

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



“Correlação entre estrutura e propriedades de sistemas líquidos cristalinos para a liberação prolongada de fármacos”

Aluna: Nathalia Cristina Rissi

Orientadora: Prof. Dra. Leila A. Chiavacci

Araraquara-SP

2013

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



“Correlação entre estrutura e propriedades de sistemas líquidos cristalinos para a liberação prolongada de fármacos”

Dissertação apresentada ao programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aluna: Nathalia Cristina Rissi

Orientadora: Prof. Dra. Leila A. Chiavacci

Araraquara-SP

2013

Ficha Catalográfica

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

R596c Rissi, Nathalia Cristina
Correlação entre estrutura e propriedades de sistemas líquidos cristalinos para a liberação prolongada de fármacos / Nathalia Cristina Rissi. – Araraquara, 2013
125 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Leila Aparecida Chiavacci

1. Sistemas líquidos cristalinos. 2. Liberação prolongada. 3. Diclofenaco de sódio. 4. Diclofenaco de potássio. 5. Microscopia de luz polarizada. 6. SAXS. 7. Medidas reológicas. I. Chiavacci, Leila Aparecida, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

*Aos meus pais, César e Dirce, grandes incentivadores deste trabalho,
oferecendo-me amor, carinho e força, acreditando sempre no meu potencial....*

*E ao meu namorado, Carlos,
por todo carinho, paciência e compreensão.*

Muito Obrigada!

“Se eu pudesse deixar algum presente à você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída”

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo que conquistei até agora, mas peço a Ele para me dar sabedoria para conquistar muito mais.

A minha família, em especial meus pais e meu namorado, pelo amor e apoio incondicional.

Agradeço a minha orientadora professora Dra. Leila Aparecida Chiavacci pelo apoio, paciência, amizade e por todo conhecimento adquirido durante a realização deste trabalho.

A professora Dra. Vera Lucia Borges Isaac e ao professor Dr. Marcos Antonio Corrêa, por terem cedido um espaço no laboratório de Cosmetologia e também pelos materiais que foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

Agradeço também a professora Dra. Maria Virgínia Scarpa, por ter cedido um espaço em seu laboratório de Controle de Qualidade para a realização deste trabalho e por permitir a utilização do Microette e do HPLC.

Ao Instituto de Química da UNESP/Araraquara, em especial ao professor Dr. Celso V. Santilli, pela disponibilização de seu laboratório para a realização das medidas reológicas.

Aos professores Dra. Thalita P. Formariz, Dra. Renata F. V. Lopez e ao Dr. Marcos Antonio Corrêa, por colaborarem para o enriquecimento deste trabalho participando das bancas de qualificação e defesa.

*E aos professores Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos,
Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, Dra. Hérica Regina Nunes Salgado,
Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, Prof. Dr. João Aristeu da Rosa,
Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, Prof. Dr. Marlus Chorilli e
Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista por permitirem a utilização de seus
laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram
para que este trabalho fosse desenvolvido.*

*Ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS - Campinas), onde foram
realizados os ensaios de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).*

*A Renata Kaminski, pela ajuda na realização das análises de SAXS no
Laboratório Nacional de Luz Luz Síncroton – LNLS e também pela amizade.*

*À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), em especial a
técnica de laboratório Fátima Rodrigues por sempre estar pronta para ajudar.*

*Às amigas que fiz durante a realização deste trabalho e que se tornaram
pessoas muito especiais, Ana Carolina, Ana Cláudia, Bruna, Carol, Dani,
Danila, Elô, Gabi, Ilzinha, João, Juliana, Kamila, Mirela, Natália e TeTê, por
toda a amizade, risadas, ajudas e companheirismo.*

*E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela
bolsa de estudos concedida.*

Obrigada a todos vocês!

Lista de Abreviaturas

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CMC: concentração micelar crítica

CV: coeficiente de variação

DEA⁺: dietilamônio

DF K⁺: diclofenaco de potássio

DF Na⁺: diclofenaco de sódio

DP: desvio padrão

EHL: equilíbrio hidrofílico lipofílico

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

MLP: microscopia de luz polarizada

OE: óxidos de etileno

OP: óxido de propileno

PEC: parâmetro de empacotamento crítico

SAXS: espalhamento de raios-X a baixo ângulo

Lista de Figuras

- Figura 1 - Estruturas líquido-cristalinas, micelares e microemulsionadas formadas dependendo do parâmetro de empacotamento (ditado pela geometria da molécula), teor de água e temperatura, em que $Vh/a_o.L$ é o fator de empacotamento 26
- Figura 2 – Representação das principais fases cristalinas liotrópicas 28
- Figura 3 – Fórmula estrutural do óxido de etileno (a) e do óxido de propileno (b) 31
- Figura 4 – Fórmula geral de um álcool graxo propoxilado e etoxilado (PPG-5-Ceteth 20) 32
- Figura 5 – Fórmula geral de álcool graxo etoxilado (Oleth 10) 32
- Figura 6 – Éster de Ácido graxo (Miristato de Isopropila $n = 11$ e Palmitato de Isopropila $n = 13$) 33
- Figura 7 - Ácido graxo monoinsaturado (Ácido Oleico) 33
- Figura 8 - Molécula do Diclofenaco 39
- Figura 9 – Diagrama de fases $D1$ (PPG - 5 - Ceteth – 20/ Ácido Oleico/ Água) (STVB) Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SEVI) Sistema Emulsionado de Viscosidade Intermediária e (SF) Separação de Fases 60
- Figura 10 – Diagrama de fases $D2$ (PPG - 5 - Ceteth – 20/Miristato de Isopropila/Água) (STVB) Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SOAV) Sistema Opaco de Alta Viscosidade e (SF) Separação de Fases 61
- Figura 11 – Diagrama de fases $D3$ (Oleth 10/Ácido Oleico/Água) (STVB) Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SEVI) Sistema Emulsionado de Viscosidade Intermediária e (SF) Separação de Fases 62

Figura 12 - Diagrama de fases *D4* (Oleth 10/Miristato de Isopropila/Água) (STVB) Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SOAV) Sistema Opaco de Alta Viscosidade e (SF) Separação de Fases 64

Figura 13 - Fotomicografias das formulações selecionadas 66

Figura 14 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 50 % de (PPG - 5 Ceteth - 20); 10, 20, 40% de Ácido Oleico e Fase aquosa e 10%, respectivamente 70

Figura 15- Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (PPG - 5 - Ceteth - 20); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente 70

Figura 16 – Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (PPG-5-Ceteth-20); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente 70

Figura 17: Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 % de (PPG-5-Ceteth-20); 10, 20, 40% de Miristato de Isopropila e 10% de Fase aquosa, respectivamente 70

Figura 18: Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (PPG-5-Ceteth-20) e 10; 20; 30% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente 71

Figura 19 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 50 % de (Oleth 10); 10, 20, 40% de Ácido Oleico e Fase aquosa e 10%, respectivamente 73

Figura 20 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (Oleth 10); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente 73

Figura 21 – Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (Oleth 10); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente 73

Figura 22 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 % de (Oleth 10); 10, 20, 40% de Miristato de Isopropila e 10% de Fase aquosa respectivamente 73

Figura 23 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (Oleth 10); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente 74

Figura 24 – Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (Oleth 10); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente 74

Figura 25 – (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80, 70, 50 % de (PPG - 5 Ceteth - 20); 10, 20, 40% de Ácido Oleico e Fase aquosa e 10%, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 76

Figura 26: (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (PPG - 5 - Ceteth - 20); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 76

Figura 27 – (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (PPG - 5 - Ceteth - 20); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 77

Figura 28 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 % de (PPG - 5 - Ceteth - 20); 10, 20, 40% de Miristato de Isopropila e 10% de Fase aquosa, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 77

Figura 29 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de PPG - 5 -Ceteth - 20 e 10; 20; 30% de Fase aquos e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 78

Figura 30 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80, 70, 50 % de (Oleth 10); 10, 20, 40% de Ácido Oleico e Fase aquosa e 10%, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 80

Figura 31 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (Oleth 10); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 80

Figura 32 – (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (Oleth 10); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 81

Figura 33 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 % de (Oleth 10); 10, 20, 40% de Miristato de Isopropila e 10% de Fase aquosa, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 81

Figura 34 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (Oleth 10); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 82

Figura 35 – (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (Oleth 10); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 82

Figura 36 - Fotomicografias das formulações incorporadas com os fármacos 83

Figura 37 - Avaliação estrutural das formulações $F5$; $F5 k^+$ e $F5 Na^+$ 85

Figura 38 - Avaliação estrutural das formulações $F12$; $F12 k^+$ e $F12 Na^+$ 85

Figura 39 - Avaliação estrutural das formulações $F26$; $F26 k^+$ e $F26 Na^+$ 86

Figura 40 - Avaliação estrutural das formulações $F28$; $F28 k^+$ e $F28 Na^+$ 86

Figura 41 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das formulações *F5*; *F5* k^+ e *F5* Na^+ ; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 87

Figura 42 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das formulações *F12*; *F12* k^+ e *F12* Na^+ ; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 87

Figura 43 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das formulações *F26*; *F26* k^+ e *F26* Na^+ ; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 88

Figura 44 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das formulações *F28*; *F28* k^+ e *F28* Na^+ ; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento 88

Figura 45- Cromatograma de referência do DF Na^+ (100 ug/mL) no tempo de retenção de 9,6 minutos 90

Figura 46 - Curva analítica do DF Na^+ em fase móvel, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r^2) 90

Figura 47 - Cromatograma referente à formulação PPG-5-Ceteth-20 e Ácido Oleico 92

Figura 48 - Cromatograma referente à formulação PPG-5-Ceteth-20 e Miristato de Isopropila 92

Figura 49 - Cromatograma referente a formulação Oleth 10 e Ácido Oleico 93

Figura 50 - Cromatograma referente à formulação Oleth 10 e Miristato de Isopropila 93

Figura 51 - Curva analítica do DF Na^+ em tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 e 10% de metanol, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r^2) 96

Figura 52 - Curva analítica do DF Na^+ em metanol, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r^2) 96

Figura 53 - Cromatograma de referência do DF K^+ (100 ug/mL) no tempo de retenção de 9,6 minutos 97

Figura 54 - Curva analítica do DF K^+ em tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 e 10% de metanol, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r^2)	98
Figura 55 - Curva analítica do DF K^+ em metanol, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r^2)	98
Figura 56 – Quantidade solubilizada do DF Na^+ e DF K^+ em $mg.g^{-1}$ ou % nos componentes das formulações	99
Figura 57 - Perfil de liberação das formulações $F5 Na^+$, $F12 Na^+$, $F26 Na^+$ e $F28 Na^+$ e DF Na^+ solubilizado em propilenoglicol	102
Figura 58 - Perfil de liberação das formulações $F5 K^+$, $F12 K^+$, $F26 K^+$ e $F28 K^+$ e DF K^+ solubilizado em propilenoglicol	103
Figura 59 - Perfil de liberação das formulações $F5 Na^+$ e $F5 K^+$	111
Figura 60 - Perfil de liberação das formulações $F12 Na^+$ e $F12 K^+$	112
Figura 61 - Perfil de liberação das formulações $F26 Na^+$ e $F26 K^+$	112
Figura 62 - Perfil de liberação das formulações $F28 Na^+$ e $F28 K^+$	113

Lista de Tabelas

Tabela 1: Solubilidade de sais de diclofenaco em água	40
Tabela 2: Diagramas construídos	46
Tabela 3: Formulações contendo PPG-5-Ceteth-20 ; Oleth 10; Ácido Oleico e porcentagem fixa de Água	47
Tabela 4: Formulações contendo PPG-5-Ceteth-20; Oleth 10; Miristato de Isopropila e porcentagem fixa de Água	47
Tabela 5: Formulações contendo PPG-5-Ceteth-20; Oleth 10; Água e porcentagem fixa de Ácido Oleico	48
Tabela 6: Formulações contendo PPG-5-Ceteth-20; Oleth 10; Água e porcentagem fixa de Miristato de Isopropila	48
Tabela 7: Composição das formulações selecionadas	50
Tabela 8: Dados da linearidade do método analítico para quantificação do DF Na ⁺	91
Tabela 9: Avaliação da precisão (intra-dia e inter-dia) do método analítico para quantificação do DF Na ⁺	94
Tabela 10: Avaliação da exatidão do método analítico para quantificação do DF Na ⁺	95
Tabela 11: Resultados da solubilidade do DF Na ⁺ e DF K ⁺ na solução receptora	100
Tabela 12: Coeficiente de correlação (r^2) calculado pelo ajuste de cada modelo matemático: zero ordem, primeira ordem e Higuchi	104
Tabela 13: Liberação da formulação $F5 Na^+$	105
Tabela 14: Liberação da formulação $F12 Na^+$	106
Tabela 15: Liberação da formulação $F26 Na^+$	106

Tabela 16: Liberação da formulação $F28 Na^+$	107
Tabela 17: Liberação formulação $F5 K^+$	107
Tabela 18: Liberação da formulação $F12 K^+$	108
Tabela 19: Liberação da formulação $F26 K^+$	108
Tabela 20: Liberação da formulação $F28 K^+$	109

Resumo

Nas últimas décadas, têm se observado um interesse crescente na inovação de sistemas nanoestruturados utilizados para a liberação prolongada de diversas substâncias. No caso de fármacos, as formulações de liberação prolongada apresentam diversas vantagens em relação às formas convencionais de administração, tais como alta eficiência de liberação, controle preciso da dosagem por períodos prolongados e diminuição da toxicidade. Dependendo da composição, uma mistura entre tensoativo, óleo e água podem formar diversos sistemas nanoestruturados com os mais variados níveis de organização estrutural, característica que interfere diretamente no processo de liberação. Neste trabalho esses sistemas foram obtidos pela construção de diagramas de fases, utilizando tensoativos com diferentes graus de hidrofília, o PPG-5-Ceteth-20 e o Oleth 10, como fases oleosas o Ácido Oleico e o Miristato de Isopropila. Através dos diagramas foi possível observar diferenças significativas relacionadas com as características dos sistemas, devido à capacidade que o Oleth 10 como tensoativo e o Ácido Oleico como fase oleosa têm em diminuir a tensão interfacial, facilitando a formação de uma extensa região de sistemas transparentes. A caracterização da estrutura interna dos mesmos foi feita por microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) e medidas reológicas. Através da microscopia foi possível identificar características isotrópicas e anisotrópicas, sendo posteriormente confirmadas pelo SAXS, o qual permitiu não só a identificação das nanoestruturas, mas também uma avaliação mais aprofundada sobre o nível de organização estrutural, principalmente dos arranjos líquido-cristalinos, característica que foi reforçada através das medidas reológicas, as quais proporcionaram uma melhor definição sobre o comportamento desses sistemas. A caracterização das formulações carregadas com os fármacos (diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio) revelaram importantes informações utilizadas na compreensão dos perfis de liberação. A maior solubilidade dos fármacos encontrada nos tensoativos e na água em relação às fases oleosas indicou a localização dos mesmos na interface tensoativo - água da bicamada lamelar; e na interface tensoativo - água entre os cilindros do arranjo hexagonal, propriedade que torna o processo de difusão dos fármacos mais lenta, revelando uma liberação de característica prolongada descrita pelo modelo matemático de zero ordem. Os resultados de liberação indica que o processo de difusão e liberação “*in vitro*” foi controlado, principalmente pelo tipo de tensoativo, ou seja, o sistema formado pelo PPG-5-Ceteth-20 favoreceu uma difusão mais rápida do diclofenaco de potássio, característica relacionada com a solubilidade do fármaco no tensoativo, proporcionando a sua molécula uma maior mobilidade entre a interface. As características cosmotrópicas e caotrópicas relacionadas ao sal de sódio e ao sal de potássio revelaram a influência de outras propriedades, além da solubilidade, relacionadas com as moléculas dos fármacos nos processos de difusão através dos arranjos líquido-cristalinos formados por uma maior concentração de água.

Abstract

In the last decades it has been observed a growing interest in nanostructure systems innovations, which are response for control release of several substances. In the case of drugs, the formulations which promote the controlled release present many advantages against the conventional forms of administration, such as high release efficiency, precise dosage control for long periods and toxicity decreasing. Depending on the composition, a surfactants mixture, oil and water can form different nanostructured systems with the most different organization structure degrees, which can directly interfere in the global process of drugs release. In this paper the nanostructured systems were obtained through the building of phases diagrams, using surfactants with different hydrophilic degrees, the PPG-5-Ceteth-20 and the Oleth 10, as oil phases the Oleic Acid and Isopropil Miristate. It was possible to observe significant difference between the diagrams which are related with the characteristics of the obtained systems, due to a higher capacity that Oleth 10 as a surfactant and the Oleic Acid as oil phase have in decreasing the interfacial tension, and consequently promoting a greater region of transparent systems. The internal structure of these systems was characterized by polarized light microscopy, small angle X-ray scattering (SAXS) and rheological measurements. Through the microscopy it was possible to identify the isotropic and anisotropic characteristics, being later confirmed by SAXS. This characterization through SAXS allowed not only the nanostructures identification, but also a more deeply evaluation on the structure degree, mainly on the arrangement of liquid-crystalline. The rheological test also provided a better understanding about the degree of internal structure of nanostructured systems, mainly those which differ by the proportion of surfactant/water phase. The systems incorporated with the drugs (sodium diclofenac and potassium diclofenac) were also characterized and showed important characteristics that were used in the release profile understanding. The highest solubility of drugs found in the surfactants and in the water in relation to oil phase showed the localization of the drugs in surfactant-water interface of lamellar bilayers; or surfactant-water interface between the cylinders of hexagonal arrangements, providing to the drugs in both arrangements a slower diffusion, showing a controlled release described by the mathematical model of zero order. The results showed that the diffusion process and release “*in vitro*” was controlled mainly by the kind of surfactant, i. e., systems formed by PPG-5-Ceteth-20 favoring a faster diffusion of potassium diclofenac, characteristic related to the drug solubility on the surfactant, providing to its molecules a bigger mobility between the interfaces. Other results related to the kosmotropic and kaotropic characteristics of the salt sodium and potassium showed the influence of other properties, beyond the solubility, related to the drugs molecules in the process of diffusion through arrangement liquid-crystalline obtained by higher water concentration.

S        

1. Introdu����	22
2. Revis���� Bibliogr������	25
2.1 Cristais l��������	25
2.2 Diagramas de Fases	29
2.3 Componentes utilizados na forma���� de sistemas de libera���� prolongada	29
2.3.1 Tensoativos	29
2.3.2 Fase Oleosa	32
2.4 Caracteriza���� f������������	34
2.4.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)	34
2.4.2 Espalhamento de raios-X a baixo ������ (SAXS)	34
2.4.3 Medidas reol��������	36
2.5 DF Na ⁺ e DF K ⁺ como modelo de anti-inflamat�������� n���� esteroidais utilizados em processos inflamat��������	39
3. Objetivo	43
4. Material e M��������	45
4.1 Materiais	45
4.2 M��������	46
4.2.1 Constru���� dos diagramas de fases	46
4.2.2 Caracteriza���� f������������ das formula������	47
4.2.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)	49
4.2.2.2 Espalhamento de Raios-X a baixo ������ (SAXS)	49
4.2.2.3 Medidas Reol����������	49

4.2.3 Escolha das formulações e dos fármacos a serem estudados	51
4.2.4 Efeitos da incorporação do DF Na ⁺ e DF K ⁺ nas formulações	51
4.2.5 Validação de metodologia analítica para a quantificação do DF Na ⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	51
4.2.6 Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação do DF K ⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	55
4.2.7 Avaliação da solubilidade do DF Na ⁺ e DF K ⁺ nos componentes das formulações	56
4.2.8 Estudo da “ <i>sink contidionts</i> ” para o DF Na ⁺ e DF K ⁺ para os ensaios de liberação “ <i>in vitro</i> ”	56
4.2.9 Ensaios de liberação “ <i>in vitro</i> ”	56
5. Resultados e Discussões	59
5.1 Construção dos diagramas de fases	59
5.2 Caracterização físico-química das formulações	64
5.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)	64
5.2.2 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)	68
5.2.3 Medidas Reológicas	74
5.3 Efeitos da incorporação do DF Na ⁺ e DF K ⁺ nas formulações	83
5.3.1 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)	83
5.3.2 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)	85
5.3.3 Medidas Reológicas	86
5.4 Validação de metodologia analítica para a determinação do DF Na ⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	89
5.5 Desenvolvimento metodologia analítica para a quantificação do DF K ⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	97

5.6 Avaliação da solubilidade do DF Na ⁺ e DF K ⁺ nos componentes das formulações	99
5.7 Estudo da “ <i>sink condition</i> ” para o DF Na ⁺ e DF K ⁺ nos ensaios de liberação “ <i>in vitro</i> ”	100
5.8 Ensaios de liberação “ <i>in vitro</i> ”	101
6. Conclusões	115
7. Referências Bibliográficas	117

Introdução

1 Introdução

Atualmente, muitos sistemas de liberação prolongada de fármacos vêm sendo estudados, como exemplo: os lipossomas, as emulsões, as microemulsões e os cristais líquidos. Os sistemas nanoestruturados como as microemulsões e os cristais líquidos têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica, pois conseguem modificar a velocidade de liberação, oferecer benefícios como o aumento da solubilidade e absorção, assim como um maior controle da biodisponibilidade de fármacos. Como sistemas reservatórios os mesmos podem alterar parâmetros farmacocinéticos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica (FORMARIZ, et al., 2005).

Nos últimos anos, foram realizados estudos de grande importância (CONHEN-AVRAHAMI et al., 2010; YARIV et al., 2010; AMSALEM et al., 2010; LIBSTER et al., 2011; CONHEN-AVRAHAMI et al., 2012; GARTI et al., 2012), fundamentados na inovação de sistemas líquidos cristalinos para a veiculação do diclofenaco e seus derivados, com o objetivo de minimizar a toxicidade e aumentar sua eficácia clínica. Estes estudos abordam principalmente as características estruturais desses sistemas com os coeficientes de difusão, assim como os perfis de liberação e permeação “*in vitro*”.

O diclofenaco é um dos princípios anti-inflamatório da classe não esteroidal (AINE), sendo usualmente utilizado no tratamento de artrites e lesões de tecidos moles e encontra-se disponível em uma série de formas farmacêuticas, que podem ser administrada por via oral, retal ou por via intramuscular (FEI et al., 2006). Por outro lado, o uso oral do diclofenaco pode causar alguns efeitos adversos, principalmente relacionados com os danos gastro-intestinais. Dessa forma, a via transdérmica vêm sendo cada vez mais utilizada como uma opção ao paciente, principalmente em relação aos efeitos indesejáveis dos AINE. A via transdérmica têm sido considerada promissora para o fornecimento de medicamentos com o objetivo de minimizar efeitos colaterais e a metabolização pré-sistêmica (PAGLIARA et al., 1999). Estudos clínicos têm demonstrado que a administração tópica do diclofenaco resultou em níveis mais elevados na derme e no músculo em comparação à administração oral (HEYNEMAN et al., 2000; BRUNNER et al., 2005). Os principais benefícios da administração tópica estão relacionados com a capacidade de atingir uma liberação sustentada e minimizar o impacto com o trato gastro-intestinal. No entanto, o caminho transdérmico é ainda um grande desafio, devido à camada de pele exterior, o estrato córneo, que serve como

uma barreira, impedindo a penetração de certas moléculas (HATZIANTONIOU et al., 2000; CEVC et al., 2010; CONHEN-AVRAHAMI et al., 2012).

Em relação à liberação prolongada, os cristais líquidos vêm sendo considerados excelentes sistemas de liberação, devido sua grande área interfacial interna, com características físico-químicas diferentes da área externa, formando microambientes distintos, com diferentes constantes dielétricas, permitindo compartimentalizar fármacos polares e apolares (BOYD et al., 2006).

Drummond e Fong (2000), também relataram sobre a capacidade que as estruturas líquidas cristalinas têm em atuar como sistemas de liberação prolongada. Segundo os autores, o perfil de liberação a partir desses sistemas é influenciado por fatores relacionados com os fármacos, como a difusão, a solubilidade e o coeficiente de partição, e também aos fatores físico-químicos relacionados com os arranjos, tais como a porosidade, a geometria e a tortuosidade dos poros e a proporção e a natureza dos componentes da mistura.

No entanto, existem poucos estudos que correlacionam à liberação prolongada de fármacos nos diferentes arranjos líquido-cristalinos (lamelar, hexagonal e cúbico) com as propriedades físico-químicas dos mesmos. Um dos poucos trabalhos que avalia a influência de tensoativos com diferentes graus de hidrofilia na difusão e permeação de substâncias em sistemas líquido-cristalinos foi realizado por Brinon et al., 1999, que avaliou o efeito dos arranjos lamelares, hexagonais e cúbicos na permeação de duas substâncias fotoprotetoras muito utilizadas na formulação de protetores solares, a Benzofenona-4 e o Metoxicinamato de 2-etil-hexila, que apresentam características de solubilidade distintas, a primeira sendo hidrossolúvel e a segunda lipossolúvel. Os resultados revelaram uma interação entre as substâncias e o sistema líquido-cristalino bastante complexa e mostraram que tanto o coeficiente de difusão quanto o perfil de permeação cutânea destas substâncias é bastante controlado tanto pela composição quanto pelo tipo de arranjo líquido-cristalino formado. Para melhor compreender a influência da estrutura líquido-cristalina no coeficiente de difusão de substâncias com solubilidade diferentes, muitos estudos ainda necessitam serem realizados.

Revisão

Bibliográfica

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Cristais líquidos

A história dos cristais líquidos vem de cem anos atrás, quando o Professor Friedrich Reinitzer observou algo incomum sobre uma substância chamada benzoato de colesterila durante os processos de fusão (CIOCA e GALVO, 1990). Entretanto, os cristais líquidos são conhecidos desde 1889, quando Lehmann descreveu um estado intermediário na transformação térmica a partir do estado sólido para o líquido. E foi em 1922, que Friedel usou o termo “estado mesomórfico” (*mesos* – intermediário e *morphé* – forma) para definir este quarto estado da matéria; com isso, os cristais líquidos passaram a ser denominados como fases mesomórficas ou mesomórficas cristalinas (TYLE, 1989).

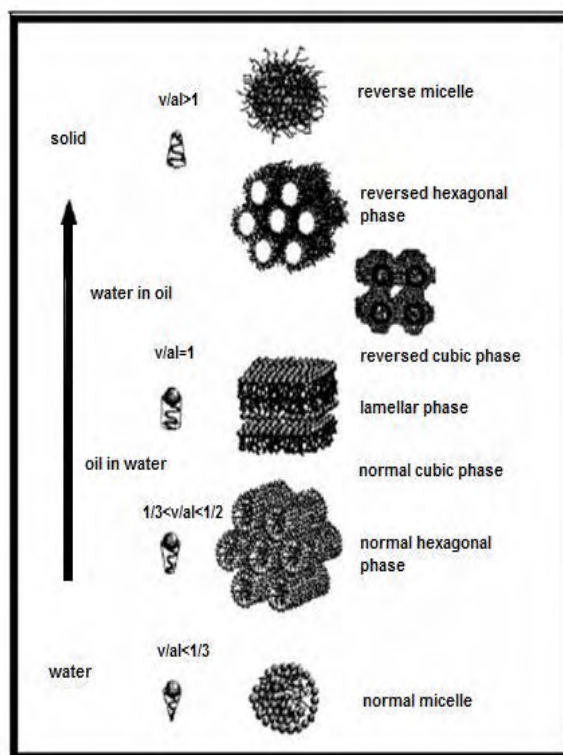
Esta fase intermediária (mesomórfia) apresenta características de sólidos e líquidos, por possuírem ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como a dos sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como a dos líquidos, ou seja, está mesofase possui propriedades mecânicas típicas do estado líquido e certa ordem molecular, constituindo assim uma fase fluida e ordenada (TYLE, 1989; CIOCA e GALVO, 1990; BEVAQUA, 1991).

Os cristais líquidos são considerados estruturas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas (LOPEZ et al., 2000). O estado líquido cristalino (mesofase) pode ser alcançado através do aumento da temperatura (termotrópicos) ou pela adição de um solvente (liotrópicos) (BURROWS, 1994). A classe termotrópica dos cristais líquidos é formada pela influência da temperatura do sistema, a qual a substância é submetida. Para a molécula se organizar é necessária uma quantidade de energia disponível proveniente da temperatura, sendo, portanto pouco estáveis. Os termotrópicos são classificados em nemáticos e esméticos. Os nemáticos possuem moléculas que se organizam de forma paralela e os esméticos, no qual as moléculas encontram-se de forma estratificada mantendo-se em camadas (TYLE, 1989). Os cristais líquidos liotrópicos são geralmente formados por substâncias anfifílicas (tensoativos) tratadas por um solvente, por exemplo, a água. A formação desse tipo de cristal líquido depende da natureza hidrofílica e lipofílica do tensoativo e de sua concentração. Essa interação entre o agente tensoativo e as moléculas do solvente (água) é do tipo fraca a qual determina a formação dessas estruturas (TYLE, 1989; HYDE, 2001).

De acordo com Tiddy (1980), os cristais líquidos liotrópicos são considerados como um conjunto ordenado de micelas de grandes dimensões, ocorrendo em altas concentrações de tensoativos e sempre acima da concentração micelar crítica.

A formação destas estruturas leva em consideração a composição do sistema, presença de sais, de óleos e de co-tensoativos, assim como a temperatura e estrutura do tensoativo. Para a formação de estruturas lamelares, geralmente possuem forma cilíndrica, Já para a formação da fase hexagonal e micelar, ele ocupa a área de um cone. O parâmetro de empacotamento crítico (PEC) é utilizado para entender qual tipo de estrutura do tensoativo é preferencial para formar determinado sistema, sendo definido como $PEC = v / a.l$, em que o v é o volume da cadeia hidrofóbica, a é área da cabeça polar e l o comprimento da cadeia hidrofóbica (Figura 1) (MALMSTEN, 2002).

