UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS ESTABILIZADOS COM ÁLCOOL CETILICO ETOXILADO E PROPOXILADO CONTENDO FLUCONAZOL POTENCIALMENTE ATIVO CONTRA ESPOROTRICOSE

TRAUDI KLEIN

Orientadora: Profª. Drª. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS ESTABILIZADOS COM ÁLCOOL CETILICO ETOXILADO E PROPOXILADO CONTENDO FLUCONAZOL POTENCIALMENTE ATIVO CONTRA ESPOROTRICOSE

TRAUDI KLEIN

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

ORIENTADORA: Profª. Drª. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA

2007

TRAUDI KLEIN

Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetilico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose

_____

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de dissertação de mestrado, em sessão pública realizada em 25/07/07, considera a candidata:

( ) REPROVADA (X) APROVADA

1) Examinador (Marcos Luciano Bruschi)_____

2) Examinador (Leila Aparecida Chiavacci)_____

3) Examinador (Maria Palmira Daflon Gremião)_____

Araraquara, 25 de julho de 2007.

Dedico este trabalho aos meus pais José e Marlise

Pai, mãe!

Vocês foram, durante todos esses anos de minha existência, meus maiores incentivadores...

Mesmo nos momentos difíceis não deixaram que eu desistisse dos meus sonhos... Todo apoio que vocês me deram espero poder um dia retribuir!

Sou muito grata pela vida que tenho e quero demonstrar o meu carinho com estas poucas palavras!!!

Obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela família, pelos amigos. Sou muito feliz e privilegiada por ter pessoas tão especiais em minha volta.

Aos meus pais, José e Marlise, pelas pessoas que são, pelo apoio durante toda a minha vida. Obrigada por tudo! Espero poder retribuir, pelo menos um pouco, tudo que fizeram por mim.

Ao meu irmão Dante, minha cunhada Ivonete, meu sobrinho Bruno. Com certeza minha vida não seria a mesma sem a presença de vocês.

À minha orientadora, Profª Palmira, pelos conhecimentos transmitidos e paciência durante o curso. Sempre lembrarei de seu exemplo de profissionalismo.

Aos professores da Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Profº Marcos e a Profª Selma, que, durante minha graduação, foram tão importantes na minha formação.

À Prof. Dra Leila Chiavacci, pela imensa colaboração nos estudos de SAXS e ao Dr. Victor Hugo Sarmento do Instituto de Química – UNESP, pela colaboração nos ensaios de reologia.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) – Campinas.

Aos professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas , UNESP, pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas oferecidas e ajuda na discussão de resultados experimentais.

À minha banca de qualificação: Beatriz Stringhetti Ferreira Cury e Victor Hugo Vitorino Sarmento, por terem ajudado a melhorar este trabalho com suas discussões.

À minha banca de defesa: Marcos Luciano Bruschi e Leila Aparecida Chiavacci, pelas discussões e sugestões.

Aos colegas de laboratório, Maria Carolina, Karen, Daniele, Rubiana, Gustavo, Priscileila, Ana Luiza, Arnóbio, Luana, Cristina, Daniela, Andréa, Fabrício, Flávia, Gisele, Nelson, pelos momentos de descontração, pela força nos momentos difíceis, pelo tempo gasto tentando entender o que estava acontecendo com os equipamentos, com os experimentos...

Às minhas colegas de república de Araraquara, Gabi, Alianda, Priscila, Mariana, e à minha colega de república de Maringá, Raquel, pela amizade, companhia, pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos e amigas de Maringá, pelos momentos de lazer nos finais de semana e pelo companheirismo.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, pela ajuda e paciência na resolução de problemas durante o curso.

À CAPES pelo apoio financeiro

"Quando alguém encontra seu caminho, precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada." Brida (Paulo Coelho).

RESUMO

A introdução de novos fármacos na terapêutica tem se tornado um processo muito oneroso. Para contornar estes altos custos pode-se recorrer à estratégia de desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para liberação dos fármacos que permitem o aumento da eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual, a reintrodução de outros anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos fármacos antes que sejam utilizados na terapêutica. A esporotricose é uma micose subcutânea causada pelo fungo *Sporothrix schenckii*. Há poucos casos de tratamento da esporotricose com fluconazol porque ele é menos efetivo e apenas é recomendado quando o itraconazol não é tolerado, o que é uma controvérsia, já que este fármaco foi desenvolvido como um promissor antifúngico de amplo espectro de ação e ótimo perfil de segurança, além de causar poucas reações adversas ao paciente. Portanto, torna-se interessante buscar novas alternativas tecnológicas para o uso do fluconazol no tratamento da esporotricose que aumentem a eficiência deste fármaco na terapia antifúngica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados constituídos de ácido oléico, álcool cetílico etoxilado 20OE e propoxilado 5OP e água contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose. Inicialmente foi construído um diagrama ternário do sistema e as formulações de interesse foram caracterizadas por índice de refração, condutividade eletrolítica, reologia, SAXS e microscopia de luz polarizada. A solubilidade do fluconazol nos constituintes do sistema e nas formulações de interesse foi analisada. Para avaliar o mecanismo de absorção intestinal do fármaco a partir das formulações utilizamos o modelo do saco intestinal invertido. Também realizamos o estudo da influência dos sais biliares na estrutura do sistema. O diagrama ternário do sistema demonstrou que a mistura direta dos constituintes do sistema em diferentes proporções possibilitou a obtenção de formulações com estruturas variadas. Analisando as curvas de SAXS e o comportamento reológico, pode-se dividir as formulações em dois grupos. No primeiro, as formulações comportam-se como líquidos Newtonianos de comportamento de fase micelar. No outro grupo as formulações comportam-se como líquidos pseudoplásticos de comportamento de fase lamelar. Entretanto, a estrutura deste último grupo não foi confirmada pela microscopia de luz polarizada, que demonstrou um campo escuro para todas as formulações, característica de sistemas micelares. A solubilidade do fluconazol nas formulações de interesse foi de cerca de 3%, suficiente para a veiculação de doses de fármaco na terapia da esporotricose, enquanto que a solubilidade do mesmo em água é de cerca de 0,5%. O ensaio de absorção do fármaco pelo saco intestinal invertido demonstra que as formulações aumentam de 4 a 5 vezes o transporte do fluconazol pela membrana intestinal em comparação com a solução aquosa. Os resultados indicam a capacidade de este tipo de sistema atuar como sistemas de liberação de fármacos, aumentando a biodisponibilidade de muitos fármacos.

Palavras-chave: microemulsão, fluconazol, esporotricose, saco intestinal invertido, reologia, espalhamento de raios-X a baixo ângulo.

ABSTRACT

The introduction of new drugs in the therapy has become a very onerous process. To skirt these high costs may be appealed to the strategy of development of nanoestructured drug delivery systems that allow the increase of the efficiency of drugs used in the therapy, the reintroduction of previously discarded others for its undesirable properties and the improvement of new drugs before they are used in the therapy. Sporotricosis is a subcutaneous mycose caused by the fungus *Sporothrix schenckii.* There are few cases of sporotricosis treatment with fluconazole because it is less effective and he is just recommended when itraconazole is not tolerated. This is a controversy, since this drug was developed as a promising antifungal of large spectrum of action and excellent profile of security, causing few adverse reactions to the patient. Therefore, it is very interesting to search new technological alternatives for the fluconazole use in the treatment of sporotricosis, increasing the efficiency of this drug in the therapy. The aim of this work was to develop and characterize nanoestructured systems consisting of oleic acid, 20OE etoxiled and 5OP propoxiled cetilic alcohol and water for the incorporation of fluconazole and oral administration for treatment of sporotrichosis. To develop the formulations, a ternary diagram of the system was constructed and the interest formulations were characterized as refractive index, electrolytic conductivity, rheology, SAXS and polarized light microscopy. The solubility of fluconazole in each constituent of the system and in the formulations of interest was analyzed. To evaluate the mechanism of intestinal absorption of the drug from the pharmaceutical dosage form we use the model of the inverted small intestine. The influence of biliary salts in the structure of the system was also evaluate. The direct mixture of the constituent of the system in different ratios made possible the obtation of formulations with varied structures. The rheologic behavior and SAXS studies of the interest formulations demonstrated formulations with Newtonian and micelar behavior. On the other hand, others displayed pseudoplastics and lamellar phase behavior, structures not confirmed for the microscopy of polarized light, that demonstrated to a dark field for all the formulations, characteristic of micelar systems. The solubility of fluconazole in the interest formulations was approximately 3%, sufficient for the incorporation of drug amounts used in the therapy of sporotricosis, whereas the solubility of the same in water is approximately 0,5%. The assay of drug absortion using the inverted small intestine demonstrates that the formulations increase of 4-5 times the transport of the drug throught the intestinal membrane in comparison with the water solution. The results indicate the capacity of this type of system to act as system of drug release, increasing the bioavailability of drugs.

Keywords: microemulsions, fluconazole, sporotricosis, inverted small intestine, rheology, small angle X-rays scattering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas do fluconazol, cetoconazol e itraconazol..... 21

Figura 2. Esporotricose cutânea disseminada em paciente com AIDS..... 22

Figura 3. Representação esquemática das estruturas mais comuns formadas com tensoativos na presença de água, óleo ou na combinação dos três..... 26

Figura 4. Representação esquemática das três microestruturas mais comuns de microemulsões: (a) óleo em água, (b) microemulsão bicontínua e (c) microemulsão água em óleo..... 28

Figura 5. Modelo de um diagrama de fases..... 30

Figura 6. Fórmula estrutural do PPG-5-Ceteth-2..... 36

Figura 7. Estrutura química do ácido oléico..... 37

Figura 8. Fluxo entre duas placas paralelas..... 41

Figura 9. Curva de fluxo de um líquido Newtoniano..... 42

Figura 10. Vários tipos de comportamento de fluxo..... 43

Figura 11. Ilustração do dispositivo de placa e cone do reômetro..... 62

Figura 12. Espectro de absorção por espectrofotometria do fluconazol em metanol 100 μg/mL..... 68

Figura 13. Curva analítica do fluconazol em metanol, obtida por espectrofotometria em 261 nm..... 69

Figura 14. Curva analítica do fluconazol em água, obtida por espectrofotometria em 261 nm..... 70

Figura 15. Solubilidade do fluconazol nos componentes do sistema, ácido oléico, PRO e água..... 72

Figura 16. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com PRO como tensoativo, fase oleosa de ácido oléico e fase aquosa de água destilada..... 74

Figura 17. Formulações escolhidas para o estudo do sistema..... 76

Figura 18. Índice de refração das formulações 1 a 9..... 77

Figura 19. Reogramas de fluxo da formulação de número 1, sem fármaco (1) e com fármaco (1F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC..... 79

Figura 20. Reogramas de fluxo da formulação de número 2, sem fármaco (2) e com fármaco (2F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC..... 79

Figura 21. Reogramas de fluxo da formulação de número 3, sem fármaco (3) e com fármaco (3F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC..... 80

Figura 22. Reogramas de fluxo da formulação de número 4, sem fármaco (4) e com fármaco (4F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC..... 80

Figura 23. Reogramas de fluxo da formulação de número 5, sem fármaco (5) e com fármaco (5F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC..... 80

Figura 24. Reogramas de fluxo da formulação de número 6, sem fármaco (6) e com fármaco (6F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC..... 81

Figura 25. Reogramas de fluxo da formulação de número 7, sem fármaco (7) e com fármaco (7F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC..... 81

Figura 26. Reogramas de fluxo da formulação de número 8, sem fármaco (8) e com fármaco (8F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC..... 81

Figura 27. Reogramas de fluxo da formulação de número 9, sem fármaco (9) e com fármaco (9F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC..... 82

Figura 28. Reogramas de fluxo da formulação de número 1, sem fármaco (1) e com fármaco (1F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC..... 83

Figura 29. Reogramas de fluxo da formulação de número 2, sem fármaco (2) e com fármaco (2F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC..... 84

Figura 30. Reogramas de fluxo da formulação de número 3, sem fármaco (3) e com fármaco (3F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC..... 84

Figura 31. Reogramas de fluxo da formulação de número 4, sem fármaco (4) e com fármaco (4F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC..... 85

Figura 32. Reogramas de fluxo da formulação de número 5, sem fármaco (5) e com fármaco (5F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC..... 85

Figura 33. Reogramas de fluxo da formulação de número 6, sem fármaco (6) e com fármaco (6F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC..... 86

Figura 34. Reogramas de fluxo da formulação de número 7, sem fármaco (7) e com fármaco (7F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC..... 86

Figura 35. Reogramas de fluxo da formulação de número 8, sem fármaco (8) e com fármaco (8F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC..... 87

Figura 36. Reogramas de fluxo da formulação de número 9, sem fármaco (9) e com fármaco (9F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC..... 87

Figura 37. Índice de fluxo e índice de consistência do sistema sem fármaco (A) e com fármaco (B) com a crescente concentração de fase aquosa e 40 % de tensoativo, a 25 ºC..... 89

Figura 38. Índice de fluxo e índice de consistência do sistema sem fármaco (A) e com fármaco (B) com a crescente concentração de fase aquosa e 40 % de tensoativo, a 37 ºC..... 89

Figura 39. Fluência e recuperação das formulações 1, 5 e 9 sem fármaco e com fármaco 1F, 5F e 9F, a 25 ºC..... 90

Figura 40. Evolução estrutural das formulações de números 1 a 9 sem fármaco..... 91

Figura 41. Evolução estrutural das formulações 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E) e 6 (F) sem fármaco (1, 2, 3, 4, 5, e 6) e com fármaco (1F, 2F, 3F, 5F e 6F)..... 93

Figura 42. Fotomicrografia representativa de um comportamento isotrópico (campo escuro), obtida da formulação de numero 8 sem fármaco. A seta indica a presença de bolha de ar para comprovar o campo escuro..... 94

Figura 43. Solubilidade do Fluconazol nas formulações 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e nos componentes do sistema, ácido oléico, água e PRO, média de três determinações e desvio padrão..... 95

Figura 44. Estrutura dos principais ácidos biliares e seus glico e tauroconjugados..... 97

Figura 45. Cromatograma referente à solução de fluconazol em fase móvel 2 mg/mL em 261 nm..... 100

Figura 46. Curva analítica do fluconazol em fase móvel obtida por CLAE em 261 nm..... 101

Figura 47. Fluconazol absorvido através do segmento intestinal invertido, após incubação por 90 minutos, com 15 mg/g de fármaco, segmento de 8 cm..... 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas empregadas na análise do fluconazol..... 65

Tabela 2 - Valores das absorbâncias das soluções metanólicas de Fluconazol obtidas por espectrofotometria no comprimento de onda de 261 nm..... 70

Tabela 3 - Valores das absorbâncias das soluções aquosas de Fluconazol obtidas por espectrofotometria no comprimento de onda de 261 nm..... 71

Tabela 4 - Solubilidade do fluconazol nos componentes do sistema (ácido oléico, PRO e água) em mg de fluconazol por g de solvente (mg FLU/g solvente)..... 72

Tabela 5 - Formulações escolhidas para o estudo do sistema. Formulações de 1 a 9, % de tensoativo (PRO), % de Fase Aquosa (Água) e % de Fase Oleosa (Ácido Oléico) para cada formulação..... 75

Tabela 6 - Porcentagem de fase aquosa nas formulações 1 a 9, valores de índice de refração..... 77

Tabela 7 - Valores das condutividades (μS/cm) obtidos com as formulações 1 a 9..... 78

Tabela 8 - Quantidade máxima de fluconazol (mg de fluconazol/g de microemulsão) incorporado nas formulações de números 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, e 9..... 96

Tabela 9 - Resultados da adição de solução de sais biliares em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) nas formulações 1 a 9 e sistemas formados após a adição de volumes de solução..... 98

Tabela 10 - Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão..... 102

Tabela 11 - Percentual de recuperação do fluconazol..... 103

Tabela 12 - Limites de detecção e quantificação de solução de fluconazol em fase móvel em 261 nm..... 103

Tabela 13 - Fluconazol absorvido através do segmento intestinal invertido, após incubação por 90 minutos, com 15 mg/g de fármaco, segmento de 8 cm..... 105

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O – água em óleo

CL – cristal líquido

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV% – coeficiente de variação

DP – desvio padrão

EHL – equilíbrio hidrófilo-lipófilo

EL – emulsão líquida

EM – emulsão

FA – fase aquosa

FO – fase oleosa

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

ME – microemulsão

O/A – óleo em água

O/T – óleo/tensoativo

PRO – álcool cetílico etoxilado e propoxilado

SAXS – espalhamento de raios-X a baixo ângulo

SF – separação de fases

SVT – sistema viscoso transparente

SO – sistema opaco

UV – ultravioleta

VIS – visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 17

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 19

2.1 Terapia antimicótica e esporotricose..... 19

2.2 Sistemas micro e nanoestruturados formados pela mistura água-óleo-tensoativo..... 25

2.3 Componentes utilizados..... 34

2.4 Caracterização física dos sistemas..... 37

2.4.1 Índice de refração..... 38

2.4.2 Condutividade eletrolítica..... 39

2.4.3 Comportamento reológico..... 39

2.4.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo..... 47

2.4.5 Microscopia de luz polarizada..... 51

2.5 Modelo de estudo *in vitro* para avaliar a absorção intestinal de fármacos..... 52

3. OBJETIVOS..... 54

3.1 Objetivo geral..... 54

3.2 Objetivos específicos..... 54

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 55

4.1 MATERIAIS..... 55

4.1.1 Reagentes, solventes e matérias-primas..... 55

4.1.2 Equipamentos e acessórios..... 55

4.1.3 Animais..... 56

4.2 MÉTODOS..... 57

4.2.1 Metodologia analítica para quantificação do fluconazol por espectrofotometria.... 57

4.2.1.1 Espectro de absorção do fluconazol em metanol por espectrofotometria..... 57

4.2.1.2 Curva analítica do fluconazol em metanol por espectrofotometria..... 57

4.2.1.3 Curva analítica do fluconazol em água por espectrofotometria..... 58

4.2.2 Determinação da solubilidade do fluconazol nos componentes do sistema..... 58

4.2.3 Desenvolvimento dos Sistemas..... 59

4.2.3.1 Construção de diagrama de fases..... 59

4.2.3.2 Preparação das formulações selecionadas..... 60

4.2.4 Caracterização física dos sistemas de interesse..... 60

4.2.4.1 Determinação do índice de refração..... 61

4.2.4.2 Determinação da condutividade eletrolítica..... 61

4.2.4.3 Determinação do comportamento reológico..... 61

4.2.4.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo..... 62

4.2.4.5 Microscopia de luz polarizada..... 63

4.2.5 Determinação da capacidade de incorporação do fluconazol nos sistemas de interesse..... 63

4.2.6 Estudo da influência dos sais biliares na estrutura do sistema..... 64

4.2.7 Avaliação do transporte intestinal de fluconazol..... 64

4.2.7.1 Validação da metodologia analítica empregada na determinação do fluconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... 64

4.2.7.2 Avaliação da absorção intestinal do fluconazol pelo método do saco intestinal invertido..... 66

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 68

5.1 Metodologia analítica para quantificação do fluconazol por espectrofotometria..... 68

5.1.1 Espectro de absorção do fluconazol em metanol por espectrofotometria..... 68

5.1.2 Curva analítica do fluconazol em metanol por espectrofotometria..... 68

5.1.3 Curva analítica do fluconazol em água por espectrofotometria..... 70

5.2 Solubilidade do fluconazol nos componentes do sistema..... 71

5.3 Desenvolvimento dos sistemas..... 73

5.3.1 Construção de diagrama de fases..... 73

5.3.2 Preparação das formulações selecionadas..... 75

5.4 Caracterização física dos sistemas de interesse..... 75

5.4.1 Determinação do índice de refração..... 76

5.4.2 Determinação da condutividade eletrolítica..... 78

5.4.3 Determinação do comportamento reológico..... 78

5.4.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)..... 90

5.4.5 Microscopia de luz polarizada..... 94

5.5 Determinação da capacidade de incorporação do fluconazol nos sistemas de interesse..... 95

5.6 Estudo da influência dos sais biliares na estrutura do sistema..... 96

5.7 Avaliação do transporte intestinal de fluconazol 99

5.7.1 Validação da metodologia analítica empregada na determinação do fluconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... 100

5.7.2 Avaliação da absorção intestinal do fluconazol pelo método do saco intestinal invertido..... 104

CONCLUSÕES..... 106

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 107

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um agente antifúngico representa um grande desafio para todos os pesquisadores da área, uma vez que, por tratar-se de célula eucariótica, compartilha com a maior parte dos alvos potenciais de ação com as células do hospedeiro, conferindo altos níveis de toxicidade. O tempo necessário para o tratamento e o elevado custo são os principais fatores limitantes para o sucesso terapêutico no tratamento das micoses (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002).

Entretanto, a introdução de novos fármacos na terapêutica tem se tornado um processo muito oneroso, em razão disto, pesquisas de novas alternativas tecnológicas que aumentem a eficiência de fármacos já conhecidos têm sido intensificadas. Muitas destas alternativas têm sido focadas no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos e a nanotecnologia tem representado um importante avanço.

Além da vantagem econômica, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação tem permitido o aumento da eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual, a reintrodução de outros anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos fármacos antes que sejam utilizados na terapêutica. Neste contexto, sistemas coloidais, como microemulsões e cristais líquidos, têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica.

Microemulsão (ME) é definida como um sistema transparente, constituído de água, óleo e tensoativos, isotrópico e termodinamicamente estável (KREILGAARD, 2002). As propriedades características destes sistemas incluem formação espontânea, transparência, grande área superficial, baixa tensão interfacial, grande capacidade de solubilização tanto de compostos hidrofílicos como de lipofílicos e baixa viscosidade (SOLANS; KUNIEDA, 1997).

A organização espontânea de lipídeos anfifílicos em meios aquosos pode resultar em outras estruturas tridimensionais, além de microemulsões (ME), como por exemplo fases líquido cristalinas com arranjo lamelar, hexagonal e cúbico, que também podem ser utilizados na liberação de fármacos. A habilidade de sistemas pouco viscosos transformarem-se em fases mais viscosas ao absorverem água, resulta em uma nova oportunidade de liberação de fármacos em termos de vias de administração e aplicações, já que o contato com fluidos biológicos pode alterar a estrutura e assim modificar as propriedades do sistema (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

Nas últimas décadas, tem ocorrido um aumento na incidência de infecções micóticas e da administração sistêmica de agentes antifúngicos. A esporotricose é uma micose subcutânea que acomete seres humanos e animais, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* (MENDOZA et. al., 2005; ROSA et. al., 2005).

Os azóis, que incluem o cetoconazol, itraconazol e fluconazol têm sido empregados no tratamento de infecções fúngicas. Visto a importância destas infecções no cenário da saúde pública, destacando o papel do azóis como agente antifúngico, é necessário buscar estratégias para aumentar a eficiência destes fármacos.

O itraconazol tem sido empregado com sucesso no tratamento da esporotricose, já o fluconazol tem algumas limitações, sendo indicado somente quando o itraconazol não é tolerado. Estas limitações, segundo alguns autores, podem estar relacionadas com a falta de estudos para determinação da dose e posologia adequadas para o tratamento.

O objetivo do trabalho foi desenvolver sistemas de liberação de fármacos para administração do fluconazol, potencialmente ativo contra a esporotricose. Para isso, desenvolvemos e caracterizamos sistemas nanoestruturados constituídos de fase oleosa de ácido oléico, álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP como tensoativo e água como fase aquosa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Terapia antimicótica e esporotricose

Nas últimas décadas, tem ocorrido um dramático aumento na incidência de infecções micóticas e da administração sistêmica de agentes antifúngicos. Apesar da maioria das infecções fúngicas tratadas por dermatologistas não serem uma ameaça para a vida, elas podem causar muitos sintomas desagradáveis para o paciente e prejudicar sua qualidade de vida (PARDASANI, 2000).

Micoses superficiais e cutâneas são infecções produzidas por fungos que afetam a pele, cabelos, unhas e mucosas, sem lesar o tecido subcutâneo nem outros órgãos. Apesar dos grandes avanços observados nas últimas décadas e do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, o tratamento das micoses ainda representa um grave problema. A primeira alternativa para o tratamento sistêmico de micoses superficiais e cutâneas foi a griseofulvina, em 1958, a qual até hoje permanece como tratamento de escolha para *Tinea capitis*. A terbinafina e os derivados azólicos, como itraconazol, cetoconazol e fluconazol, são os fármacos mais eficazes disponíveis no arsenal terapêutico da atualidade (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002).

Atualmente, as principais limitações das opções terapêuticas disponíveis são: espectro inadequado de atividade, falta de eficácia devido à crescente resistência dos fungos, pequeno índice de tolerância, interações com outros fármacos, perfil farmacocinético inadequado e custo excessivo. No início do século XXI ainda são muitos os desafios sobre o tratamento das micoses (REX, 2001).

Observa-se o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e o aprimoramento de técnicas de tratamento e controle da doença. Contudo, tais avanços estão muito aquém da

necessidade da medicina moderna, pois as micoses estão entre as doenças que mais tem aumentado em prevalência e diversidade. O tempo necessário para o tratamento e o elevado custo são os principais fatores limitantes para o sucesso terapêutico das micoses. Além disso, em muitos casos os antifúngicos tópicos são ineficazes e os sistêmicos, embora mais eficientes, apresentam uma série de efeitos colaterais, obrigando a uma análise risco/benefício (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002). A freqüência das infecções fúngicas relacionadas com pacientes diabéticos e imunocomprometidos, associado com um aumento da resistência aos fármacos antifúngicos apontam a necessidade tratamentos mais eficazes e seguros (HARDMAN et. al., 2004).

