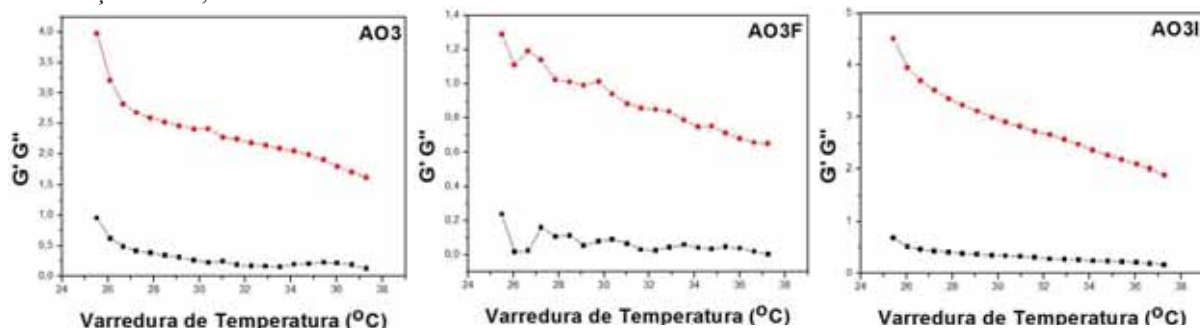


Figura 37. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO4, AO4F e AO4I.

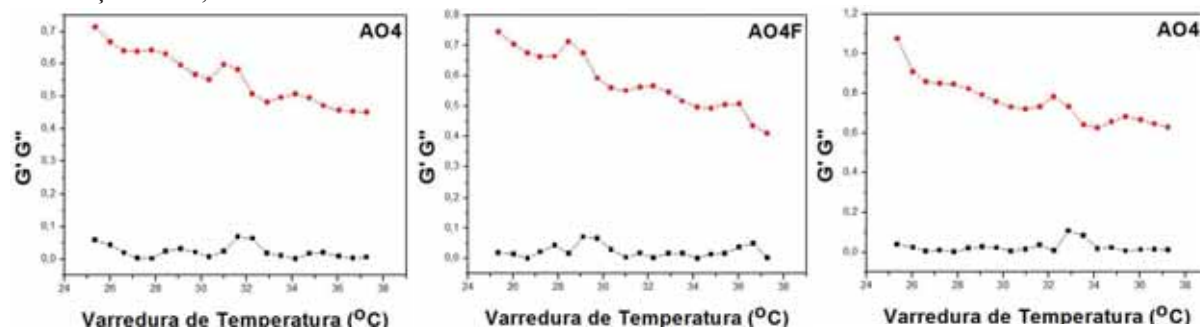
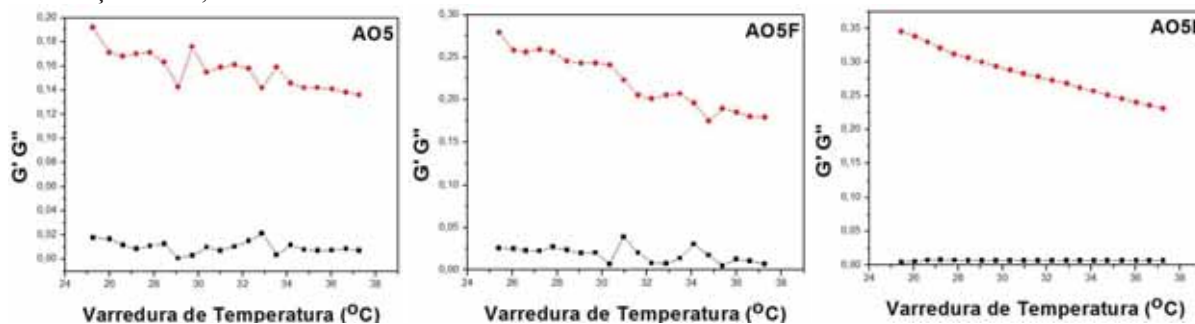


Figura 38. Reogramas da evolução dos módulos de armazenamento G' (■) e de perda G'' (●) das formulações AO5, AO5F e AO5I.



Os módulos de perda foram predominantes nas formulações AO3, AO3F, AO3I, AO4, AO4F, AO4I, AO5, AO5F e AO5I, mostrando que não há armazenamento de energia de tensão com o aumento da temperatura. As demais formulações apresentaram o módulo de armazenamento predominante. Os módulos predominantes, em todas as formulações, mostraram que um decaimento conforme o aumento da temperatura.

4.2.4. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol

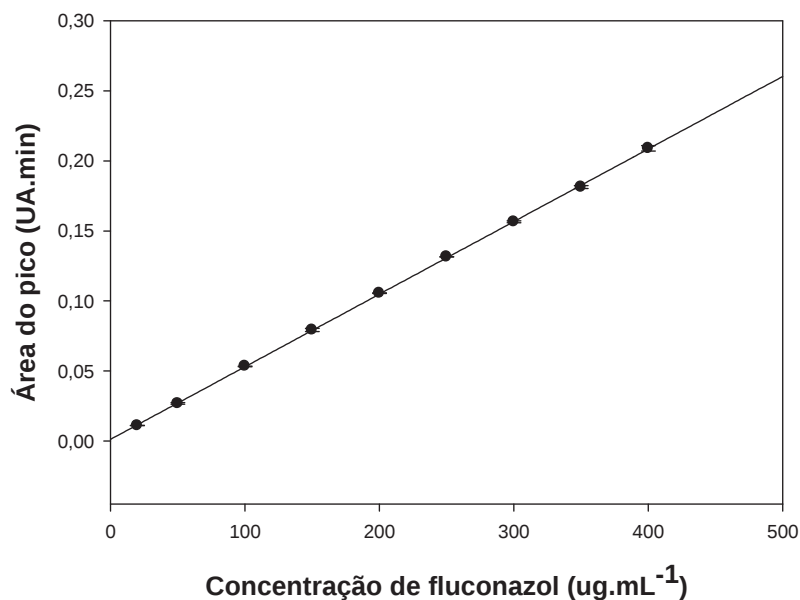
4.2.4.1. Linearidade

A curva analítica do fluconazol em metanol foi obtida através de análises cromatográficas, em triplicata, em $\lambda = 210$ nm. A equação representativa da regressão linear foi $y = 0,0005x + 0,0012$, com coeficiente de determinação de 0,9999.

Tabela 7. Valores da média das áreas dos picos das soluções de fluconazol obtidas por análises cromatográficas no comprimento de onda de 210 nm, desvio padrão e coeficiente de variação.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área dos picos (UA.min)	Desvio Padrão	CV (%)
20	0,011087	0,00015	1,327
50	0,026787	0,00057	2,119
100	0,053352	0,00028	0,525
150	0,079218	0,00113	1,424
200	0,105514	0,00025	0,235
250	0,131502	0,00006	0,048
300	0,156485	0,00072	0,459
350	0,181283	0,00106	0,586
400	0,208915	0,00200	0,959

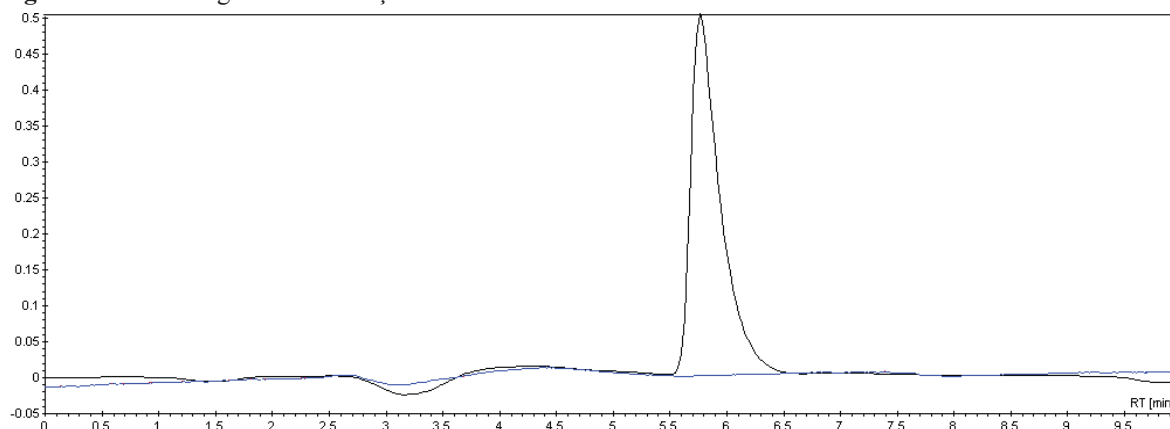
Figura 39. Curva padrão do fluconazol obtida por análise cromatográfica em 210 nm, $y = 0,0005x + 0,0012$, $r^2 = 0,9999$.



Pode-se observar que o método é linear, pois apresentou coeficiente de determinação superior a 0,99 (BRASIL, 2003). A partir dessa equação e do valor da área do pico das soluções (Tabela 7) foi possível calcular a quantidade de fármaco incorporado nas formulações.

4.2.4.2. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas da solução estoque contendo o fármaco e fase móvel (Figura 40). No tempo de retenção relacionado com o fármaco (aproximadamente 6 minutos) não se observou nenhuma interferência da matriz, como pode ser observado nos cromatogramas comparativos a seguir, mostrando que o método é específico nestas condições.

Figura 40. Cromatogramas da solução contendo o fármaco fluconazol e fase móvel.

4.2.4.3. Exatidão

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação. Os resultados referem-se à média de três determinações para cada concentração (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados obtidos nos testes de recuperação para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol.

<i>Concentração de padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Recuperado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)*</i>	<i>Recuperação (%)</i>
20	19,8	99,12
200	203,94	101,97
400	405,44	101,21

* Os dados representam a média e o desvio padrão das três determinações.

A recuperação ficou entre 99 e 102%, dentro do limite permitido pela ANVISA que é de 80 a 120%, refletindo um método exato (BRASIL, 2003).

4.2.4.4. Precisão

Os resultados dos ensaios de precisão interdia foram expressos como desvio padrão e coeficiente de variação (CV) de amostragens feitas em dias diferentes de ensaio e podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Coeficientes de variação obtidos nos testes de precisão interdia para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol, nas concentrações de 20, 200, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

<i>Parâmetros</i>	<i>Solução de fluconazol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>		
Média*	19,68	207,29	413,11
Desvio padrão	0,26	1,70	6,85
Coeficiente de variação (%)	1,32	0,82	1,66

* Corresponde a três determinações.

Os resultados dos ensaios de precisão intradia foram expressos como desvio padrão e coeficiente de variação (CV) de amostragens feitas no mesmo dia de ensaio e podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10. Coeficientes de variação obtidos nos testes de precisão intradia para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol, nas concentrações de 20, 200, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

<i>Parâmetros</i>	<i>Solução de fluconazol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>		
Média*	19,52	205,33	405,45
Desvio padrão	0,22	0,47	3,16
Coeficiente de variação (%)	1,12	0,23	0,78

* Corresponde a três determinações.

Os valores de CV devem ser menores que 5% de acordo com a Resolução da ANVISA (BRASIL, 2003). Como todos os valores de CV ficaram inferiores ao limite, pode-se concluir que o método é preciso.

4.2.4.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação.

Tabela 11. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do fluconazol.

<i>Parâmetros</i>	<i>Resultados</i>
Desvio padrão médio (σ)	$9,02 \cdot 10^{-6}$
Inclinação da curva padrão (S)	$5,3 \cdot 10^{-4}$
Limite de Detecção ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,057
Limite de Quantificação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,172

* Os dados representam a média e desvio padrão de três determinações.

Verificou-se que as concentrações utilizadas na curva estão superiores aos LD e LQ.

4.2.5. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para avaliação da incorporação do itraconazol.

