

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**HIDROGÉIS DO ÁCIDO ACRÍLICO: CORRELAÇÃO DAS PROPRIEDADES
BIOADESIVAS E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO METRONIDAZOL**

ANA CAROLINA YOSHII

ARARAQUARA

2011

ANA CAROLINA YOSHII

**HIDROGÉIS DO ÁCIDO ACRÍLICO: CORRELAÇÃO DAS PROPRIEDADES
BIOADESIVAS E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO METRONIDAZOL**

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

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

ARARAQUARA

2011

Dedico este trabalho aos meus pais, Elisete e Rui,
e a minha irmã Alyne, pelo apoio, carinho
e compreensão.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela confiança, paciência, dedicação, compreensão, e, acima de tudo, pela amizade.

À Giovana Calixto pela grande ajuda nas análises feitas no reômetro, texturômetro e nos programas gráficos.

À Dra. Hilris Rocha pela grande paciência em me ensinar a usar o permeador.

À Gabriela Marielli e Ilka pela imensa ajuda e constante presença no laboratório, sempre nos momentos em que eu mais precisava delas.

À Prof. Dr. Vera Lucia Borges Isaac por possibilitar o uso do reômetro do laboratório de cosmetologia.

Às minhas amigas Juliana Molina e Renata Marchete por todos esses maravilhosos anos que compartilhamos juntas em Araraquara. Obrigada pela amizade e presença nesses inesquecíveis anos da minha vida.

À Deus por me presentear com oportunidades que enriqueceram a minha vida.

“Cada hora perdida na mocidade é uma
possibilidade a menos nos sucessos do futuro.”

Napoleão Bonaparte

SUMÁRIO

SUMÁRIO	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	13
3. OBJETIVO	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. MATERIAIS.....	14
4.2. EQUIPAMENTOS	14
4.3. MÉTODOS	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. ANÁLISE DE TEXTURA	20
5.2. TESTE DE BIOADESÃO	22
5.3. ANÁLISE REOLÓGICA	25
5.4. AVALIAÇÃO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	28
6. CONCLUSÃO.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo desenvolver hidrogéis do ácido acrílico e correlacionar as propriedades bioadesivas e a liberação *in vitro* empregando metronidazol. Para tanto, inicialmente foram preparadas dispersões dos polímeros Carbopol 974[®] e Policarbofil[®] nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5%, que foram submetidas a testes para avaliação das propriedades bioadesivas, mecânicas e reológicas. As amostras com maior concentração de polímeros (Carbopol 974[®] 1,5%, e Policarbofil[®] 1,0% e 1,5%,) foram as que apresentaram melhores resultados nos testes de bioadesão, e portanto selecionadas para prosseguimento dos estudos, que envolveu a incorporação de metronidazol (MTZ) na concentração de 0,5% para estudo de liberação *in vitro* por 12 horas. O experimento foi realizado por meio do sistema automático com célula de difusão vertical de Franz e solução tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora. A temperatura utilizada foi 32,5 °C. Os resultados demonstraram que o tipo e a concentração do polímero influenciou diretamente na liberação do fármaco. Os melhores resultados em termos de controle de liberação foram apresentados pelo polímero Policarbofil[®] na concentração de 1,5%.

ABSTRACT

The aim of this project was to develop hydrogels of acrylic acids and correlate their bioadhesive properties to the *in vitro* release, using metronidazol. Therefore, initially it was prepared some polymers dispersions with Carbopol 974[®] and Policarbofil[®] at the content of 0,5%, 1,0%, and 1,5%, which were tested for evaluation of the bioadhesive, mechanical and rheological properties. The samples with the highest contents of polymers (Carbopol 974[®] 1,5%, e Policarbofil[®] 1,0% e 1,5%,) provided the best results to the bioadhesive tests, and thus they were selected for the following studies, which involved the incorporation of metronidazol (MTZ) at the content of 0,5% for *in vitro* release studies per 12 hours. The experiment were realized with an automatic system with Franz's vertical diffusion cell, and the phosphate buffer solution pH 7,4 was used as a receiving solution. The recorded temperature was 32,5°C. The results showed that the polymer type and content present on the formulation directly influences the controlled releasing of the drug. The best results in terms of control release were presented for the polymer Policarbofil[®] at the content of 1,5%.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do metronidazol	11
Figura 2. Parâmetros obtidos na análise do perfil de textura (Compressibilidade (A), Adesividade (B), Coesão (C) e Dureza (D)) para os hidrogéis de PCF (Policarbofil [®]) e PCB (Carbopol 974 [®]) em diferentes concentrações.	21
Figura 3. Exemplo de gráfico que mostra o trabalho de adesão e pico de força mensurados em um teste de bioadesão.	22
Figura 4. Representação gráfica das médias das forças bioadesivas (N) para as diferentes formulações de gel.	23
Figura 5. Representação gráfica das médias dos trabalhos de bioadesão para as diferentes formulações de gel.	24
Figura 6. Evolução dos módulos de armazenagem (G') Carbopol 974 [®] e Policarbofil [®]	25
Figura 7. Evolução dos módulos de perda (G'') Carbopol 974 [®] e Policarbofil [®]	26
Figura 8 Reograma dos ensaios de fluxo do Carbopol 974 [®]	26
Figura 9. Reograma dos ensaios de fluxo do Policarbofil [®]	27
Figura 10 Curva analítica do metronidazol em solução tampão fosfato pH 7,4, obtida por análise espectrofotométrica em 320 nm (n=3), $y = 0,062x + 0,0021$	29
Figura 11. Perfil de liberação do gel Carbopol 974 [®] 1,5%.	30
Figura 12. Perfil de liberação do gel Policarbofil [®] 1,0%.	31
Figura 13. Perfil de liberação do gel Policarbofil [®] 1,5%.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Forças bioadesivas (N) para as diferentes formulações de gel.	23
Tabela 2. Média dos trabalhos de adesão para as diferentes formulações de gel.	24
Tabela 3. Valores das áreas dos picos das soluções de metronidazol obtidas por análises espectrofotométricas no comprimento de onda de 320 nm, média de três determinações, desvio padrão e coeficiente de variação	28
Tabela 4. Quantidade de metronidazol liberado por área em excipiente Carbopol 974 [®] 1,5%.	30
Tabela 5. Quantidade de metronidazol liberado por área em excipiente Policarbofil [®] 1,0%. .	31
Tabela 6. Quantidade de metronidazol liberado por área em excipiente Policarbofil [®] 1,5%. .	32

1. INTRODUÇÃO

Chama-se de bioadesão ou mucoadesão a capacidade que um material sintético ou biológico tem de aderir na mucosa ou no muco por um período extenso de tempo (KEREC et al, 2002). Esse conceito tem recebido uma grande atenção devido às potenciais aplicações na liberação de fármacos e aumento da biodisponibilidade destes, com resultados de maior período de tempo de contato da forma bioadesiva da pele *versus* a dose-padrão a ser aplicada (PHARMACEUTICAL BULLETIN 23, 2008).

Nos últimos anos aumentou-se o interesse no desenvolvimento de formas farmacêuticas que poderiam controlar a liberação de fármacos através das mucosas empregando-se polímeros bioadesivos (PEPPAS et al., 1998).