O antifúngico ideal deve ter amplo espectro de atividade e ação fungicida ao invés de fungistática, estar disponível em formulações tópicas e orais, apresentar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ter custo acessível e não apresentar resistência microbiana. Para o tratamento de micoses superficiais e cutâneas, alguns autores indicam a aplicação tópica de antifúngicos específicos. No entanto, para outros, o tratamento sistêmico é o mais eficaz, sobretudo para as infecções crônicas (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002).

A descoberta do fluconazol foi resultado de um programa de pesquisa dirigido ao desenvolvimento de um agente antifúngico de amplo espectro de ação, ativo pelas vias oral e intravenosa, para tratamento de infecções superficiais e sistêmicas. Após anos de modificações moleculares a partir dos fármacos imidazólicos, o fluconazol surgiu como um promissor antifúngico graças à ótima combinação de eficácia, características farmacocinéticas, solubilidade e perfil de segurança (PEREIRA, 2007)

O fluconazol (Figura 1) é um inibidor da membrana celular dos fungos, pertencente à classe dos triazóis. A unidade estrutural básica de todos antifúngicos azóis é um anel azólico de cinco membros o qual é unido por uma ligação nitrogênio carbono com outros anéis

aromáticos. Os fármacos imidazólicos, incluindo o miconazol e o cetoconazol (Figura 1), contêm dois átomos de nitrogênio no anel azólico, enquanto que a classe dos agentes triazólicos, incluindo o fluconazol e o itraconazol (Figura 1), contêm um terceiro átomo de nitrogênio no anel azólico. Uma importante diferença entre os triazóis, representado pelo fluconazol e os imidazóis, é a maior afinidade dos triazóis pelas enzimas dos fungos quando comparado com as enzimas do citocromo P-450 dos mamíferos. Seu mecanismo de ação, assim como dos outros azóis, está ligado à sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana das leveduras e fungos, inibindo a síntese do ergosterol. Inibe a enzima P-450-14-alpha-demetilase dependente de lanosterol, causando acúmulo de esteróis metilados, depleção de ergosterol e inibição do crescimento celular (DIDOMENICO, 1999; ROSA et.al, 2005; SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002;).

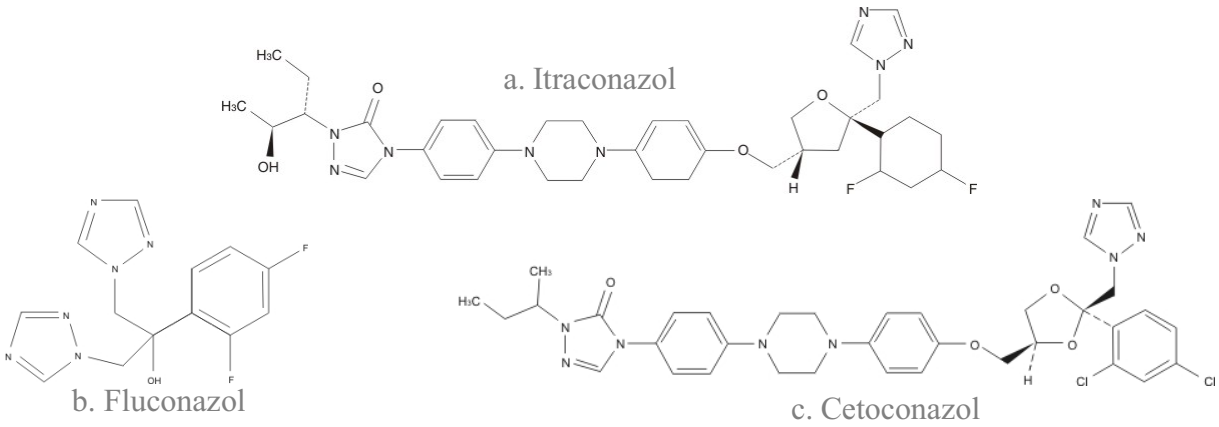


Figura 1. Estruturas químicas do fluconazol, cetoconazol e itraconazol. (Disponível em http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol39_2_05/far12205.htm).

O fluconazol está disponível para uso parenteral e oral. A administração com alimentos não prejudica sua absorção. Uma característica importante deste fármaco é a sua boa penetração no sistema nervoso central. Níveis do fármaco no líquor cefalorraquidiano representam 50 a 90% da concentração sérica concomitante. Cerca de 80% da dose

administrada é eliminada de forma ativa pelos rins e sua vida média no soro é prolongada na vigência de insuficiência renal. Ao contrário dos outros antifúngicos do grupo dos triazóis, o cetoconazol e o itraconazol, que sofrem metabolização hepática e são excretados de forma inativa pela bile, o fluconazol não é metabolizado pelo organismo do homem, e é excretado inalterado na urina (MOISÉS NETO; FIGUEIREDO, 1996). Embora este fármaco apresente lipofilicidade suficiente para ser consideravelmente reabsorvido no túbulo renal, sua depuração é predominantemente renal devido à sua alta estabilidade metabólica. Esta estabilidade metabólica do fluconazol foi conseguida pela combinação de três elementos estruturais: a resistência dos anéis triazólicos ao ataque oxidativo, o bloqueio da hidroxilação aromática pela presença de dois átomos de flúor e o impedimento estérico da hidroxila, um sítio possível de conjugação (PEREIRA, 2007).

Figura 2. Esporotricose cutânea disseminada em paciente com AIDS. Disponível em www.scielo.br/img/fbpe/rsbmt/v35n6/a18f01.jpg.

Na Medicina Veterinária, muitos casos de esporotricose animal têm sido encontrados em cavalos, bovinos e gatos (LARSON et. al., 1989). A transmissão zoonótica ocorre e muitos animais são implicados. Este tipo de transmissão é mais freqüente em profissionais que trabalham com animais, mas em muitas partes do mundo há um aumento na transmissão por gatos de estimação. Nesses casos, a infecção pode ser observada no ambiente familiar, uma importante consideração epidemiológica para os clínicos (OLIVEIRA-NETO et. al., 2002).

A partir de 1998, o Serviço de Zoonoses e o Ambulatório de Dermatologia Infecciosa do Centro de Pesquisa Hospital Evandro Chagas - Fiocruz vêm acompanhando uma epidemia de esporotricose no Rio de Janeiro envolvendo gatos, cães e seres humanos.

A esporotricose (Figura 2) é uma micose subcutânea, que acomete seres humanos e animais, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii.* Este fungo é amplamente distribuído na natureza como um organismo saprófico, particularmente em áreas temperadas e tropicais. Condições ótimas para o desenvolvimento do fungo incluem uma atmosfera de umidade de 80 a 100% e temperatura entre 20 e 27 ºC. Lesões subcutâneas e polimórficas são produzidas na pele de humanos bem como em animais. Em ocasiões raras, uma forma sistêmica da doença pode ocorrer (MENDOZA et. al., 2005; ROSA et. al., 2005).

Esta micose é desenvolvida principalmente por penetração do fungo na derme em feridas e arranhões na pele produzidos por materiais infectados, como feno, espinhos, lascas de madeira, lâmina de barbear, ferramentas de jardinagem, flores e louças de cerâmica, contato com gado ou ração animal ou inalação dos esporos pelo trato respiratório (ROSA et. al., 2005).

É considerada uma micose ocupacional, desde que muitos dos indivíduos afetados incluem floristas, jardineiros e trabalhadores do campo, os quais geralmente reportam lesões traumáticas como a fonte de infecção (MENDOZA et. al., 2005).

O diagnóstico da doença é orientado por um teste intradérmico positivo com esporotricina e, então, confirmado por cultura. No exame visual ou histológico a forma patogênica do fungo ou os corpos asteróides podem ser observados. O exame microscópico de culturas em temperatura ambiente demonstra hifas septadas delgadas, 1-2 μm de diâmetro e conídias hialinas, 2 x 3-3 x 6 μm, triangulares ou arredondadas, com paredes finas. Culturas a 37 ºC revelam formas fúngicas de forma arredondadas, ovais ou alongadas (MENDOZA et. al., 2005).

Muitos casos de esporotricose envolvem primariamente a pele e os canais linfáticos vizinhos. A disseminação para outros órgãos e tecidos como ossos e articulações parece ocorrer mais freqüentemente em pacientes com imunossupressão (por exemplo, alcoolismo, AIDS, diabetes, uso de corticóides) (Figura 2). Clinicamente pode ocorrer em muitas formas. O tipo mais comum de esporotricose é a doença linfática cutânea, em 75 % dos casos, seguida por lesões cutâneas localizadas (20 %), formas extracutâneas e formas disseminadas da doença. As formas disseminadas e extracutâneas são incomuns (ROSA et. al., 2005).

A recomendação de tratamento da esporotricose, segundo Hardman (2004) é com Anfotericina B na dose total de 1-2 g para pacientes com AIDS, seguido por terapia de manutenção com itraconazol 200 mg. Itraconazol, também é útil para tratamento de doenças agudas em pacientes intolerantes à anfotericina B e é o fármaco de escolha para doenças cutâneas e osteoarticular em pacientes HIV negativos. Fluconazol é menos efetivo, de acordo com os autores, que reportam casos de tratamento da doença com este fármaco com pouco sucesso, e apenas é recomendado quando o itraconazol não é tolerado (HARDMAN et. al., 2004).

Há poucos casos de tratamento da esporotricose com fluconazol. Consegue-se a cura, não ocorrem efeitos adversos, porém o tratamento deve ser longo e a dose varia entre 200 e 400 mg por dia. A dose normalmente tem de ser aumentada de 200 para 400 mg por dia

devido à resposta inadequada do tratamento com a dose menor. Baseado em evidências experimentais, o fluconazol é um antifúngico promissor no tratamento da esporotricose porém necessita de mais estudos para a determinação de dose ideal e duração de tratamento (CASTRO et. al., 1993).

O insucesso do fluconazol como tratamento da esporotricose, como relatado em diversos trabalhos, está em desacordo com as propriedades do fármaco, que é um promissor antifúngico para diversas patologias.

Neste sentido torna-se interessante buscar novas alternativas tecnológicas para o uso do fluconazol no tratamento da esporotricose, que busquem aumentar a eficiência deste fármaco na terapia e forneça aos clínicos e pacientes maior diversidade de tratamento.

2.2 Sistemas micro e nanoestruturados formados pela mistura água-óleo-tensoativo

Uma formulação farmacêutica ideal é aquela capaz de liberar a substância ativa no seu órgão alvo em doses terapeuticamente relevantes, com mínimos desconfortos e efeitos adversos para o paciente (KREILGAARD, 2002). Agregados supramoleculares (ex: micelas, microemulsões, lipossomas e cristais líquidos) são importantes nas áreas química e farmacêutica desde que estes sistemas podem ser associados a fármacos, reduzindo toxicidade, modificando a biodisponibilidade e estabilidade (CORREA et. al., 2005).

Microemulsões e cristais líquidos podem modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e absorção e controle da biodisponibilidade de fármacos. Como sistemas reservatórios podem alterar os parâmetros farmacocinéticos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica de fármacos (FORMARIZ et. al., 2005).

Quando tensoativos são incorporados em misturas imiscíveis de óleo e água, a molécula de tensoativo forma um filme na interface óleo-água estabilizando a mistura tornando o sistema mais estável termodinamicamente. A Figura 3 mostra algumas estruturas possíveis de se formarem quando tensoativos estão na presença de água, óleo ou na combinação desses três componentes (LAWRENCE; REES, 2000). A formação de microestruturas em soluções aquosas de tensoativos é um fenômeno comum de auto-organização molecular como forma de atingir a estabilidade termodinâmica (FORMARIZ et. al., 2005).

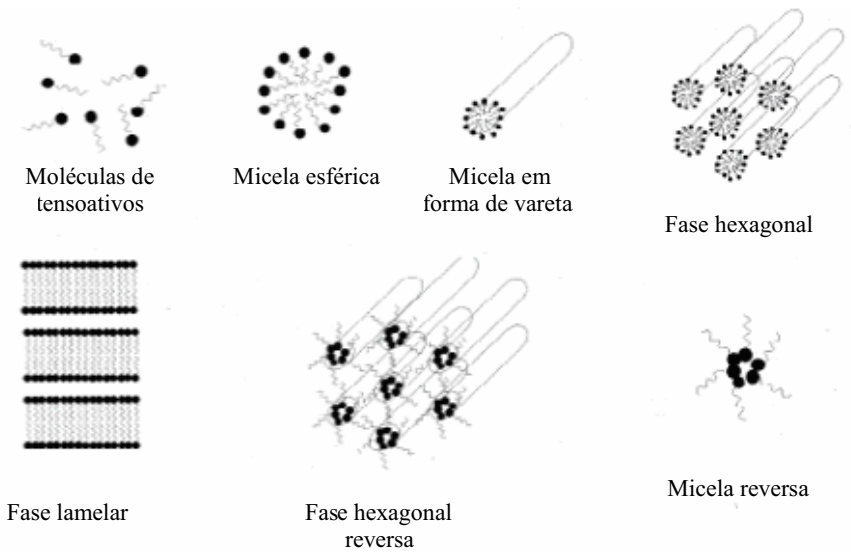


Figura 3. Representação esquemática das estruturas mais comuns formadas com tensoativos na presença de água, óleo ou na combinação dos três (Adaptado de LAWRENCE; REES, 2000).

O conceito de microemulsão foi introduzido no começo dos anos 1940 por Hoar e Schulman que produziram uma dispersão transparente titulando uma emulsão leitosa com hexanol. Schulman e colaboradores subseqüentemente criaram o termo microemulsão (LAWRENCE; REES, 2000).

Microemulsões são muito interessantes como sistemas de liberação de fármacos. Vantagens associadas a esse tipo de sistema incluem estabilidade termodinâmica, transparência e facilidade de preparação. São definidas como um sistema constituído de água, óleo e tensoativo que se apresentam como uma dispersão líquida termodinamicamente estável e isotrópica. A existência de regiões de diferentes polaridades em uma microemulsão faz com que seja possível que materiais lipossolúveis e hidrossolúveis sejam solubilizados. Além do mais, também é possível incorporar fármacos anfifílicos nestes sistemas. São capazes de proteger fármacos contra hidrólise enzimática, controlar a liberação, aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos e reduzir variações de absorção entre pacientes, bem como aumentar o potencial de absorção devido a mudanças na permeabilidade induzidas pelo tensoativo. Sua aplicação científica ou industrial como sistema de liberação de fármacos necessita do entendimento de sua microestrutura, e muito trabalho nesta área tem sido feito nas últimas três décadas (GAO et. al., 1998; GARTI et. al., 2004; LAWRENCE; REES, 2000).

A capacidade de solubilização das microemulsões pode ser afetada por diversos fatores, como parâmetros geométricos das gotículas, variações estruturais e aspectos termodinâmicos (GARTI et. al., 2004). Uma grande vantagem associada ao desenvolvimento de microemulsões é sua facilidade de formação em temperatura ambiente, particularmente para fármacos termolábeis (GAO et. al., 1998).

A principal diferença entre emulsões e microemulsões é que a primeira é termodinamicamente instável e pode eventualmente separar fases. Outra importante diferença está na aparência; emulsões são turvas enquanto microemulsões são transparentes ou translúcidas. Além do mais, têm diferenças distintas em seus métodos de preparação, enquanto emulsões requerem grandes depósitos de energia, microemulsões não necessitam.

Isto é importante quando consideramos o custo de produção desses dois tipos de sistemas (LAWRENCE; REES, 2000).

As microemulsões (ME) podem ser de água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), podendo inverter de um tipo para outro pela adição de uma fase ou alteração do tensoativo. A Figura 4 é uma representação esquemática da organização das microemulsões.

A formação de uma microemulsão O/A se dá quando o volume de óleo é baixo. Ao contrário, microemulsões A/O se formam quando o volume de água é baixo. Em sistemas em que as quantidades de água e óleo são similares, microemulsões bicontínuas são formadas (Figura 4) (LAWRENCE; REES, 2000). A formação dessas diferentes microestruturas pode afetar fortemente a liberação de fármacos (CORREA et. al., 2005).

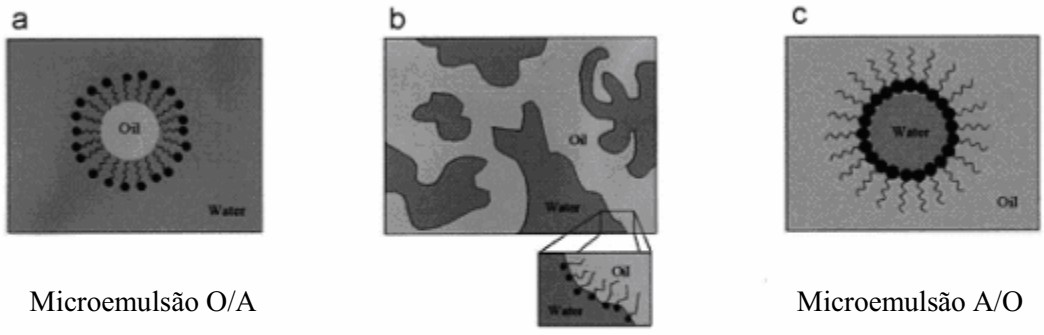


Figura 4. Representação esquemática das três microestruturas mais comuns de microemulsões: (a) óleo em água, (b) microemulsão bicontínua e (c) microemulsão água em óleo (Adaptado de LAWRENCE; REES, 2000).

A energia livre de formação de microemulsões depende da área superficial da interface óleo-água e de quanto será a mudança na entropia do sistema, como representado na fórmula abaixo:

$$\Delta G_f = \gamma\ \Delta A - T\ \Delta S \qquad \text{(Equação 1)}$$

em que, ΔG_f é a energia livre de formação, γ é a tensão superficial da interface óleo-água, ΔA é a mudança na área interfacial na microemulsificação, ΔS é a mudança na entropia do sistema, e T é a temperatura. Deve-se notar que quando se forma uma microemulsão a mudança no ΔA é muito grande porque um grande número de gotículas são formadas. Uma grande energia livre de formação é alcançada quando grandes reduções na tensão superficial são acompanhadas por significantes e favoráveis mudanças na entropia. Na maioria das vezes, a microemulsificação é espontânea e resulta em uma dispersão termodinamicamente estável (LAWRENCE; REES, 2000).

O comportamento de fase de um sistema microemulsionado, constituído de óleo, água e tensoativo, pode ser representado por um diagrama de fase ternário em que, em cada vértice do diagrama representa 100% de um dos componentes. Mais comumente, entretanto, e principalmente no caso de microemulsões para uso farmacêutico, a microemulsão pode conter componentes adicionais como co-tensoativos e/ou fármaco. No caso em que quatro ou mais componentes estão sendo estudados, diagramas de fase pseudoternários são utilizados e um dos vértices do diagrama representa uma mistura binária de dois componentes como tensoativo/co-tensoativo, água/fármaco ou óleo/fármaco. As diferentes fases formadas em um sistema em particular podem então ser visualizadas (CORREA et. al., 2005; LAWRENCE; REES, 2000).

A construção de um diagrama de fases é muito demorada. Aquecimento e sonicação são freqüentemente utilizados, particularmente com sistemas que contém tensoativos não-iônicos, para agilizar o processo. O procedimento mais empregado é a preparação de uma

série de composições binárias e titulação com o terceiro componente, avaliando a mistura após cada adição (LAWRENCE; REES, 2000).

Representados como triângulos eqüiláteros, a grande vantagem dos diagramas de fase é que nos mostram tanto a proporção de cada componente utilizado (diagrama de pontos), bem como as regiões de domínio dos diferentes sistemas encontrados (diagrama de linhas). Cada vértice do triângulo corresponde a 100% de cada fase, estando representados no vértice superior o tensoativo, no vértice esquerdo a fase aquosa e, no direito, a fase oleosa. Para a leitura das concentrações, em porcentagem, de cada componente em qualquer ponto do diagrama de fases, deve-se seguir a orientação horária, sendo que no eixo oposto ao vértice superior está representada a fase oleosa, no eixo oposto ao vértice esquerdo, o tensoativo, e no eixo oposto ao vértice direito, a fase aquosa (LONGO, 2006).

A Figura 5 representa um modelo de diagrama. O ponto destacado no diagrama é de uma preparação com composição de 40% de fase aquosa, 30% de fase oleosa e 30% de tensoativo.

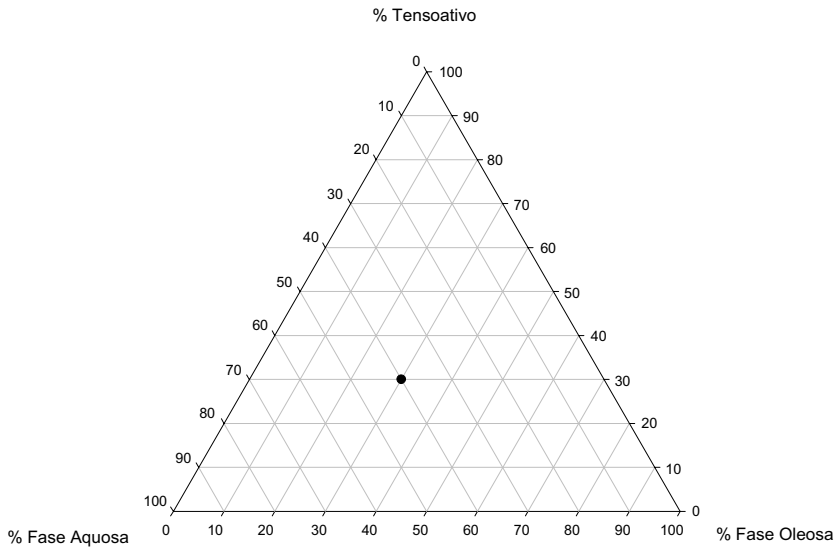


Figura 5. Modelo de um diagrama de fases.

A mistura de água, óleo e tensoativo formam uma grande variedade de estruturas e fases. Ao lado das microemulsões, pesquisas estruturais podem revelar a existência de emulsões regulares, fases líquido cristalinas anisotrópicas, hexagonais ou lamelares, e isotrópicas, micelares ou cúbicas, dependendo da razão dos componentes. Algumas destas diferentes fases e estruturas são facilmente reconhecidas por uma simples inspeção visual das formulações, devido a sua aparência física. Por exemplo, emulsões não são transparentes e podem separar fases, estruturas lamelares, hexagonais e fases cúbicas são muito viscosas. Além disso, podem ser reveladas por monitoração por microscopia de luz polarizada e então diferenciadas das microemulsões (KREILGAARD, 2002). Sistemas micelares e fases cúbicas são isotrópicas e apresentam-se como um campo escuro sob luz polarizada enquanto que fases cristalinas lamelares e hexagonais são anisotrópicas e apresentam estruturas características sob luz polarizada.

Fora da região de microemulsão, particularmente para composições próximas dos eixos binários de óleo-água, não há tensoativo suficiente para a obtenção de uma única fase de microemulsão. Nestas regiões, microemulsões podem existir em equilíbrio com excesso de água ou de óleo. Estes sistemas multifases podem ser convenientemente descritos utilizando a classificação de Winsor. Nesta classificação, microemulsões são classificadas como sistemas Winsor IV (LAWRENCE; REES, 2000).

Para descrever o equilíbrio entre emulsões, Winsor em 1948 caracterizou alguns sistemas:

- Winsor I: Há equilíbrio entre a fase ME e excesso de óleo;
- Winsor II: Há equilíbrio entre a fase ME e excesso de fase aquosa;
- Winsor III: três fases em equilíbrio (O, A e ME);
- Winsor IV: Há apenas a fase ME que pode ser chamado de sistema pseudomonofásico.

Sabe-se que no caso de microemulsões A/O, não há uma correlação óbvia entre tamanho de gotícula e biodisponibilidade oral, ao contrário do que acontece com as microemulsões O/A. Este comportamento é esperado já que no caso de microemulsões A/O ocorre a inversão ou separação de fase após administração, liberando assim o fármaco que estava compartimentalizado no interior da gotícula aquosa (LAWRENCE; REES, 2000).

Para uma seleção adequada do sistema microemulsionado quanto a liberação de fármacos, é importante conhecer as propriedades físico-químicas do sistema, como a solubilidade do fármaco, a área da região do diagrama correspondente a microemulsão e o tamanho das gotículas da microemulsão (GAO et. al., 1998).

A organização espontânea de lipídeos anfifílicos em meios aquosos pode resultar em outras estruturas tridimensionais, além de microemulsões, como por exemplo fase lamelar, fase hexagonal e fase cúbica, as quais também podem ser utilizadas na liberação de fármacos. A habilidade de sistemas pouco viscosos, como as ME, se transformarem em fases líquido cristalinas muito viscosas quando os sistemas absorvem água, como no caso de contato com os líquidos biológicos *in vivo*, resulta em uma nova estratégia para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

Os cristais líquidos são caracterizados por apresentarem um grau de ordem molecular intermediário, entre a ordem orientacional e posicional de longo alcance dos sólidos, e a desordem de longo alcance dos líquidos isotrópicos e gases. O grau de desordem aumenta com o aumento da temperatura. Apresentam propriedades ópticas, elétricas e magnéticas, semelhantes às de um sólido cristalino, e propriedades mecânicas semelhantes aos líquidos, o que caracteriza sua fluidez. São classificados em mesofases essencialmente por sua simetria e grau de ordenamento. Dessa forma, as mesofases líquido-cristalinas são caracterizadas pelos graus de liberdade que as moléculas de cristal líquido apresentam, através das simetrias de translação e rotação. Nesse sentido, as transições de fase ocorrem pela quebra na ordem

posicional e/ou orientacional das moléculas, aumentando ou diminuindo seus graus de liberdade (BECHTOLD, 2005).

Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos e contêm, no mínimo, dois componentes: o componente orgânico, por exemplo tensoativo, e seu solvente. A porção orgânica deve exibir algumas características químicas, do contrário o solvente simplesmente solubilizaria a molécula, originando soluções em que as moléculas estariam dispersas e desordenadas, e certamente não seriam formados cristais líquidos. A adição de um solvente como a água hidrata seletivamente a porção hidrofílica das moléculas de tensoativo, evitando as regiões hidrofóbicas (HYDE, 2001).

Mesofases liotrópicas podem ser consideradas micelas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas e diferentes formas líquido-cristalinas podem ser formadas, como lamelares, hexagonais e cúbicas.

A fase lamelar (Lα) é formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente. Já a fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos. Na fase H_I (fase normal), as moléculas do tensoativo se agrupam em micelas cilíndricas circulares, com a água preenchendo o volume entre os cilindros, enquanto que na fase H_{II} (fase reversa) os cilindros contém canais de água circundados pelas cabeças polares do tensoativo e a porção oleosa localizada ao redor dos cilindros. Fases cúbicas apresentam estruturas mais complicadas e visualizadas com maior dificuldade que as outras fases. Quase todas as fases fluidas tridimensionais observadas são de simetria cúbica, apesar das fases romboédricas, tetragonais e ortorrômbicas de topologia inversa também serem detectadas em alguns sistemas (EZRAHI et. al., 1999).

2.3 Componentes utilizados

Um dos maiores problemas associados com o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é, sem dúvida, a escolha dos excipientes. Essa escolha deve ser bastante criteriosa, e deve atender alguns requisitos, como não toxicidade, não irritabilidade, capacidade de solubilização do fármaco a ser incorporado no sistema, assim como capacidade de formar o sistema desejado (KREILGAARD, 2002; LAWRENCE; REES, 2000).

Os agentes tensoativos são fundamentais na estabilização de emulsões e microemulsões. Enquanto que as emulsões são estabilizadas por agentes emulsivos comuns (tensoativos), as microemulsões geralmente são adicionadas de um co-tensoativo, cuja função é diminuir a tensão interfacial para valores abaixo dos limites proporcionados pelo emulsivo comum. No entanto, nos casos em que os tensoativos são capazes de cumprir integralmente essa função, a presença dos co-tensoativos não é necessária e a composição da microemulsão restringe-se aos outros três componentes (OLIVEIRA, et. al., 2004).

Moléculas de tensoativos convencionais possuem uma cabeça polar e uma parte apolar que tem um grande volume molecular particularmente no caso dos tensoativos iônicos. Quando dispersos em água, os tensoativos se auto-organizam em uma variedade de fases de equilíbrio, e a natureza desta organização depende de forças inter e intramoleculares bem como da entropia (LAWRENCE; REES, 2000).

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 (GARTI et. al., 2004; KREILGAARD, 2002). Porém, estes sistemas, especialmente os estabilizados com derivados dos polioxietilenos, são muito sensíveis à temperatura, porque ocorre uma diminuição da solubilidade do tensoativo com o aumento da

temperatura. Em contraste, microemulsões estabilizadas com tensoativos iônicos são pouco ou nada sensíveis à temperatura (LAWRENCE; REES, 2000).

Esforços têm sido feitos para racionalizar o comportamento dos tensoativos em função de seu equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL). Tensoativos com baixos valores de EHL favorecem a formação de microemulsões A/O, enquanto tensoativos com altos valores de EHL são preferidos para a formação de microemulsões O/A. Tensoativos iônicos como o dodecil sulfato, que tem EHL maior que 20, freqüentemente requerem a presença de co-tensoativos para reduzir seu EHL efetivo para valores necessários para a formação de microemulsões (LAWRENCE; REES, 2000).

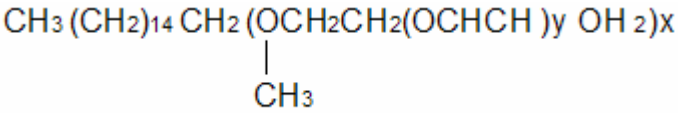
Como orientação geral, tensoativos zwiteriônicos e não-iônicos são menos tóxicos que os iônicos. Se o fármaco de interesse é lipofílico, as propriedades do solvente oleoso devem ser compatíveis com o fármaco. Moléculas oleosas grandes, de alto peso molecular, são geralmente capazes de dissolver compostos lipofílicos de vários tamanhos de cadeia carbônica. Entretanto, para serem capazes de formar microemulsões, a importância da penetração e associação das moléculas da fase oleosa com o filme interfacial do tensoativo, que é governado por moléculas de óleo menores, tem de ser lembrada. O balanço entre estas duas propriedades na escolha da fase oleosa tem que ser alcançado (KREILGAARD, 2002).

GAO e colaboradores (1998) prepararam sistemas microemulsionados para liberação oral de ciclosporina A. Cremophor EL® foi utilizado porque é um tensoativo não iônico e estes são conhecidos por serem menos afetados pelo pH e mudanças iônicas, glicerídeos de cadeia média derivados de óleo de côco foram selecionados como fase oleosa por serem produtos de grau alimentício e também são conhecidos por aumentar a absorção intestinal de fármacos. Microemulsões foram preparadas variando a razão entre os componentes, óleo (Captex 355®), mistura tensoativo/co-tensoativo (Cremophor EL®/Transcutol®) e ciclosporina A. Após otimização do sistema, a biodisponibilidade da ciclosporina A incorporada no

sistema microemulsionado foi comparada com preparações comerciais do fármaco em ratos. Concluíram que o aumento na biodisponibilidade da ciclosporina A no sistema estudado foi devido uma combinação de fatores, incluindo o efeito da solubilização do fármaco, o aumento da permeabilidade dele através da membrana intestinal e ao reduzido tamanho das gotículas do sistema microemulsionado (GAO et. al., 1998).

Sistemas microemulsionados são, portanto, aplicáveis para formulações líquidas e sólidas com intuito de aumentar a biodisponibilidade de fármacos pouco hidrossolúveis, após administração oral (GAO et. al., 1998).

O álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Figura 6) é um tensoativo não iônico, da classe dos polioxietilenos e polioxipropilenos, de nome INCI PPG-5-Ceteth-20 e nome comercial Procetyl AWS® (PRO). Apresenta-se como um líquido transparente ou ligeiramente turvo, incolor, odor leve característico, com as seguintes propriedades fisico-químicas: EHL = 16; pH (sol. aquosa 3%, 25 ºC) = 5,5-7,5; densidade relativa = 1,050; completamente solúvel em água e etanol (CRODA, 2002).



(Sendo, x em média 5 e y em média 20)

Figura 6. Fórmula estrutural do álcool cetílico etoxilado e propoxilado (WENNINGER, 1997 *apud* LONGO, 2006).

Apresenta estabilidade frente à decomposição térmica nas condições de uso. Não é irritante para a pele e em caso de ingestão não são considerados efeitos tóxicos, apresenta DL50 (oral, ratos) de 3050 mg/Kg (CRODA, 2002).

O ácido oléico é um ácido graxo monoinsaturado, principal constituinte do azeite, também presente em outros óleos. Este ácido, também denominado ácido cis-9-octadecenóico, em estado puro possui uma densidade de 0,891 g/cm^3 a 25 ºC. Possui 18 carbonos e uma insaturação em sua estrutura química (Figura 7).

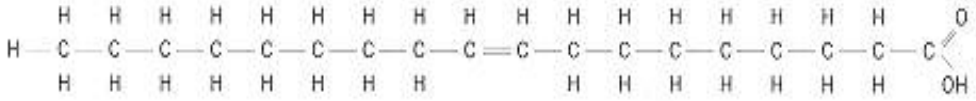


Figura 7. Estrutura química do ácido oléico. Disponível em http://www.cultura.ufpa.br/mestfis/materiais.html.

De acordo com Cury-Boaventura e colaboradores (2005), o ácido oléico é capaz de induzir a apoptose em células Raji (linhagem celular humana derivada de linfócitos-B), que são células linfocitárias, porém em menor extensão que o ácido linoléico. Estes pesquisadores acreditam que a diminuição no número de linfócitos devido a apoptose e/ou necrose tem um papel importante na função imune induzida por ácidos graxos. Portanto, para dietas parenterais o uso de ácidos graxos deve ser monitorada, pois pode causar uma alteração na resposta imune do paciente. O ácido oléico é uma alternativa menos prejudicial que o ácido linoléico em dietas parenterais o que diz respeito à atividade imunológica mediada por linfócitos-B (CURY-BOAVENTURA, 2005).

2.4 Caracterização física dos sistemas

O conhecimento da estrutura interna de um sistema micro ou nanoestruturado, além de ser muito importante, é também muito complexo. Assim, várias técnicas são necessárias para

atingir este objetivo. Métodos como espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) (ARAMAKI et. al., 2001; FANUN et. al., 2001; SIDDIG et. al., 2006), espalhamento de nêutron a baixo ângulo (SANS) (CAMPO et. al., 2004; CHOI et. al., 1998; REYNOLDS, et. al., 2004), microscopia eletrônica de transmissão, ressonância magnética nuclear (FANUN et. al., 2001; HELLWEG, 2002) estão sendo cada vez mais utilizados nos últimos anos. Outros métodos, por exemplo, índice de refração, condutividade, viscosidade, microscopia de luz polarizada, entre outras, também são freqüentemente utilizados para complementar o estudo estrutural e físico-químico desses sistemas.

2.4.1 Índice de refração

O índice de refração de uma substância é a relação entre a velocidade da luz no vácuo e sua velocidade no interior da substância. Quando um raio de luz monocromática passa de um meio transparente para outro de densidade óptica diferente ele sofre modificações no seu trajeto, exceto quando incide perpendicularmente à superfície de contato entre os meios. A relação entre o seno do ângulo de incidência (*sen i)* e o seno do ângulo de refração (*sen r)*, é constante, não variando com o ângulo de incidência. Essa relação equivale ao índice de refração. Pode-se, pois, definir o índice de refração como a relação entre o seno do ângulo de incidência e o seno do ângulo de refração, isto é, $n = sen\ i / sen\ r$. Para fins práticos mede-se a refração com referência ao ar e à substância e não com referência ao vácuo e à substância, porquanto as diferenças entre os valores obtidos com ambas as medidas não são significativas para fins farmacopéicos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Em substâncias isotrópicas, o índice de refração é característica constante em determinado comprimento de onda, temperatura e pressão. Por esta razão, este índice é útil não só para identificar a substância, mas também para detectar a presença de impurezas. É

empregado para caracterizar principalmente gorduras, óleos graxos, ceras, açúcares e solventes orgânicos, bem como para identificar certos fármacos. É igualmente usado para determinar a pureza de óleos voláteis (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

2.4.2 Condutividade eletrolítica

A condutividade eletrolítica, também chamada condutância específica, é a capacidade de uma solução conduzir corrente elétrica. A condução da corrente elétrica em soluções eletrolíticas difere da dos metais por ser composta unicamente de elétrons livres, já nos líquidos a condução é feita por íons em solução. É definida como o recíproco da resistência específica e é dada em Siemens/cm em uma dada temperatura (PALMIGIANE, 2005; URBAN, 2004).

O mecanismo responsável é o transporte de cargas elétricas na solução através dos íons. Todos os íons presentes na solução participam dessa condução e, por essa razão, pode-se dizer que a condutividade fornece uma informação global, por natureza não específica. A maioria dos ácidos, bases e sais inorgânicos são bons condutores da corrente elétrica ao passo que substâncias orgânicas, que não se dissociam em solução (benzina, gasolina, açúcares por exemplo), não são boas condutoras (PALMIGIANE, 2005).

2.4.3 Comportamento reológico

Numa fase de investigação e desenvolvimento de formulações, a determinação das características reológicas são usadas para caracterizar o comportamento mecânico dos fluidos, a facilidade com que o material pode ser vertido de um frasco, ser apertado em um tubo ou outro recipiente deformável, manter a forma do produto num frasco, ou após a extrusão,

esfregar o produto sobre a pele, ou bombear o produto do equipamento onde se procedeu a mistura, ou enchimento. Em última análise, pretende-se que os produtos mantenham as suas propriedades intrínsecas e de escoamento durante o tempo que permanecem em prateleira (WOOD, 2001).

A reologia, do grego *rheo* que significa escoar/fluir e *logos* que significa conhecimento, consiste no estudo do escoamento ou deformação do material em estudo, quando submetido a uma tensão. Os fluidos Newtonianos são fluidos para os quais se verifica uma proporcionalidade, entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de cisalhamento, para todos os valores de tensão de cisalhamento aplicados. Fluidos não newtonianos são aqueles em que não se verifica uma relação linear direta entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de cisalhamento aplicados, como é o caso da maioria dos sistemas com interesse em farmácia. (WOOD, 2001).

A resistência de um fluido a qualquer mudança irreversível de seus elementos de volume é chamada de viscosidade. Para a conservação do fluxo em um fluido, a energia deve ser adicionada continuamente (SCHRAMM, 2006).

Os equipamentos que medem as propriedades de fluxo e viscoelásticas de sólidos, semi-sólidos e fluidos são chamados reômetros. Os equipamentos limitados apenas à medida do comportamento de fluxo viscoso são descritos como viscosímetros (SCHRAMM, 2006).

A medida de viscosidade dos líquidos requer primeiramente a definição dos parâmetros que estão envolvidos no fluxo. Então, devem-se encontrar condições adequadas de teste que permitam a medida das propriedades do fluxo objetivamente e reprodutivamente. Isaac Newton foi o primeiro a expressar a lei básica da viscosimetria, descrevendo o comportamento de fluxo de um líquido ideal:

$$\tau = \eta \, . \, \gamma \qquad \text{(Equação 2)}$$

em que, τ é a tensão de cisalhamento, η é a viscosidade e γ a taxa de cisalhamento.

O modelo de placas paralelas auxilia na definição da tensão de cisalhamento e da taxa de cisalhamento (Figura 8).

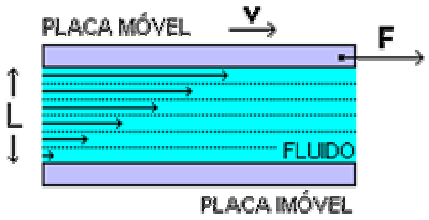


Figura 8. Fluxo entre duas placas paralelas. Disponível em: http://www.ufsm.br/gef/Atrito1.gif.

Uma força F aplicada tangencialmente em uma área A (área de cisalhamento A em contato com o líquido/fluido), sendo a interface entre a placa superior e o líquido abaixo, gera um fluxo na camada líquida. A velocidade do fluxo que pode ser mantida com uma força constante é controlada pela resistência interna do líquido, ou seja, por sua viscosidade.

$$\tau = \frac{\text{F(Força)}}{\text{A(Área)}} = \frac{\text{N(Newton)}}{\text{m}^2} = \text{Pa[Pascal]} \qquad \text{(Equação 3)}$$

A unidade Pascal tem substituído a unidade inicial dyna/cm^2, a qual era usada para tensões, especialmente em literaturas científicas (SCHRAMM, 2006).

A tensão de cisalhamento (τ) conduz o líquido para perfil de fluxo especial. A velocidade máxima do fluxo ($v_{máx}$) se encontra na camada superior (Figura 8). A velocidade diminui atravessando o corpo de prova até chegar a zero ($v_{min} = 0$) na camada ligada a placa estacionária. No fluxo laminar, uma camada infinitamente fina de líquido desliza sobre a

outra. O gradiente da velocidade na amostra é chamado de taxa de cisalhamento e é definido como uma diferencial (velocidade pela distância y) (SCHRAMM, 2006).

$$\gamma = \frac{dv}{dy} \qquad \text{(Equação 4)}$$

$$\gamma = \frac{m/s}{m} = \frac{1}{s} = [s^{-1}] \qquad \text{(Equação 5)}$$

A viscosidade dinâmica η é dada por:

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} \qquad \text{(Equação 6)}$$

$$\eta = \frac{N}{m^2}.\, s = Pa.s \qquad \text{(Equação 7)}$$

A correlação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento que define o comportamento de fluxo de um líquido é mostrada graficamente em um diagrama de τ na ordenada e γ na abscissa. Este diagrama é chamado de "curva de fluxo" (Figura 9).

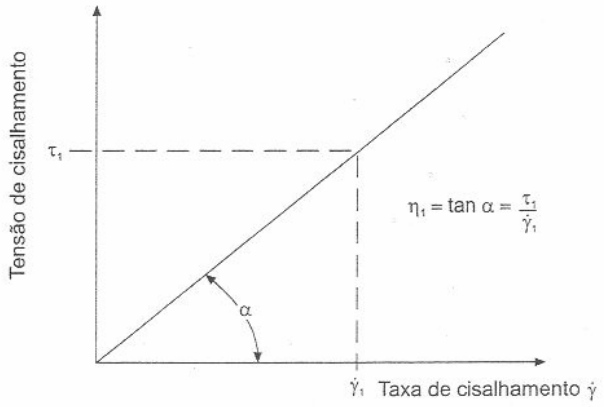


Figura 9. Curva de fluxo de um líquido Newtoniano (SCHRAMM, 2006).

Devido ao fato de a curva de fluxo para um líquido ideal ser uma reta, a razão de todos os pares de valores de τ e γ pertencentes a essa reta é constante. Isto significa que a viscosidade (η) não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento. Todos os líquidos para os quais essa afirmativa seja verdadeira são chamados de líquidos Newtonianos (curva 1 na Figura 10) (SCHRAMM, 2006).

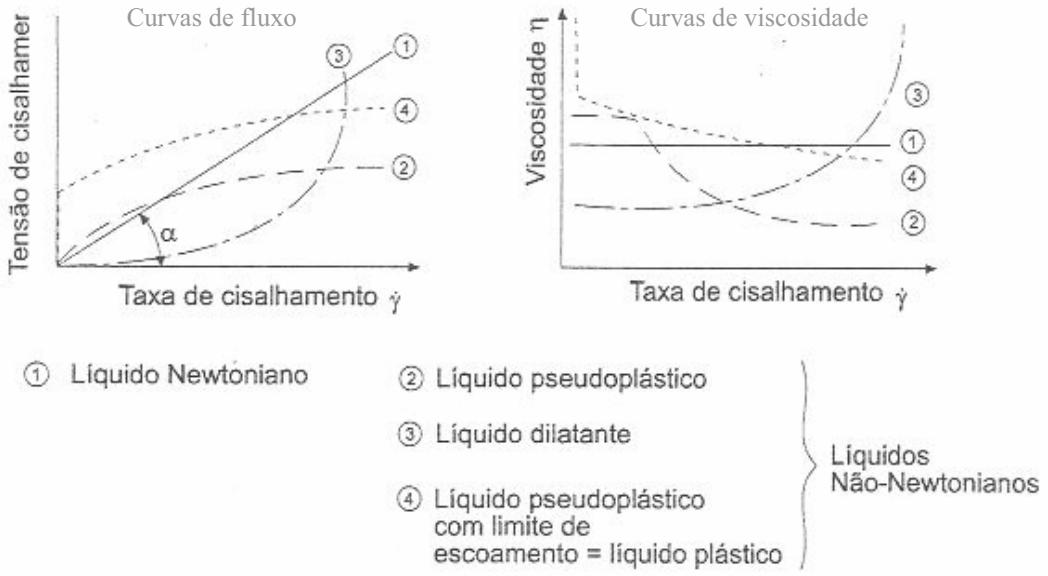


Figura 10. Vários tipos de comportamento de fluxo (SCHRAMM, 2006).

Todos os outros líquidos que não exibem esse comportamento de fluxo são chamados de líquidos não-Newtonianos.

a) Líquidos com comportamento pseudoplástico (curva 2 na Figura 10) apresentam uma diminuição na viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta. Tecnicamente, isso pode significar que, para certa força ou pressão, uma massa maior pode ser movimentada ou a energia para manter a mesma taxa de cisalhamento pode ser reduzida.

b) Líquidos dilatantes (curva 3 na Figura 10) são líquidos que sob certas condições de tensão ou taxa de cisalhamento apresentam um comportamento de fluxo dilatante, ou seja, aumentam a viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta.

c) Líquidos com comportamento plástico (curva 4 na Figura 10) são líquidos pseudoplásticos com valor de cedência. São na maior parte das vezes, dispersões que em repouso podem formar uma rede intermolecular/interpartículas mantida por forças ligantes. Essas forças restringem mudanças de posição de elementos de volume e dão ao material um caráter sólido com uma viscosidade extremamente alta. As forças externas, se menores do que aquelas que formam a rede, deformarão elasticamente a substância de caráter sólido. Somente quando as forças externas são fortes o suficiente para superar as forças de reticulação (superar a tensão de cisalhamento) a estrutura entra em colapso. Quando isso ocorre, os elementos de volume podem mudar de posição irreversivelmente: o sólido se torna um líquido.

Para fluidos pseudoplásticos, a diminuição da viscosidade com a taxa de cisalhamento crescente depende, principalmente, da orientação/alinhamento de moléculas ou partículas na direção do fluxo, superando o movimento Browniano de moléculas. Esta orientação se perde, se o cisalhamento diminui ou é interrompido. Plotando uma curva de fluxo de um líquido não Newtoniano sem limite de escoamento em função de uma taxa de cisalhamento crescente percebe-se que a curva com taxa de cisalhamento decrescente é sobreposta à curva com taxa de cisalhamento crescente: elas estão exatamente uma em cima da outra, e somente uma pode ser visualizada. Muitas dispersões não apresentam apenas este potencial para orientação, mas também para interações moleculares dependentes do tempo. Esse fato faz com que as ligações criem uma estrutura tridimensional em rede freqüentemente chamada de “gel”. Em comparação com as forças intermoleculares, essas ligações são relativamente fracas: elas se rompem facilmente quando a dispersão é submetida ao cisalhamento por um longo período de tempo (SCHRAMM, 2006).

Assim, um líquido tixotrópico é definido pelo seu potencial de ter uma estrutura de gel reversível, sempre que a substância for mantida em repouso por um período de tempo. Na curva de fluxo, a curva superior não está mais sobreposta à inferior. Agora se tem uma área de histerese entre as duas curvas, a qual define a magnitude da propriedade chamada tixotropia. Esta área tem dimensão de "energia" relacionada ao volume da amostra cisalhada, e indica a energia necessária para quebrar a estrutura tixotrópica (SCHRAMM, 2006).

A curva de viscosidade correspondente indica o que foi destacado: a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento como resultado da combinação entre a quebra da estrutura tixotrópica e a orientação molecular.

Por outro lado, líquidos com comportamento de fluxo reopético (anti-tixotrópico) são caracterizados pelo aumento da viscosidade durante o cisalhamento. Quando esses líquidos são deixados em repouso, eles recuperam sua forma original, ou seja, de baixo nível de viscosidade. A reopeticidade e a tixotropia são propriedades de fluxo opostas (SCHRAMM, 2006).

Os materiais podem apresentar tanto um comportamento de sólido quanto de liquido, dependendo de suas características relacionadas ao fator tempo natural de relaxamento "λ" e o tempo relacionado à duração do experimento "t". Viscosidade e elasticidade são, portanto, duas possibilidades de resposta dos materiais à tensão a que são submetidos. A determinação das propriedades elásticas de um fluido, sem negligenciar as propriedades viscosas, permite aos cientistas uma excelente elucidação a estrutura molecular deste fluido e os torna capazes de modificar esta estrutura de forma a adequá-la às exigências de uso (SCHRAMM, 2006).

O teste de fluência e recuperação é um teste de viscoelasticidade que permite diferenciar, de forma bastante satisfatória, as respostas elásticas das respostas viscosas. O ensaio introduz um parâmetro adicional de tempo de resposta (dependente da tensão) para o comportamento elástico e viscoso de sólidos e de fluidos (SCHRAMM, 2006).

O teste pode ser explicado por um exemplo simples. Na resposta elástica ao bater com um martelo em um pedaço de borracha vulcanizada, este "marca" a superfície da borracha, mas, devido à grande elasticidade da borracha, o martelo volta à posição inicial e a "marca" desaparece quase que instantaneamente: a superfície recupera a forma original, ou seja, a deformação elástica é completamente recuperável.

Já na resposta viscosa o comportamento é completamente diferente quando a água é derramada de uma garrafa em uma superfície lisa de uma mesa. A água forma uma poça sobre esta superfície e escoa até que a camada de água se torne bem fina: somente a tensão superficial da água impede que a poça fique com uma camada infinitesimalmente fina. A energia cinética da água atingindo superfície da mesa e a gravidade na camada de água superior da poça forçam a água a fluir. A água, por não ser elástica, nunca retorna à garrafa por força própria. A energia que faz a água fluir é completamente transformada em aquecimento cisalhante, isto é, em energia que não pode ser recuperada.

A resposta viscoelástica pode ser observada plotando a resposta de deformação como função do tempo, a curva da deformação mostra inicialmente um rápido crescimento que é seguido por um gradual decréscimo de inclinação. Esta curva finalmente se converte assintoticamente (em minutos ou pouco mais) em uma tangente com inclinação constante: o fluido mostra uma resposta completamente viscosa à tensão aplicada (SCHRAMM, 2006).

A recuperação, assim como as fases de fluência, é dependente do tempo. Para determinar com precisão o percentual de viscosidade e de elasticidade, teoricamente, é necessário um tempo de relaxação de tamanho infinito. Nos testes práticos para a maioria dos fluidos pode-se observar que a curva de recuperação já está suficientemente nivelada depois de 5 ou 10 minutos, relacionada ao nível de deformação final (SCHRAMM, 2006).