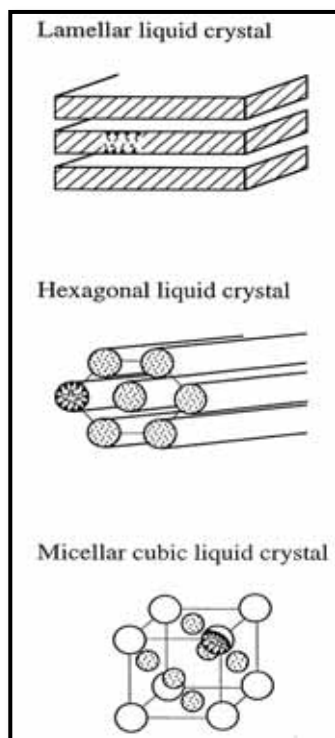
Figura 1 - Estruturas líquido-cristalinas, micelares e microemulsionadas formadas dependendo do parâmetro de empacotamento (ditado pela geometria da molécula), teor de água e temperatura, em que $Vh/a_o.L$ é o fator de empacotamento (BORNÉ, 2001).



As mesofases liotrópicas mais importantes são: as fases lamelares, as hexagonais e as cúbicas, conforme mostra a Figura 2. A fase lamelar é formada por camadas duplas de tensoativos com os grupos hidrofílicos introduzidos nas camadas aquosas, suas cadeias hidrocarbônicas encontram-se no estado líquido e as bicamadas anfifílicas estão separadas por camadas de água. Uma característica dessa fase é a fluidez, apesar do alto conteúdo de tensoativos, fazendo com que suas lamelas deslizem facilmente sobre as outras. Já a fase hexagonal, apresenta um centro lipofílico rodeado por uma camada interfacial de grupos hidrofílicos hidratados. Nos sistemas de fase cúbica, as moléculas estão arranjadas de forma esférica em cubos. O arranjo esférico tem a porção hidrofílica da molécula sobre a superfície e a porção lipofílica esta dirigida para o centro da esfera, as regiões hidrofílicas interagem com a água, originando o arranjo cúbico, sendo uma estrutura opticamente isotrópica (TYLE, 1989; FORMARIZ, et al., 2005). De acordo com Brinon et al., 1999, existem duas principais fases cúbicas. A primeira é um cubo contínuo, o qual consiste em um domínio de água dividindo duas redes contínuas de tensoativos. A segunda é um cubo micelar e consiste em discretas camadas de tensoativos organizadas em uma estrutura cúbica separadas por uma fase polar continua.

Os cristais líquidos também podem ser formados por o monoelato de glicerila (lipídeo polar biodegradável), o qual é capaz de formar diferentes tipos fases líquidas cristalinas na presença de água (lamelar, hexagonal e cúbica). A formação dessas fases depende da temperatura e da quantidade de água, sendo a fase lamelar formada em temperaturas baixas ($< 50^{\circ}\text{C}$) e a quantidade de água é menor que 20%; a fase cúbica em temperaturas variadas ($< 90^{\circ}\text{C}$) e a quantidade de água está 20 e 40%; e a fase hexagonal em altas temperaturas ($>90^{\circ}\text{C}$) e quantidade de água é semelhante a da fase cúbica (TIDDY 1980, BURROWS, 1994; SINGH, 2000; SHAH, 2001).

Figura 2 – Representação das principais fases cristalinas liotrópicas. (BRINON et al., 1999).



A identificação da estrutura interna dos cristais líquidos, além de ser muito importante, é também complexa. Técnicas como espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS), espalhamento de luz (*light scattering*), microscopia eletrônica de transmissão e ressonância magnética nuclear estão sendo cada vez mais utilizadas. Entretanto, outros métodos mais comuns, como condutividade iônica, medidas reológicas, espectroscopia de fotocorrelação, microscopia de luz polarizada, entre outros, também são bastante utilizados para o estudo do comportamento físico-químico destes sistemas (CHORILLI et al., 2009).

2.2 Diagramas de Fases

Sistemas nanoestruturados podem ser obtidos pelo diagrama de fases (BOONME et al., 2006; CORRÊA et al., 2005). Estes diagramas representam o comportamento de sistemas específicos, formados através da combinação de diferentes concentrações de tensoativo, de fase oleosa e de fase aquosa. De certo modo, os diagramas descrevem as condições em que cada componente deve ser combinado para formar esses sistemas, sua forma geral é do triângulo equilátero, cada vértice desse triângulo corresponde a 100% de cada componente, sendo o vértice superior correspondente ao tensoativo, o vértice esquerdo a fase aquosa e o direito correspondente a fase oleosa.

Com a modificação progressiva da composição de uma mistura, as mudanças produzidas na solução podem ser traduzidas por importantes variações nas propriedades termodinâmicas dos compostos que a compõe. Por outro lado, as observações dessas propriedades e sua evolução com a composição da solução podem fornecer informações específicas sobre a estrutura do meio (OLIVEIRA et al., 2004). De acordo com as condições e proporções dos constituintes, podem-se delimitar regiões em que ocorre a formação de sistemas homogêneos de característica isotrópica (sistemas micelares e/ou microemulsionados), anisotrópica (cristais líquidos de fase lamelar e hexagonal) e sistemas emulsionados.

2.3 Componentes utilizados na formação de sistemas de liberação prolongada

2.3.1 Tensoativos

Os tensoativos são moléculas anfifílicas, capazes de diminuir as tensões interfaciais dos sistemas, sendo caracterizados por possuírem em sua estrutura duas regiões com polaridade distinta: Uma parte da molécula é polar (hidrofílica), solúvel em água ou em outros solventes polares; enquanto que a outra parte é apolar (hidrofóbica), solúvel em hidrocarbonetos ou em solventes apolares (ATWOOD, 1983). Os tensoativos também permitem incorporação de fármacos hidrofílicos em sua região polar e fármacos lipofílicos em sua região apolar (LAWRENCE et al., 2000).

As substâncias tensoativas em presença de água e óleo tendem a se localizar nas interfaces orientando-se de maneira que o grupo polar fique voltado para a fase aquosa e o

grupo apolar para a fase oleosa, formando um filme molecular ordenado nas interfaces, que reduz as tensões interfaciais e superficiais (PROSSER e FRANCES, 2001).

Os tensoativos são classificados de acordo com a carga do grupo polar, podendo ser: catiônicos, quando possuem carga positiva; aniônicos, quando a carga é negativa; neutros ou não iônicos, quando não possuem carga; e zwitteriônicos, quando a carga líquida é nula em virtude de possuírem dois grupos na cabeça polar, um positivo e outro negativo (LAWRENCE et al., 2000).

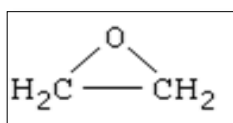
Segundo Gustaffon et al., 1997, o aumento da concentração do tensoativo requer que as moléculas se ordenem, de maneira a reduzir a interação entre as caudas apolares e o meio hidrofílico. Uma vez atingida à concentração micelar crítica, ocorre à formação de micelas, e as moléculas de tensoativo passam a interagir entre si. Três interações são dominantes e determinam o número de moléculas ideal para a formação e o formato do agregado: repulsão entre os grupamentos polares, interações entre as cadeias apolares e entre as interfaces polar-apolar. A redução ou o aumento da concentração do tensoativo e do solvente favorece a formação de diferentes sistemas, tais como as microemulsões, cristais líquidos e emulsões. Sendo que as interações intermicelares, associadas às interações entre as moléculas da micela e à geometria do tensoativo influenciam o tipo de sistema formado.

As moléculas de tensoativos não iônicos também são classificadas de acordo com seu equilíbrio entre as partes hidrofílicas e lipofílicas das moléculas, numerado com um determinado valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL). Substâncias de EHL muito baixo, ou menor que três, são lipofílicas, apresentando apenas propriedades antiespumantes. Substâncias de EHL entre três e nove já apresentam propriedades emulsificantes dando origem a emulsões do tipo A/O. Substâncias de EHL entre oito e dezesseis já começam a apresentar características hidrofílicas dando origem a emulsões do tipo O/A. Substâncias de EHL acima de dezesseis já apresentam características hidrofílicas atuando como solubilizantes (PRISTA et al., 1990). A formação dos cristais líquidos liotrópicos também depende da natureza hidrofílica e lipofílica do tensoativo, ou seja, dependem do valor de EHL, assim como da sua concentração (TYLE, 1989; HYDE 2001). Alguns tensoativos catiônicos e não iônicos em altas concentrações quando tratados com solvente (água) são capazes de formar cristais líquidos liotrópicos, incluindo suas fases mais importantes: lamelar, hexagonal e cúbica (TYLE, 1989). Sistemas de liberação de fármacos estabilizados com tensoativos não iônicos são, geralmente, menos afetados pela presença de aditivos (tampão,

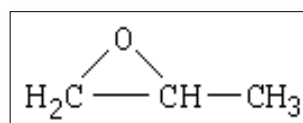
eletrólitos e conservantes) e mudanças no pH que os tensoativos iônicos, além de serem mais seguros e menos susceptíveis em causar irritação (KREILGAARD, 2002; GARTI et al., 2004). Os tensoativos não iônicos possuem em sua maioria concentração micelar crítica muito menor que dos tensoativos ionicamente carregados, e por isso são menos irritante e mais tolerados (MALMSTEN, 2002).

Os tensoativos não iônicos da classe dos polioxietilenos e polioxipropilenos como o álcool cetílico etoxilado e propoxilado (PPG-5-Ceteth-20) são obtidos pela reação de um álcool, de origem natural, com 20 moléculas de óxido de etileno (OE) mais 5 moléculas de óxido de propileno (OP). Com o aumento do grau de etoxilação, aumenta-se a hidrofilia da molécula (maior EHL) alterando, consequentemente sua solubilidade em água, no entanto, as moléculas de óxido de propileno tem o poder de tornar o tensoativo menos solúvel em água, devido à presença de uma metila em sua molécula (DI SERIO et al., 2005).

Figura 3 – Fórmula estrutural do óxido de etileno (a) e do óxido de propileno (b)

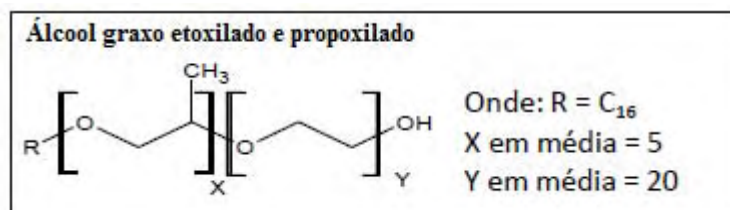


(a)

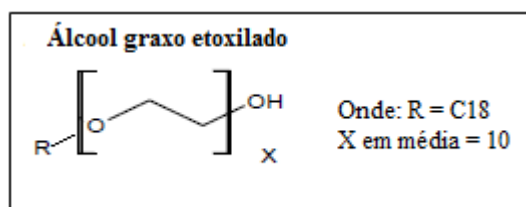


(b)

O álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Figura 4), de nome INCI PPG-5-Ceteth-20 e nome comercial Procetyl AWS[®], se apresenta como um líquido transparente ou ligeiramente turvo, incolor, odor leve característico, com as seguintes propriedades físico-químicas: EHL = 16; pH (sol. Aquosa 3%, 25 °C) = 5,5-7,5; densidade relativa = 1,050; completamente solúvel em água e etanol (CRODA, 2002).

Figura 4 – Fórmula geral de um álcool graxo propoxilado e etoxilado (PPG-5-Ceteth 20)

Os tensoativos da linha Brij são tensoativos não iônicos, geralmente chamados de polioxietileno (OE) éteres. De certa forma, o aumento do comprimento do grupo alquil diminui a solubilidade em água e o aumento no número de moléculas de OE aumenta a solubilidade em água. O polyoxyethylene (10) oleyl ether pertence à classe dos polyoxyethylene oleyl ether (fórmula geral representada pela Figura 5) de nome INCI Oleth10 e nome comercial Brij O 10[®], se apresenta como um líquido branco amarelo pálido, seu valor de EHL é de 12,4 e solúvel em água e etanol (SIGMA).

Figura 5 – Fórmula geral de álcool graxo etoxilado (Oleth 10)

2.3.2 Fase Oleosa

A fase graxa ou oleosa também é um importante componente, pois influencia na organização dos sistemas. Desta forma, alterando a fase oleosa nos diagramas é possível obter diferentes formas de agregação. Estas devem ser compatíveis com o fármaco utilizado, principalmente se for lipofílico (MORENO et al., 2003; PODLOGAR et al., 2005). Quando esses sistemas são administrados pela via cutânea, os compostos graxos podem atuar como promotores de permeação, podendo melhorar a penetração de fármacos através da pele. A

maioria dos materiais graxos utilizados nos sistemas para uso farmacológico possui alta massa molar e são semi-polares, ao contrário dos óleos hidrocarbônicos que são comumente utilizados em outras aplicações (AGATONOVIC – KUSTRIN et al., 2003; VALENTA e SCHULTZ, 2005). Os ésteres de Ácido graxo, como o Miristato de Isopropila são aceitáveis e utilizados na obtenção de sistemas nanoestruturados. O Miristato de Isopropila (Figura 6) é um material graxo utilizado em estudos de permeação, os quais revelam a capacidade que o material tem em aumentar as taxas de permeação de diversos ativos (ABRAHAM e ACREE, 2005). Outro óleo bastante utilizado é um Ácido graxo monoinsaturado, o Ácido Oleico, também conhecido por possuir propriedades que aumentam a permeação transdérmica (ESCRIBAN et al., 2003; MARTINDALE, 2007). O Ácido Oleico (Figura 7) possui em seu grupo terminal um ($-\text{COOH}$), o que permite a sua molécula atuar como um co-tensoativo e auxiliar o tensoativo na diminuição da tensão interfacial dos sistemas (WANG et al., 2006).

Figura 6 – Éster de Ácido graxo (Miristato de Isopropila $n = 11$ e Palmitato de Isopropila $n = 13$)

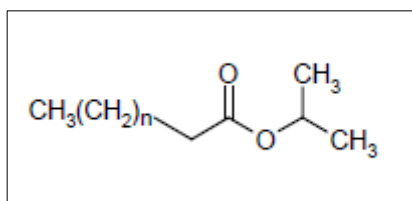
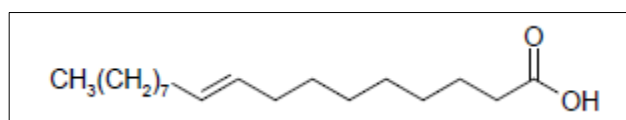


Figura 7 – Ácido graxo monoinsaturado (Ácido Oleico)



2.4 Caracterização físico-química

2.4.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)

Os cristais líquidos são espécies anisotrópicas (exceto os cristais líquidos de fase cúbica, sendo isotrópicos) e possuem certa habilidade em refringir a luz polarizada apresentando birrefringência, sendo por esse motivo possível identificar suas estruturas através do microscópio óptico de luz polarizada (KLEIN, 2002). A microscopia de luz polarizada fundamenta-se em um campo elétrico de raio luminoso polarizado que uma substância birrefringente é capaz de provocar. O comportamento de uma substância em relação ao efeito que causa na luz polarizada pode ser classificado como anisotrópico ou isotrópico (ABRAMOWITZ et al., 2005). Se a substância permitir a passagem da luz polarizada sem modificação da sua propagação, tem-se o fenômeno de isotropia, exemplo desses sistemas são os micelares, as microemulsões. O arranjo cúbico também possui isotropia e em microscopia de luz polarizada apresenta-se como campo escuro, somente sendo detectado através de outras técnicas de análise, como espalhamento de raios-X de baixo ângulo. O arranjo hexagonal apresenta uma forma chapada típica (estruturas parecidas com fibras), com os agregados de tensoativo organizados em cilindros. Já o arranjo lamelar apresenta-se com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando estruturas denominadas “cruzes-de-malta” (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

2.4.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de SAXS é muito utilizada na caracterização de diversos sistemas nanoestruturados, pois através dela é possível avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que não estejam organizados, além de permitir a caracterização de materiais que tem distância entre objetos espalhadores além do limite de trabalho da difração de raios-X (GLATTER, 1982).

Segundo Singh (2000), devido às fases líquidas cristalinas possuírem características de ordem encontrada nos sólidos e alguma desordem evidenciada pela fluidez dos líquidos, as técnicas que utilizam o espalhamento dos raios-X são as mais adequadas para sua identificação.

A linha de fonte de luz para realização de estudos de SAXS nos laboratórios de radiação Sinchrotron é monocromática e através dela é possível realizar estudos de materiais espalhadores e, também análises *in situ* de transformações estruturais com grande tempo de resolução. Este tipo de radiação permite-nos usar o efeito do espalhamento em muitas aplicações (CRAIEVICH, 2002).

Quando uma amostra bifásica na forma de uma plaqueta relativamente fina é irradiada com um feixe monocromático (luz visível, raios-X, nêutrons, elétrons), observa-se o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. No caso dos raios X a baixo ângulo, o espalhamento deve-se as heterogeneidades na densidade eletrônica do sistema. O ângulo formado através da intensidade espalhada está diretamente relacionado à densidade eletrônica através da transformada de Fourier. Considerando uma gotícula de tamanho e forma variada, a intensidade espalhada $I(q)$ é proporcional ao fator forma $P(q)$ desta gotícula: $I(q) \propto P(q)$ (NIELSEN, 1993).

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

Em sistemas diluídos, em que as partículas estão isoladas uma das outras e não interage entre si, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma $P(q)$ (GLATTER, 1982). A intensidade resultante é a soma das contribuições de cada partícula, de modo que, para n partículas distribuídas ao acaso têm-se:

$$I(q) \propto \sum_{n=1}^n P(q) \quad (\text{Equação 1})$$

Quando um sistema é mais concentrado, conseqüentemente suas partículas espalhadoras por serem numerosas começam a interagir entre si, permitindo com que o espalhamento medido reflita na sua geometria e no arranjo entre elas. Para N partículas idênticas, distribuídas ao acaso, a intensidade espalhada é descrita pela Equação 2 em que $S(q)$ é o fator de estrutura do conjunto (GLATTER, 1982):

$$I(q) = N.P(q).S(q) \quad (\text{Equação 2})$$

em que, $P(q)$ é o fator de forma da partícula espalhadora, $S(q)$ é o fator da estrutura do conjunto. Portanto, se as partículas estão correlacionadas, $S(q)$ caracteriza o arranjo e contém todas as informações sobre as interações entre as partículas.

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

$$d = \frac{2\pi}{q_{max}}$$

em que q_{max} é o valor de q no pico de refração. A relação da distância d calculada para cada pico deve seguir a relação $\sqrt{1} : \sqrt{3} : \sqrt{4}$ (NEGRINI e MEZZENGA, 2011) para fase hexagonal e 1:2:3:4:5 para fase lamelar (BINNEMANS, 2005). Além disso, sabe-se que quanto mais definido o pico, maior é o fator de estrutura que dá informações sobre as interações e a correlação espacial entre os objetos espalhadores.

Sendo assim o SAXS pode fornecer informações referentes ao tamanho, formato e estrutura interna de macromoléculas e das estruturas de longa extensão, como o arranjo dos tensoativos, encontradas nos sistemas líquido-cristalinos (DONG e BOYD, 2011), informações de extrema importância para a compreensão deste trabalho.

2.4.3 Medidas reológicas

A reologia consiste no estudo do escoamento ou da deformação de um material quando submetido a uma tensão (WOOD, 1986). Este método aplica-se na caracterização de diversos sistemas nanoestruturados, pois o comportamento reológico do fluido está relacionado com o tipo de arranjo e seu nível organizacional (SCOTT, 2000).

Os cristais líquidos são viscosos em razão de sua orientação (KLEIN, 2002). A reologia ajuda a entender as relações entre as propriedades viscoelásticas e estruturais destes

sistemas (SIDDIG et al., 2006). A fase lamelar apresenta-se geralmente como um líquido viscoso, Já a fase hexagonal possui viscosidade semelhante à de um gel e a fase cúbica possui viscosidade extremamente elevada (HYDE, 2001).

Németh et al., 1998, relataram um método reológico para a identificação de estruturas líquidos cristalinas liotrópicas. Segundo os autores, a estrutura lamelar demonstra uma maior semelhança com a membrana lipídica intercelular da pele, sendo recomendada para o desenvolvimento de sistemas de liberação via transdérmica. Makai et al., 2003, também avaliou a ligação que há entre a estrutura e as propriedades reológicas de sistemas líquidos cristalinos lamelares, pois eles acreditam que as medidas reológicas oferecem a possibilidade de identificar a fase lamelar, relacionando assim suas propriedades com a liberação de fármacos pela via transdérmica. No entanto, dependendo da concentração do solvente, da fase aquosa e da polaridade do solvatado, estas estruturas cristalinas podem sofrer variações e modificações estruturais que consequentemente provocam mudanças nas propriedades reológicas desses sistemas.

Deste modo, os sistemas coloidais apresentam complexos comportamentos reológicos, principalmente devido às interações partícula-partícula e partícula-solvente, pois nestes sistemas as moléculas podem unir-se por ligações químicas (forças de atração de Van der Waals) e associar-se através de um emaranhamento mecânico, dificultando a compreensão de suas propriedades reológicas (SHAW, 1975).

Existe uma correlação entre a tensão e a taxa em que ocorre o cisalhamento da amostra, esta relação define o comportamento de fluxo e é demonstrada graficamente por curvas de fluxo. As curvas de fluxo representam duas partes do experimento, a curva ascendente que indica o aumento da taxa de cisalhamento, e a curva descendente, quando a taxa de cisalhamento é reduzida continuamente (SCHRAMM, 2006). As curvas ascendentes representam o comportamento de fluxo dos sistemas, podendo ser classificado em fluidos Newtonianos, o qual se verifica uma proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento e os fluidos não newtonianos, caracterizados por não apresentarem uma relação linear entre a tensão e taxa de cisalhamento (WOOD, 2001).

Soluções, dispersões líquidas ou sólidas, suspensões coloidais, microemulsões (entre outros exemplos) se forem concentradas e/ou contiverem partículas assimétricas, observa-se através da curva de fluxo um comportamento não newtoniano. Este efeito ocorre

principalmente devido as partículas se orientarem de forma assimétrica em relação ao gradiente de velocidade (taxa de cisalhamento) (SHAW, 1975). No entanto, sistemas líquidos cristalinos por apresentarem estruturas organizadas, dificultam o alinhamento das partículas em direção a taxa de cisalhamento, possuindo geralmente um comportamento não-newtoniano. Dentro desse comportamento, os fluidos podem ser classificados em plásticos, pseudoplásticos e dilatantes, não apresentando o comportamento linear previsto pelo modelo de Newton. De acordo com o este modelo a viscosidade é uma propriedade física que sofre alterações apenas mediante variação de temperatura e pressão. Porém, para a maioria dos fluidos reais a viscosidade pode depender ou não do cisalhamento aplicado ou também do tempo de sua aplicação. Nestes casos, a viscosidade deixa de ser um coeficiente, tornando-se uma propriedade que varia de acordo com as condições com as quais o fluido se depara, passando a ser denominada de viscosidade aparente (NAVARRO, 1997).

Já os fluidos não newtonianos podem ser independentes do tempo, ou seja, as propriedades reológicas independem do tempo de aplicação da taxa de cisalhamento (SOCHI, 2010). Quando o aumento da taxa de cisalhamento provoca uma diminuição na viscosidade do fluido, este pode ser chamado de pseudoplástico. Esse aumento promove uma reorientação das moléculas na direção da força aplicada, tornado assim as ligações que ocorrem entre as moléculas menores. Quanto maior está força, maior é a ordenação e, conseqüentemente, menor será a viscosidade aparente. Fluidos que apresentam um aumento de viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento são chamados de dilatantes (SCHRAMM, 2006).

A curva descendente também pode fornecer informações sobre a estrutura dos sistemas, como por exemplo, a tixotropia, que é um fenômeno do fluido (MEWIS e WAGNER, 2008; LEE et al., 2009). A tixotropia é um termo usado para descrever um sistema isotérmico em que a viscosidade aparente diminui sob a taxa de cisalhamento, seguindo-se uma recuperação gradual quando a tensão é removida. Um material tixotrópico torna-se mais fluido com a duração da força aplicada, sendo reversível, ou seja, este tipo de material depois de certo tempo recupera sua estrutura e viscosidade (LEE et al. 2009).

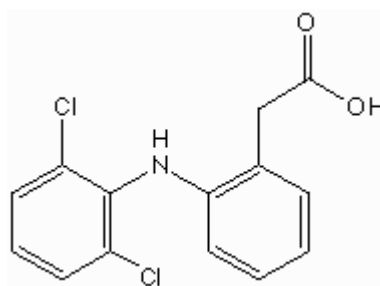
As curvas de fluxo de um sistema tixotrópico são representadas através de um laço de histerese, o aumento desse laço entre as curvas ascendentes e descendentes está relacionado com o grau de tixotropia da amostra. Entretanto, existem sistemas que apresentam uma maior resistência a fluir de forma que a histerese apresenta a curva correspondente à

diminuição da velocidade de cisalhamento deslocada para a esquerda da curva de aumento de velocidade. Este fenômeno é conhecido por anti-tixotropia, e tem como característica ser reversível com aumento na viscosidade aparente com o tempo sob taxa de deformação constante (SCHRAMM, 2006).

2.5 DF Na^+ e DF K^+ como modelo de anti-inflamatórios não esteroidais utilizados em processos inflamatórios

O diclofenaco é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE), da classe do Ácido fenilacético, sendo amplamente prescrito no tratamento de várias doenças inflamatórias, como exemplo: artrite reumatóide e osteoartrite (GIAGOUDAKIS e MARKANTONIS, 1998). Designado quimicamente por 2-[(2,6 diclofenil) amino] Ácido benzenoacético (Figura 8).

Figura 8 - Molécula do Diclofenaco



O diclofenaco de sódio possui fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NNaO}_2$ e peso de 318,13, Já o diclofenaco de potássio possui fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NKO}_2$ e peso 334,25. A descrição de ambos os fármacos é: pó cristalino branco ou levemente amarelado, levemente higroscópico, praticamente solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em álcool, pouco solúvel em acetona. Por ser um Ácido fraco possui pKa de 4,0 e é mais solúvel em pH na faixa de 7,0-8,0. Em meio Ácido é praticamente insolúvel (USP, 2007).

O diclofenaco está presente no mercado na forma de sal livre, sal sódico ou sal potássico. Esta última salificação é mais solúvel, promovendo uma taxa maior de absorção, consequentemente um efeito analgésico mais rápido em comparação com as outras formas administradas (REINER, et al., 2001). O medicamento de referência para diclofenaco de sódio é o Voltaren[®] e para o diclofenaco de potássio e o Cataflam[®].

Estudos apresentam a influência dos diferentes sais incorporados à molécula do diclofenaco, assim como o pH e a temperatura, com o perfil de solubilidade em água. A Tabela 1 apresenta essas variações.

Tabela 1 - Solubilidade dos sais de diclofenaco em água (adaptado de STAHL, 2003).

<i>Sal</i>	<i>25 °C</i>	<i>pH</i>	<i>37°C</i>	<i>pH</i>
<i>Diclofenaco (Ácido)</i>	0,0071	5,8	0,0120	6,9
<i>Cálcio</i>	0,58	6,8	0,62	6,8
<i>Sódio</i>	19,08	7,8	22,5	7,8
<i>Potássio</i>	47,05	7,8	120,5	8,2
<i>Etilenodiamina</i>	1,76	7,2	2,86	7,2
<i>Dietilamina</i>	13,95	7,6	18,3	7,6
<i>Meglumina</i>^a	14,5	80	15,9	7,6
<i>HEP</i>^b	44,7	8,3	584	7,8

A solubilidade está expressa em mg.ml⁻¹,

^a 1-deoxy-1-(methilamino)-D-glucitol.

^b 2-pyrrolidino-2-ethanol.

Assim como os outros AINEs o mecanismo de ação do diclofenaco é conhecido pela inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX) presente em processos inflamatórios, sendo também responsável pela síntese de prostaglandinas envolvidas nos processos fisiológicos (ROBERTS e MORROW, 2003). No entanto, o uso de diclofenaco é limitado pela alta incidência de efeitos indesejados, principalmente relacionados com o trato gastrintestinal, incluindo reações adversas como irritação, sangramento, ulcerações e eventualmente perfurações na parede gástrica (MULLER et al., 2004).

Segundo Tood et al., 1988, o diclofenaco e seus sais são um dos anti-inflamatórios mais utilizados. Embora, seja quase completamente absorvido logo após sua administração oral o mesmo sofre metabolização pré-sistêmica, diminuindo assim sua biodisponibilidade em até 50%, necessitando de doses múltiplas. A reação adversa mais comum é a agressão com a mucosa gástrica, um estudo recente utilizando exame endoscópico de uma série de pacientes de ortopedia, demonstrou que cerca de 83,3% dos pacientes que se trataram com o diclofenaco, manifestaram lesões da mucosa gástrica (YAJIMA et al., 2007).

Conforme citado anteriormente, estudos de grande importância (CONHEN-AVRAHAMI et al., 2010; YARIV et al., 2010; AMSALEM et al., 2010; LIBSTER et al., 2011; CONHEN-AVRAHAMI et al., 2012; GARTI et al., 2012), fundamentados na inovação de sistemas líquidos cristalinos para a veiculação do diclofenaco e seus derivados, tiveram o objetivo de minimizar a toxicidade e aumentar sua eficácia clínica.