Os géis poliméricos são estruturas tridimensionais formadas por polímeros reticulados que se expandem quando imersos em solventes específicos e que não se dissolvem, devido à presença de forças intermoleculares (PEPPAS et al., 1998). Exemplos desses polímeros incluindo os polímeros do ácido acrílico são Carbopol[®] e Policarbofil[®], além dos polímeros de quitosana (BLANCO-FUENTE et al, 1998).

Uma classe especial dos géis são os hidrogéis, que são constituídos por polímeros tridimensionais com ligações cruzadas e que absorvem uma quantidade considerável de solvente, no caso a água, devido a sua forte afinidade com a mesma e com a maioria das soluções aquosas. Da mesma maneira que os géis, os hidrogéis se expandem em contato com a água sem se dissolver, sendo essa expansão de volume limitada pelo grau de reticulação e entrelaçamento das cadeias poliméricas (BLANCO-FUENTE et al, 1998).

O uso de hidrogéis pode ser proposto em sistema de liberação controlada de fármacos pelo fato de absorverem grande quantidade de água, de possuírem uma natureza elástica similar a de tecidos naturais, por apresentarem biocompatibilidade e, principalmente, por terem a capacidade de controlar a taxa de liberação do fármaco em função de estímulos

externos e das condições do meio em que se encontram (BONACUCINA et al, 2004).

Como exemplo de hidrogéis, podem ser citados os carbopóis, que são polímeros de alto peso molecular de ácido acrílico que têm sido usados principalmente em formulações líquidas ou semi-sólidas, como géis, suspensões e emulsões, atuando principalmente como agente viscosificante, com o intuito de modificar as características do fluxo. Recentemente, eles estão também sendo usados em virtude de suas propriedades mucoadesivas (BLANCO-FUENTE et al, 1998).

Já o polímero Policarbofil, segundo Hosny (1992), trata-se de uma resina sintética hidrofílica de ácido poliacrílico, um copolímero de ácido acrílico com frouxas ligações cruzadas com divinilglicol, capaz de conter uma quantidade considerável de água sem dissolver-se. É um material polimérico que pode ser usado como um sistema de liberação de fármacos (HOSNY, 1992).

As propriedades bioadesivas dos hidrogéis podem ser verificadas pela análise por texturômetro, que é um instrumento versátil capaz de medir as forças de compressão ou de extensão e pode ser programado com diferentes intervalos de espera entre os ciclos, sendo a saída de dados realizada através da interface do computador (PHARMACEUTICAL BULLETIN 23, 2008).

A reologia descreve a deformação de um corpo sob influência de tensões. Corpos, neste contexto, podem ser sólidos, líquidos ou gases. Os corpos reais não são nem sólidos ideais e nem fluidos ideais. A grande maioria dos materiais apresenta um comportamento reológico que os classifica entre sólido e líquido: são elásticos e viscosos, portanto, chamados de viscoelásticos. O estudo reológico é realizado a partir de testes oscilatórios e rotacionais. Os testes oscilatórios são realizados para estudar as propriedades viscoelásticas da amostra, enquanto que os testes rotacionais estudam o comportamento de fluxo do produto (SCHRAMM, 2006).

Durante a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos é também adequado empregar procedimentos de avaliação de liberação *in vitro* para selecionar matérias-primas para as formulações que possam proporcionar uma atividade terapêutica adequada. Pode-se considerar que os estudos de liberação proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os fármacos (SATO et al, 2007).

Um dos fármacos que tem sido bastante empregado em infecções que acometem a pele é o metronidazol, cuja fórmula estrutural encontra-se na Figura 1.

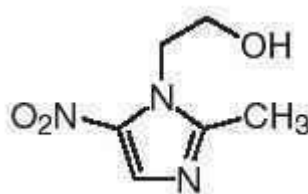


Figura 1. Fórmula estrutural do metronidazol

O metronidazol [1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole] é um agente antimicrobiano sintético, efetivo contra a maioria das bactérias anaeróbicas gram-positivas e gram-negativas e vários protozoários (RAFII et al, 2003). Caracteriza-se por ser um pó cristalino branco ou levemente amarelado, inodoro, e seu peso molecular é 171,15. Apresenta solubilidade a 1,0% em água, 1,5% em etanol e menos de 0,5% em éter, e seu ponto de fusão é entre 158 e 160°C.

Este fármaco pertence à classe dos nitroimidazóis, que são substâncias que apresentam um radical nitroso ligado ao núcleo imidazólico. Apresenta alta potência antimicrobiana contra a maioria dos cocos e bacilos anaeróbios, além de ser clinicamente eficaz contra a tricomoniase, amebíase e giardíase (ZIP, 2010).

O efeito microbicida do metronidazol em suscetíveis microrganismos é mediado por um intermediário que se forma como resultado da atividade nitrorredutora da bactéria. A nitroredutase produz derivados que interagem com o DNA, causando dano caracterizado pela

desestabilização da hélice, quebra da fita e liberação de nucleotídeos de timidina (ZIP, 2010).

Devido a sua rápida atividade antimicrobiana, baixo custo, limitados efeitos adversos e boa penetração tópica, o metronidazol tem sido incorporado em formulações convencionais objetivando a profilaxia e tratamento de uma série de infecções que acometem a pele, como lesões causadas por rosácea, graus III e IV de úlceras de decúbito infecciosas por anaeróbios e dermatite perioral (ZIP, 2010).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Os hidrogéis apresentam propriedades hidrofílicas e bioadesivas, controlam a velocidade de liberação do fármaco, e são termodinamicamente compatíveis com a água, o que lhes permite intumescer em meio aquoso. Tais propriedades o tornam um potencial sistema objetivando liberação controlada de fármacos.

Estudos têm mostrado que o metronidazol possui boa ação tópica quando incorporado em formulações convencionais. Todavia, devido às propriedades bioadesivas que os hidrogéis podem conferir, acredita-se que a ação do metronidazol poderia ser potencializada, correlacionando, desta forma, bioadesão e liberação *in vitro*.

3. OBJETIVO

O objetivo deste projeto foi avaliar as propriedades bioadesivas, mecânicas e reológicas de hidrogéis derivados do ácido poliacrílico em diferentes concentrações, objetivando a incorporação de metronidazol, para posterior co-relação com dados de liberação *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.MATERIAIS

- Água deionizada Milli-Q;
- Carbopol 974[®] P NF Polymer, Lubrizol, Cleveland;
- Fosfato de Potássio Monobásico Anidro pa., Qhemis, Brasil;
- Hidróxido de Sódio, Grupo Química, Brasil;
- Membrana de Acetato Celulose para tubos de diálise, 76 mm, Sigma-Aldrich, USA;
- Metronidazol, Henrifarma, Brasil;
- Pele de orelha de porco dermatomizada na espessura de 500 um;
- Policarbofil[®] Polymer, Lubrizol, Cleveland;
- Trietanolamina.

4.2.EQUIPAMENTOS

- Agitador mecânico;
- Balança Analítica Ohaus - AS200;
- Balança Semi-Analítica, Marte – AS 2000C;
- Centrífuga Sorvall TC6 DuPont;
- Dermatômetro Nouvag TCM 300, Goldach, USA;
- Espectrofotômetro HP 8453;
- pHmetro digital PG 1800 Gehaka;
- Purificador de água Milli-Q Plus – Millipore;
- Reômetro, modelo RS-1, (Haake Rheostress);

- Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus (Hanson Research Corporation[®]);
- Tamis GranuTest, ABNT 40, Abertura em 0,42mm, Tyler 35;
- Texturômetro, TA-Xtplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK).