A compliança é uma função material semelhante à viscosidade η no fluxo em estado estacionário. Ela define quão complacente é uma amostra. Quanto mais alta for a compliança,

mais fácil será deformar uma amostra por uma tensão aplicada. Se a amostra testada é submetida às condições de teste que mantêm a interação tensão/cisalhamento na região elástica, a compliança será independente da tensão aplicada. Este fato é utilizado para definir os limites para o teste de fluência e recuperação de fluidos viscoelásticos com limites de viscoelasticidade linear (SCHRAMM, 2006).

2.4.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

A luz Sinchroton é a intensa radiação eletromagnética produzida por elétrons de alta energia num acelerador de partículas. Esta luz abrange uma ampla faixa do espectro eletromagnético: raios-X, luz ultravioleta e infravermelha, além da luz visível, que sensibiliza o olho humano. É com esta luz que os cientistas estão descobrindo novas propriedades físicas, químicas e biológicas existentes em átomos e moléculas, os componentes básicos de todos materiais.

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) opera no comprimento de onda dos raios-X e é destinado a análises de materiais heterogêneos, caracterização de estruturas fractais, materiais microporosos, compósitos nanocristalinos, polímeros e blendas, membranas biológicas e proteínas em solução. Sua aplicação básica é em sistemas biológicos e materiais nanoestruturados e no desenvolvimento de novos materiais.

A utilização dos raios-X de comprimento de onda de aproximadamente 1,4 Å é um meio de o modelo de interferência coerente desses materiais ser substituído por ângulos de espalhamento baixos, portanto o uso de SAXS para a descrição deste tipo de experimento. O desenvolvimento de fontes de raios-X de alta intensidade tem aberto o cenário e permitido novas oportunidades do uso de SAXS. Até o presente, o trabalho principal tem sido focado

nos estudos biológicos mas há um interesse crescente na aplicação nas ciências dos materiais (DORE et. al., 1995).

A linha de fonte de luz para realização de estudos de SAXS nos laboratórios de radiação Sinchrotron oferece uma fonte de raios-X monocromática e com esta faz-se estudos de materiais espalhadores e, também, análises *in situ* de transformações estruturais com grande tempo de resolução. Além disso sob a condição de um alto fluxo de fótons, a natureza branca do espectro de emissão da radiação Sinchrotron permite-nos usar o efeito de espalhamento em muitas aplicações (CRAIEVICH, 2002).

Através da irradiação de uma amostra em forma de uma plaqueta relativamente fina, colocada perpendicularmente a um feixe monocromático, na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido, pode-se observar o espalhamento de suas partículas a baixos ângulos. No caso dos raios-X, o espalhamento deve-se às heterogeneidades na densidade eletrônica das estruturas do sistema. A dependência angular da intensidade espalhada por uma heterogeneidade está diretamente relacionada à densidade eletrônica através da transformada de Fourier. Considerando uma partícula de tamanho e forma qualquer, a intensidade espalhada I(q) é proporcional aos fatores de forma P(q) e de estrutura S(q) da partícula, onde q é o vetor de espalhamento (URBAN, 2004).

A intensidade de raios-X espalhada é experimentalmente determinada como uma função do vetor de espalhamento q o qual é dado por $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$, em que λ é o comprimento de onda dos raios-X e θ é a metade do ângulo de espalhamento ε (ε: ângulo entre as direções espalhadas e transmitidas do feixe). Para ângulos pequenos $q \approx (2\pi/\lambda)\ \varepsilon$ (CRAIEVICH, 2002).

Em um sistema diluído, em que as partículas são isoladas uma das outras e não interagem entre si, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma P(q) das

diferentes partículas. A intensidade resultante é a soma das contribuições de cada partícula, de modo que para n partículas distribuídas ao acaso tem-se:

$$I(q) \propto \sum_{n} P_{n}(q) \qquad \text{(Equação 8)}$$

Em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si e o espalhamento medido refletirá sua geometria e o arranjo entre elas. Para N partículas idênticas, distribuídas ao acaso, a intensidade espalhada é escrita da seguinte forma:

$$I(q) = N.P(q).S(q) \qquad \text{(Equação 9)}$$

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 contêm todas as informações sobre as interações entre as partículas. Entretanto, S(q) pode assumir formas muito variadas, de acordo com o arranjo das entidades espalhadoras e é difícil separar as contribuições P(q) e S(q). De um modo geral, quando a curva de espalhamento apresenta um máximo na intensidade de espalhamento a baixos ângulos, podemos relacioná-lo com a presença de correlações entre as posições dos centros espalhadores. Podemos calcular uma distancia média, d, entre as partículas vizinhas (ou dois planos paralelos) a partir do valor da posição do máximo (q_{max} – máximo da intensidade espalhada), empregando a relação (GLATTER, 1982 *apud* URBAN, 2004; LECOMTE, 1988 *apud* URBAN, 2004; CRAIEVICH, 2002):

$$d = \frac{2\pi}{q_{max}} \qquad \text{(Equação 10)}$$

Esta equação não é uma equação exata para sistemas desordenados porque a distância média também depende de um tipo particular de arranjo ao redor de cada partícula. Mesmo assim pode ser aplicada como uma estimativa semiquantitativa na caracterização de tendências de transformações estruturais (CRAIEVICH, 2002).

O vetor de espalhamento q, em amostras semelhantes a cristalitos de orientações aleatórias, deve apresentar pico máximo na intensidade espalhadora I(q). Se um suficiente número desses picos é observado, suas posições relativas no eixo-q revelam a periodicidade da estrutura. Entretanto, essa condição não é única para determinar a periodicidade das mesofases (lamelares, hexagonais, cúbicas) (URBAN, 2004).

A fase lamelar é caracterizada por uma seqüência eqüidistante de reflexões $q_n = 2\pi n/L$, onde n = 1, 2, 3, ... e L é o período lamelar. As posições de reflexão seguem uma seqüência $n^{1/2}$. No caso hexagonal 2-D, os primeiros valores são n = 1, 3, 4, 7, 9, 12, 13, ..., enquanto as reflexões cúbicas ocorrem nas posições $n = h^2 + k^2 + l^2$, onde h, k e l são números inteiros (índices de Müller) (URBAN, 2004).

O interesse na utilização da técnica de SAXS na caracterização de sistemas micro e nanoestruturados é explicado pelo fato de existir a possibilidade de exploração dos dados na determinação do tamanho médio e da distância entre os objetos espalhadores, como gotículas e micelas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados. Oferece a vantagem de caracterizar materiais que tem distância entre objetos espalhadores além do limite de trabalho da difração de raios-x.

Assim sendo, da curva de espalhamento de raios-X, pode-se obter informações sobre o tamanho, a forma, a quantidade e o arranjo dos objetos espalhadores.

2.4.5 Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma técnica muito usada para a verificação de estruturas internas de um sistema e fundamenta-se em um campo elétrico de raio luminoso polarizado que uma substância birrefringente é capaz de provocar (RESENDE, 2004).

O microscópio de luz polarizada é projetado para observar estruturas que são principalmente visíveis devido ao seu caráter óptico anisotrópico. Com a finalidade de realizar essa tarefa, o microscópio deve ser equipado com um polarizador posicionado no trajeto da luz, antes do material analisado, e um analisador (um segundo polarizador) localizado no caminho óptico entre a abertura traseira da objetiva e os tubos de observação ou o ponto da câmera. O contraste da imagem origina-se da interação da luz plano-polarizada com a substância birrefringente para produzir dois componentes individuais da onda, sendo cada um polarizado em planos mutuamente perpendiculares (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 2003).

O comportamento de uma substância, ou composto, em relação ao efeito que causa na luz polarizada pode ser classificado como anisotrópico ou isotrópico. Se o feixe de luz polarizada que atravessar a substância, ou composto, for dividido em dois feixes de planos perpendiculares, é porque as direções da propagação da luz no interior da substância não são equivalentes e o comportamento é conhecido como anisotropia. Se a substância, ou composto, permitir a passagem da luz polarizada sem modificação da sua propagação, tem-se o fenômeno de isotropia (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 2003; RESENDE, 2004).

A microscopia de luz polarizada é apropriada para a detecção de cristais líquidos ou algumas mesofases, já que estes são birrefringentes, assim como os cristais verdadeiros. O arranjo cúbico apresenta-se isotrópico, somente sendo detectado com outras técnicas de análise, como difração de raios-X de baixo ângulo (MÜLLER-GOYMANN, 2004). O arranjo hexagonal apresenta uma forma estriada típica que o distingue facilmente do lamelar, quando

observados ao microscópio com luz polarizada. Os agregados de tensoativo organizam-se em cilindros, que podem se empacotar formando uma fase fluida bidimensional. Já o arranjo lamelar apresenta-se com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando espécies de ondas e estruturas denominadas "cruzes-de-malta" que são observadas ao microscópio com luz polarizada (MÜLLER-GOYMANN, 2004; RESENDE, 2004).

2.5 Modelo de estudo *in vitro* para avaliar a absorção intestinal de fármacos

A biodisponibilidade adequada de fármaco administrado por via oral é um dos mais importantes objetivos da indústria farmacêutica durante a fase de desenvolvimento de novos produtos e representa a quantidade do fármaco absorvido a partir da forma farmacêutica e a velocidade com que este processo ocorre. Aumentar a biodisponibilidade e reduzir a variabilidade da quantidade absorvida é o objetivo de numerosos estudos. Alcançar estes objetivos requer conhecimento dos processos fisiológicos da absorção, informações das propriedades físicas e químicas do fármaco e do seu comportamento na forma farmacêutica específica (BARTHE et. al., 1999).

Portanto, é importante avaliar, durante o período de desenvolvimento de novos medicamentos, o mecanismo de absorção intestinal do fármaco a partir da forma farmacêutica.

A técnica do saco intestinal invertido foi descrita primeiramente por Wilson e Wiseman (1954) e usada para estudar o transporte de açúcares e aminoácidos. Este sistema tem sido utilizado por muitos autores ao longo dos tempos para avaliar a absorção intestinal. É uma técnica simples, rápida, reprodutível e de baixo custo. É um sistema de dois compartimentos que permite calcular a cinética de absorção pelo tecido epitelial e a transferência através da camada epitelial, pela medida da quantidade de fármaco dentro do saco intestinal no final do período de incubação. É possível identificar os parâmetros

importantes na liberação do fármaco da matriz farmacêutica e assim tomar uma decisão racional sobre a melhor forma de aumentar a permeação do fármaco através da membrana (CINTO, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados estabilizados pelo tensoativo não-iônico álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados estabilizados pelo tensoativo não-iônico álcool cetílico etoxilado e propoxilado, fase oleosa de ácido oléico, água como fase aquosa;
- ✓ Avaliar a incorporação do fluconazol;
- ✓ Avaliar a absorção intestinal do fluconazol pelo método do saco intestinal invertido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes, solventes e matérias-primas

- ✓ Acetonitrila grau CLAE (J. T. Baker®)
- ✓ Ácido glicoquenodeoxicólico (Sigma®)
- ✓ Ácido fosfórico P.A. (Berzog®)
- ✓ Ácido oléico (Sinth®)
- ✓ Água purificada
- ✓ Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Procetyl AWS® Croda®)
- ✓ Fluconazol (Purifarma®)
- ✓ Fosfato de potássio dibásico (Vetec®)
- ✓ Fosfato de potássio monobásico (Dinâmica®)
- ✓ Metanol grau CLAE (J. T. Baker®)
- ✓ TC 199 – cloreto de sódio 145 mM, cloreto de potássio 4,56 mM, cloreto de cálcio diidratado 1,25 mM, fosfato de sódio monobásico 5 mM, (pH 7,4)

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- ✓ Agitador (Phoenix®)
- ✓ Balança semi-analítica (Ohaus® – AS200)
- ✓ Centrífuga (Du Pont® – Sorvall TC 6)
- ✓ Condutivímetro (CORNING® - 441)

- ✓ Equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência (modelo ProStar – Varian®) composta por:
    - o Duas bombas de injeção de solvente (ProStar®/Dynamax® 210/215);
    - o Detector espectrofotométrico com fotodiodo (ProStar® 330 UV-VIS PDA);
    - o Forno controlador de temperatura da coluna;
    - o Sistema de integração (Star®);
    - o Sistema de injeção (Rheodyne® VS 7125) – *loop* de 100 μL;
    - o Coluna para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência C_{18}.
- ✓ Espectrofotômetro (HP® 8453)
- ✓ Membrana de acetato de celulose 0,2 μm (Sartorius®)
- ✓ Microscópio óptico de luz polarizada (Leica Leitz® DMRXE)
- ✓ Microseringa de 100 μL para CLAE (Agilent®)
- ✓ Purificador de água (MILLIPORE® – mod. Milli-Q Plus)
- ✓ Refratômetro (Carl Zeiss Jena®)
- ✓ Reômetro (modelo TA Instruments Carri–Med® CLS 100)

4.1.3 Animais

- ✓ Ratos albinos, linhagem *Wistar*, machos adultos, 210-250 g.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Metodologia analítica para quantificação do fluconazol por espectrofotometria

A quantificação do fluconazol foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta. O espectro de absorção do fluconazol em metanol por espectrofotometria, a curva analítica do fluconazol em metanol por espectrofotometria e a curva analítica do fluconazol em água por espectrofotometria foram obtidos.

4.2.1.1 Espectro de absorção do fluconazol em metanol por espectrofotometria

Preparou-se solução metanólica de fluconazol de concentração 100 μg/mL, homogeneizou-se e efetuou-se a leitura espectrofotométrica na faixa de comprimentos de onda de 200 a 400 nm.

4.2.1.2 Curva analítica do fluconazol em metanol por espectrofotometria

A curva analítica do fluconazol em metanol foi obtida diluindo uma solução estoque de fluconazol em metanol contendo 2 mg/mL. Adicionaram-se 2 mL de metanol em uma cubeta de espectrofotômetro e foram adicionados volumes crescentes da solução metanólica de fluconazol (porções de 50 μL). As leituras espectrofotométricas foram realizadas em triplicata no comprimento de onda de 261 nm.

Elaborou-se um gráfico relacionando as absorbâncias em função da concentração de fluconazol. Com os valores experimentais, calculou-se a equação da reta e o coeficiente de regressão linear.

4.2.1.3 Curva analítica do fluconazol em água por espectrofotometria

A curva analítica do fluconazol em água foi obtida diluindo uma solução estoque de fluconazol em água contendo 2 mg/mL. Adicionaram-se 2 mL de água em uma cubeta de espectrofotômetro e foram adicionados volumes crescentes da solução estoque de fluconazol (porções de 100 μL). As leituras espectrofotométricas foram realizadas em triplicata no comprimento de onda de 261 nm.

Elaborou-se um gráfico relacionando as absorbâncias em função da concentração de fluconazol. Com os valores experimentais, calculou-se a equação da reta e o coeficiente de regressão linear.

4.2.2 Determinação da solubilidade do fluconazol nos componentes do sistema

O ensaio de solubilidade do fluconazol foi realizado segundo a metodologia descrita por Higushi e Connors (1965) nos seguintes solventes: água, ácido oléico e álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP.

A solubilidade foi determinada adicionando-se excesso de fármaco aos solventes, em frascos lacrados, protegidos da luz e submetidos à agitação constante por 48 horas e sob temperatura controlada a 25 °C. Finalizada a agitação as amostras foram centrifugadas. As soluções de PRO e ácido oléico foram e adequadamente diluídas em metanol, enquanto que a solução aquosa foi adequadamente diluída em água. As soluções resultantes foram filtradas e submetidas a leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 261 nm.

Para calcular os valores de solubilidade do fluconazol em PRO e ácido oléico utilizou-se a equação da curva analítica do fluconazol em metanol obtida por espectrofotometria, enquanto que para a solubilidade do fluconazol em água utilizou-se a equação da curva

analítica do fluconazol em água, também obtida por espectrofotometria. As determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.3 Desenvolvimento dos sistemas

4.2.3.1 Construção de diagrama de fases

Para a construção do diagrama de fases foi utilizado o método de titulação aquosa. Para tanto, nove formulações na quantidade de 5 g cada, compostas por 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 % de tensoativo e concentrações decrescentes de fase oleosa, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10 %. As formulações foram tituladas com água purificada utilizando micropipetas automáticas com agitação após cada adição para a homogeneização dos componentes.

Durante o processo de titulação, os tipos de sistemas formados e suas viscosidades foram analisados visualmente. Os volumes de água adicionados às preparações e que provocaram tais alterações foram anotados.

Após a titulação aquosa foram calculadas as concentrações de cada componente da formulação obtendo-se pontos os quais foram utilizados na delimitação das diferentes regiões existentes no diagrama de fases. Dessa forma delimitaram-se as regiões de microemulsão (ME), sistemas viscosos transparentes (SVT), sistemas opacos (SO), emulsão (EM), emulsão líquida (EL) e separação de fases (SF).

4.2.3.2 Preparação das formulações selecionadas

Os componentes das formulações foram pesados em frascos de vidro com tampa, em balança semi-analítica (Ohaus AS-200). As amostras foram submetidas à agitação constante por 48 horas (Agitador Phoemix), sob temperatura controlada de 25 °C.

4.2.4 Caracterização física dos sistemas de interesse

Sistemas constituídos de PRO, como tensoativo, ácido oléico, como fase oleosa e água foram desenvolvidos como sistemas potenciais para administração oral. Para isso optamos por selecionar pontos do diagrama de fases em que o sistema esteja estruturado na forma de microemulsão e, portanto, fluido, com a menor concentração possível de tensoativo. Quanto em contato com água ou meio aquoso, este tensoativo forma um sistema bastante viscoso, formando cristais líquidos. A inclusão do ácido oléico ao sistema torna o sistema menos viscoso. O inverso também ocorre, ou seja, sistemas microemulsionados quando em contato com o meio aquoso tem a propriedade de adquirir viscosidade e tem a tendência de formar fases líquidas cristalinas com a crescente concentração de água. Assim os pontos selecionados foram aqueles nos quais há uma um pequeno limite de transição entre a região de microemulsão e a região de separação de fases, para que a formulação escolhida ao entrar em contato com os líquidos biológicos, incorpore estes líquidos e separe fases para a liberação do fármaco e não venha a formar fases liquidas cristalinas, que poderia promover uma retenção maior do fármaco.

As formulações selecionadas foram caracterizadas por estudos de índice de refração, condutividade eletrolítica, comportamento reológico, espalhamento de raios-X a baixo ângulo e microscopia de luz polarizada.

4.2.4.1 Determinação do índice de refração

A determinação do índice de refração foi realizada no Refratômetro Carl Zeiss, conforme metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (1988).

A temperatura durante as leituras foi ajustada e mantida em 20 ± 0,5 ºC. O equipamento foi calibrado no início do experimento com água destilada, cujo índice de refração é de 1,3330 a 20 ºC. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.4.2 Determinação da condutividade eletrolítica

Os ensaios para determinação da condutividade eletrolítica foram conduzidos conforme metodologia preconizada pela *British Pharmacopeia* (2001), utilizando condutivímetro Corning 441. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4.3 Determinação do comportamento reológico

Foram feitos ensaios de comportamento de fluxo e de fluência e recuperação, utilizando o reômetro CARRI-MED CLS 100 nas formulações escolhidas sem fármaco e nas mesmas com fármaco na concentração de 30 mg/g, considerando os seguintes parâmetros:

O equipamento (Figura 11) funciona pelo princípio de rotação de um dispositivo de geometria cone e placa e oferece os valores da tensão e do gradiente de cisalhamento, a partir dos quais torna-se possível a análise reológica oscilatória dos materiais. O diâmetro do cone utilizado é de 4 cm com gap de 55 μm .

O cone é constituído por um prato biselado formando um ângulo ψ com o prato. Mesmo para os sistemas mais grosseiros o ângulo não ultrapassa 10º (LACHMAN;

LIEBERMAN; KANIG, 2001). Para o estudo do nosso sistema utilizamos um cone de ângulo ψ de 2°.

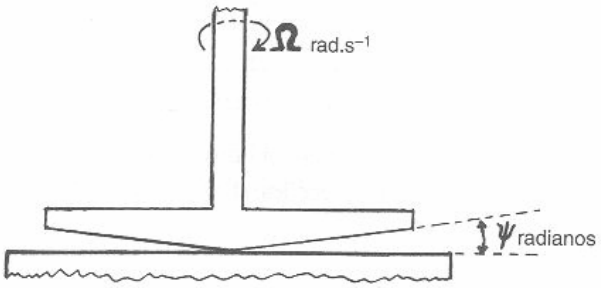


Figura 11. Ilustração do dispositivo de placa e cone do reômetro (WOOD, 2001).

O equipamento possui um termostato que permite regular a temperatura dos ensaios. O ensaio de escoamento foi conduzido nas temperaturas de 25 °C e 37 °C.

Para a determinação das propriedades reológicas de escoamento, iniciou-se as leituras com 0 s^{-1} de velocidade de cisalhamento, o qual foi sendo aumentado gradualmente até 300 s^{-1} e, posteriormente, diminuído até o valor inicial.

O teste de fluência e recuperação foi realizado na temperatura de 25 ºC. Na fase de fluência o tempo do ensaio foi de três minutos e na fase de recuperação também de três minutos.

A quantidade de amostra utilizada em ambos os ensaios foi a suficiente para cobrir a superfície coberta pelo cone.

4.2.4.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

A evolução estrutural das amostras em função do teor de água, de tensoativo e presença ou ausência de fármaco foi analisada por SAXS (espalhamento de raios-X a baixo ângulo). Os dados foram coletados na estação de medidas D11-A SAS do Laboratório

Nacional de Luz Sincroton (LNLS) em Campinas, que é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1,608 Å. O espalhamento do parasita (espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra) foi subtraído da intensidade total da amostra.

Como o feixe de raios-X incidente é pontual no plano de detecção e na faixa de resolução do detector, não foi necessária a realização de desconvolução das curvas de intensidade.

4.2.4.5 Análise por microscopia de luz polarizada

Formulações recentemente preparadas com e sem fármaco foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em Microscópio óptico Leica Leitz® DMRXE sob luz polarizada.

4.2.5 Determinação da capacidade de incorporação do fluconazol nos sistemas de interesse

A 5 g de cada formulação (1 a 9) foi adicionado o fármaco, sob agitação, até formação de precipitado. Após certificação de excesso de fármaco a amostra foi deixada sob agitação por um período de 48 horas.

Finalizada a agitação, a amostra foi centrifugada (centrífuga Du Pont – Sorvall TC 6) por 40 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi adequadamente diluído em metanol para posterior quantificação por espectrofotômetro em λ = 261 nm. Para calcular os valores de solubilidade do Fluconazol nas formulações (incorporação) utilizou-se a equação da curva analítica do fluconazol em metanol obtida por espectrofotometria. As leituras foram

realizadas com branco de solução metanólica das formulações de microemulsão sem o fármaco.

4.2.6 Estudo da influência dos sais biliares na estrutura do sistema

As formulações de números 1 a 9 foram preparadas e posteriormente tituladas com solução 4mM de Ácido Glicoquenodeoxicólico (sob a forma de seu sal sódico) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7. Após cada adição de tampão, monitorou-se o sistema visualmente.

A solução 4mM de Ácido Glicoquenodeoxicólico (sob a forma de seu sal sódico) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7 foi utilizada para simular o fluido intestinal endógeno, técnica adaptada de Kossena et. al. (2004).

Tampão fosfato 0,1 M, pH 7 foi preparado dissolvendo 13,6 g de fosfato de potássio dibásico e 4 g de fosfato de potássio monobásico em 1000 mL de água. Ajustou-se o pH com ácido fosfórico 18 N ou hidróxido de potássio 10 N para pH 7,0 ± 0,2.

4.2.7 Avaliação do transporte intestinal de fluconazol

4.2.7.1 Validação da metodologia analítica empregada na determinação do fluconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A validação foi realizada para garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atendesse às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, os parâmetros de validação estudados foram especificidade, linearidade, precisão, recuperação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ);

Essa metodologia foi empregada na quantificação do fluconazol no estudo de absorção intestinal pelo método do saco intestinal invertido.

As condições cromatográficas empregadas nos ensaios estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas na análise do fluconazol.

Parâmetro	**Condição Cromatográfica**
Coluna	Fase Estacionária: octadecilsílica – C_{18}
Detecção	UV, 261 nm
Fase Móvel	Acetonitrilia : Água (25 : 75, V/V)
Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção	100 µL

A especificidade do método foi determinada com o objetivo de verificar a interferência de algum componente da análise quantitativa do fluconazol presente na solução em fase móvel ou na amostra do interior do saco intestinal, parâmetros de especificidade foram estabelecidos através da comparação dos resultados obtidos nas diferentes análises cromatográficas.

A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva analítica de fluconazol em fase móvel (Acetonitrila : Água, 25 : 75, v/v). A partir de soluções estoque contendo 2 mg/mL de fluconazol em fase móvel, foram preparadas diluições correspondentes às concentrações de 31,25; 62,50; 125; 250; 500 µg/mL. Para cada concentração foram preparadas triplicatas e as soluções resultantes foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,2 µm e analisadas por CLAE.

A curva analítica foi construída, relacionando a concentração de fluconazol à resposta obtida por CLAE, através dos valores da área dos picos correspondentes às concentrações de fluconazol.