Objetivo

3 Objetivo

Avaliar a influência da composição e do tipo de arranjo líquido-cristalino (lamelar e hexagonal) obtidos a partir de tensoativos com diferentes graus de hidrofília (PPG-5-Ceteh-20 e Oleth 10) e fases oleosas (Ácido Oleico e Miristato de Isopropila), com os perfis de liberação “*in vitro*” de fármacos com estruturas químicas parecidas (diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio), porém com características de solubilidade distintas.

Objetivos Específicos

- Construção dos diagramas de fases;
- Caracterização físico-química das formulações de interesse;
- Avaliação dos efeitos da incorporação do DF Na⁺ e DF K⁺ nas formulações;
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do DF Na⁺ e DF K⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinação do perfil de liberação dos fármacos “*in vitro*”.

Material e
Métodos

4 Material e Métodos

4.1 Materiais

- Ácido trifluoroacético (TFA), Sigma-Aldrich;
- Água purificada, Milli-Q;
- Diclofenaco de Potássio, AUDAZ;
- Diclofenaco de Sódio, AUDAZ;
- Fosfato de Potássio monobásico, Merck;
- Hidróxido de Sódio, Cinética;
- Miristato de Isopropila, Synth, Brasil;
- Metanol grau HPLC, J T Baker;
- Ácido Oleico, Synth, Brasil;
- Oleth 10 (Brij O 10), Sigma-Aldrich;
- PPG -5 -Ceteth -20 (Procetyl AWS), Croda.

Equipamentos

- Balança digital Ohaus;
- Banho de ultrassom, Branson, modelo 1210;
- Bomba a vácuo, Tecnal – TE – 058;
- Centrifuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R;
- Coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB, 4,6 X 250 mm, 5µm;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent com detector Uv-Vis;
- Filtros descartáveis para seringas, porosidade 0,22 µm, Corning® Incorporated;
- Homogeneizador de sangue AP 22 - Phoenix;
- Membrana de diálise de acetato de celulose 12 kDa cut-off;
- Microette HANSON 0700-1251;
- Micropipeta de 0,5 e 10µL – Eppendorf;
- Micropipeta de 10 e 100µL – Eppendorf;
- Micropipeta de 100 e 1000µL – Eppendorf;

- Microscópio de luz polarizada (Leica Leitz DM RXE) com capturador de imagens (Moticam 2000);
- Peagômetro Micronal;
- Reômetro Carrimed CSL 100;
- Sistema de purificação de água Millipore, Milli-Q Plus.

4.2 Métodos

4.2.1 Construção dos diagramas de fases

Foram construídos diagramas de fases através da forma do triângulo equilátero, traçando-se retas paralelas aos eixos correspondentes a cada componente, formando-se assim trinta e seis pontos. Cada ponto corresponde a uma combinação de diferentes concentrações de tensoativo, fase oleosa e fase aquosa. Para a construção dos diagramas foram utilizados tensoativos com diferentes graus de hidrofilia, da classe dos polioxietilenos e polioxipropilenos (PPG-5-Ceteth-20) e da classe dos polioxietilenos oleil éter (Oleth 10), como fases oleosas foram utilizados o Ácido Oleico e o Miristato de Isopropila.

Tabela 2: Diagramas construídos

<i>Diagrama</i>	<i>Tensoativo</i>	<i>Fase Oleosa</i>	<i>Fase Aquosa</i>
<i>D₁</i>	PPG - 5 - Ceteth - 20	Ácido Oleico	Água
<i>D₂</i>	PPG - 5 - Ceteth - 20	Miristato de Isopropila	Água
<i>D₃</i>	Oleth 10	Ácido Oleico	Água
<i>D₄</i>	Oleth 10	Miristato de Isopropila	Água

4.2.2 Caracterização físico-química das formulações

A fim de se entender o comportamento das moléculas de tensoativo, quando se varia a proporção de fase aquosa, assim como o tipo e a proporção de fase oleosa, foram analisadas formulações nos quatro diagramas obtidos (Tabela 3, 4, 5 e 6).

Tabela 3: Formulações contendo PPG-5-Ceteth-20; Oleth 10; Ácido Oleico e porcentagem fixa de Água.

	F1	F2	F3
% PPG - 5 - Ceteth - 20	80	70	50
% Ácido Oleico	10	20	40
% Água	10	10	10
	F8	F9	F10
% Oleth 10	80	70	50
% Ácido Oleico	10	20	40
% Água	10	10	10

Tabela 4: Formulações contendo PPG-5-Ceteth-20; Oleth 10; Miristato de Isopropila e porcentagem fixa de Água.

	F15	F16	F17
% PPG - 5 - Ceteth - 20	80	70	50
% Miristato de Isopropila	10	20	40
% Água	10	10	10
	F22	F23	F24
% Oleth 10	80	70	50
% Miristato de Isopropila	10	20	40
% Água	10	10	10

Tabela 5: Formulações contendo PPG-5-Ceteth-20; Oleth 10; Água e porcentagem fixa de Ácido Oleico.

	F4	F5	F6	F7
% PPG - 5 - Ceteth - 20	70	60	50	40
% Ácido Oleico	10	10	10	10
% Água	20	30	40	50
	F11	F12	F13	F14
% Oleth 10	70	60	50	40
% Ácido Oleico	10	10	10	10
% Água	20	30	40	50

Tabela 6: Formulações contendo PPG-5-Ceteth-20; Oleth 10; Água e porcentagem fixa de Miristato de Isopropila.

	F18	F19	F20	F21
% PPG - 5 – Ceteth - 20	70	60	50	40
% Miristato de Isopropila	10	10	10	10
% Fase aquosa	20	30	40	50
	F25	F26	F27	F28
% Oleth 10	70	60	50	40
% Miristato de Isopropila	10	10	10	10
% Fase aquosa	20	30	40	50

4.2.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)

Uma pequena alíquota das formulações foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio (Leica Leitz DM RXE) com capturador de imagens (Moticam 2000) sob luz polarizada.

A microscopia de luz polarizada é uma técnica rápida e de fácil acesso para a identificação principalmente de arranjos líquidos cristalinos, porém a técnica mais adequada para sua caracterização é o Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).

4.2.2.2 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A caracterização das nanoestruturas presentes nas formulações foi confirmada através de dados coletados na estação de medidas do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas, na estação D11A. A linha SAXS é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1,608 Å, duas câmaras de ionização, um detector vertical localizado a cerca de 800 mm da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento $I(q)$, em função do módulo de espalhamento, q .

4.2.2.3 Medidas Reológicas

A evolução das características reológicas das formulações, como índice de fluxo e de consistência, tensão de escoamento e viscosidade, foram avaliadas através das curvas de fluxo. O reômetro utilizado foi Carrimed CSL 100, os ensaios foram realizados empregando um dispositivo placa - placa com um diâmetro de 40 mm e um espaçamento de 200 µm entre as placas. As propriedades de escoamento das formulações foram realizadas assegurando o mínimo de cisalhamento e permitindo um tempo de repouso de 2 minutos antes de cada leitura e determinadas através da taxa de cisalhamento no intervalo de 0 -100 s⁻¹ para a curva ascendente e de 100 – 0 s⁻¹ para a curva decrescente, ambas por um período de 120 segundos. Os testes foram realizados à temperatura de 32 °C ± 0,5 °C, a mesma utilizada nos ensaios de liberação “*in vitro*”.

4.2.3 Escolha das formulações e dos fármacos a serem estudados

A escolha das formulações para a incorporação dos fármacos foi fundamentada no propósito de se entender a relação que existe entre a composição e o tipo de arranjo líquido cristalino com os perfis de liberação “*in vitro*” de fármacos com diferentes solubilidades. Dessa forma, a escolha dos fármacos foi baseada na semelhança entre as características físico-químicas e peso molecular, evitando assim possíveis efeitos relacionados com o tamanho da molécula no processo de difusão para fora das estruturas líquido-cristalinas. Com esse objetivo foram selecionados os anti-inflamatórios: DF Na⁺ e DF K⁺, fármacos semelhantes, porém com diferente grau de solubilidade, sendo o D K⁺ 3 vezes mais solúvel em água do que o DF Na⁺, característica que provavelmente modifica a interação fármaco – estrutura e consequentemente o perfil de liberação “*in vitro*”. Com a finalidade de melhor esclarecer as interações desses fármacos com a composição dos sistemas, optou-se primeiramente por arranjos de fase lamelar com porcentagem fixa de tensoativo, fase oleosa e aquosa (60%, 10 e 30%, respectivamente), sendo as seguintes formulações selecionadas *F5*, *F12* e *F26*. Ainda com o propósito de se definir de forma mais aprofundada a complexa relação entre os fármacos e as estruturas, designou-se para tal comparação diferentes arranjos líquidos cristalinos, sendo uma fase lamelar (*F26*) e outra hexagonal (*F28*), ver Tabela 7.

Tabela 7: Composição das formulações selecionadas.

	F5		F12
% PPG-5-Ceteth-20	60	%Oleth 10	60
% Ácido Oleico	10	% Ácido Oleico	10
% Água	30	% Água	30
	F26		F28
%Oleth 10	60	%Oleth 10	40
% Miristato de Isopropila	10	% Miristato de Isopropila	10
% Água	30	% Água	50

4.2.4 Efeitos da incorporação do DF Na⁺ e DF K⁺ nas formulações

Para avaliar o efeito estrutural das formulações citadas anteriormente com a adição dos fármacos foi incorporado uma concentração de 30 mg.g⁻¹. As formulações incorporadas com o DF Na⁺ foram nomeadas de *F5 Na⁺*, *F12 Na⁺*, *F26 Na⁺* e *F28 Na⁺* e com o DF K⁺ nomeadas de *F5 K⁺*, *F12 K⁺*, *F26 K⁺* e *F28 K⁺*. A caracterização físico-química foi à mesma utilizada nas formulações isenta dos fármacos, descrita nos itens (MLP; SAXS e Medidas Reológicas).

4.2.5 Validação de metodologia analítica para a quantificação do DF Na⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Condições cromatográficas

Com o objetivo de quantificar o DF Na⁺ nos ensaios de liberação “*in vitro*” e no teste de solubilidade nos componentes das formulações, validou-se uma metodologia analítica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A metodologia utilizada baseia-se no método descrito pela USP (2007), porém foram necessárias modificações relacionadas à coluna e a fase móvel. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent, com detector Uv-Vis, através de uma coluna C18 Agilent Zorbax Eclipse XDB, 4,6 X 250 mm, 5µm. A fase móvel utilizada foi 75 % metanol : 25 % solução aquosa de Ácido trifluoroacético à 0,1% p/v, taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹, injeção de 20 µl e detecção na região UV de 275 nm.

Validação do método

Para a validação da metodologia analítica foram analisados parâmetros como: linearidade, especificidade, precisão (precisão intra-dia e precisão inter-dia), exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, segundo a Resolução-RE Nº899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Preparo das soluções

A solução estoque foi preparada na concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, em que 10 mg do fármaco foi pesado em uma balança analítica e dissolvido em um balão de 10 ml contendo fase móvel.

Esta solução foi diluída para a obtenção das soluções de trabalho na faixa de concentração de $5 - 500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. O DF Na⁺ utilizado na validação foi o mesmo incorporado nas formulações e possui grau de pureza de 99,5%.

Curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas injetando-se quatorze soluções de trabalho em triplicata. As áreas dos picos obtidas foram integradas automaticamente usando o programa de software HPChem e plotadas versus a concentração do fármaco.

Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas em triplicata. A partir da média dos valores das áreas encontrados e das concentrações testadas para as três curvas, a equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Para a linearidade ser aceita, o coeficiente de correlação (r) deve ser no mínimo 0,99, e o CV da média tanto do intercepto com o eixo y como da inclinação da equação da regressão linear das três curvas não devem ultrapassar 5% (BRASIL, 2003).

Especificidade

A fim de garantir que os componentes das formulações não iriam interferir na quantificação do DF Na⁺ durante os ensaios, amostras sem o fármaco foram testadas. Para isso as formulações foram diluídas nas soluções receptoras, filtradas em membrana filtrante de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ e injetadas no CLAE, nas condições cromatográficas descritas anteriormente.

Precisão

A precisão foi considerada em dois níveis: precisão intra-dia sendo analisada em triplicata através das soluções de trabalho nas concentrações de 10, 200 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, correspondendo a concentrações baixas, médias e altas das duas curvas analíticas, uma corrida no período da manhã e outra no período da tarde. E a precisão inter-dia, a qual foi analisada em triplicata amostras nas mesmas concentrações, através da curva analítica corrida no dia seguinte. Foi calculado então o desvio padrão (DP) e CV para cada solução. O CV não deve ser maior que 5% (BRASIL, 2003).

Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, o qual foi analisado através da injeção em triplicata das soluções de trabalho nas concentrações de 10, 200 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente, conforme equação 3. Os limites de recuperação não devem ser inferiores a 80 % e nem superiores a 120% (BRASIL, 2003).

(Equação 3)

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}}$$

Limite de detecção

A estimativa do limite de detecção foi realizada com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, através da equação:

(Equação 4)

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}, \text{ em que:}$$

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações da substância ativa próximas ao suposto limite de quantificação.

IC é a inclinação da curva analítica.

Limite de quantificação

O limite de quantificação do método pode ser calculado através da equação:

(Equação 5)

$$LD = \frac{DPa \times 10}{IC}, \text{ em que:}$$

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

IC é a inclinação da curva analítica.

Curvas analíticas com solventes diferentes

Para garantir a “*sink conditions*” do experimento nos ensaios de liberação “*in vitro*”, foi construída uma curva analítica em solução receptora (tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 e 10% de metanol), utilizando em triplicata concentrações de 5 a 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Outra curva analítica em metanol na concentração de 5 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, também foi construída com a finalidade de ser utilizada na avaliação da solubilidade do DF Na⁺ nos componentes das formulações.

4.2.6 Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação do DF K⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Condições cromatográficas

A metodologia utilizada baseia-se no método descrito pela USP (2007), porém foram necessárias modificações relacionadas à coluna e a fase móvel. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent, com detector Uv-Vis, através de uma coluna C18 Agilent Zorbax Eclipse XDB, 4,6 X 250 mm, 5 μm . A fase móvel utilizada foi 75 % metanol : 25 % solução aquosa de Ácido trifluoroacético à 0,1% p/v, taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹, injeção de 20 μl e detecção na região UV de 275 nm.

Curvas analíticas

Foram construídas duas curvas analíticas do DF K⁺, uma em solução receptora (tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 e 10% de metanol) e outra em metanol, utilizadas respectivamente, nos ensaio de liberação “*in vitro*” e na avaliação da solubilidade do fármaco nos componentes das formulações. Para a construção da curva em solução receptora foi utilizada em triplicata concentrações de trabalho na faixa de 5 a 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A curva analítica em metanol foi construída na concentração de 5 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O DF K⁺ utilizado foi o mesmo incorporado nas formulações e possui grau de pureza de 99,5%.

4.2.7 Avaliação da solubilidade do DF Na⁺ e DF K⁺ nos componentes das formulações

A solubilidade dos DF Na⁺ e do DF K⁺ nos componentes das formulações, PPG-5-Ceteth-20, Oleth 10, Ácido Oleico, Miristato de Isopropila e água, foram determinadas adicionando-se em 10 mL de cada componente um excesso dos fármacos (1g). As soluções foram submetidas à agitação em um homogeneizador de sangue à temperatura de 25 °C por um período de 48 horas. Após a agitação as mesmas foram centrifugadas a 3500 G por 30 minutos. Coletou-se 1 ml do sobrenadante o qual foi diluído em metanol para a obtenção da concentração 100 µg/ mL para leitura em CLAE, as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.8 Estudo da “*sink condition*” para o DF Na⁺ e DF K⁺ para os ensaios de liberação “*in vitro*”

A condição *sink* foi determinada após a avaliação da solubilidade de 60 mg dos fármacos (quantidade 10 vezes superior a quantidade incorporada nas formulações) em 10 ml de solução receptora. As soluções foram agitadas em banho de ultrassom a 32,5 °C por 1 hora, depois foram diluídas para obtenção da concentração de 600 µg/ mL para leitura em CLAE, as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.9 Ensaios de liberação “*in vitro*”

As liberações do DF Na⁺ e do DF K⁺ a partir das formulações escolhidas foram desenvolvidas utilizando seis células de Franz com área de difusão de 1,77 cm² e volume aproximado de 7 mL, no equipamento Microette (Hanson Research) e membrana de acetato de celulose 0,45 µm (Sigma-Aldrich), o compartimento receptor foi preenchido com solução receptora composta por tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 e 10% de metanol, a qual foi continuamente agitada a 300 G com a utilização da agitação magnética presente nas células e mantida a 32,5°C por meio de um banho-maria circulante. Cerca de 200 mg das formulações foi previamente pesadas em papel manteiga e transferidas com auxílio de espátula para o copo dosador colocado sobre a membrana disposta na célula de difusão. Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, filtradas em membrana

0,45 µm e analisadas por CLAE. Um volume de 0,8 mL foi desprezado antes do início de cada coleta. 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. Os resultados foram colocados em gráficos para a definição do modelo de cinética adequado para cada formulação. A equação 6, demonstrada a seguir, foi utilizada para calcular a quantidade real liberada (Q real) em determinado tempo:

(Equação 6)

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

Em que:

$Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t ;

C_t = concentração obtida referente ao tempo t;

V_r = volume da solução receptora (7 mL);

C_c = concentração da amostragem anterior;

V_c = volume amostrado (coleta + limpeza)

Resultados e Discussões

5 Resultados e Discussões

5.1 Construção dos diagramas de fases

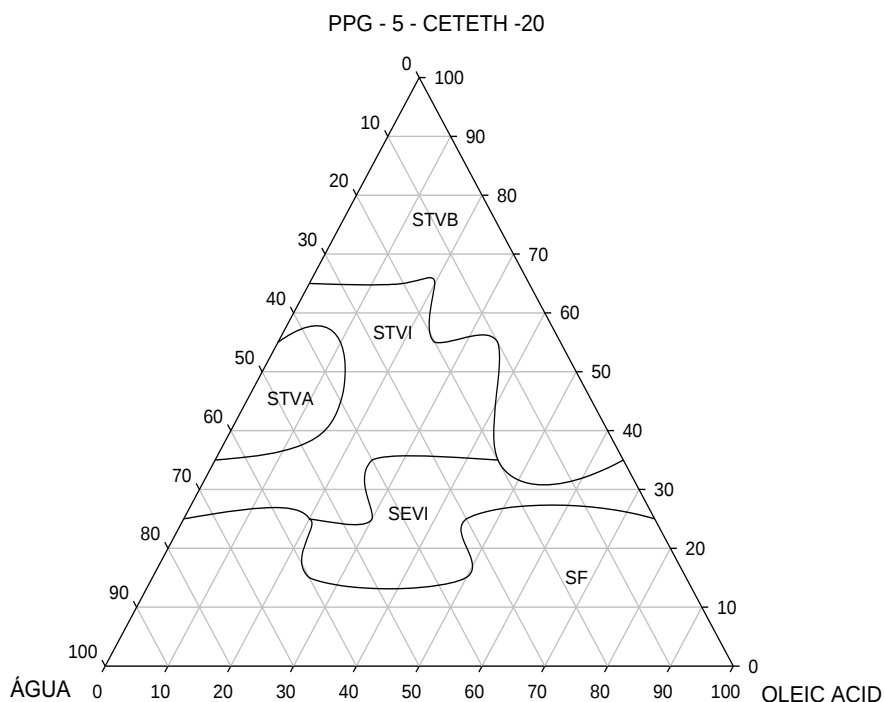
Através dos diagramas de fases foi possível compreender o comportamento das moléculas de tensoativo, quando se varia a proporção de fase aquosa, assim como o tipo e a proporção de fase oleosa. Sendo possível a obtenção de sistemas homogêneos de característica isotrópica (sistemas micelares e/ou microemulsionados), anisotrópica (cristais líquidos de fase lamelar e hexagonal) e sistemas emulsionados.

Os diagramas foram divididos em regiões de acordo com as características visuais e viscosas dos sistemas formados, sendo classificados em: sistemas transparentes de baixa viscosidade (STBV), os quais apresentam menor viscosidade em relação aos sistemas transparentes de viscosidade intermediária (STVI) e sistemas transparentes de viscosidade alta (STVA). Sistemas de aspecto leitoso com certa viscosidade foram denominados sistemas emulsionados de viscosidade intermediária (SEVI). Já aqueles que apresentam alta viscosidade, porém opacos foram classificados como sistemas opacos de alta viscosidade (SOAV).

Os resultados demonstram que os diagramas formados pelo PPG-5-Ceteth-20, independente do tipo de fase oleosa, apresentaram sistemas homogêneos com os mais variados tipos de organização em uma ampla faixa de combinação dos componentes. A Figura 9 representa o diagrama D_1 (PPG-5-Ceteth-20, Ácido Oleico e Água). Nele a região STVB foi obtida com baixa concentração de água (10 a 20%), intermediária de óleo (10% a 50%), alta e intermediária de tensoativo (80 a 40%, respectivamente). Através dos resultados observou-se que quando a fase aquosa aumentou entre 20 e 40% e a de tensoativo se manteve entre 50 e 60%, o STVB transitou para uma região de sistemas mais organizados e viscosos (STVI), provavelmente o aumento da fase aquosa fez com que a parte apolar das moléculas do tensoativo se protegesse da água e se agrupassem em agregados micelares, que por sua vez se organizou sob a forma de bicamadas na interface água/óleo separando ambas as fases, característica de arranjos líquidos cristalinos de fase lamelar. Ainda com o aumento da fase aquosa foi possível observar que esses agregados se organizavam em estruturas cilíndricas bidimensionais, como a de um hexágono, caracterizando assim a fase hexagonal (STVA). Essa mudança de fase provocou alterações relacionadas à anisotropia com a visualização de

“estrias”, mudanças na distância entre os objetos espalhadores e também alterações relacionadas à viscosidade desses sistemas, características posteriormente confirmadas através da MLP, SAXS e das medidas reológicas, respectivamente. Em concentrações intermediárias de fase oleosa (40 a 60%), quando a concentração de tensoativo foi de 30% e a de fase aquosa foi menor, sistemas emulsionados se formaram. Em altas concentrações de fase oleosa ou aquosa, a baixa concentração de tensoativo promoveu a separação de fases.

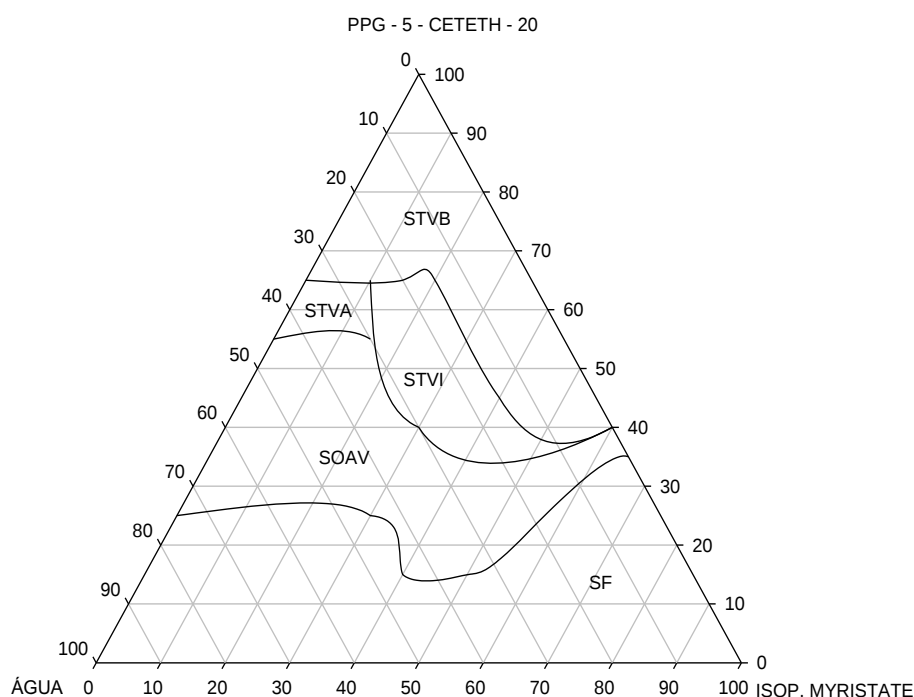
Figura 9 – Diagrama de fases D_1 (PPG - 5 - Ceteth - 20/ Ácido Oleico/ Água) (STVB). Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SEVI) Sistema Emulsionado de Viscosidade Intermediária e (SF) Separação de Fases.



A Figura 10 apresenta o diagrama D_2 constituído por PPG-5-Ceteth-20, Miristato de Isopropila e água. Neste diagrama foi possível observar algumas particularidades em relação ao aumento de fase aquosa. Em concentrações acima de 40% observou-se a formação de sistemas de alta viscosidade, porém com certa opacidade (SOAV). Comparando com o diagrama D_1 , o uso do Ácido Oleico, facilitou a formação de uma maior região de STVI e STVA, regiões que apresentam estruturas mais ordenadas e de tamanhos nanométricos, fato que reflete na transparência dos sistemas. Este efeito provavelmente ocorreu devido o Ácido

Oleico possui em seu grupo terminal um Ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), podendo ter agido como um co-tensoativo e cooperado junto com o PPG-5-Ceteth-20 na diminuição da tensão interfacial dos sistemas (WANG et al. 2006), ao contrário do Miristato de Isopropila que possui um grupo terminal apolar ($-\text{CH}_3$). Segundo GARTI e ASERIN (1996), a capacidade que os tensoativos têm em diminuir a tensão interfacial entre a água e óleo proporciona a transparência dos sistemas, isso ocorre devido à formação de estruturas de tamanhos menores que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz visível, as quais não desviam luz. O uso do Miristato de Isopropila não proporcionou a formação de sistemas emulsionados. A separação de fases também ocorreu em altas concentrações de fase oleosa ou aquosa e em baixas concentrações de tensoativo.

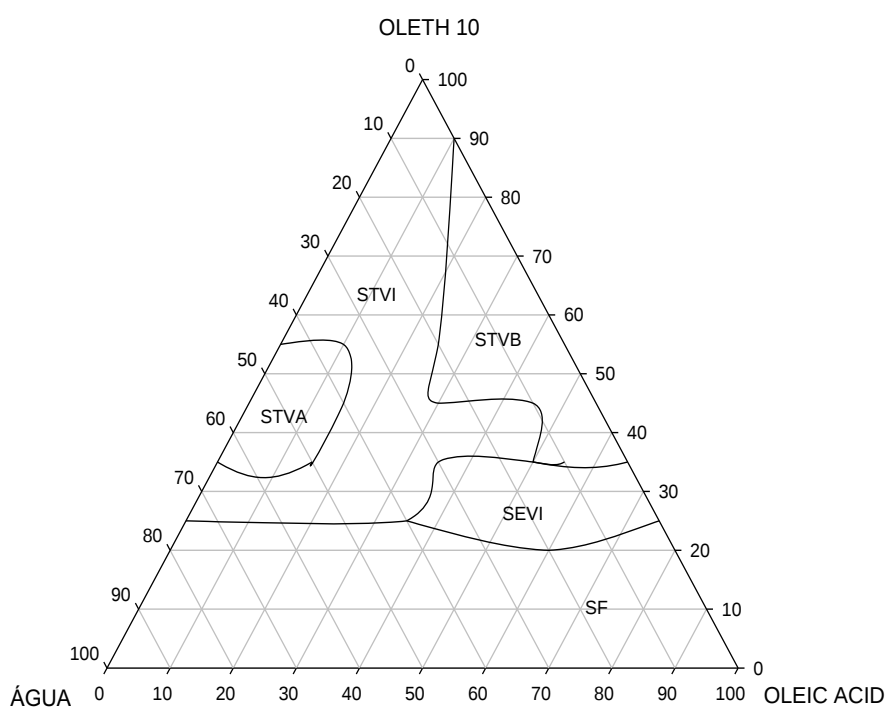
Figura 10 – Diagrama de fases D_2 PPG - 5 - Ceteth – 20, Miristato de Isopropila e Água. (STVB) Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SOAV) Sistema Opaco de Alta Viscosidade e (SF) Separação de Fases.



