

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS ESTABILIZADOS COM ÁLCOOL
CETÍLICO ETOXILADO E PROPOXILADO CONTENDO FLUCONAZOL
POTENCIALMENTE ATIVO CONTRA DERMATOMICOSSES**

HILRIS ROCHA E SILVA

ORIENTADOR: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

ARARAQUARA - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS ESTABILIZADOS COM ÁLCOOL
CETÍLICO ETOXILADO E PROPOXILADO CONTENDO ÓLEO DE
COPAÍBA E FLUCONAZOL POTENCIALMENTE ATIVO CONTRA
DERMATOMICOSSES**

HILRIS ROCHA E SILVA

Tese 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 Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

ARARAQUARA - SP

2011

Ficha Catalográfica

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

S586s Silva, Hilris Rocha e
Sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo óleo de copaíba e fluconazol potencialmente ativo contra dermatomicoses / Hilris Rocha e Silva – Araraquara, 2011
188 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião

Co-orientador: Georgino Honorato de Oliveira

1. Fluconazol. 2. Óleo de copaíba. 3. Dermatomicoses. 5. Microemulsões. 6. Cristais líquidos. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Oliveira, Georgino, Honorato, co-orient.. III. Título.

CAPES: 40300005

HILRIS ROCHA E SILVA

**“SISTEMAS NANOESTRUTURADOS ESTABILIZADOS COM ÁLCOOL CETÍLICO
ETOXILADO E PROPOXILADO CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA E
FLUCONAZOL POTENCIALMENTE ATIVO CONTRA DERMATOMICOSSES”**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Tese de
Doutorado, em sessão pública realizada em 26/08/2011, considerou a candidata

Hilris Rocha e Silva:

() REPROVADA

(X) APROVADA

1) Examinadora (*Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski
Guterres*) _____

2) Examinadora (*Profa. Dra. Nereide Santos
Magalhães*) _____

3) Examinadora (*Prof. Dr. Renata Fonseca Vaz Lopez*) _____

4) Examinador (*Prof. Dr. Marlus Chorilli*) _____

5) Presidente (*Profa. Dra. Maria Palmira Daflon
Gremião*) _____

“Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as
dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.”

John Quincy Adams

DEDICATÓRIA

A DEUS

Que me deu a vida, cheia de oportunidades de aprender e ajudar as pessoas, como esta que concretizo, me deu sabedoria, muitos momentos felizes e nunca me deixou nos difíceis!! E por me dar uma Mãe, que intercede pelos planos Dele em minha vida! Maria, passa na frente!

" Para todo esforço há fruto" Pr 14,23

AO MEU ESPOSO LUCIANO

Por ter abraçado esta oportunidade comigo, abdicando de muitas coisas; por estar comigo principalmente nestes quase quatro anos de doutorado que coincidem com nossos quatro anos de casados, onde estive tantas vezes ausente e ele compreendeu com seu amor, paciência e seus cuidados! Obrigada, meu benzinho, te amo muito!

*"O verdadeiro amor nunca se desgasta. Quanto mais se dá mais se tem."
Antoine de Saint-Exupéry*

AOS MEUS PAIS E IRMÃOS

A minha mãe, Irisdalva, por ser minha maior educadora e incentivadora nesta etapa, sempre me amando e escutando meus desabafos, pela sua presença constante, mesmo distante. Ao meu pai, Hilson, por, a seu modo, me amar e apoiar sempre que precisei. Aos meus irmãos, Juliana e Arthur (e Rita!), por sempre se preocuparem comigo, mesmo a distância, por me incentivarem e ajudarem muito nesta etapa e por acreditarem sempre em mim!!! Se eu fosse agradecer por cada ajuda que me deram desde o primeiro dia que me mudei para Araraquara, não teriam folhas suficientes.... Amo muito vocês!!!

"O amor humano tem a capacidade de ser amor de Deus em nossa vida porque ele nos elege." Pe. Fábio de Melo

A MINHA FAMÍLIA

Aos meus avós (*in memoriam*), aos meus tios (a quem saúdo nos nomes dos meus tios Valdo, Tales e Dalvinha que me ajudaram muito na minha mudança pra cá) e primos, por tudo que fizeram por mim para eu realizar este sonho, pela torcida constante, pelas palavras de incentivo, pelas orações!!! A minha sogra, Onorina e meus cunhados, pessoas especiais na minha vida que estão sempre preocupados comigo e torcem pela minha felicidade e do Lu.

*"Se pela força da distância tu te ausentas, pelo poder que há na saudade voltarás".
Pe. Fábio de Melo*

AGRADECIMENTOS

A minha estimada orientadora, Profa. Palmira, por tudo que fez por mim desde o dia que cheguei em Araraquara, por sempre estar disposta a me ouvir, por me transmitir muitos conhecimentos profissionais e pessoais, por ser um exemplo de pessoa ética e profissional. Agradeço muito a paciência e confiança em mim. Levo comigo sempre estes anos que convivemos.

Ao meu co-orientador, Prof. Georgino, pela ótima convivência e pelos conhecimentos transmitidos. Em especial meu obrigado por me ensinar a trabalhar com animais e pela disponibilidade sempre que precisei.

Aos Professores Wagner Vilegas e Marlus Chorilli, pela valiosa contribuição no Exame de Qualificação. Ao amigo Marlus pela imensa ajuda na finalização deste trabalho e disponibilidade sempre que precisei e pelas conversas que me ensinaram muito!

Aos Professores Nereide Stela Santos Magalhães, Silvia Stanisçuaski Guterres, Renata Fonseca Vianna Lopez e Marlus Chorilli, por aceitarem o convite para participar da minha banca e desde já pelas importantes contribuições dadas.

A Profa. Dra. Marcela Longhi por me acolher no Laboratório de Ciências Químicas da Universidade de Córdoba e pelos conhecimentos transmitidos. As alunas do laboratório Caro, Lichi, Júlia, Cláudia e Ariana pela amizade e ajuda durante meu estágio. A técnica Glória Maria Bonetto pelas análises de RMN.

A profa. Dra. Amélia M. Lopes Dias da Silva por me receber tão bem no Centro de Investigação e Tecnologia de Ciências Agro-ambientais e Biológicas (CITAB), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal, para realizar os experimentos de citotoxicidade. As alunas Ana Luíza e Tatyana pela ajuda e amizade! A Ana Luisa, Pollyana e Patrícia pelos ótimos dias de convivência.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Fernanda Kolenyak, Ana Luíza, Flávia Chiva, Cristina Franzini, Priscileila, Fernanda Carbinatto, Liliane, Charlene, Márcia, Beatriz, Flávio, Gustavo, Joceana, Cristina Bruno, Giselle, Grazielle, Mariana, Andréia, Fabíola e tantos outros que fizeram dos dias de trabalho mais prazerosos. Obrigada pela ajuda, amizade e torcida, em especial das amigas Fernanda Kolenyak e Ana Luíza que foram verdadeiras irmãs para mim em diversos momentos desta etapa.

As minhas queridas estagiárias Gabriela, Bruna, Fernanda, Natália e Mariane, que me ensinaram muito e com que pude exercitar a vida acadêmica na orientação dos seus projetos. De modo especial agradeço a Gabi, por estar

Agradecimentos

comigo desde o primeiro mês que iniciei no laboratório, me ajudando em muitos experimentos.

Aos amigos da pós-graduação, Flávia Angélica, Lucélia, Eliete, Lucas, Marcelo, Guilherme, Ana Paula, Bruna, Letícia, Ademir, Jemima, Juliana, Eloísa, Juliana Assumpção, Priscila, Geisy, Josilene e muitos outros que levo em meu coração, pela amizade, ajuda e torcida!! Muito obrigada a todos!!!

Ao professor Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento pela colaboração nas análises por SAXs e pela ajuda em toda parte de caracterização das amostras. Pela amizade, correções e ajuda, obrigada!!!

Aos professores Hérida Regina, Vera Isaac, Virgínia, Iracilda, Luís Vítor, Rosângela e Leila Chiavacci, por pela ajuda quando eu precisei e por abrirem as portas de seus laboratórios para que eu pudesse realizar experimentos. A aluna da Profa. Iracilda Lívia Ribeiro, pela valorosa ajuda nos experimentos de atividade anti-inflamatória, meu muito obrigada!!!!

Aos professores Ana Dóris de Castro, Raul César e Anselmo Gomes pela ótima convivência no laboratório e pela ajuda quando precisei.

À Coordenadora da Pós-Graduação, Profa. Hérida Regina N. Salgado, pelo exemplo de dedicação e justiça e pelas conversas que tanto me ensinaram.

A profa. Dra. Monica Freiman de Souza Ramos pela doação das amostras de óleo de copaíba obtidas de cooperativas do Acre.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação – Cláudia, Sônia, Laura, Márcia e Joyce, pela atenção e ajuda sempre que precisei.

As funcionárias Margareth, Fátima, Maria, Queila e Angélica pela imprescindível colaboração nas horas necessárias e pelas conversas divertidas e agradáveis.

Ao Sr. Orandi, da UNESP de Jaboticabal pela valorosa contribuição nos ensaios de histopatologia.

A Neusa, zeladora, que com tanta dedicação na limpeza me animava a cada dia de trabalho. A todo o pessoal da portaria, em especial a Olívia e Tiana, que sempre me acolhiam muito bem e me ajudavam quando necessário. Aos porteiros da noite, por sempre me acolherem bem quando eu precisava ficar durante as madrugadas ou vir aos finais de semana.

Aos amigos piauienses residentes aqui Magela, Lima Neto, José Renato e Aline pela amizade e por ajudarem a diminuir a saudades da nossa terra

Agradecimentos

querida! E as minhas amigas de Teresina, que sempre estiveram torcendo por mim.

A FAPESP pela bolsa concedida!

Enfim, a todos de que alguma forma passaram pela minha vida nesses quase quatro anos e deixaram sua contribuição para que esse trabalho se realizasse.

“Unir-se é um bom começo; manter a união é um progresso, e trabalhar em conjunto é a vitória.” Henry Ford

RESUMO

Nas últimas décadas, tem ocorrido um aumento expressivo na incidência de infecções fúngicas. Por outro lado, o tratamento das micoses nem sempre é efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis apresentam espectro de atividade e perfil farmacocinético inadequados, em especial no tratamento das lesões cutâneas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PROC) contendo fluconazol (FLU), empregando ácido oléico (AO) e óleo de copaíba como fases oleosas. A caracterização química, seguida de ensaios biológicos, dos óleos de copaíba de diferentes fontes, foi determinante para a escolha do óleo a ser usado no desenvolvimento das formulações. A construção de diagramas de fases com ambos os óleos mostrou que diferentes sistemas como microemulsões (ME) e cristais líquidos (CL) podem ser formados. A caracterização físico-química (MLP, SAXS e Reologia) mostrou que na região de 40% de PROC, o aumento da quantidade de água favorece a formação de sistemas mais estruturados como CL de fase lamelar e hexagonal quando se utiliza AO e óleo de copaíba procedente de Cooperativas do Acre (OC) e Sigma (OS). O estudo reológico evidenciou que ocorre diminuição da viscosidade das formulações à medida que aumenta a quantidade de fase oleosa e diminui a fase aquosa. As formulações analisadas não provocaram sinais de toxicidade dérmica após administração em ratos, resultados confirmados através da avaliação histológica, pela qual se verificou aumento significativo da espessura da derme e epiderme, além de contagem de leucócitos estatisticamente iguais ao controle. Os testes de atividade antifúngica contra *Candida albicans* mostraram que o fluconazol incorporado nas formulações apresentou melhores resultados, provavelmente devido às propriedades dos sistemas de liberação como ME e CL. Os ensaios de liberação *in vitro* mostraram que as formulações contendo AO e OS podem controlar a liberação de fluconazol. Os ensaios de permeação cutânea mostraram que os sistemas analisados promoveram a retenção do fármaco nas camadas da pele. Os resultados apresentados sugerem que esses sistemas podem ser promissores na administração cutânea de fluconazol para o tratamento de dermatomicoses.

ABSTRACT

In the last decades, there has been an expressive increase in incidence of fungal infections. On the other hand, the treatment of mycoses is not always effective, because available antifungal drugs show inappropriate activity spectrum and pharmacokinetic profile. The aim of this work was to develop and characterize nanostructured systems stabilized by propoxyl (5OP) ethoxyl (20 OE) cethyl alcohol (PROC) containing fluconazole, using oleic acid and copaiba oil from different origins as oily phases. Chemical and biological characterization of copaiba oils from different origins was decisive for the choice of oil to be used in the development of the formulations. The construction of phase diagrams with studied copaiba oils showed that different systems such as microemulsions (ME) and liquid crystals (CL) can be formed. The characterization by polarized light microscopy, rheological behavior and SAXS confirmed the results obtained in phase diagrams, showing that in the region of 40% of PROC, the increase in the quantity of water favors the formation of more structured systems as CL of lamellar and hexagonal phase when using AO and copaiba oil Cooperatives founded in Acre (OC) and Sigma (OS). The formulations did not show signs of Acute Dermal Toxicity after dermal administration in rats. This result was confirmed by histological evaluation, for which there was significant increase in dermis and epidermis thickness, and present leukocytes count lesser than the control. The antifungal activity essay against *C. albicans* showed that the formulations presented significantly higher inhibition halo, suggesting that the components of the systems can improve the drug diffusion, providing better use of their properties and increasing antifungal activity. The in vitro release tests showed that the formulations containing OS and AO can control the drug release. Cutaneous permeation tests showed that the analyzed systems promoted the drug retention in the skin layers. The presented results suggest that these systems may be promising in cutaneous administration of fluconazole in the treatment of dermatomycoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais antifúngicos usados no tratamento de micoses superficiais e sistêmicas.....	26
Figura 2. Estrutura da pele.....	28
Figura 3. Absorção percutânea e liberação transdérmica. Absorção pode ocorrer através dos ductos sudoríparos (1); regiões do estrato córneo (2) e através dos folículos pilosos (3).....	29
Figura 4. Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo (adaptado de MOSER et al., 2001).....	29
Figura 5. 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)	34
Figura 6. Representação esquemática das estruturas mais comuns formadas, dependendo do parâmetro de empacotamento (ditado pela geometria da molécula), teor de água e temperatura.....	37
Figura 7. Representação esquemática de um diagrama de fases.....	39
Figura 8. Estrutura molecular do PPG-5-CETETH-20.....	41
Figura 9. Estrutura molecular do ácido oléico.....	42
Figura 10. Equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation) e Célula de Difusão de Franz com demonstração do compartimento doador e receptor e disposição da membrana.....	80
Figura 11. Cromatograma de Íons Totais do Óleo-Resina de <i>Copaifera sp</i> (OC)	84
Figura 12. Cromatograma de Íons Totais do Óleo-Resina de <i>Copaifera sp</i> (OS).....	84
Figura 13. Cromatograma de Íons Totais do óleo-resina de <i>Copaifera sp</i> (OE).	84
Figura 14. Principais constituintes encontrados nos óleos de copaíba analisados.....	85
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de OC	90
Figura 16. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de OC	91
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de CS	92

Figura 18. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de CS	93
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de OE	94
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de OE	95
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de (1) OE e (2) Óleo de soja.....	96
Figura 22. Resposta de OC, OS e OE sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.....	98
Figura 23. Efeito de OC, OS e OE sobre a produção de NO em culturas de macrófagos peritoneais.....	99
Figura 24. Efeito de OC, OS e OE sobre a inibição de NO em culturas de macrófagos peritoneais.....	100
Figura 25. Efeito da concentração de OC no crescimento da linha celular HepG2. Células HepG2 em placas de cultura de 96-poços foram expostas a OC 24 h antes de se adicionar o AB. O efeito das várias concentrações de OC foi avaliado ao longo de 7 dias.....	103
Figura 26. Efeito da concentração de OS no crescimento da linha celular HepG2. Células HepG2 em placas de cultura de 96-poços foram expostas a OC 24 h antes de se adicionar o AB. O efeito das várias concentrações de OC foi avaliado ao longo de 7 dias.....	103
Figura 27. Efeito da concentração de OE no crescimento da linha celular HepG2. Células HepG2 em placas de cultura de 96-poços foram expostas a OC 24 h antes de se adicionar o AB. O efeito das várias concentrações de OC foi avaliado ao longo de 7 dias.....	103
Figura 28. Diagrama de fases do sistema estabilizado com PROC, AO e fase aquosa. As áreas delimitadas representam: ME – microemulsão, CL – cristal líquido, EM – emulsão e SF – separação de fases. Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.....	107
Figura 29. Diagrama de fases do sistema estabilizado com PROC, OC e fase aquosa. As áreas delimitadas representam: ME – microemulsão, CL – cristal líquido, EM – emulsão, SF – separação de fases e DA – diluição aquosa. Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.....	107
Figura 30. Diagrama de fases do sistema estabilizado com PROC, OS e fase	

aquosa. As áreas delimitadas representam: ME – microemulsão, CL – cristal líquido, EM – emulsão e SF – separação de fases. Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.....	108
Figura 31. Diagrama de fases do sistema estabilizado com PROC, OE e fase aquosa. As áreas delimitadas representam: ME – microemulsão, CL – cristal líquido, EM – emulsão e SF – separação de fases. Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.....	108
Figura 32. Índice de refração das formulações e seus componentes, em relação a concentração de fase aquosa, empregando as 3 fases oleosas: (A) sistemas contendo OC ; (B) sistemas contendo OS e (C) sistemas contendo AO.....	113
Figura 33. Fotomicrografias correspondentes a MLP das formulações contendo OS	115
Figura 34. Fotomicrografias correspondentes a MLP das formulações contendo OC	116
Figura 35. Fotomicrografias correspondentes a MLP das formulações contendo AO	117
Figura 36. Espectros de SAXS de sistemas tensoativos contendo OS, com e sem fluconazol	121
Figura 37. Espectros de SAXS de sistemas tensoativos contendo OC, com e sem fluconazol	122
Figura 38. Espectros de SAXS de sistemas tensoativos contendo AO, com e sem fluconazol	123
Figura 39 Reogramas de ensaios de fluxo de sistemas tensoativos contendo AO, com e sem fluconazol	125
Figura 40. Reograma de ensaios de fluxo de sistemas tensoativos contendo OC, com e sem fluconazol	126
Figura 41. Reogramas de ensaios de fluxo de sistemas tensoativos contendo OS, com e sem fluconazol	127
Figura 42. Reogramas de varredura de frequência de sistemas tensoativos contendo AO, com e sem fluconazol . G' – módulo de armazenagem; G'' – módulo de perda.....	128