A partir da solução estoque de fluconazol em fase móvel na concentração de 2 mg/mL, foram preparadas soluções de fluconazol em fase móvel nas concentrações de 500 e 62,5 µg/mL. As soluções foram filtradas utilizando membrana de acetato de celulose 0,2 µm e analisadas por CLAE. A análise foi realizada em triplicata.

Para o ensaio de recuperação preparou-se soluções de fluconazol nas concentrações de 2000; 500 e 62,5 µg/mL. As amostras foram homogeneizadas e filtradas em membrana de acetato de celulose 0,2 µm e quantificadas por CLAE.

A recuperação foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do fármaco, acrescida dos intervalos de confiança, utilizando a equação:

$$R\% = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \qquad \text{(Equação 11)}$$

Os LD e LQ foram estabelecidos através da análise de concentrações decrescentes da solução de fluconazol 2 mg/mL até atingir os respectivos limites. A análise foi realizada em triplicata.

4.7.7.2 Avaliação da absorção intestinal do fluconazol pelo método do saco intestinal invertido

A análise da absorção intestinal utilizando como modelo a técnica do saco intestinal invertido foi realizada para avaliar a eficiência do transporte de fluconazol através da membrana intestinal.

Ratos machos adultos (210-250 g), mantidos em jejum por 8 h, foram anestesiados com pentobarbital sódico e o intestino delgado imediatamente dissecado, lavado com solução TC 199 a 10 ºC e colocado em meio de cultura para tecido (TC 199) na mesma temperatura e

oxigenado (O_2 : CO_2 – 95 : 5). O intestino foi então cuidadosamente invertido com auxilio de uma haste flexível (~ 2,5 mm de diâmetro) com sua extremidade protegida com um tecido fino (mini brush), uma das extremidades foi fechada utilizando fio de sutura, de forma que o comprimento do segmento intestinal fosse de 8,0 cm. A incubação foi realizada em TC 199 à 37 ºC, sob agitação suave do sistema previamente oxigenado. As concentrações de fluconazol foram determinadas por CLAE após filtração com membrana de acetato de celulose (0,22 μm).

Foi avaliada a absorção do fluconazol na forma de solução aquosa 15 mg/g e quando incorporado nas formulações de números 3 e 5 na concentração de 15 mg/g. Para tanto, foram adicionadas ao meio de incubação (19 g de TC 199) 1 g de cada formulação (solução aquosa e formulações de números 3 e 5). Após 90 minutos de incubação, as quantidades de fluconazol presentes no espaço serosal foram determinadas. As amostras foram diluídas na proporção de 1:2 em fase móvel antes de serem analisadas por CLAE. Para cada formulação avaliada e para a solução aquosa do fármaco foram feitas 5 determinações a partir de cinco animais diferentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Metodologia analítica para quantificação do fluconazol por espectrofotometria

5.1.1 Espectro de absorção do fluconazol em metanol por espectrofotometria

O espectro de absorção do fluconazol em metanol está representado na Figura 12 e foi obtido contra branco de metanol.

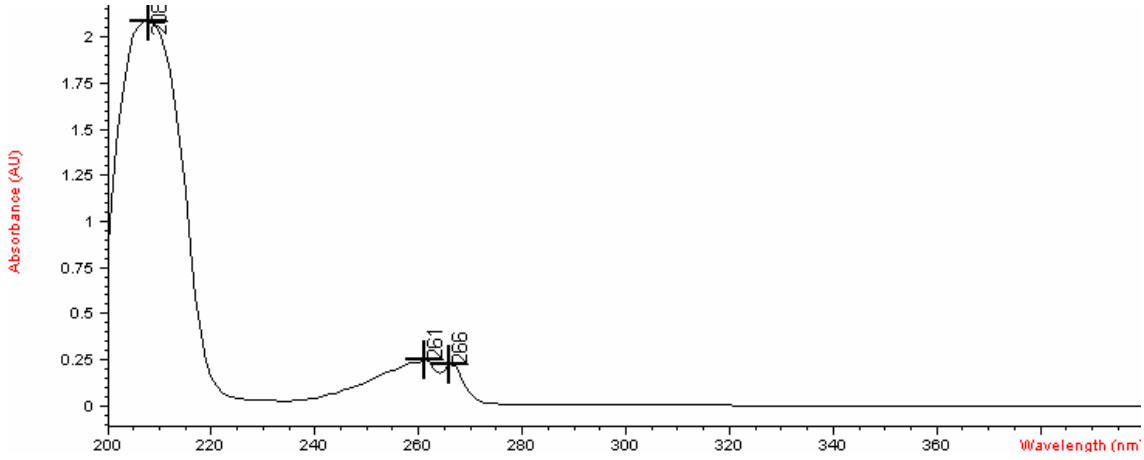


Figura 12. Espectro de absorção por espectrofotometria do fluconazol em metanol 100 µg/mL.

O espectro de absorção do fluconazol demonstra três picos de absorção, o máximo de 208 nm, e outros dois em 261 nm e 266nm.

5.1.2 Curva analítica do fluconazol em metanol por espectrofotometria

A curva analítica do fluconazol em metanol foi obtida através de leituras espectrofotométricas, em triplicata, e comprimento de onda de 261 nm.

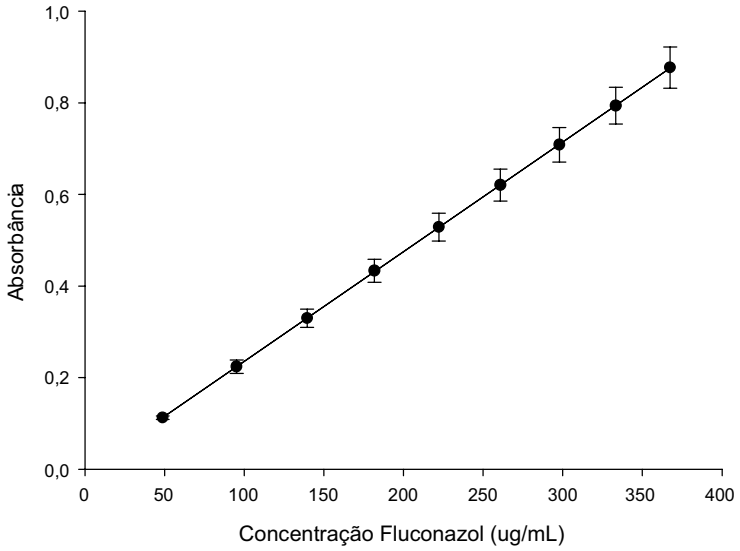


Figura 13. Curva analítica do fluconazol em metanol, obtida por espectrofotometria em 261 nm. As barras representam o desvio padrão das três determinações.

A equação representativa da regressão linear foi **y = 0,002395 x – 0,003874** com coeficiente de regressão linear de $r^2 = 0,999986$.

A Tabela 2 mostra os valores das absorbâncias das várias concentrações utilizadas para a construção da curva analítica.

Tabela 2. Valores das absorbâncias das soluções metanólicas de fluconazol obtidas por espectrofotometria no comprimento de onda de 261 nm (média de três determinações), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

Concentração (µg/mL)	Amostra			Absorbância Média	DP	CV%
	1	2	3			
48,78	0,11605	0,10873	0,11322	0,11267	0,0037	3,28
95,24	0,23849	0,20921	0,22489	0,22420	0,0146	6,54
139,53	0,35069	0,31051	0,32796	0,32972	0,0201	6,11
181,81	0,45969	0,40988	0,43110	0,43356	0,0250	5,77
222,22	0,56151	0,50209	0,52237	0,52866	0,0302	5,71
260,87	0,65759	0,58887	0,61489	0,62045	0,0347	5,59
297,87	0,74869	0,67414	0,70254	0,70846	0,0376	5,31
333,33	0,83670	0,75655	0,78815	0,79380	0,0403	5,09
367,35	0,92452	0,83463	0,87208	0,87708	0,0451	5,15

5.1.3 Curva analítica do fluconazol em água por espectrofotometria

A curva analítica do fluconazol em água foi obtida através de leituras espectrofotométricas, em triplicata, e comprimento de onda de 261 nm.

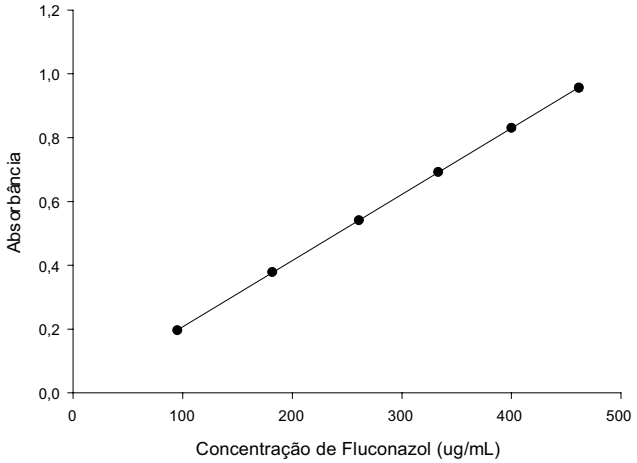


Figura 14. Curva analítica do fluconazol em água, obtida por espectrofotometria em 261 nm (n = 3). As barras representam o desvio padrão das três determinações.

A equação representativa da regressão linear foi **y = 0,002075x – 0,000854** com coeficiente de regressão linear de $r^2 = 0,999985$.

A Tabela 3 mostra os valores das absorbâncias das várias concentrações utilizadas para a construção da curva analítica.

Tabela 3. Valores das absorbâncias das soluções aquosas de Fluconazol obtidas por espectrofotometria no comprimento de onda de 261 nm (média de três determinações), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

Concentração (µg/mL)	Amostra			Absorbância Média	DP	CV%
	1	2	3			
95,24	0,19177	0,19925	0,19576	0,19559	0,0037	1,91
181,81	0,38086	0,37761	0,37426	0,37758	0,0033	0,87
260,87	0,54309	0,54120	0,53793	0,54074	0,0026	0,48
333,33	0,69724	0,69297	0,68625	0,69215	0,0055	0,80
400,00	0,83735	0,83009	0,82251	0,82998	0,0074	0,89
461,53	0,96408	0,95653	0,94700	0,95587	0,0086	0,89

5.2 Solubilidade do fluconazol nos componentes do sistema

A quantidade de fármaco solúvel nos componentes foi calculada a partir da equação das retas obtidas pelas curvas analíticas do fluconazol em metanol e em água por espectrofotometria e do valor das absorbâncias das soluções (Tabela 4).

A Figura 15 exibe uma comparação entre os valores de solubilidade do Fluconazol nos componentes do sistema, ácido oléico, água e PRO.

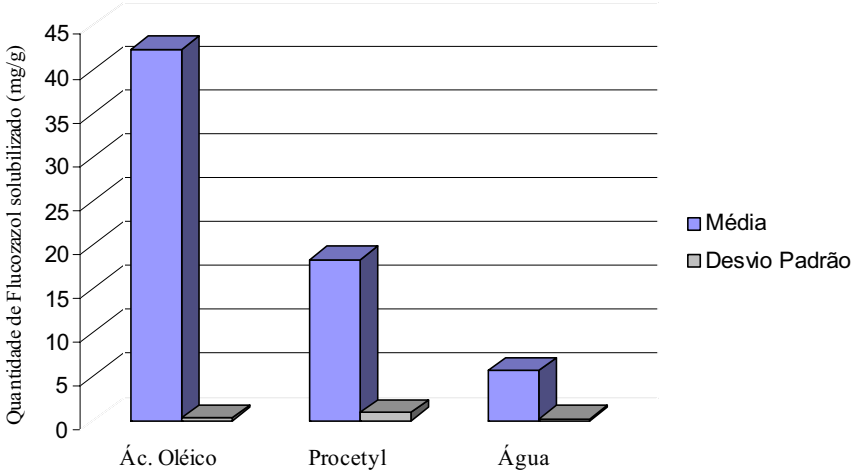


Figura 15. Solubilidade do Fluconazol nos componentes do sistema, ácido oléico, PRO e água (n = 3).

Podemos perceber que, dentre os componentes do sistema, o fluconazol é mais solúvel na fase oleosa, constituída de ácido oléico, cerca de 40 mg/g. Já a solubilidade do fluconazol no tensoativo, PRO, é cerca da metade da solubilidade no ácido oléico, 20 mg/g. E por fim, a solubilidade do fluconazol na água é relativamente baixa, cerca de 5 mg/g.

Como o fluconazol apresenta solubilidade em todos os componentes do sistema podemos imaginar que ele irá particionar entre os componentes e não ficará restrito em uma das fases e sim estará presente tanto nas fases aquosa, oleosa e distribuído no filme interfacial.

Tabela 4. Solubilidade do fluconazol nos componentes do sistema (ácido oléico, PRO e água) (mg FLU/g solvente), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%) (n = 3).

Solvente	**Fluconazol (mg/g)**				**DP**	**CV%**
	1	**2**	**3**	**Média**		
Ácido Oléico	42,4022	41,9000	42,4209	42,2410	0,2955	0,70
PRO	19,2124	17,4266	18,3757	18,3382	0,8935	4,87
Água	5,8314	5,5400	5,5500	5,6405	0,1654	2,93

5.3 Desenvolvimento dos sistemas

5.3.1 Construção de diagrama de fases

O diagrama de fases descreve em que condição experimental é possível se obter microemulsões e as regiões limites de transição entre emulsões, fases separadas, microemulsões O/A e A/O (OLIVEIRA et. al., 2004) e cristais líquidos.

A titulação aquosa foi realizada, empregando a mistura óleo/tensoativo nas proporções: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1. Os sistemas empregados neste trabalho são constituídos de óleo/tensoativo/água (ácido oléico/PRO/água) então, o diagrama obtido é um diagrama ternário, com cada um dos componentes representados em cada um dos vértices do diagrama.

Após a titulação aquosa, foram calculadas as concentrações de cada componente da formulação. Então plotou-se os pontos em que se observou, visualmente, a mudança de fases.

Os resultados mostraram que, utilizando apenas o PRO como tensoativo, foi possível obter diversos sistemas com os mais variados tipos de organização, em uma ampla faixa de combinação dos componentes. As regiões: Separação de Fases (SF), Emulsão Líquida (EL), Emulsão (EM), Microemulsão (ME), Sistema Opaco (SO) e Sistema Viscoso Transparente (SVT), foram identificados em regiões, no diagrama de fases (Figura 16).

Os sistemas líquidos opticamente transparentes foram considerados ME, os mais viscosos, que apresentaram pouca ou nenhuma fluidez ao verter o frasco onde estavam contidos, foram denominados Sistemas Viscosos Transparentes (SVT).

Sistemas não transparentes, turvos, que apresentaram estabilidade quanto à separação de fases, foram denominados Sistemas Opacos – SO. Visualmente, algumas dessas formulações apresentaram alta viscosidade e outras, viscosidades menores.

A região em que as formulações formadas têm aspecto leitoso porém têm viscosidade de tal forma que não são vertidas do frasco quando este é inclinado foi denominada Emulsões – EM. Sistemas de aspecto leitoso e líquido foram considerados Emulsões Líquidas – EL.

A região onde os sistemas formados não foram estáveis quanto à separação de fases e apresentaram duas ou três fases separadas foi denominada Separação de Fases – SF.

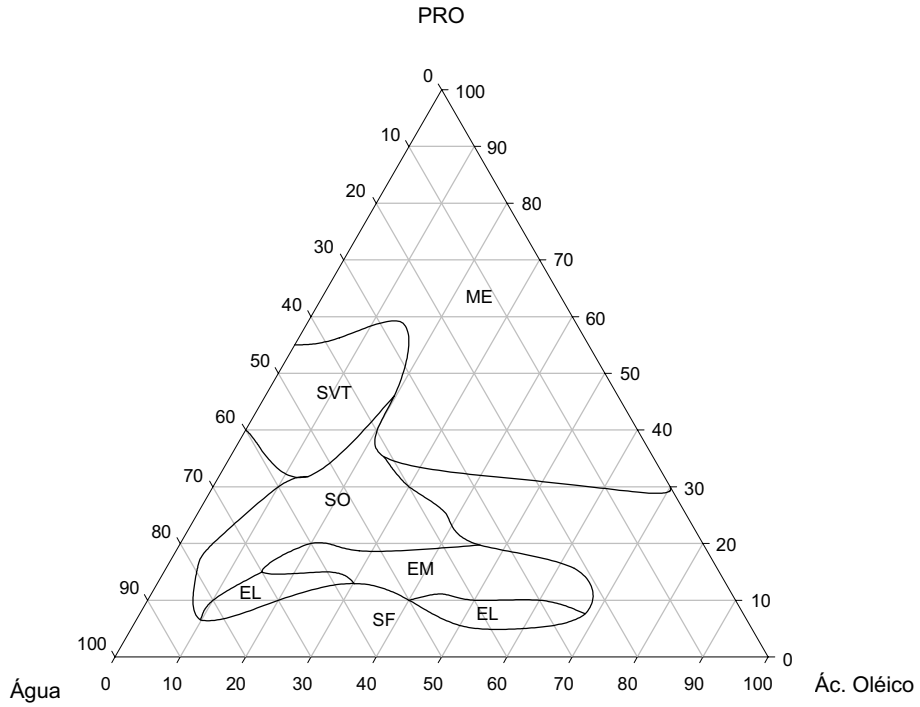


Figura 16. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com PRO como tensoativo, fase oleosa de ácido oléico e fase aquosa de água destilada: **ME** (Microemulsão), **SVT** (Sistema Viscoso Transparente), **SO** (Sistema Opaco), **EM** (Emulsão), **EL** (Emulsão Líquida) e **SF** (Separação de Fases).

Podemos perceber que, conforme a quantidade de PRO vai aumentando nas misturas, sistemas emulsionados vão sendo formados indicando que o tensoativo em maiores concentrações começa a ser capaz de manter a estabilidade dos sistemas. Quando a concentração de tensoativo atinge cerca de 30 - 35 %, sistemas transparentes são formados. Microemulsões formam-se quando a concentração de água é de até 45 %, acima destes

valores de água e mesma quantidade de tensoativo (35 - 40 %), Sistemas Viscosos Transparentes são formados.

5.3.2 Preparação das formulações selecionadas

As composições das formulações escolhidas para a caracterização física estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Formulações escolhidas para o estudo do sistema. Formulações de 1 a 9, % de tensoativo (PRO), % de Fase Aquosa (Água) e % de Fase Oleosa (Ácido Oléico) para cada formulação.

Formulação	% Tensoativo	% Fase Aquosa	% Fase Oleosa
1	30	5	65
2	30	15	55
3	35	5	60
4	35	15	50
5	35	20	45
6	40	5	55
7	40	15	45
8	40	20	40
9	40	25	35

5.4 Caracterização Física dos Sistemas de Interesse

A Figura 17 indica os pontos escolhidos para fazer a caracterização física do sistema.

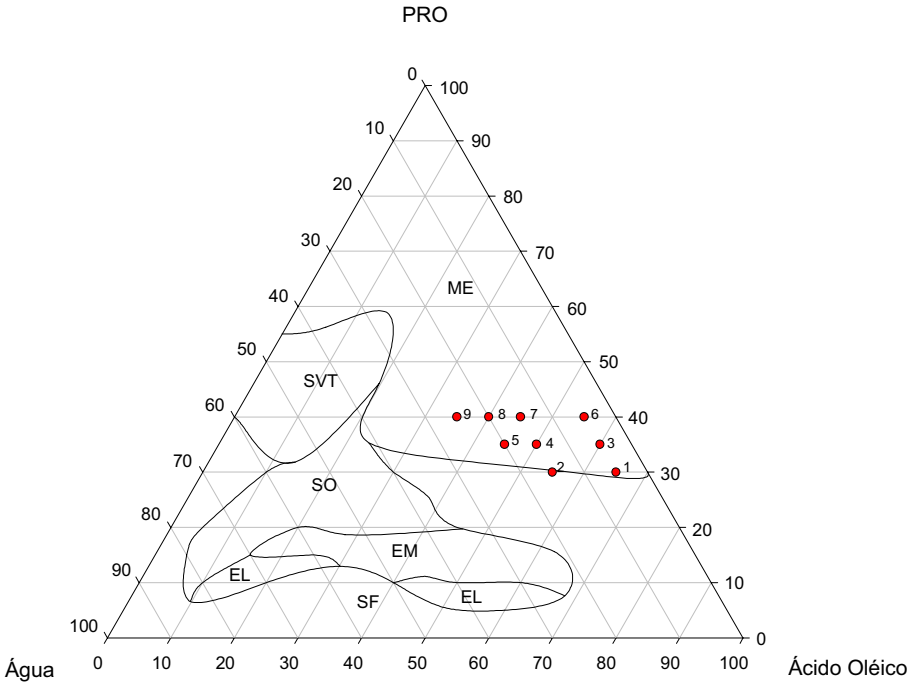


Figura 17. Formulações escolhidas para o estudo do sistema. Pontos vermelhos - formulações 1 a 9, **ME** (Microemulsão), **SVT** (Sistema Viscoso Transparente), **SO** (Sistema Opaco), **EM** (Emulsão), **EL** (Emulsão Líquida), **SF** (Separação de fases).

Os seguintes experimentos foram realizados para a caracterização física do sistema:

5.4.1 Determinação do Índice de refração

Os resultados obtidos (Figura 18) nos mostram que, com o aumento da quantidade de fase aquosa nas formulações, ocorre uma diminuição do índice de refração. A diminuição do índice de refração está relacionado com a diminuição da proporção de fase oleosa, cujo índice de refração é mais alto (1,460), e o conseqüente aumento da proporção de fase aquosa, cujo índice de refração é de 1,3330, levando à diminuição do índice de refração das formulações.

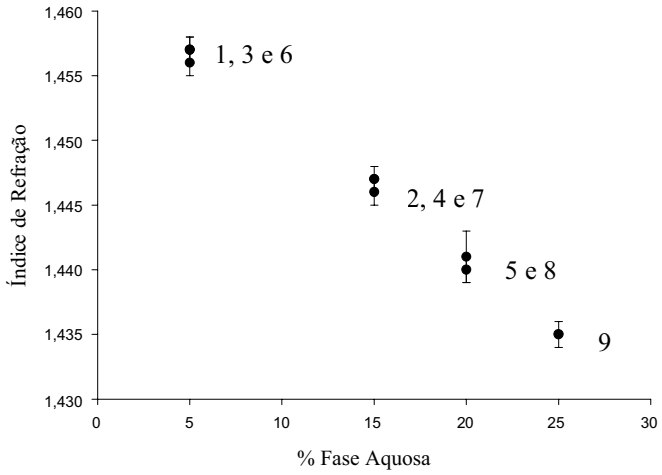


Figura 18. Índice de refração das formulações 1 a 9, as barras representam o desvio padrão de três determinações.

A Tabela 6 apresenta os valores de índice de refração das formulações 1 a 9:

Tabela 6. Valores de índice de refração (média de três determinações), porcentagem de fase aquosa (%FA), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

Formulação	% FA	Amostra			Média	DP	CV%
		1	2	3			
1	5	1,457	1,456	1,456	1,456	0,001	0,040
2	15	1,447	1,446	1,447	1,447	0,001	0,040
3	5	1,457	1,457	1,456	1,457	0,001	0,040
4	15	1,447	1,446	1,445	1,446	0,001	0,069
5	20	1,441	1,440	1,440	1,440	0,001	0,040
6	5	1,456	1,457	1,457	1,457	0,001	0,040
7	15	1,447	1,447	1,447	1,447	0,000	0,000
8	20	1,440	1,440	1,444	1,441	0,002	0,160
9	25	1,435	1,434	1,435	1,435	0,001	0,040

5.4.2 Determinação da condutividade eletrolítica

As moléculas de água dissociadas em íons em função do pH e da temperatura resultam na medida da condutividade (PALMIGIANE, 2005).

A Tabela 7 mostra os valores das condutividades das formulações 1 a 9.

Tabela 7. Valores das condutividades (μS/cm) obtidos com as formulações 1 a 9 (média de três determinações), porcentagem de fase aquosa (% FA) e desvio padrão (DP).

Formulação	% FA	Amostra			Média (μS/cm)	DP
		1	2	3		
1	5	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
2	15	0,00	0,01	0,01	0,007	0,006
3	5	0,02	0,01	0,01	0,013	0,006
4	15	0,04	0,03	0,03	0,033	0,006
5	20	0,02	0,02	0,02	0,020	0,000
6	5	0,02	0,02	0,02	0,020	0,000
7	15	0,08	0,07	0,08	0,077	0,006
8	20	0,07	0,09	0,08	0,080	0,010
9	25	0,36	0,36	0,36	0,360	0,000

5.4.3 Determinação do comportamento reológico

Os parâmetros que levam à caracterização de fluidos não-Newtonianos tempo-dependentes ou independentes foram analisados pelas curvas ascendentes e descendentes dos reogramas. Quando as curvas se sobrepõem, o sistema é caracterizado como tempo-independente e indica que apresenta uma rápida reestruturação. Quando a curva ascendente indica valores maiores que os da curva descendente, o sistema é chamado de tixotrópico, e quando ocorre o contrário, o sistema tem comportamento reopético. A diferença entre as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas ilustra o fenômeno de histerese e sua área indica a energia requerida para a quebra da estrutura do sistema (LABBA, 1993).

As curvas de fluxo obtidas com as formulações podem ser divididas em dois grupos, as formulações de números 1, 3 e 6 com comportamento Newtoniano (Figuras 19, 21 e 24) e as formulações de números 2, 4, 5, 7, 8 e 9 com comportamento não-Newtoniano pseudoplásticos (Figuras 20, 22, 23, 25, 26 e 27). Estes comportamentos se repetem nas formulações adicionadas de fármaco que podem ser visualizados nas mesmas figuras.