Os resultados para os diagramas formados pelo tensoativo Oleth 10, independente do tipo de fase oleosa, também demonstraram que foi possível obter sistemas homogêneos com

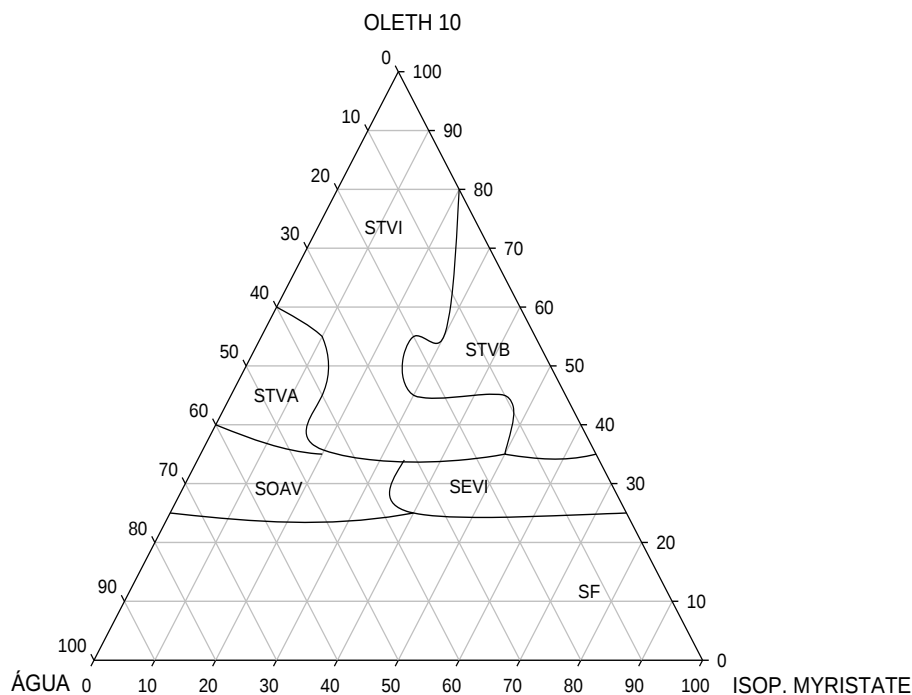
os mais variados tipos de organização em uma ampla faixa de combinação dos componentes. A Figura 11 representa o diagrama D_3 , constituído por Oleth 10, Ácido Oleico e água, o qual apresentou uma região de STVB com baixa concentração de água (10 a 20%), intermediária de óleo (20 a 50%), alta e intermediária de tensoativo (70 a 40%, respectivamente). Diferente dos diagramas obtidos com o PPG-5-Ceteth-20, o uso do Oleth 10 em altas concentrações (entre 80 e 70%) e em baixas concentrações de fase aquosa (10 a 20%) permitiu a formação de uma maior região de STVI. O uso de um tensoativo menos hidrofílico (Oleth 10) em concentrações intermediárias de fase oleosa (40 a 60%) favoreceu a formação de sistemas emulsionados do tipo A/O. Também foi observado separação de fases em altas concentrações de fase oleosa ou aquosa e em baixas concentrações de tensoativo.

Figura 11 – Diagrama de fases D_3 (Oleth 10/Ácido Oleico/Água). (STVB) Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SEVI) Sistema Emulsionado de Viscosidade Intermediária e (SF) Separação de Fases.



A Figura 12 apresenta o diagrama D_4 , constituído por Oleth 10, Miristato de Isopropila e água. Em contraste com diagrama obtido com PPG-5-Ceteth-20, o uso do Oleth 10 contribuiu para a formação de uma maior região de estruturas transparentes e organizadas. Essa diferença pode ter ocorrido devido o Oleth 10 possuir em sua cadeia menos unidades de óxidos de etileno em relação ao PPG-5-Ceteth-20, o que representa uma menor quantidade de oxigênio em sua molécula, diminuindo assim possíveis ligações de hidrogênio com a água presente nas formulações. Ou seja, tensoativos com maior grau de etoxilação e consequentemente uma maior massa molar possuem uma menor capacidade para diminuir a tensão interfacial, pois as ligações entre os átomos de oxigênio de sua molécula com o hidrogênio da água dificultam sua mobilidade em direção à superfície das gotas de óleo, proporcionando sistemas menos transparentes (NETO et al., 2009). A região de STBV também foi obtida com baixa concentração de água (10 a 20%), intermediária de óleo (20 a 50%), alta e intermediária de tensoativo (70 a 40%, respectivamente). Foi visualizada uma pequena região de sistemas opacos de alta viscosidade (SOAV), a qual ocorreu em concentrações acima de 40% de fase aquosa. Comparando com o diagrama anterior o uso do Ácido Oleico provavelmente também estendeu a região de STVI. A formação de sistemas emulsionados foi obtida em concentrações intermediárias de fase oleosa (40 a 60%). A separação de fases ocorreu em altas concentrações de fase oleosa ou aquosa e em baixa concentração de tensoativo

Figura 12 – Diagrama de fases D_4 (Oleth 10/Miristato de Isopropila/Água). (STVB) Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SEVI) Sistema Emulsionado de Viscosidade Intermediária e (SF) Separação de Fases.



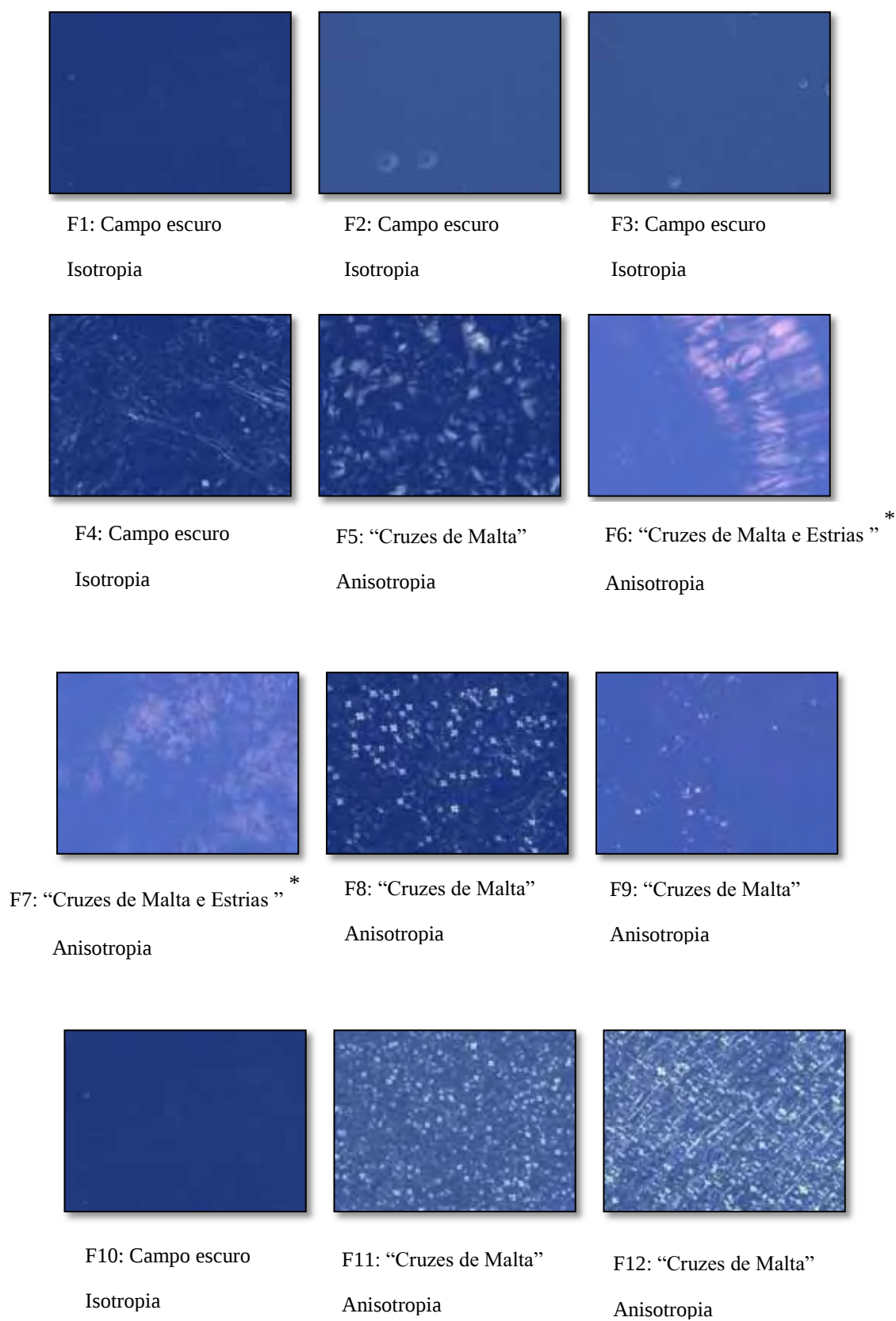
5.1 Caracterização físico-química das formulações

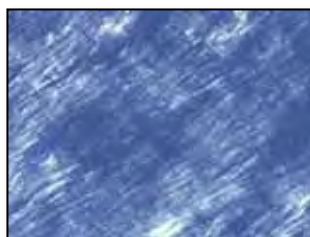
5.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)

A Figura 13 representa as fotomicrografias das formulações que possuem um valor fixo de fase aquosa, mas diferem entre si pela proporção de tensoativo /fase oleosa e formulações que possuem um valor fixo de fase oleosa, porém diferem-se pela proporção de tensoativo/fase aquosa. A composição de cada formulação está descrita nas Tabelas 3 a 6. Nota-se para as formulações formadas pelo PPG-5-Ceteth-20, independente do tipo de fase oleosa e que possuem valor fixo de fase aquosa, um comportamento isotrópico através da visualização de um campo escuro ($F1$, $F2$, $F3$, $F15$, $F16$ e $F17$), ou seja, as amostras permitiram a passagem da luz polarizada sem modificações na sua propagação à formação de sistemas micelares e/ou microemulsionados. Sistemas micelares também apresentam isotropia

e baixa viscosidade, porém ocorrem em soluções aquosas quando a concentração do tensoativo atinge sua CMC formando agregados micelares. Já os sistemas micelares inversos também ocorrem quando o tensoativo atinge sua CMC, porém são sistemas que possuem fase oleosa (MÜLLER-GOYMANN, 2004) e uma pequena quantidade de fase aquosa, a qual se encontra voltada para a parte interna do sistema e está fortemente ligada à parte polar do tensoativo, por forças intermoleculares incluindo forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (ISRAELACHVILI, 1992), Já a parte apolar do tensoativo direciona-se para fora em contato com a fase oleosa. As micelas inversas são difíceis de diferenciar das microemulsões do tipo A/O devido suas características semelhantes e por isso, muitas vezes as microemulsões são tratadas como uma extensão de soluções micelares (OLIVEIRA et al., 2004). Para o diagrama D_1 à medida que a concentração de fase aquosa aumenta de 20 a 30% ($F4$ e $F5$), observa-se que houve um desvio sob o plano de luz polarizada (anisotropia), proporcionando o aparecimento de “cruzes de malta”, característica de arranjo líquido cristalino de fase lamelar, Já o aumento de fase aquosa em 40 a 50% ($F6$ e $F7$) promoveu uma diferente organização entre os arranjos, sendo revelada através da anisotropia das amostras uma mistura de fases, visualizando-se estruturas de fase lamelar e estruturas parecidas com “estrias”, característica do arranjo líquido cristalino de fase hexagonal. Para o D_2 o aumento da fase aquosa em 20% ($F18$) também possibilitou a formação de arranjos de fase lamelar, porém o aumento em 30% provocou uma maior organização do sistema, caracterizado pela presença de uma fase hexagonal ($F19$), entretanto não foi possível obter fotomicrografias das formulações $F20$ e $F21$, devido à alta viscosidade desses sistemas. Para os diagramas formados através do Oleth 10 (D_3 e D_4) observa-se que em altas concentrações de tensoativo (80 a 70%) e baixa concentração de fase aquosa (10%) ($F8$, $F9$, $F11$, $F12$, $F22$, $F23$, $F25$ e $F26$) há um desvio sob o plano de luz polarizada, resultando no aparecimento de “cruzes de malta”. Amostras da $F10$ do diagrama com Ácido Oleico e $F24$ do Miristato de Isopropila, demonstram a isotropia das formulações observada através da visualização de um campo escuro. Já o aumento da fase aquosa (40 a 50%) em ambos os diagramas provocou a mudança da fase lamelar para sistemas mais organizados de fase hexagonal ($F13$, $F14$, $F27$ e $F28$).

Figura 13- Fotomicrografia das formulações selecionadas.





F13: “Estrias”

Anisotropia



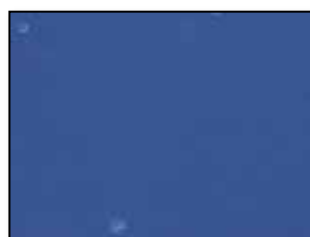
F14: “Estrias”

Anisotropia



F15: Campo escuro

Isotropia



F16: Campo escuro

Isotropia



F17: Campo escuro

Isotropia



F18: “Cruzes de Malta”

Anisotropia



F19: “Estrias”

Anisotropia



F22: “Cruzes de Malta”

Anisotropia



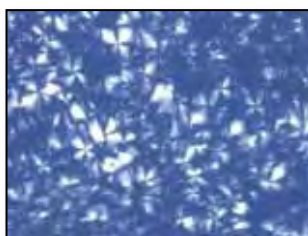
F23: “Cruzes de Malta”

Anisotropia



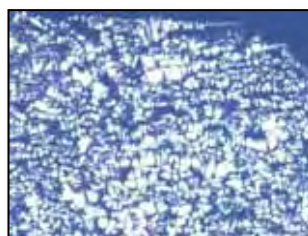
F24: Campo escuro

Isotropia



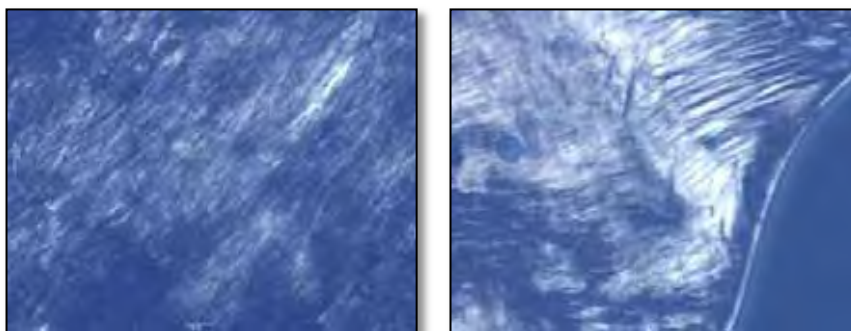
F25: “Cruzes de Malta”

Anisotropia



F26: “Cruzes de Malta”

Anisotropia



F27: “Estrias”

Anisotropia

F28: “Estrias”

Anisotropia

* Não foi possível através das fotomicrografias a visualização das “Cruzes de Malta”, porém as mesmas foram observadas durante a microscopia.

5.2.2 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A caracterização das formulações através do SAXS foi feita através das curvas de intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q). Com as curvas foi possível avaliar através da correlação espacial entre os objetos espalhadores, as nanoestruturas dos sistemas em que se varia a proporção de fase aquosa, assim como o tipo e a proporção de fase oleosa. Nota-se pelas curvas de SAXS das formulações obtidas pelo PPG-5-Ceteth-20, em que se variou a proporção de tensoativo /fase oleosa ($F1$, $F2$, $F3$, $F15$ e $F16$), a presença de um pico alargado, característico de sistemas micelares e/ou microemulsionados (BEAUCAGE et al., 1995) (Figura 14 e 17). Com exceção da formulação $F17$ que apesar de exibir um comportamento isotrópico na MLP, apresentou um pico suficientemente definido, o que indica uma maior correlação espacial entre os objetos espalhadores, porém sem uma periodicidade equivalente a um arranjo mais organizado, podendo assim indicar o começo de uma organização do sistema localizado em uma região de transição de fases (Figura 17). Através da MLP foi possível observar um comportamento anisotrópico da formulação $F4$ do diagrama D_1 , entretanto sua curva de SAXS demonstrou picos definidos, porém pouco estreitos, o que indica um menor nível de organização desse sistema (Figura 15). O aumento

da fase aquosa em 30% na formulação *F5* do diagrama D_1 proporcionou um aumento na organização estrutural do sistema e através do deslocamento na posição máxima do pico demonstrou uma mudança na distância entre os objetos espalhadores, indicando uma correlação mais condensada, sendo possível através do valor da posição do vetor de espalhamento ($q_{m\grave{a}x.}$) o emprego da relação $d = 2\pi/q_{m\grave{a}x.}$, a correlação entre as distâncias dos objetos espalhadores $d1/d2 = 2$, demonstra uma periodicidade equivalente a um arranjo líquido cristalino de fase lamelar (Figura 15), confirmada pela presença de “cruzes de malta” na MLP. As curvas das formulações do diagrama D_1 que apresentam uma maior quantidade de fase aquosa (*F6* e *F7*) também apresentaram picos de alta definição (Figura 16), porém não foi possível através da relação empregada confirmar a mistura de fases encontrada na MLP. A formulação *F19* do diagrama D_2 com o aumento de fase aquosa em 30% demonstrou em relação às outras formulações uma menor distância entre os objetos espalhadores (Figura 18), consequentemente arranjos mais organizados que através da correlação $d1/d2 = 1,73$ e $d1/d3 = 2$, revelou uma periodicidade relativa a um arranjo líquido cristalino de hexagonal.

Figura 14 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 50 % de (PPG - 5 Ceteth - 20); 10, 20, 40% de Ácido Oleico e Fase aquosa e 10%, respectivamente.

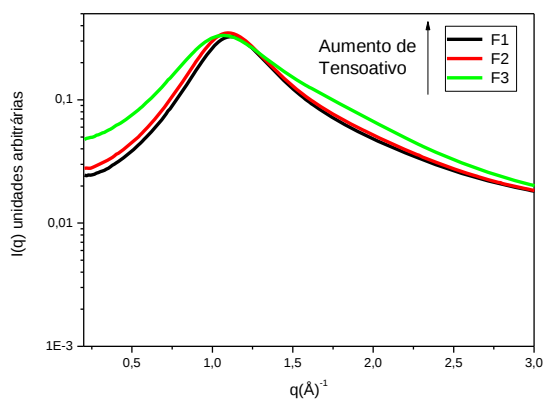


Figura 15- Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 % de (PPG - 5 - Ceteth - 20); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente.

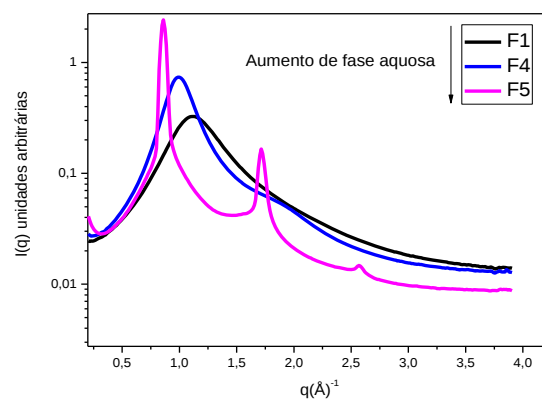


Figura 16 – Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (PPG - 5 - Ceteth – 20); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente.

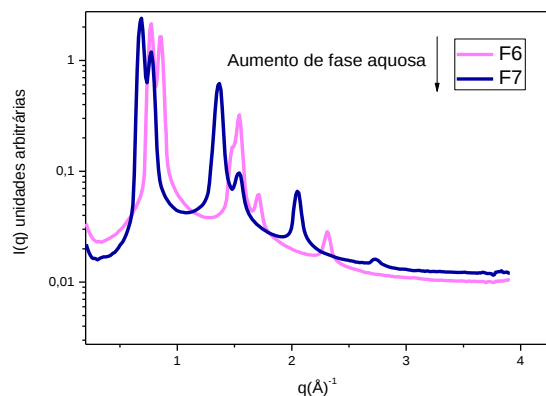


Figura 17- Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 % de (PPG - 5 - Ceteth – 20); 10, 20, 40% de Miristato de Isopropila e 10% de Fase aquosa, respectivamente.

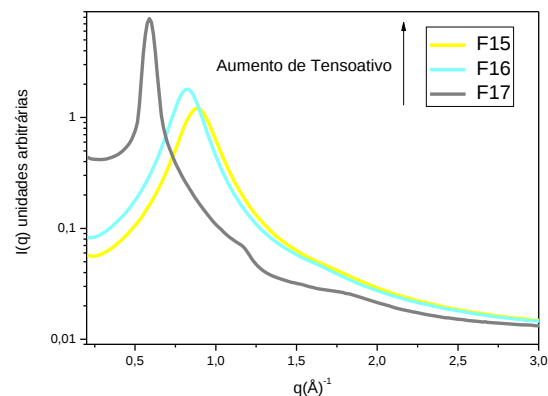
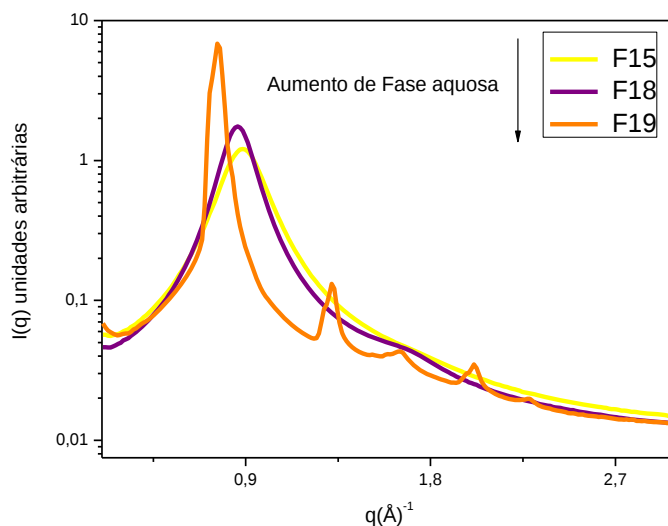


Figura 18- Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 % de (PPG - 5 -Ceteth – 20) e 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente



As formulações com alta concentração de tensoativo (80 a 70%) e baixa concentração de fase aquosa (10%) para os diagramas formados através do Oleth 10 (*F8*, *F22* e *F23*), demonstraram curvas de SAXS com periodicidade equivalente a fase lamelar (Figuras 19 e 22). Esse efeito na organização das formulações contendo altas concentrações de Oleth 10 em relação ao PPG-5-Ceteth-20 é provavelmente dependente da sua CMC, que é atingida nessas concentrações, proporcionando a formação de agregados micelares que se organizam em estruturas ordenadas, apresentando picos bastante definidos. A formulação *F9* do diagrama *D*₃ apresentou-se como uma amostra anisotrópica e através da curva de SAXS foi possível observar picos definidos, porém pouco estreitos, caracterizando uma menor organização do sistema (Figura 19). Já o comportamento isotrópico da formulação *F10* do diagrama *D*₃ foi confirmado através de um pico alargado (Figura 19). As formulações *F11*, *F12*, *F25* e *F26* (Figuras 20 e 23), apresentaram curvas com picos bem definidos e através da correlação $d_1/d_2 = 2$, revelaram uma de fase lamelar. A formulação *F24* do diagrama *D*₄ apresentou um comportamento semelhante à formulação *F17* do diagrama formado pelo PPG-5-Ceteth-20 e Miristato de Isopropila, exibindo um pico definido, porém sem uma periodicidade específica, indicando sua localização em uma região de transição de fase (Figura 22). Através da MLP das formulações *F13* e *F14* do diagrama *D*₃ foi possível à visualização de uma fase hexagonal, entretanto suas curvas de SAXS revelaram uma

correlação $d1/d2 = 2$ e $d1/d3 = 3$, característica de fase lamelar (Figura 21). As formulações *F27* e *F28* do diagrama D_4 , demonstraram uma menor distância entre os objetos espalhadores (Figura 24) e através da correlação $d1/d2 = 1,73$ e $d1/d3 = 2$, revelou uma periodicidade relativa a uma fase hexagonal.

A caracterização das formulações obtidas principalmente pelo Oleth 10 através do SAXS permitiu não só a identificação das nanoestruturas, mas também uma avaliação mais aprofundada sobre os níveis de organização dos arranjos líquido-cristalinos. Com as curvas de SAXS foi possível observar que o estreitamento dos picos vai se tornando mais evidente nas formulações em que se varia a proporção de fase aquosa, ou seja, o aumento de água proporcionou uma ampliação na ordem estrutural desses sistemas. Esse efeito provavelmente relaciona-se com a parte hidrofóbica do tensoativo que tende a se proteger do aumento de água se agrupando cada vez mais, aumentando assim seu nível de empacotamento, o que conseqüentemente torna mais condensada a correlação espacial entre os objetos espalhadores, proporcionando a visualização de picos mais estreitos e definidos (Figuras 20, 21, 22 e 24).

Figura 19 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 50 % de (Oleth 10); 10, 20, 40% de Ácido Oleico e Fase aquosa e 10%, respectivamente.

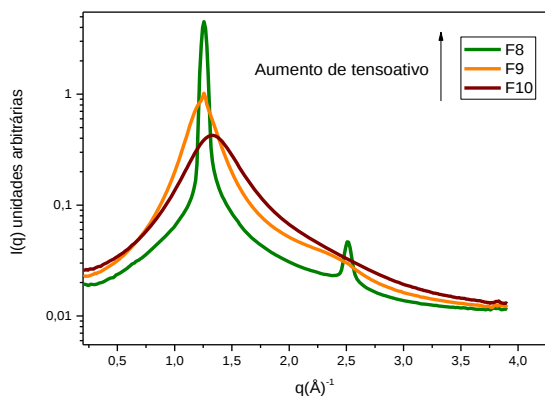


Figura 21 – Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (Oleth 10); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente.

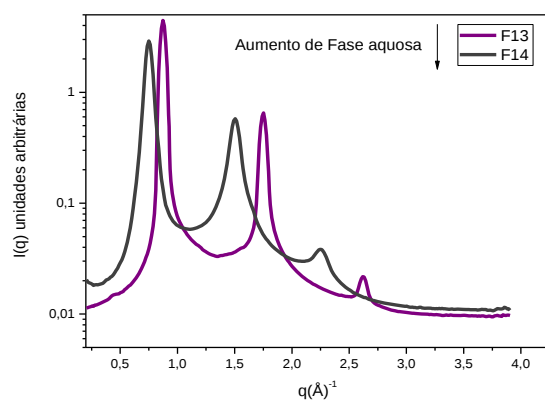


Figura 20 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60% de (Oleth 10); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente.

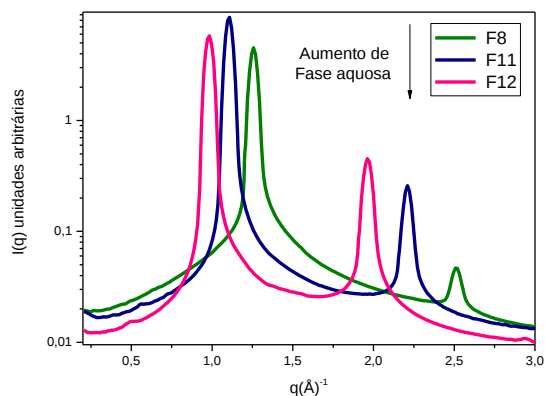


Figura 22 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 %de (Oleth 10); 10, 20, 40% de Miristato de Isopropila e 10% de Fase aquosa, respectivamente.

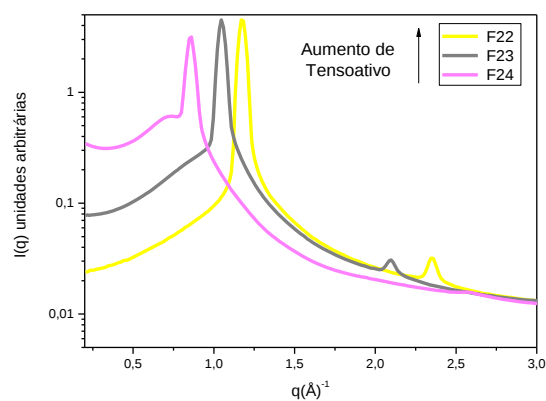


Figura 23 - Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 de (Oleth 10); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente.

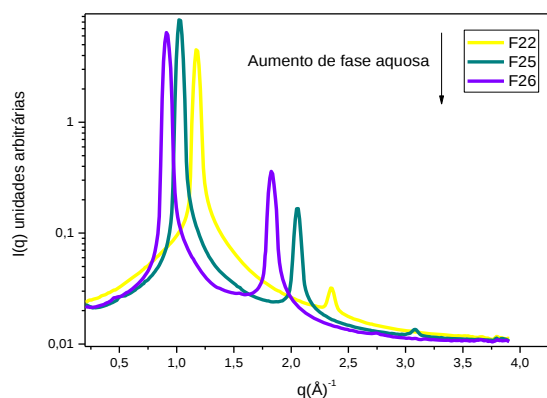
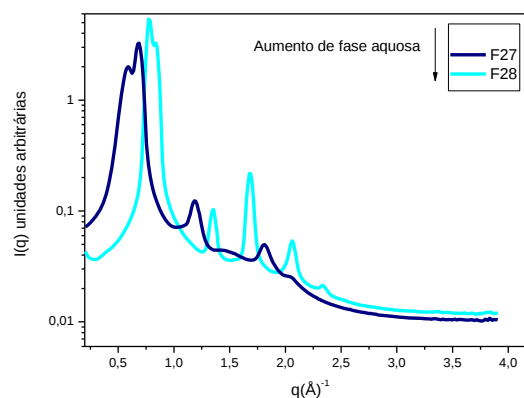


Figura 24 – Evolução estrutural interna dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (Oleth 10); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente.