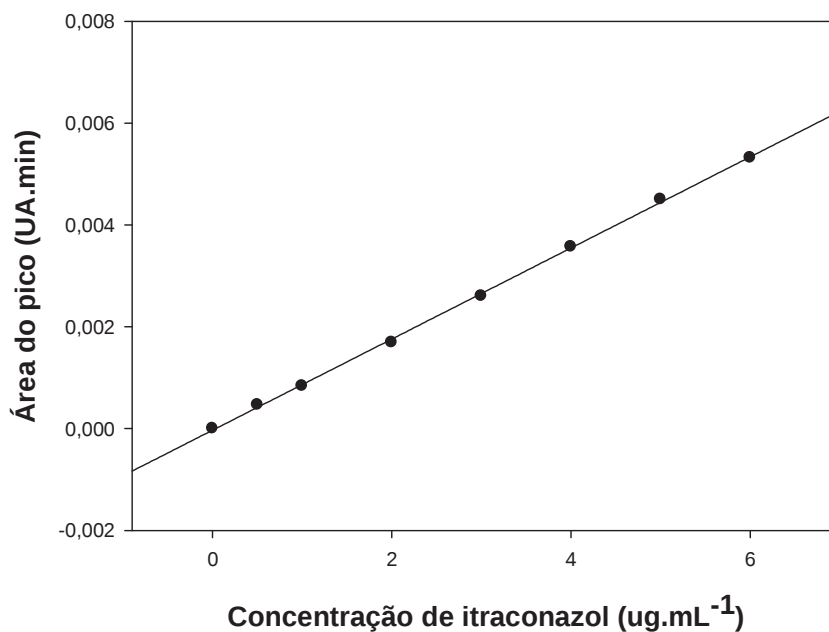
4.2.5.1. Linearidade

A curva analítica do itraconazol em metanol foi obtida através de análises cromatográficas, em triplicata, em $\lambda = 263$ nm. A equação representativa da regressão linear foi $y = 0,0009x - 0,00003$, com coeficiente de determinação de 0,9994.

Tabela 12. Valores das áreas dos picos das soluções de itraconazol obtidas por análises cromatográficas no comprimento de onda de 263 nm, média de três determinações, desvio padrão e coeficiente de variação.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área dos picos (UA.min)	Desvio Padrão	CV (%)
20	0,000465	0,000003	0,568979
50	0,000838	0,000004	0,419246
100	0,001689	0,000053	3,148239
150	0,002606	0,000048	1,831447
200	0,003572	0,000044	1,240363
250	0,004502	0,000004	0,092484
300	0,005319	0,000081	1,52518

Figura 41. Curva padrão do itraconazol obtida por análise cromatográfica em 263 nm ($n=3$), $y = 0,0009x - 0,00003$, $r^2 = 0,9994$.

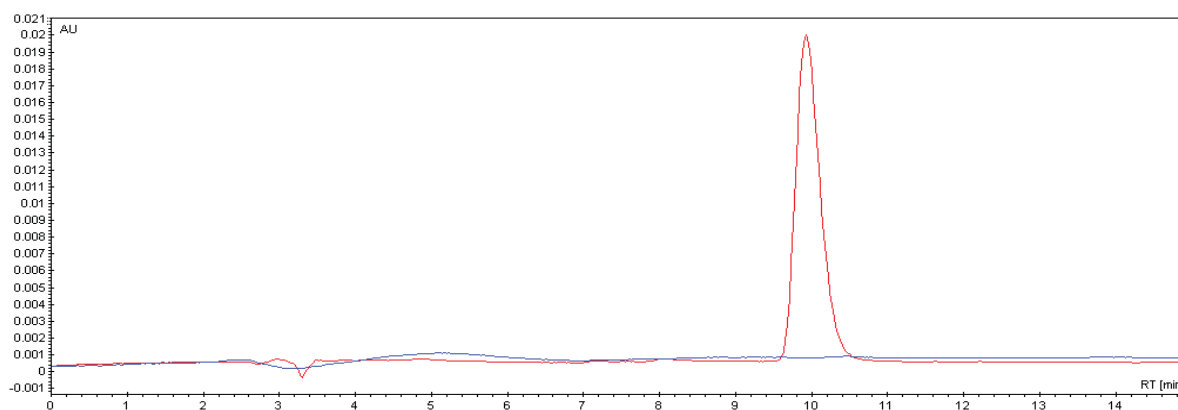


Pode-se observar que o método é linear, pois apresentou coeficiente de determinação superior a 0,99 (BRASIL, 2003). A partir da equação e do valor da área do pico das soluções (Tabela 12) foi possível calcular a quantidade de fármaco incorporado nas formulações.

4.2.5.2. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas da solução estoque contendo o fármaco e fase móvel (Figura 42). No tempo de retenção relacionado com o fármaco (aproximadamente 10 minutos) não se observou nenhuma interferência da matriz, como pode ser observado nos cromatogramas comparativos a seguir:

Figura 42. Cromatogramas da solução contendo o fármaco itraconazol e fase móvel.



A figura mostra que não há interferência da fase móvel no pico de detecção do fármaco, mostrando que o método é específico nestas condições.

4.2.5.3. Exatidão

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação. Os resultados referem-se à média de três determinações para cada concentração (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados obtidos nos testes de recuperação para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do itraconazol.

<i>Concentração de padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Recuperado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)*</i>	<i>Recuperação (%)</i>
0,5	0,47	94,59
3,0	2,92	97,23
6,0	5,95	99,12

* Os dados representam a média e o desvio padrão das três determinações.

A recuperação ficou entre 99 e 102%, dentro do limite permitido pela ANVISA que é de 80 a 120%, refletindo um método exato (BRASIL, 2003).

4.2.5.4. Precisão

Os resultados dos ensaios de precisão interdia foram expressos como desvio padrão e coeficiente de variação (CV) de amostragens feitas em dias diferentes de ensaio e podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14. Coeficientes de variação obtidos nos testes de precisão interdia para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do itraconazol, nas concentrações de 0,5, 3,0, 6,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

<i>Parâmetros</i>	<i>Solução de itraconazol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>		
Média*	0,43	2,78	5,81
Desvio padrão	0,01	0,02	0,07
Coeficiente de variação (%)	2,53	0,60	1,26

* Corresponde a três determinações.

Os resultados dos ensaios de precisão intradia foram expressos como desvio padrão e coeficiente de variação (CV) de amostragens feitas no mesmo dia de ensaio e podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15. Coeficientes de variação obtidos nos testes de precisão intradia para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do itraconazol, nas concentrações de 0,5, 3,0, 6,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

<i>Parâmetros</i>	<i>Solução de itraconazol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>		
Média*	0,46	2,93	5,92
Desvio padrão	0,01	0,00	0,03
Coeficiente de variação (%)	1,19	0,02	0,45

* Corresponde a três determinações.

Os valores de CV devem ser menores que 5% de acordo com a Resolução da ANVISA (BRASIL, 2003). Como todos os valores de CV ficaram inferiores ao limite, pode-se concluir que o método é preciso.

4.2.5.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação.

Tabela 16. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação para validação da metodologia analítica para determinação da incorporação do itraconazol.

<i>Parâmetros</i>	<i>Resultados</i>
Desvio padrão médio (σ)	$7,64.10^{-6}$
Inclinação da curva padrão (S)	$9,0.10^{-4}$
Limite de Detecção ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,03
Limite de Quantificação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,08

* Os dados representam a média e desvio padrão de três determinações.

Pode-se perceber que as concentrações utilizadas na curva estão superiores aos LD e LQ.

4.2.6. Ensaio de incorporação do fluconazol e itraconazol nas formulações

As formulações selecionadas para realização do ensaio de incorporação e suas respectivas composições e estruturas estão apresentadas na tabela 5. Os ensaios prévios de incorporação do fluconazol e do itraconazol foram realizados para ter como base a quantidade de fármaco possível de se dispersar nas formulações. Esta metodologia foi utilizada devido à alta viscosidade de algumas formulações.

A tabela 17 mostra as concentrações máximas de fluconazol incorporado no ensaio prévio realizado com cada formulação, bem como os resultados da quantificação deste fármaco nas formulações utilizando a metodologia analítica descrita no item 4.2.4. Além disso, realizou-se o ensaio prévio da solubilização do fluconazol no AO e no PROC, a fim de verificar qual a influência destes componentes na incorporação dos fármacos nos sistemas.

Tabela 17. Ensaio prévio da incorporação do fluconazol e a sua concentração quantificada por CLAE.

<i>Formulações</i>	<i>Ensaio prévio de incorporação de fluconazol</i>		<i>Concentração de fluconazol quantificado por CLAE (mg.g⁻¹)*</i>
	<i>Incorporação completa (mg.g⁻¹)</i>	<i>Precipitado (mg.g⁻¹)</i>	
AO	36,00	38,00	-
PROC	14,00	16,00	-
AO1	22,00	24,00	21,60 ± 2,48
AO2	22,00	24,00	24,43 ± 1,58
AO3	24,00	26,00	26,34 ± 1,53
AO4	30,00	32,00	29,78 ± 2,50
AO5	26,00	28,00	26,28 ± 2,10

* Os dados representam a média e desvio padrão de três determinações.

A partir dos valores de incorporação de fluconazol resultantes, observou-se que as formulações conseguiram solubilizar uma quantidade de fármaco de 2 a aproximadamente 3 vezes maior que a concentração usualmente utilizada em estudos semelhantes encontrados na literatura, que é de 10 mg.g⁻¹.

É importante conhecer a solubilidade do fármaco em cada componente, pois as partículas do fármaco inicialmente precisam ser solubilizadas para que então possam sofrer partição e se difundir passivamente para a interface veículo/estrato córneo. Com o fluconazol, essa partição entre os componentes e difusão para a interface irá ocorrer com maior facilidade, pois apresenta solubilidade em todos os componentes do sistema. O fluconazol mostrou ser mais solúvel na fase oleosa, pois os óleos de natureza menos apolar, como o ácido oléico, por exemplo, permitem a dissolução de maiores concentrações de fármacos lipossolúveis. Percebe-se que os componentes tiveram grande importância na incorporação do fluconazol nos sistemas, por isso, a escolha dos componentes deve ser criteriosa, pois influencia diretamente nas características do produto final.

A adição de óleo, no entanto, não alterou significativamente as quantidades de fármaco incorporadas, mostrando que a incorporação pode estar relacionada também à estruturação destes sistemas.

Apesar da baixa capacidade da água de solubilizar o fármaco, é importante que haja alguma concentração de água na formulação, não só para favorecer sua estruturação, mas também por favorecer a partição do fármaco entre os componentes da formulação. Se o sistema tiver água como fase contínua, e fase oleosa como fase dispersa, a compartimentalização do fármaco será favorecida, pois, o fármaco apresenta baixa solubilidade em água e sua partição da fase oleosa para a fase aquosa será prejudicada, diminuindo a velocidade de liberação do fármaco.

Já, se o ácido oléico for a fase contínua, a velocidade de liberação do fármaco será maior, pois provavelmente o fluconazol estará solubilizado nesta fase. Desta forma, é possível escolher um sistema favorável à sua finalidade e prever o perfil de liberação do fármaco.

As formulações estudadas conseguiram incorporar uma quantidade relativamente menor de fármaco quando comparadas ao ácido oléico. Apesar disso, as formulações apresentam vantagens em relação ao ácido oléico para aplicação cutânea devido à maior facilidade de aplicação, capacidade de compartimentalizar e controlar a liberação do fármaco.

A tabela 18 mostra as concentrações máximas de itraconazol incorporado no ensaio prévio realizado com cada formulação, bem como os resultados da quantificação deste fármaco nas formulações utilizando a metodologia analítica descrita no item 4.2.5. Assim como ocorreu para o fluconazol, foi realizado o ensaio prévio da solubilidade do itraconazol no AO e PROC.

Tabela 18. Ensaio prévio da incorporação do itraconazol e sua concentração quantificada por CLAE.

Formulações	Ensaio prévio de incorporação de itraconazol		Concentração de itraconazol quantificado
	Incorporação completa (mg.g^{-1})	Precipitado (mg.g^{-1})	por CLAE (mg.g^{-1})*
AO	5.10^{-3}	1.10^{-2}	-
PROC	5.10^{-3}	1.10^{-2}	-
AO1	1.10^{-1}	5.10^{-2}	$8,40.10^{-2} \pm 6,98.10^{-3}$
AO2	1.10^{-1}	5.10^{-2}	$9,32.10^{-2} \pm 3,40.10^{-4}$
AO3	5.10^{-1}	1.10^{-1}	$5,17.10^{-1} \pm 1,35.10^{-2}$
AO4	5.10^{-3}	1.10^{-2}	$5,80.10^{-3} \pm 1,62.10^{-3}$
AO5	5.10^{-3}	1.10^{-2}	$4,78.10^{-3} \pm 1,50.10^{-3}$

* Os dados representam a média e desvio padrão de três determinações.