4.3.MÉTODOS

4.3.1. Desenvolvimento dos géis

Foram preparadas 200g de dispersões de Carbopol 974[®] e Policarbofil[®], em triplicata, nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% cada, utilizando água milli-Q como solvente. Os polímeros foram tamisados em Tamis GranuTest, ABNT 40 separadamente antes da pesagem, de forma a garantir melhor homogeneização no momento da preparação da dispersão.

Após prévia agitação manual, as dispersões foram submetidas a agitação mecânica, onde permaneceram até total quebra dos grumos.

Após total dispersão dos polímeros em água, as formulações foram submetidas ao ajuste para pH 6,5 empregando trietanolamina. Observou-se o aumento da viscosidade da formulação, em função do aumento do pH. A verificação do pH foi feita empregando pHmêtro digital PG 1800 Gehaka.

4.3.2. Análise de textura

Para caracterizar mecanicamente os sistemas em questão, as amostras foram submetidas ao teste TPA (*Texture profile analysis*) através do analisador de textura TAXtplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK). Este teste consiste em submeter a amostra a 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 (7,5 g) foram colocadas em tubos de centrífuga, tipo Falcon (BD[®]), com capacidade para 45 ml e centrifugadas a 3500 rpm por 3 min (Sorval, modelo TC 6 Du Pont), para eliminação das bolhas de ar e tornar suas superfícies lisas. No modo TPA, a prova analítica (cilindro de plástico com 10 mm de diâmetro) desce a uma velocidade constante de 1 mm/s, encontra a amostra a uma profundidade definida (10 mm), e volta até a superfície a uma velocidade de 0,5 mm/s. Após este primeiro ciclo, a prova permanece em repouso por 5 s, quando então inicia a segunda

compressão. Foram analisadas pelo menos sete replicatas para cada formulação à temperatura ambiente (25°C).

4.3.3. Teste de bioadesão

A bioadesão dos sistemas foi avaliada através da medida da força necessária para destacar a formulação mantida em contato com pele animal, utilizando para isso o analisador de textura TAXT *plus* (Stable Micro Systems[®], Surrey, Inglaterra), através do teste *Hold Until Time*. A pele utilizada foi obtida de orelhas de porcos domésticos provenientes de abatedouro local, separada da cartilagem com o auxílio de uma lâmina e depois separada do tecido adiposo, sendo posteriormente dermatomizada com auxílio de um dermatômetro (Nouvag TCM 300, Goldach, USA) na espessura de 500 µm, retirando-se o estrato córneo, epiderme e parte da derme. Antes do ensaio, as peles foram hidratadas com água destilada, os pêlos foram removidos com auxílio de uma tesoura e foram afixadas na prova com o auxílio de anéis de borracha.

Os hidrogéis (7,5 g) foram colocados em tubos de centrifuga, tipo Falcon (BD[®]), com capacidade para 45 ml e centrifugados a 3500 rpm por 3 min (Sorval, modelo TC 6 Du Pont), para eliminação das bolhas de ar e tornar suas superfícies lisas. A pele foi colocada na prova cilíndrica superior. O teste iniciou-se com a prova superior descendo até encontrar a amostra (detectada por uma força de gatilho de 2 mN) a uma velocidade constante de 1 mm/s, e permanecendo em contato com a pele por 60 segundos. Nenhuma força foi aplicada durante a fase de contato. A prova foi lentamente removida a uma velocidade constante de 0,5 mm/s e a força necessária para destacar a amostra da pele foi determinada através da curva força pelo tempo. O trabalho de adesão, ou seja, área sob a curva determinada durante a fase de retirada da prova, foi determinada utilizando o software *Texture Exponent Lite* do equipamento. Esse parâmetro foi usado como medida de mucoadesão.

4.3.4. Avaliação do comportamento reológico

As análises reológicas de hidrogéis foram feitas empregando o reômetro RheoStress modelo RS1 (HAAKE) e o software Rheowin 3,5, com um sensor de geometria cone-placa Platte PP 35 Ti de 35 mm de diâmetro com uma abertura de 200 mm entre as placas. Para este teste, colocou-se uma pequena amostra de gel entre o cone e a placa. Os testes realizados foram testes oscilatórios e propriedades de fluxo. A temperatura foi mantida em 25°C.

4.3.5. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do metronidazol

Foi utilizado método espectrofotométrico para quantificação do metronidazol liberado a partir da membrana de acetato de celulose. Para tanto, construiu-se uma curva analítica de metronidazol em espectrofotômetro HP 8453. Preparou-se uma solução mãe de metronidazol e a partir desta, prepararam-se diluições de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 µg de metronidazol/mL de solução – tampão fosfato pH 7,4. A curva analítica do metronidazol em tampão fosfato pH 7,4 foi obtida através de análises espectrofotométricas em triplicata, em $\lambda = 320$ nm.

4.3.6. Incorporação do metronidazol aos hidrogéis

Escolheu-se as três formulações mais bioadesivas para incorporar o metronidazol e posteriormente realizar o teste de liberação *in vitro*. Dessa maneira, incorporou-se 0,5% de metronidazol nas dispersões de Carbopol[®] 974 na concentração 1,5% e de Policarbofil[®] nas concentrações de 1,0% e 1,5%. O metronidazol foi incorporado antes da neutralização com trietanolamina, apenas por agitação manual.

4.3.7. Avaliação da Liberação *in vitro*

A liberação do metronidazol das formulações variando os polímeros Carbopol 974[®] na

concentração de 1,5% e Policarbofil[®] nas concentrações de 1,0% e 1,5% foi avaliada utilizando-se equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation,), contendo seis células de Franz modificada, de volume aproximado de 7 mL. A solução receptora foi o tampão fosfato monobásico 0,01M pH 7,4 e membrana sintética utilizada foi a de acetato de celulose 0,45 μm (Sigma-Aldrich[®]). Os hidrogéis foram previamente pesados em papel alumínio e transferidas para o anel dosador colocado sobre a membrana disposta na célula de difusão de Franz até completar o anel dosador (aproximadamente 400 mg e área de exposição de 1,77cm²).

Os experimentos foram conduzidos a 32,5°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 em vials nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12, horas e analisadas por Espectrofotômetro HP 8453 para quantificação do fármaco liberado por tempo.

A equação abaixo (USP, 2009) foi utilizada para calcular a quantidade real liberada/permeada (Q real) em determinado tempo:

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c$$

Na qual:

Q real, t = quantidade real liberada 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)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DE TEXTURA

A partir do resultado de força por tempo e força por distância foi possível calcular a dureza (força necessária para chegar a uma dada deformação), compressão (trabalho necessário para deformar o produto durante a compressão), adesividade (trabalho necessário para superar as forças de atração entre as superfícies da amostra e sonda) e coesão (força que liga as moléculas). Usando esta técnica, foi possível realizar uma avaliação prévia da capacidade do material adesivo, evidenciando as propriedades de mucoadesão (BRUSCHI, 2006).