5.2.3 Medidas Reológicas

As Figuras 25 a 29 representam através das curvas de fluxo a evolução reológica das formulações. As curvas de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento crescente são representadas por símbolos preenchidos, os símbolos vazios correspondem às curvas medidas com taxas de cisalhamento decrescentes. A caracterização reológica junto com as curvas de SAXS permitiu uma melhor compreensão sobre o nível de organização interno das formulações, principalmente daquelas que se diferem pela proporção de tensoativo/fase aquosa. Através dos reogramas foi possível observar que a área de histerese entre as curvas torna-se maior à medida que aumenta a quantidade de água, este efeito é representado pelo comportamento tixotrópico das amostras, indicando que o tempo de aplicação do cisalhamento influencia no restabelecimento da estrutura inicial das formulações. As curvas de fluxo para as formulações obtidas pelo PPG-5-Ceteth-20 de porcentagem fixa de fase aquosa (F1, F2, F3, F15, F16 e F17) e caráter isotrópico, representadas pela presença de picos alargados nas curvas de SAXS, apresentaram um comportamento newtoniano com uma tensão de escoamento próxima a zero, essas características provavelmente estão relacionadas com o alinhamento das gotículas de óleo ou das micelas em direção ao escoamento, diminuindo assim a resistência interna e a viscosidade aparente de forma constante

(FORMARIZ, 2008). Quando a velocidade de cisalhamento foi removida, os sistemas readquiriram sua estrutura inicial, de modo que as curvas ascendentes e descendentes sobrepõem praticamente uma em cima da outra (Figuras 25 e 28). Já as formulações *F4* e *F18* apesar de demonstrarem um caráter anisotrópico, apresentaram o mesmo comportamento citado anteriormente, entretanto para essas formulações o comportamento reológico está provavelmente relacionado com a maior mobilidade dos agregados micelares que formam as lamelas, devido uma menor organização dos sistemas (confirmado pela baixa definição dos picos nas curvas de SAXS), podendo-se dizer que as bicamadas lamelares se desestruturaram com a ação do cisalhamento, voltando ao estado micelar, que por sua vez alinham-se em direção ao escoamento e readquirem após o cisalhamento sua estrutura inicial (Figuras 26 e 29). A formulação *F5* do diagrama D_1 , na qual a aplicação do cisalhamento provocou uma menor resistência interna com consequente diminuição da viscosidade aparente à medida que a taxa de cisalhamento foi aumentando, apresentou-se como um sistema de comportamento não newtoniano de fluido pseudoplástico, com tensão de escoamento maior que zero e maior área de histerese (Figura 26). Os reogramas das formulações do diagrama D_1 que apresentam uma maior quantidade de fase aquosa (*F6* e *F7*) e a *F19* do diagrama D_2 , também apresentaram um comportamento não newtoniano de fluido pseudoplástico (Figuras 27 e 29). A formulação *F7* em relação a *F6*, a qual possui uma maior quantidade de água (50%), apresentou uma maior tensão de escoamento, área de histerese e viscosidade aparente (Figura 25), o que indica uma maior organização desse sistema. Já a formulação *F19* em relação às outras formulações formadas pelo PPG-5-Ceteth-20 foi a que apresentou maior tensão de escoamento, área de histerese e consequentemente maior viscosidade aparente (Figura 29), características que complementam as curvas de SAXS.

Figura 25 – (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80, 70, 50 % de (PPG - 5 Ceteth - 20); 10, 20, 40% de Ácido Oleico e Fase aquosa e 10%, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

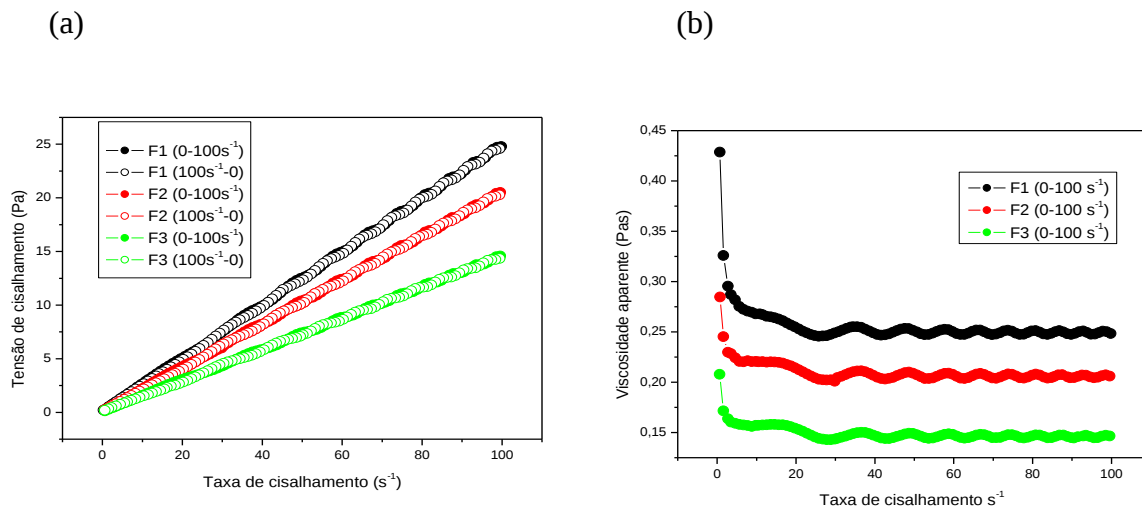


Figura 26 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (PPG - 5 - Ceteth - 20); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

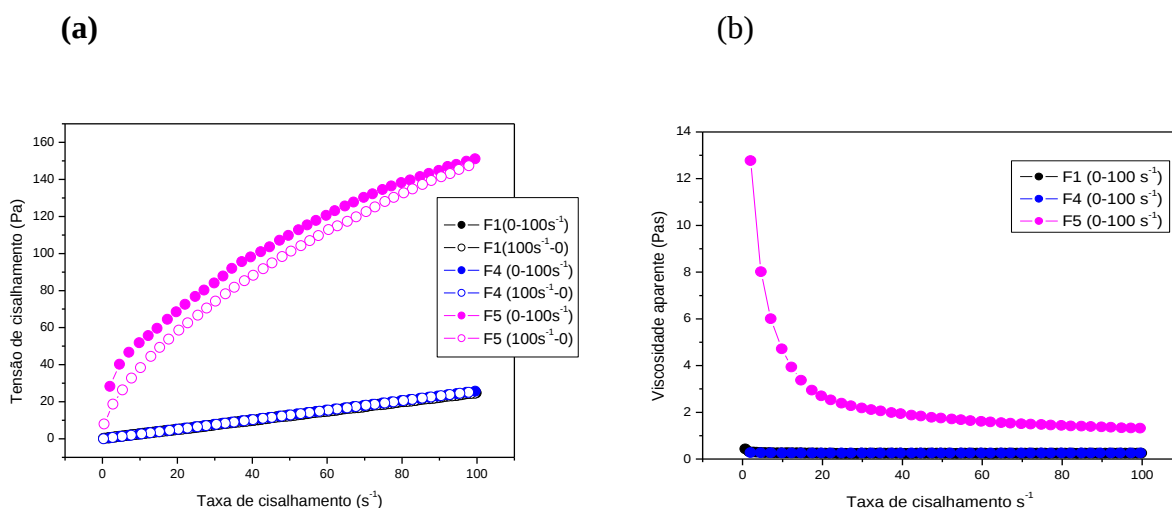


Figura 27 – (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (PPG - 5 - Ceteth – 20); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

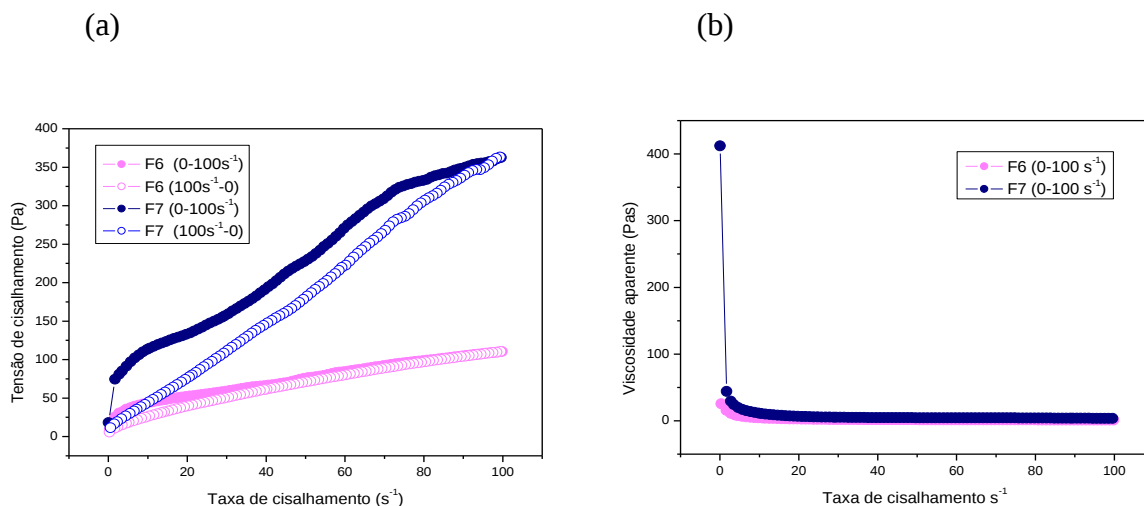


Figura 28 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 % de (PPG - 5 - Ceteth – 20); 10, 20, 40% de Miristato de Isopropila e 10% de Fase aquosa, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

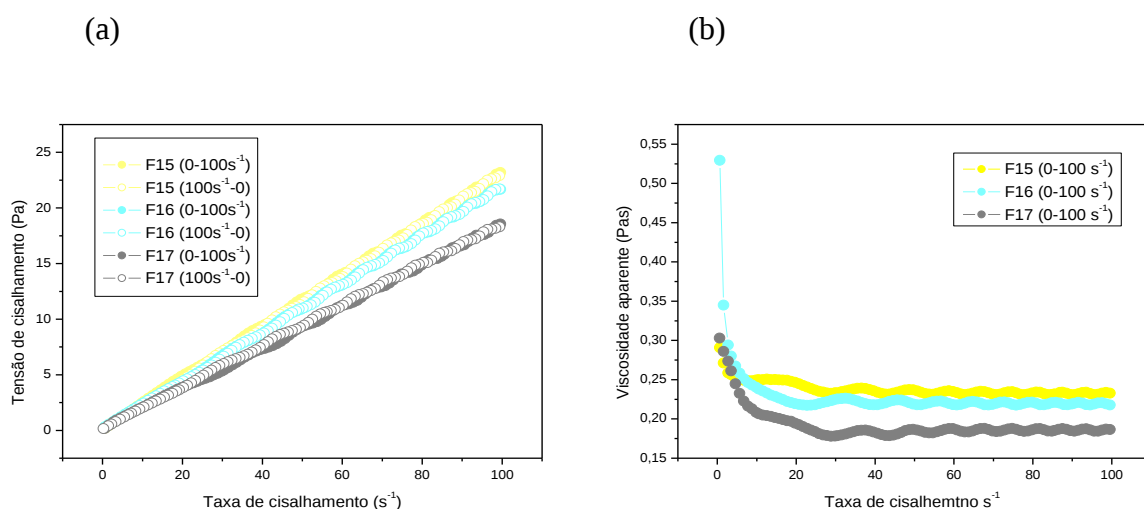
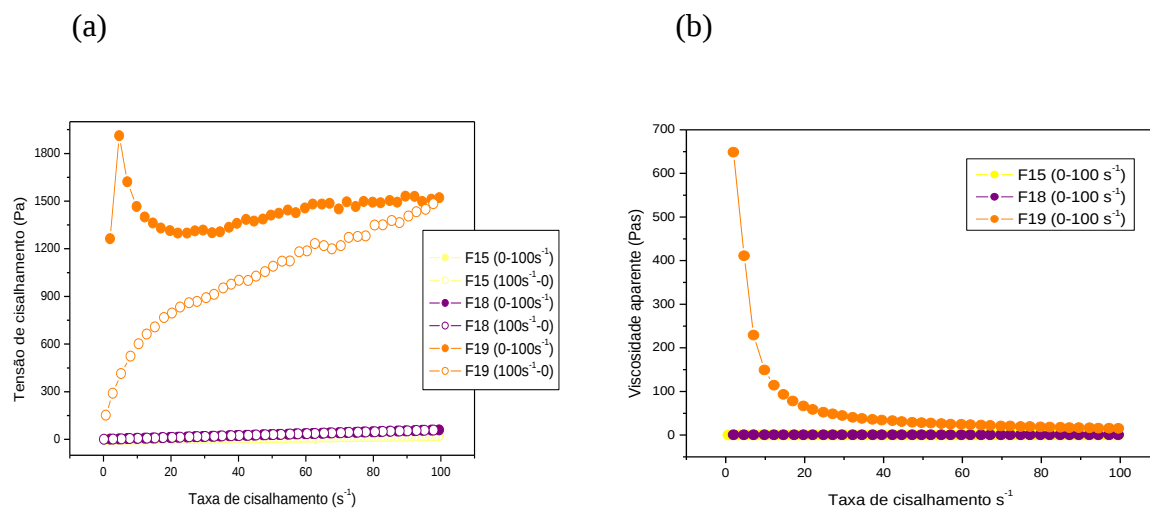


Figura 29 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de PPG - 5 -Ceteth – 20 e 10; 20; 30% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.



As formulações obtidas pelo Oleth 10 de porcentagem fixa de fase aquosa e cerca de 80 e 70% de tensoativo (*F8*, *F22* e *F23*) apesar de possuírem arranjos líquidos cristalinos de fase lamelar, caracterizados pela definição das curvas de SAXS, apresentaram através das curvas de fluxo um comportamento newtoniano com uma tensão de escoamento próxima à zero (Figuras 30 e 33), característica que pode estar relacionada com desorganização das bicamadas lamelares com a ação do cisalhamento. Esse efeito pode ter ocorrido devido uma maior mobilidade entre os agregados micelares que formam as lamelas, provavelmente devido à baixa quantidade de fase aquosa, que com ação do cisalhamento retorna ao estado micelar, alinhando-se em direção ao escoamento, demonstrando assim um comportamento newtoniano com tensão de escoamento próxima à zero, devido sua baixa resistência interna. Já a formulação *F9* do diagrama *D₃* apresentou o mesmo comportamento reológico (Figura 30), no entanto a amostra possui um menor nível de organização, característica que facilita o desarranjo das lamelas durante a ação de cisalhamento. O comportamento newtoniano com tensão de escoamento próxima a zero, também representou as amostras de caráter isotrópico e de baixa correlação espacial (*F10* e *F24*, Figuras 30 e 33). O aumento da fase aquosa entre 20 e 30% em ambos os diagramas formados pelo Oleth 10 (*F11*, *F12*, *F25* e *F26*, Figuras 31 e 34) proporcionou sistemas de comportamento newtoniano e de fluido pseudoplástico, a

amplitude do laço de histerese entre os sistemas permitiu junto com as curvas de SAXS confirmar o nível de organização desses sistemas. As formulações *F13* e *F14* do diagrama D_3 apresentaram um comportamento diferente das outras formulações, no entanto foram representadas por curvas de histerese em sentido anti-horário, denotando um comportamento anti-tixotrópico (Figura 32). O comportamento reológico dessas formulações prova que elas são dependentes de uma ação de cisalhamento para formar arranjos mais organizados, uma vez que suas microscopias revelam uma fase hexagonal em contraste com as curvas de SAXS, que demonstram uma fase lamelar. Esse efeito anti-tixotrópico provavelmente deve estar ligado com a ação do cisalhamento que aumenta a frequência das colisões entre as moléculas do tensoativo, conduzindo a um rearranjo dos agregados micelares com consequentemente aumento da viscosidade. A formulação *F27* do digrama D_4 , também apresentou o mesmo comportamento anti-tixotrópico (Figura 35), no entanto essa formulação demonstra um arranjo líquido cristalino de fase hexagonal confirmado pela MLP e curva de SAXS. Já a formulação *F28* apresentou um comportamento não newtoniano de fluido pseudoplástico com alta tensão de escoamento e área de histerese (Figura 35), características que complementam a intensidade e distância entre os objetos espalhadores das curvas de SAXS, dados que revelam um arranjo líquido cristalino de periodicidade hexagonal.

A viscosidade aparente das formulações é um dado de extrema importância, auxiliando diretamente na interpretação dos ensaios de liberação “*in vitro*”, pois a velocidade de difusão de um fármaco com sua consequente liberação final para o meio receptor, também depende da barreira imposta pela viscosidade de um sistema, a qual pode facilitar ou dificultar a fração de fármaco disponível por unidade de tempo (CORRÊA et al., 2005).

Figura 30 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80, 70, 50 % de (Oleth 10); 10, 20, 40% de Ácido Oleico e Fase aquosa e 10%, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

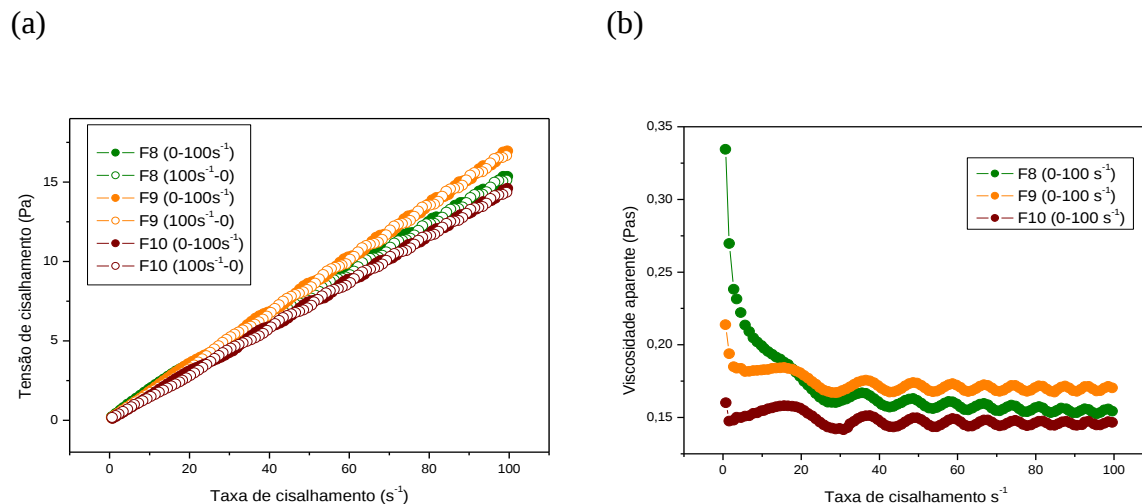


Figura 31 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (Oleth 10); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

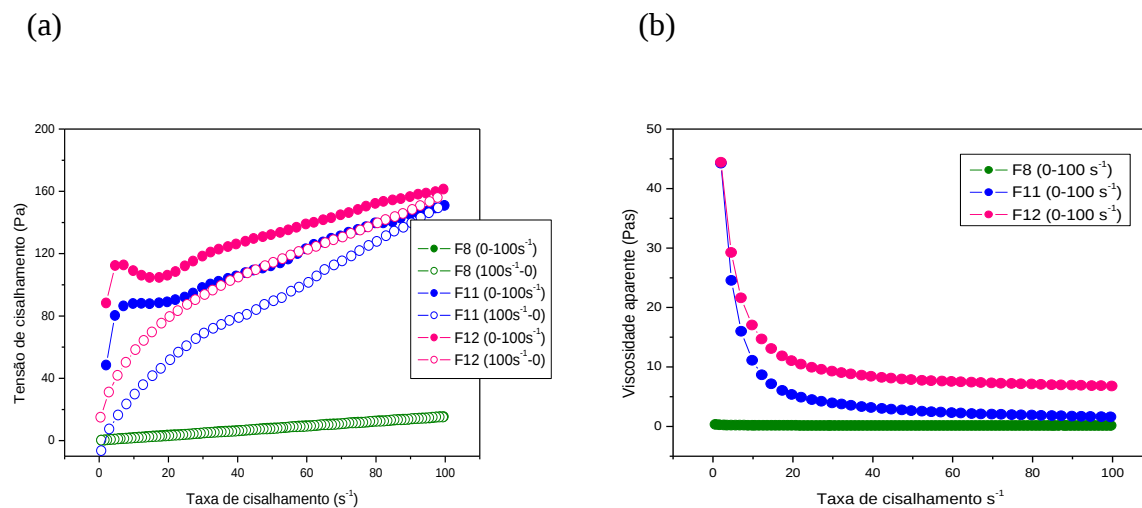


Figura 32 – (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (Oleth 10); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Ácido Oleico, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

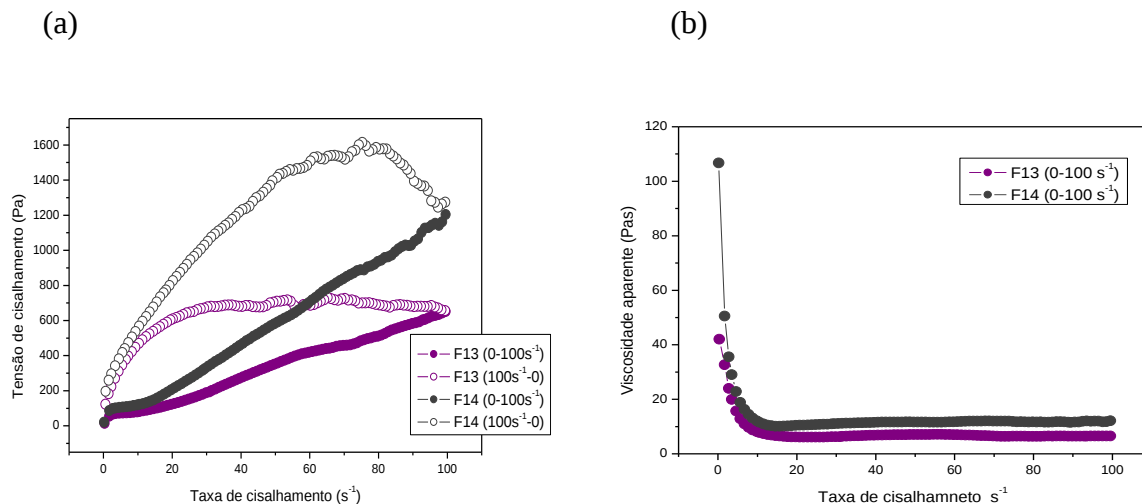


Figura 33 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80, 70, 60 % de (Oleth 10); 10, 20, 40% de Miristato de Isopropila e 10% de Fase aquosa, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

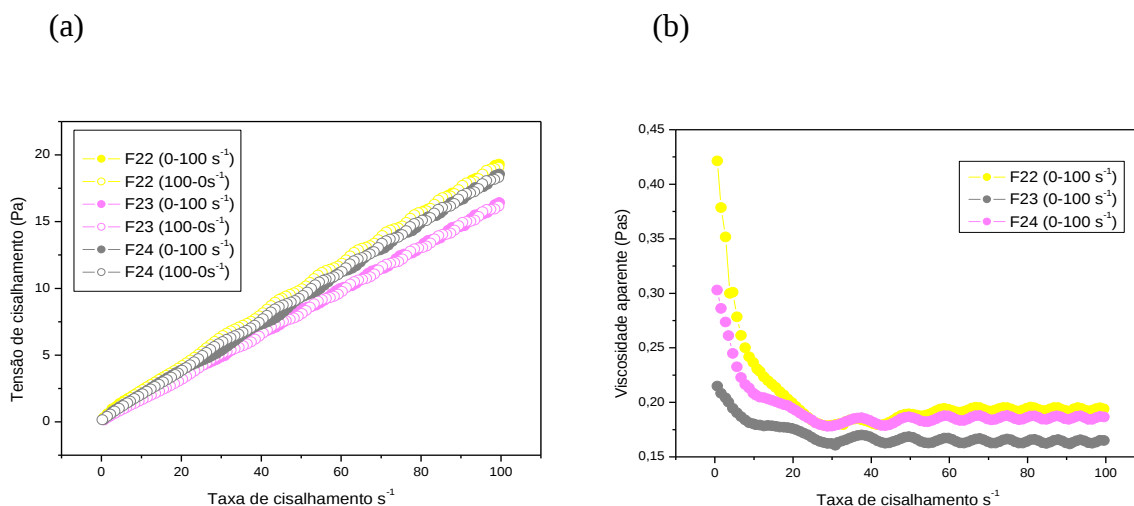


Figura 34 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 80; 70; 60 % de (Oleth 10); 10, 20, 30% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

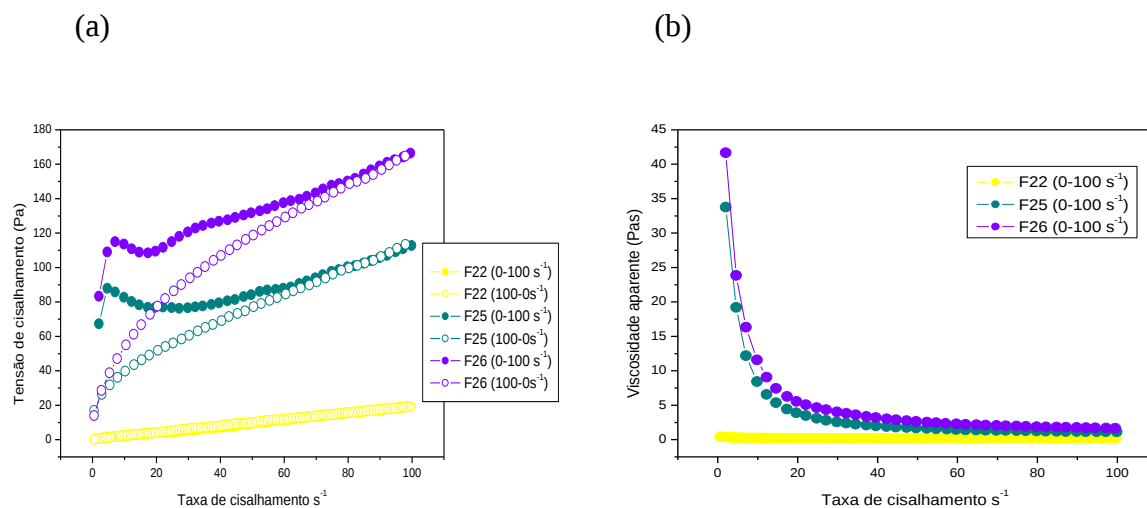
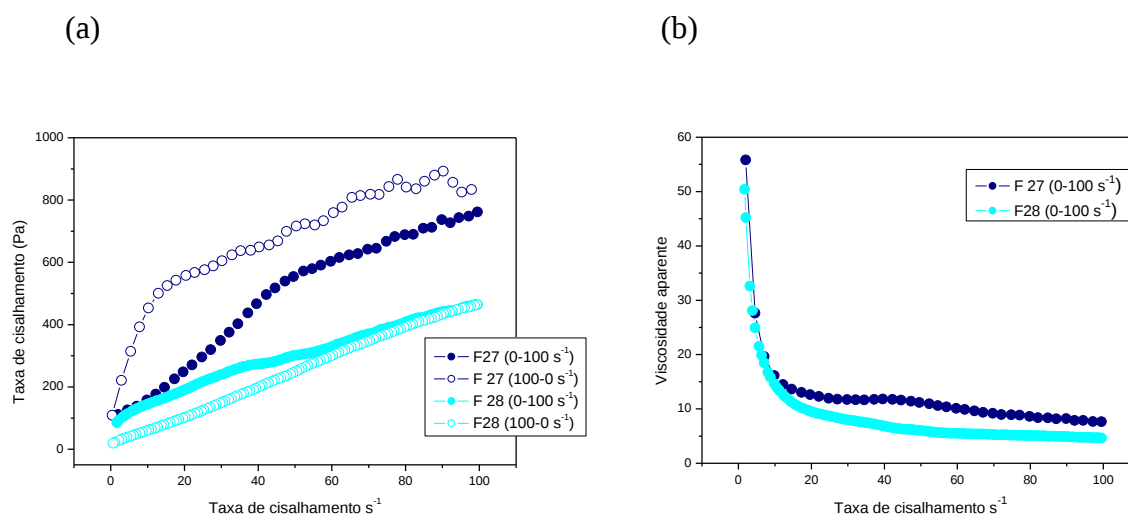


Figura 35 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento dos sistemas estabilizados com 50, 40 % de (Oleth 10); 40, 50% de Fase aquosa e 10% de Miristato de Isopropila, respectivamente; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

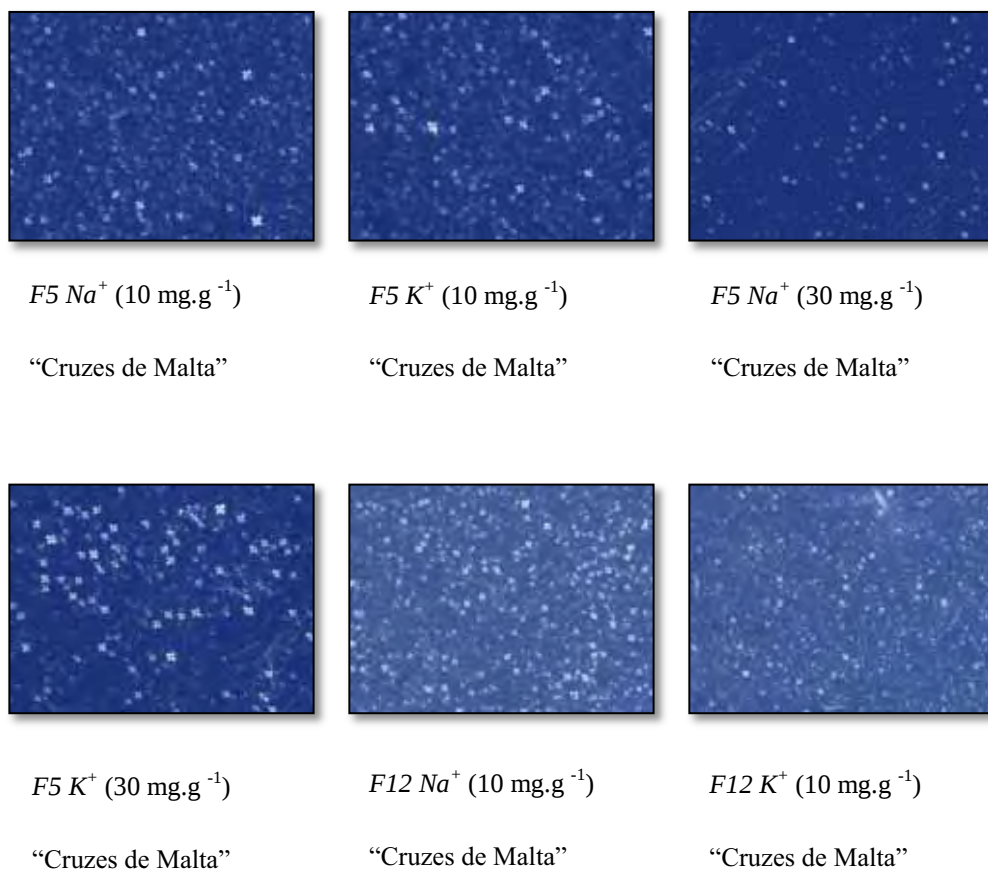


5.3 Efeitos da incorporação do DF Na⁺ e DF K⁺ nas formulações

5.3.1 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

A Figura 36 representa as fotomicrografias das formulações em que foi incorporado 10 e 30 mg.g⁻¹ do DF Na⁺ e DF K⁺. Nota-se que as quantidades incorporadas de ambos os fármacos não interferiram na organização dos arranjos caracterizados anteriormente, mantendo sua característica anisotrópica através da visualização de “cruzes de malta” (fase lamelar) e “estrias” (fase hexagonal).