As formulações foram avaliadas visualmente quanto a precipitação, e além disso, foram observadas em microscópio para garantir a completa incorporação.

No caso do itraconazol, o aumento da fase oleosa não aumentou a concentração de fármaco incorporada. Este aumento de até 20 vezes na capacidade de incorporação apresentada pela formulação AO3 pode ser explicada pela compartimentalização do fármaco que talvez ocorra neste cristal líquido de fase lamelar. Apenas as formulações AO4 e AO5, AO1 e AO2 não apresentaram diferença estatística quando comparadas entre si ($p < 0,05$) no ensaio de incorporação do itraconazol.

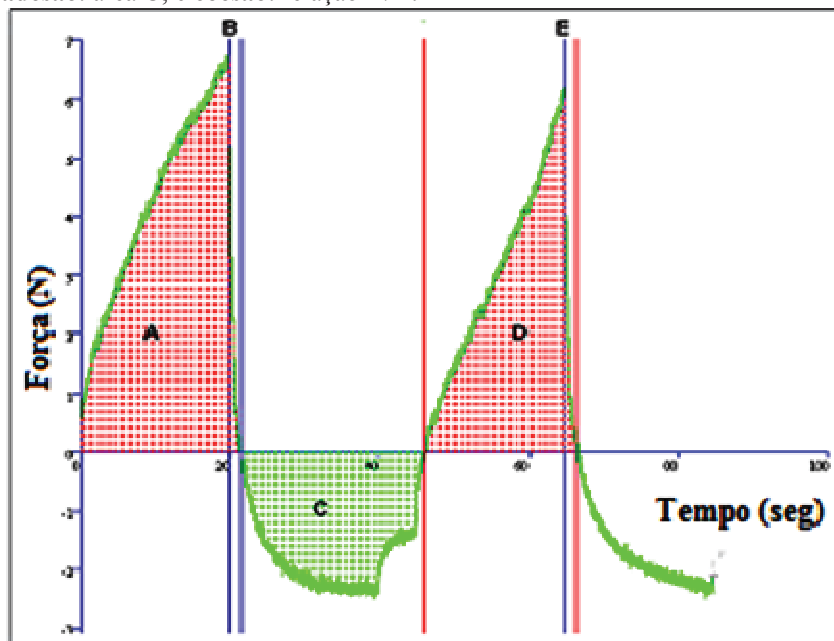
Os resultados mostraram que os sistemas estudados tiveram pouca capacidade de incorporar o itraconazol, pois a sua molécula (Figura 3) é bem mais complexa que a do fluconazol (Figura 2) e pouco solúvel em diversos solventes.

Ainda assim, foi possível perceber, analisando os resultados, que as formulações conseguiram aumentar significativamente a capacidade de incorporação dos fármacos quando comparados com as suas solubilidades em água, sendo 8 mg.mL^{-1} do fluconazol (USP, 2006) e 1 ng.mL^{-1} do itraconazol (PEETERS *et al.*, 2002).

4.2.7. TPA - Análise do Perfil de Textura

As propriedades mecânicas das formulações, como dureza, adesão, coesão, elasticidade, e compressibilidade foram obtidas utilizando um analisador de textura no modo TPA. As formulações estudadas foram comparadas com um gel de Carbopol[®] 974P 5%. As amostras classificadas como microemulsões não foram analisadas neste teste, pois como elas são líquidas, não é possível caracterizá-las quanto à textura, além delas não oferecerem resistência a uma tensão por serem Newtonianas, não sendo possível realizar o teste. Além disso, as formulações AO3, AO3F e AO3I, apesar de serem cristais líquidos de fase lamelar, também não apresentaram viscosidade suficiente para a realização do ensaio.

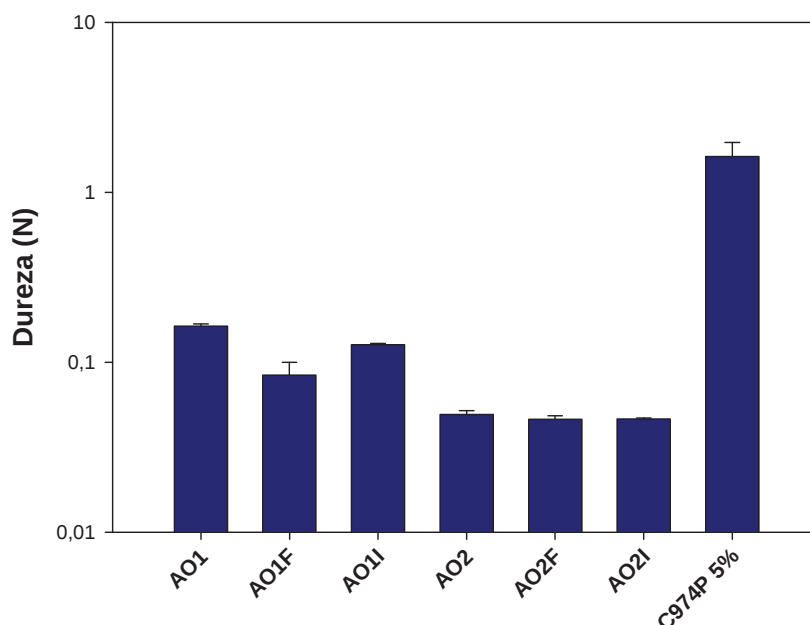
Figura 43. Gráfico representativo de uma análise do perfil de textura. A **compressibilidade** representa: área A; **dureza**: pico B; **adesão**: área C; e **coesão**: relação D/A.



A compressão é o trabalho necessário para comprimir as formulações. A dureza é definida como o pico de força máxima obtido durante a primeira compressão. A adesão é definida como a área negativa presente na curva força $\times$ tempo formada durante a primeira compressão, e representa o trabalho requerido para vencer as forças atrativas entre a superfície da prova e a amostra. A coesão é a taxa em que a amostra se desintegra sob uma ação mecânica. É obtida pela razão entre a área positiva obtida durante a segunda compressão e a área obtida na primeira compressão (TAMBURIC; CRAIG, 1995). Todos estes parâmetros foram avaliados em formulações com e sem fármaco, e são representados na forma de gráfico como mostrado na figura 43.

Observou-se que as formulações cujas estruturas são cristais líquidos de fase hexagonal (AO1, AO1F e AO1I), são as formulações com maiores durezas quando comparadas ao C974P 5% e a adição dos fármacos não causou diferença estatística no valor de dureza da formulação (Figura 44).

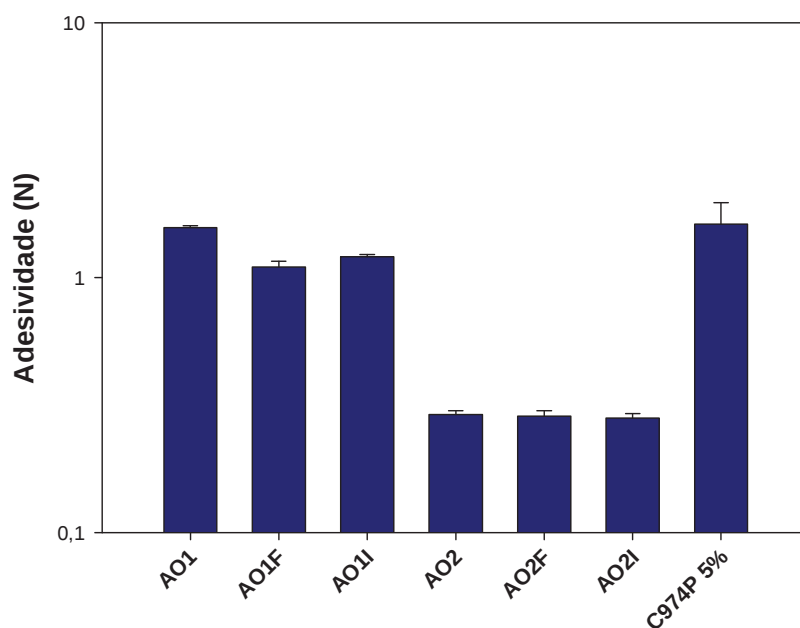
Figura 44. Dureza das formulações com e sem fármaco (média e desvio padrão das replicatas (n=7)).



As medidas de dureza das formulações AO2, AO2F e AO2I, caracterizadas como cristais líquidos de fase lamelar, que possuem estruturação menos rígida que os cristais líquidos de fase hexagonal, por isso os valores de dureza menores já eram esperados.

Quanto à adesividade (Figura 45), percebe-se que as formulações com maiores durezas também foram as mais adesivas comparando-se com os cristais líquidos de fase lamelar. Além disso, apesar dos menores valores de dureza apresentados pelas formulações AO1, AO1F e AO1I em relação ao gel, a adesividade destes sistemas não foi estatisticamente diferente.

Figura 45. Adesividade das formulações com e sem fármaco (média e desvio padrão das replicatas (n=7)).



A compressibilidade também está diretamente relacionada com a dureza das formulações, como foi observado na figura 46, pois quanto mais rígido o sistema, maior é a força necessária para comprimi-lo. Mais uma vez, a adição dos fármacos não interferiu nos valores de compressibilidade das formulações. Todas as formulações apresentaram coesividade de aproximadamente 1 (Figura 47), mostrando que são altamente coesas, isto é, as interações entre as estruturas dos sistemas são altas, sendo difícil a quebra destas interações.

Figura 46. Trabalho de compressão das formulações com e sem fármaco (média e desvio padrão das replicatas (n=7)).

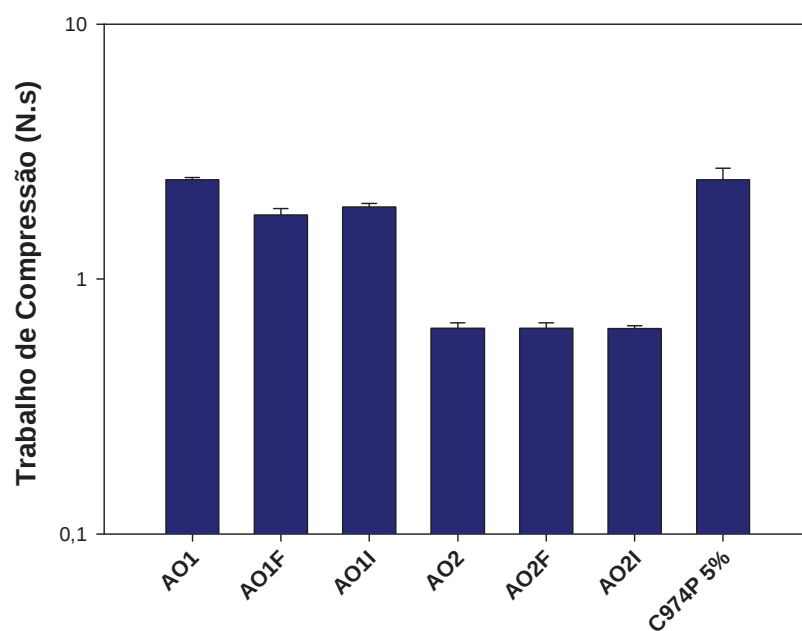
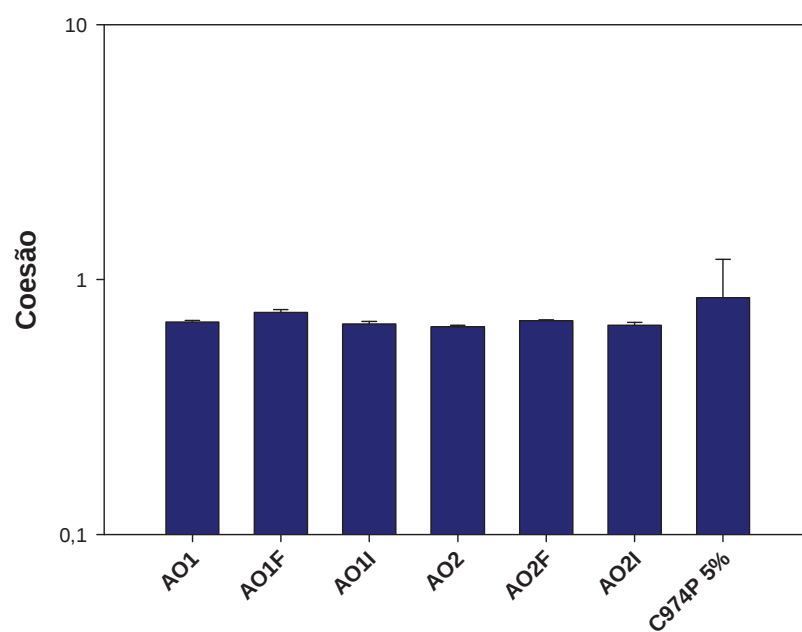


Figura 47. Coesão das formulações com e sem fármaco (média e desvio padrão das replicatas (n=7)).