A Figura 2 apresenta os parâmetros obtidos na análise do perfil de textura (Compressibilidade (A), Adesividade (B), Coesão (C) e Dureza (D)) para os hidrogéis de Policarbofil[®] (PCF) e Carbopol[®] 974 (PCB) em diferentes concentrações.

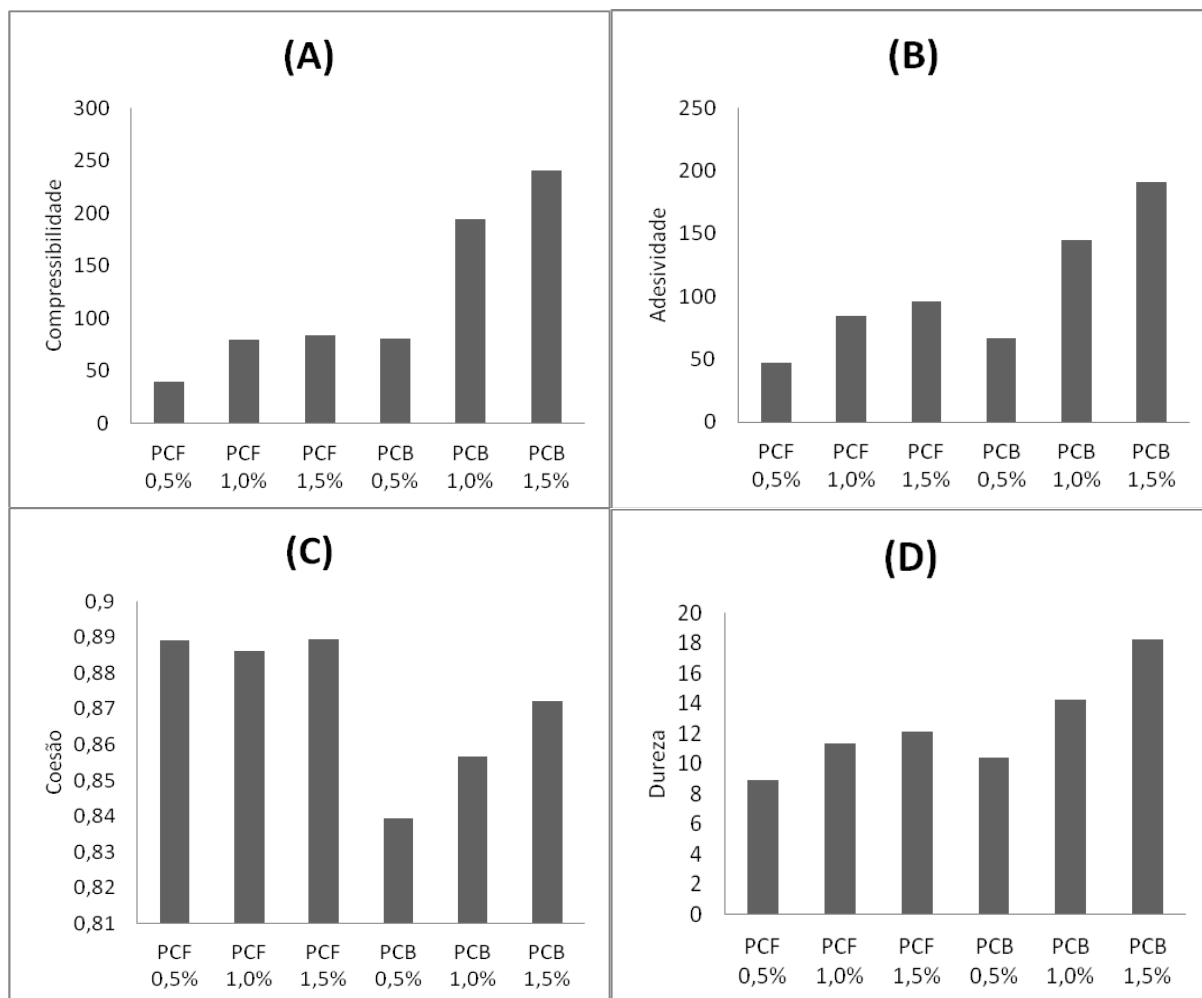


Figura 2. Parâmetros obtidos na análise do perfil de textura (Compressibilidade (A), Adesividade (B), Coesão (C) e Dureza (D)) para os hidrogéis de PCF (Policarbofil®) e PCB (Carbopol 974®) em diferentes concentrações.

Pela Figura 2, observa-se que Carbopol 974® tem valores de dureza, trabalho de compressão e adesão superiores ao Policarbofil®, revelando que as moléculas de Carbopol 974® são mais fortemente ligadas, necessitando de força maior para chegar a uma dada deformação.

5.2. TESTE DE BIOADESÃO

Estudos de bioadesão determinam a força máxima e trabalho necessários para separar duas superfícies de um contato íntimo (BLANCO-FUENTE et al., 1996). O teste de bioadesão foi feito com tempo de contato de 60 segundos.

Sabe-se que a maioria dos testes podem variar em relação à força de adesão e ao trabalho de adesão mensurados. A força de bioadesão, ou pico de força de adesão, refere-se à altura do pico da curva de tensão-deformação, que representa a força exigida para separar a prova do substrato. Já o trabalho de bioadesão é a área sobre a curva de tensão-deformação. Esta área refere-se à energia necessária para romper a ponte adesiva (PHARMACEUTICAL BULLETIN 23, 2008). A Figura 3 exemplifica um gráfico de teste de bioadesão.

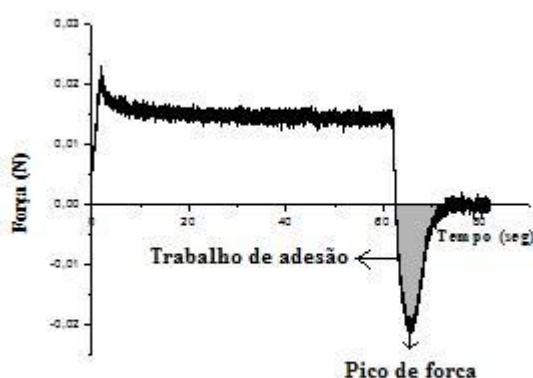


Figura 3. Exemplo de gráfico que mostra o trabalho de adesão e pico de força mensurados em um teste de bioadesão.

Os resultados das médias das forças bioadesivas (N) para as diferentes formulações de gel encontram-se na Tabela 1 e Figura 4.

Tabela 1. Forças bioadesivas (N) para as diferentes formulações de gel.