As formulações de comportamento não-Newtoniano pseudoplástico apresentaram tixotropia com uma pequena área de histerese, o que indica que apresentam rápida reestruturação do sistema após serem submetidas a tensões de cisalhamento.

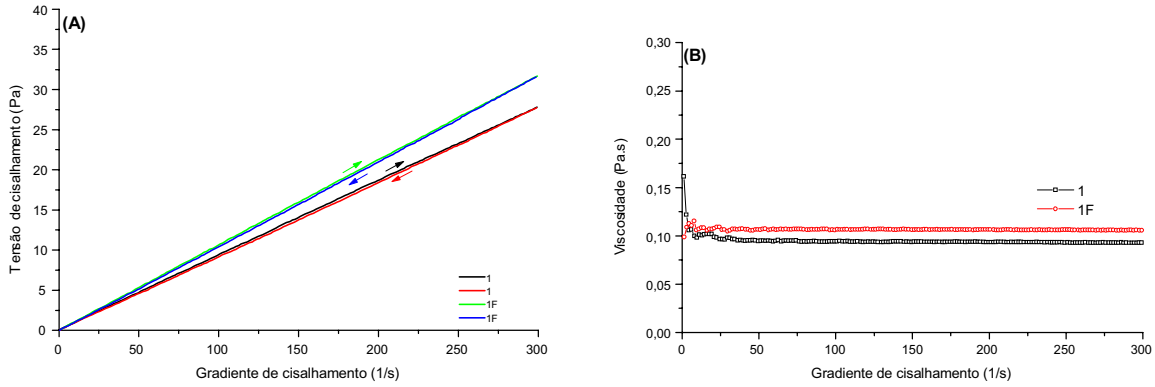


Figura 19. Reogramas de fluxo da formulação de número 1, sem fármaco (1) e com fármaco (1F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC.

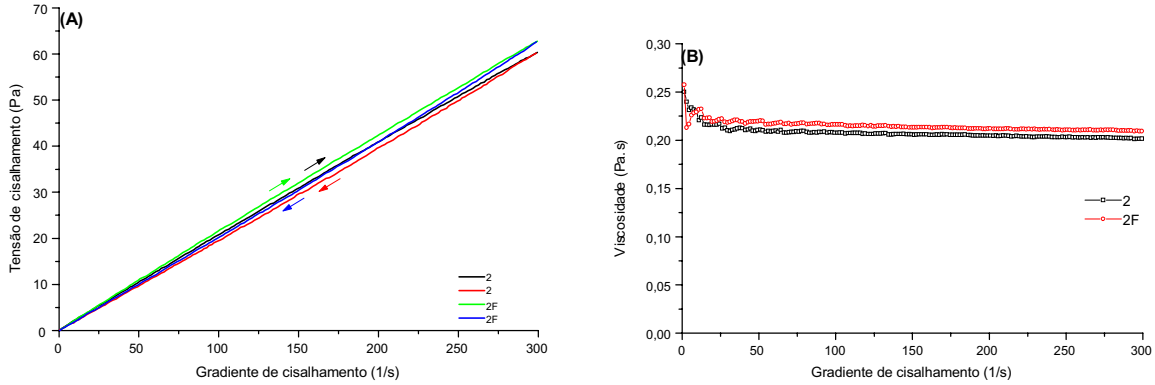


Figura 20. Reogramas de fluxo da formulação de número 2, sem fármaco (2) e com fármaco (2F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC.

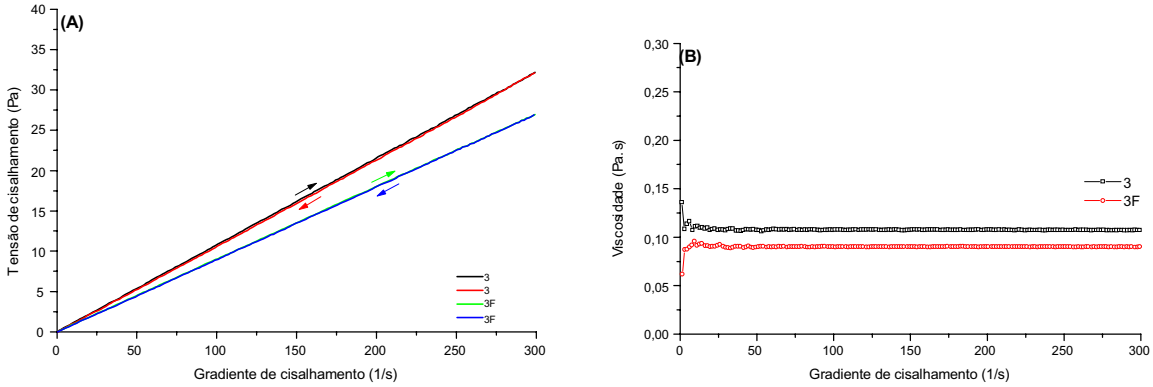


Figura 21. Reogramas de fluxo da formulação de número 3, sem fármaco (3) e com fármaco (3F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC.

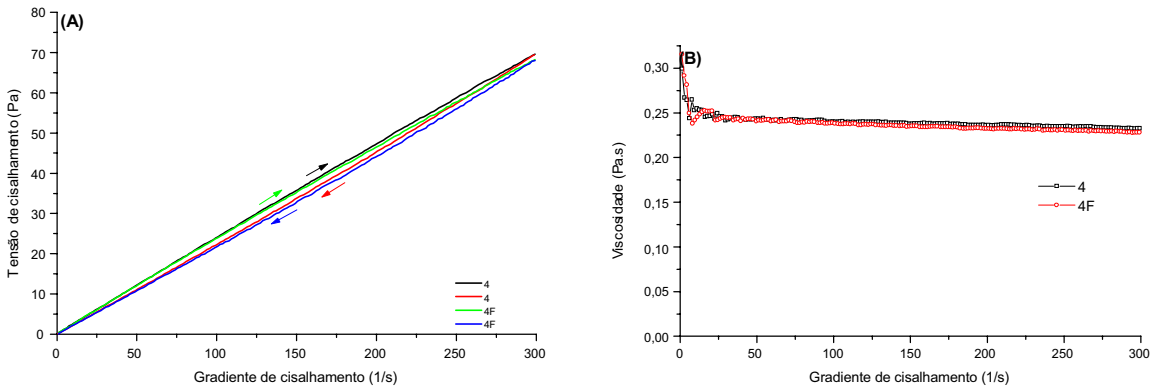


Figura 22. Reogramas de fluxo da formulação de número 4, sem fármaco (4) e com fármaco (4F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC.

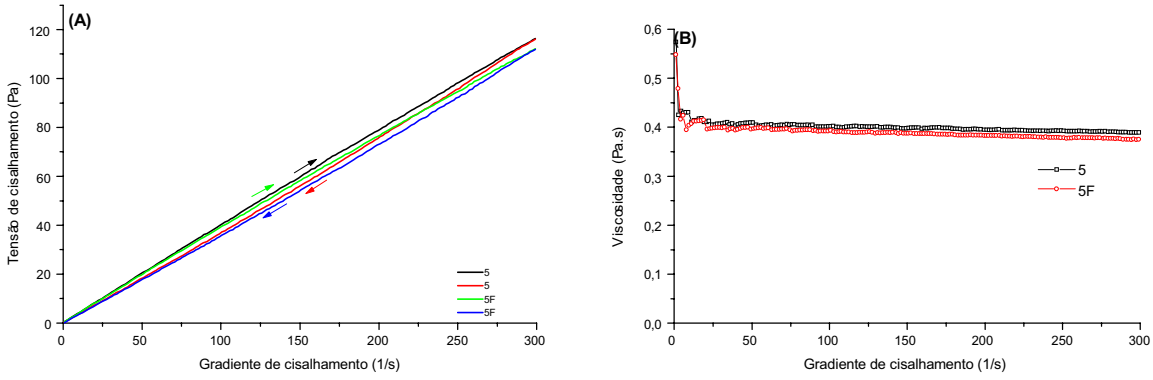


Figura 23. Reogramas de fluxo da formulação de número 5, sem fármaco (5) e com fármaco (5F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC.

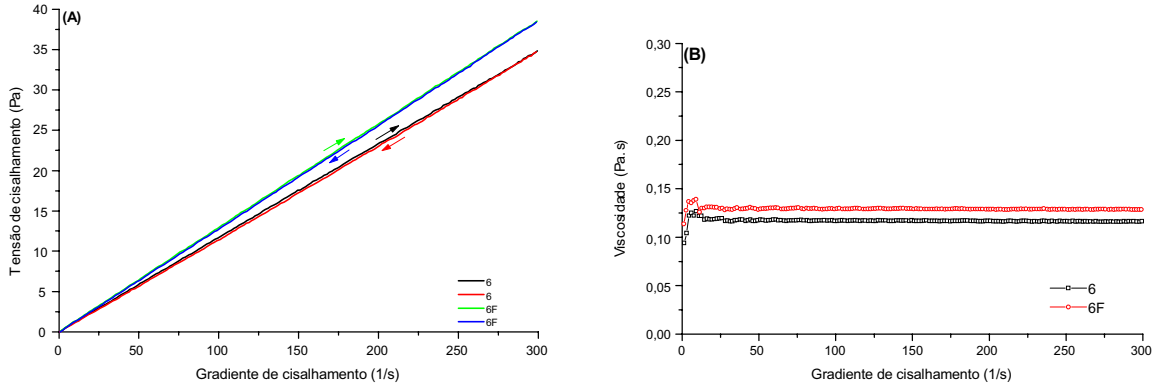


Figura 24. Reogramas de fluxo da formulação de número 6, sem fármaco (6) e com fármaco (6F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC.

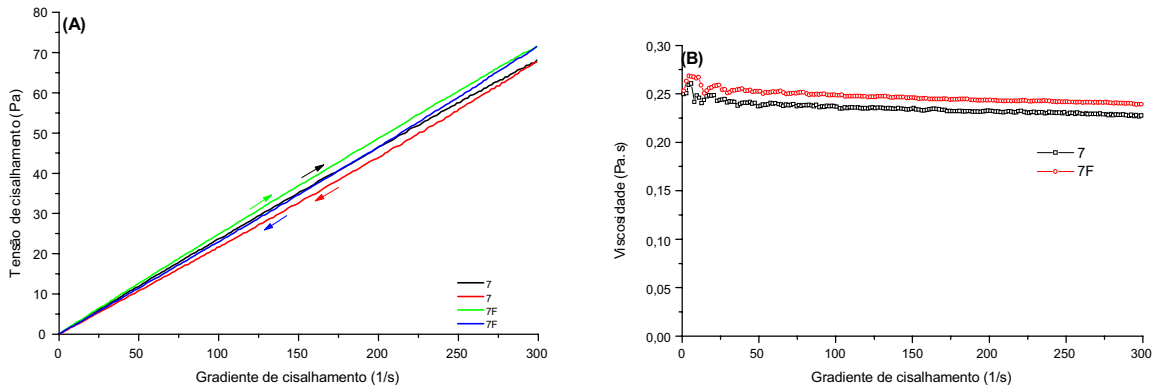


Figura 25. Reogramas de fluxo da formulação de número 7, sem fármaco (7) e com fármaco (7F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC.

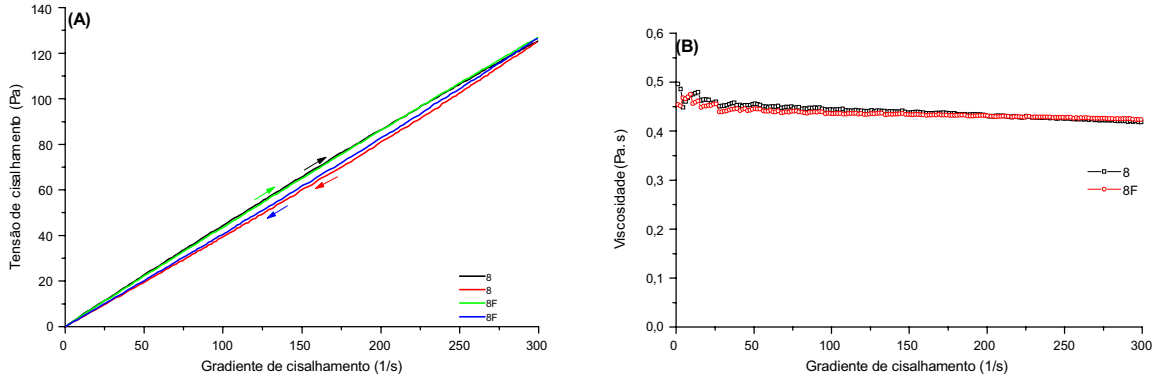


Figura 26. Reogramas de fluxo da formulação de número 8, sem fármaco (8) e com fármaco (8F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC.

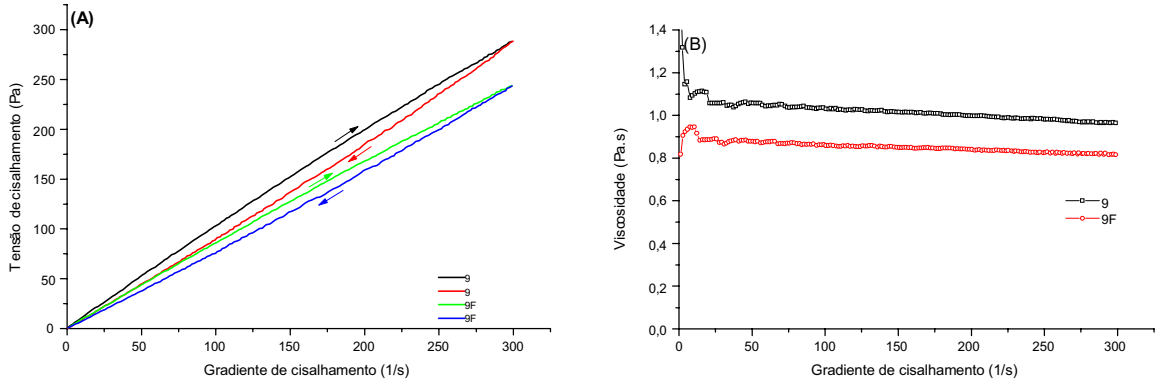


Figura 27. Reogramas de fluxo da formulação de número 9, sem fármaco (9) e com fármaco (9F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 25 ºC.

Com o aumento do gradiente de cisalhamento, partículas se orientam na direção do fluxo. Alinhamentos de moléculas ou partículas permitem que elas escorreguem umas pelas outras mais facilmente, reduzindo a resistência interna do sistema e com isso a viscosidade diminui (SCHRAMM, 2006).

Para a maioria dos fluidos o efeito do cisalhamento é reversível, mas leva algum tempo, ou seja, os líquidos recuperam a sua alta viscosidade original quando o cisalhamento é reduzido ou interrompido (SCHRAMM, 2006).

As ME não apresentam nenhum tipo de estrutura organizada que possa ser desestruturada pelo cisalhamento. Dessa forma, apresentam relação linear direta entre a tensão e o gradiente de cisalhamento aplicado, com viscosidade constante paralela ao eixo do gradiente, comportamento característico de fluidos Newtonianos, comportamento apresentado pelas formulações de números 1, 3 e 6 (Figuras 19, 21 e 24).

As demais formulações, de números 2, 4, 5, 7, 8 e 9 (Figuras 20, 22, 23, 25, 26 e 27), sugerem pelas análises de seus reogramas (característicos de comportamento pseudoplástico), que possuem algum tipo de estrutura, pois apresentam tixotropia, que é um fenômeno que surge em conseqüência da dependência da quebra, ou retorno, das ligações que definem a

estrutura do material ao longo do tempo. As curvas de viscosidade correspondentes indicam que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento como resultado da combinação entre a quebra da estrutura tixotrópica e a orientação molecular.

Nos experimentos conduzidos a 37 ºC houve uma diminuição da área de histerese para todas as formulações com comportamento pseudoplástico, indicando que nessa temperatura há necessidade de um tempo menor para a reestruturação das formulações após um gradiente de cisalhamento (Figuras 29, 31, 32, 34, 35, 36) . Para as formulações com comportamento Newtoniano, o aumento da temperatura para 37 ºC não alterou o comportamento dos sistemas (Figuras 28, 30 e 33).

A viscosidade de um sistema está relacionada com a temperatura. Geralmente, a viscosidade diminui com o aumento da temperatura (LABBA, 1993). Esse fato pode ser observado em todas as formulações analisadas, quando comparados os experimentos conduzidos a 25 ºC com os conduzidos a 37 ºC.

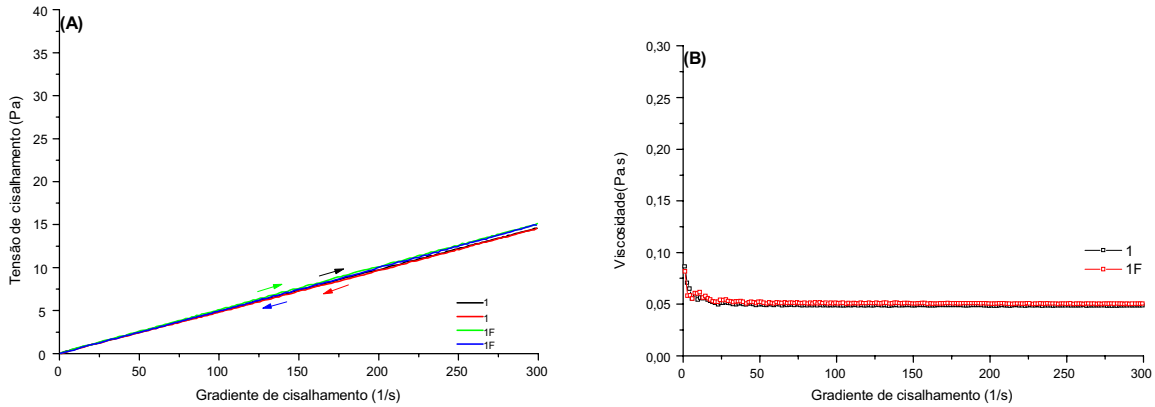


Figura 28. Reogramas de fluxo da formulação de número 1, sem fármaco (1) e com fármaco (1F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC.

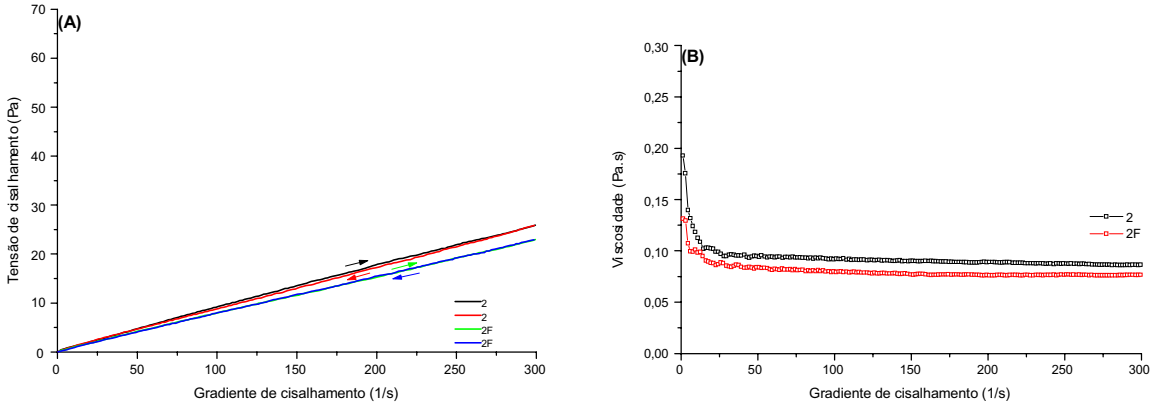


Figura 29. Reogramas de fluxo da formulação de número 2, sem fármaco (2) e com fármaco (2F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC.

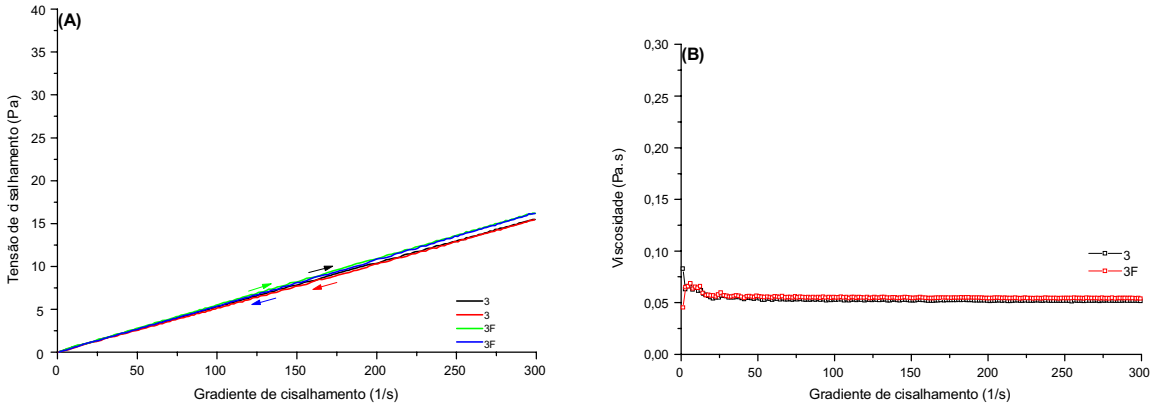


Figura 30. Reogramas de fluxo da formulação de número 3, sem fármaco (3) e com fármaco (3F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC.

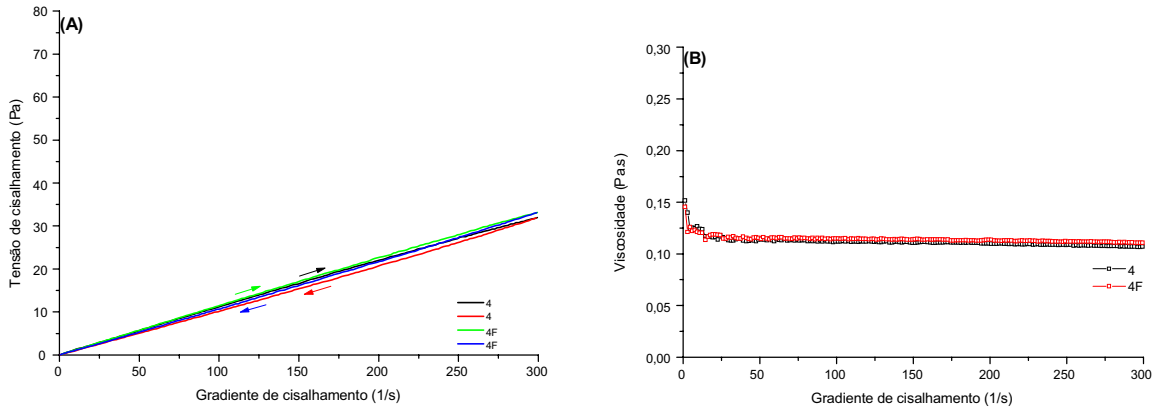


Figura 31. Reogramas de fluxo da formulação de número 4, sem fármaco (4) e com fármaco (4F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC.

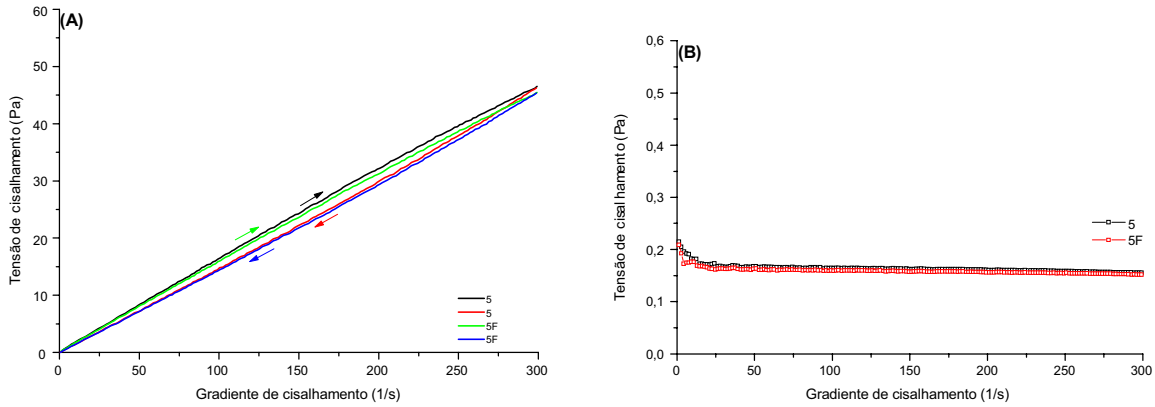


Figura 32. Reogramas de fluxo da formulação de número 5, sem fármaco (5) e com fármaco (5F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC.

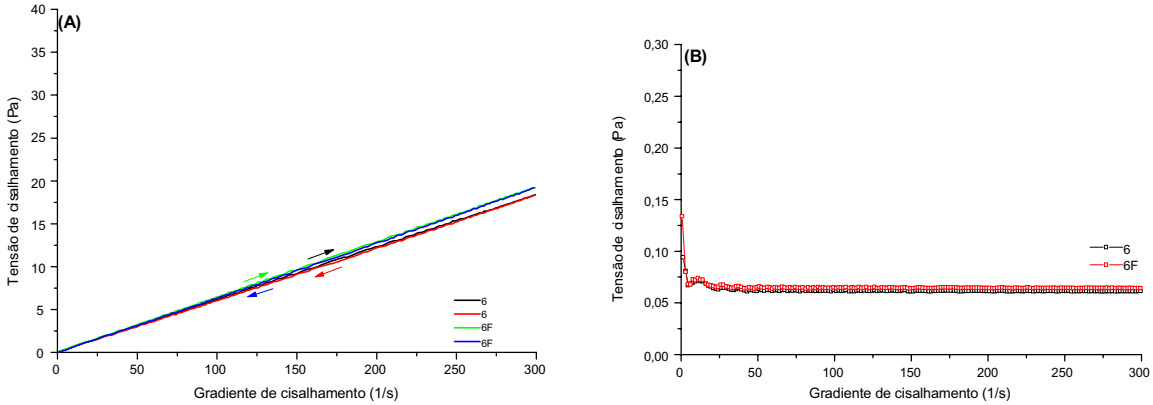


Figura 33. Reogramas de fluxo da formulação de número 6, sem fármaco (6) e com fármaco (6F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC.