Figura 36 – Fotomicrografias das formulações incorporadas com os fármacos





F12 Na⁺ (30 mg.g⁻¹)

“Cruzes de Malta”



F12 K⁺ (30 mg.g⁻¹)

“Cruzes de Malta”



F26 Na⁺ (10 mg.g⁻¹)

“Cruzes de Malta”



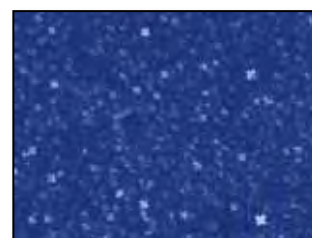
F26 K⁺ (10 mg.g⁻¹)

“Cruzes de Malta”



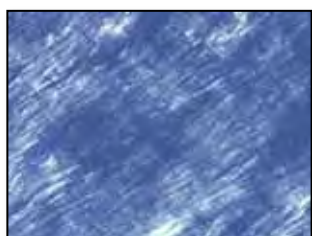
F26 Na⁺ (30 mg.g⁻¹)

“Cruzes de Malta”



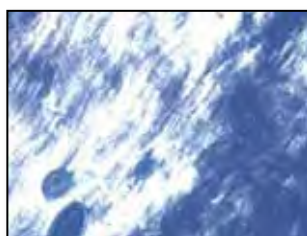
F26 K⁺ (30 mg.g⁻¹)

“Cruzes de Malta”



F28 Na⁺ (10 mg.g⁻¹)

“Estrias”



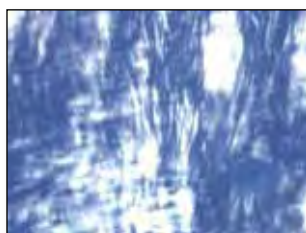
F28 K⁺ (10 mg.g⁻¹)

“Estrias”



F28 Na⁺ (30 mg.g⁻¹)

“Estrias”



F28 K⁺ (30 mg.g⁻¹)

“Estrias”

5.3.2 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As Figuras 37-40 demonstram através das curvas de intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) as nanoestruturas das formulações em que foi incorporado 30 mg.g^{-1} de DF Na^+ e DF K^+ . Nota-se que a incorporação de ambos os fármacos nas formulações em estudo não provocou nenhuma transição de fase entre os sistemas. No entanto, a formulação $F5 \text{ Na}^+$ e $F5 \text{ K}^+$, apresentou uma diminuição na definição dos picos, através de uma menor correlação espacial entre os objetos espalhadores, refletindo diretamente na organização estrutural dos arranjos, ou seja, a incorporação do DF Na^+ e do DF K^+ nestas formulações promoveu uma diminuição na ordem dos arranjos lamelares.

A incorporação de fármacos em alguns arranjos líquidos cristalinos pode aumentar sua solubilidade assim como afetar no parâmetro de empacotamento das moléculas de tensoativo com consequências na transição de fase que pode resultar em mudanças de propriedades importantes do veículo como comportamento reológico, estabilidade, solubilidade e liberação (OTTO et al., 2009

Figura 37 - Avaliação estrutural das formulações $F5$; $F5 \text{ K}^+$ e $F5 \text{ Na}^+$

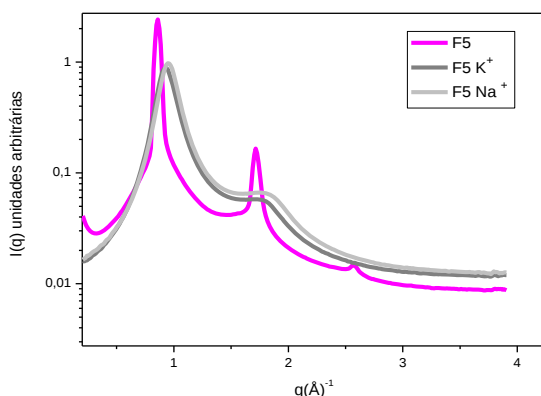


Figura 38 - Avaliação estrutural das formulações $F12$; $F12 \text{ K}^+$ e $F12 \text{ Na}^+$

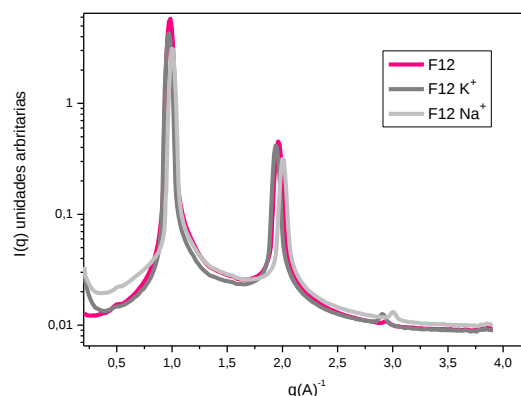


Figura 39 - Avaliação estrutural das formulações *F26*; *F26 K⁺* e *F26 Na⁺*

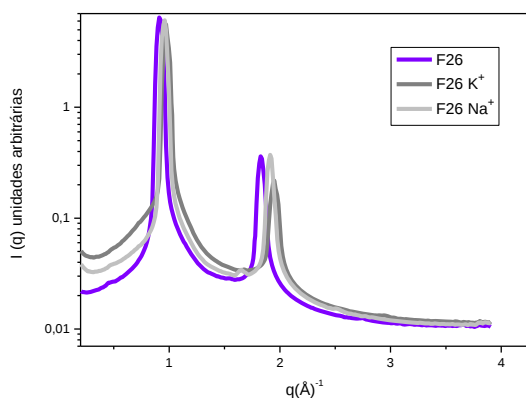
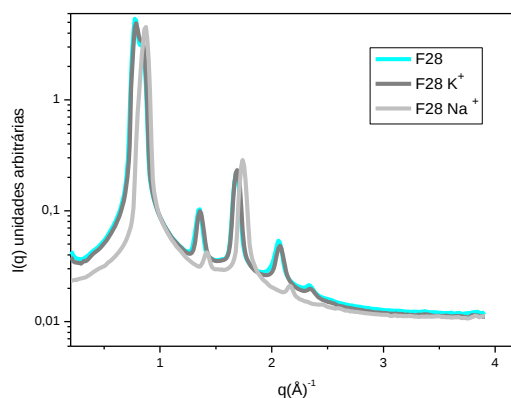


Figura 40 - Avaliação estrutural das formulações *F28*; *F28 K⁺* e *F28 Na⁺*



5.3.2 Medidas Reológicas

As figuras 41 a 44 representam através das curvas de fluxo o comportamento reológico e a viscosidade aparente das formulações em que foi incorporado 30 mg.g⁻¹ de DF Na⁺ e DF K⁺. As curvas de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento crescente, também estão representadas por símbolos preenchidos, os símbolos vazios correspondem às curvas medidas com taxas de cisalhamento decrescentes. Nota-se que a incorporação de ambos os fármacos nas formulações em estudo não provocou nenhuma alteração em relação ao comportamento reológico, mantendo as características de comportamento não newtoniano e fluido pseudoplástico, no entanto houve alteração em relação à viscosidade aparente.

A formulação *F5* quando incorporada com o DF Na⁺ e DF K⁺ apresentou em ambas as formulações uma diminuição na viscosidade e área de histerese, indicando um menor nível de organização do sistema (Figura 41), características que complementam as curvas de SAXS. A formulação *F26* embora mantivesse praticamente a mesma viscosidade aparente com a incorporação dos fármacos foi possível observar através das curvas ascendentes da *F26 K⁺* e *F26 Na⁺* um aumento na característica pseudoplástica da amostra.

Figura 41 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das formulações *F5*; *F5 K⁺* e *F5 Na⁺*; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

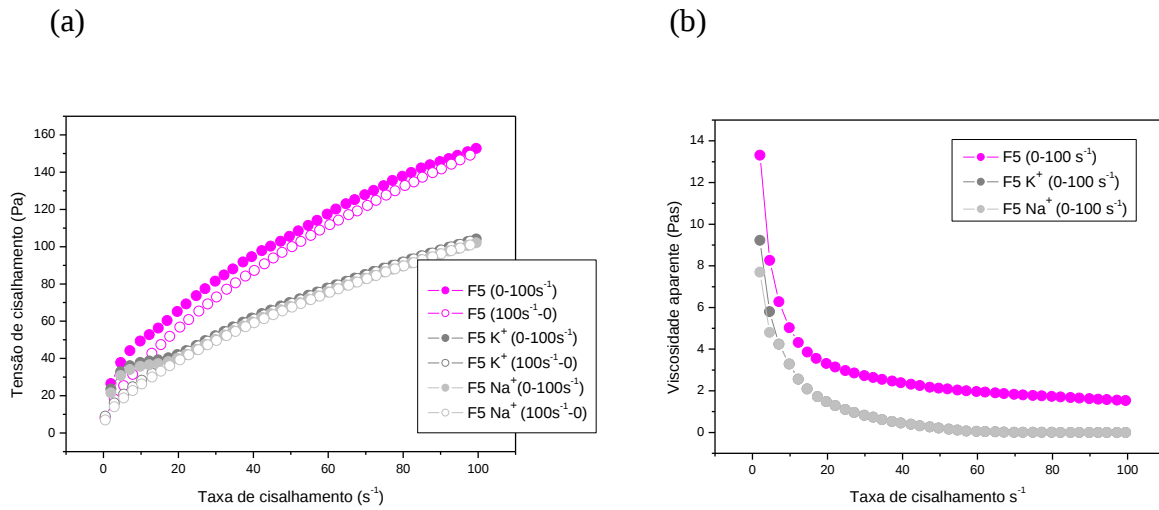


Figura 42 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das formulações *F12*; *F12 K⁺* e *F12 Na⁺*; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

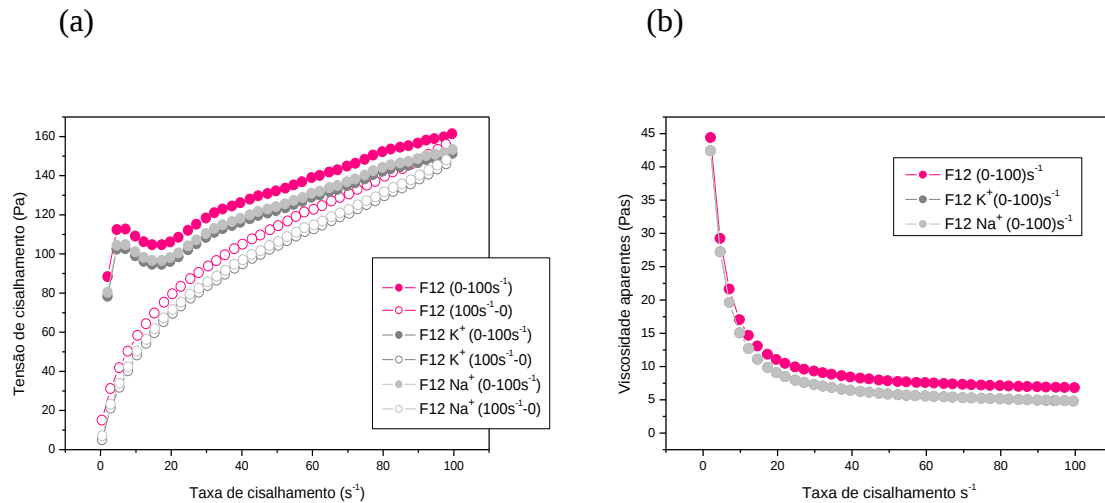


Figura 43 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das formulações *F26*; *F26 k⁺* e *F26 Na⁺*; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

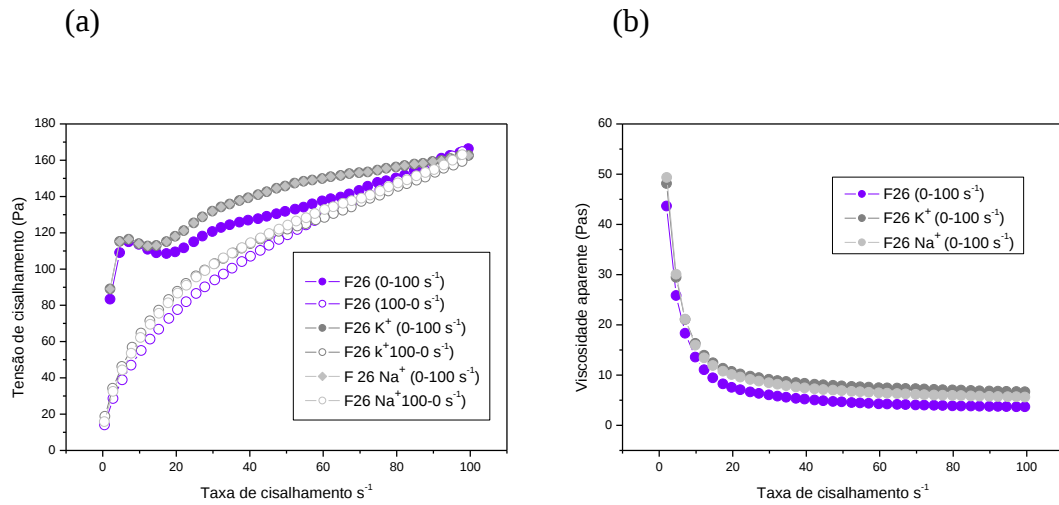
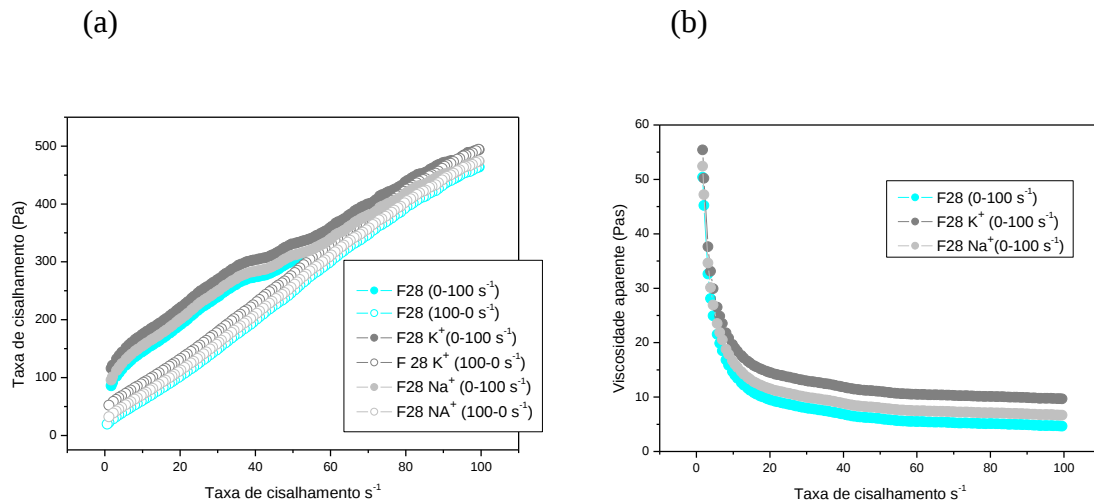


Figura 44 - (a) Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das formulações *F28*; *F28 k⁺* e *F28 Na⁺*; (b) viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento.

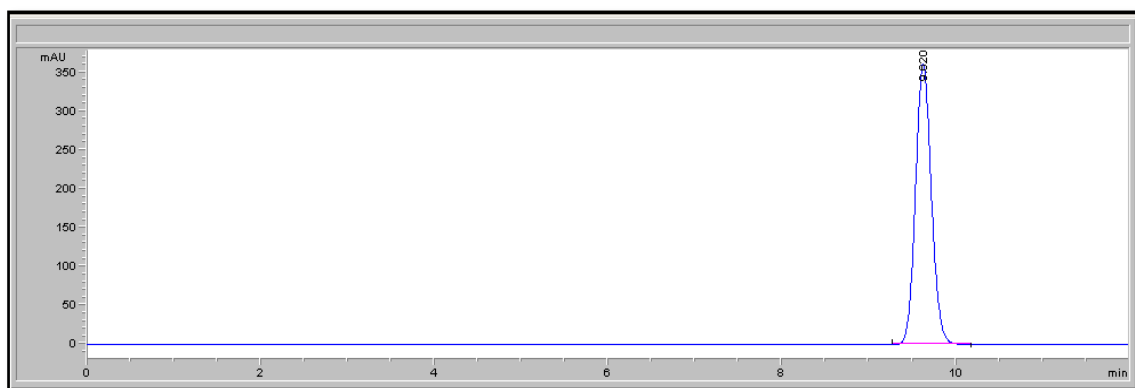


5.4 Validação de metodologia analítica para a determinação do DF Na⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A validação foi desenvolvida com o objetivo de se obter um método capaz de quantificar o DF Na⁺ nos ensaios de liberação “*in vitro*” e no teste de solubilidade nos componentes da formulação. O método validado apresentou linearidade na faixa de concentração utilizada, especificidade, precisão e exatidão. Os parâmetros de validação utilizados foram os estipulados pela ANVISA (2003).

A metodologia analítica utilizada inicialmente foi baseada no método descrito pela USP (2007), porém foram necessárias modificações relacionadas ao tipo de coluna e a fase móvel. O método descrito pela farmacopéia possui uma fase móvel constituída de 70% de metanol e 30 % de tampão fosfato pH 2,5. Com o intuito de preservar o sistema cromatográfico o tampão fosfato foi substituído por uma solução aquosa de Ácido trifluoroacético a 0,1% p/v (pH 2,5). A primeira injeção do fármaco foi feita a fim de se confirmar o tempo de retenção nessa nova condição cromatográfica, resultando em um tempo de 15 minutos, caracterizando uma análise muito longa, o que representa uma desvantagem durante a rotina no laboratório. Na tentativa de reduzir o tempo de retenção, aumentou-se a proporção do solvente orgânico para 75 %. Observando-se assim que à medida que aumenta a proporção do solvente orgânico há uma diminuição do tempo de retenção do fármaco. O cromatograma utilizado como referência (Figura 45) exibiu o pico do DF Na⁺ no tempo de retenção de 9,6 minutos.

Figura 45- Cromatograma de referência do DF Na⁺ (100 ug/mL) no tempo de retenção de 9,6 minutos.



Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da equação da regressão linear obtida pela média das três curvas analíticas. A Figura 46 demonstra que a curva analítica encontrada apresentou um resultado linear, pois o coeficiente de correlação encontrado foi de 0,99994. A Tabela 8 demonstra os resultados obtidos a partir da injeção das quatorze concentrações do DF Na⁺ a partir das três curvas em triplicata.

Figura 46 - Curva analítica do DF Na⁺ em fase móvel, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r^2).

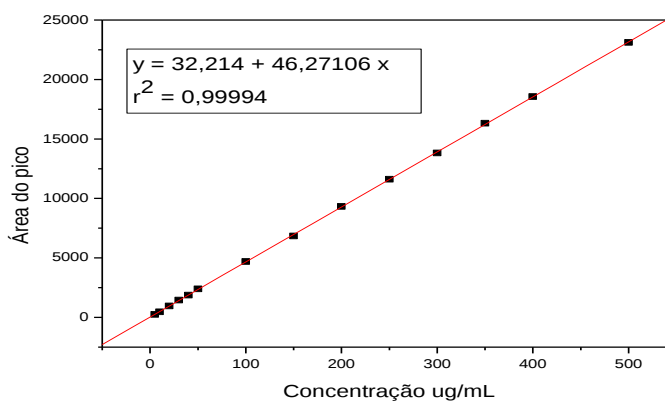


Tabela 8 – Dados da linearidade do método analítico para quantificação do DF Na⁺.

<i>DF Na⁺ (ug/mL)</i>	<i>Área média dos picos*</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV (%)**</i>
5	255,6	0,787401	0,30806
10	458,0178	6,105778	1,333087
20	951,8667	7,906457	0,830627
30	1454,8	8,606288	0,591579
40	1875,278	27,96274	1,491125
50	2394,844	18,83336	0,786413
100	4695,633	66,01977	1,405982
150	6844,533	34,69176	0,506854
200	9327,011	186,5657	2,000273
250	11610,29	348,0768	2,998002
300	13826,33	356,0743	2,575334
350	16319,11	296,3603	1,816032
400	18566,58	264,1683	1,422816
500	23117,83	228,8744	0,990034

* Média das 3 curvas em triplicata. ** CV- coeficiente de variação, calculado em função da média e desvio padrão das áreas obtidas.

Especificidade

A capacidade do método em quantificar o DF Na⁺ nos ensaios sem que os componentes das formulações interfiram, foi confirmada pela comparação dos cromatogramas ilustrados nas Figuras 47 a 50 com o cromatograma de referência (Figura 45). Observou-se que os placebos das quatro formulações não interferem na análise, uma vez que não se observa interferência com o tempo de retenção do DF Na⁺.

Figura 47 - Cromatograma referente à formulação PPG-5-Ceteth-20 e Ácido Oleico.

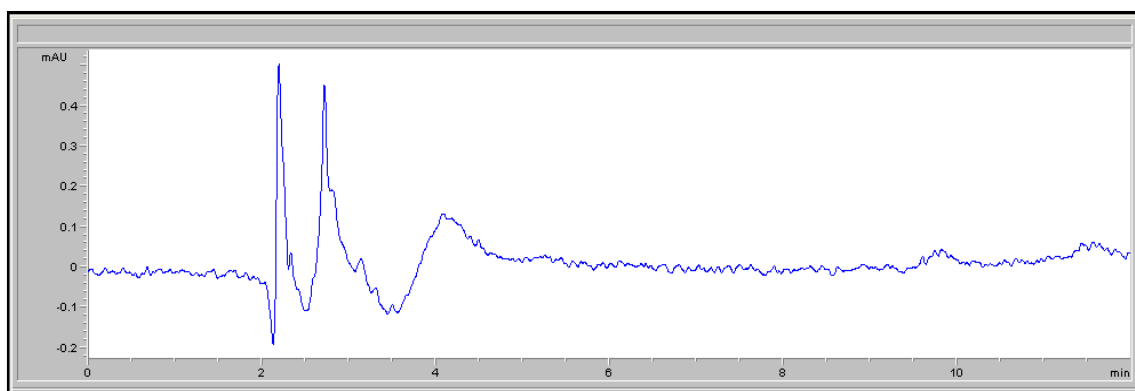


Figura 48 - Cromatograma referente à formulação PPG -5- Ceteth -20 e Miristato de Isopropila.

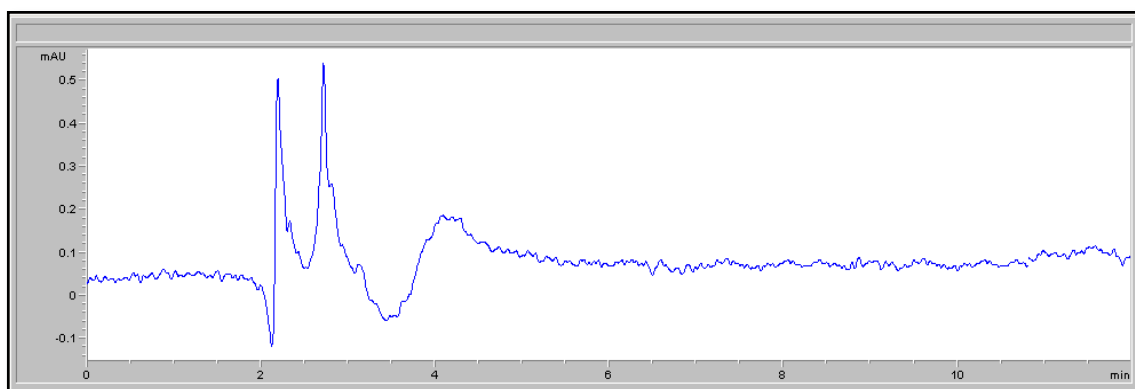


Figura 49 - Cromatograma referente à formulação Oleth 10 e Ácido Oleico.

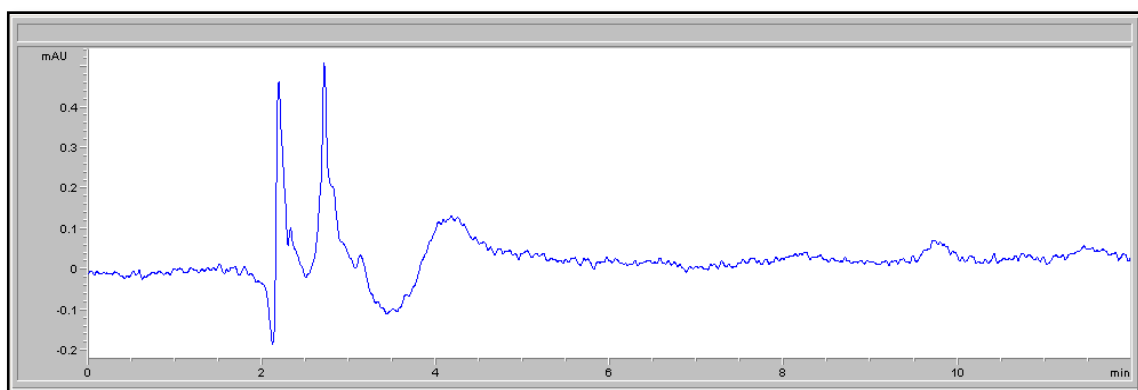
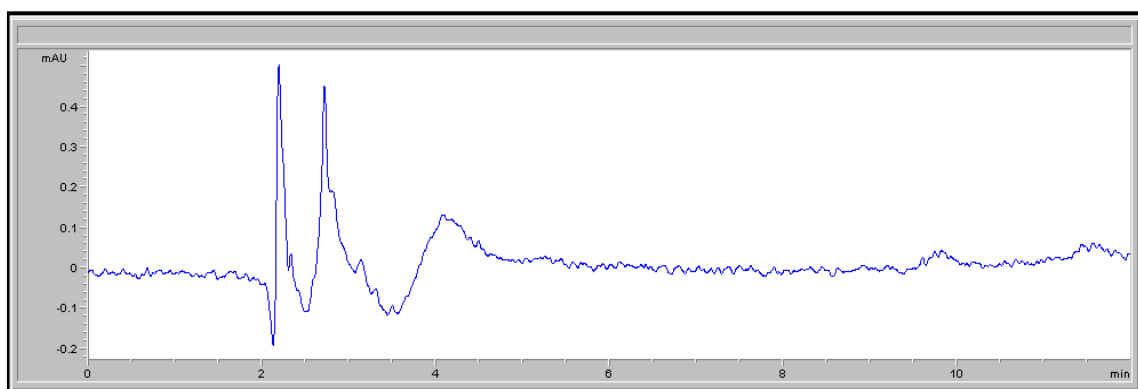


Figura 50 - Cromatograma referente à formulação Oleth 10 e Ácido Oleico.



Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em séries repetidas de análises, sob as mesmas condições experimentais. Os resultados para os dois níveis de precisão (intra-dia e inter-dia) mostraram CV menores de 5%, demonstrando assim que o método é preciso (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliação da precisão (intra-dia e inter-dia) do método analítico para quantificação do DF Na⁺.

	<i>Concentrações teóricas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Média das concentrações encontradas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV %</i>
<i>Intra-dia</i> *	10	9,046667	0,426363	4,712931
**	10	9,353333	0,289745	3,097774
*	200	195,9167	1,890645	0,965025
**	200	205,96	2,666771	1,294801
*	500	497,48	1,183334	0,237866
**	500	491,38	9,178395	1,867881
<i>Inter-dia</i> ***	10	9,106667	0,401031	4,403704
***	200	200,7067	0,316136	0,157512
***	500	493,9867	2,86586	0,58014

* Analisada através da curva analítica corrida no período da manhã.

** Analisada através da curva analítica corrida no período da tarde.

*** Analisada através da curva analítica corrida no dia seguinte.

Exatidão

A exatidão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro, sob as mesmas condições experimentais. O resultado expresso pelo o limite de recuperação foi em média de 91 - 98 %, demonstrando assim a exatidão do método (Tabela 10)

Tabela 10: Avaliação da exatidão do método analítico para quantificação do DF Na⁺.

<i>Concentrações teóricas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Média das concentrações encontradas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Recuperação %</i>
10	9,18	0,369973	91,8
200	194,8967	2,296915	97,44833
500	488,2467	5,817361	97,64933

Limite de detecção e Quantificação

O limite de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram obtidos através da três curvas analíticas, empregando-se os valores de desvio padrão e da inclinação da curva analítica, conforme demonstrados nas equações 2 e 3, respectivamente. O LD foi de 1,08 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o LQ foi de 3,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Curvas analíticas com solventes diferentes

Duas novas curvas analíticas foram construídas com solventes diferentes, uma vez que tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 e 10% de metanol (solução receptora) foi utilizado nos ensaios e liberação “*in vitro*” e o metanol no teste de solubilidade do DF Na⁺ nos componentes da s formulações. As curvas estão representadas nas Figuras 51 e 52.