Gel	Forças Bioadesivas (N)
Carbopol 974 0,5%	4,05843
Carbopol 974 1,0%	4,50971
Carbopol 974 1,5%	5,46214
Policarbofil 0,5%	3,99014
Policarbofil 1,0%	5,09029
Policarbofil 1,5%	5,17414

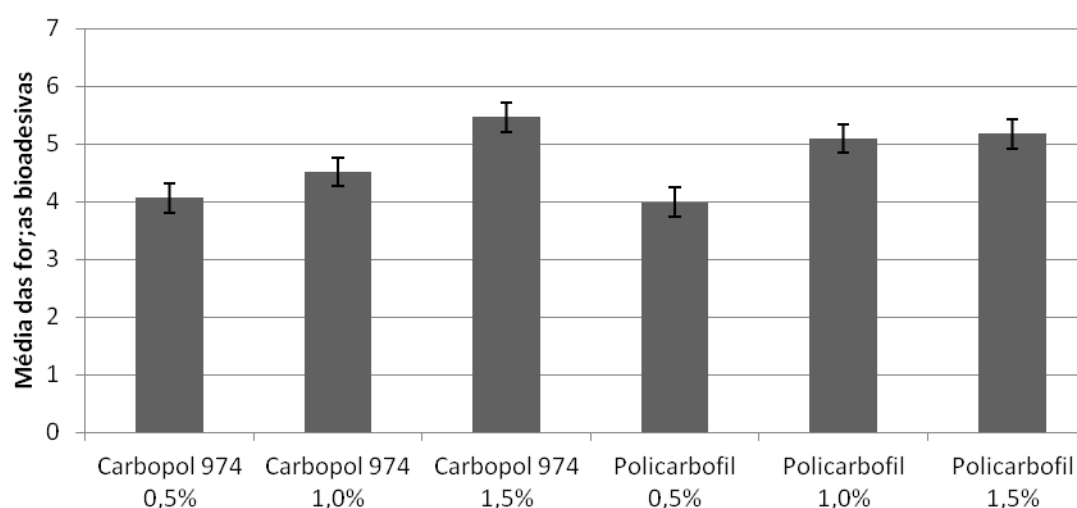


Figura 4. Representação gráfica das médias das forças bioadesivas (N) para as diferentes formulações de gel.

Além disso, também foram avaliadas os trabalhos de bioadesão, referentes ao tempo utilizado pelo gel para romper a força bioadesiva. Os resultados se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Média dos trabalhos de adesão para as diferentes formulações de gel.

Gel	Trabalho de Bioadesão
Carbopol 974 0,5%	22,1946
Carbopol 974 1,0%	24,161
Carbopol 974 1,5%	29,644
Policarbofil 0,5%	21,239
Policarbofil 1,0%	27,065
Policarbofil 1,5%	25,764

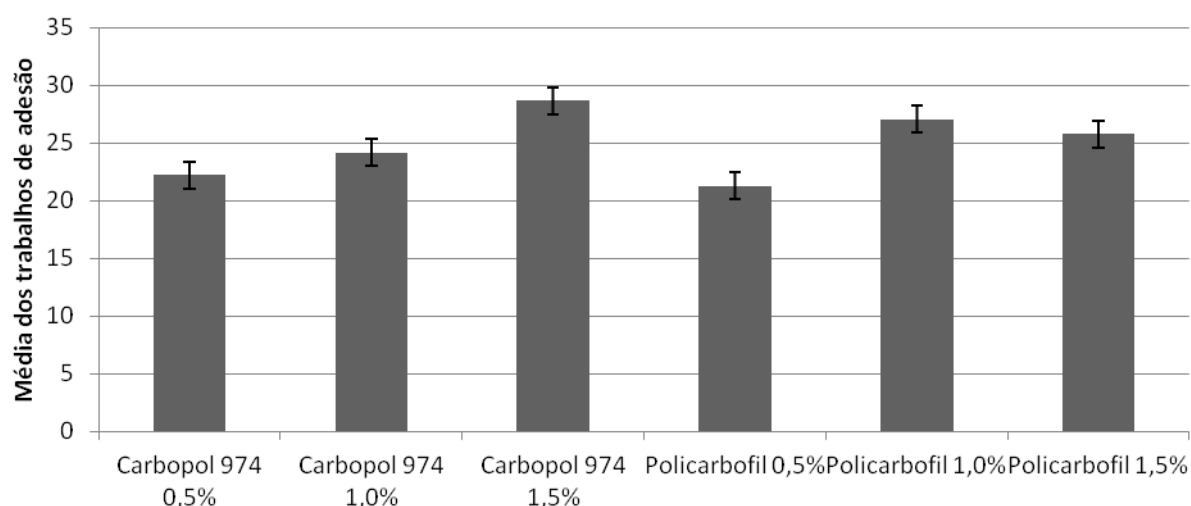


Figura 5. Representação gráfica das médias dos trabalhos de bioadesão para as diferentes formulações de gel.

Através dos estudos dos géis, observou-se que as porcentagens de cada polímero (Carbopol 974[®] e Policarbofil[®]) podem influenciar nas características dos hidrogéis. É possível analisar pelos dois gráficos obtidos que os géis Carbopol 974[®] na concentração de 1,5% e Policarbofil[®] nas concentrações de 1,0% e 1,5% são as formulações que exigem maior força bioadesiva. Quanto maior a concentração de polímero, mais rígido/viscoso será o gel. Dessa maneira, comprovou-se a influência da quantidade do polímero na sua rigidez.

5.3. ANÁLISE REOLÓGICA

5.3.1. Testes Oscilatórios

Neste tipo de ensaio, a tensão de cisalhamento varia como uma onda senoidal e a relação entre as ondas de tensão aplicada e a deformação resultante fornece informações sobre os tipos de resposta (elástica ou viscosa) do sistema. A partir da razão destas duas grandezas, obtém-se o módulo elástico complexo G^* . A componente real do módulo elástico, G' , é denominada de módulo de armazenagem, porque representa a energia armazenada durante a deformação à tensão crescente, a qual é liberada quando a tensão é relaxada. A parte imaginária do módulo, G'' , deve-se ao elemento viscoso que não pode armazenar energia, porque a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível. Desse modo, G'' é denominado módulo de perda e leva em conta esta dissipação de energia (CHORILLI, 2007).

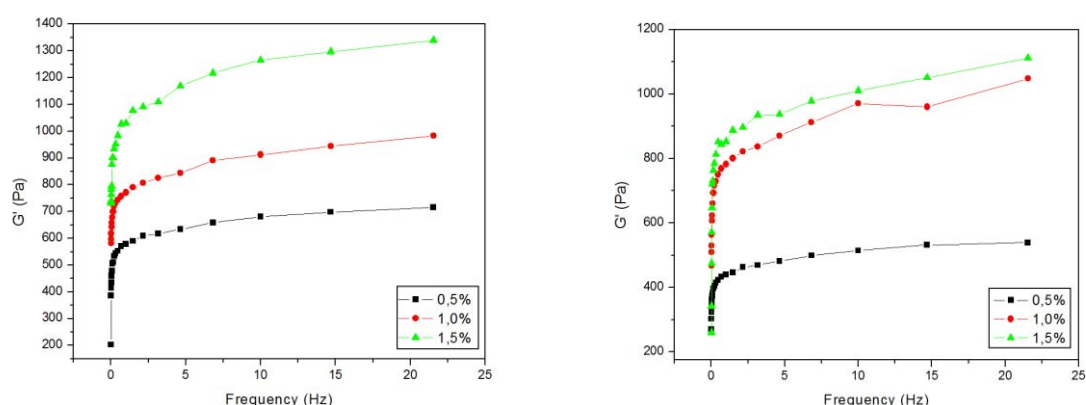


Figura 6. Evolução dos módulos de armazenagem (G') Carbopol 974[®] e Polycarbofil[®].