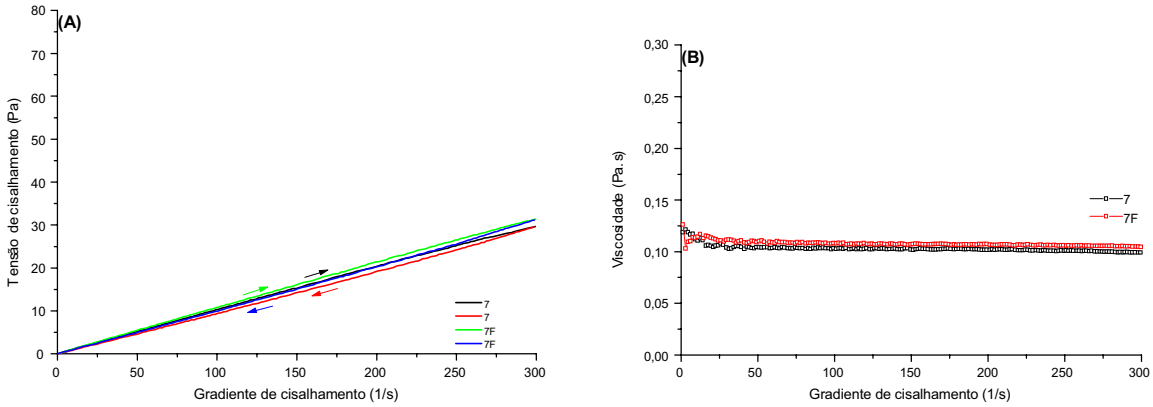


Figura 34. Reogramas de fluxo da formulação de número 7, sem fármaco (7) e com fármaco (7F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC.

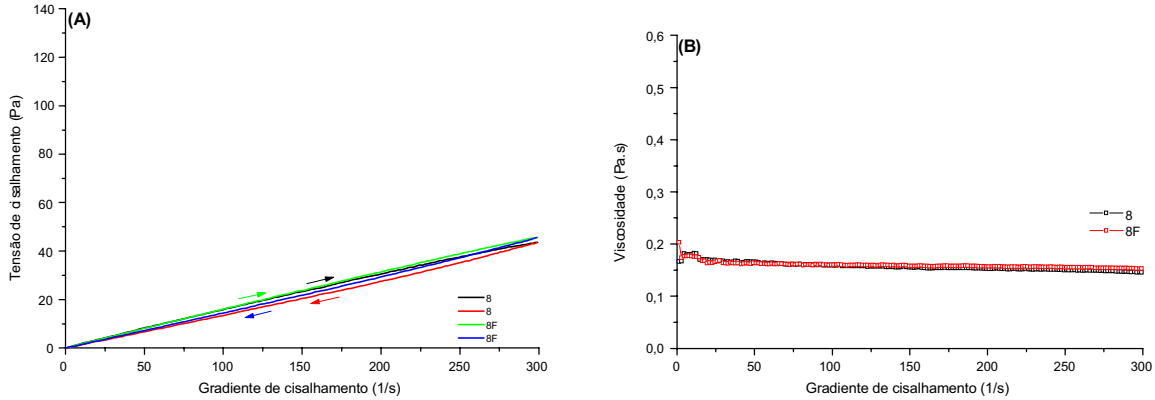


Figura 35. Reogramas de fluxo da formulação de número 8, sem fármaco (8) e com fármaco (8F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC.

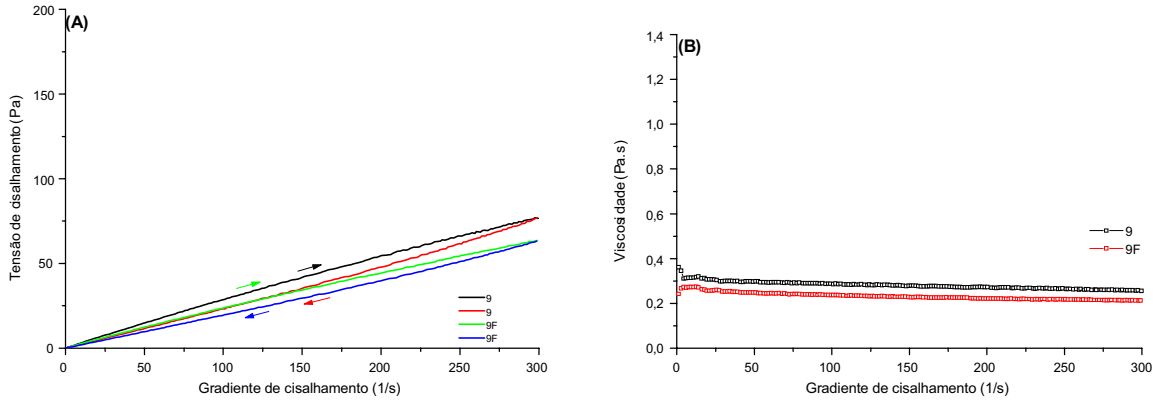


Figura 36. Reogramas de fluxo da formulação de número 9, sem fármaco (9) e com fármaco (9F). Curva de fluxo (A) e viscosidade da formulação (B), a 37 ºC.

A presença do fármaco nas formulações analisadas mostrou que este não altera significativamente o comportamento reológico do sistema, apenas há uma pequena mudança na viscosidade e esta não segue uma regra geral.

A 25 ºC observamos que as formulações 1, 2, 6 e 7 tiveram um aumento na viscosidade quando na presença do fármaco enquanto que as formulações 3, 5 e 9 demonstraram uma diminuição na viscosidade. As formulações 4 e 8 apresentaram viscosidades muito próximas quando sem fármaco e quando com fármaco.

Com o aumento da temperatura para 37 ºC essas diferenças de viscosidade entre as formulações com fármaco e formulações sem fármaco quase que desapareceram. Apenas a formulação 7 teve um aumento na viscosidade quando acrescentada de fármaco e a formulação 9 teve uma diminuição da viscosidade na presença de fármaco.

O índice de consistência de uma formulação, k, é um valor relacionado com a viscosidade do sistema. Quanto maior a viscosidade maior o valor deste fator. Pode ser observado que os sistemas demonstram uma tendência em aumentar sua viscosidade de acordo com quantidade de água. Com o aumento da concentração de água, para uma mesma concentração de tensoativo, observamos um aumento na viscosidade das formulações (Figuras 37 e 38).

Para avaliar o comportamento dos fluidos observamos o índice de fluxo (n) das formulações. Este índice tem valores de 0 à 1. Para líquidos Newtonianos n é igual a 1, para líquidos pseudoplásticos n é menor que 1. Valores como 0,99 os líquidos podem ser considerados como líquidos newtonianos. O aumento da concentração de água no sistema, para uma mesma concentração de tensoativo, aumenta a pseudoplasticidade das formulações. (Figuras 37 e 38).

O aumento da temperatura de 25 ºC para 37 ºC não modifica a tendência do sistema em relação a sua viscosidade e comportamento, porém um aumento na temperatura faz com que as diferenças de viscosidade entre as formulações fiquem menores assim como é menor a tendência a pseudoplasticidade com o aumento da concentração de água para a mesma concentração de tensoativo (Figuras 37 e 38).

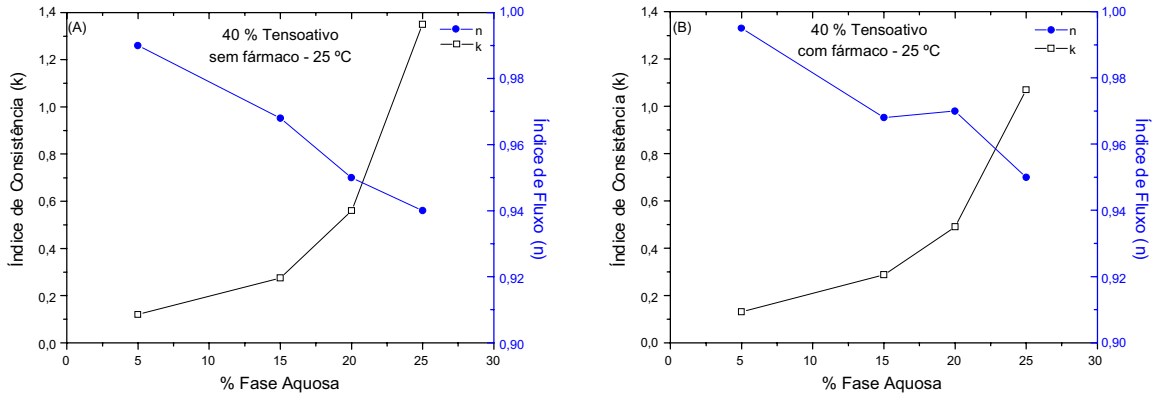


Figura 37. Índice de fluxo e índice de consistência do sistema sem fármaco (A) e com fármaco (B) com a crescente concentração de fase aquosa e 40 % de tensoativo, a 25 ºC.

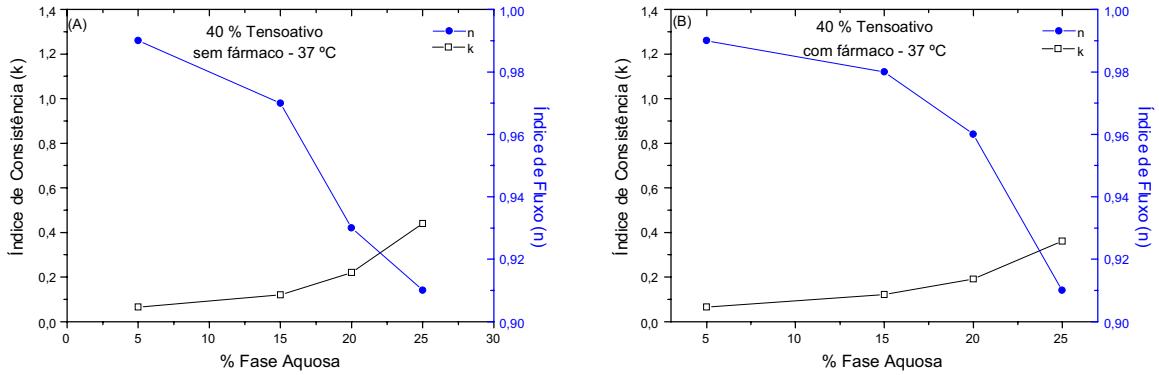


Figura 38. Índice de fluxo e índice de consistência do sistema sem fármaco (A) e com fármaco (B) com a crescente concentração de fase aquosa e 40 % de tensoativo, a 37 ºC.

A Figura 39 mostra os resultados dos ensaios de fluência e recuperação das formulações de números 1, 5 e 9 sem fármaco e com fármaco. Estas formulações foram escolhidas como demonstrativas do comportamento do sistema que apresentaram-se como líquidos Newtonianos ou líquidos pseudoplásticos com áreas de histerese muito pequenas.

Os resultados demonstram que as formulações aproximam-se de líquidos Newtonianos. A inclinação da curva deformação/tempo é a tan α, que marca o gradiente de

cisalhamento relevante, se torna mais pronunciada com o aumento das tensões aplicadas: o aumento na inclinação da curva é uma indicação de uma viscosidade reduzida. Portanto, de acordo com a Figura 39, as formulações possuem viscosidades diferentes sendo que a formulação 9 apresenta maior viscosidade, seguida da formulação de número 5 e da formulação de número 1 e , portanto, quanto mais alta for a compliança, mais fácil será a deformação de uma amostra por uma tensão aplicada, ou seja, mais fluida é a formulação.

A presença do fármaco nas formulações não modifica seus comportamentos, somente pode haver uma diferença de viscosidades entre as formulações sem fármaco e formulações com fármaco.

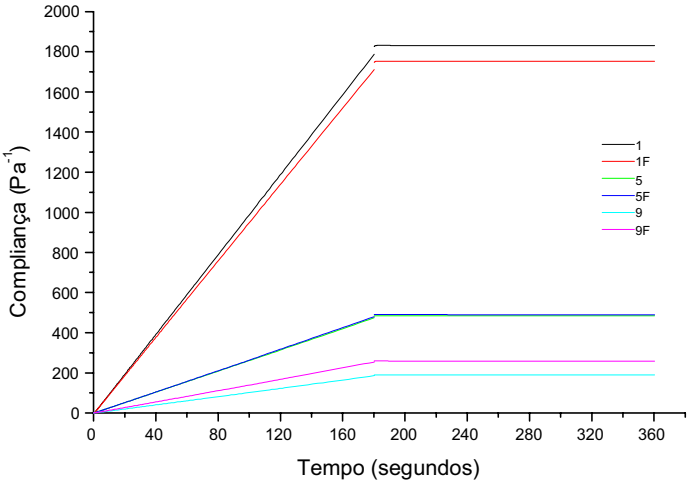


Figura 39. Fluência e recuperação das formulações 1, 5 e 9 sem fármaco e com fármaco 1F, 5F e 9F, a 25 ºC.

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

A intensidade espalhada é gerada pelas diferenças de densidades eletrônicas, ou seja, das diferenças entre as densidades eletrônicas do tensoativo e da fase aquosa. Então, em

outras palavras, a densidade depende do tamanho, número, da forma e do arranjo das partículas espalhadoras.

A Figura 40 mostra as curvas de intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento (q) das formulações 1 a 6 sem fármaco.

De acordo com os resultados ilustrados na Figura 40, podemos observar que as formulações de números 1, 3 e 6, que têm 30, 35 e 40% de tensoativo respectivamente nas suas formulações e 5% de água, apresentam um máximo de intensidade em valores de $q \neq 0$, comportamento este é característico de sistema micelar. Para obter as distâncias médias e os tamanhos precisos das micelas são necessários modelos estruturais mais detalhados. Já as formulações de números 2, 4, e 5 apresentam picos que sugerem um comportamento de fase indicativo de fase lamelar.

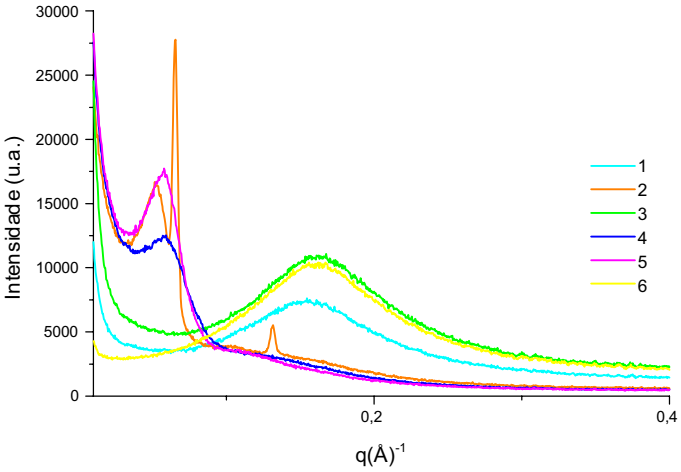


Figura 40. Evolução estrutural das formulações de números 1 a 9 sem fármaco.

A Figura 41 apresenta as curvas de intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento (q) das formulações 1 a 6, fazendo uma comparação das formulações sem fármaco e das mesmas com fármaco.

A figura 41 B, a presença de três picos é observada para a formulação de número 2 sem fármaco. Aplicando modelos matemáticos e considerando a equação $d = 2\pi/q_{max}$,

podemos sugerir que o primeiro pico, em q = 0,052 não tem uma proporção entre os outros dois picos que sugira algum comportamento de fase líquido-cristalina. Já os outros dois picos têm razão d2/d3 = 2, sugerindo um comportamento de fase lamelar. Podemos sugerir que a presença de três picos, sendo que o primeiro não tem com os outros dois picos uma razão característica de comportamento de fase líquido-cristalina, que a amostra apresenta uma mistura de tipos de organização, fase lamelar e algum outro tipo de comportamento de fase. A presença do fármaco na formulação contribuiu para a organização do sistema, já que os resultados demonstram a presença de dois picos, com razão d1/d2 = 2, característica de periodicidade lamelar, sem a presença do pico 1 da formulação sem fármaco. Deve ser considerado que a formulação de número 2 está em uma região do diagrama de fases limite entre região de microemulsão e região de separação de fases. Isto pode ser a razão para a existência de uma mistura de tipos de organização do sistema.

As figuras 41 D e 41 E sugerem um comportamento de fase lamelar para as formulações de números 4 e 5, sendo que d1/d2 = 2 para ambas as formulações. A presença do fármaco não modificou a estrutura do sistema da formulação de número 5.

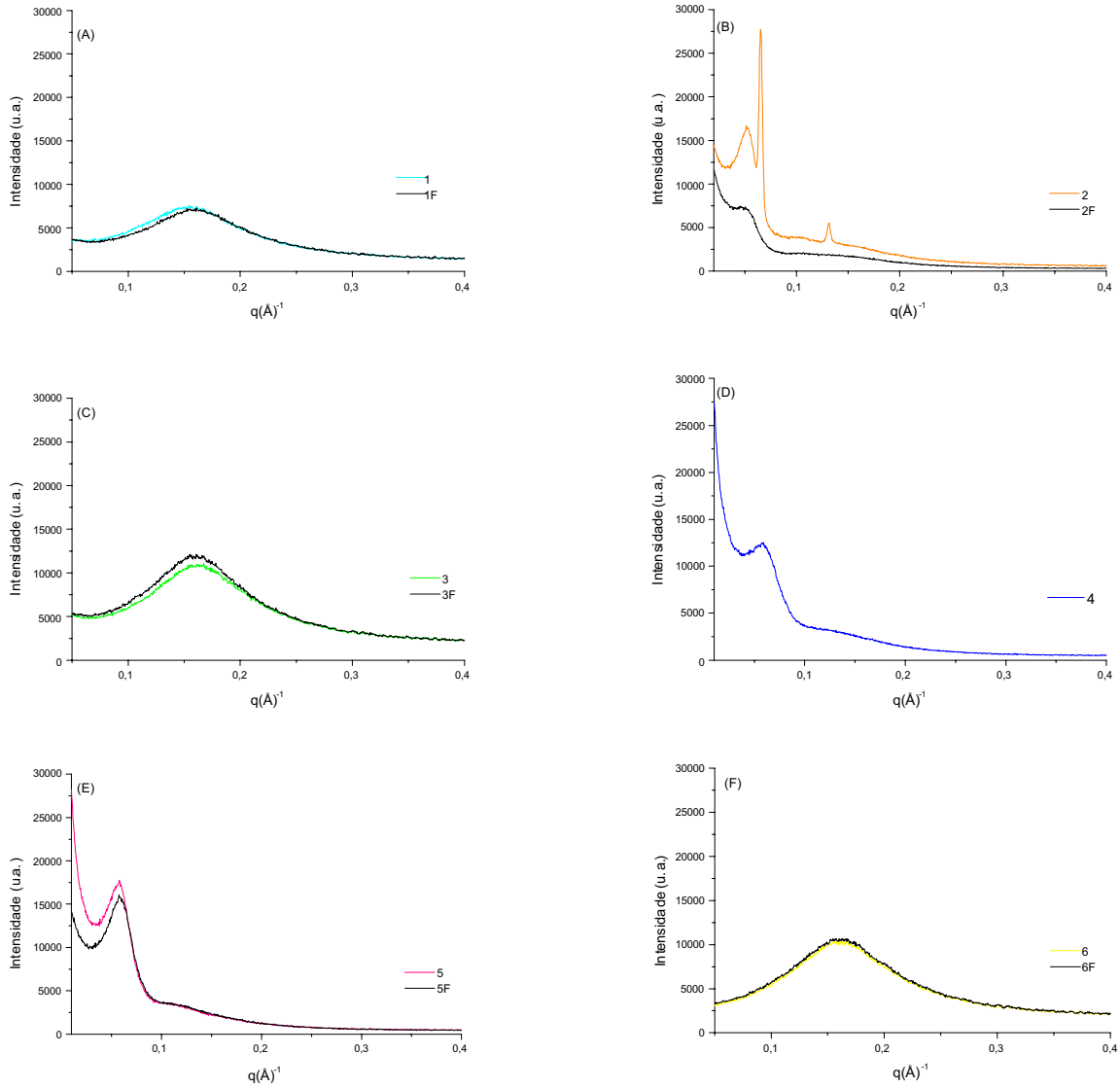


Figura 41. Evolução estrutural das formulações 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E) e 6 (F) sem fármaco (1, 2, 3, 4, 5, e 6) e com fármaco (1F, 2F, 3F, 5F e 6F). A formulação de número 4 com fármaco, não teve seu comportamento avaliado.

O aumento da proporção de água parece ser responsável pela estrutura lamelar, já que as formulações com 5 % de água (formulações 1, 3 e 6) apresentaram comportamento de fase micelar enquanto que as formulações com maiores concentrações de água, formulações 2 e 4 com 15% e formulação 5 com 20% de água, apresentaram comportamento característico de fase lamelar.

5.4.5 Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma técnica que permite a classificação quanto à isotropia e anisotropia dos sistemas, permitindo a diferenciação microscópica entre o tipo de estruturação.

Todas as formulações escolhidas para caracterização (1 a 9), com e sem fármaco, mostraram um comportamento isotrópico (campo escuro) (Figura 42), ou seja, as formulações, sob o plano de luz polarizada, não desviam luz.

A análise das formulações contendo fármaco mostrou que a incorporação do fármaco não altera a estrutura do sistema, pois todas as imagens das formulações 1 a 9, sob luz polarizada, contendo fármaco, também demonstraram um comportamento isotrópico (campo escuro) (Figura 42).

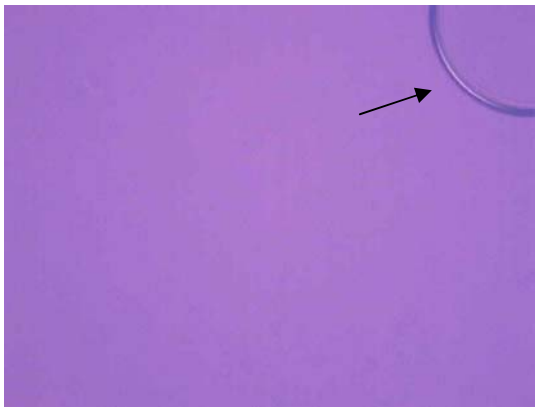


Figura 42. Fotomicrografia representativa de um comportamento isotrópico (campo escuro), obtida da formulação de numero 8 sem fármaco. A seta indica a presença de bolha de ar para comprovar o campo escuro.

O campo escuro sugere que as formulações apresentam um comportamento de fase micelar. Porém, com os estudo de SAXS podemos sugerir que algumas formulações têm comportamento de fase micelar (formulações 1, 3 e 6) e outras (formulações 2, 4 e 5) apresentam comportamento de fase lamelar, não confirmado pela microscopia de luz polarizada. Isto vem confirmar a idéia que os sistemas microemulsionados são sistemas complexos e necessitam de mais de uma técnica para caracterizar suas estruturas.

5.5 Determinação da capacidade de incorporação do fluconazol nos sistemas de interesse

A Figura 43 mostra as concentrações máximas obtidas pelo ensaio de incorporação do fluconazol nas formulações 1 a 9.

Não foi possível avaliar a capacidade de incorporação da formulação 2 pois, durante a centrifugação, ocorreu separação de fases.

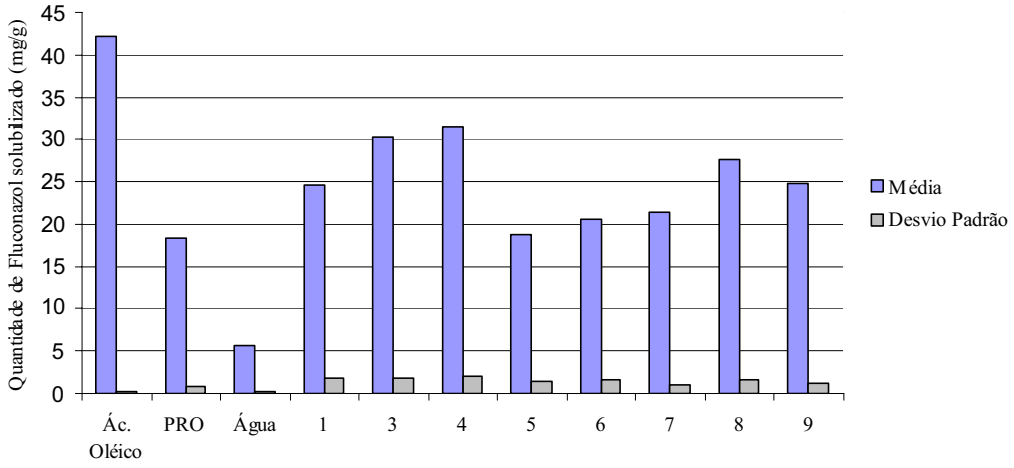


Figura 43. Solubilidade do Fluconazol nas formulações 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e nos componentes do sistema, ácido oléico, água e PRO, média de três determinações e desvio padrão.