Figura 43. Reogramas de varredura de frequência de sistemas tensoativos contendo OS, com e sem fluconazol . G' – módulo de armazenagem; G'' – módulo de perda.....	129
Figura 44. Reogramas de varredura de frequência de sistemas tensoativos contendo OC, com e sem fluconazol . G' – módulo de armazenagem; G'' – módulo de perda.....	130
Figura 45. Fotografia representativa do escore 0 do ensaio de TDA: normal; animal com pele intacta, presença de pequenas manchas características da pele; constituição do epitélio sem alterações. 44A - Antes e 44B - após a administração da substância (dia 1).....	136
Figura 46. Fotografia representativa do escore 1 do ensaio de TDA: Coceira, pele áspera e mais escurecida que as outras regiões, manchas podem estar mais visíveis, com coloração marrom, pêlos da região como em camadas, podendo ocorrer vermelhidão.....	137
Figura 47. Fotografia representativa do escore 2 do ensaio de TDA: pequenas feridas formando escaras leves. 46A e 46B - Escore 2 para OC; 46C - Escore 2 para CB.....	137
Figura 48. Fotografia representativa do escore 4 do ensaio de TDA: escaras graves, com desprendimento de crosta e ferida exposta Escore 4 para CB	137
Figura 49. Fotografia representativa do escore 4 do ensaio de TDA: escaras graves, com desprendimento de crosta e ferida exposta Escore 4 para CB	138
Figura 50. Fotomicrografia evidenciando epiderme de ratos após os tratamentos: (A)- controle; (B) – AO; (C) – PROC; (D) – OS (E) – OC.....	142
Figura 51. Fotomicrografia evidenciando epiderme de ratos após os tratamentos: A - controle; (B) – AO3F; C – OS3F; D – OC3F	142
Figura 52. Fotomicrografia evidenciando a derme papilar de ratos após os tratamentos: (A)- controle; (B)- AO3F; (C) – OC3F; (D) – OS3F.....	144
Figura 53. Placas representativas dos testes antifúngicos frente aos componentes das formulações: AO, OC, OS, e PROC.....	148

Figura 54. Placas representativas dos testes antifúngicos de sinergismo dos óleos (OC, OS, OE e AO) com fluconazol.....	149
Figura 55. Placas representativas dos testes antifúngicos de sinergismo das formulações com e sem fluconazol.....	150
Figura 56. Valores de halo de inibição das formulações e controle positivo frente à <i>Candida albicans</i>	151
Figura 57. Perfil de liberação <i>in vitro</i> (% de liberação) do fluconazol incorporado nas fases oleosas AO, OS e no controle PG.....	153
Figura 58. Perfil de liberação <i>in vitro</i> (% de liberação) do fluconazol incorporado em formulações contendo OS como fase oleosa (média de n=6)...	154
Figura 59. Perfil de liberação <i>in vitro</i> (% de liberação) do fluconazol incorporado em formulações contendo AO como fase oleosa (média de n=6)...	156
Figura 60. Retenção cutânea, no estrato córneo (EC) e na epiderme +derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), de fluconazol incorporado em formulações contendo AO.....	159
Figura 61. Retenção cutânea, no estrato córneo (EC) e na epiderme +derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), de fluconazol incorporado em formulações contendo OS.....	161
Figura 62. Curva analítica do fluconazol, equação da reta (y) e coeficiente de correlação (r^2).....	183
Figura 63. Cromatograma referente injeção de solução tampão fosfato pH 7,4 contendo fluconazol ($150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).....	186
Figura 64. Cromatograma de solução das formulações selecionadas contendo fluconazol ($150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).....	187
Figura 65. Curva analítica de fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.....	188

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção dos componentes empregados na construção do diagrama de fases por titulação aquosa.....	65
Tabela 2. Condições analíticas empregadas nos estudos de liberação, permeação e retenção <i>in vitro</i> do fluconazol.....	68
Tabela 3. Escala utilizada nos testes de toxicidade dérmica.....	73
Tabela 4. Principais constituintes voláteis detectados no óleo-resina <i>Copaifera sp</i> (OC).....	86
Tabela 5. Principais constituintes voláteis detectados no óleo-resina <i>Copaifera sp</i> (OS)	87
Tabela 6. Viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos, após exposição às amostras, OC, OS e OE.....	97
Tabela 7. Produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais após exposição às amostras OC, OS, OE.....	99
Tabela 8. Avaliação da inibição da produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais após exposição às amostras OC, OS, OE.....	101
Tabela 9. Composição (%) das formulações para caracterização física do sistema	110
Tabela 10. Índice de refração dos componentes das formulações.....	111
Tabela 11. Índice de refração das formulações contendo OC.....	111
Tabela 12. Índice de refração das formulações contendo OS.....	112
Tabela 13. Índice de refração das formulações contendo AO.....	112
Tabela 14. Composição (%) das formulações para caracterização física do sistema e resultados de MLP.....	119
Tabela 15. Parâmetros para determinação estrutural dos sistemas.....	120
Tabela 16. Solubilidade do fluconazol nos componentes empregado nas formulações mediante ensaio prévio	132
Tabela 17. Solubilidade do fluconazol nas formulações mediante ensaio prévio...	133
Tabela 18. Resultados obtidos para o ensaio de quantificação do fluconazol nas formulações.....	134
Tabela 19. Escores de toxicidade em ratos após administração de Prop 2000 mg/Kg (controle negativo)	135

Tabela 20. Escores de toxicidade em ratos após administração de CB 15% (1700 mg/Kg) (controle positivo)	135
Tabela 21. Escores de toxicidade em ratos após administração de PROC 2000 mg/Kg.....	135
Tabela 22. Escores de toxicidade em ratos após administração de OC 2000 mg/Kg.....	135
Tabela 23. Escores de toxicidade em ratos após administração de OS 2000 mg/Kg.....	136
Tabela 24. Escores de toxicidade em ratos após administração de AO 2000 mg/Kg.....	136
Tabela 25. Espessura da epiderme e derme (média ± DP) para os diferentes grupos experimentais.....	140
Tabela 26. Contagem de leucócitos e fibroblastos (média ± DP) para os diferentes grupos experimentais.....	145
Tabela 27. Halos de inibição obtidos para os óleos puros, óleos com fluconazol e controle positivo fluconazol contra <i>C. albicans</i>	147
Tabela 28. Halos de inibição obtidos para as formulações testadas contra <i>C. albicans</i>	150
Tabela 29. Quantidade de fluconazol liberado a partir de formulações contendo OS, por área e porcentagem liberada, após 24h de experimento.....	155
Tabela 30. Quantidade de fluconazol liberado por área e porcentagem liberada, a partir de formulações contendo AO, após 24h de experimento.....	157
Tabela 31. Quantidade de fluconazol, incorporado em formulações contendo AO como fase oleosa retido e permeado na pele após 6 ou 12h de experimento.....	158
Tabela 32. Quantidade de fluconazol, incorporado em formulações contendo OS como fase oleosa retido e permeado na pele após 6 ou 12h de experimento.....	161
Tabela 33. Resultados obtidos para o ensaio de linearidade.....	184
Tabela 34. Resultados obtidos para o ensaio de precisão por repetibilidade.....	184
Tabela 35. Resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária.....	185
Tabela 36. Resultados obtidos para o ensaio de exatidão.....	186

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ✓ AO – ácido oléico
- ✓ CB – cloreto de benzalcônio
- ✓ CL – cristal líquido
- ✓ DA – diluição aquosa
- ✓ EM - emulsão
- ✓ F (presente em siglas como AOF, OSF, AO1F, OS1F, etc..) - Fluconazol
- ✓ LPS - lipopolissacarídeo bacteriano
- ✓ ME - microemulsão
- ✓ MLP – Microscopia de Luz Polarizada
- ✓ NO – óxido nítrico
- ✓ OC – óleo de copaíba obtido de Cooperativas do Acre.
- ✓ OE – óleo de copaíba obtido comercialmente
- ✓ OS – óleo de copaíba obtido da Sigma
- ✓ PROC – álcool cetílico etoxilado e propoxilado
- ✓ Prop – propilenoglicol
- ✓ RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- ✓ SAXS – Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
- ✓ SF – separação de fases
- ✓ TDA – Toxicidade Dérmica Aguda
- ✓ TDDR – Toxicidade Dérmica por dose repetida
- ✓ TMS – Trimetilsilano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 DERMATOMICOSSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	24
2.2 VIA CUTÂNEA.....	27
2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS: MICROEMULSÕES E CRISTAIS LÍQUIDOS.....	32
2.3.1 DIAGRAMA DE FASES.....	38
2.3.2 COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS.....	39
2.3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DE SISTEMAS COLOIDAIIS.....	44
2.3.3.1 Microscopia de Luz Polarizada.....	45
2.3.3.2 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	46
2.3.3.3 Comportamento Reológico.....	48
2.4 TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA.....	49
3 OBJETIVOS	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 MATERIAIS.....	54
4.2 EQUIPAMENTOS.....	55
4.3 Animais.....	55
4.4 Células e Cepas	56
4.3 MÉTODOS.....	56
4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS DE COPAÍBA DE DIFERENTES FONTES.....	56
4.3.1.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	56
4.3.1.1.1 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)	56
4.3.1.1.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	57
4.3.1.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	57

4.3.1.2.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS ÓLEOS DE COPAÍBA.....	57
4.3.1.2.1.1 Animais.....	58
4.3.1.2.1.2 Amostras.....	58
4.3.1.2.1.3 Obtenção das células do exsudato peritoneal.....	58
4.3.1.2.1.4 Obtenção do sobrenadante de cultura de macrófagos.....	59
4.3.1.2.1.5 Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal.....	59
4.3.1.2.1.6 Determinação da produção de óxido nítrico.....	60
4.3.1.2.1.7 Inibição da produção de óxido nítrico.....	61
4.3.1.2.1.8 Análise estatística.....	62
4.3.1.2.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM CÉLULAS HEPG2.....	62
4.3.1.2.2.1 Cultura celular.....	62
4.3.1.2.2.2 Tratamento das células.....	63
4.3.1.2.2.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando Alamar Blue®.....	63
4.3.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS.....	64
4.3.2.1 DIAGRAMA DE FASES.....	64
4.3.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS COLOIDAIIS.....	65
4.3.2.2.1 Índice de refração.....	66
4.3.2.2.2 Determinação do pH.....	66
4.3.2.2.3 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)	66
4.3.2.2.4 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)	66
4.3.2.2.5 Comportamento Reológico.....	67
4.3.3 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO FLUCONAZOL NOS SISTEMAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	68
4.3.3.1 Linearidade.....	69
4.3.3.2 Precisão.....	69
4.3.3.4 Exatidão.....	69
4.3.3.5 Especificidade ou seletividade.....	69
4.3.3.6 Limite de detecção e limite de quantificação.....	70
4.3.3.7 Robustez.....	70
4.3.3.8 Avaliação da incorporação de fluconazol.....	70
4.3.4 TOXICIDADE DÉRMICA.....	71
4.3.4.1 Toxicidade Dérmica com componentes e formulações.....	71

4.3.4.2	Análise estatística.....	73
4.3.4.3	Avaliação histológica.....	74
4.3.4.1	Análise histométrica.....	74
4.3.4.2	Análise histopatológica.....	75
4.3.5	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS COMPONENTES E FORMULAÇÕES.....	75
4.3.5.1	Preparo das amostras.....	76
4.3.5.2	Preparo do inóculo fúngico.....	76
4.3.5.3	Preparo dos discos.....	77
4.3.5.4	Ensaio de difusão.....	77
4.3.5.5	Análise estatística.....	77
4.3.6	AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>in vitro</i>	78
4.3.6.1	Curva analítica de fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.....	78
4.3.6.2	Estudo de solubilidade do fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.....	79
4.3.6.3	Liberação <i>in vitro</i>	79
4.3.6.4	Permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	81
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS DE COPAÍBA DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS.....	83
5.1.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	83
5.1.1.1	CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG/EM).....	83
5.1.1.2	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹ H E ¹³ C.....	88
5.1.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	97
5.1.2.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	97
5.1.2.1.1	Avaliação da viabilidade celular.....	97
5.1.2.1.2	Determinação da produção de óxido nítrico.....	98
5.1.2.1.3	Determinação da inibição da produção de óxido nítrico.....	100
5.1.2.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM CÉLULAS HEPG2.....	102
5.2	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS.....	106
5.2.1	DIAGRAMA DE FASES.....	106
5.2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS.....	110

5.2.2.1 Índice de refração (IR)	110
5.2.2.2 Determinação do pH.....	113
5.2.2.3 Microscopia de Luz Polarizada.....	114
5.2.2.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	120
5.2.2.5 Comportamento Reológico.....	123
5.3 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE FLUCONAZOL NAS FORMULAÇÃO	131
5.4 TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA.....	135
5.4.1 Toxicidade Dérmica com componentes e formulações.....	135
5.4.2 Avaliação histológica.....	139
5.4.2.1 Análise histométrica.....	139
5.4.2.2 Análise histopatológica.....	143
5.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS COMPONENTES E FORMULAÇÕES.....	147
5.5.1 Avaliação da atividade antifúngica dos componentes dos sistemas nanoestruturados.....	147
5.5.2 Avaliação da atividade antifúngica das formulações contendo fluconazol.....	149
5.6 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>in</i> <i>vitro</i>	151
5.6.1 Estudo de solubilidade do fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.....	152
5.6.2 Liberação <i>in vitro</i>	152
5.6.3 Permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	157
6. CONCLUSÕES.....	163
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	166
APÊNDICE.....	182

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são consideradas um dos maiores problemas para a saúde pública. Dentre estas infecções, destacam-se as dermatomicoses, que envolvem a pele, principalmente o estrato córneo e apêndices como unhas, cabelo e mucosas (oral e vaginal) (NEGRONI, 2010; CRESPO-ERCHIGA et al., 2005). O tratamento das micoses humanas não é sempre efetivo e 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 da sua utilização (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002). Por esta razão, há uma busca contínua de novos medicamentos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes.

O tempo necessário e o elevado custo são os principais fatores limitantes para o sucesso terapêutico no tratamento das micoses (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002). Além disso, muitas infecções fúngicas provocam aparecimento de lesões cutâneas ou subcutâneas que demoram a desaparecer mesmo em tratamentos longos (REX, 2001; FENNER et al., 2006).

Por outro lado, 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 (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002). Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos e medicamentos antifúngicos mais potentes, e, sobretudo, mais seguros que os existentes. Assim, nas últimas décadas tem ocorrido um grande interesse no desenvolvimento de produtos para serem administrados na pele ou mucosas, para exercer ação local ou sistêmica.

A pele apresenta inúmeras vantagens tanto para a liberação tópica quanto para a permeação cutânea de fármacos (URBAN, 2004; NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2004; THOMAS; PANCHAGNULA, 2003; LEHMANN et al., 2001). O fármaco ao se difundir na pele pode ficar retido no estrato córneo, na epiderme+derme, caracterizando a retenção cutânea do fármaco ou ainda se permear para as camadas mais profundas, podendo atingir a circulação sistêmica. Entretanto, devido à estrutura e composição lipídica da epiderme, mais

especificamente do estrato córneo, existe uma grande dificuldade na difusão dos fármacos através da pele. Por conseguinte, a penetração através da pele e permeação do fármaco após aplicação tópica depende das propriedades físico-químicas do fármaco, coeficiente de partição O/A, propriedades de superfícies, entre outras (BAROLI, 2000; PROW et al., 2011; MULLER et al., 2003; MULLER; GOYMANN, 2004; MAGHRABY, 2008).

Assim, a habilidade de se conseguir concentrações terapêuticas de fármaco nas diversas camadas do tecido cutâneo ou lesão, acompanhado por baixas concentrações sanguíneas, evitando-se, desta forma, os efeitos farmacológicos, adversos e tóxicos em outras regiões do corpo, pode melhorar a eficiência de tratamento de algumas patologias como a dermatomicoses.

Muitas das alternativas tecnológicas empregadas na modulação da penetração e permeação do fármaco pela pele têm sido focadas no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, como os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, as micro e nanopartículas, as microemulsões e os cristais líquidos, devido às suas propriedades favoráveis de transporte, direcionando mais especificamente o fármaco para o local de ação, além da facilidade de solubilização de fármacos, melhorando as propriedades biofarmacêuticas dos mesmos.

As microemulsões (ME) e cristais líquidos (CL) têm sido amplamente estudados no desenvolvimento de novas formulações para administração tópica, em especial a cutânea (HEUSCHKEL et al., 2008; MÜLLER-GOYMANN, 2004). ME são sistemas estáveis, constituídos por um tensoativo e/ou co-tensoativo, uma fase oleosa e a fase aquosa, propriedades que facilitam a solubilização de fármacos lipofílicos, possibilitando incorporação, se necessário, de concentração mais elevada que a preconizada. A interação fármaco com o sistema também proporciona um controle da liberação do fármaco, bem como o direcionamento do mesmo ao local de ação. Dependendo da composição, estes sistemas podem interagir com a pele, facilitando a interação com o estrato córneo e proporcionando melhor aproveitamento da dose administrada do fármaco (BAROLI, 2000).