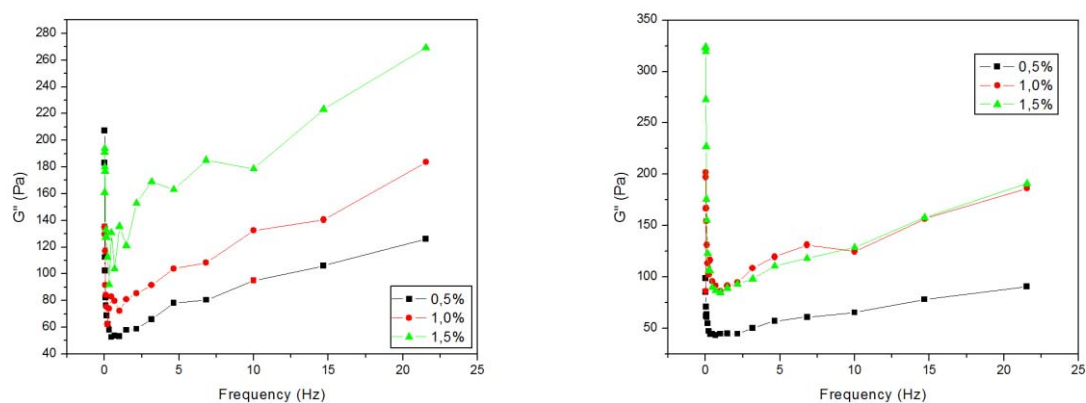


Figura 7. Evolução dos módulos de perda (G'') Carbopol 974[®] e Policarbofil[®].

Os sistemas com maior concentração de polímero apresentaram alto módulo de armazenagem (G') assim como alto módulo de perda (G''), revelam a formação de uma rede estrutural consolidada. Este fato pode ser confirmado pelo alto grau de tixotropia. Inversamente à isto, os géis com menores concentrações de polímeros apresentaram baixos módulo de perda e armazenamento, o que indica que a concentração dos componentes interferem significativamente na formação estrutural.

5.3.2. Análise de escoamento

Os dados obtidos na análise de escoamento foram utilizados na construção de reogramas, nos quais é possível observar a relação entre tensão de cisalhamento (σ) e velocidade de cisalhamento (γ).

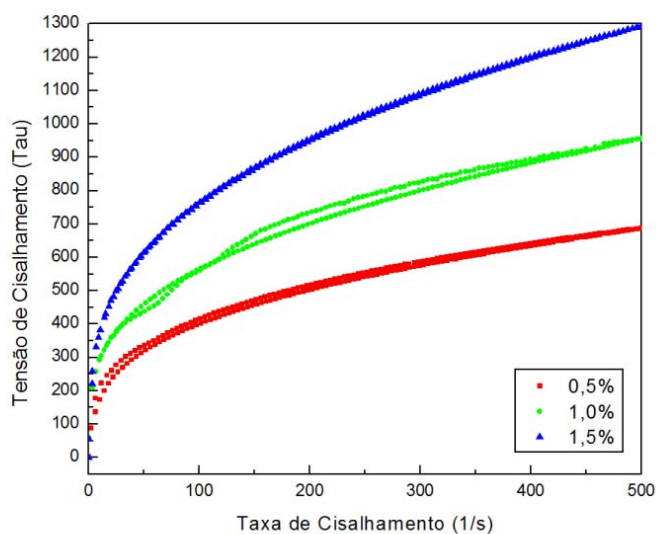


Figura 8 Reograma dos ensaios de fluxo do Carbopol 974[®].

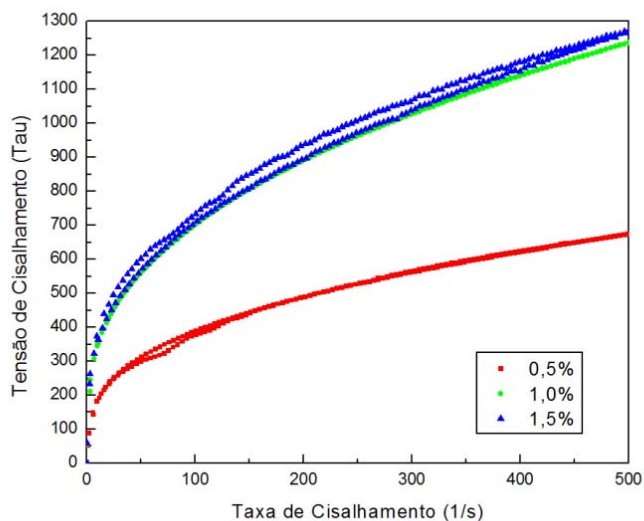


Figura 9. Reograma dos ensaios de fluxo do Policarbofil[®]

A diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento que ocorreu nos sistemas estudados é uma característica de fluidos pseudoplásticos (SCHRAMM, 2006). A pseudoplasticidade é adequada para produtos indicados para uso tópico, pois após a aplicação da tensão a formulação apresenta facilidade para fluir, levando a um bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na superfície cutânea (CHORILLI, 2007).

Além disso, há variáveis temporais da viscosidade. Sob uma tensão constante, a viscosidade pode se reduzir (fluidos tixotrópicos) ou aumentar (reopéticos). São ainda chamados viscoelásticos os fluidos que recuperam sua forma original, pelo menos parcialmente, depois de cessada a força a qual estavam submetidos (HARLEY, 2003).

Dessa maneira, pode-se verificar que as formulações apresentam leve tixotropia, através de análise das Figuras 8 e 9, já que algumas das curvas apresentam área de histerese.

5.4.AVALIAÇÃO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

A curva analítica do metronidazol em tampão fosfato pH 7,4 foi obtida através de análises espectrofotométricas em triplicata, em $\lambda = 320$ nm. A equação representativa da regressão linear foi $y = 0,062x + 0,0021$, com coeficiente de correlação 0,9988.

A partir dessa equação e do valor da área do pico das soluções foi possível calcular a quantidade de fármaco liberado, a partir do fármaco presente no meio receptor. A Tabela 3 mostra as concentrações de metronidazol e respectivas absorbâncias, exibidas na Figura 9.

Tabela 3. Valores das áreas dos picos das soluções de metronidazol obtidas por análises espectrofotométricas no comprimento de onda de 320 nm, média de três determinações, desvio padrão e coeficiente de variação

Conc. µg/ml	N1	N2	N3	Abs media	Desvio padrão	Coeficiente de Variação
2,5	0,14975	0,14902	0,14845	0,149073	0,000652	0,437126
5	0,30829	0,31368	0,31068	0,310883	0,002701	0,868733
7,5	0,47259	0,47287	0,46994	0,4718	0,001617	0,342704
10	0,62007	0,63429	0,63817	0,630843	0,00953	1,510603
12,5	0,77586	0,78869	0,79435	0,7863	0,009474	1,204866
15	0,91613	0,9158	0,91655	0,91616	0,000376	0,04103