As formulações 3 e 4 foram as que apresentaram as maiores taxas de incorporação. Elas têm em comum a concentração do tensoativo na formulação. Estas formulações solubilizaram cerca de 3% de fluconazol.

As formulações de número 4 e de número 6 sem fármaco, quando centrifugadas, apresentaram separação de fases, enquanto que as mesmas formulações quando adicionadas de fármaco e centrifugadas não apresentaram separação de fases.

A Tabela 8 mostra os resultados do ensaio de incorporação do fluconazol nos sistemas de interesse.

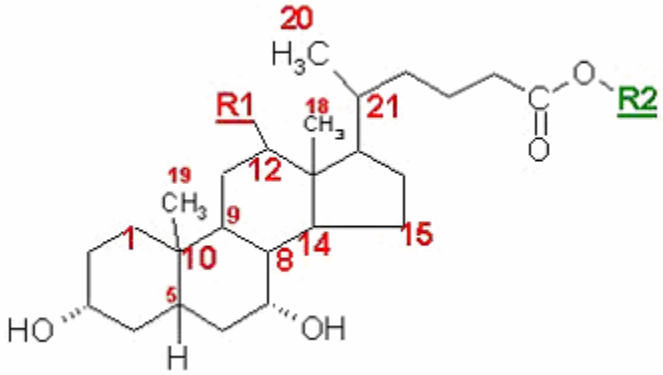
Tabela 8. Quantidade máxima de fluconazol incorporado nas formulações de números 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, e 9 (n = 3), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

Formulação	Fluconazol (mg/g)				DP	CV %
	1	2	3	Média		
1	23,53	26,74	23,48	24,5833	1,8679	7,60
3	29,50	32,26	28,79	30,1833	1,8331	6,07
4	32,72	29,26	32,74	31,5733	2,0034	6,35
5	17,98	20,57	18,03	18,8600	1,4811	7,85
6	19,74	22,45	19,72	20,6367	1,5704	7,61
7	20,68	22,59	20,67	21,3133	1,1056	5,19
8	28,56	25,60	28,50	27,5533	1,6919	6,14
9	24,16	26,25	24,16	24,8567	1,2067	4,85

5.6 Estudo da influência dos sais biliares na estrutura do sistema

As células hepáticas sintetizam cerca de 0,6 g de sais biliares diariamente. O precursor dos sais biliares é o colesterol, que é fornecido pela dieta ou sintetizado nas células hepáticas durante o metabolismo das gorduras, sendo então convertido em ácido cólico ou ácido quenodeoxicólico, em quantidade aproximadamente igual. Estes ácidos combinam-se principalmente com glicina e, em menor grau, com taurina, formando os ácidos biliares glico-

e tauroconjugados (Figura 44). Os sais desses ácidos são secretados na bile (GUYTON; HALL, 1996).



	R_1=OH	R_1=H
R_2=H	ácido cólico	ácido quenodeoxicólico
R_2= NH-CH_2-COOH	ácido glicocolicoácido	glicoquenodeoxicólico
R_2= NH-CH_2-CH_2-SO_3H	ácido taurocólico	ácido tauroquenodeoxicólico

Figura 44. Estrutura dos principais ácidos biliares e seus glico e tauroconjugados (Disponível em http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/acidos%20biliares.html).

Os sais biliares exercem duas funções importantes no tubo intestinal: possuem ação detergente sobre as partículas de gordura do alimento, uma vez que diminuem a tensão superficial das partículas e permitem que a agitação no tubo intestinal desintegre os glóbulos de gordura em partículas de pequenas dimensões. Este processo é conhecido como função emulsificante ou detergente dos sais biliares. Também ajudam na absorção de ácidos graxos, monoglicerídeos, colesterol e outros lipídios no tubo intestinal, por formarem diminutos complexos, chamados micelas, com esses lipídios (GUYTON; HALL, 1996).

Fases líquidas cristalinas cúbicas têm uma importante função no processamento fisiológico dos lipídeos da dieta e das formulações de origem e tem sido sugerido que os triglicérides alimentares comuns podem assumir microestruturas cúbicas nos estágios intermediários de sua digestão. Os benefícios de solubilidade dessas fases cúbicas, bem como

o potencial de prever a modificação das características de liberação, fazem desses sistemas interessantes como ponto de entendimento dos processos naturais de digestão e também pelo seu potencial de modular a cinética de liberação e estabilidade de fármacos. Por exemplo, a incorporação de moléculas pequenas e proteínas em fases líquidas cristalinas têm sido descritas como uma forma efetiva de aumentar a estabilização e liberação de fármacos (KOSSENA et. al., 2004).

Quando em contato com os líquidos biológicos, após a administração pela via oral, as microemulsões podem assumir uma forma estruturada, como de cristal líquido por exemplo, e com isso há uma modificação e prolongamento da liberação do fármaco, que ficaria retido na estrutura formada. Isto aconteceria devido à incorporação de maior quantidade de água ao sistema e também pela contribuição dos sais biliares como tensoativos quando assumem sua função de emulsificação.

A Tabela 9 mostra os resultados da adição de solução de sais biliares no sistema.

Tabela 9. Efeito da adição de solução de sais biliares em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) nas formulações 1 a 9 e sistemas formados após a adição de volumes de solução. SF – separação de fases; ME – microemulsão; SO – sistema opaco.

Volume de solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9
300 μL	SF	SF	ME	ME	SF	ME	ME	ME	SF
300 μL	SF	SF	SF	SF	SF	ME	ME	SF	SF
300 μL	SF	SF	SF	SF	SF	ME	SF	SF	SF + SO
300 μL	SF	SF + SO	SF	SF + SO	SF + SO	SF + SO	SF + SO	SF + SO	SF + SO

Podemos perceber que as formulações tendem à separação de fases após a adição de volumes de solução de sais biliares, porém, com volumes crescentes o que era separação de fases volta a adquirir viscosidade, formando sistemas opacos bastantes viscosos com excesso de óleo (SF + SO). Portanto, os sais biliares alteram a estrutura dos sistemas.

As formulações de números 1 e 3, que têm 5 % de água e 30 e 35 % de tensoativo respectivamente e comportamento de fase micelar de acordo com os resultados de SAXS, mesmo após a adição de volumes crescentes de solução de sais biliares, separaram fases e não voltaram a adquirir viscosidade, sugerindo que seriam adequadas para a administração do fluconazol microemulsionado, caso o prolongamento da ação do fármaco não fosse interessante, já que entrariam em contato com os líquidos biológicos e liberariam prontamente o fármaco.

A formulação de número 6 também tem apenas 5 % de água, porém maior concentração de tensoativo, 40 %. Esta formulação separa fases mas volta a formar sistema opaco com excesso de óleo quando adicionado de quantidades maiores de solução de sais biliares. Isto sugere que a maior concentração de tensoativo faz com que o sistema, ao entrar em contato com pequenos volumes de líquidos biológicos, se reorganiza formando sistemas mais viscosos do que as formulações com menores concentrações de tensoativo.

As outras formulações, todas com maiores concentrações de água, que as formulações 1, 3 e 6, separam fases e voltam a se organizar em sistemas mais viscosos com pequenos volumes de solução de sais biliares.

5.7 Avaliação do transporte intestinal de fluconazol

O transporte intestinal de fluconazol foi avaliado pelo modelo do saco intestinal invertido. Para tanto foi necessário validar uma metodologia analítica para a determinação do fármaco no espaço serosal.

5.7.1 Validação da metodologia analítica empregada na determinação do fluconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os parâmetros de validação da metodologia analítica foram determinados para garantir que o método proposto para quantificação do fluconazol fornecesse informações confiáveis e que os resultados obtidos fossem reprodutíveis.

Especificidade

Especificidade é a capacidade do método de avaliar um composto em presença de outras substâncias, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A determinação da especificidade pode ser realizada através da analise de amostra contendo esses interferentes, determinando a capacidade do método em gerar informações confiáveis na presença dos mesmos (ANVISA, 2003).

O método foi validado empregando-se o comprimento de onda de 261 nm.

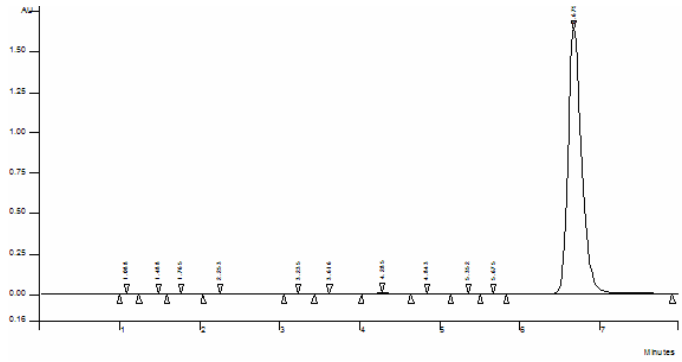


Figura 45. Cromatograma referente à solução de fluconazol em fase móvel 2 mg/mL em 261 nm.

Visto que o cromatograma referente à fase móvel não apresenta nenhum pico e que o cromatograma referente à fase móvel acrescida de fluconazol apresenta um pico significante e

isolado dos outros picos interferentes (Figura 45), os resultados mostram que o método proposto é seletivo e específico, uma vez que não foi observado interferência na medida da área e não houve alteração no tempo de retenção do fluconazol, que foi de aproximadamente 6,7 minutos.

Linearidade

Linearidade de um método analítico é a sua habilidade de fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de um determinado intervalo (ANVISA, 2003).

A linearidade do método de quantificação do fluconazol por CLAE foi determinada através da construção da curva analítica em fase móvel (Figura 46), utilizando diferentes concentrações da solução de fluconazol.

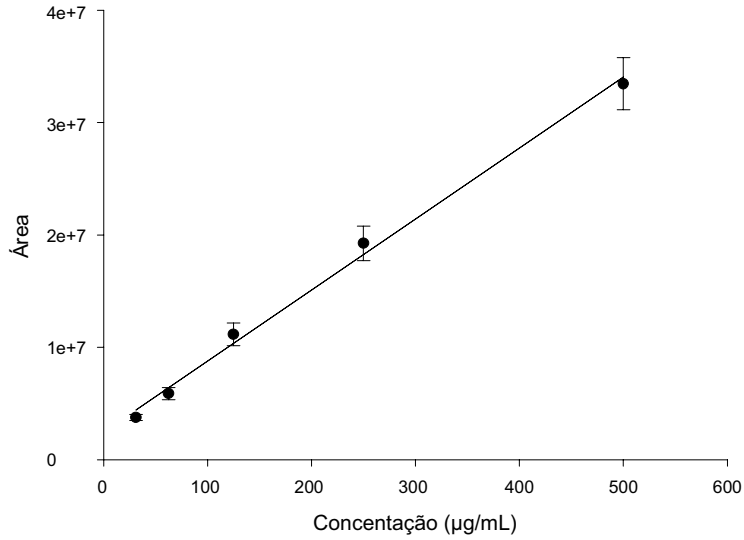


Figura 46. Curva analítica do fluconazol em fase móvel obtida por CLAE em 261 nm (n=3). As barras representam o desvio padrão das três determinações.

A equação representativa da regressão linear foi **y = 50441,08x + 5089400,43** com coeficiente de regressão linear de $r^2 = 0,994453$.

Precisão

Precisão é a avaliação da proximidade das respostas obtidas quando uma serie de medidas foram realizadas para uma mesma amostra, em idênticas condições de teste. Esta é considerada em três níveis, verificada por, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (baixa, média, alta) em triplicata ou no mínimo seis determinações com 100% da concentração do teste (ANVISA, 2003).

A precisão foi determinada através da análise de três níveis de concentração, 2000, 500 e 62,5 μg/mL. As soluções foram filtradas utilizando membrana de acetato de celulose 0,2 μm e analisada por CLAE. A análise foi realizada em triplicata.

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 10, indicam que o método proposto mostrou-se preciso para a quantificação do fluconazol, obtendo-se um coeficiente de variação menor que 5 % (ANVISA, 2003).

Tabela 10. Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão (n=3).

Concentração de fluconazol (μg/mL)	**Área**			**Média**	**DP**	**CV%**
	Amostra 1	**Amostra 2**	**Amostra 3**			
2000	103578488	101949320	102953096	102826968	821874,8672	0,79
500	31407272	31984616	32998376	32130088	805465,4318	2,50
62,5	7907312	7806456	7582098	7765288	166469,5121	2,14

Recuperação

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois determina a quantidade do fármaco recuperado no processo de preparação da amostra (ANVISA, 2003).

O percentual de recuperação do fluconazol é apresentado na Tabela 11. Os resultados mostram índices de recuperação adequados, dentro da faixa recomendada pela ANVISA (2003), cujo intervalo é de 80 a 120 %. A análise foi realizada em triplicata.

Tabela 11. Percentual de recuperação do fluconazol.

Quantidade de fluconazol adicionada (µg/mL)	Quantidade recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)
2000	1960,18	98,01
500	548,63	109,72
62,5	62,16	99,46

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) é determinado pela menor quantidade de fármaco presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação (LQ) é determinado pela menor quantidade de fármaco em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Os resultados obtidos na determinação dos LD e LQ (Figura 12) mostram que o método analítico é adequado para quantificação do fluconazol em fase móvel, obedecendo a faixa linear da curva analítica. A análise foi realizada em triplicata.

Tabela 12. Limites de detecção e quantificação de solução de fluconazol em fase móvel em 261 nm.

LD (µg/mL)	7,8125
LQ (µg/mL)	15,625

5.7.2 Avaliação da absorção intestinal do fluconazol pelo método do saco intestinal invertido

Durante o período de desenvolvimento de novos fármacos ou sistemas de liberação para administração por via oral, torna-se interessante avaliar a capacidade de permeação do produto através da membrana intestinal. Vários modelos *in vitro* podem ser usados para avaliar o potencial absortivo de fármacos. Alguns são amplamente utilizados para avaliar o perfil de absorção a partir de novos sistemas de liberação. O modelo do saco intestinal invertido tem sido usado com este propósito.

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a permeação intestinal do fluconazol contido no sistema constituído de PRO, ácido oléico e água, utilizando o modelo do saco intestinal invertido.

A solução de fluconazol em água 15 mg/g e as formulações de números 3 e 5 incorporadas de fluconazol 15 mg/g foram avaliadas de acordo com a metodologia proposta. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos já considerando as diluições feitas na preparação das amostras antes de serem analisadas por CLAE.

O meio de incubação apresentou-se com aspecto leitoso após a adição das formulações de números 3 e 5 enquanto permaneceu límpido após a inclusão da solução aquosa do fármaco.

Ao retirar o segmento intestinal foi visível a presença de fragmentos de tecido no meio de dispersão significativamente maior no meio onde foi adicionada a formulação de número 5 em comparação com o meio onde foi adicionada a formulação de número 3 enquanto que para solução aquosa do fármaco não foi observada.

Após a filtração do conteúdo do saco intestinal observou-se coloração levemente avermelhada, possivelmente advinda de agressão tecidual.

Podemos observar que o fluconazol quando veiculado nas formulações tem seu transporte pela membrana intestinal aumentada em 4 a 5 vezes em comparação com a solução aquosa do fármaco.

A microemulsão (formulação de número 3) demonstra uma absorção maior que a formulação de comportamento de fase lamelar (formulação de número 5), para um mesmo tempo de ensaio. Isto sugere que pode ter ocorrido uma retenção do fármaco na estrutura da fase lamelar, característico deste tipo de comportamento de fase.

Tabela 13. Fluconazol absorvido através do segmento intestinal invertido, após incubação por 90 minutos, com 15 mg/g de fármaco, segmento de 8 cm (n = 5).

Formulação	Fluconazol ug/mL (média n = 5)	DP	CV%
Solução aquosa	29,2999	15,7925	53,89
Formulação 3	147,9807	15,1922	10,26
Formulação 5	118,3860	44,8890	37,91

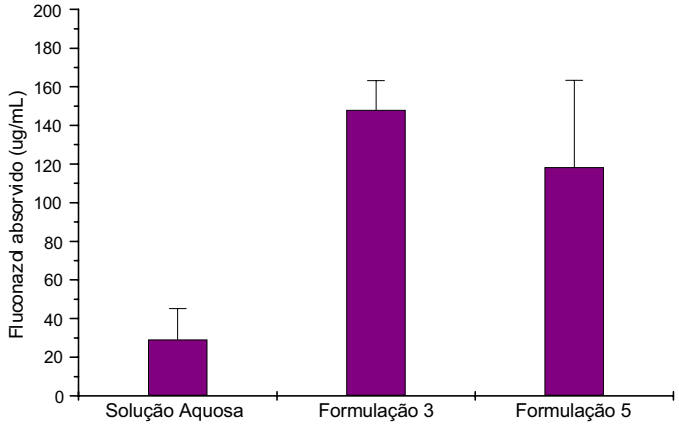


Figura 47. Fluconazol absorvido através do segmento intestinal invertido, após incubação por 90 minutos, com 15 mg/g de fármaco, segmento de 8 cm (n = 5).

6. CONCLUSÕES

- O diagrama de fases construído mostrou que foi possível obter sistemas com diferentes formas de estruturação utilizando o álcool cetilico etoxilado e propoxilado como tensoativo, ácido oléico como fase oleosa e água destilada como fase aquosa, em função da variação da proporção entre os componentes do sistema, o que pode levar a diferentes comportamentos de liberação de fármacos.
- As formulações 1, 3 e 6, apresentaram comportamento Newtoniano e as formulações 2, 4, 5, 7, 8 e 9 se comportaram como sistemas pseudoplásticos e tixotrópicos.
- O fluconazol apresentou alta solubilidade em acido oléico e baixa solubilidade em água, dessa forma, podemos presumir que o fármaco particione preferencialmente na fase oleosa do sistema.
- Nas formulações 3 e 4 ocorreram as maiores taxas de incorporação do fármaco, cerca de 3%, seis vezes maior que a solubilidade do fluconazol em água, devido a maior solubilidade do fármaco na FO em comparação com a FA.
- Os métodos analíticos para quantificação do fluconazol no ensaio de absorção pelo método do saco intestinal invertido por CLAE apresentaram-se sensíveis, exatos e precisos.
- O ensaio de absorção do fármaco pelo saco intestinal invertido demonstra que as formulações 3 (35% PRO, 5% FA, 60% FO) e 5 (35% PRO, 20% FA, 45% FO) aumentam de 4 a 5 vezes a absorção do fármaco pela membrana intestinal em comparação com a solução aquosa.
- Os resultados indicam o potencial de este tipo de sistema atuar como sistemas de liberação de fármacos, aumentando a biodisponibilidade de muitos fármacos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Disponível em www.anvisa.org.br. Acesso em: 30/04/07.

ARAKAMI, K.; KABIR, M. H.; NAKAMURA, N.; KUNIEDA, H.; ISHITOBI, M. Formation of cubic-phase microemulsions in sucrose alkanoate systems. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 183-185, p. 371-379, 2001.

BARTHE, L.; WOODLEY, J.; HOUIN, G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 13, p. 154-168, 1999.

BECHTOLD, I. H. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. **Rev. Bras. Ens. Fís.**, v. 27, n. 3, p. 333-342, 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery Office (2001) A173.

CAMPO, L.; YAGHMUR, A.; GARTI, N.; LESER, M. E.; FOLMER, B.; GLATTER, O. Five-component food-grade microemulsions: structural characterization by SANS. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 274, p. 251-267, 2004.

CHOI, S. M.; CHEN, S. H.; SOTTMENN, T.; STREY, R. Measurement of interfacial curvatures in microemulsions using small-angle neutron scattering. **Physica B**, v. 241-243, p. 976-978, 1998.

CASTRO, L. G. M.; BELDA JR, W. CUCÉ, L. C.; SAMPAIO, . A. P.; STEVENS, D. A. Successful treatment of sporotrichosis with oral fluconazole: a report of three cases. **British Journal of Dermatology**, v. 128, p. 352-356, 1993.

CINTO, P. O. **Avaliação da absorção intestinal de praziquantel a partir de lipossomas de fosfatidilcolina de soja empregando o modelo do saco intestinal invertido**. Araraquara, 2005. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

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 and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 43, p. 108-114, 2005.

CRAIEVICH, A. F. Syncrotron SAXS studies of nanoestructured materials and colloidal solutions. A review. **Materials Research**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2002.

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

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

DAVIDSON, M.W.; ABRAMOWITZ, D. **Polarized Light Microscopy**. Olympus America Inc. and The Florida State University. Disponível em http://microscope.fsu.edu/primer/techniques/polarized/polarizedhome.html. Acesso em: 01 de fevereiro de 2005.

DIDOMENICO, B. Novel antifungal drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 509-515, 1999.

DORE, J. C.; NORTH, A. N.; RIGDEN, J. S. Small-angle scattering studies of meso-scopic structures with synchrotron X-rays. **Radiat. Phis. Chem.**, v. 45, n. 3, p. 413-426, 1995.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K. L. **Handbook of microemulsion science and technology**. Ed. New York: Marcel Dekker, cap. 7, p. 195-240, 1999.

FANUN, M.; WACHTEL, E.; ANTALEK, B.; ASERIN, B.; GARTI, N. A study of the microestructure of four-component sucrose ester microemulsions by SAXS and NMR. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 180, p. 173-186, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4ª Ed., São Paulo: Editora Atheneu, 1988.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JUNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Ciên. Farm.**, v. 41, n. 03, jul/set 2005.

GAO, Z. G.; CHOI, H. G.; SHIN, H. J.; PARK, K. M.; LIM, S. J.; HWANG, K. J.; KIM, C. K. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for oral delicery of cyclosporin A. **Intern. J. of Pharm.**, v. 161, p. 75-86, 1998.

GARTI, N.; YAGHMUR, A.; ASERIN, A.; SPERNATH, A.; ELFAKESS, 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.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**, Editora Guanabara Koogan, 9ª Edição, Rio de Janeiro – RJ, 1996.

HARDMAN, S.; STEPHENSON, I.; JENKINS, D.R., WISELKA, M.J. Disseminated *Sporothrix schenkii* in patient with AIDS. **J. Infec.**, Article in press, p. 1-5, 2004.

HELLWEG, T. Phase structures of microemulsions. **Current Opinion in Collloid & Interface Science**, v. 7, p. 50-56, 2002.

HIGUSHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instrum.**, v. 4, p. 117-212, 1965.

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

KOSSENA, G. A.; CHARMAN, W. N.; BOYD, B. J.; PORTER, C. J. H. A novel cubic phase of medium chain lipid origin for the delivery of poorly water soluble drugs. **Journal od Controlled Release**, v. 99, p. 217-229, 2004.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Suppl. 1, p. S77-S98, 2002.

LABBA, D. **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. Nova Iorque: Marcel Dekker. 1993.

LACHMANN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, I volume, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 211- 253, 2001.

LARSSON, C. E.; GONÇALVES, M. de A.; ARAUJO, V. C.; DAGLI, M. L. Z.; CORREA, B.; FAVA NETO, C. Esporotricosis felina: aspectos clínicos e zoonóticos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 31, n. 5, p. 351-358, setembro-outubro, 1989.

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

LONGO, D. P. Obtenção, caracterização e estudo de liberação in vitro e permeação in vivo de sistemas microestruturados contendo cafeína. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2006.

MENDOZA, M.; HUNG, M. B.; DÍAZ, A. M.; ZAMBRANO, E. A.; DÍAZ, E.; DE ALBORNOZ, M. C. Growth kinetics and morphology of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. **J. de Mycologie Médicale**, v. 15, p. 127-135, 2005.

MOISÉS NETO, M.; FIGUEIREDO, J. F. C. Terapêutica das micoses profundas em pacientes transplantados renais. **J. Bras. Nefrol.**, v. 18, n. 4, p. 369-374, 1996.

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.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: Estrutura e Aplicações como Sistema de Liberação de Fármacos. **Quím. Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M.; LAZERA, M.; REIS, R. S.; CHICARINO-COELHO, J. M. Zoonotic sporothricosis transmitted by cats in Rio de Janeiro, Brazil. A case report. **Dermatology Online Journal**, v. 8, n. 2, 2002.

PALMIGIANE, A. L. M. L. Avaliação das Incertezas de Medições Analíticas em Implementação de um Modelo de Controle. 2005. 136f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, 2005.

PARDASANI, A. Oral antifungal agents used in dermatology. **Curr. Probl. Dermatol**., november/december, 2000.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento e fármacos. **Quím. Nova**, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.

RESENDE, K. X. **Obtenção e caracterização física de sistemas microemulsionados nãoiônicos e estudo da atividade antibiótica *in vitro* de eritromicina base nesses sistemas**. 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara. 2004.

REX, J. H. O desafio das infecções fúngicas no século XXI. Disponível em: http://ccih.med.med.br/fungos21.html. Acessado em 10 de fevereiro de 2006.

REYNOLDS, P. A.; HENDERSON, M. J.; WHITE, J. W. A small angle scattering study of the interface between solids and oil-continuous emulsions and oil-based microemulsions. **Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 232, p. 55-65, 2004.

ROSA, A. C.; SCROFERNEKER, M. L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R. L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 52, n. 3, p. 451-459, março, 2005.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. Editora Artliber, 2ª Edição, 2006.

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

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: Physicochemical Eng. Aspects**, v. 276, p. 15-21, 2006.

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

SOLANS, C.; KUNIEDA, H. Industrial Applications of Microemulsions. Ed. Dekker, **Surfactant Science Series**, v. 66, 1997.

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Micro e Nanoestruturados para Administração Cutânea do Acetato de Dexametasona**. Araraquara, 2004. 136p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

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. I, 2001.