Figura 51 - Curva analítica do DF Na⁺ em tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 e 10% de metanol, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r²).

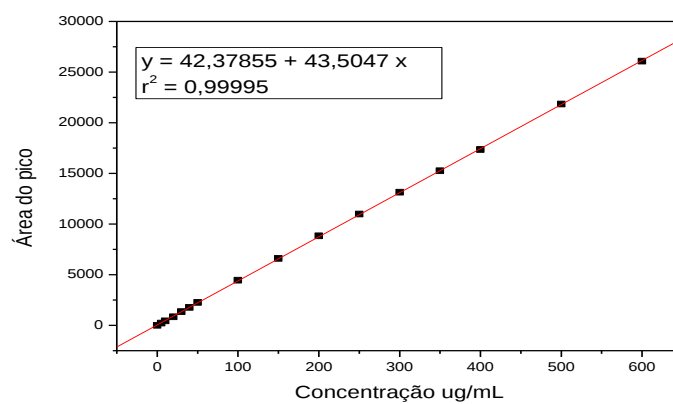
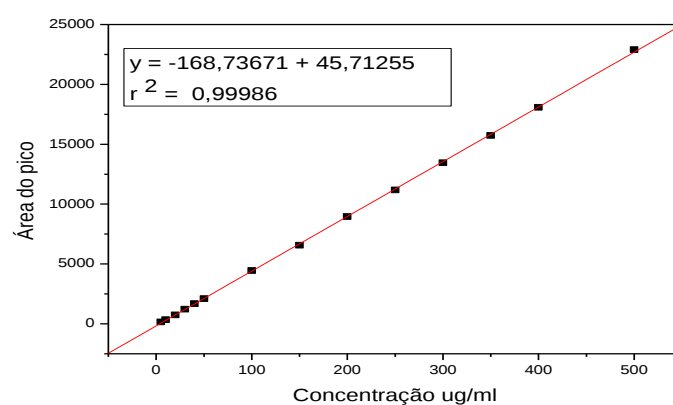


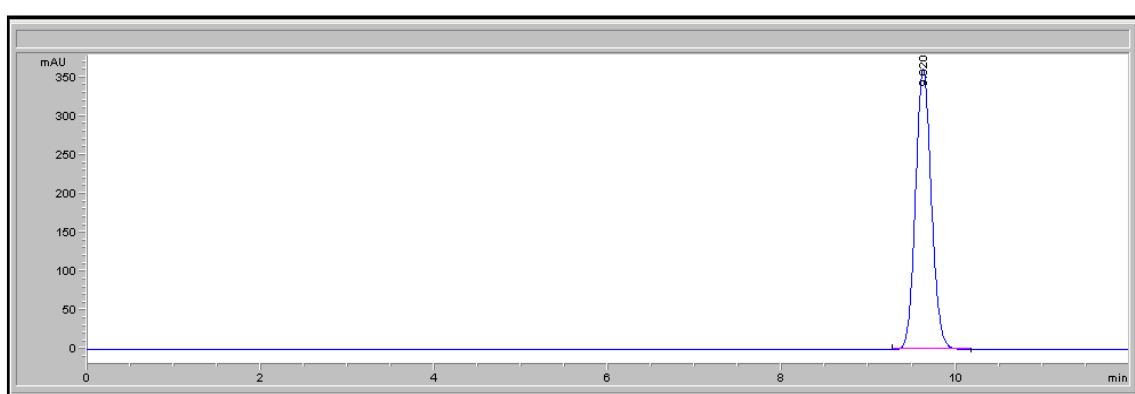
Figura 52 - Curva analítica do DF Na⁺ em metanol, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r²).



5.5 Desenvolvimento metodologia analítica para a quantificação do DF K⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O cromatograma utilizado como referência (Figura 53) exibiu o pico do DF K⁺ no mesmo tempo de retenção do DF Na⁺, que é de aproximadamente 9,6 minutos.

Figura 53 - Cromatograma de referência do DF K⁺ (100 ug/mL) no tempo de retenção de 9,6 minutos.

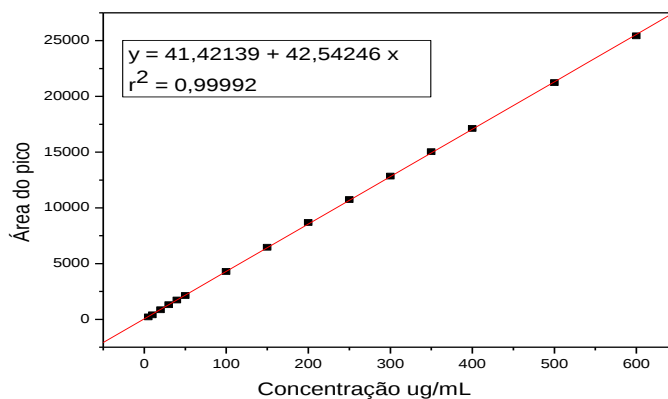


Curvas analíticas

Curva analítica em solução receptora

Com objetivo de quantificar o DF K⁺ nos ensaios de liberação “*in vitro*”, foi construída uma curva analítica em solução receptora (tampão fosfato 0,02 M e 10% metanol). A Figura 54 demonstra que a curva analítica encontrada apresentou um resultado linear, pois o coeficiente de correlação encontrado foi de 0,99992.

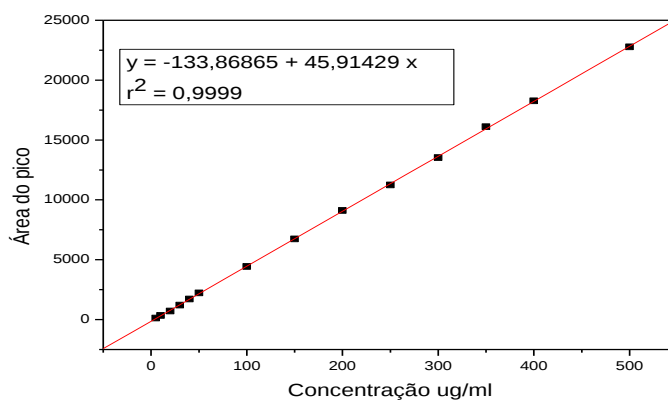
Figura 54 - Curva analítica do DF K⁺ em tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 e 10% de metanol, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r^2).



Curva analítica em metanol

Com objetivo de quantificar o DF K⁺ no teste de solubilidade nos componentes das formulações, foi construída uma curva analítica em metanol. A Figura 55 demonstra que a curva analítica encontrada apresentou um resultado linear, pois o coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9999.

Figura 55 - Curva analítica do DF K⁺ em metanol, equação da reta (y) coeficiente de correlação (r^2).

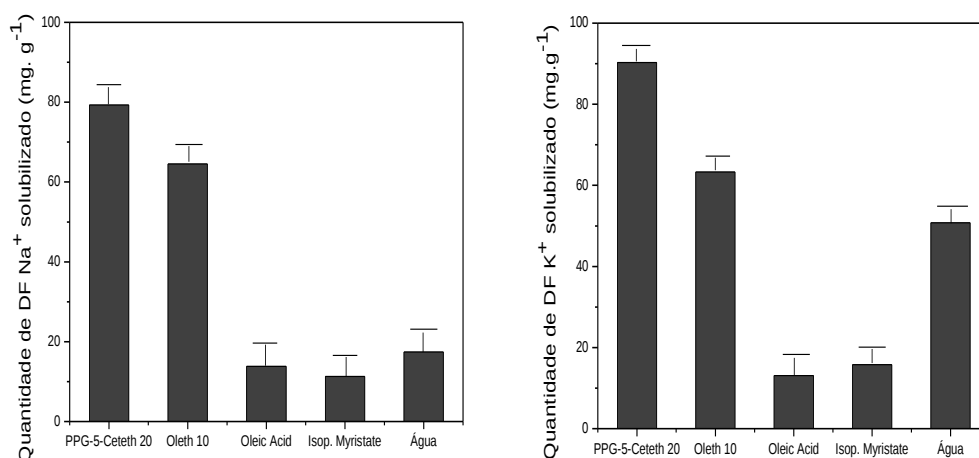


5.6 Avaliação da solubilidade do DF Na⁺ e DF K⁺ nos componentes das formulações

A relação dos fármacos com o processo de difusão e consequentemente com a liberação final dos mesmos para o meio receptor está não só relacionado com o tipo de arranjo, mas também com a composição dos sistemas, pois o processo de difusão de um fármaco depende da sua solubilidade nos domínios hidrofóbicos e/ou hidrofílicos que formam os arranjos.

Os resultados para o DF Na⁺ demonstram que ele é mais solúvel nos tensoativos, principalmente no PPG-5-Ceteth 20, cerca de 80% contra aproximadamente 65% no Oleth 10. Em relação à fase aquosa e oleosa dos sistemas, o DF Na⁺ revela-se mais solúvel na água (17,5%) do que no Ácido Oleico (13,8%) e Miristato de Isopropila (11,3%). Através dos resultados do DF K⁺ foi possível comprovar seu maior grau de solubilidade em água, tornando o DF K⁺ três vezes mais solúvel do que o DF Na⁺, característica que provavelmente influenciou na solubilização de mais de 90% no PPG-5-Ceteth-20, uma vez que este tensoativo possui um caráter mais hidrofílico. Já a solubilidade no Oleth 10 e no Ácido Oleico foi praticamente à mesma em relação ao DF Na⁺, no entanto foi maior para o Miristato de Isopropila (15,8%).

Figura 56 – Quantidade solubilizada do DF Na⁺ e DF K⁺ em mg.g⁻¹ ou % nos componentes das formulações.



5.7 Estudo da “*sink conditions*” para o DF Na⁺ e DF K⁺ nos ensaios de liberação “*in vitro*”

A seleção de um meio receptor adequado é um fator de extrema importância para o sucesso dos ensaios de liberação “*in vitro*” (SHAH et al., 1994). A composição do meio receptor deve sempre manter a condição “*sink*” do experimento à temperatura de 32 °C ± 0,5 °C e apresentar-se como uma solução tampão com pH fisiológico para fármacos hidrofílicos ou ainda em uma solução hidro-alcóolica para fármacos lipofílicos (PRAÇA, 2010). Baseando-se na solubilidade de 6 mg.g⁻¹ do DF Na⁺ em tampão fosfato pH 7,2 e 24 mg.g⁻¹ em metanol, encontradas pelos pesquisadores Zahedi e Lee (2007), optou-se por utilizar uma solução receptora hidro-alcóolica, na qual adicionou-se 10% de metanol ao tampão fosfato pH 7,2, afim de se garantir a “*sink conditions*” do experimento. A mesma solução receptora também foi utilizada para o DF K⁺.

Tabela 11 – Resultados da solubilidade do DF Na⁺ e DF K⁺ na solução receptora.

	Área média dos picos*	CV (%)**	Media da quantidade solubilizada em mg.g ⁻¹	Quantidade solubilizada em %
DF Na⁺	26011,5	0,990034	5,989	99,8%
DF K⁺	25439,2	0,987613	5,989	99,8%

* Média das 3 áreas em triplicata. ** CV- coeficiente de variação, calculado em função da média e desvio padrão das áreas obtidas.

Os resultados demonstram que o DF Na⁺ e DF K⁺ foram completamente solubilizados na solução receptora, garantindo assim as condições “*sink*” dos ensaios de liberação “*in vitro*”.

5.8 Ensaios de liberação “*in vitro*”

Os ensaios de liberação “*in vitro*” são de extrema importância para compreender a relação que existe entre as características estruturais dos sistemas com as propriedades físico-químicas dos fármacos, incluindo o processo de difusão dos mesmos através de sistemas líquido-cristalinos, com consequente liberação final para o meio receptor. Para isso a membrana utilizada não deve ser limitante, ou seja, não deve controlar o transporte dos fármacos (HELLEDI e SCHUBERT, 2001) e o meio receptor deve garantir as condições “*sink*” do meio. O processo global de liberação dos fármacos a partir dos arranjos líquido-cristalinos envolve duas constantes; a primeira que pode ser chamada de K_1 , a qual representa a difusão dos fármacos através do sistema para o meio externo dos sistemas e a segunda constante chamada de K_2 , que descreve a passagem dos fármacos pela membrana de celulose. O primeiro processo, o qual envolve a difusão através dos arranjos, depende da localização dos fármacos nos domínios hidrofóbicos e/ou hidrofílicos dos sistemas. Dependendo do tipo de arranjo, o formato destes domínios pode mudar e interferir no processo de difusão. A fase lamelar é formada por duplas camadas de tensoativos com os grupos hidrofílicos hidratados pela região aquosa e a parte hidrofóbica voltada à região oleosa, formando assim bicamadas anfifílicas, as quais estão separadas pelas camadas de água. Já a fase hexagonal, apresenta um centro lipofílico no formato de cilindro e rodeado por uma camada de grupos hidrofílicos hidratados (TYLE, 1989; FORMARIZ et al., 2005). A solubilidade dos fármacos nos componentes das formulações é de grande importância, pois assim pode-se prever sua localização e avaliar como será o processo de difusão.

Quando o processo de difusão dos fármacos do lado interno da membrana é menos intenso, gera-se um gradiente de concentração menor nos dois lados da membrana, proporcionando assim uma liberação menos intensa (PESTANHA, 2009), que consequentemente torna a passagem dos fármacos para o meio receptor mais lenta, apresentando assim uma liberação prolongada. A organização estrutural dos sistemas, assim como a viscosidade também são características que podem regular o processo de liberação “*in vitro*”.

Os dados das Figuras 57 e 58 mostram o efeito da variação dos fármacos no processo de liberação. Verifica-se que a liberação de ambos os fármacos não foi limitada pela membrana de celulose, pois a solubilização em propilenoglicol gerou uma rápida liberação

dos mesmos, acumulando-se no lado interno da membrana, criando-se assim um alto gradiente de concentração em relação ao lado externo, proporcionando a passagem mais rápida dos fármacos através da membrana. A escolha do propilenoglicol para esse teste baseou-se na capacidade que o mesmo tem em solubilizar os fármacos e por não apresentar em seu interior qualquer estrutura organizada.

Figura 57 - Perfil de liberação das formulações $F5 Na^+$, $F12 Na^+$, $F26 Na^+$ e $F28 Na^+$ e $DF Na^+$ solubilizado em propilenoglicol.

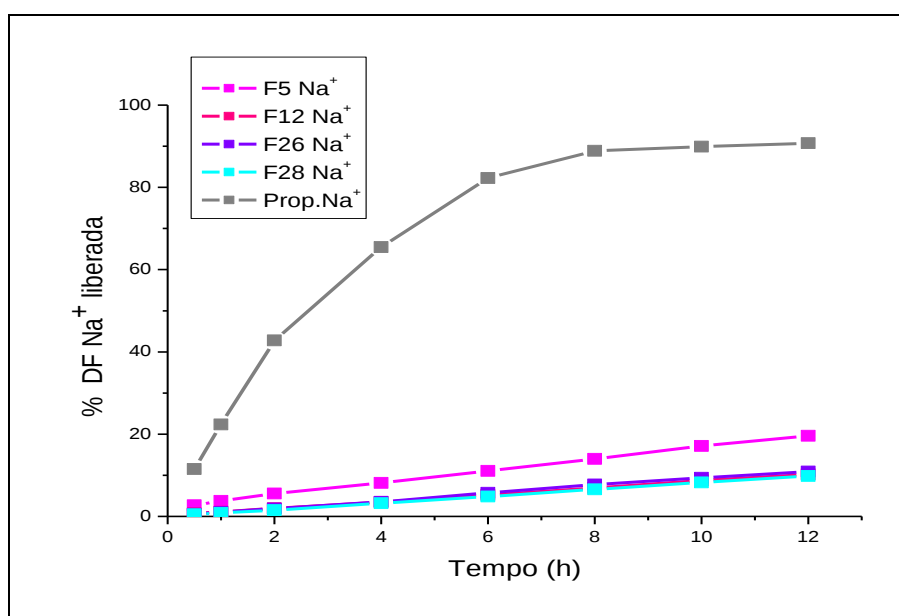
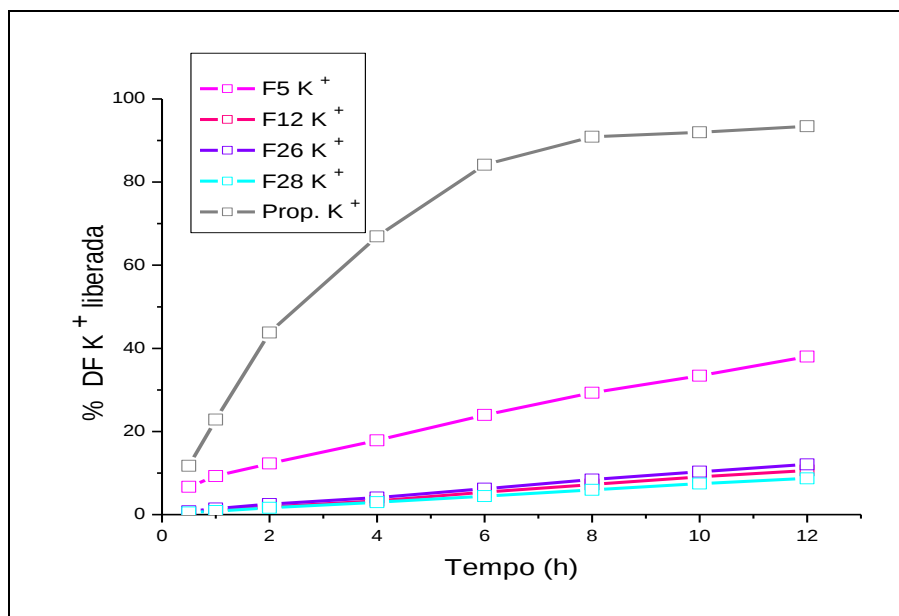


Figura 58 - Perfil de liberação das formulações $F5 K^+$, $F12 K^+$, $F26 K^+$ e $F28 K^+$ e $DF K^+$ solubilizado em propilenoglicol.



Com o propósito de se compreender a relação que existe entre a composição e o tipo de arranjo líquido cristalino com os perfis de liberação de fármacos com diferentes solubilidades, optou-se primeiramente por comparar arranjos lamelares com porcentagem fixa de tensoativo, fase oleosa e aquosa (60%, 10 e 30%, respectivamente), sendo as seguintes formulações selecionadas $F5$, $F12$ e $F26$. Além disso, para definir de forma mais aprofundada a relação entre os fármacos e o sistema, designou-se para tal comparação diferentes arranjos líquidos cristalinos, uma fase lamelar ($F26$) e outra hexagonal ($F28$). A liberação dos fármacos nas formulações chegou a ser de 3 a 6 vezes menor que a observada em propilenoglicol. Isso ocorre em função dos arranjos líquidos cristalinos possuírem estruturas ordenadas, que diminui a mobilidade das moléculas dos fármacos, devido à presença de interações intermoleculares entre os arranjos, tornado assim o processo de difusão mais lento.

A maior solubilidade dos fármacos encontrada nos tensoativos e na água em relação às fases oleosas indica a localização dos mesmos na interface tensoativo - água da bicamada lamelar ($F5$, $F12$ e $F26$); ou na interface tensoativo - água entre os cilindros do arranjo hexagonal ($F28$), proporcionado aos fármacos em ambos os arranjos uma difusão mais

lenta, demonstrando uma liberação prolongada. Para compreender a cinética de liberação dos fármacos três modelos matemáticos, foram aplicados aos resultados obtidos: zero ordem, (Q_{real} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em função do tempo), primeira ordem (logaritmo da porcentagem de fármaco em função do tempo) e Higuchi (Q_{real} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em função da raiz quadrada do tempo). A Tabela 12 mostra o coeficiente de correlação (r^2) calculado pelo ajuste de cada modelo matemático às curvas experimentais para as formulações selecionadas:

Tabela 12: Coeficiente de correlação (r^2) calculado pelo ajuste de cada modelo matemático: zero ordem, primeira ordem e Higuchi.

<i>Formulação</i>	<i>Zero ordem</i>	<i>Primeira ordem</i>	<i>Higuchi</i>
<i>F5 Na⁺</i>	0,9987	0,9228	0,9771
<i>F12 Na⁺</i>	0,9991	0,9025	0,9723
<i>F26 Na⁺</i>	0,9984	0,8896	0,9718
<i>F28 Na⁺</i>	0,9992	0,8945	0,9666
<i>F5 ^{+K}</i>	0,9941	0,9191	0,9881
<i>F12 K⁺</i>	0,9988	0,9013	0,9653
<i>F26 K⁺</i>	0,9991	0,8900	0,9718
<i>F28 K⁺</i>	0,9998	0,8898	0,9675

O modelo matemático que apresentou r^2 maior para todas as das formulações foi o de zero ordem. As Figuras 59 a 62 trazem os gráficos de cinética de liberação de zero ordem das formulações e seus respectivos r^2 .

O modelo matemático de zero ordem pode ser usado para descrever a liberação modificada de fármacos de várias formas farmacêuticas, como sistemas transdérmicos, formas revestidas, sistemas osmóticos, entre outros. As formas farmacêuticas que seguem essa cinética liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, o que é ideal para atingir ação farmacológica prolongada (COSTA e LOBO, 2000).

A análise estatística foi efetuada utilizando o software Origin 7. A avaliação dos dados foi feita através da análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey

($p < 0,05$). Sendo consideradas estatisticamente diferentes quando o valor de p foi menor que o nível de significância 0,05. Os resultados demonstram que a liberação do DF Na^+ nos sistemas lamelares não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), indicando que a alteração no tipo do tensoativo e da fase oleosa não provocou nenhuma modificação no processo de difusão do DF Na^+ . Os resultados da liberação do DF Na^+ na formulação $F26 \text{Na}^+$ de arranjo lamelar em comparação com a $F28 \text{Na}^+$ de arranjo hexagonal, também não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), indicando que a alteração do tipo de arranjo neste caso não provocou nenhuma modificação no processo de difusão do DF Na^+ .

Já as liberações para o DF K^+ demonstram uma diferença significativa entre a formulação $F5 \text{K}^+$ e as outras formulações ($F12 \text{K}^+$, $F26 \text{K}^+$ e $F28 \text{K}^+$), caracterizada pelo valor de p menor que o nível de significância 0,05. Esse resultado ocorre provavelmente devido a maior solubilidade do DF K^+ no PPG-5-Ceteth-20, favorecendo uma maior mobilidade à molécula do fármaco, a qual se difundiu com maior rapidez através da interface tensoativo – água, liberando assim uma maior quantidade do fármaco. A comparação entre os dois arranjos líquidos cristalinos (lamelar e hexagonal) para o DF K^+ também não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). As Tabelas 13 a 20 apresentam os resultados de liberação encontrados para as formulações selecionadas.

Tabela 13: Liberação da formulação $F5 \text{Na}^+$

<i>Tempo (h)</i>	<i>Q_{real} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>%</i>	<i>CV (%)</i> [*]
0,5	89,34	2,6803	5,7918
1	127,96	3,7347	3,5955
2	187,19	5,5508	2,8999
4	273,58	8,1439	2,7353
6	371,79	11,0588	2,8340
8	469,80	13,9682	1,2889
10	570,01	17,1211	1,8883
12	656,40	19,5712	2,3583

Tabela 14: Liberação da formulação $F12 Na^+$

<i>Tempo (h)</i>	<i>Q_{real} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>%</i>	<i>CV (%)</i> [*]
0,5	24,40	0,7198	9,1630
1	38,09	1,1235	3,1345
2	65,27	1,9701	5,5826
4	118,08	3,4566	4,3044
6	176,33	5,2017	4,0198
8	234,48	6,9172	2,9732
10	289,72	8,7433	2,2273
12	333,74	10,2209	2,3367

Tabela 15: Liberação da formulação $F26 Na^+$

<i>Tempo (h)</i>	<i>Q_{real} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>%</i>	<i>CV (%)</i> [*]
0,5	20,28	0,5983	7,2163
1	36,17	1,0669	3,9880
2	64,52	1,9033	4,6600
4	123,09	3,5488	4,3842
6	194,02	5,7236	5,9094
8	262,79	7,7524	6,0829
10	317,40	9,3632	3,6631
12	370,09	10,9177	4,7879

Tabela 16: Liberação da formulação $F28 Na^+$

<i>Tempo (h)</i>	<i>Q_{real} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>%</i>	<i>CV (%)</i> [*]
0,5	25,32	0,5169	6,6594
1	40,14	0,8159	4,3828
2	78,87	1,5317	1,6864
4	151,57	3,1802	3,5990
6	239,30	4,8057	4,8970
8	319,82	6,5459	2,4204
10	395,72	8,2696	2,0612
12	475,17	9,8182	1,9150

Tabela 17: Liberação formulação $F5 K^+$

<i>Tempo (h)</i>	<i>Q_{real} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>%</i>	<i>CV (%)</i> [*]
0,5	226,05	6,6684	4,3990
1	320,56	9,2439	6,9894
2	417,73	12,3231	4,2451
4	605,63	17,8661	1,6736
6	812,75	23,9761	3,4946
8	993,75	29,3157	1,9563
10	1132,16	33,3987	2,6375
12	1288,15	38,0003	1,5520

Tabela 18: Liberação da formulação *F12 K⁺*

<i>Tempo (h)</i>	<i>Q_{real} (μg/cm²)</i>	<i>%</i>	<i>CV (%)</i> [*]
0,5	20,82	0,6141	8,4670
1	35,09	1,0352	4,8430
2	63,43	1,8713	3,7816
4	114,30	3,297	2,8149
6	183,05	5,3998	2,4619
8	245,52	7,243	2,7072
10	308,72	9,1073	2,0511
12	358,83	10,5856	2,4561

Tabela 19: Liberação da formulação *F26 K⁺*

<i>Tempo (h)</i>	<i>Q_{real} (μg/cm²)</i>	<i>%</i>	<i>CV (%)</i> [*]
0,5	26,67	0,7868	7,7689
1	48,73	1,4375	11,2514
2	85,42	2,52	7,5395
4	141,89	4,0875	3,9692
6	212,06	6,2558	2,4472
8	286,10	8,44	2,4934
10	349,56	10,3119	2,3234
12	409,42	12,0779	2,2733

Tabela 20: Liberação da formulação $F28 K^+$

<i>Tempo (h)</i>	<i>Q_{real} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>%</i>	<i>CV (%)</i> *
0,5	16,99	0,5011	6,7612
1	29,30	0,8643	5,3562
2	55,98	1,6515	2,7429
4	103,39	2,9835	2,3770
6	150,28	4,4332	3,2171
8	201,95	5,9576	1,5249
10	253,29	7,4722	1,4949
12	303,86	8,7078	1,9971

* Observa-se que o CV do teste de liberação está dentro dos limites das especificações, ou seja, menores que 10%.

O interessante em se comparar o perfil de liberação das formulações $F5 Na^+$ e $F5 K^+$, está relacionado principalmente com o nível da organização estrutural desses sistemas. A incorporação de ambos os fármacos possivelmente promoveu uma diminuição na ordem dos arranjos, observados através das curvas de SAXS picos menos definidos em relação à formulação isenta dos mesmos e também pela menor viscosidade aparente identificada nos ensaios reológicos, estas características provavelmente facilitou a difusão das moléculas dos fármacos entre os arranjos, promovendo uma maior liberação dos mesmos. No entanto, foi possível notar que houve uma diferença significativa entre os perfis de liberação do DF Na^+ e DF K^+ nestas formulações, caracterizada pelo p valor ($p < 0,05$). Este efeito deve estar relacionado com a diferença encontrada na solubilidade dos fármacos, pois os resultados demonstram que o DF Na^+ é três vezes menos solúvel em água do que o DF K^+ e cerca de 10% menos solúvel no PPG-5-Ceteth-20, particularidades que provavelmente influenciaram o mecanismo de difusão, proporcionado ao DF K^+ uma maior mobilidade entre a interface tensoativo - água. Um dos poucos trabalhos que avalia a influência de tensoativos com diferentes graus de hidrofília na difusão e permeação de substâncias em sistemas líquido-cristalinos foi realizado por Brinon et al., 1998, que avaliou o efeito dos diferentes arranjos na difusão e permeação de duas substâncias fotoprotetoras, a Benzofenona-4 e o

Metoxicinamato de 2-etil-hexila, que apresentam características de solubilidade bem diferentes, a primeira sendo hidrossolúvel e a segunda lipossolúvel. Os resultados demonstraram que o coeficiente de difusão foi controlado principalmente pelo tipo de tensoativo, ou seja, sistemas formados pelo tensoativo mais lipofílico favoreceram uma difusão mais rápida do ativo lipofílico (Metoxicinamato de 2-etil-hexila), enquanto que sistemas formados pelo tensoativo mais hidrofílico favoreceu uma maior difusão do ativo hidrofílico (Benzofenona-4). O que reforça a diferença encontrada entre as liberações da formulação $F5 Na^+$ e $F5 K^+$ (Figura 59).

Já as liberações dos fármacos a partir das formulações em que houve uma mudança em relação à fase oleosa (Figura 60 e 61), não apresentou diferença significativa, representadas pelo valor de $p > 0,05$. Este efeito ocorreu devido os fármacos não apresentarem boa solubilidade nestes materiais graxos, não interferindo no processo de difusão, uma vez que os fármacos estão localizados na interface tensoativo – água.