Com base no exposto, torna-se interessante a busca de novas alternativas tecnológicas para o tratamento de dermatomicoses envolvendo estudos relacionados à nanotecnologia. O presente trabalho propõe a pesquisa de ME e CL para administração cutânea de fluconazol no tratamento de dermatomicoses.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DERMATOMICOSSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As dermatomicoses são definidas como dermatites crônicas localizadas, causada pela invasão de dermatófitos, podendo acometer pele, cabelos, unhas, canal auditivo externo, mucosas e áreas adjacentes (LACAZ et al., 2002). São doenças de ocorrência mundial, com maior prevalência em regiões com clima quente e úmido (SAMPAIO; RIVITTI, 2002).

Nas últimas décadas, tem se verificado um grande aumento na incidência de infecções fúngicas, sendo as dermatomicoses as principais responsáveis por este aumento expressivo. Dentre os fatores relacionados a esta ocorrência, os principais são: o melhor diagnóstico laboratorial e clínico, o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras ou que utilizam medicamentos imunossupressores e o uso indiscriminado de fármacos que têm permitido a instalação de microorganismos convencionalmente saprófitos. Além das infecções em humanos, os animais também podem ser atacados por fungos muito difíceis de serem combatidos, tornando-se foco de transmissão (FENNER et al., 2006).

As infecções fúngicas que acometem a pele são divididas em micoses subcutâneas ou sistêmicas. As primeiras resultam de infecção traumática causada pelo fungo no tecido subcutâneo, desenvolvendo doenças localizadas, com eventual disseminação linfática. A esporotricose é uma das infecções mais comuns desta classe e, embora antes considerada doença do meio rural, está cada vez mais frequente em grandes centros urbanos (ARAÚJO et al., 2001). As micoses sistêmicas ou profundas ou disseminadas compreendem as infecções fúngicas que atingem os órgãos internos do corpo ou se difundem pela circulação sanguínea, como por exemplo, a coccidioidomicose, histoplasmose e candidíase sistêmica (ERCHIGA, 2008).

A maioria das doenças fúngicas tem sido tratadas com medicamentos administrados por via oral ou venosa, entretanto, observam-se limitações nas opções terapêuticas disponíveis. Outro agravante é que muitas destas infecções provocam aparecimento de lesões cutâneas ou subcutâneas que demoram a

desaparecer mesmo com tratamentos em longo prazo, podendo se tornar focos de transmissão (REX, 2008; FENNER et al., 2006).

O tratamento das micoses nem sempre é efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis possuem um perfil farmacocinético inadequado, promovendo recorrência ou resistência, além de apresentarem toxicidade. 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 da sua utilização (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002). Por esta razão e levando em conta o fato de que a introdução de novos fármacos na terapêutica tem se tornado um processo muito oneroso, a pesquisa de novas alternativas tecnológicas que aumentem a eficiência e segurança dos fármacos já disponíveis tem sido intensificada.

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 (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002).

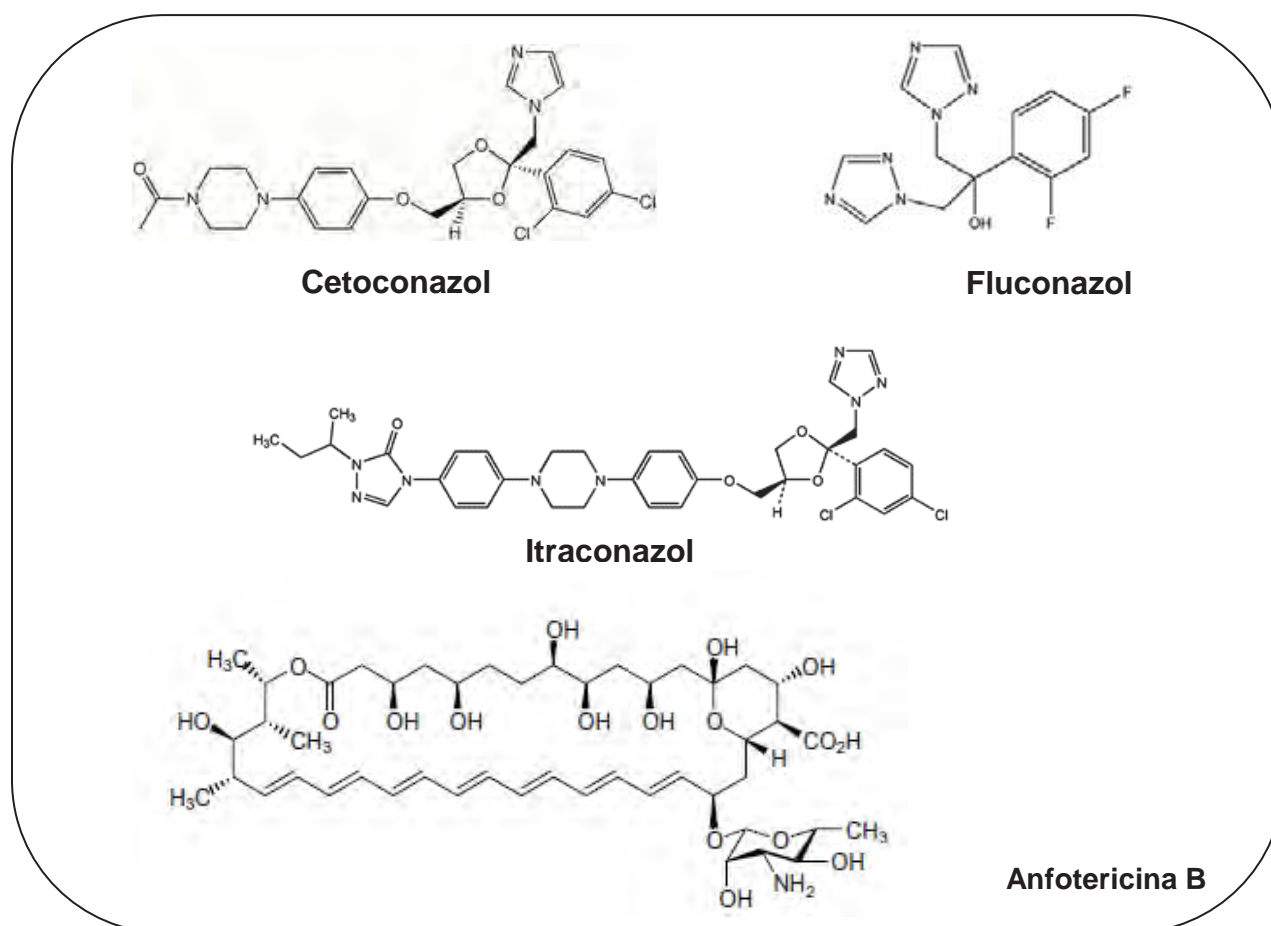
A anfotericina B e os derivados azólicos, como itraconazol, cetoconazol e fluconazol (Figura 1), são os fármacos mais eficazes disponíveis no arsenal terapêutico da atualidade para o tratamento de infecções fúngicas. Dentre os derivados azólicos pertencentes à classe dos triazóis, o fluconazol, desenvolvido na década de 1980, foi o primeiro a integrar a classe dos triazóis e surgiu após anos de pesquisas com modificações moleculares a partir dos fármacos imidazólicos, como um promissor antifúngico graças à ótima combinação de eficácia, características farmacocinéticas, solubilidade e perfil de segurança (PEREIRA, 2007). É metabolizado de forma mais lenta e, quando comparado aos imidazólicos, age na inibição da síntese de esteróide fúngico e praticamente não altera a síntese do ergosterol dos mamíferos, sendo menos tóxico e melhor absorvido que os outros azóis, razão principal pelas quais os triazóis são os principais fármacos antifúngicos em pesquisa e desenvolvimento (PARK et al., 2007).

O fluconazol (P.M. 306, 27 g/mol), é um pó branco, ligeiramente solúvel em água (8 mg/mL), solúvel em etanol e acetona, facilmente solúvel em metanol e muito pouco solúvel em tolueno. A presença de dois anéis triazólicos em sua estrutura é responsável por sua menor lipofilicidade (Figura 1). É considerado uma base fraca

com constante de ionização (pKa) medida em NaOH 1,1M de $1,76 + 0,1$, com protonação no nitrogênio 4 (O'NEIL, 2006; DASH; ELMQUIST, 2001).

Seu mecanismo de ação, assim como dos outros azóis, está ligado à sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana das leveduras e outros fungos, inibindo a síntese do ergosterol. A inibição do P-450-14-alfa- demetilase dependente de lanosterol causa acúmulo de esteróis metilados, depleção de ergosterol e inibição do crescimento celular (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002).

Figura 1. Principais antifúngicos usados no tratamento de micoses superficiais e sistêmicas.



Dependendo do tipo de dermatomicose, existem os fármacos de escolha, entretanto, em alguns casos pode-se observar intolerância, resistência e diversos efeitos colaterais, que podem aumentar o tempo de tratamento, que pode durar três

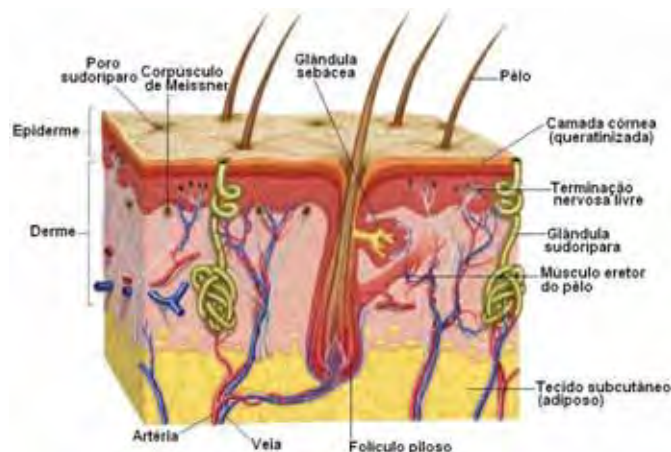
meses ou mais, principalmente quando não há administração de antifúngico por via tópica (KWON et al., 1998; HAN, 2007; BONIFAZ et al., 2007).

O fluconazol é utilizado quando ocorre intolerância. É utilizado também por apresentar menor número de efeitos colaterais. Entretanto, o tratamento é muito longo, principalmente quando há presença de lesões cutâneas, sendo que a dose quase sempre é aumentada devido à resposta inadequada do tratamento, necessitando assim de mais estudos para determinação de dose ideal e duração do tratamento.

Devido à importância das infecções antifúngicas dentro do cenário de saúde pública, destacando o papel dos azóis como agentes antifúngicos, é necessário buscar novas alternativas tecnológicas, que engloba inclusive outras vias de administrações, para o uso destes fármacos no tratamento de doenças antifúngicas, que possibilitem aumentar a eficiência dos mesmos na terapia e forneça aos clínicos e pacientes uma maior diversidade de tratamento.

2.2 VIA CUTÂNEA

A pele, considerada o maior órgão do corpo humano, pode ser descrita como um órgão estratificado com três camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo, além dos apêndices como folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas (Figura 2). A epiderme é composta externamente do estrato córneo (cerca de 10 μm de espessura), conhecido como epiderme não viável e considerado a principal barreira limitante à absorção percutânea de fármacos, o que se justifica pelo seu espaço intercelular, rico em lipídios, que compreende matrizes lamelares com camadas hidrofílicas e camadas duplas lipofílicas alternantes formadas durante o processo de queratinização. Além dessa estrutura, o estrato córneo possui células queratinizadas sobrepondo-se umas às outras, ligadas por pontes intercelulares (corneócitos) e comprimidas em cerca de 15 camadas. Ele requer no mínimo 10% de umidade para que sua flexibilidade seja mantida, e a camada de lipídios intercelulares é a responsável direta por evitar a perda de água transcutânea (WALTERS; ROBERTS, 2002; BLOCK, 2005).

Figura 2. Estrutura da pele (Fonte: BLOCK, 2008).

Apesar da grande utilização e vantagens que a via oral oferece, vários fármacos, quando administrados por esta via podem ser inativados no trato gastrointestinal ou apresentarem extenso metabolismo hepático. Assim, nas últimas décadas tem ocorrido um grande interesse no desenvolvimento de produtos para serem administrados por outras vias de administração, como a cutânea. Para isso, muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de conhecer mais os mecanismos de permeabilidade cutânea das substâncias ativas (KOVACEVIK et al., 2011; BAROLI, 2009).

O uso de medicamentos administrados pela via cutânea tem se evidenciado ao longo dos anos. Existem relatos de efeitos sistêmicos de agentes hormonais e antimicrobianos quando administrados por via tópica, desde o século anterior. Os medicamentos são aplicados na pele com o objetivo de alcançar um ou mais dos seguintes efeitos: efeitos de superfície (fotoprotetores); efeitos locais (corticosteróides para dermatite); permeação para atingir efeitos sistêmicos (adesivos transdérmicos de nicotina) e tecidos mais profundos (anti-inflamatórios não-esteroidais) (BLOCK, 2005; WALTERS; ROBERTS, 2002; ROBERTS; CROSS; PELLET, 2002). As Figuras 3 e 4 resumem o processo permeação e penetração do fármaco através da pele através do estrato córneo. Esta última pode ocorrer intracelularmente através da matriz lipídica entre os corneócitos ou pela via transcelular entre os corneócitos e a matriz lipídica (Figura 4) (MOSER et al., 2001).

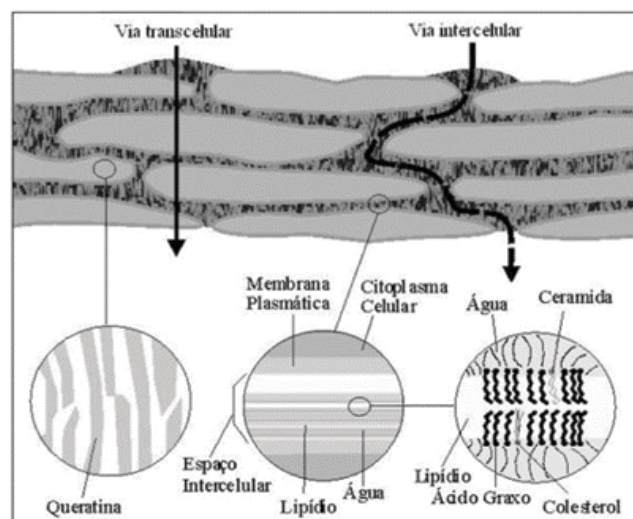
Apesar da grande utilização e vantagens que a via oral oferece, vários fármacos, quando administrados por esta via, podem ser inativados no trato gastrointestinal ou apresentarem extenso metabolismo hepático. Assim, nas últimas

décadas tem ocorrido um grande interesse no desenvolvimento de produtos para serem administrados por outras vias de administração, como a cutânea. Para isso, muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de conhecer melhor os mecanismos de permeabilidade cutânea das substâncias ativas (KOVACEVIK et al., 2011; BAROLI, 2009; PROW et al., 2011).

Figura 3. Absorção percutânea e liberação transdérmica. Absorção pode ocorrer através dos ductos sudoríferos (1); regiões do estrato córneo (2) e através dos folículos pilosos (3) (adaptado de Walters, 2002).



Figura 4. Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo (adaptado de MOSER et al., 2001).



A via cutânea apresenta inúmeras vantagens tanto para a liberação tópica quanto para a permeação cutânea de fármacos, uma vez que o metabolismo pré-

sistêmico do fármaco pode ocorrer antes que este alcance a circulação sistêmica, além de maior conforto e adesão do paciente ao tratamento (BAROLI et al., 2000; KREILGAARD, 2002). Entretanto, devido à estrutura e composição lipídica da epiderme, mais especificamente do estrato córneo, existe uma grande dificuldade na difusão dos fármacos através da pele.

Um produto farmacêutico tópico ideal é aquele capaz de liberar o fármaco no local de ação na concentração terapêutica por um período de tempo tão longo quanto necessário (SERQUEIRA, 1990). Assim, pode-se afirmar que o sucesso terapêutico para alguns produtos está relacionado com a habilidade de se conseguir concentrações terapêuticas de fármaco no tecido cutâneo ou lesão, acompanhado por baixas concentrações sanguíneas, evitando-se, desta forma, os efeitos farmacológicos, adversos ou tóxicos, em outras regiões do corpo (NACHT, 1996).

Segundo Suhonen et al. (1999), o aumento da permeação cutânea se dá por agentes específicos chamados de promotores de permeação, que interagem com o estrato córneo, alterando sua resistência à penetração de substâncias exógenas. São exemplos, dimetil-sufóxido (DMSO), ácido láctico, ácido oléico, ácido salicílico, uréia, solventes orgânicos (etanol, metanol e acetona) e os tensoativos, os quais podem interagir com o estrato córneo quando incorporados em formulações de uso tópico, facilitando a difusão do fármaco. A interação da água presente na bicamada lipídica com as cabeças polares do tensoativo permite a entrada de substâncias polares, devido ao intumescimento dessas cabeças, induzindo alterações na estrutura do estrato córneo, aumentando a permeação (SUHONEN et al., (1999).

Devido às suas propriedades favoráveis de transporte e solubilização de fármacos, os sistemas de liberação controlada de fármacos têm se tornado um foco de maior interesse na aplicação tópica, com o objetivo de se obter um efeito mais localizado. Na aplicação cutânea de antifúngicos para algumas infecções, o aumento da distribuição e do acúmulo desses fármacos no estrato córneo ou em camadas da pele como epiderme e derma é mais importante para a eficácia e segurança do tratamento que o aumento da absorção percutânea e/ou sistêmica. (HASHIGUCHI et al., 1997).

A eficácia clínica de terapia tópica antifúngica depende da habilidade do fármaco penetrar no estrato córneo e do tempo de residência (PIÉRARD et al., 1996). O fluconazol é um antifúngico de amplo espectro que tem sido usado para

administração oral (KLEIN, 2007). Após administração oral, podem ocorrer efeitos adversos como cefaléia, desconforto epigástrico, diarreia, náuseas, icterícia, e, além disso, pode acumular-se no suor e estrato córneo (FAERGEMANN, 1999), além de favorecer o aparecimento de cepas resistentes ao fármaco (BORECKÁ-MELKUSOVÁ et al., 2008). Ele pode acumular em tecidos queratinizados mesmo durante semanas após o término do tratamento, ficando muito tempo em locais que em alguns casos seria necessário (FAERGEMANN, 1999).