A análise do perfil de textura mostrou-se um método eficaz de caracterizar as formulações, complementando o conhecimento sobre o comportamento destas formulações quando submetidas a tensão, sendo um método adicional às análises do comportamento reológico destes sistemas.

4.2.8. Ensaio *in vitro* de bioadesão

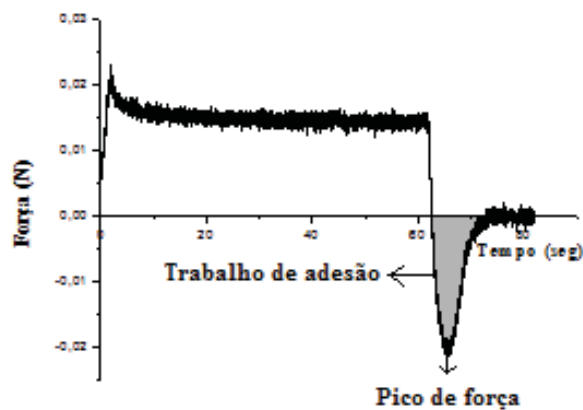
A bioadesão é caracterizada como uma interação de forças interfaciais entre um sistema e uma membrana biológica, sendo as principais interações as ligações de hidrogênio e forças de Van de Waals (THIRAWONG *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada a sistemas com alta capacidade bioadesiva, pois conseguem aumentar o tempo de residência da preparação na pele, além da aumentar a biodisponibilidade do fármaco no local de ação (KHUTORYANSKIY, 2007).

Várias técnicas para determinação *in vitro* da bioadesão têm sido relatados na literatura, e a maioria dos métodos têm como base a medição da força de tração. Métodos usando resistência à tração examinam a força necessária para separar duas superfícies após o contato entre o sistema e a membrana biológica (THIRAWONG *et al.*, 2007).

Recentemente, o ensaio de tração utilizando analisador de textura tem sido utilizado para estudar as características mecânicas das formulações estudadas. Em geral, a bioadesão usando esta técnica foi avaliada através da medida da força máxima necessária para separar formulação da superfície da membrana após o contato em tempo especificado, e a força e o trabalho de adesão são calculados, como mostrado na figura 48 (THIRAWONG *et al.*, 2007).

Figura 48. Figura representativa do gráfico de força X tempo para obtenção de valores de força bioadesiva e área de bioadesão das formulações estudadas.



As figuras 49 e 50 representam os valores de força bioadesiva e trabalho de adesão, respectivamente, das formulações estudadas.

Figura 49. Picos máximos de força bioadesiva, obtidos com diferentes tempos de contato entre as formulações estudadas e a membrana biológica (n=7).

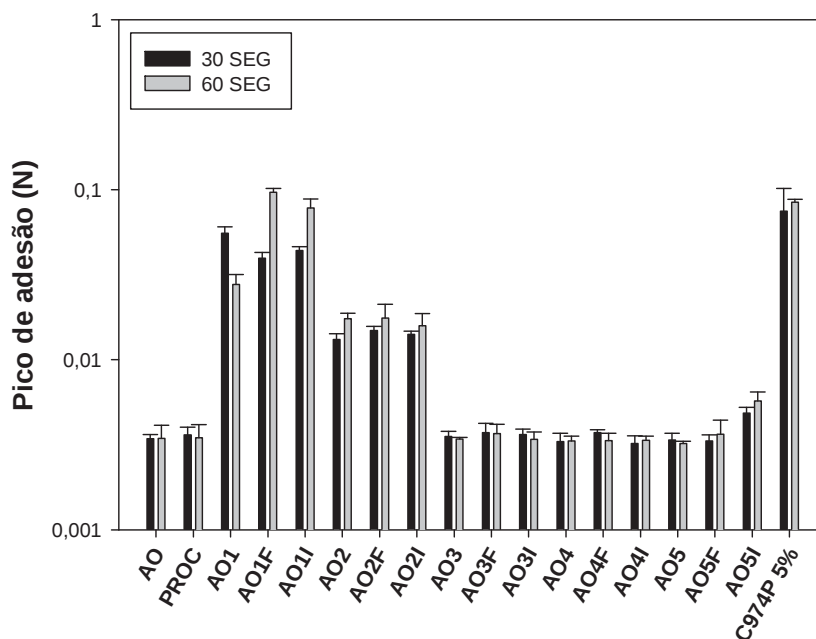
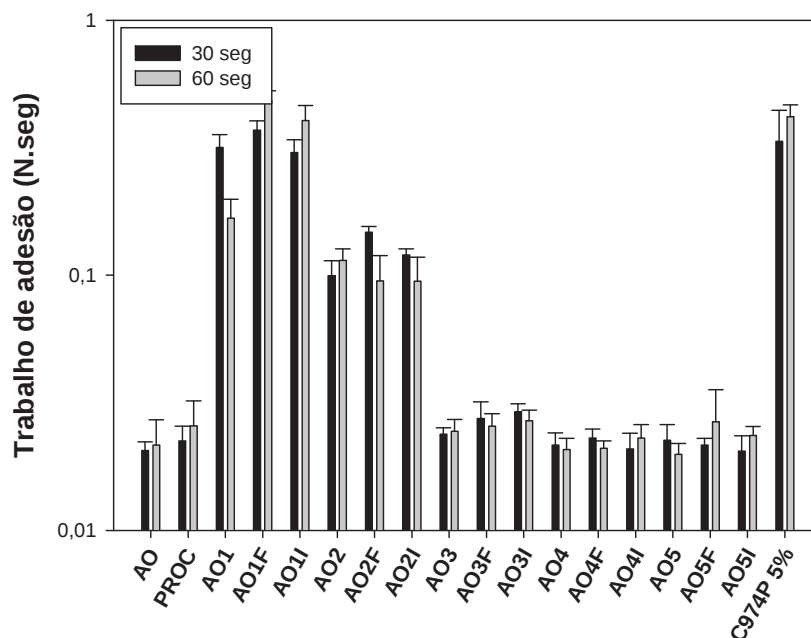


Figura 50. Trabalho de adesão, obtidos com diferentes tempos de contato entre as formulações estudadas e a membrana biológica (n=7).



Pode-se observar que para as formulações pouco viscosas analisadas (AO3, AO3F, AO3I, AO4, AO4F, AO4I, AO5, AO5F e AO5I), incluindo a fase oleosa e o tensoativo, não houve diferença significativa no pico e trabalho de adesão.

As exceções foram as formulações AO3, AO3F e AO3I, que apesar da baixa viscosidade, são um cristal líquido de fase lamelar, já apresentando uma resistência ao fluxo, diferentemente das microemulsões (AO4, AO4F, AO4I, AO5, AO5F e AO5I) e substâncias puras (AO e PROC). As formulações AO1, AO1F e AO1I (CLs de fase hexagonal) mostraram-se altamente bioadesivas, inclusive quando comparadas ao C974P 5%. Além disso, alguns estudos têm mostrado que com o aumento da viscosidade da formulação, a bioadesividade do sistema aumenta, e esta pode ser outra explicação para a maior bioadesão dos cristais líquidos de fase hexagonal.

As formulações AO2, AO2F e AO2I (CLs de fase lamelar) não apresentaram diferença estatística na força bioadesiva do sistema com a adição dos fármacos. Dentre as formulações pouco viscosas, o aumento do tempo de contato não apresentou diferença estatística nos valores de força bioadesiva.

Dentre as formulações mais viscosas, o sistema AO1 apresentou maior força bioadesiva com apenas 30 segundos de contato, já as formulações AO1F, AO1I, AO2 e C974P 5% são mais bioadesivas com 60 segundos de contato. O aumento da bioadesão com o aumento do tempo de contato pode estar relacionado com a maior interação entre os sistemas e as proteínas presentes nas membranas biológicas (KELLY *et al.*, 2004). As formulações viscosas no geral apresentaram boa interação com as membranas biológicas, sendo tanto ou pouco menos bioadesivas que o gel de C974P 5%, podendo aumentar o tempo de residência destes sistemas nos locais desejados.

4.3. Toxicidade Dérmica Aguda

4.3.1. Teste Limite

A escolha dos componentes das formulações deve ser criteriosa, pois deve-se levar em conta a grande quantidade de substâncias utilizadas como veículos de fármacos.

Muitos produtos para uso cutâneo contêm em sua composição substâncias capazes de interagir com a estrutura da pele, além de sofrerem biotransformação cutânea quando ultrapassam a barreira da epiderme (RIVIERE, 1999). Portanto, os estudos de toxicidade dérmica para garantia de segurança do produto final devem ser avaliados a fim de que danos à saúde sejam evitados.

Uma substância é tóxica quando é capaz de causar algum dano a um organismo vivo, e a avaliação da toxicidade dérmica aguda é importante quando há possibilidade de exposição deste composto pela via cutânea. Existem diversos protocolos que avaliam a toxicidade dérmica aguda, dentre eles os protocolos da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) são aceitos por toda comunidade científica europeia e se adequam as realidades das pesquisas atuais.

O protocolo OECD 402 relata os procedimentos para avaliação de toxicidade dérmica aguda (OECD 402; WHO, 1978), e o OECD 410 relata os procedimentos para avaliação da toxicidade dérmica de dose repetida (OECD 410).

Nesta primeira etapa da avaliação de toxicidade dérmica, foi realizado o teste limite com os componentes das formulações e controles negativo e positivo. Doses máximas de 2000 mg.kg⁻¹ foram administradas e verificou-se a evolução toxicológica durante 14 dias.

Escolheu-se o propanol como controle negativo, por ser o solvente para todos os componentes caso haja necessidade de diluições posteriores e por não haver relatos de toxicidade. O CB já é conhecido por ser tóxico e irritante em altas concentrações, portanto, escolheu-se a concentração de 15% por provocar irritação severa e não causar letalidade.

As tabelas 19 a 22 mostram a evolução dos escores de toxicidade dérmica para as amostras submetidas ao teste limite.

Tabela 19. Escores de toxicidade dérmica aguda em ratos após administração de 2000 mg.kg⁻¹ de PROP (controle negativo).

Ratos	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 20. Escores de toxicidade dérmica aguda em ratos após administração de 150 mg.kg⁻¹ de CB 15% (controle positivo).

Ratos	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	1	2	2	2	2	3	3	3	4	-	-	-	-	-	-
R2	1	2	2	2	2	2	3	3	3	-	-	-	-	-	-
Soma	2 ¹	4 ¹	4 ¹	4 ¹	4 ¹	5 ¹	6 ^{1,2}	6 ^{1,2}	7 ^{1,2}	-	-	-	-	-	-

¹Dados significativamente diferentes em relação ao escore 0 (p<0,05).

²Dados significativamente diferentes em relação ao dia 1.

Tabela 21. Escores de toxicidade dérmica aguda em ratos após administração de 2000 mg.kg⁻¹ de PROC.

Ratos	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 22. Escores de toxicidade dérmica aguda em ratos após administração de 2000 mg.kg⁻¹ de AO.

Ratos	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1		0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
R2		0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R3		0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
R4		0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma		0	4 ¹	4 ¹	4 ¹	2 ¹	2 ¹	2 ¹	2 ¹	0	0	0	0	0	0

¹Dados significativamente diferentes em relação ao escore 0 (p<0,05).