As liberações dos fármacos nos arranjos hexagonais, também não apresentaram diferença significativa, representadas pelo o p valor maior que 0,05. No entanto, existe um estudo realizado Yariv et al., 2010, que avaliou o mecanismo de difusão e permeação “*in vitro*” de sistemas líquido-cristalinos incorporados com três derivados do diclofenaco (Na^+ , K^+ e DEA^+). O estudo avaliou a influência da característica cosmotrópica do sal Na^+ com a capacidade de melhor estruturar a água ao seu redor, facilitando a liberação do DF Na^+ pelo caminho aquoso. Ao contrário do sal K^+ e DEA^+ (caotrópicos), os quais possuem a capacidade de desestruturar a água ao seu redor, apresentando assim uma maior interação com a parte polar do tensoativo, característica que proporciona uma menor mobilidade as moléculas do DF, tornando o processo global de liberação e consequentemente a permeação “*in vitro*” mais sustentada. As diferenças encontradas no perfil de liberação do DF relacionados com as características cosmotrópicos e caotrópicos dos sais, só foram perceptíveis em sistemas ricos em água (fase cúbica e, estrutura intermediária entre a fase cúbica e lamelar) e praticamente indetectáveis em sistemas pobres em água (fase lamelar). Este efeito também pode ser visualizado nesse trabalho, evidenciando a possível influência do efeito cosmotrópico do sal Na^+ no arranjo hexagonal, o qual contém maior quantidade de água (50%) e um domínio hidrofílico mais estendido em relação à fase lamelar, favorecendo assim uma difusão mais rápida do DF Na^+ , ao contrário do DF K^+ que provavelmente teve uma maior interação com o tensoativo (Figura 62). Os resultados demonstram a influência de outras

propriedades, além da solubilidade, relacionadas com as moléculas dos fármacos nos processos de difusão e liberação através dos arranjos líquido-cristalinos.

As características cosmotrópicas e caotrópicas dos sais seguem a série de Hofmeister, esses sais possuem a capacidade de alterar a estrutura de água, ou seja, de modificar as ligações naturais da estrutura de água, sendo esse efeito similar ao aumento da temperatura ou da pressão (LI et al., 1998). Desta forma os sais alteram a formação natural das ligações de hidrogênio e as moléculas de água se ordenam de forma diferente ao redor de cada sal (STILINGER, 1980). Os sais capazes de organizar mais moléculas de água ao seu redor são chamados de cosmotrópicos, Já os sais caotrópicos são aqueles que têm a função de diminuir a estrutura da água ao seu redor. Segundo a escala de Hofmeister o sal Na^+ é considerado cosmotrópico e o sal K^+ caotrópico (LI et al., 1998).

Figura 59 - Perfil de liberação das formulações $F5 \text{Na}^+$ e $F5 \text{K}^+$.

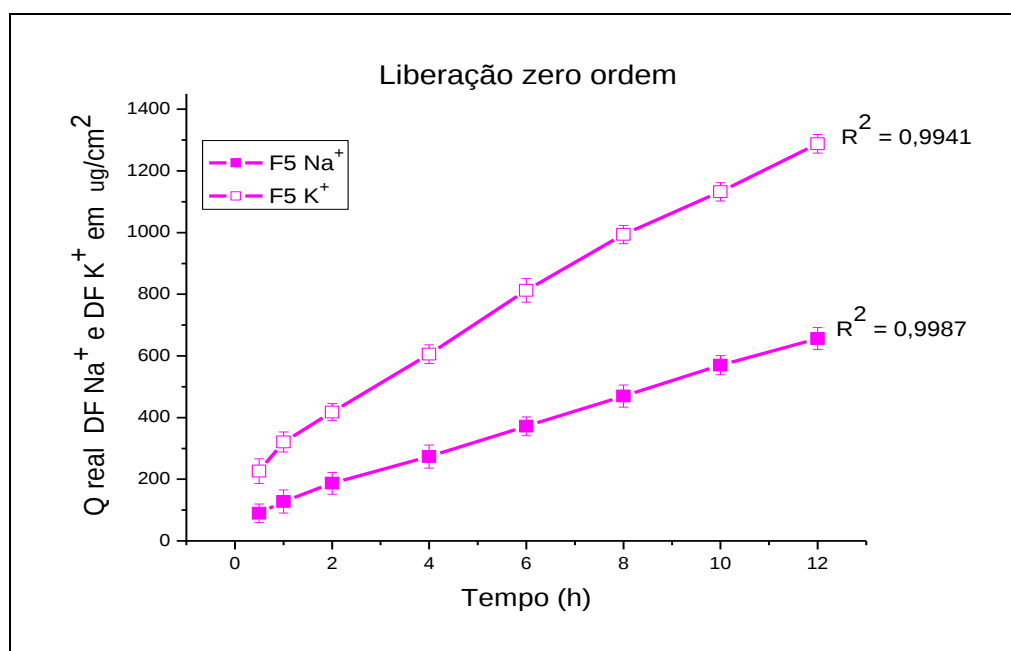


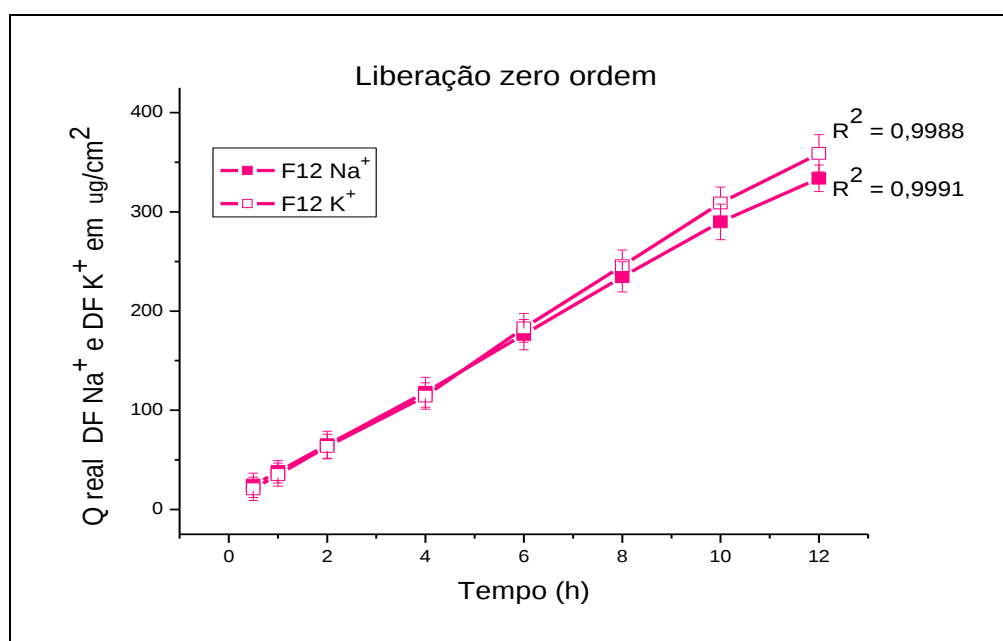
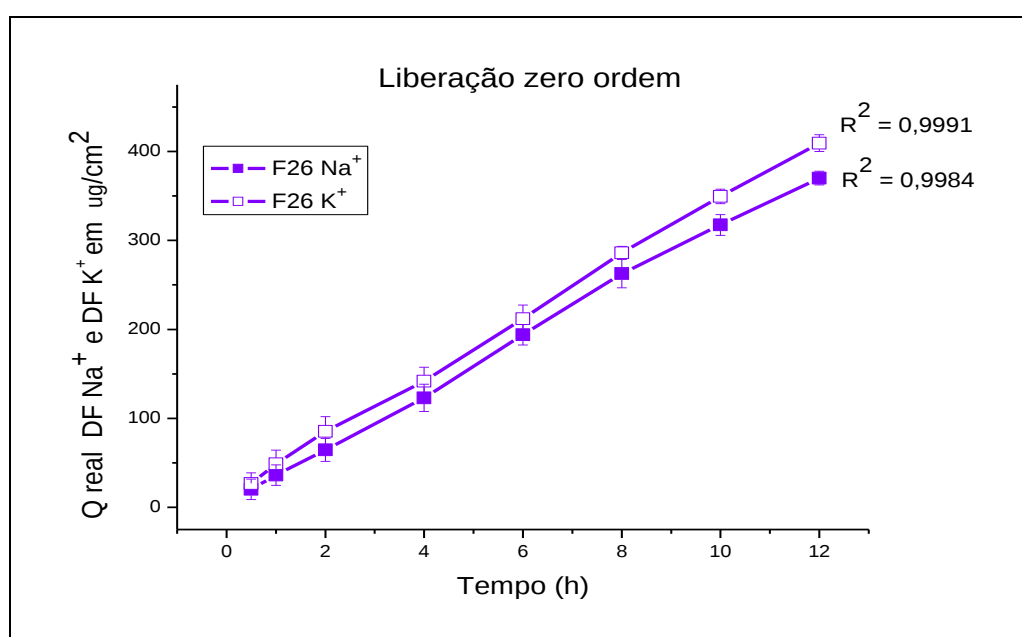
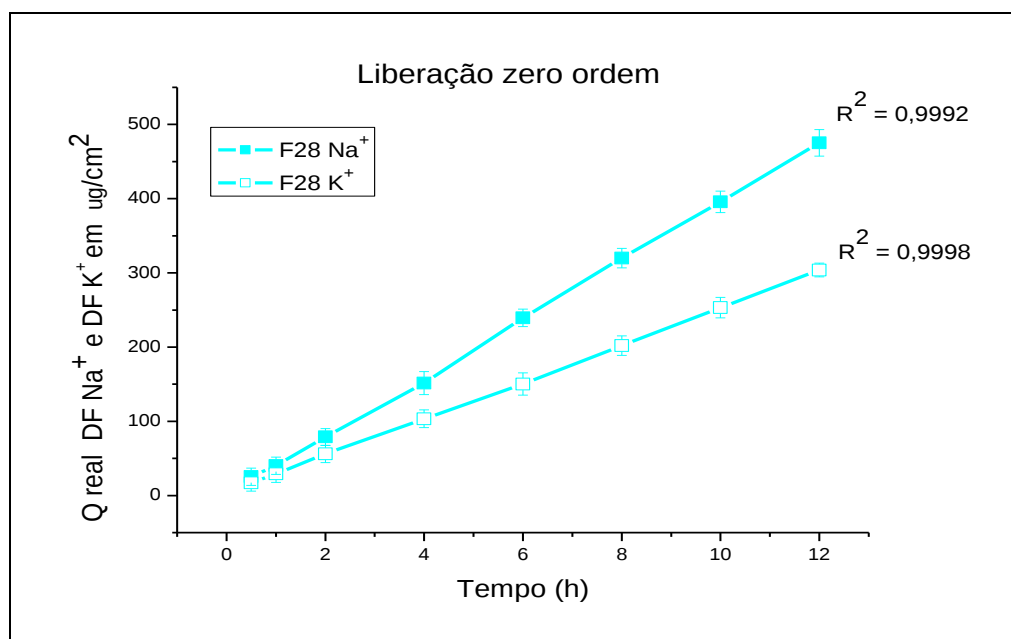
Figura 60 - Perfil de liberação das formulações $F12 Na^+$ e $F12 K^+$.**Figura 61** - Perfil de liberação das formulações $F26 Na^+$ e $F26 K^+$.

Figura 62 - Perfil de liberação das formulações $F28 Na^+$ e $F28 K^+$ 

Conclusões

6 Conclusões

Concluiu-se que através dos diagramas formados foi possível obter sistemas homogêneos com diferentes níveis de organização estrutural. Nos diagramas D_3 e D_4 observou-se a formação de uma maior região de estruturas transparentes e organizadas em relação aos diagramas D_1 e D_2 , essa diferença provavelmente ocorreu devido o Oleth 10 possuir uma maior capacidade em diminuir a tensão interfacial entre a água e fase oleosa. O Ácido Oleico em ambos os diagramas, possivelmente atuou como um co-tensoativo cooperando na diminuição da tensão interfacial, promovendo assim uma maior região de sistemas transparentes.

Através da caracterização físico-química das formulações por microscopia de luz polarizada foi possível visualizar a formação de sistemas isotrópicos e anisotrópicos, os quais foram confirmados pelas curvas de SAXS que permitiu não só a identificação das nanoestruturas, mas também uma avaliação mais aprofundada sobre o nível organizacional dos arranjos líquido-cristalinos em que se varia a proporção de fase aquosa, ou seja, o aumento de água proporcionou uma ampliação na ordem estrutural dos sistemas, podendo ser observado através do estreitamento dos picos, característica reforçada através das medidas reológicas, as quais também proporcionaram uma melhor definição sobre o comportamento desses sistemas.

Os resultados demonstraram a influência da composição e das características estruturais dos arranjos líquido-cristalinos nos perfis de difusão e liberação “*in vitro*” do DF Na^+ e DF K^+ , demonstrando que o processo global de liberação foi controlado principalmente pelo tipo de tensoativo, ou seja, sistemas formados pelo PPG-5-Ceteth-20 favoreceu uma difusão mais rápida do DF K^+ , característica relacionada com o grau de solubilidade do fármaco no tensoativo, proporcionando assim a sua molécula uma maior mobilidade entre a interface tensoativo – água. As características cosmotrópicas e caotrópicas do sal de Na^+ e do sal K^+ , revelaram a influência de outras propriedades, além da solubilidade, relacionadas com as moléculas dos fármacos nos processos de difusão e liberação através dos arranjos líquido-cristalinos com maior concentração de água.

Referências
Bibilogràficas

7 Referências Bibliográficas

ABRAHAM, M. H.; ACREE, W. E. Characterisation of the water - Miristato de Isopropila system. **Int J Pharm**, v. 294, p. 121 – 128, 2005.

ABRAMOWITZ, M.; PARRY-HILL, M. J.; DAVIDSON, M. Polarized light microscopy. The Florida State University and Olympus American Inc. Disponível em: <http://www.microscope.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index.html>. Acesso em: 05 nov. de 2012.

AGATONOVIC – KUSTRIN, S.; GLASS, B. D.; WISCH, M. H.; ALANY, G. G. Prediction of a stable microemulsion formulation for the oral delivery of a combination of antitubercular drugs using ann methodology. **Pharm Res**, v. 20, p. 1760 -1765, 2003.

AMSALEM, O.; ASERIN, A.; GARTI, N. Phospholipids-embedded fully dilutable liquid nanostructures. Part 2: The role of sodium diclofenac. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 81, p. 422– 429, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Disponível em: <http://www.anvisa.org.br>. Acesso em 20 out. 2012.

ATWOOD, D., FLORENCE, A.T. **Surfactant systems: Their chemistry, pharmacy and biology**. New York: Chapman and Hall, 1983. 794 p.

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

BEVAQUA, A. J.; LAMANAS, K. M.; COHEN, I. D.; CIOCA, G. Liquid crystal in multiple emulsions. **Cosm Toilet**, v.106, n.5, p.53-56, 1991.

BINNEMANS, K. Ionic liquid crystals. **Chem Rev**, v. 105, p. 4148 - 4204, 2005.

BOONME, P.; KRAUEL, K.; GRAF, A.; RADES, T.; JUYAPRASERT, V. B. Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of Palmitato de Isopropila/water/brij 97 : 1-butanol. **Aaps Pharmscitech**, v. 7, p. E1 – E6, 2006; 7(2).

BORGES, C.D.; VENDRUSCOLO, C.T.; MARTINS, A.L.; LOMBA, R.F.T. Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 19, n. 2, p. 160-165, 2009.

- BORNÉ, J.; NYLAMDER, T.; KHAN, A. Phase behaviour and aggregate formation for the aqueous monoolein system mixed with sodium oleate and Ácido Oleico. **Langmuir**, v.17, p.7742-7751, 2001.
- BOYD, B. J.; WHITTAKER, D. V.; KHOO, S – M.; DAVEY, G. Hexosomes formed from glycerate surfactants – Formulation as a colloidal carrier for irinotecan. **Int J Pharm**, v. 318, n.154-162, 2006.
- BRINON, L.; GEIGER, S.; VALÉRIE, A. DOUCET, J.; TRANCHANT, J. P.; COVARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J Control Rel**, v.60, p. 67-76, 1999.
- BRUNNER, M.; DEHGHANYAR, P., SEIGFRIED, B.; MARTIN, W.; MENKE, G.;MULLER, M. Favourable dermal penetration of diclofenac after administration to the skin using a novel spray gel formulation. **Br J Clin Pharmacol**, v. 60, p. 573-577, 2005.
- BRUNNER, M.; DEHGHANYAR, P., SEIGFRIED, B.; MARTIN, W.; MENKE, G.; MULLER, M. Favourable dermal penetration of diclofenac after administration to the skin using a novel spray gel formulation. **Br J Clin Pharmacol**, v. 60, p. 573 - 577, 2005.
- BURROWS, T.; COLLET, J. H.; ATTWOOD, D. The release of drugs from monoglyceride – water liquid crystalline phase. **Int J Pharm**, v. 111, p. 283-293, 1994.
- CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. **J Control Rel**, v. 141, p. 277–299, 2010.
- CHIAVACCI, L. A. **Formação de sóis e géis a partir de soluções aquosas de oxicloreto de zircônio: efeito da modificação por sulfato na termoreversibilidade da transição solgel.** Dissertação 1996 (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.
- CHORILLI, M. PRESTES, P. S.; RIGON, R. B.; LEONARDI, G. R.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V. Desenvolvimento de sistemas liquido - cristalinos de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Quim Nova**, v. 32, p. 1036-1040, 2009.
- CIOCA, G.; CALVO, L. Liquid crystal and cosmetic applications. **Cosm Toilet**, New York, v. 105, n. 5, p. 57-62, 1990.

- CONHEN-AVRAHAMI, M.; ASERIN, A.; GARTI, N. HII mesophase and peptide cell-penetrating enhancers for improved transdermal delivery of sodium diclofenac. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 77, p. 131 – 138, 2010.
- CONHEN-AVRAHAMI, M.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Penetratin-induced transdermal delivery from HII mesophases of sodium diclofenac. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 159, p. 419– 428, 2012.
- CORREA, M. A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI M. C.; OLIVEIRA A. G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic o/w microemulsions. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 43, p. 198 -114, 2005.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur J Pharm Sci**, v. 13, p. 123-133, 2001.
- CRAIEVICH, A. F. Synchrotron SAXS studies of nanostructured materials and colloidal solutions. A review. **Materials Research**, v. 5, p. 1-11, 2002.
- CRODA DO BRASIL. Folha de informações de segurança de produto químico – FISPQ. **Procetyl AWS**, 2002.
- DI SERIO, M. TESSER, R. SANTACESARIA, E. Comparison of Different Reactor Types Used in the Manufacture of Ethoxylated, Propoxylated Products. **Ind Eng Chem Res**, v. 44, p. 9482 - 9489, 2005.
- DONG, Y. D. ; BOYD, B. J. Applications of x-ray scattering in pharmaceutical science. **Int J Pharm**, v. 417, p. 101 - 111, 2011.
- DRUMMOND, C. J.; FONG, C. Surfactant self – assembly objects as novel drug delivery vehicles. **Curr Op Colloid Int Sci**, v. 4, p. 449-456, 2000.
- ESCRIBANO, E.; CALPENA, A. C.; QUERALT, J.; OBACH, R.; DOMENECH, J. Assessment of diclofenac permeation with diferente formulations antiinflammatory study of a selected formula. **Int J Pharm**, v. 19, n. 4 , p. 203-210, 2003.
- FEI, X. W.; LIU, L. Y.; XU, J. G.; ZHANG, Z. H.; MEI, Y. A. The non-steroidal anti-inflammatory drug, diclofenac, inhibits Na⁺ current in rat myoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, v.346, p. 1275-1283, 2006.

- FORMARIZ, T. P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorubicina**. Dissertação 2008 (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; A. A. SILVA-JUNIOR; GREMIÃO, M. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistema de liberação de fármacos. **Rev Bras Ciênc Farm**, v. 41, p. 301- 313, 2005.
- GARTI, N.; ASERIN, A. **Drug and the pharmaceutical science**; Banker, G. S.; Rhodes, C., eds.; Marcel Dekker: New York, 1996
- GARTI, N.; HOSHEN, G.; ASERIN, A. Lipolysis and structure controlled drug release from reversed hexagonal mesophase. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 94, p. 36– 43, 2012.
- GARTI, N.; YAGHMUR, A.; ASERIN, A.; SPERNATH, A.; ELFAKES, R.; EZRAHI, S. solubilization of active molecules in microemulsions for improved environmental protection. **Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects**, v.230, p. 183-190, 2004.
- GIAGOUDAKIS, G.; MARKANTONIS, S. L.; An alternative high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac and flubiprofen in plasma. **J Pharm Biomed Anal**. v. 1, p. 897 – 901, 1998.
- GLATTER, O. **Small-angle-X-rays scattering**. London: Academic Press, 1982.
- GUSTAFSSON, J.; LJUSBERG-WAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic aM pHiphilic polymer. **Langmuir**, v.13, p.6964-6971, 1997.
- HATZIANTONIOU, S.; RALLIS, S.; DEMETZOS, C.; PAPAIONNOU, G. T. Pharmacological activity of natural lipids on skin barrier disruption model. **Pharmacol Res**, v. 42, p. 55 – 59, 2000.
- HELLEDI, L.S., SCHUBERT, L. Release kinetics of acyclovir from a suspension of acyclovir incorporated in a cubic phase delivery system. **Drug Dev Ind Pharm**, v.27, p.1073-1081, 2001.
- HEYNEMAN, C.A.; LAWLESS-LIDAY, C.; WALL, G.C. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. **Drugs**, v. 60, p. 555 - 574, 2000.

- HEYNEMAN, C.A.; LAWLESS-LIDAY, C.; WALL, G.C. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. **Drugs**, v. 60, p. 555 - 574, 2000.
- HYDE, S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In. HOLMERBERG, K. (Ed.) **Handbook of applied surface and colloid chemistry**. New York: John Wiley and Sons, p. 299-332, 2001.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: methodology, 1996, p. 1-8.
- ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular and surface forces**; 2nd ed., Academic Press: London, 1992.
- KLEIN, K. Liquid crystal and emulsions: a wonderful marriage. **Cosm Toilet**, New York, v. 117, n. 1, p. 30-34, 2002.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 54, n.1, p.77-98, 2002.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsions-based Media as Novel Drug Delivery Systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 45, p. 89-114, 2000.
- LEE, C. H.; MOTURI, V. LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **J Control Rel**, v. 136, p. 88-98, 2009.
- LI, C. X.; PARK, B.; KIM, J. S.; LEE, H. A new generalized model for predicting the density of single – and mixe – electrolyte solutions. **Fluid Phase Equil**, v 145, p. 1 -14, 1998.
- LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 356, p. 375– 386, 2011.
- LOPEZ, A.; LLINARES, F.; CORTELL, C. HERRAEZ, M. Comparative enhancer effects of Span®20 with Tween®20 and Azone® on the “in vitro” percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities. **Int J Pharm**, v. 202, p. 133-140, 2000.
- MAKAI, M. CSÀNYI, E.; NÉMETH, Z. S.; PÀLINKÀS, J.; EROS, I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **Int J Pharm**, v. 256, p. 95 – 107, 2003.
- MALMSTEN, M. Surfactants and polymers in drug delivery. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**. New York: Marcel Dekker, 348 p., 2002.

- MARTINDALE, The complete drug reference. 35th.ed. London: Pharmaceutical Press, 2007. v.1.
- MEWIS, J.; WAGNER, N. J. Thixotropy. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 147 – 148, p. 214 – 227, 2008.
- MORENO, M. A.; BALLESTEROS, M. P. FRUTOS, P. Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: Pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies. **J Pharm Sci**, v. 92, p. 1428 – 1437, 2003.
- MULLER, C. P.; HASS, S. E.; BASSINI, V. I.; GUTERRES, S. S. Degradação e Estabilização do Diclofenaco em nanocapsulas poliméricas. **Quim Nova**, v. 27, p. 555 - 560, 2004
- MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 58, p. 343–356, 2004.
- NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: Ed.Universidade de Caxias do Sul, 1997. p. 9-73.
- NEGRINI, R.; MEZZENGA, R. PH-responsive lyotropic liquid crystals for controlled drug delivery. **Langmuir**, v. 27, p. 5296 – 5303, 2011.
- NÉMETH, Z. S.; HALÁSZ, L. PÁLINKÁS, J.; BÓTA, A. HÓRANYI, T. Rheological behavior of a lamellar liquid crystalline surfactant–water system. **Colloid Surf**, v. 145, p. 107 –119, 1998.
- NETO, E. T.; MALTA, M. M. SANTOS R. G. Surface tension measurement by drop counting method: Method description and experiments with etoxilated non-ionic surfactants. **Quim Nova**, v. 32, p. 223 -227, 2009.
- NIELSEN, J. A. In: BARUCHEL, J.; HODEAN, J.L.; LECHMAN, M.S.; REGNARD, J.R.; SCHLENKER, C. **Diffraction, refraction and absortion of X-rays and neutrons: a comparative exposition**. Paris: Spring Verlag, 1993, p.3-21.
- OLIVEIRA A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsions: Structure and application as drug delivery systems. **Quim Nova**, v. 27, p. 131-138, 2004.

- OTTO, A.; PLESSIS DU J.; WIECHER, J. W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. **Int J Cosmet Sci**, v. 31, p. 1-19, 2009.
- PAGLIARA, A., REIST, M., GEINOZ, S., CARRUPT, P.A., TESTA, B. Evaluation and prediction of drug permeation. **J Pharm Pharmacol**, v. 51, n. 12, p. 1339-1357, 1999.
- PESTANHA, K. C. **Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral. Estudo estrutural, liberação “in vitro” e farmacocinética pré clínica**. Dissertação 2009 (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- PODLOGAR, F.; ROGAC, M. B.; GAGPERLIN, M. The effect of internal structure of selected water-tween 40 (r)-imwitor 308 (r)-ipm microemulsions on ketoprofene release. **Int J Pharm**, v. 302, p. 68 – 77, 2005.
- PRAÇA, F. S. G. **Liberação e permeação “in vitro” de produtos transdérmicos em estudo metodológico de aparatos e condições experimentais** 2010. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 518 p., 1990.
- PROSSER, A. J.; FRANCES, E. I. Adsorption and surface tension of ionic surfactants at the air-water interface: review and evaluation of equilibrium models. **Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects**, v. 178, p. 1- 40, 2001.
- REINER V; REINER A; REINER G; CONTI M. Increased absorption rate of diclofenac from fast acting formulations containing its potassium salt. **Arzneimittel – Forschung – Drug Research**, 2001, v. 51, p. 885-890, 2001.
- ROBERTS, L. J.; MORROW, J. D. Analgésico-antipiréticos, agentes anti-inflamatórios e fármacos utilizados no tratamento de gota. In: GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 517 - 550.
- SCHRAMM, G. **Reologia e reômetria**: fundamentos teóricos e práticos. São Paulo: Artliber, 2006.

- SCOTT, H. Reology. In: Remington (Ed). **The science and practice of pharmacy**. 20nd ed. Philadelphia: Editora Lippincott, 2000, cap.23, p.335 - 355.
- SHAH, J.C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv Drug Del**, v. 47, p.229-250, 2001.
- SHAH, V. P.; ELKINS, J. S.; WILLIAMS, R. L. Evalution of the test system used “*in vitro*” release of drugs from topical dermatological drug products. **Pharm Develop Technol**, p. 377 – 385, 1994.
- SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. cap. 9.
- SIDDIG, M. A.; RADIMAN, S.; JAN, L. S.; MUNIANDY, S. V. Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucopone (APG) surfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects**, v. 276, p. 15-21, 2006.
- SIGMA ALDRICH. Folha de informações de segurança de produto químico –FISPQ. **Brij O 10**.
- SINGH, S. Phase transitions in liquid crystal. **Phys Rep**, Amsterdam, v.324, p. 107-269, 2000.
- SOCHI, T. Non-Newtonian flow in porous media. **Polymer**, v. 51, p. 5007- 5023, 2010.
- STAHL, P. H. Preparation of Water-Soluble Compounds through Salt Formation. In: WERMUTH, C. G. **Practice of Medicinal Chemistry**, 2^a Ed. Illkirch: Academic Press, 2003 p. 601–615.
- STILINGER, F. H. Water Revisited. **Science**, v. 209, p. 451-457, 1980.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (USP 30), NF 25 – The National Formulary. Rockville, MD, USA, 2007.
- TIDDY, G. J. T. Surfactant – water liquid crystal phases. **Phys Rep**, North – Holland, v. 57, n. 1, p. 1-46, 1980.
- TODD, P.A; SORKIN, E.M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, v.35, p. 244 - 285, 1988.
- TYLE, P. Liquid crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF,M. **Controlled of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: VCH publishes, p. 125-162, 1989.

- VALENTA, C.; SCHULTZ, K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. **J Control Rel**, v. 95, p. 257 – 265, 2004.
- WANG, Z.; DIAO, Z.; LIU, F.; LI, G.; ZHANG, G. Microstructure and rheological properties of liquid crystallines formed in brij 97/water/ipm system. **J Colloid Interface Sci**, v. 297, p. 813 – 818, 2006.
- WOOD, J. H. Reologia Farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 2001.
- WOOD, J.H. Reologia Farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIBERMAN, H.; KANIG, L.J.(Ed). **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, v.1, cap.6, p.210 - 253.
- YAJIMA, H.; YAMAO, J.; FUKUI, H.; TAKAKURA, Y. Up-to-date information on gastric mucosal lesions from long-term NSAID therapy in orthopedic outpatients: study using logistic regression analysis. **J Orthop Sci**, v.12, p. 341-346, 2007.
- YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. “in vitro” permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 78, p. 185 – 192, 2010.
- ZAHEDI, P.; LEE P. L. Solid molecular dispersions of poorly water-soluble drugs in poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **Eur J Pharm Biopharm**, v.65, p.320 – 328, 2007.