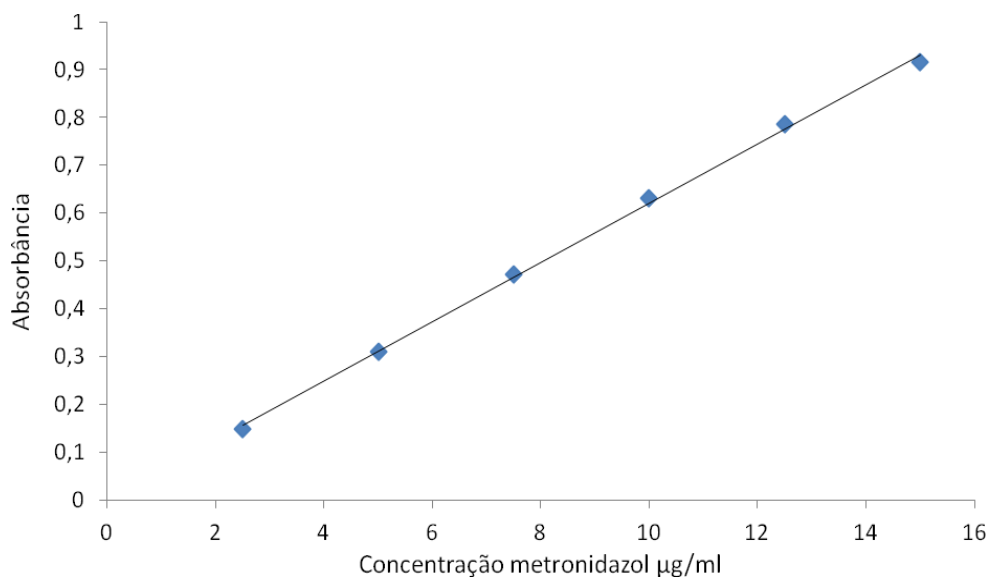
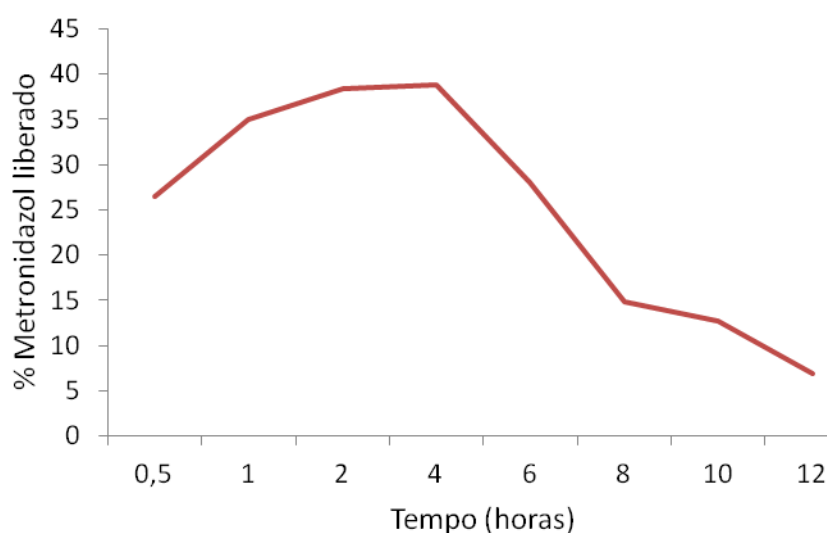


Figura 10 Curva analítica do metronidazol em solução tampão fosfato pH 7,4, obtida por análise espectrofotométrica em 320 nm (n=3), $y = 0,062x + 0,0021$.

As amostras da solução tampão colhidas das células de Franz e transferidas automaticamente para os vials foram diluídas a 1:10 em solução tampão fosfato pH 7,4 e lidas em espectrofotômetro em 320 nm. As tabelas 4, 5 e 6 ilustram a leitura das amostras de cada gel, nos respectivos horários de coleta, e as figuras 11, 12 e 13 ilustram o perfil de liberação do metronidazol incorporado aos hidrogéis em função do tempo. A Tabela 4 abaixo mostra os dados referentes ao gel Carbopol 974[®] 1,5%, e a Figura 11 ilustra o seu comportamento de liberação.

Tabela 4. Quantidade de metronidazol liberado por área em excipiente Carbopol 974[®] 1,5%.

Tempo	Q real	Q real $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Desvio padrão	CV %	% Metronidazol liberado
30 min	528,8884	298,8069	18,9412	6,3389	26,4445
1 h	699,2774	395,0719	15,6061	3,9501	34,9639
2 hs	768,3494	434,0956	11,4396	2,6352	38,4175
4 hs	775,6452	438,2176	11,1074	2,5346	38,7823
6 hs	560,8581	316,8689	14,0273	4,4268	28,0429
8 hs	297,3442	167,9910	18,0268	10,7308	14,8672
10 hs	253,409	143,1689	16,0312	11,1974	12,6704
12 hs	137,9971	77,9644	7,3253	9,3958	6,8998

Figura 11. Perfil de liberação do gel Carbopol 974[®] 1,5%.

Analisando-se a figura 11 é possível notar a propriedade de liberação controlada exercida pelo Carbopol 974[®], em que continua liberando o metronidazol mesmo depois de 8 horas após a aplicação. Também pode-se verificar o seu comportamento específico, em que apresenta um pico de liberação do fármaco entre 3 a 4 horas depois da aplicação.

A tabela 5 mostra os dados referentes ao perfil de liberação do Policarbofil[®] 1,0%, e a Figura 12 demonstra seu perfil de liberação.

Tabela 5. Quantidade de metronidazol liberado por área em excipiente Policarbofil® 1,0%.

Tempo	Q real	Q real $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Desvio padrão	CV %	% Metronidazol liberado
30 min	725,693	409,9960	23,0056	5,6111	23,8728
1 h	751,401	424,5203	29,6736	6,9899	24,3410
2 hs	712,156	402,3479	30,4813	7,5758	19,5455
4 hs	613,441	346,5767	23,8820	6,8908	15,0446
6 hs	426,968	241,2248	41,7343	17,3099	10,0097
8 hs	274,376	155,0144	25,6966	16,5769	6,0625
10 hs	163,902	97,6829	11,4902	11,7628	4,0233
12 hs	99,0293	59,9567	13,2060	22,0259	2,2202

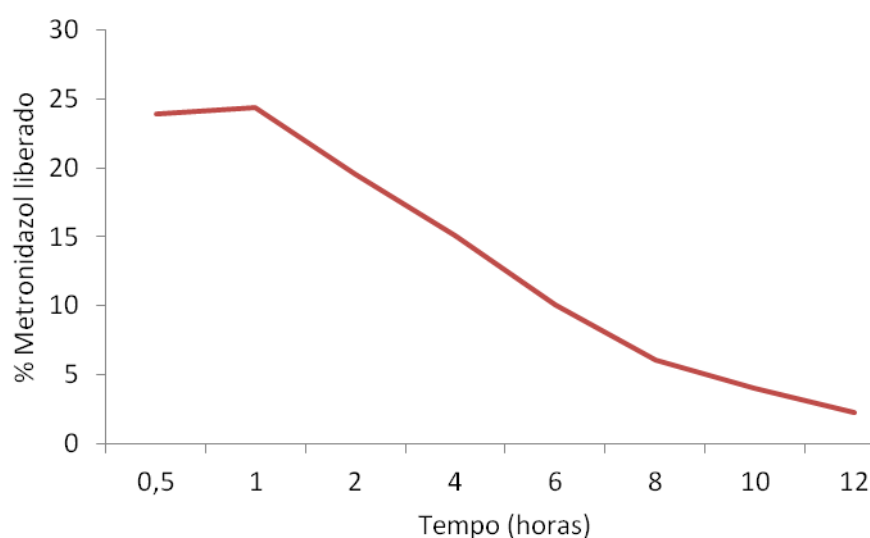


Figura 12. Perfil de liberação do gel Policarbofil® 1,0%.