Os ratos utilizados como controle positivo apresentaram escaras graves, por isso foram eutanasiados no nono dia para evitar sofrimento por parte do animal.

De acordo com os resultados, observou-se que o PROC não apresentou diferença significativa em relação ao escore 0, que representa o não aparecimento de sinais de toxicidade dérmica aguda, sendo que estes sinais foram observados para o controle negativo. Portanto, sugere-se que este tensoativo pode ser usado no desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos, como microemulsões e cristais líquidos.

O AO apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo (escore 0), entretanto todos os animais aos quais se administrou esses sistemas, não apresentaram sinais de toxicidade irreversíveis, pois até o dia 9 esses sinais desapareceram. Alguns estudos mostraram que em epiderme humana reconstituída, o AO não mostrou alteração da morfologia epidermal, e não é necessariamente identificado como uma substância tóxica (BOELSMA *et al.*, 1996). A toxicidade dérmica aguda apresentada neste estudo deve ter ocorrido, pois alguns ácidos graxos insaturados podem modular diferentes funções de leucócitos como proliferação, ativação por antígenos, liberação de citocinas podendo causar uma ligeira reação inflamatória (BOELSMA *et al.*, 1996; CURY-BOAVENTURA; POMPEIA; CURI, 2005). Portanto, faz-se necessária a continuação dos testes de avaliação de toxicidade dérmica aguda para esse componente, usando concentrações menores e que estejam relacionadas aquelas usadas no preparo das formulações.

4.3.2. Teste de porcentagens

Avaliou-se a toxicidade dérmica aguda de ácido oléico na concentração de 60% e PROC 60% (dose de 600 mg.kg⁻¹). O PROC, apesar de não mostrar sinais de toxicidade aparente no teste limite, durante o ensaio histológico mostrou algumas alterações, por isso uma dose reduzida foi avaliada.

Os resultados mostraram que na concentração de 60% o AO e o PROC, visualmente, não causam toxicidade aparente, devendo este resultado ser complementado pela análise histológica. Este resultado prévio mostrou que estes componentes podem ser utilizados nesta concentração, caso haja necessidade.

4.4. Toxicidade dérmica de dose repetida

Avaliou-se a toxicidade dérmica de dose repetida. As concentrações dos componentes da formulação selecionada (AO3F) estão representadas na tabela 3.

Selecionou-se apenas uma formulação contendo fluconazol como fármaco, por possuir concentrações semelhantes entre os componentes, além da facilidade de aplicação desta formulação nos animais. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 23.

Pôde-se observar que a formulação selecionada não apresentou sinais de toxicidade dérmica quando administrada continuamente, mostrando que é uma formulação segura para a administração cutânea.

4.5. Avaliação histológica

As avaliações histopatológicas e histométricas são evidências da irritação no tecido cutâneo, pois faz uma análise mais minuciosa da epiderme, derme e células, coisa que a análise macroscópica não permite. A lesão no tecido cutâneo é caracterizada por qualquer evento que danifique a estrutura ou função do tecido. Logo, um processo irritativo irá liberar mediadores inflamatórios, mobilizando uma série de células, principalmente neutrófilos e linfócitos (ANDREWS, 1995).

A análise histopatológica é uma observação visual de biópsias com auxílio de um microscópio óptico, permitindo a visualização das diversas estruturas presentes no tecido cutâneo, no entanto é uma análise qualitativa. Por isso, a histopatologia deve ser complementada pela histometria (SILVA; MAIA CAMPOS, 2000).

A avaliação histológica envolveu três ensaios: Teste Limite, Teste Porcentagem e Teste Dose Repetida. O Teste Limite envolveu quatro grupos experimentais administrados com as matérias-primas AO, PROC, 15% de CB (controle positivo) e PROP (controle negativo). O Teste Porcentagem englobou 3 grupos experimentais: AO60%; PROC60% e PROP (controle negativo). O Teste Dose Repetida envolveu 2 grupos: AO3F e PROP (controle negativo).

4.5.1. Análise histométrica

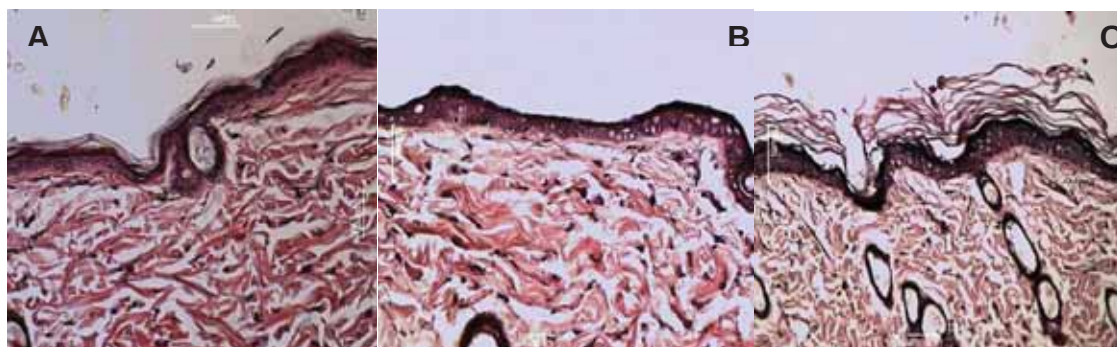
Os resultados da espessura da epiderme e derme para os grupos experimentais, conforme os tratamentos estão presentes na Tabela 24 e Figuras 51 e 52.

Tabela 24. Espessura da epiderme e derme (média $\pm$ DP) para os diferentes grupos experimentais (em μm).

Grupos	Espessura	
Teste Limite	Epiderme	Derme
PROC	32,92 $\pm$ 1,66	1136,76 $\pm$ 37,20
AO	35,56 $\pm$ 5,79	1097,83 $\pm$ 47,64
Controle positivo	37,58 $\pm$ 3,00	1269,11 $\pm$ 53,04
Controle negativo	23,95 $\pm$ 1,62	672,95 $\pm$ 51,48
Teste Porcentagem	Epiderme	Derme
AO60%	33,44 $\pm$ 2,61	952,86 $\pm$ 62,88
PROC60%	25,90 $\pm$ 1,95	1215,39 $\pm$ 38,20
Controle negativo	23,95 $\pm$ 1,62	672,95 $\pm$ 51,48
Teste Dose Repetida	Epiderme	Derme
AO3F	30,24 $\pm$ 3,63	1014,82 $\pm$ 66,79
Controle negativo	23,95 $\pm$ 1,92	672,95 $\pm$ 51,48

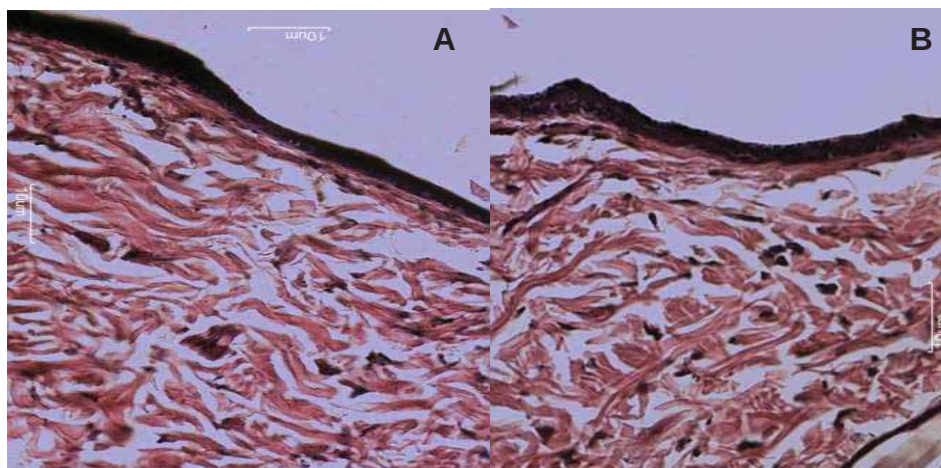
Os resultados obtidos no teste limite e no teste de porcentagem sugerem que as amostras AO e PROC provocaram aumento da espessura da epiderme e derme significativamente maior que o controle, sugerindo que estas amostras podem aumentar a hidratação cutânea, o que seria evidenciado por aumento de espaços intersticiais (Figura 51).

Figura 51. Fotomicrografia evidenciando epiderme de ratos após os tratamentos: (A)- controle negativo; (B) – AO; (C) – PROC.



A amostra do teste de porcentagem ainda apresentou aumento na hidratação da pele, mostrando que provavelmente este comportamento seja intrínseco ao ácido oléico, não sendo dependente da concentração do óleo. As propriedades oclusivas dos componentes foram observadas na formulação AO3F (Figura 52), que é um CL de fase lamelar.

Figura 52. Fotomicrografia evidenciando epiderme de ratos após os tratamentos: A- controle negativo; (B) – AO3F.



Acredita-se que os cristais líquidos possuam características oclusivas, pois sua organização estrutural é semelhante ao da bicamada lipídica da pele, aumentando a coesão e, conseqüentemente, a capacidade de formação de filme (KLEIN, 2002, ROUX; CYRUS; NALLET, 1994).

4.5.2. Análise histopatológica

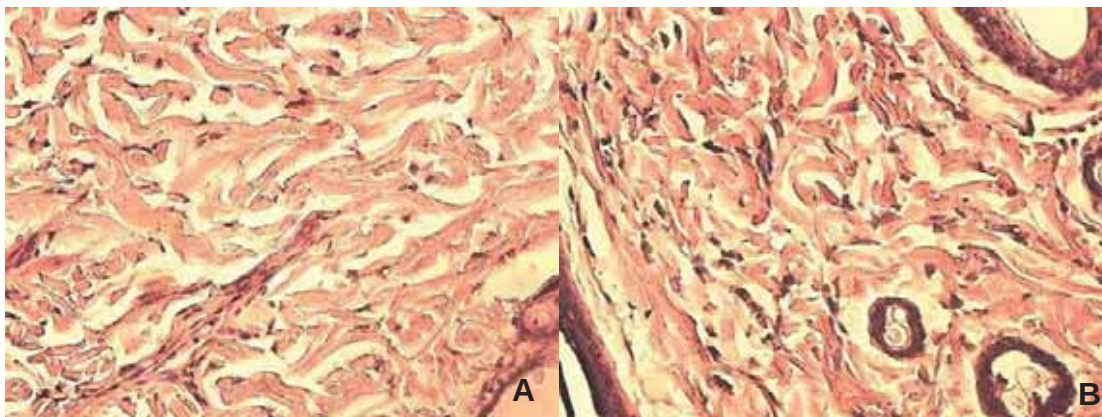
Em uma pele irritada, os fibroblastos e leucócitos podem estar presentes em maiores quantidades, por isso podem ser usados para predizer se uma determinada substância ou formulação irrita ou não a pele.

Os resultados do número de fibroblastos e leucócitos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar estão presentes na Tabela 25 e Figura 53. Trata-se do número de fibroblastos e leucócitos contados em uma área de 30000 μm^2 .

Tabela 25. Contagem de leucócitos e fibroblastos (média $\pm$ DP) para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	Contagem	
Teste Limite	Leucócitos	Fibroblastos
PROC	2,6 $\pm$ 1,65	12,47 $\pm$ 2,30
AO	1,87 $\pm$ 1,53	12,27 $\pm$ 2,30
Controle positivo	6,1 $\pm$ 3,00	7,83 $\pm$ 1,68
Controle negativo	0,67 $\pm$ 0,88	9,10 $\pm$ 1,65
Teste Porcentagem	Leucócitos	Fibroblastos
AO60%	7,03 $\pm$ 1,65	11,47 $\pm$ 1,83
PROC60%	3,77 $\pm$ 1,57	11,93 $\pm$ 1,72
Controle negativo	0,67 $\pm$ 0,88	7,83 $\pm$ 1,68
Teste Dose Repetida	Leucócitos	Fibroblastos
AO3F	0,27 $\pm$ 0,52	12,67 $\pm$ 2,59
Controle	0,67 $\pm$ 0,88	7,83 $\pm$ 1,68

Figura 53. Fotomicrografia evidenciando a derme papilar de ratos após os tratamentos: (A)- controle negativo; (B)- AO3F.