Por um bom tempo, acreditou-se que o mecanismo pelo qual algumas substâncias administradas por via sistêmica alcançavam as camadas mais superficiais da pele era pelo mecanismo de difusão. Por este mecanismo, a substância era lentamente transportada para as camadas queratinizadas e corneócitos pelo processo de renovação natural da pele. Entretanto, este processo leva cerca de 3-4 semanas, o que contraria as evidências de que algumas substâncias, como o fluconazol, administrada sistemicamente são capazes de atingir a pele muito mais rapidamente que a renovação celular. Outra evidência de que o transporte destas substâncias deve ocorrer por outros mecanismos é a ausência de vasos sanguíneos nesta região. Em um bom trabalho de revisão, Patzelt e colaboradores (2008) discutem os mecanismos que podem explicar porque algumas substâncias administradas por via sistêmica atingem rapidamente as camadas mais externas da pele. Segundo estes autores, o transporte pode ocorrer por dois mecanismos que dependem das características da substância a ser transportada.

A retenção do fluconazol na pele tem sido atribuída à alta afinidade ao estrato córneo devido a uma interação entre o fármaco e queratina (KLIMKE; SCHAFER-KORTING, 1997). Com o acúmulo na pele, cabelo ou unhas, o fluconazol dificilmente irá atingir camadas mais profundas e posteriormente a circulação sistêmica, devido a sua alta afinidade ao estrato córneo, até mesmo quando é administrado pela via oral (DE DONCKER et al., 1997). Esse alto tropismo do fluconazol pela queratina é um importante fator para sua ação contra infecções da pele (SOBUE; SEKIGUCHI; NABESHIMA, 2004), no entanto precisa atingir as outras camadas da pele, como epiderme e derme para ter maior efeito sobre os fungos. Entretanto, sua administração tópica tem sido pouco investigada, apesar das vantagens apresentadas.

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

2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS: MICROEMULSÕES E CRISTAIS LÍQUIDOS

A pesquisa de novos sistemas de liberação de fármacos, ao longo dos anos, tem possibilitado contornar as limitações existentes, bem como melhorar as propriedades de medicamento com consequente direcionamento do fármaco (BLOCK, 2008). A acessibilidade da pele como via de administração de medicamentos, além de evitar efeitos adversos observados em outras vias, resultou em um número cada vez mais crescente de sistemas de liberação de fármacos e formas farmacêuticas aplicadas à pele, quer seja para efeitos locais ou sistêmicos (BLOCK, 2008; ROBERTS; CROSS; PELLET, 2002).

Uma preparação 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). Muitas das pesquisas de novas alternativas tecnológicas que aumentem a eficiência e segurança dos fármacos já disponíveis têm sido focadas no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (BRUSCHI et al., 2008; MAINARDES et al., 2006; BRUSCHI et al., 2003).

A nanotecnologia tem representado um grande avanço no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, em especial na indústria farmacêutica. Esses sistemas se caracterizam pelo tamanho reduzido das partículas e principalmente pela compartimentalização de fármacos em ambientes restritos, podendo, com isso, direcioná-los para regiões específicas onde deverão exercer o efeito farmacológico, favorecendo a interação com sistemas biológicos, além de poder controlar a velocidade de liberação sem alterar a estrutura química da molécula transportada (MAINARDES et al., 2005, MOURÃO et al., 2005).

Além da vantagem econômica, o desenvolvimento de novos sistemas para liberação de fármacos, como lipossomas, microemulsões, cristais líquidos, micro/nanopartículas e dispersões sólidas, tem permitido o aumento da eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual, a re-introdução de outros anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos fármacos antes que sejam utilizados na terapêutica (MAINARDES et al. 2006; URBAN, 2004).

O estudo de microemulsões e cristais líquidos como alternativa de novos sistemas de liberação de componentes ativos tem se intensificado com os objetivos de aumentar a solubilidade e a estabilidade de componentes ativos, possibilitando a incorporação de componentes hidrofílicos ou lipofílicos, agindo como sistemas reservatórios, melhorando a biodisponibilidade e estabilidade dos fármacos, reduzindo a dose de fármacos (HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008; HEUSCHKEL; GOEBEL; NEUBERT, 2008; FORMARIZ et al., 2005).

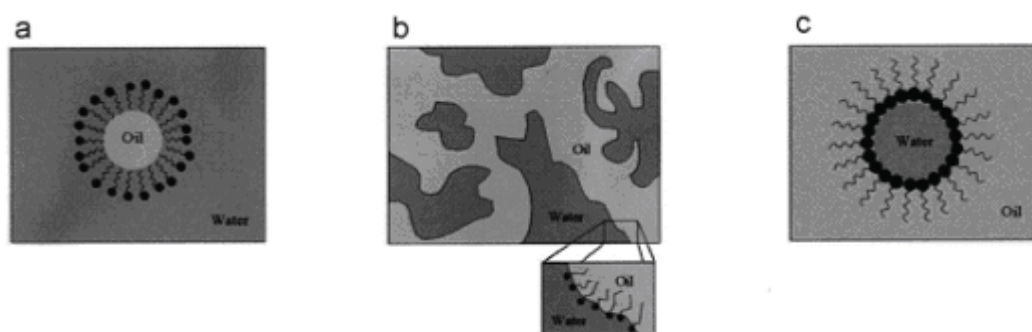
Microemulsões (ME) são sistemas opticamente transparentes ou translúcidos, pouco viscosos, termodinamicamente estáveis e sua formação é acompanhada pela diminuição da tensão superficial do sistema, chegando a ficar próxima de zero (HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008; HEUSCHKEL; GOEBEL; NEUBERT, 2008). São caracterizadas pela mistura de óleo, água e tensoativo, formando um sistema isotrópico e termodinamicamente estável, que se forma espontaneamente. Possuem grande capacidade de solubilização (compostos hidrofílicos e lipofílicos) e baixa viscosidade. Um filme interfacial flexível é formado e caracteriza-se por valores baixos de tensão interfacial (10^{-2} mN/m) (HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008; FORMARIZ et al., 2005).

Geralmente, as MEs são sistemas esféricos com diâmetro muito pequeno, na faixa de 100 a 1000 Å, enquanto que o diâmetro das gotículas de uma emulsão estável é da ordem de 5000 Å. As MEs são classificadas como sistemas coloidais com diâmetro de partícula menor que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente, e, portanto, não espalham luz. Este fato explica porque são sistemas opticamente transparentes (HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008; HEUSCHKEL; GOEBEL; NEUBERT, 2008; FORMARIZ et al., 2005).

As microemulsões (ME) podem ser de água em óleo (A/O, quando o volume de água é baixo) ou óleo em água (O/A, quando o volume de óleo é baixo), podendo

inverter de um tipo para outro pela adição de uma fase ou alteração do tensoativo. A Figura 5 mostra uma representação esquemática da organização das microemulsões. Em sistemas nos quais as quantidades de água e óleo são similares, estruturas bicontínuas são formadas (LAWRENCE; REES, 2000). Essas diferentes microestruturas podem afetar significativamente a liberação de fármacos (CORREA et. al., 2005).

Figura 5. 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).



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

As microemulsões são exemplos de formulações que podem aumentar a penetração através do estrato córneo. Isto pode ocorrer pelos seguintes mecanismos: a composição e estrutura destes sistemas permitem incorporar quantidades de fármacos maiores que outras formulações tópicas convencionais, como loções, cremes e géis; podem aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água através da fase oleosa; podem, através de sua composição, aumentar a estabilidade do fármaco, modificar a barreira de difusão da pele, podendo favorecer sua liberação na pele, sem, contudo, induzir alterações

significantes e irreversíveis à função barreira da pele (BAROLI et al., 2000; URBAN, 2004).

A composição e propriedades destes sistemas têm permitido uma melhor aplicabilidade e utilização das microemulsões como sistemas de liberação de fármacos em diferentes vias de administração (BAROLI et al., 2000). A utilização de microemulsões como sistemas capazes de modular a liberação transdérmica de fármacos e o potencial destes sistemas tem sido descrito e discutido por vários autores (HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008; HEUSCHKEL; GOEBEL; NEUBERT, 2008; SARCIAUX et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2004).

Dependendo da composição da ME, a barreira difusional da pele pode ser modificada o que poderá favorecer o particionamento do fármaco na pele. Estes sistemas podem ainda modular a liberação local ou sistêmica de fármacos através de diferentes mecanismos. (HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008; FORMARIZ et al., 2005; BAROLI et al., 2000).

Por esta razão, esses sistemas têm se tornado foco de grande interesse para administração cutânea, com o objetivo de se obter um efeito do fármaco mais localizado, o que poderá ser acompanhado de uma diminuição da sua absorção sistêmica, uma vez que esta absorção muitas vezes não é necessária, como nas dermatomicoses.

A organização espontânea de tensoativos em meios aquosos pode resultar em outras estruturas além de microemulsões, como por exemplo, fases líquido-cristalinas. Os cristais líquidos são estruturas ordenadas com arranjo molecular contendo regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. Alterando a composição dos sistemas, podem ser formadas diferentes formas líquido-cristalinas, como lamelares, hexagonais e cúbicas. Os cristais líquidos são utilizados na liberação de fármacos devido a sua alta viscosidade, podendo prolongar a liberação dos mesmos. Além disso, possuem uma área interfacial interna, com características físico-químicas diferentes da área externa, formando microambientes distintos, que permitem compartimentalizar fármacos lipossolúveis e hidrossolúveis (BOYD et al., 2006; KREILGAARD, 2002).

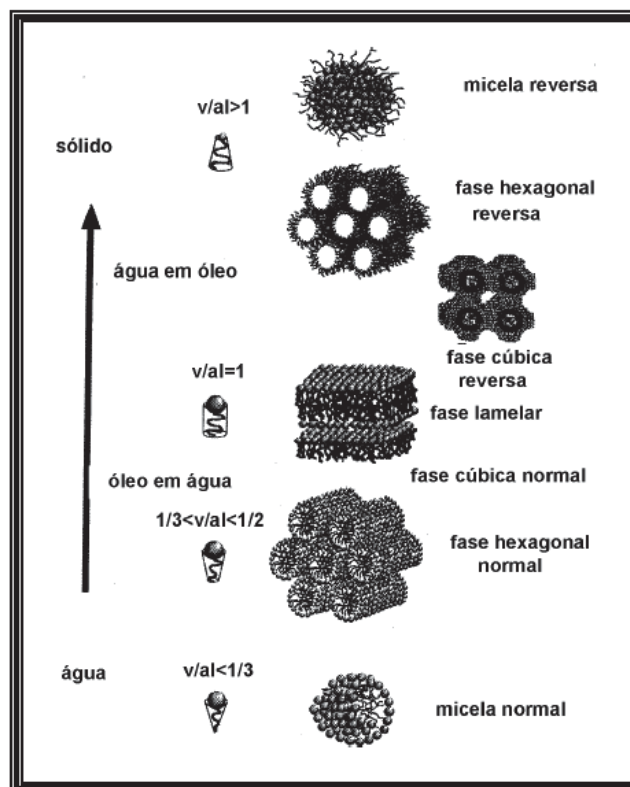
Os cristais líquidos são sistemas cujas características físicas os posicionam entre sólidos e fundidos, com parcial ordem/desordem das espécies moleculares. Por esse motivo, são também chamados de mesofases. Mesofases liotrópicas

contêm, no mínimo, dois componentes: o componente orgânico, por exemplo, tensoativo e seu solvente. A porção orgânica deve exibir certa complexidade química, do contrário, o solvente iria simplesmente solubilizar a molécula, originando soluções de moléculas dispersas e desordenadas, e certamente não seriam formados cristais líquidos. A adição de um solvente, tal como a água, irá hidratar seletivamente a porção hidrofílica das moléculas de tensoativo, evitando as regiões hidrofóbicas (FORMARIZ et al., 2005; HYDE, 2001).

As mesofases liotrópicas podem ser consideradas um arranjo molecular de micelas ordenadas, caracterizadas por domínios hidrofóbicos e hidrofílicos alternadamente. Conforme aumenta a concentração de tensoativo, diferentes mesofases líquido-cristalinas podem ser formadas, como lamelares, hexagonais e cúbicas (Figura 6). Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados liotrópicos, enquanto os termotrópicos têm sua estrutura dependente da temperatura (GABBOUN et al., 2001).

A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede unidimensional. Já na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bidimensionais. Nos sistemas de fase cúbica, as moléculas estão arranjadas numa estrutura tridimensional, a qual consiste de duas redes congruentes de canais de água envolvidos por bicamadas lipídicas ou de tensoativo (FORMARIZ et al., 2005).

Figura 6. Representação esquemática das estruturas mais comuns formadas, dependendo do parâmetro de empacotamento (ditado pela geometria da molécula), teor de água e temperatura. Adaptado de BORNÉ; NYLAMDER; KHAN (2001).



Para entender a formação destas estruturas, deve-se levar em consideração a composição do sistema, presença de sais, óleos e co-tensoativos, temperatura e estrutura do tensoativo. Para formação de estruturas lamelares, os tensoativos normalmente têm a forma cilíndrica, e na formação da fase hexagonal e micelar, ele ocupa a área de um cone. Para entender qual tipo de estrutura do tensoativo é preferencial para formar determinado sistema, pode ser considerado o parâmetro de empacotamento crítico (PEC), definido como $PEC = v/a.l$, em que v é o volume da cadeia hidrofóbica, a é a área da cabeça polar e l é o comprimento da cadeia hidrofóbica. Como pode ser visto na Figura 6, há uma correlação direta entre os valores de PEC e o tipo de agregado formado (MALMSTEN, 2002).

Esses sistemas nanoestruturados oferecem uma série de vantagens, como alto potencial de solubilização de fármacos pouco solúveis, estabilidade termodinâmica, transporte facilitado através de membrana, capacidade de agir como sistemas reservatórios e modificar a liberação, permitem a incorporação de grandes quantidades de fármacos e possibilitam a administração de componentes ativos por

várias vias, como a oftálmica, oral, intravaginal, pulmonar, cutânea, transdérmica, periodontal e intranasal (URBAN, 2004; MAINARDES et al., 2006, BRUSCHI et al., 2006; BRINON et al., 1999; LEE; KELLAWAY, 2000; URBAN, 2004; FORMARIZ et al., 2005). As interações fármaco-sistema desempenham importante papel no controle da liberação. O perfil de liberação de fármacos incorporados em sistemas líquido cristalinos dependerá da estrutura da mesofase assim como das características físico-químicas do fármaco. Essas propriedades tornam possível a utilização de cristais líquidos como veículos transportadores de fármacos, os quais devem ser capazes de controlar a liberação das substâncias neles incorporados (GABBOUN et al., 2001). Como consequência da interação fármaco-solvente, fármacos incorporados nos sistemas podem induzir mudanças no empacotamento molecular do tensoativo na mesofase líquido cristalina (FARKAS et al., 2001).

2.3.1 DIAGRAMA DE FASES

O comportamento de fase de um sistema microemulsionado ou de cristal líquido, constituído de óleo, água e tensoativo, pode ser representado por um diagrama de fase ternário, que descreve as condições em que os componentes devem ser combinados para formar um sistema específico.

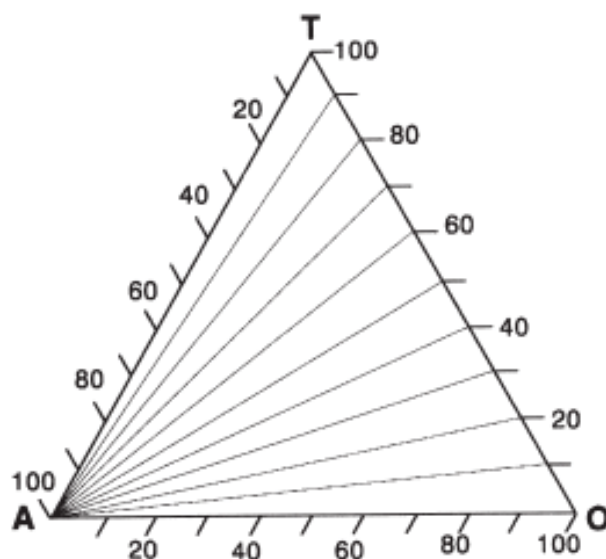
As microemulsões podem conter componentes adicionais como co-tensoativos. No caso em que quatro ou mais componentes estão sendo estudados, diagramas de fase pseudoternários são utilizados e um dos vértices do diagrama representa uma mistura binária de dois componentes como tensoativo/co-tensoativo, água/fármaco ou óleo/fármaco. A construção de diagrama de fases proporciona a visualização das diferentes fases formadas com o sistema (Figura 7) (SAULNIER et al., 2008; PAUL; MOULIK, 2001; LAWRENCE; REES, 2000).

O procedimento mais empregado para a construção do diagrama de fases é a preparação de uma série de misturas binárias e titulação com o terceiro componente, avaliando a mistura após cada adição, podendo necessitar aquecimento ou sonicação (LAWRENCE; REES, 2000).

Representados como triângulos equiláteros, a grande vantagem dos diagramas de fase é que eles mostram tanto a proporção de cada componente utilizado (diagrama de pontos), bem como as regiões de domínio dos diferentes

sistemas encontrados (diagrama de linhas). A Figura 7 representa um modelo de diagrama de fases, com as linhas traçadas direcionadas ao infinito de fase aquosa, isto é, convergentes ao vértice do triângulo que representa 100% de fase aquosa, semelhante ao que ocorre na titulação.

Figura 7. Representação esquemática de um diagrama de fases.