Pode-se concluir a partir de uma análise feita no gráfico referente ao gel Policarbofil®, que na concentração de 1,0% que o pico de liberação se dá nas primeiras 2 horas após a aplicação do gel, e com o passar do tempo a liberação vai decaindo regularmente.

A tabela 6 mostra os dados referentes ao perfil de liberação do Policarbofil® 1,5%, e a Figura 13 demonstra seu perfil de liberação.

Tabela 6. Quantidade de metronidazol liberado por área em excipiente Policarbofil® 1,5%.

Tempo	Q real	Q real $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Desvio padrão	CV %	% Metronidazol liberado
30 min	542,927	306,738	23,2172	7,5690	26,4628
1 h	622,207	351,53	15,341	4,3640	31,4466
2 hs	748,774	423,036	22,9677	5,4292	36,2504
4 hs	738,845	417,427	53,6644	12,856	35,3052
6 hs	515,358	291,163	54,1092	18,5838	27,3408
8 hs	342,327	193,405	34,723	17,9535	18,3992
10 hs	250,022	142,441	27,5047	19,3095	11,6114
12 hs	161,81	91,3862	18,7957	20,5673	7,4992

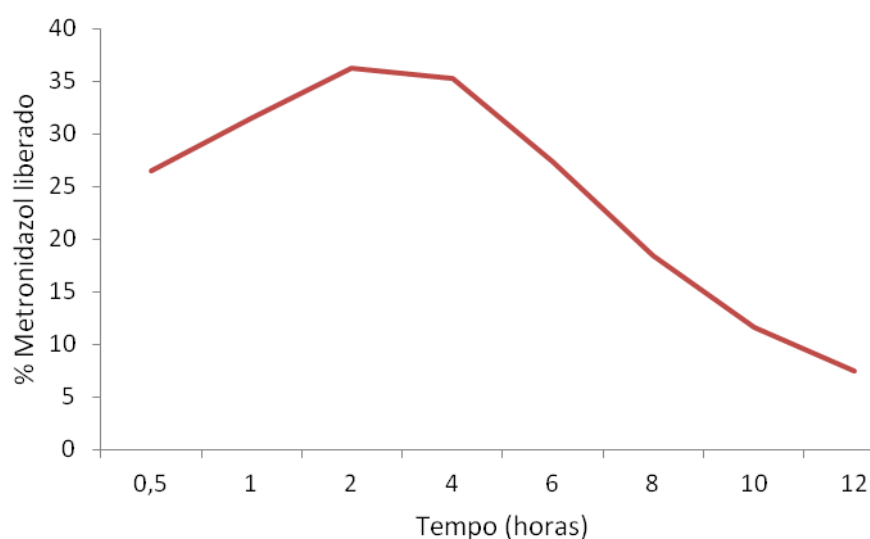


Figura 13. Perfil de liberação do gel Policarbofil® 1,5%.

Pode-se observar claramente na Figura 13 como o gel Policarbofil® na concentração 1,5% apresenta como pico de liberação um platô exatamente entre 2 e 4 horas após a aplicação. É também nítido observar como apresenta uma liberação controlada do metronidazol muito regular nas horas seguintes em que a liberação de metronidazol decresce.

6. CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas pôde-se concluir que alguns dos géis apresentam tixotropia, embora a maioria deles possua apenas características pseudoplásticas. Além disso, os géis constituídos de polímeros em maiores concentrações foram os que apresentaram maior capacidade bioadesiva, confirmando a efetividade das ligações intermoleculares biocompatíveis com a pele animal.

Após a realização dos ensaios de liberação *in vitro*, pode-se observar o comportamento de cada gel nas primeiras doze horas a partir do momento em que foi aplicado sobre a membrana, e pode-se concluir que os géis com maiores concentrações de polímero apresentaram pico de liberação entre três e quatro horas a partir do momento da aplicação, enquanto o gel com concentração menor de polímero apresentou pico de liberação do metronidazol nas primeiras duas horas após a aplicação.

Dessa maneira, conclui-se que a efetividade de sistemas de liberação controlada destinadas a aplicações tópicas está intimamente relacionada à concentração de polímero presente na formulação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. *Cosmetics & Toiletries* (ed. Port.), v.15, n. 3, p. 96-100, 2003.
2. BLANCO-FUENTE, H.; ANGUIANO-IGEA, S.; OTERO-ESPINAR, F.J.; BLANCO-MÉNDEZ, J.; In-vitro bioadhesion of carbopol hydrogels, *International Journal of Pharmaceutics* 142, Espanha, pp. 169-174, 10 de julho de 1996.
3. BONACUCINA, Giulia; MARTELLI, Sante; PALMIERI, Giovanni F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents, *International Journal of Pharmaceutics* 282, Itália, pp. 115-130, 29 de julho de 2004.
4. CHORILLI, M. Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo. 2007. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.
5. FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
6. HARLEY E. A. Bicas, Métodos Alternativos na correção de transtornos oculomotores. *Arq Bras Oftalmol* 2003;66:453-60.
7. HOSNY, Ehab A., Polycarbophyl as a controlled release matrix, *International Journal of Pharmaceutics* 98, Arábia Saudita, pp. 235-238, 9 de novembro de 1992.
8. JONES, DS; BRUSCHI, Marcos Luciano; FREITAS, O. ; DAFLON, Maria Palmira Gremião; LARA, Elza Helena G; Andrews, GP. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *International Journal of Pharmaceutics* (Print), v. 372, p. 49-58, 2009.

9. KEREC, M; BOGATAJ, M; MUGERLE, B.; GASPERLIN, M.; MRHAR, A.,
Mucoadhesion on pig vesical mucosa: influence of polycarbophil/calcium interactions.
International Journal of Pharmaceutics 241, Eslovenia, pp. 135-143, 19 de abril de 2002.
10. PEPPAS, Nikolaos S.; SAHLIN, Jennifer J. Hydrogels as mucoadhesive and
bioadhesive materials: a review. *Biomaterials* 17, Estados Unidos, 1996.
11. *Pharmaceutical Bulletin* 23, Lubrizol, de 29 de outubro de 2008.
12. RAFII, Fatemeh; WYNNE, Rebecca; HEINZE, Thomas M.; PAINE, Donald D.
Mechanism of metronidazole-resistance by isolates of nitroreductase-producing
Enterococcus gallinarum and *Enterococcus casseliflavus* from the human intestinal
tract. *FEMS microbiology letters* 225, Federation of European Microbiological
Societies. pp. 195-200, 18 de julho de 2003.
13. SATO, Mayumi E. O.; GOMARA, Fernanda; PONTAROLO, Roberto;
ANDREAZZA, Itamar F.; ZARONI, Mariella, Permeação cutânea *in vitro* do ácido
kójico, Rev. Bras. Cienc. Farm. v.43 n.2 São Paulo abr./jun. 2007
14. SCHRAMM, G. Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos. São Paulo:
Artliber Editora. 2 ed., 2006.
15. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals /Maryadele J.
O’Neil, senior editor [et al.]. – Edição 14.ed. – Imprenta Whitehouse Station: Merck,
2001, 1657 pp
16. ZIP, Catherine M. Innovative Use of Topical Metronidazole. *Dermatologic Clinics*,
Volume 28, Issue 3, pp. 525-534, July 2010.