Observou-se que as amostras avaliadas no Teste limite e no Teste Porcentagem apresentaram contagem de leucócitos e fibroblatos significativamente maior que o controle.

Os dados obtidos para contagem de leucócitos para PROC e AO no teste limite e teste porcentagem, embora maiores que os obtidos para o controle, ainda continuam baixos. É importante frisar que estes resultados podem ter ocorridos em virtude de utilização de matérias-primas puras na pele do animal.

O teste de dose repetida é o que mais mimetiza a administração real da formulação no cotidiano, por isso, foi importante o não aparecimento de processos inflamatórios.

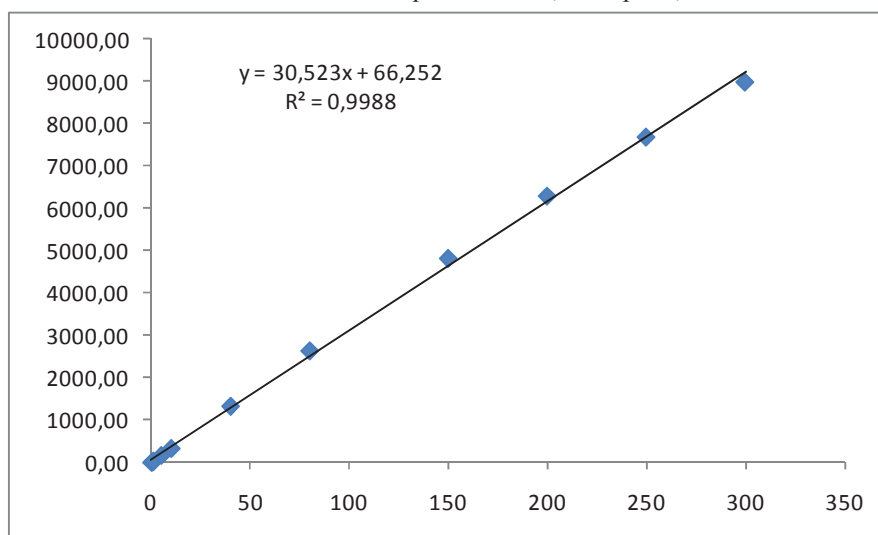
Por isso, conclui-se que estes sistemas são promissores para a administração cutânea, por não causarem sinais evidentes de toxicidade, por melhorar a hidratação da pele e por aumentar o número de fibroblastos que podem auxiliar na sustentação cutânea e regeneração celular.

4.6. Avaliação da liberação, permeação e retenção *in vitro* do fluconazol

4.6.1. Curva analítica de fluconazol em solução tampão fosfato 0,01 M pH 7,4

A curva analítica (Figura 54) construída a partir da análise de fluconazol em tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M pH 7,4 em CLAE foi utilizada nos ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*. A equação da reta foi $y = 30,523x + 66,25$ e coeficiente de determinação foi 0,9988, mostrando-se linear dentro do preconizado pela ANVISA, que é de 0,99 (BRASIL, 2003).

Figura 54. Curva analítica de fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.



4.6.2. Estudo de solubilidade do fluconazol na solução receptora em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4

O estudo da solubilidade do fármaco na solução receptora foi feito para garantir a condição *sink* do experimento. Os resultados dos estudos de solubilidade com o fluconazol em tampão fosfato monobásico 0,01 M pH 7,4 mostraram que a solubilidade do fluconazol neste meio foi de aproximadamente 7 mg.mL^{-1} .

O resultado encontrado assegura que os ensaios de permeação e liberação estão dentro da condição *sink*.

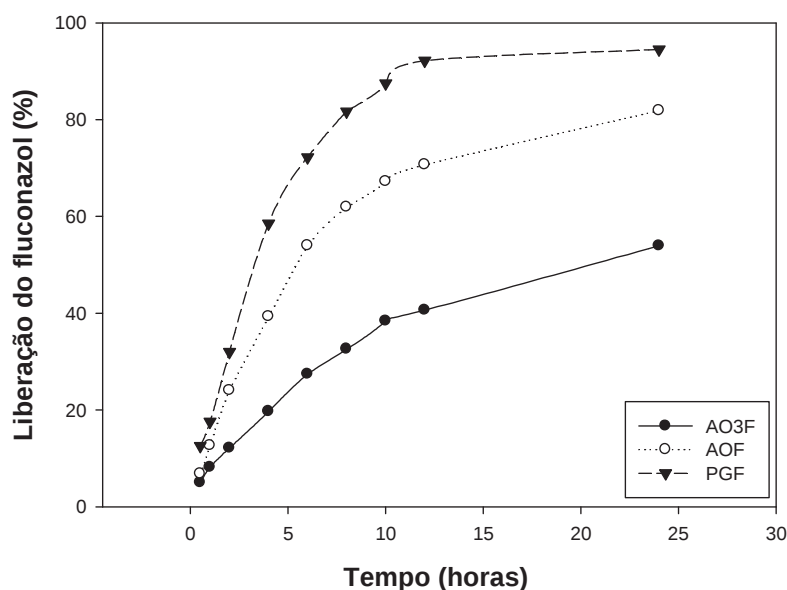
4.6.3. Liberação *in vitro*

A avaliação da liberação *in vitro* do fluconazol permitiu analisar o perfil de liberação do fármaco que pode ser relacionado com a sua saída da matriz farmacêutica (CHOWDRAY; RAJYALAKSHMI, 1987, PRAÇA, 2010).

Foram avaliadas a formulação AO3F, o ácido oléico (AO) e propilenoglicol (PG), sendo estes últimos utilizados para efeito comparativo com o sistema estudado. O ensaio foi feito por 24 horas, e todas as amostras continham 1% de fluconazol. Os perfis de liberação estão apresentados na figura 55.

As quantidades liberadas de fluconazol a partir da formulação foram inferiores à liberação a partir do AO e do PG, mostrando que este sistema é capaz de controlar a liberação do fármaco, não sendo um sistema de liberação imediata (Figura 55).

Figura 55. Perfil de liberação *in vitro* (% de liberação) do fluconazol incorporado na formulação AO3F, na fase oleosa AOF e no PGF (propilenoglicol + 1% de fluconazol) (média de n=6).



A tabela 26 mostra a porcentagem de fluconazol liberado por tempo, a quantidade liberada por área ($Q_{\text{real}} \mu\text{g}/\text{cm}^2$), o fluxo por tempo, durante 24 horas. Observou-se que em 24h o PG liberou 94% de fluconazol, quantidade estatisticamente maior que o valor apresentado por AOF (81%). Vale ressaltar que em 8h de experimento, o PG já havia liberado 87%, enquanto AOF havia liberado aproximadamente 62%.

Tabela 26. Quantidade de fluconazol liberado por área e porcentagem liberada, após 24h de experimento.

Amostra	Estrutura	Fármaco inicial ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Q_{real} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 24 horas	Fluxo (J) $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}/\text{R}^2$	Liberação (%)
PG	-	1694,92	1601,70	173,55/ 0,9502	94,50 $\pm$ 6,39
AOF	-	1694,92	1387,56	132,12/ 0,0758	81,86 $\pm$ 6,35
AO3F	CL lamelar	1694,92	914,17	59,89/ 0,9953	53,17 $\pm$ 7,62

4.6.4. Permeação e retenção cutânea *in vitro*

O ensaio de permeação foi realizado a fim de que as interações dos sistemas com a pele fossem avaliados, e mimetizar o comportamento destes sistemas *in vivo*.

A pele de orelha de porco foi escolhida por possuir características de permeação semelhantes a da pele humana (OECD/428, 2004; SCCP, 2006).

Os ensaios de permeação foram realizados com as mesmas condições do ensaio de liberação, com exceção da membrana utilizada e o tempo de experimento. Comparou-se a retenção cutânea nos tempos de 6h e 12h.

A Tabela 27 apresenta a quantidade de fluconazol em $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ permeado através da pele de orelha de porco, retido no estrato córneo (EC) e na epiderme+derme (EP+D), para a formulação AO3F e a fase oleosa contendo o fármaco (AOF).

Tabela 27. Quantidade de fluconazol retido e permeado na pele, em $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ após 6 ou 12h de experimento.

Amostras		Retenção EC	Retenção EP+D	Permeação
AOF	6h	2,87	19,87	319,19
	12h	9,97	13,43	673,64
AO3F	6h	2,35	5,37	0,00
	12h	2,15	6,96	0,00

A quantidade de fluconazol permeado quando este foi solubilizado em AO (AOF) foi maior que o verificado para AO3F que não permitiu a permeação do fluconazol. A retenção de fluconazol na EP+D foi maior tanto após 6 horas como 12 horas para AOF. Já para AO3F observou-se que o fármaco não permeia nos dois tempos avaliados e os valores de retenção na EP+D não variaram estatisticamente com o tempo, o que pode indicar a saturação da membrana biológica em 6h.

O fato de não haver permeação do fármaco a partir da formulação é interessante já que nem sempre a absorção do fármaco é desejada devido aos efeitos adversos. Além disto, o aumento da concentração de fármaco na lesão pode melhorar a eficácia do fármaco, podendo diminuir o tempo de tratamento das dermatomicoses.

V. CONCLUSÃO

- O tensoativo empregado, álcool cetílico etoxilado (20 OE) e propoxilado (5 OP), possibilitou a formação de várias estruturas e interferiu na estruturação e no comportamento reológico das formulações.
- Os sistemas empregados aumentaram a incorporação dos fármacos, pois o fluconazol e o itraconazol são fármacos pouco solúveis em água.
- O perfil de textura dos sistemas, complementou a caracterização por reologia de cada sistema, podendo verificar dureza, e a sua relação com adesividade e trabalho de compressão. Também, obteve-se sistemas altamente bioadesivos, que podem aumentar o tempo de residência das formulações no local de ação, aumentando a disponibilidade do fármaco no alvo.
- Nos testes de avaliação da toxicidade dérmica aguda (TDA), verificou-se que PROC e AO apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo, por isso uma concentração inferior foi testada, a fim de que a toxicidade deste componente fosse avaliada em concentrações semelhantes às que serão utilizadas nas formulações.
- Nos testes histológicos foi verificado o aumento da espessura da epiderme e derme com a administração destes componentes.
- Na avaliação da toxicidade dérmica de dose repetida, pôde-se concluir que a formulação AO3F é segura para administração cutânea, mesmo quando administrada repetidamente, não causando toxicidade nos animais quando comparado ao controle negativo.

- A formulação a também promoveu o aumento da espessura da epiderme e derme, mostrando características oclusivas, o que pode aumentar a hidratação da pele. A propriedade oclusiva apresentada pelos componentes e pela formulação é interessante, pois é uma forma de proteção da pele, pois peles desidratadas ficam mais sujeitas a lesões.
- O sistema nanoestruturado estabilizado com álcool cetílico etoxilado e propoxilado foi capaz de modular a liberação do fluconazol. No ensaio de permeação e retenção cutânea, conclui-se que o fármaco fica retido na pele, o que é interessante para a administração cutânea de antifúngicos, pois, evitando sua permeação, diminuindo o surgimento de efeitos adversos e aumentando a quantidade de fármaco disponível no local.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: interesse e aplicações na área cosméticofarmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p. 96-100, 2003.
- ANDREWS, J.M. **Cirurgia plástica**. São Paulo: Atheneu, 1995. p.1-2.
- ARONSON, J. K **Itraconazole Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Reactions and Interactions Drug's**, p. 1932-1946, 2009.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed, 2 ed., 2006.
- BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or Reality?. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, p. 21-50, 2010.
- BLANCO-FUENTE, H.; ANGUIANO-IGEA, S.; OTERO-ESPINAR, F.J.; BLANCO-MÉNDEZ, J. In-vitro bioadhesion of carbopol hydrogels, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 142, p.169-174, 1996.
- BOELSMA, E.; TANOJO, H.; BODD, H. E.; PONEC, M. Assessment of the Potential Irritancy of Oleic Acid on Human Skin: Evaluation In Vitro and *In Vivo*. **Toxicology in Vitro**, v. 10, p. 129-142, 1996.
- BORECKÁ-MELKUSOVÁ, S.; MORAN, G. P.; SULLIVAN, D. J.; KUCHARÍKOVÁ, S.; CHORVÁT JR, BUJDÁKOVÁ, D. H. The expression of genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms exposed to fluconazole. **Mycoses**, v.52, p.118–128, 2008.
- 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. **International Journal of Pharmaceutics**, v.309, p. 218–226, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Assistência Farmacêutica. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF), 02 de junho de 2003.
- BRITTAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, p. 4-9, 1998.
- CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP.
- CHOWDRAY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharmaceutical New Delhi**, v. 30, n. 350, p. 51-54, 1987.