2.3.2 COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS

Um parâmetro muito importante relacionado ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é, sem dúvida, a escolha dos componentes da formulação. Essa escolha deve ser bastante criteriosa e atender alguns requisitos, em especial os relacionados à toxicidade, irritabilidade, capacidade de solubilização do fármaco a ser incorporado no sistema, bem como capacidade de formar o sistema desejado (KREILGAARD, 2002; LAWRENCE; REES, 2000).

Os agentes tensoativos são fundamentais na estabilização dos sistemas coloidais. 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, quando comparados aos tensoativos iônicos, além de serem mais seguros e menos susceptíveis em causar irritação (GARTI et al., 2004; KREILGAARD, 2002).

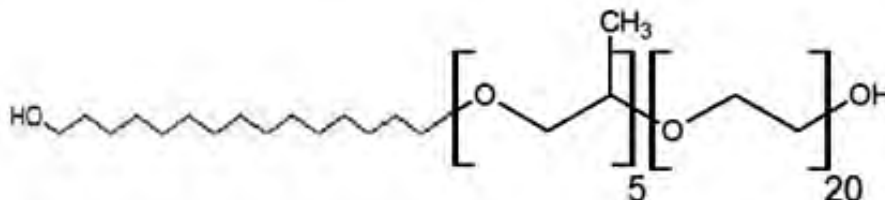
Quando os tensoativos são incorporados em misturas imiscíveis de óleo e água, a molécula de tensoativo forma um filme na interface óleo-água estabilizando a mistura tornando o sistema mais estável termodinamicamente. Quando dispersos em água, os tensoativos se auto-organizam em uma variedade de fases e a natureza desta organização depende de forças intermoleculares bem como da entropia do sistema (LAWRENCE; REES, 2000).

Os tensoativos são substâncias caracterizadas pela presença de uma região polar e outra apolar em suas estruturas moleculares, as quais são definidas, principalmente, pelo equilíbrio apresentado entre a parte polar e a apolar do tensoativo empregado, denominado equilíbrio-hidrófilo-lipófilo (EHL). Valores de EHL inferiores a dez indicam predominância da parte apolar nessas substâncias, tornando-as adequadas para o preparo de emulsões A/O. Ao contrário, valores superiores a oito ou dez apontam a prevalência da região polar e o emprego dessas substâncias na obtenção de emulsões O/A. No entanto, nem sempre o valor de EHL do tensoativo consegue explicar o fenômeno de formação de microemulsão. Por exemplo, para o tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PROC), que apresenta EHL de 15, a região de microemulsão ocorre quando há o domínio de certa quantidade de fase oleosa sobre aquosa. Assim, o mais importante para a estabilização deste sistema é a diminuição da tensão interfacial da dispersão, como forma de reduzir a energia livre derivada da expansão da área interfacial. A estabilidade de sistemas dispersos deverá ser maior, quanto menor for a energia livre remanescente da expansão da área interfacial, tendendo a um sistema termodinamicamente estável, caso o aumento da energia livre seja totalmente compensado pela diminuição da tensão interfacial. A estabilização destes sistemas requer que o tensoativo tenha baixa solubilidade nas fases aquosa e oleosa, resultando na adsorção deste na interface óleo-água para provocar abaixamento da tensão interfacial (OLIVEIRA et al., 2004; DÉBORA, 2002).

Dentre os tensoativos, os derivados da classe dos polioxietilenos e polioxipropilenos têm sido muito utilizados. O álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Figura 8), cujo INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) é PPG-5 CETETH-20 (PROC) e são comercializados com os nomes comerciais de Procetyl AWS[®] ou Acquasolv[®], é um tensoativo não iônico, que se apresenta como um líquido transparente ou ligeiramente turvo, incolor, odor leve e

característico, EHL=15, pH (sol. aquosa 3%, 25°C) = 5,5-7,5, densidade relativa = 1,050 e completamente solúvel em água e etanol. Não é irritante para pele e DL_{50} (oral, ratos) de 3050 mg.kg^{-1} (CRODA DO BRASIL, 2002).

Figura 8. Estrutura molecular do PPG-5-CETETH-20.



As características físicas, químicas e físico-químicas, tais como a solubilidade e coeficiente de partição óleo-água do tensoativo e das fases oleosa e aquosa, assim como as proporções dos componentes, são fatores essenciais na formulação destes sistemas nanoestruturados. Recentemente, foram desenvolvidos sistemas coloidais estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado, água e diferentes fases oleosas. Alterando as fases oleosas, foi possível obter sistemas com diferentes formas de agregação, com diferentes concentrações dos componentes (CARVALHO et al., 2011; CARVALHO et al., 2009; LANDGRAF, 2006).

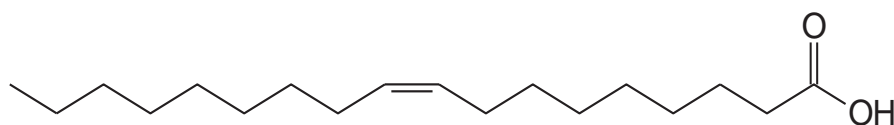
Urban (2004) verificou que sistemas compostos por PROC, água e miristato de isopropila apresentaram sistemas com diferentes estruturas em função da variação da proporção entre os componentes. Foi observado também que a capacidade de solubilização da dexametasona nestes sistemas foi maior que em seus componentes isolados, sendo possível a incorporação de uma concentração 10 vezes maior que a dose farmacológica utilizada. Neste trabalho, observou-se que a formulação de cristal líquido promoveu maior permeação e retenção de dexametasona através da pele de orelha de porco que o creme empregando os mesmos componentes. Esse comportamento de fase, que forma sistemas mais estruturados dependendo da proporção de água e tensoativos, tem se mostrado bastante promissor nos sistemas de liberação de fármacos (CARVALHO, 2010a; CARVALHO, 2010b; URBAN, 2004).

As fases oleosas devem ser compatíveis com o fármaco, principalmente se o fármaco de interesse é lipofílico. 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, as moléculas da fase oleosa tem que estar associadas e penetrar no filme interfacial do tensoativo. Para facilitar a interação da fase oleosa com o filme interfacial do tensoativo, o tamanho da molécula de óleo não deve ser muito grande ou pelo menos conter ligações insaturadas (KREILGAARD, 2002).

O ácido oléico, um ácido graxo monoinsaturado, também denominado ácido cis-9-octadecenóico (Figura 9), é muito utilizado como aditivo em bases de sabões e sabonetes e em cremes e emulsões cosméticas pelas suas propriedades emolientes e para recompor a oleosidade em peles ressecadas e com problemas de escamação. Ele vem sendo empregado no preparo de formulações farmacêuticas de liberação controlada, em especial para incorporação de fármacos lipofílicos (KLEIN, 2007).

Figura 9. Estrutura molecular do ácido oléico.



Klein (2007) verificou que formulações O/A contendo fluconazol aumentaram cerca de 4 a 5 vezes a absorção do fármaco pela membrana intestinal em comparação com solução aquosa de fluconazol. Este fármaco apresentou alta solubilidade no ácido oléico e baixa solubilidade em água, sugerindo-se que o fármaco particiona preferencialmente na fase oleosa do sistema.

Como foi dito anteriormente, empregando diferentes fases oleosas foi possível obter sistemas com diferentes formas de agregação, diferentes concentrações dos componentes (CARVALHO et al., 2011; URBAN, 2004). Assim, a busca de novas fases oleosas que permitam a obtenção de sistemas coloidais com este tensoativo é bastante interessante.

Por outro lado, a natureza é rica em componentes oleosos que possuem efeitos farmacológicos interessantes, mas que apresentam dificuldades – como possibilidade de adulteração e composição a base de misturas complexas (presença

de vários constituintes), dificultando a caracterização – que podem influenciar no desenvolvimento de formulações farmacêuticas.

Diversos sistemas coloidais têm permitido a incorporação de material de composição complexa como as matérias-primas de origem vegetal. Micropartículas de gelatina contendo própolis obtidas por *spray-drying* tornou possível a transformação de uma forma farmacêutica líquida, com extrato etanólico de própolis, em sólida, sem a presença de etanol, com velocidade de liberação lenta dos componentes ativos (BRUSCHI et al., 2003).

Um produto natural bastante utilizado na indústria de cosméticos, na preparação de xampus, sabonetes, cremes, loções capilares e espumas de banhos devido às suas propriedades emolientes, bactericida e antiinflamatória, é o óleo de copaíba (DEL NUNZIO, 1985; VEIGA JR. et al., 2007). Constitui-se de um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom, cujas características físicas variam de líquido transparente a opaco, de baixa a alta viscosidade (VEIGA JR.; PINTO, 2002; RIGAMONTE-AZEVEDO, 2004).

O óleo de copaíba pertence ao gênero *Copaifera*, Caesalpinoideae, é constituído de espécies de elevado valor econômico e ecológico, não somente na Amazônia, como em todo o continente Sul-americano. As espécies do gênero *Copaifera* são popularmente conhecidas como copaíba, copaíva ou pau d'óleo. Compreendem cerca de 72 espécies, sendo que dezesseis destas são encontradas apenas no Brasil. São árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. Na América Latina são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina (VEIGA JR.; PINTO, 2002; GOMES et al., 2007).

Os óleos de copaíba são constituídos por misturas de sesquiterpenos, predominantes na maioria deles, e de diterpenos, pertencentes principalmente aos esqueletos caurano, labdano e clerodano. Em estudos realizados com diversos óleos de copaíba de várias regiões do Brasil, o ácido copálico foi o único encontrado em todos os óleos analisados. Por esta razão, este diterpeno ácido pode ser usado como biomarcador de óleos de copaíba (VEIGA JR.; PINTO, 2000; VEIGA JR.; PATITUCCI; PINTO, 1997). A composição pode variar bastante entre as espécies (MONTI; TILIACOS; FAUREJ, 1996; PINTO et al., 2000; VEIGA JR. et al., 2001;

PATITUCCI et al., 1995; VEIGA JR; PINTO, 2002; GOMES et al., 2007; VEIGA JR. et al., 2007).

Na medicina popular, o óleo de copaíba é utilizado como, antiinflamatório, anti-séptico, cicatrizante e como agente para tratar bronquites, doenças do trato urinário, pulmonar e da pele, como úlceras e feridas (PAIVA et al., 2004; GOMES et al., 2007). Dentre as propriedades farmacológicas já descritas para o óleo de copaíba, destacam-se: antiinflamatória (VEIGA JR. et al., 2007), anti-ulcerogênica (PAIVA et al., 2004), cercaricida e anti-helmíntica (GILBERT et al., 1972), repelente de insetos (LACEY; SCHERECK; MCGOVERN, 1981), antimicrobiana (LIMA et al., 2006) e antinociceptiva (GOMES et al., 2007).

O óleo de copaíba vem sendo estudado como componente para preparações de sistemas de liberação controlada, podendo representar uma alternativa como fase oleosa no desenvolvimento destes sistemas, além de, possivelmente, poder promover efeito sinérgico com fármacos incorporados à estes sistemas, devido à suas propriedades farmacológicas e dependendo da proporção em que estiver presente na formulação. Ramos (2006) avaliou a utilização do óleo-resina de copaíba como insumo farmacêutico para microencapsular sua fração volátil, obtendo microcápsulas com potencial uso na obtenção de um medicamento com atividade anti-inflamatória.

2.3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DE SISTEMAS COLOIDAIS

O conhecimento da estrutura de um sistema coloidal é muito importante, porém bastante complexo. Assim, várias técnicas são necessárias para atingir este objetivo. Métodos como espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) (FANUN et al., 2001; SIDDIG et al., 2006), espalhamento de nêutron a baixo ângulo (SANS) (CAMPO et al., 2004; REYNOLDS, et al., 2004), microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de luz polarizada e ressonância magnética nuclear (FANUN et al., 2001; HELLWEG, 2002) são necessários para o estudo estrutural dos sistemas. Outras técnicas como comportamento reológico, índice de refração, condutividade, viscosidade, entre outras, são freqüentemente utilizadas para complementar o estudo estrutural e físico-químico desses sistemas (LAWRENCE ; REES, 2000; CERA, 2001).

2.3.3.1 Microscopia de Luz Polarizada

Quando a luz se propaga em um meio opticamente isotrópico, as propriedades ópticas são as mesmas em todas as direções, isto é, existe um único índice de refração. Entretanto, quando uma fonte de onda de luz incide em um meio anisotrópico, independente do estado inicial de polarização, a direção de oscilação do seu campo elétrico pode ser decomposta em duas componentes conhecidas como raio extraordinário (paralelo à direção do eixo óptico do meio) e raio ordinário (perpendicular à direção do eixo óptico do meio), os quais viajam com velocidades de propagação diferentes (ABRAMOWITZ; PARRY-HILL; DAVIDSON, 2006).

A microscopia de luz polarizada é uma técnica que permite verificar as estruturas de um sistema e fundamenta-se em um campo elétrico de raio luminoso polarizado que uma substância birrefringente é capaz de provocar. Ela possibilita a classificação quanto à isotropia e anisotropia dos sistemas, permitindo diferenciar microscopicamente os tipos de estruturas formadas. Os sistemas isotrópicos são aqueles que não desviam luz sob o plano de luz polarizada e os anisotrópicos desviam luz sob o plano de luz polarizada (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 2003).

O microscópio de luz polarizada é um microscópio óptico comum, em que o polarizador, localizado junto ao condensador, orienta as ondas luminosas provenientes da fonte de luz em uma só direção, em um só plano. As alterações que uma substância birrefringente ou anisotrópica provoca na direção da propagação da luz, em um equipamento desse tipo, são feitas graças ao analisador, um segundo sistema de polarização, junto à ocular. O máximo de luz é obtido quando o polarizador e analisador estão com eixos em paralelo e, ao contrário, a luz extingue quando são perpendiculares (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 2003; ABRAMOWITZ; PARRY-HILL; DAVIDSON, 2006).

A microscopia de luz polarizada é apropriada para a detecção de cristais líquidos, 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. 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 (SIDDIG et al., 2006).

2.3.3.2 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) na caracterização de sistemas é importante pela possibilidade de se determinar o tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas, além de avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada. Um exemplo é a localização de diferentes fases oleosas nos microdomínios de várias estruturas que pode ser determinada com o auxílio desta técnica (HOLMQVIST; ALEXANDRIDIS; LINDMAN 1997).

Ao irradiar uma amostra bifásica numa plaqueta relativamente fina, com um feixe de luz monocromático (luz visível, raios-x, nêutrons, elétrons), observa-se o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. O espalhamento de raios X deve-se às heterogeneidades na densidade eletrônica das estruturas do sistema. Considerando uma partícula de tamanho e forma qualquer, a intensidade espalhada $I(q)$ é proporcional ao fator de forma $P(q)$ desta partícula, em que q é o vetor de espalhamento (NIELSEN et al., 1993).

Em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si, e o espalhamento medido refletirá sua geometria e arranjo. Em sistemas cuja concentração de tensoativo é superior à concentração micelar crítica, as interações entre as moléculas de tensoativo começam a ocorrer em diferentes graus de organização. O padrão de espalhamento poderá então ser similar ao observado em partículas dispersas numa matriz homogênea. Para N partículas idênticas, distribuídas ao acaso, a intensidade espalhada é descrita pela Equação 1, em que $S(q)$ é o fator de estrutura do conjunto:

$$I(q) = N \cdot P_{(q)} \cdot S_{(q)} \quad (\text{Eq. 1})$$

Entretanto $S_{(q)}$ pode assumir formas muito variadas, de acordo com o arranjo das entidades espalhadoras e será difícil separar as contribuições de $P_{(q)}$ e $S_{(q)}$. De

modo geral, quando a curva de espalhamento apresenta um máximo de espalhamento a baixos ângulos, pode-se relacioná-la com a presença de correlações entre as posições dos centros espalhadores. Pode-se deduzir uma distância média d , entre duas gotículas ou planos vizinhos, a partir do valor da posição do vetor de espalhamento quando a intensidade é máxima (q_{max}), empregando a relação (equação 2):

$$d = \frac{\pi}{q} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sistemas cristalinos randomicamente orientados podem também se agregar formando domínios exibindo estruturas uni, bi e tridimensionais. A intensidade $I(q)$ produzida exhibe forma máxima (ou picos de Bragg) para valores específicos do vetor de espalhamento q . Se a curva de espalhamento contiver vários picos, suas posições no eixo q revelam o tipo de estrutura cristalina e permite calcular parâmetros estruturais (KLUG, 1954).

As estruturas hexagonal, lamelar e cúbica podem ser classificadas de acordo com a posição dos picos de difração no eixo do vetor de espalhamento q . Para estruturas lamelares, a posição relativa dos picos (em relação ao primeiro pico mais intenso) deve obedecer à relação 1: 2: 3..., enquanto que, para estruturas hexagonais a relação esperada é 1: $\sqrt{3}$: 2: $\sqrt{3}$... (HOLMQVIST; ALEXANDRIDIS; LINDMAN, 1997). Quanto à fase cúbica, podem ser formados diferentes tipos de estruturas, como, por exemplo, as fases cúbicas de corpo centrado, as quais possuem três planos de reflexão, representados pelo grupamento $Im3m$ (WANG; ZHOU; GANZUO, 2008) cujas razões das distâncias d em relação ao primeiro e mais intenso pico de espalhamento seguem as razões $\sqrt{2}$: 2: $\sqrt{2}$ (IMURA et al., 2007). Há as fases cúbicas bicontínuas, as quais podem ser identificadas pela geometria $la3d$, cujos picos satisfazem a relação $\sqrt{2}$: $\sqrt{2}$: $\sqrt{2}$..., entre outras fases como $Pm3n$ ($\sqrt{2}$: 2: $\sqrt{2}$...) e $Pn3m$ ($\sqrt{2}$: $\sqrt{2}$: 2...) (IMURA et al., 2007).

2.3.3.3 Comportamento Reológico

O estudo reológico descreve o comportamento deformacional e de fluxo de matéria submetido a tensões, sob determinadas condições termodinâmicas ao longo de um intervalo de tempo. Inclui propriedades como: elasticidade, viscosidade e plasticidade (SCHRAMM, 2006).

A viscosidade é a medida da resistência interna ou fricção interna de uma substância ao fluxo quando submetida a uma tensão (deformação ou escoamento). Quanto maior a viscosidade, maior a resistência, e esta é dada pela razão entre a tensão de cisalhamento aplicada e o gradiente de cisalhamento, sendo diretamente proporcional à temperatura (WOOD, 2001).

Um fluido é um material que se deforma continuamente quando sujeito à ação de uma força. Os fluidos reais (líquidos, gases, sólidos fluidizados) apresentam uma resistência à deformação ou ao escoamento quando submetidos a uma determinada tensão. Os líquidos viscosos que não possuem formas definidas escoam irreversivelmente quando submetidos a forças externas. Por outro lado, os sólidos elásticos apresentam forma geométrica bem definida e se deformados pela ação de forças externas, assumem outra forma geométrica de equilíbrio. Muitos materiais apresentam um comportamento mecânico intermediário entre estes dois extremos, evidenciando tanto características viscosas como elásticas e, por este motivo, são conhecidos como viscoelásticos (SCHRAMM, 2006).

Quando há uma relação linear direta entre a tensão e taxa de cisalhamento, os fluidos são chamados de Newtonianos, isto é, não são afetados pelas alterações da taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2006). Quando não há proporcionalidade entre tais parâmetros, os fluidos são classificados como não-Newtonianos, podendo ser plásticos, pseudoplásticos ou dilatantes, que são fluidos com comportamento reológico independentes do tempo da aplicação da tensão de cisalhamento (SCHRAMM, 2006).

Os fluidos não newtonianos com comportamento reológico dependente do tempo são assim classificados porque apresentam propriedades que variam, além da tensão de cisalhamento, com o tempo de aplicação desta tensão, para uma velocidade de cisalhamento constante. Podem ser tixotrópicos, que tem sua viscosidade diminuída com o tempo de aplicação da tensão de cisalhamento,

voltando a ficarem mais viscosos quando a tensão de cisalhamento cessa; ou reopéticos, que tem a viscosidade destes fluidos aumentada com o tempo de aplicação da tensão, retornando à viscosidade inicial quando esta força cessa (SCHRAMM, 2006; WOOD, 2001).

Tixotropia é uma propriedade que caracteriza um material mais consistente quando em repouso, mas de elevada fluidez quando agitado pelo usuário. Logo, esse fenômeno está associado a uma recuperação lenta da consistência do material, perdida pelo cisalhamento através do retorno das ligações quebradas, redefinindo sua estrutura (WOOD, 2001) e sendo desenhado pela curva de histerese (NETZ; ORTEGA, 2002). A obtenção de formulações com comportamento tixotrópico é bastante interessante, pois como elas se deformam durante a aplicação tornam-se mais fluidas e facilitam, assim, o espalhamento, recuperando a viscosidade inicial no momento em que se encerra a força, o que evita que o produto escorra.

Além disso, o produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira (“shelf-life”), pois durante o armazenamento, como apresenta viscosidade constante, dificulta a separação dos constituintes da formulação (LEONARDI, 2004; WOOD, 2001). A determinação da viscosidade e do comportamento reológico de produtos semisólidos permite compreender melhor a natureza físico-química do veículo, controlam a qualidade de matérias-primas e produtos acabados, e ainda, verificar o efeito da consistência do produto na liberação e penetração cutânea de substâncias ativas (LEONARDI, 2004).

As características reológicas de um produto podem estar associadas a aspectos de absorção e biodisponibilidade de um fármaco (NETZ e ORTEGA, 2002). Como na área farmacêutica, as análises reológicas podem ser utilizadas, também, para caracterizar a facilidade com que o material pode ser despejado de um frasco, verificar o bombeamento de um produto do equipamento em um processo industrial, o espalhamento de um creme ou loção sobre a pele, entre outras (ALMEIDA; BAHIA, 2003; WOOD, 2001; SCHOTT, 2000).

2.4 TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA

A pele representa uma barreira eficaz contra a penetração de muitas substâncias. Entretanto, há vários estudos na literatura comprovando que a pele é

permeável a uma grande variedade de compostos. Nos últimos anos, com o avanço das pesquisas, o uso da pele como local de administração para medicamentos e cosméticos, tem sido cada vez mais intensificada e muitos fármacos estão sendo incorporados às preparações para aplicação sobre a pele (MURRAY et al., 2009; SOBUE; SEKIGUCHI; NABESHIMA, 2004; TANG et al., 2001). Portanto, o estudo de toxicidade dérmica é um importante parâmetro para avaliar o potencial de formulações que serão aplicadas na pele.

A toxicidade de uma substância pode ser definida como a sua capacidade de causar dano a um organismo vivo. Na avaliação das características toxicológicas de uma substância, a toxicidade dérmica aguda é importante quando há possibilidade de exposição do composto à pele. Esta avaliação fornece informações sobre os perigos para a saúde que uma determinada substância pode causar a um indivíduo quando exposto, por curta duração de tempo (OECD 402, 1987; WHO, 1978). Existem diversos protocolos que avaliam a toxicidade dérmica aguda, dentre eles os protocolos da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) são aceitos em toda comunidade científica europeia e se adequam às realidades das pesquisas atuais. O protocolo OECD 402 (1987) relata os procedimentos para avaliação de toxicidade dérmica aguda.

Os dados de um estudo de toxicidade dérmica aguda (TDA) podem servir ainda para classificação e rotulagem de produtos, uma vez que é uma etapa inicial para estabelecer regimes de dose de doenças subcrônicas, e pode fornecer informações sobre a absorção cutânea e o modo de ação tóxica de uma substância por esta via (EPA, 1998; OECD 402, 1987; WHO, 1978).

O termo TDA se refere aos efeitos adversos que ocorrem quando uma substância teste é administrada na pele, em uma única dose e por curto espaço de tempo (OECD 402, 1987). Assim, a toxicidade não pode ser definida sem referência à quantidade de uma substância administrada ou absorvida (dose), à forma como esta quantidade é administrada (por exemplo, inalação, ingestão, injeção) e distribuída no tempo (por exemplo, dose única, doses repetidas) e o tipo e a gravidade da lesão, assim como o tempo necessário para produzir essa lesão (EPA, 1998; WHO, 1978)

O teste de TDA deve avaliar também a ocorrência de efeitos sistêmicos provocados pela administração cutânea da substância ou produto. Na prática, isso

era feito pela determinação da dose letal média (DL_{50}) após uma simples exposição dérmica dos animais testados. Como a DL_{50} era usada para avaliar o risco das substâncias ou produtos, as condições do teste deveriam simular as condições humanas de exposição (AULETTA, 2002; EPA 1998; OECD 402, 1987; NATIONAL, 1977).

A partir de 2004, surgiram novos protocolos na OECD que adaptam a determinação da DL_{50} para toxicidade dérmica, e não calculam um valor exato para DL_{50} , mas tem como objetivo identificar a dose da substância em estudo que apenas produz sinais de toxicidade e não necessariamente letais. (OECD 434, 2004). Estas adaptações foram feitas com vistas a adequar um teste para substâncias que não são letais na dose limite de 2000 mg/kg e observar sinais de toxicidade e qual dose limite que garante a segurança toxicológica do produto em estudo (STALLARD, 2004; OECD, 2004; AULETTA, 2002).

Como base nas informações obtidas no teste limite, duas a quatro doses menores são selecionadas para se obter uma região de dose sem-efeito e outra que produz efeitos ligeiramente menos pronunciados que o da dose limite. As doses podem ser administradas concomitantemente, se já existirem informações que permitam seleção adequada das mesmas, entretanto, o mais comum é a realização por etapas, com novas doses selecionadas com base nos resultados de doses anteriores (STALLARD, 2004; OECD, 2004; AULETTA, 2002).

As informações obtidas são utilizadas para atribuir a classificação de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem (GHS), que é uma abordagem sistêmica, lógica e harmonizada para classificação de perigos de produtos químicos e para comunicação desses perigos, através de rótulos e fichas de informações de segurança (OECD, 2004). O GHS resultou de uma atividade conjunta da OECD (saúde humana e ambiental), Organização para o Trabalho Internacional (OIT) e vários governos e partes do mundo inteiro que se reuniram em Conferencia na Organização das Nações Unidas em 1992 (OECD, 2004; GHS, 2003).

Levando-se em conta a grande quantidade de substâncias em uso atualmente, além dos princípios ativos com atividade terapêutica, muitos produtos para uso cutâneo podem conter em suas composições substâncias capazes de interagir com a estrutura da pele, aumentando a permeação dos princípios ativos.

Assim, tornam-se necessário os estudos de toxicidade dérmica para garantia de segurança dos princípios ativos, dos componentes da formulação e do produto final, de forma a evitar danos à saúde humana.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados estabilizados com éter cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol para administração cutânea, empregando como fase oleosa o ácido oléico e óleo de copaíba de três diferentes origens.

3.2 ETAPAS

As etapas deste trabalho incluíram:

- Avaliação de óleo-resina de copaíba de diferentes procedências – caracterização química (RMN e CG-EM) e biológica (atividades anti-inflamatória e hepatotoxicidade);
- Desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OE como tensoativo, água e as fases oleosas ácido oléico ou óleo de copaíba;
- Incorporar o fármaco nos sistemas selecionados e realizar a caracterização físico-química;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação de fluconazol nas formulações;
- Avaliar a segurança dos componentes e formulações selecionadas, através de ensaios de toxicidade dérmica *in vivo*, seguido de avaliação histológica da pele dos animais submetidos a administração das amostras;
- Avaliar a atividade antifúngica contra *Candida albicans* para os componentes e formulações selecionadas;
- Avaliar a liberação *in vitro* do fluconazol nos sistemas de interesse;
- Avaliar a permeação e retenção cutânea *in vitro* do fluconazol nos sistemas de interesse.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

- Ácido oléico (Synth[®]);
- Ágar Sabouraud dextrose (Acumedia/Newgen);
- Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Procetyl, Croda[®]);
- Cartucho SPE Strata C18-E 500mg/3mL, (Phenomenex);
- Cloreto de benzalcônio (Merck[®]);
- Cloreto de Sódio (Vetec);
- Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec[®]);
- Cloridrato xilazina 2% (Xilazin, Syntec[®]);
- Discos brancos de papel filtro esterilizados (Labroclin)
- Fluconazol (Purifarma[®]);
- Fosfato de potássio monobásico (Quemis);
- Hidróxido de sódio (Quimis);
- Isopropanol (Mallinckrodt);
- Kits da BD Biosciences Pharmingen;
- LPS (lipopolissacarídeo obtido de *E. coli*, Sigma-Aldrich) a 10 µg/mL;
- Meio de cultura RPMI-1640 (Sigma);
- Metanol, J.T. Baker, HPLC;
- Óleo de copaíba (Sigma-Aldrich[®]);
- Óleo de copaíba "*in natura*" (obtido de Cooperativas do Acre);
- Óleo de copaíba comercial;
- Placas de 96 orifícios (Corning Inc.);
- Placas de cultura de tecidos de 24 cavidades;
- Placas de Petri 100 x 20 mm de diâmetro;
- Propanol (Synth[®]);
- Solução de MTT (Across Organics);
- Substrato 10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2 mM de H₂O₂;

- Tampão PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado, Sigma-Aldrich, pH 7,2 a 7,4;
- Tioglicolato de sódio (Difco Lab. Ltda) a 3,0%.

4.2 EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro BECKMAN[®] modelo DU-530
- Espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems),
- Espectrômetro de RMN Bruker Avance II, UltraShield 400;
- Estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100)
- Microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena;
- pH-Metro MicroNal[®] B474;
- Refratrômetro de Abbé (Atargo);
- Reômetro HAAKE, modelo RS1, com software é Rheowin 3.5
- HPLC Varian[®] ProStar 310
- Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus (Hanson Research Corporation[®]).
- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas equipado com uma coluna HP – 1MS (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro, 0,1 µm de espessura do filme da fase estacionária).

4.3 ANIMAIS

- Camundongos Swiss fêmeas (Biotério Central da Faculdade de Ciência Farmacêuticas – UNESP/Araraquara).
- Ratos Wistar machos, (Biotério Central da Faculdade de Ciência Farmacêuticas – UNESP/Araraquara).

4.4 CÉLULAS E CEPAS

- Células HepG2 (ATCC nº HB-8065; isoladas a partir de carcinoma hepatocelular humano)
- Cepa padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) de *Candida albicans* nº 64548

4.3 MÉTODOS

4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS DE COPAÍBA DE DIFERENTES FONTES

Foram caracterizadas, quimicamente e por ensaios biológicos, três amostras de óleo de copaíba: óleo de copaíba (**OC**), obtido de cooperativas do Acre; óleo de copaíba Sigma (**OS**) e óleo de copaíba comercial, adquirido em farmácia de Araraquara, no estado de São Paulo. (**OE**). As amostras foram selecionadas de modo a se obter uma amostra originária da região amazônica, outra obtida comercialmente em farmácias e outra obtida de empresa de renome que comercializa este óleo

4.3.1.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

4.3.1.1.1 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

A identificação dos constituintes do óleo-resina, após metilação com diazometano (De Lima et al., 2008), foi realizada por CG-EM, em um espectrômetro de massas equipado com uma coluna HP – 1MS (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro, 0,1 µm de espessura do filme da fase estacionária). A programação utilizada foi a seguinte: injetor a 250 °C, detector

a 270 °C, coluna a 60 °C (1,0 min) até 180 °C (4 min.), com taxa de aquecimento de 4 °C/min e, finalmente, aquecimento até 260 °C (15 min.), com 10 °C/min. O gás de arraste foi o hélio, com vazão de 1,0 mL/min. A aquisição dos espectros de massas foi feita na faixa de 40 a 450 Daltons pelo método de ionização por impacto de elétrons, com energia de ionização de 70 eV e fonte de íons a 200 °C. Para identificação das substâncias, os espectros de massas foram comparados com a biblioteca eletrônica Wiley 229; foram calculados também os índices de Kovats, baseados nos tempos de retenção de padrões de hidrocarbonetos (C₈ - C₂₄) homólogos, injetados nas mesmas condições das amostras, para comparação com dados da literatura (DE LIMA et al., 2008; ADAMS, 2007).

4.3.1.1.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro RMN Bruker (Avance II, UltraShield 400), operando a 400 MHz para ¹H, e 100 MHz para ¹³C, utilizando CDCl₃ como solventes e TMS como referência interna.

Estes experimentos foram realizados durante estágio com o Grupo de Investigación de Calidad de los Medicamentos, no Departamento de Farmácia, da Faculdade de Ciências Químicas, da Universidade Nacional de Córdoba, sob supervisão da Profa. Dra. Marcela Longhi.

4.3.1.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.3.1.2.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS ÓLEOS DE COPAÍBA

Estes testes foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara) conforme parecer nº 35/2008.

4.3.1.2.1.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 18-25 g, procedentes do Biotério Central da Faculdade de Ciência Farmacêuticas – UNESP, situado na cidade de Araraquara-SP. Estes animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato em grupos de 5 com água e ração (Purina) *ad libitum* em condições ambientais estáveis (23 ± 2 °C, 56 ± 2 % de umidade relativa do ar) e ciclos de claro/escuro de 12 horas por 5 dias. A eutanásia dos animais foi realizada em câmara de CO₂. Todos os procedimentos que utilizaram células vivas dos animais foram realizados com 5 animais.

4.3.1.2.1.2 Amostras

Os testes foram realizados com OC, OS ou OE na concentração de 50 µg.mL⁻¹ de OC, OS ou OE, em meio RPMI.

4.3.1.2.1.3 Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3 mL de tioglicolato de sódio a 3%, três dias antes da coleta das células. Após esse período, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar e o peritônio exposto. Posteriormente, foram injetados 5 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril em pH 7,2 e a 4°C, com auxílio de seringa e agulhas estéreis. Uma leve massagem manual utilizando algodão foi realizada e as células do exsudato peritoneal foram coletadas com a mesma seringa e dispensadas em tubo cônico estéril para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5 mL de PBS e centrifugadas a 400 xg por 5 minutos em centrífuga à 4°C. As células sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 contendo 2β-mercaptoetanol a 2×10^{-5} M, penicilina

100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL, L-glutamina 2 Mm e 5% de soro fetal bovino, sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer em uma diluição 1:100 em líquido de Lázarus, e esta foi ajustada à concentração de 5×10^6 células/mL para realização dos testes propostos.

4.3.1.2.1.4 Obtenção do sobrenadante de cultura de macrófagos

As células obtidas do exsudato peritoneal foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades. A cada cavidade foi adicionado 1,0 mL dessa suspensão celular e um dos seguintes compostos: 1 mL de LPS (lipopolissacarídeo obtido de *E. coli*, Sigma-Aldrich) a 10 µg/mL em RPMI, como controle positivo; somente 1 mL de RPMI-1640-C como controle negativo; ou 1 mL de amostra OC, OS e OE, Meio (meio de cultura RPMI-1640-C, como controle de viabilidade celular) ou LPS (lipopolissacarídeo bacteriano, controle positivo). Estas placas foram incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ por 24 horas. Após esta incubação, os sobrenadantes obtidos das placas de culturas foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C, durante 10 minutos a 7800 g. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados em freezer a -80°C.

4.3.1.2.1.5 Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal

Foi empregada para a determinação da viabilidade celular a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que se baseia na verificação da atividade e integridade mitocondrial, interpretada como uma medida de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Esta metodologia baseia-se na redução do sal de MTT por enzimas microsossomais e também pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis. Os produtos dessa redução são cristais de formazana, insolúveis e de cor púrpura, acumulando-se nas células devido a sua incapacidade de atravessar a membrana celular. O álcool isopropílico, por sua vez, é utilizado para a solubilização da formazana, produzindo uma solução homogênea que possibilita a medição da densidade óptica em espectrofotômetro UV/visível.

Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL. 100 μ L dessas suspensões foram adicionadas a placas de 96 cavidades junto a 100 μ L de um dos seguintes compostos: as amostras OC, OS, OE a $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e LPS a $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou somente o meio de cultura RPMI-1640-C (como controle de viabilidade, equivalendo a 100% de células viáveis). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 5% de CO_2 . Após esse período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes tratadas com 100 μ L de uma solução de MTT a $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em RPMI-1640 incompleto. A placa foi então incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após esse período, o conteúdo da placa foi vertido e 100 μ L de álcool isopropílico foram adicionados em cada orifício para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura foi feita em espectrofotômetro UV/visível de microplacas a 540 nm com filtro de referência a 620 nm (MOSMANN, 1983).

4.3.1.2.1.6 Determinação da produção de óxido nítrico

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%, utilizando NaNO_2 como padrão (GREEN et al., 1982).

As células obtidas do exsudato peritoneal foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 96 cavidades. A cada cavidade foram adicionados 100 μ L dessa suspensão celular e ainda um dos seguintes compostos: 100 μ L de LPS a 10 μ g/mL, como controle positivo, 100 μ L das amostras ou RPMI-1640-C como controle negativo. Estas placas foram incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ por 24 horas. Então, alíquotas de 50 μ L dos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram transferidas para uma placa de cultura de células não estéril contendo 96 cavidades de fundo plano e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada com filtro de 540 nm em espectrofotômetro. As concentrações de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, e os valores foram expressos em μ mols de nitrito.

4.3.1.2.1.7 Inibição da produção de óxido nítrico

As células obtidas do exsudato peritoneal foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 96 cavidades. A cada cavidade foram adicionados 100 μ L dessa suspensão celular e ainda um dos seguintes compostos: 200 μ L de LPS a 5 μ g/mL, como controle positivo, 100 μ L das amostras ou RPMI-1640-C como controle negativo. Estas placas foram incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ por 24 horas. Então, alíquotas de 50 μ L dos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram transferidas para uma placa de cultura de células não estéril contendo 96 cavidades de fundo plano e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada com filtro de 540 nm em espectrofotômetro. A porcentagem de inibição da produção de NO foi calculada como (controle positivo-amostra)*100/(controle positivo – controle negativo).

4.3.1.2.1.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa estatístico GraphPad InStat aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tukey). Todos os experimentos foram realizados utilizando cinco animais e cada determinação foi executada em duplicata.

4.3.1.2.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM CÉLULAS HEPG2

O presente ensaio foi realizado durante visita técnica da aluna ao Centro de Investigação e Tecnologia de Ciências Agro-ambientais e Biológicas (CITAB), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal, sob supervisão da Profa. Dra. Amélia M. Lopes Dias da Silva.

4.3.1.2.2.1 Cultura celular

Células HepG2 (ATCC nº HB-8065; isoladas a partir de carcinoma hepatocelular humano) foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura completo contendo meio base *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM sem L-glutamina; Gibco) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco), antibióticos (200 U/ml penicilina e 200 µg/ml estreptomicina; Gibco) e 10% de soro fetal bovino (heat inactivated; Gibco) e incubadas em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂/95% de ar a 37°C, em frascos de cultura ventilados. Em confluência (próximo de 80 – 90%), as células HepG2 foram subcultivadas por tripsinização (0,05% Tripsina-EDTA; Gibco), de forma a evitar uma diminuição do índice mitótico e mesmo a morte celular (PHELAN, 2007; WILLARD; MERRITT & DEAN, 1965).

4.3.1.2.2.2 Tratamento das células

Células em confluência foram tratadas com tripsina (0,05% Tripsina-EDTA; Gibco), por 4 minutos a 37°C, após este tempo meio de cultura completo foi adicionado para parar a ação da tripsina (2:1, meio: solução de tripsina). As células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas em meio de cultura completo para a densidade pretendida.

Células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células/mL (5000 células/poço) e incubadas por 24 h com meio completo para restabelecimento das condições. Após as 24 h de cultura, o meio foi removido e substituído por 100 µL de meio de cultura sem soro suplementado com as diferentes substâncias a serem testadas (OS, OC e OE), nas concentrações de 5, 10 e 50 µg/mL ou por meio de cultura sem soro (controle).

4.3.1.2.2.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando Alamar Blue®

Para avaliar a proliferação e a viabilidade das células HEPG 2, utilizou-se o indicador Alamar Blue® (AB). É um teste simples e rápido, em que 10% da solução disponível comercialmente deste corante são adicionadas ao meio de cultura e as medidas são realizadas tanto por colorimetria ou fluorimetria. O Alamar Blue® oxidado, azul, não fluorescente é reduzido, no meio, a um corante rosa fluorescente por atividade celular. O Alamar Blue é captado pelas células ativas e é reduzido por uma das oxiredutases da cadeia respiratória, daí que seja um indicador direto da atividade mitocondrial da célula. Há uma correlação direta entre a redução do Alamar Blue® no meio de crescimento e a quantidade/proliferação de organismos vivos, desde as bactérias às células de mamíferos (O'BRIEN ET al., 2000).

Após 24 h de incubação da placa com as substâncias, adicionou-se 10 µL/poço de uma solução de Alamar Blue® (Invitrogen) seguida por um período de incubação de 1 h (37°C, 5% de CO₂, 95% de umidade) antes da primeira medida de absorbância aos comprimentos de onda de 570 nm (forma reduzida)

e 620 nm (forma oxidada). A placa foi incubada, no total, por 7 dias. Devido à sobreposição no espectro de absorção da forma oxidada e reduzida do Alamar Blue, a porcentagem de redução do Alamar Blue[®] foi medida por uma equação derivada por Willard et al., e fornecida pelo fabricante (LARSON et al., 1997):

$$\text{reduçãoAB} = \frac{\varepsilon_{oxid\ 620nm} (A_{620nm}) - \varepsilon_{oxid\ 570nm} (A_{570nm})}{\varepsilon_{red\ 620nm} (A_{620nm}) - \varepsilon_{red\ 570nm} (A_{570nm})} \times \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: $\varepsilon_{oxid\ 620nm}$ = Coeficiente de extinção molar do Alamar Blue na forma oxidada a 620 nm; $\varepsilon_{oxid\ 570nm}$ = Coeficiente de extinção molar do Alamar Blue na forma oxidada a 570 nm; $\varepsilon_{red\ 570nm}$ = Coeficiente de extinção molar do Alamar Blue na forma reduzida a 570 nm; $\varepsilon_{red\ 620nm}$ = Coeficiente de extinção molar do Alamar Blue na forma reduzida a 620 nm; A_{570nm} = Absorbância dos poços testados a 570 nm; A_{620nm} = Absorbância dos poços testados a 620 nm; A'_{620nm} = Absorbância dos poços de controle negativo a 620 nm; A'_{570nm} = Absorbância dos poços de controle negativo a 570 nm.

4.3.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS

4.3.2.1 DIAGRAMA DE FASES

Foram construídos quatro diagramas de fases ternários, referentes às fases oleosas utilizadas: OC, OS, OE e ácido oléico (AO). Para construção do diagrama de fase ternário foram preparadas nove amostras de 3g, contendo diferentes proporções do tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PROC) e a fase oleosa, conforme Tabela 1.

Em seguida foram realizadas titulações através do acréscimo de volumes constantes de água, sob contínua agitação manual, até se adicionar cerca de 100% de água em cada formulação.

Durante o processo, o comportamento de fases dos sistemas formados foi determinado visualmente durante a titulação. Os volumes de fase aquosa

adicionados às formulações que promoveram as respectivas alterações nos sistemas foram usados para calcular as proporções dos componentes nas formulações finais e assim delimitar as diferentes regiões existentes no diagrama de fases. Posteriormente, algumas formulações, com diferentes proporções dos componentes foram preparadas novamente, para melhor delimitar as regiões de transição de uma fase para outra.

Tabela 1. Proporção dos componentes empregados na construção do diagrama de fases por titulação aquosa

Formulações Componentes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fase oleosa	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
Tensoativo	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%

4.3.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS COLOIDAIS

Após avaliação dos diagramas de fases, foram escolhidas para caracterização, os sistemas contendo 40% de tensoativo, usando as concentrações de fase oleosa de 20, 30, 40 e 50% (Tabela 9).

As formulações selecionadas foram caracterizadas por medidas de índice de refração (IR), determinação do pH, microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) e comportamento reológico. Analisou-se formulações com e sem fluconazol (10mg.g^{-1}), sendo este incorporado ao tensoativo durante o preparo da formulação. A concentração de fluconazol (10mg.g^{-1}) corresponde a usualmente empregada em publicações científicas internacionais envolvendo experimentos com fluconazol para administração cutânea (SALERNO, CARLUCCI, BREGNI, 2010; AYUB et al., 2007).

4.3.2.2.1 Índice de refração

O índice de refração foi determinado mantendo a temperatura do experimento a $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e calibrando o equipamento com água destilada cujo índice de refração é 1,3330 a 20°C . Conforme metodologias descritas na Farmacopéia Brasileira 5ed. (2010), as leituras foram realizadas em triplicata, colocando-se quantidade suficiente de cada amostra para cobrir a face do prisma.

4.3.2.2.2 Determinação do pH

As medidas de pH foram determinadas a $25,0 \pm 0,50^\circ\text{C}$. O equipamento foi calibrado com uma solução padrão de pH 7,0 e em seguida com outra solução de pH 10,0. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.3.2.2.3 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

A avaliação da fase estrutural dos sistemas selecionados foi realizada por MLP. Nesta análise, as amostras preparadas foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e observadas em microscópio (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena) sob luz polarizada.

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

O arranjo estrutural das formulações analisadas por Microscopia de Luz Polarizada (MLP) foi determinado também por SAXS a 25°C , com a finalidade de confirmar as fases identificadas. Os dados foram coletados em uma estação de medidas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), no Pólo II de Alta Tecnologia de Campinas, na estação D11A-SAXS, equipada com um monocromador de Si cortado assimetricamente (111) produzindo um feixe de raios-X (com comprimento de onda de $1,488 \text{ \AA}$) colimado e focalizado horizontalmente. A distância amostra-detector foi de 899,1 mm e a intensidade

do feixe espalhado $I(q)$ (expressa em unidades arbitrárias) em função do módulo do vetor de espalhamento (q) foi determinada com um detector de raios-X sensível à posição bidimensional. O espalhamento parasita do ar (resquício de ar, apesar do vácuo) e das fendas foi subtraído da intensidade total espalhada e as curvas resultantes foram normalizadas levando em consideração os efeitos do decaimento natural e da intensidade da fonte de radiação síncroton.

4.3.2.2.5 Comportamento Reológico

No estudo do comportamento reológico, utilizou-se um Reômetro Haake, modelo RS1, acoplado a computador com software Rheowin 3.5, em que o equipamento funcionou pelo princípio de rotação de um dispositivo de placa e placa (sensor placa PP35Ti), diâmetro de 35 mm e distância entre as placas (*gap*) de 200 μm .

Inicialmente, para avaliar a viscosidade das amostras, realizou-se testes de fluxo ou escoamento, a 25 °C e as formulações foram submetidas a condições de estresse, tendo como parâmetros uma faixa de taxa de cisalhamento de 0-100 s^{-1} para a curva de subida durante 150 segundos e de 100-0 s^{-1} para a curva de descida também por 150 segundos. Os reogramas foram avaliados quanto à tensão de cisalhamento obtida em relação à taxa de cisalhamento, a partir do qual se calculou, com o software Origin, os valores índice de consistência e de fluxo, que fornecem informações relativas à viscosidade.

Após estes ensaios, estudou-se o comportamento viscoelástico das formulações de interesse. Para isso, realizou-se ensaios reológicos de varredura de tensão e varredura de frequência para determinar o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') das amostras. Para o teste de varredura de tensão, foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 100 Pa e frequência de 1 Hz. O teste de varredura de frequência foi realizado utilizando uma faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz a uma tensão de 1 Pa.

As análises foram feitas em triplicata, e os gráficos foram plotados a partir das médias obtidas.

4.3.3 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO FLUCONAZOL NOS SISTEMAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para quantificação do fluconazol nas formulações selecionadas, desenvolveu-se e validou-se metodologia usando CLAE. O equipamento empregado foi um HPLC Varian, com detector espectrofotométrico ProStar[®] 330 UV-VIS PDA e Rheodine VS 125, auto-amostrador Varian ProSar[®] modelo 410.

As condições experimentais utilizadas estão apresentadas na Tabela 2. A validação da metodologia analítica foi realizada usando os parâmetros: linearidade, precisão intra-corrída e intermediária, exatidão, especificidade/seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, sugeridos pelos guias ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 2. Condições analíticas empregadas nos estudos de liberação, permeação e retenção *in vitro* do fluconazol

Parâmetros	Condições
Coluna	C18-RP (VARIAN-CHROMSEP [®])
Fase móvel	MeOH/H ₂ O (1:1)
Comprimento de onda	210 nm
Meio para preparação da amostra	Fase móvel
Temperatura do forno	25 °C
Fluxo	1ml.min ⁻¹
Volume de injeção	20 µl

4.3.3.1 Linearidade

Foi avaliada pela construção de três curvas analíticas desenvolvidas em diferentes dias, usando nove níveis de concentração em cada uma delas. Para isso, preparou-se solução padrão do fármaco na concentração de 1 mg.ml^{-1} em fase móvel. A partir desta solução, preparou-se nove diluições, em triplicata, correspondendo as concentrações: 20, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e $400 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$. A partir da média dos valores de áreas encontrados e das concentrações testadas para as 3 curvas, construiu-se uma curva total, verificando-se a relação linear e coeficiente de correlação.

4.3.3.2 Precisão

A precisão intra-corrída ou repetibilidade foi avaliada usando três concentrações diferentes da curva, 20, 40 e 200 mg.mL , no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. A precisão inter-corrída ou intermediária foi realizada nas mesmas condições, em três dias consecutivos. Os resultados foram analisados através do coeficiente de variação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.3.4 Exatidão

Foi determinada em triplicata, com três concentrações diferentes da curva, 20, 40 e 200 mg.mL , expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente (percentual de recuperação)

4.3.3.5 Especificidade ou seletividade

Este parâmetro foi avaliado através da avaliação do grau de interferência de outras substâncias na quantificação de fluconazol. As amostras escolhidas foram: solução de diluição do fármaco em tampão fostato PBS pH 7,4, e

soluções contendo alíquotas das formulações AO4, OC4 e OS4 com e sem fármaco.

4.3.3.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Estes parâmetros foram avaliados com base na obtenção de 3 curvas analíticas do fármaco contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. Calculou-se os desvios padrão dos coeficientes angulares das retas e os coeficientes lineares das mesmas e aplicou-se em equações indicadas pelo ICH (2005) para obter os valores de LQ e LD.

4.3.3.7 Robustez

Neste ensaio, avaliou-se a interferência de alguns parâmetros na quantificação/recuperação do fármaco. Os parâmetros foram: marca da coluna (Phenomenex e Varian) cromatográfica, HPLC (Varian e HP) e detector (DAD e UV).

4.3.3.8 Avaliação da incorporação de fluconazol

Devido à viscosidade da maioria das amostras, a quantificação do fluconazol nas mesmas não foi possível de ser realizada por métodos tradicionais, como os que envolvem a solubilização de excesso do fármaco na amostra, posterior centrifugação e quantificação. Realizou-se, portanto, um ensaio prévio de incorporação, que consistiu da adição de quantidade crescentes de fluconazol às formulações em estudo, até a formação de precipitado, mediante observação visual. Para isso, pesou-se 2g de formulação e acrescentou-se fluconazol em porcentagens de 0,01%, sob agitação manual, até que se observasse formação de precipitado. Ao final, registrou-se a quantidade de fluconazol que solubilizou e que precipitou. Esse mesmo ensaio foi realizado com os componentes das formulações: água, PROC, AO, OC e OS.

A partir dos resultados obtidos, incorporou-se fármaco nas formulações e, após 24 h, pesou-se uma quantidade das mesmas que, ao diluir em 10 mL de fase móvel, a concentração final teórica de fármaco na solução seria de 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, concentração dentro da curva analítica conforme metodologia relatada anteriormente. Uma alíquota desta solução foi submetida à *clean-up* em cartucho C18-E 500mg/3mL, previamente condicionado com fase móvel (MeOH/H₂O). Após condicionamento, aplicou-se 2,5 mL da diluição no cartucho, coletou-se 1 mL de volume morto (correspondente a conteúdo ocupado pela sílica) e em seguida coletou-se a alíquota final que foi filtrada em membrana 0,45 μm para quantificação por CLAE conforme metodologia validada.

4.3.4 TOXICIDADE DÉRMICA

Estes testes foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara) conforme parecer nº 33/2008.

4.3.4.1 Toxicidade Dérmica com componentes e formulações

A primeira parte dos testes foi feita com objetivo de avaliar a toxicidade dérmica aguda (TDA) dos componentes da formulação escolhidas em ratos Wistar, conforme *guideline* OECD 402 (1987).

Realizou-se primeiramente teste limite que consistiu em administrar uma dose de pelo menos 2000 mg/Kg de peso do animal. As amostras foram: óleo de copaíba do Acre (OC), óleo de copaíba Sigma (OS), ácido oléico (AO), álcool cetílico etoxilado e propoxilado (PROC), controle negativo propanol (Prop) e controle positivo cloreto de benzalcônio 15% (CB).

Escolheu-se o Prop como controle negativo, por ser o solvente para todos os componentes caso haja necessidade de diluições posteriores. O CB já é conhecido por ser tóxico e irritante em altas concentrações, portanto,

escolheu-se a concentração de 15% por provocar irritação severa e não causar letalidade.