CRODA DO BRASIL. Folha de Informações de Segurança de Produto Químico – FISPQ. **Procetyl AWS: revisão nº 1** de 29/01/2002 de acordo com NBR 14725. Campinas, 2002.

CURY-BOAVENTURA, M. F.; POMPEIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Raji cells. **Nutrition**, v. 21, p. 395-405, 2005.

DAVIDSON, M.W.; ABRAMOWITZ, D. **Polarized Light Microscopy**. Olympus America Inc. and The Florida State University. Disponível em <<http://microscope.fsu.edu/primer/techniques/polarized/polarizedhome.html>>. 2003. Acesso em: 15 set. 2009.

DICK, I. P.; SCOTT, R. C. Pig ear skin as an in vitro model for human skin permeability. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. p. 640-645, v. 44, 1992.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J.J.; MERINO-SANJUÁN, V.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; URBAN-MORLAN, Z.; PIÑÓN-SEGUNDO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n.1, p. 104-130, 2008.

FAERGEMANN, J. Pharmacokinetics of fluconazole in skin and nails. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40, p. S14-S20, 1999.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; A.A. SILVA-JUNIOR; GREMIAO, M.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsoes e fases liquidas cristalinas como sistemas de liberacao de farmacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.301-313, 2005.

FORMARIZ, T.P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorrubicina**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP.

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. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.212, p.73-80, 2001.

GENNARO, A.R. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 20th.ed. Philadelphia: Lippincott: Williams & Wilkins, 2000. p.655.

GRAESSLEY, W.W. In: EISEMBERG, E.; GRAESSEY, W.W.; MANDELKEN, L.; KOENING, J.L. **Physical Properties of Polymers**, American Chemical Society, 1984, cap.3.

GUPTA, R. **Veterinary toxicology**, Hopkinsville: Elsevier, p. 263-286, 2007.

HASHIGUCHI, T.; YASUTAKE, T.; MANAKO, T.; OTAGIRI, M. In vitro percutaneous absorption of prednisolone derivatives based on solubility parameter. **International Journal of Pharmaceutics**, v.158, p.11-18, 1997.

HASSAN, H. A.; AL-MARZOUQI, A. H.; JOBE, B.; HAMZA, A. A.; RAMADAN, G. A. Enhancement of dissolution amount and *in vivo* bioavailability of itraconazole by complexation with cyclodextrin using supercritical carbon dioxide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 243–250, 2007.

HEUSCHKEL, S.; GOEBEL, A.; NEUBERT, R. H. H. Microemulsions—Modern Colloidal Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 2, p. 603 – 631, 2008.

HOELLER, S.; KLANG, V.; VALENTA C. Skin-compatible lecithin drug delivery systems for fluconazole: effect of phosphatidylethanolamine and oleic acid on skin permeation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 587–591, 2008.

HOSMER, J.; REED, R.; VITÓRIA, M.; BENTLEY, L.B.; NORNOO, A.; LOPES, L.B. Microemulsions Containing Medium-Chain Glycerides as Transdermal Delivery Systems for Hydrophilic and Hydrophobic Drugs. **American Association of Pharmaceutical Scientists: Pharmaceutical Sciences Technology**, v.. 10, n. 2, p. 589-596, 2009.

ICH-Q2B **Validation of analytical procedures: Methodology**. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical Human Use, Geneva, Switzerland, 2005.

KELLY, H.M.; DEASY, P.B.; BUSQUET, M.; TORRANCE. A.A. Bioadhesive, rheological, lubricant and other aspects of an oral gel formulation intended for the treatment of xerostomia. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 391–406, v. 278, 2004.

KHUTORYANSKIY, V. V. Hydrogen-bonded interpolymers as materials for pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 15–26, v. 334, 2007.

KLEIN, K. Liquid crystals and emulsions: a wonderful marriage. **Cosmetics & Toiletries**, v.117, n.5, p.30-34, 2002.

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

KLIMKE, K.; SCHÄFER-KORTING, M. Effect of keratin on the efficacy of fluconazole. **Mycoses**, v. 40, p. 43-46, 1997.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Arlington, v.54, p.77-98, 2002.

- KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E.J.; JAROSZEWSKI, J.W. Characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems, **Journal of Controlled Release**, v. 69, p.421–433, 2000.
- LAVKER, R.M.; SUN, T.T. Epidermal stem cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v.81, p.121–7, 1983.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 89-121, 2000.
- LEONARDI, G.R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo : Editora Medfarma, 2004.
- LONGO, D. P. **Obtenção, caracterização e estudo de liberação *in vitro* e permeação *in vivo* de sistemas microestruturados contendo cafeína**. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2006.
- LOPEZ, R.F.V.; BENTLEY, M.V.L.B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. **Journal of Controlled Release**, n. 14, p. 65-70, 2003.
- MAINARDES, R.M.; URBAN, M.C.C.; CINTO, P.O.; CHAUD, M.V.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Colloidal Carriers for Ophthalmic Drug Delivery. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 363-371, 2005.
- MALMSTEN, M. **Surfactants and polymers in drug delivery**. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. New York: Marcel Dekker, 2002, 348p.
- MARTINS, M.R.F.M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Portugal, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.
- MATTEUCCI, M.; CASELLA, M.; BEDONI, M.; DONETTI, E.; FANETTI, M.; DE ANGELIS, F.; GRAMARICA, F.; DI FABRIZIO E. A compact and disposable transdermal drug delivery system, **Microelectronic Engineering**, v.85, p.1066-1073, 2008.
- MONTEIRO-RIVIERE, N.A. The integument. In: EURELL, J.A.; FRAPPIER, B. **Dellmann's Textbook of Veterinary Histology**, 6^a ed., Blackwell Press, Ames, IA, 2006, p. 320–49.
- MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; INMAN, A.O; MAK, V.; WERTZ, P.; RIVIERE, J.E. Effects of selective lipid extraction from different body regions on epidermal barrier function. **Pharmaceutical Research** , v. 18, p. 992–998, 2001.
- 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. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 157-162, 2005.

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

OECD 402. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Toxicity, 1987.

OECD 410. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Repeated Dose Dermal Toxicity – 21/28 day study , 1981.

OECD 428. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Skin Absorption: *In vitro* Method , 2004.

PADULA, C.; NICOLI, S.; SANTI P. Innovative formulations for the delivery of levothyroxine to the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.372, p.12-16 2009.

PATZELT, A., ANTONIOU, C, STERRY, W., LADEMANN, J. Skin penetration from the inside to the outside: A review. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 2, p.229-235, 2008.

PEETERS, J.; NEESKENS, P.; TOLLENAERE, J.P.; VAN, P.; BREWSTER, M. Characterization of the interaction of 2-hydroxy- β -cyclodextrin with Itraconazole at pH 2, 4 and 7. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 1414–1422, 2002.

POLACOW, M.L.O.; PIRES-DE-CAMPOS, M.S.M.; LEONARDI, G.R.; CARVALHO, L.S.; RIBEIRO, M.C.A.P.; MONTEBELO, M.I.L. Eleito do ultra-som na permeação cutânea do tiratricol: análise histológica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.8, n.1, p.53-60, 2004.

PRAÇA, F. S. G. **Liberção e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Departamento de Medicamentos e Cosméticos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP.

PRENTICE, J.H. **Measurements in the rheology of foodstuffs**. Elsevier Applied Science Publishers, London. 1984, 191p.

RIVIERE, J.E. Absorption. In **Comparative Pharmacokinetics, Principles, Techniques and Applications**, Riviere JE (ed.). Iowa State Press, Ames, IA, 1999, p. 34–35.

ROUX, D.; CYRUS, R.; NALLET, F. Lyotropic lamellar La phases. In: GELBART, W.M.; BEN-SHAUL, A.; ROUX, D. **Micelles, membranes, microemulsions and monolayers**. Berlim: Springer, 1994. p.303-338.

SAULNIER, P.; ANTON, N.; HEURTAULT, B., BENOIT, J. Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers. **Comptes Rendus Chimie**, v. 11, p. 221-228, 2008.

SCCP 0970/06. Opinion on Basic Criteria for In vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. Scientific Committee on Consumer Products, Adapted by the SCCP, March 28th, 2006.

SCHOTT, H. Rheology In: GENARO, A.R.; MARDEROSIAN, A.H.; HANSON, G.R. MEDWICK, T. (Ed.). **Remington: the science and practice of pharmacy**. 20th ed. Philadelphia: Williams e Wilkins, 2000. p.1472-1473.

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

SEARS, F.W.; ZEMANSKY, M.W. **Física**, Livro técnico, Rio de Janeiro, 1971, 300p.

SHAH, J.S.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Review**, Arlington, v. 47 p. 229–250, 2001.

SILVA, G.M.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Histopathological, morphometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in skin care formulation. **International Journal of Cosmetic Science**, v.22, n.3, p.169-179, 2000.

SIZENANDO NETO, D.; SVIDZINSKI, T. I. E. Antifúngicos disponíveis para o tratamento das dermatomicoses. **Revista de Ciências e Saúde**, v. 2, n.1, p. 19-24, 2002.

SOBUE, S.; SEKIGUCHI, K.; NABESHIMA, T. Intracutaneous Distributions of Fluconazole, Itraconazole, and Griseofulvin in Guinea Pigs and Binding to Human Stratum Corneum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 216-223, 2004.

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

TAMBURIC, S.; CRAIG, D. Q. M. An investigation into the rheological, dielectric and mucoadhesive properties of poly (acrylic acid) gel systems, **Journal of Controlled Release**, v. 37, p. 59-68, 1995.

TANG, H., MITRAGOTRI, S., BLANKSCHTEIN, D., LANGER, R. Theoretical description of transdermal transport of hydrophilic permeants: application to low-frequency sonophoresis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 545-568, 2001.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, XXIX, NF XIV, The United States Pharmacopoeial Convention Inc.; 2006. pp. 911–913.

THIRAWONG, N.; NUNTHANID, J.; PUTTIPIATKHACHORN, S.; SRIAMORNSAK, P. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An in vitro evaluation using texture analyzer, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 132-140, 2007.

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de Sistemas de liberação Micro e Nanoestruturados para Administração Cutânea do Acetato de Dexametasona**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de farmácia – Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP.

WHO Publication: Environmental Health Criteria 6, **Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals**. Part I, Geneva, 1978.

WOOD, J.H. Reologia farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, M.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 1, p. 211-253.

VII. ANEXOS

7.1. Artigos

Carvalho, F. C.; Silva, H. R.; Luz, G. M.; Barbi, M. S.; Landgraf, D. S.; Sarmiento, V. H. V.; Chiavacci, L. A.; Gremião, M. P. D. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant containing systems designed as a potencial platform for drug delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology** (Artigo aceito).

Souza, A. L. R.; Kiill, C. P.; Kolenyak, F.; Luz, G. M.; Silva, H. R.; Chorilli, M.; Gremião, M. P. D. Nanotechnology-based drug delivery systems for dermatomycosis treatment - A review. **Current Nanoscience** (Artigo submetido).

7.2. Trabalhos apresentados e publicados em anais de congressos

Trabalhos completos

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Marlus Chorilli; Maria Palmira Daflon Gremião. Influência de sistemas nanoestruturados na liberação de ativos de uso tópico. In: **XX COLAMIQC**, 2011, Isla de Margarita.

Marlus Chorilli; Gabriela Marielli da Luz, Mariane Hiromi Hirata, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos bioadesivos para incorporação de ativos cosméticos. In: **XX COLAMIQC**, 2011, Isla de Margarita.

Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Desarrollo y caracterización física de microemulsiones y cristales líquidos estabilizados com alcohol cetílico etoxilado y propoxilado para administración cutánea de fluconazol. In: **Jornadas Jovenes Investigadores - AUGM**, 2010, Santa Fé.

Resumos expandidos

Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Bruna Carolina Corrêa, Maria Palmira Daflon Gremião, Georgino Honorato Oliveira. Avaliação da toxicidade dérmica aguda dos componentes de sistemas nanoestruturados compostos por ácido oléico e álcool cetílico etoxilado e propoxilado para administração cutânea de fluconazol. In: **XXII Congresso de Iniciação Científica - CIC**, 2010, Araraquara (SP).

Gabriela Marielli da Luz, Maria Palmira Daflon Gremião, Hilris Rocha e Silva, Victor Hugo Vitorino Sarmento. Desenvolvimento e caracterização física de microemulsões e cristais líquidos estabilizadas com álcool cetílico etoxilado e propoxilado para administração cutânea de fluconazol. In: **XXI Congresso de Iniciação Científica - CIC**, 2009, São José do Rio Preto (SP).

Bruna Carolina Corrêa, Maria Palmira Daflon Gremião, Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva. Influência do fluconazol na evolução estrutural de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado. In: **XXI Congresso de Iniciação Científica - CIC**, 2009, São José do Rio Preto (SP).

Gabriela Marielli da Luz, Maria Palmira Daflon Gremião, Daniele Silveira Landgraf, Maria Cristina Cocenza Urban. Perfil de liberação in vitro do acetato de dexametasona em sistemas nanoestruturados contendo miristato de isopropila. In: **XX Congresso de Iniciação Científica - CIC**, 2008, São José dos Campos (SP).

Gabriela Marielli da Luz, Maria Palmira Daflon Gremião, Daniele Silveira Landgraf, Maria Cristina Cocenza Urban, Leila Aparecida Chiavacci. Avaliação da solubilidade da dexametasona em sistemas nanoparticulados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado In: **XIX Congresso de Iniciação Científica - CIC**, 2007, Botucatu (SP).

Daniele Silveira Landgraf, Maria Palmira Daflon Gremião, Gabriela Marielli da Luz, Maria Cristina Cocenza Urban, Leila Aparecida Chiavacci. Incorporação de dexametasona em sistemas nanoparticulados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado para liberação de fármacos empregando ácido oléico como fase oleosa In: **XIX Congresso de Iniciação Científica - CIC**, 2007, Botucatu (SP).

Resumos

Gabriela Marielli da Luz, Mariane Hiromi Hirata, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Avaliação da força bioadesiva de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado para administração tópica de itraconazol. In: **1º Workshop de Tecnologia Farmacêutica e Inovação - WFI**, 2011, Aracaju (SE).

Hilris Rocha e Silva, Fernanda Padilla; Gabriela Marielli da Luz, Sidney G. Lima; Maria Palmira Daflon Gremião. Avaliação de óleos de copaíba de diferentes procedências empregando diagrama de fases. In: **1º Workshop de Tecnologia Farmacêutica e Inovação - WFI**, 2011, Aracaju (SE).

Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Mariane Hiromi Hirata, Marlus Chorilli, Maria Palmira Daflon Gremião. Texture profile analysis of nanostructured systems for cutaneous administration of itraconazole. In: **3º PharmSciFair**, 2011, Praga.

Mariane Hiromi Hirata, Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Avaliação da força bioadesiva de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado para administração tópica de itraconazol. In: **58ª Jornada Farmacêutica da Unesp - JFU**, 2011, Araraquara (SP).

Gabriela Marielli da Luz, Mariane Hiromi Hirata, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de itraconazol em sistemas nanoestruturados. In: **58ª Jornada Farmacêutica da Unesp - JFU**, 2011, Araraquara (SP).

Gabriela Marielli da Luz, Mariane Hiromi Hirata, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Incorporation of itraconazole in nanostructured systems using propoxyl ethoxyl cethyl alcohol as surfactant. In: **Brazilian MRS Meeting - X SBPMat**, 2011, Gramado (RS).

Mariane Hiromi Hirata, Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Bioadhesive force of hydrogels containing C971P® and C974P® carbomer polymers. In: **Brazilian MRS Meeting - X SBPMat**, 2011, Gramado (RS).

Natália Barbosa Vedovato, Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Construction of phase diagrams from systems stabilized with alcohol lauryl and Pluronic. In: **IX Brazilian MRS Meeting - SBPMat**, 2010, Ouro Preto (MG).

Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Nanostructured systems stabilized with propoxyl 5 OP ethoxyl 20 OE cethyl alcohol using different oil phases. In: **IX Brazilian MRS Meeting - SBPMat**, 2010, Ouro Preto (MG).

Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Daniele Silveira Landgraf, Maria Cristina Cocenza Urban, Maria Palmira Daflon Gremião. Dexamethasone acetate in vitro release profile from nanostructured systems containing propoxyl 5 OP ethoxyl 20 OE cethyl, water and isopropyl miristate. In: **Controlled Release Society - CRS**, 2010, Portland.

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Bruna Carolina Corrêa, Victor Hugo Vitorino Sarmiento, Maria Palmira Daflon Gremião. Nanostructured Systems for cutaneous administration of fluconazole. In: **Controlled Release Society - CRS**, 2010, Portland.

Mariane Hiromi Hirata, Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Maria Palmira Daflon Gremião. Diagrama de fases como ferramenta tecnológica para avaliar o comportamento de fases de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado. In: **57ª Jornada Farmacêutica da Unesp - JFU**, 2010, Araraquara (SP).

Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Efeito da adição do fluconazol na caracterização de sistemas nanoestruturados para administração cutânea. In: **57ª Jornada Farmacêutica da Unesp - JFU**, 2010, Araraquara (SP).

Natália Barbosa Vedovato, Daniele Silveira Landgraf, Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Incorporação do acetato de dexametasona em sistemas nanoestruturados empregando fosfatidilcolina de soja como fase oleosa. In: **57ª Jornada Farmacêutica da Unesp - JFU**, 2010, Araraquara (SP).

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Bruna Carolina Corrêa, Maria Palmira Daflon Gremião, Georgino Honorato Oliveira. Evaluation of acute dermal toxicity of components of nanostructured systems. In: **XII International Congress of Toxicology - IUTOX**, 2010, Barcelona.

Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Mecanismo de liberação in vitro de acetato de dexametasona a partir de sistemas nanoestruturados. In: **XX Congresso Pan-Americana de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana - FEFAS**, 2010, Porto Alegre (RS).

Natália Barbosa Vedovato, Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Diagrama de fases de sistemas nanoestruturados contendo álcool laurílico e óleo de copaíba In: **XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana - FEFAS**, 2010, Porto Alegre (RS).

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Ana Luiza Ribeiro de Souza, Victor Hugo Vitorino Sarmento, Leila Aparecida Chiavacci, Maria Palmira Daflon Gremião. Small angle X-ray scattering characterization of surfactants systems. In: **7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology**, 2010, Malta.

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Victor Hugo Vitorino Sarmento, Maria Palmira Daflon Gremião. Development of systems stabilized with propoxyl 5 OP ethoxyl 20 OE cethyl alcohol containing fluconazol to the treatment of sporotrichosis. In: **Controlled Release Society - CRS**, 2009, Copenhagen.

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Daniele Silveira Landgraf, Maria Palmira Daflon Gremião. *In vitro* dexamethasone acetate release from nanostructured systems containing oleic acid as oil phase. In: **Controlled Release Society - CRS**, 2009, Copenhagen.

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Bruna Carolina Corrêa, Maria Palmira Daflon Gremião. Oil phase effect in the structure of systems stabilized with propoxyl 5 OP ethoxyl 20 OE cethyl alcohol. In: **7th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP**, 2009, Ribeirão Preto (SP).

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Bruna Carolina Corrêa, Maria Palmira Daflon Gremião. Oil phase effect in the structure of systems stabilized with propoxyl 5 OP ethoxyl 20 OE cethyl alcohol. In: **7th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP**, 2009, Ribeirão Preto (SP).

Gabriela Marielli da Luz, Daniele Silveira Landgraf, Hilris Rocha e Silva, Maria Palmira Daflon Gremião. Profile of *in vitro* dexamethasone acetate release from nanostructured systems containing oleic acid as oil phase. In: **7th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP**, 2009, Ribeirão Preto (SP).

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Flávia Chiva Carvalho, Daniele Silveira Landgraf, Maria Palmira Daflon Gremião. Reología de sistemas estabilizados con alcohol cetílico etoxilado y propoxilado utilizando diferentes fases oleosas in: **XIX Congreso Farmaceutico Argentino**, 2009, San Juan.

Gabriela Marielli da Luz, Hilris Rocha e Silva, Daniele Silveira Landgraf, Maria Palmira Daflon Gremião. Efeito da fase oleosa no comportamento reológico de sistemas nanoestruturados para administração cutânea de fármacos. In: **56ª Jornada Farmacêutica - JFU**, 2009, Araraquara (SP).

Bruna Carolina Corrêa, Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Maria Palmira Daflon Gremião. Influência de óleo de copaíba de diferentes procedências no desenvolvimento de sistemas estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado. In: **56ª Jornada Farmacêutica - JFU**, 2009, Araraquara (SP).

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Victor Hugo Vitorino Sarmiento, Maria Palmira Daflon Gremião. Desenvolvimento de sistemas estabilizados álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol para o tratamento da esporotricose. In: **Encontro sobre estruturas auto-organizadas em soluções e interfaces - Auto Org**, 2008, Águas de São Pedro (SP).

Gabriela Marielli da Luz, Daniele Silveira Landgraf, Maria Cristina Cocenza Urban, Maria Palmira Daflon Gremião. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise do acetato dexametasona nos estudos de liberação *in vitro*. In: **55ª Jornada Farmacêutica - JFU**, 2008, Araraquara (SP).

Daniele Silveira Landgraf, Gabriela Marielli da Luz, Maria Cristina Cocenza Urban, Maria Palmira Daflon Gremião. Determinação da liberação *in vitro* do acetato de dexametasona a partir de sistemas nanoestruturados empregando miristato de isopropila. In: **55ª Jornada Farmacêutica - JFU**, 2008, Araraquara (SP).

Hilris Rocha e Silva, Gabriela Marielli da Luz, Maria Palmira Daflon Gremião. Diagrama de fases estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado de sistemas nanoestruturados contendo óleo de copaíba. In: **55ª Jornada Farmacêutica da Unesp - JFU**, 2008, Araraquara (SP).

Gabriela Marielli da Luz, Daniele Silveira Landgraf, Hilris Rocha e Silva, Ana Luiza Ribeiro de Souza, Maria Palmira Daflon Gremião. Development and validation of analytical methodology by HPLC for dexamethasone acetate analysis in nanostructured systems for the *in vitro* release studies. In: **XII Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - COLACRO**, 2008, Florianópolis (SC).

Gabriela Marielli da Luz, Daniele Silveira Landgraf, Maria Palmira Daflon Gremião, Maria Cristina Cocenza Urban, Leila Aparecida Chiavacci. Avaliação da solubilidade do dexametasona em sistemas nanoparticulados compostos de álcool cetílico etoxilado e propoxilado e miristato de isopropila e colesterol In: **54ª Jornada Farmacêutica Unesp - JFU**, 2007, Araraquara (SP).

Daniele Silveira Landgraf, Gabriela Marielli da Luz, Maria Palmira Daflon Gremião, Maria Cristina Cocenza Urban, Leila Aparecida Chiavacci. Determinação da incorporação do dexametasona em sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos empregando ácido oléico In: **54ª Jornada farmacêutica Unesp - JFU**, 2007, Araraquara (SP).

Trabalhos premiados

“Diagrama de fases como ferramenta tecnológica para avaliar o comportamento de fases de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado.” - Trabalho classificado entre os cinco primeiros colocados na 57ª Jornada Farmacêutica da Unesp/2010.

“Diagrama de fases estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado de sistemas nanoestruturados contendo óleo de copaíba.” - Trabalho classificado entre os cinco primeiros colocados na 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp/2008.

“Incorporação de dexametasona em sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado” – Trabalho classificado entre os dez primeiros colocados na 54ª Jornada Farmacêutica da Unesp/2007.