Para todos os componentes das formulações foram usados 5 animais; para o controle positivo CB foram usados 2 ratos, uma vez que o objetivo era observar a ocorrência de irritação e fazer uma comparação com os animais para os quais foram administrados os componentes das formulações. Para isso, ratos machos Wistar adultos (250 - 300 g), após adaptação nas condições experimentais, foram pesados e anestesiados com Ketamina/Xylasina (8:3) para retirada cuidadosa dos pêlos da região dorso-caudal, procurando-se obter uma área de 4x5 cm.

Após um período de observação de 24 horas para verificação da inexistência de qualquer solução de continuidade na pele, aplicou-se uniformemente um volume de amostra conforme o peso do animal. Como as amostras são líquidas, foram administradas sem diluição, correspondendo, portanto, a dose que preconiza o teste limite.

Imediatamente após a aplicação da amostra, a região foi protegida através da fixação de uma tela de nylon, em seus bordos, através de esparadrapos, evitando que o animal pudesse lambear a substância aplicada. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, por 14 dias, para observações de possíveis sinais de toxicidade.

Durante os 14 dias, foram efetuadas observações periódicas no comportamento dos animais, verificando a ocorrência de alterações na pele, como erupções e vermelhidão, olhos, membranas mucosas e também alterações no sistema respiratório e na atividade somato-motora. Observações como presença de tremor, convulsão, salivação, diarreia, letargia e coma foram devidamente registradas.

A segunda parte do teste com os componentes consistiu em avaliar a TDA dos componentes que apresentaram sinais de toxicidade no teste limite, administrando-se uma dose menor. Para isso, administrou-se aos ratos a amostra na dose de 600 mg/Kg, diluída em Prop, controle negativo. Se ainda assim, o componente apresentou sinais de toxicidade, procedeu-se o

experimento usando dose de 500 mg/Kg. O protocolo e a observação dos resultados foram os mesmos para o teste limite.

Após a avaliação da TDA dos componentes dos sistemas, realizou-se teste de toxicidade dérmica por dose repetida (TDDR) com as formulações de interesse, conforme *guidline* OECD 410 (1981).

Para isso, selecionou-se as formulações AO2, OC2 e OS2 contendo fluconazol (1%), PROC (40%), fase oleosa (30%) e água (30%), e administrou-se em ratos Wistar durante 21 dias, utilizando procedimento experimental empregado na avaliação de TDA dos componentes.

A partir das observações realizadas durante os experimentos, estabeleceu-se escores e elaborou-se uma escala de toxicidade dérmica (Tabela 3) para classificações dos sinais clínicos de TDA e TDDR. Realizou-se um estudo cego simples, com as avaliações realizadas por dois pesquisadores diferentes.

Tabela 3. Escala utilizada nos testes de toxicidade dérmica.

Escore	Observação
0	Normal; animal com pele intacta, presença de pequenas manchas características da pele; constituição do epitélio sem alterações
1	Coceira, pele áspera e mais escurecida que as outras regiões, manchas podem estar mais visíveis, com coloração marrom, pêlos da região como em camadas, podendo ocorrer vermelhidão.
2	Pequenas feridas formando escaras leves.
3	Escaras moderadas, feridas com crostas maiores e escurecidas.
4	Escaras graves, com desprendimento de crosta e ferida exposta.

4.3.4.2 Análise estatística

As diferenças entre os dados não paramétricos (escores de toxicidade dérmica) foram analisadas estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney utilizando o programa Bioestat 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (ARANGO, 2001).

4.3.4.3 Avaliação histológica

A avaliação histológica envolveu três ensaios: Teste Limite, realizado com os componentes empregados nos sistemas; Teste Porcentagem, realizado com os componentes que apresentaram toxicidade no teste limite e Teste Dose Repetida, onde foram avaliadas as formulações AO3F, OS3F e OC3F.

O Teste Limite envolveu seis grupos experimentais administrados com as matérias-primas AO, PROC, OC, OS e 15% de CB, como controle positivo e Prop, como controle negativo. O Teste Porcentagem englobou 6 grupos experimentais: PROC 60%, AO60%; OC 50% OC 60%, OS 60% e Prop (controle negativo). O Teste Dose Repetida envolveu 4 grupos: AO3F, OS3F, OC3F e Prop (controle negativo).

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ após anestesia com cloridrato de xilazina/cloridrato de ketamina, as áreas tratadas foram removidas com tamanhos de cerca de 1 cm e fixadas em solução de formaldeído 10% por 48 horas e tratadas convenientemente para inclusão em parafina. Foram obtidos 5 cortes histológicos não seriados de 6 µm de profundidade para cada lâmina, sendo 5 lâminas para cada grupo. As lâminas foram processadas de forma a obter uma coloração em hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise histométrica e histopatológica.

4.3.4.1 Análise histométrica

Para essa análise utilizou-se para análise histopatológica foram captadas imagens aleatórias de cada corte por meio de um microscópio óptico Leica DMZ 2000 conectado a um microcomputador e do software Motic Images Advanced 3.2, Escolheu-se aleatoriamente 30 áreas nas quais foram medidas a espessura da epiderme e da derme para cada área de tratamento. Para a epiderme, obteve-se medidas em áreas planas, sem muitas papilas dérmicas, através da distância entre a membrana basal até a borda externa da camada córnea (POLACOW et al., 2004). A partir dessas medidas, foi realizada a correção do coeficiente micrométrico, considerando que foi utilizada objetiva de

20x, e obtida a média e o desvio padrão de cada grupo experimental. A análise estatística foi realizada utilizando-se teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido de Teste de Duns, usando software GraphPad Prism 5.0. O nível de significância considerado nos testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

4.3.4.2 Análise histopatológica

Esta análise permitiu a determinação do número de fibroblastos e leucócitos, utilizando-se um microscópio óptico Leica DMZ 2000 conectado a um microcomputador e do software Motic Images Advanced 3.2. Para cada grupo experimental, foram obtidos 5 cortes não seriados por lâmina, sendo obtidas 3 lâminas. Quantificou-se 6 áreas por grupo experimental, sempre na região da derme papilar. Portanto, por animal, em cada tratamento, obteve-se uma área total de $30000 \mu\text{m}^2$. Dos resultados referentes aos estudos histopatológicos, obteve-se a média e o desvio padrão de cada tipo celular para cada tratamento e realizou-se a análise estatística através do teste de Kruskal-Wallis, seguido de Teste de Duns, usando software GraphPad Prism 5.0. O nível de significância considerado nos testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

4.3.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS COMPONENTES E FORMULAÇÕES

Os testes foram divididos em duas partes principais:

- Avaliação da atividade antifúngica dos componentes, na presença e ausência de fluconazol, empregados no preparo dos sistemas nanoestruturados;
- Avaliação da atividade antifúngica das formulações selecionadas, contendo óleo de copaíba, com e sem fluconazol. As formulações selecionadas foram OC2, OC4, OS2 e OS4.

4.3.5.1 Preparo das amostras

O fluconazol foi utilizado como controle positivo na concentração de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em clorofórmio para todos os testes, dessa maneira ao pipetar 20 μL dessa solução, obteve-se 15 μg de fluconazol no disco.

As fases oleosas (AO, OC, e OS) e o tensoativo PROC foram utilizados puros e nas concentrações de 200, 400 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em clorofórmio, preparadas a partir de uma solução estoque de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada componente em clorofórmio.

Para o teste dos componentes nas presença de fluconazol, preparou-se uma solução contendo 500 μL de cada um dos componentes analisados na concentração de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 500 μL da solução de fluconazol 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (proporção 1:1) e pipetou-se 20 μL das soluções resultantes nos discos.

Foram testadas formulações com e sem fluconazol. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.3.5.2 Preparo do inóculo fúngico

Foi utilizada a cepa padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) de *Candida albicans* n°64548. Foi feito um repique, 24 horas antes de ser realizada a difusão em disco, da cepa de *Candida albicans* em um tubo, contendo meio ágar Sabouraud inclinado.

Após este período, tomou-se uma alçada do tubo de cultivo e essa foi colocada em tubo contendo pérolas de vidro e cerca de 5 mL de solução fisiológica esterilizada (0,85%), então levou-se à agitação em vórtex com a finalidade de desagregar as unidades formadoras de colônia (UFC). Para padronização do inóculo, utilizou-se o espectrofotômetro, em comprimento de onda de 580nm e transmitância entre $25 \pm 2\%$ (Farmacopéia Brasileira, 1988).

4.3.5.3 Preparo dos discos

Foram utilizados discos de papel filtro esterilizados de 13 mm de diâmetro. Esses discos foram embebidos com as amostras com o auxílio de um pipetador e depois levados para a estufa à 35 ± 2 °C e deixados por 24 horas antes dos testes.

Para as amostras contendo óleo com fármaco, aplicou-se 20 µL nos discos, com exceção para os óleos puros e as formulações que foram aplicados somente 5 µL devido à viscosidade e dificuldade de secagem.

4.3.5.4 Ensaio de difusão

Foram utilizadas placas de Petri estéreis de 40x10 mm de diâmetro e em cada placa foi colocado 20mL de meio de cultivo ágar Sabouraud fundido para se fazer a camada base. Depois de solidificado, acrescentou-se 5mL de meio ágar Sabouraud inoculado com 2% da suspensão fúngica e esperou-se solidificar. Foram colocados os discos previamente impregnados com as amostras com o auxílio de uma pinça estéril. As placas então foram colocadas na geladeira a 5 °C por 4 horas para facilitar a difusão das amostras em análise e, em seguida, estas foram incubadas a 25°C durante 24 horas. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos. O halo de inibição do crescimento foi medido utilizando paquímetro digital.

4.3.5.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa Excel, através do teste de análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tukey). Todos os experimentos foram em triplicata.

4.3.6 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *in vitro*

Após a avaliação da incorporação do fármaco nas formulações, realizou-se os testes de liberação *in vitro*. Este ensaio foi realizado com as formulações que continham as fases oleosas AO e OS, sendo incorporado em cada formulação a concentração de 10 mg/g de fluconazol, concentração que solubiliza em todas as amostras e usada nos ensaios de caracterização físico-química.

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

As condições experimentais utilizadas foram semelhantes as utilizadas na avaliação da incorporação do fluconazol e estão resumidas na tabela 3, diferindo apenas no meio de preparo das amostras da curva analítica que foi o tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 M pH 7,4

Construiu-se uma curva analítica a partir de uma solução estoque contendo 1 mg.mL⁻¹ de fluconazol em tampão fosfato monobásico 0,01M pH 7,4.

Diferentes alíquotas foram retiradas desta solução estoque, a partir das quais se preparou novas diluições em balões de 10 mL, a fim de se obter concentrações finais de 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 150, 200 e 250 µg.mL⁻¹. Em seguida, as soluções foram filtradas e analisadas por CLAE, usando todos os parâmetros cromatográficos do experimento relatado no item 4.3.4. O experimento foi realizado em triplicata e a curva analítica foi construída com a média dos valores das áreas lidas para cada concentração. A partir destes valores, construiu-se uma curva analítica, verificando-se a relação linear e o coeficiente de correlação.

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

Este estudo foi realizado com o objetivo de comprovar a solubilidade do fluconazol em tampão fosfato monobásico 0,01 M pH 7,4 e garantir a condição *sem* nos ensaios de liberação e permeação *in vitro*. Segundo Das e ELMQUIST (2001), a solubilidade do fluconazol na água é de aproximadamente 8mg.mL⁻¹. Assim, soluções saturadas de fluconazol foram preparadas adicionando-se excesso de fármaco em 5 mL de tampão. As soluções foram agitadas em homogeneizador de sangue por 48 horas e em seguida foram centrifugadas a 3500 rpm (2268,5 xg) por 15 minutos. Retirou-se uma alíquota de 100 µL das soluções e transferiu-se para um balão de 10 mL completando com tampão. Filtrou-se em membrana filtrante de 0,45 µm e avaliou-se as amostras contendo o fluconazol solubilizado por CLAE. Este experimento foi realizado em triplicata.

4.3.6.3 Liberação *in vitro*

A liberação do fluconazol das formulações foi avaliada utilizando-se equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation, figura 10), contendo seis células de Franz modificada, de volume aproximado de 7 mL. A solução receptora foi o tampão fosfato monobásico 0,01M pH 7,4 e membrana sintética utilizada foi a de acetato de celulose 0,45 µm (Sigma-Aldrich®). As formulações semi-sólidas foram previamente pesadas em papel alumínio e transferidas para o anel dosador colocado sobre a membrana disposta na célula de difusão de Franz até completar o anel dosador (aproximadamente 400 mg e área de exposição de 1,77cm²).

Os experimentos foram conduzidos a 32,5°C e a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm, por meio de um placa magnética agitadora onde as células ficaram dispostas. As formulações líquidas foram colocadas sobre a célula usando dispositivo para líquidos e procedendo-se como relatado acima.

Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas, filtradas em membrana 0,45 µm e analisadas por CLAE para quantificação do fármaco liberado por tempo. Um volume de 0,8 mL foi desprezado antes do início de cada coleta. As alíquotas da coleta e os volumes desprezados foram repostos automaticamente e os valores utilizados nos cálculos da quantidade real permeada por tempo em função da área de exposição.

A equação 4 (USP, 2010), demonstrada abaixo, foi utilizada para calcular a quantidade real liberada/permeada (Q real) em determinado tempo:

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

Na qual:

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

C_t = concentração obtida referente ao tempo t;

V_r = volume da solução receptora (7 mL)

C_c = concentração da amostragem anterior

V_c = volume amostrado (coletado + limpeza)

Figura 10. Equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation) e Célula de Difusão de Franz com demonstração do compartimento doador e receptor e disposição da membrana.



4.3.6.4 Permeação e retenção cutânea *in vitro*

Os ensaios de permeação e retenção cutânea *in vitro* do fluconazol nas amostras foram realizados usando pele de orelha de porco, não escaldada, obtida no Frigorífico Olhos d'água logo após o abate rotineiro de animais para o consumo. As peles foram preparadas conforme metodologia adaptada de Dick e Scott (1992). Para isso, as orelhas foram lavadas, os pelos em excesso removidos com o auxílio de uma tesoura, descartando-se as orelhas onde se observou danos na pele. Em seguida, dissecou-se as orelhas, separando a pele da cartilagem com o auxílio de uma lâmina e depois separada do tecido adiposo.

As peles foram dermatomizadas, com auxílio de um dermatômetro, na espessura de 500 µm, retirando apenas o estrato córneo, epiderme e a camada mais externa da derme.

Antes do ensaio, as peles foram hidratadas, e recortadas em tamanhos adequados para os ensaios de permeação cutânea. Em seguida, eram colocadas na célula de difusão, com o lado da derme voltado para baixo, ficando em contato com a solução receptora. Na parte de cima, região do estrato córneo, foi adicionada a formulação usando mesmo procedimento descrito no item 4.3.5.3. Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições descritas no ensaio de liberação *in vitro*. Entretanto, a avaliação da permeação cutânea *in vitro* foi realizada durante 6 ou 12 horas. Os experimentos foram realizados em sextuplicata.

No experimento de retenção cutânea a pele ficou exposta por 6 ou 12 horas, nas condições experimentais da permeação cutânea *in vitro*. Ao final do tempo, as peles foram retiradas da célula de difusão. Removeu-se o excesso de formulação na pele com papel absorvente. As peles foram fixadas em superfície lisa e a área exposta à formulação (1,77 cm²) foi submetida à técnica de *tape stripping* (HOSMER et al., 2009; HERAI et al., 2007; LOPEZ et al., 2003) para remoção do estrato córneo (EC) usando 16 fitas adesivas (Scotch 750 3M), para cada pele. As fitas foram colocadas em um tubo de ensaio contendo 5 mL de metanol, agitado em vórtex por 2 minutos e posteriormente

colocado em lavadora ultrassônica por 30 minutos. A solução foi filtrada em membrana 0,45 μm e avaliada por CLAE para quantificação do fármaco retido no EC.

A pele remanescente (epiderme viável + derme, E+D) foi cortada em tamanhos muito pequenos e coloca num tubo de centrífuga contendo 5 mL de metanol, agitado em vórtex por 2 minutos, levado ao homogeneizador Turrax[®] por um minuto e em seguida para lavadora ultrassônica por 30 minutos. Ao final, filtrou-se em membrana de e 0,45 μm e quantificou-se por CLAE.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS DE COPAÍBA DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS

5.1.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.1.1.1 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG/EM)

A caracterização dos óleos de *Copaifera* sp de diferentes procedências é muito importante, por diversos motivos: os óleos comerciais de copaíba têm sido sujeitos a adulterações na própria origem, pela mistura com outros óleos; a necessidade de relacionar as diversas atividades farmacológicas do óleo de copaíba com sua constituição química; um produto para o mercado de medicamentos, em especial quando possui produtos naturais em sua composição, como o óleo de copaíba, deve garantir a reprodutibilidade da eficácia dentro do lote utilizado industrialmente, fazendo-se necessário que seja anexado um laudo sobre a composição química mínima para o efeito desejado.

Portanto, a caracterização qualitativa e quantitativa dos óleos de copaíba torna-se uma ferramenta apropriada para a identificação de óleos de diferentes procedências, podendo ser adequada para o controle de qualidade dos óleos

As análises por CG/EM dos óleos-resina de *Copaifera* sp., metilados com diazometano, mostraram a presença basicamente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados na fração volátil (óleo essencial), que eluem primeiro na análise, e de ácidos diterpênicos na fração fixa (resina), que eluem após os sesquiterpenos, como é possível observar nos cromatogramas Figuras 11 a 13. Observou-se ainda que OC e OS possuem perfil químico diferente, característica observada em óleo de copaíba proveniente de locais diferentes.

Figura 11. Cromatograma de Íons Totais do Óleo-Resina de *Copaifera sp* (OC).

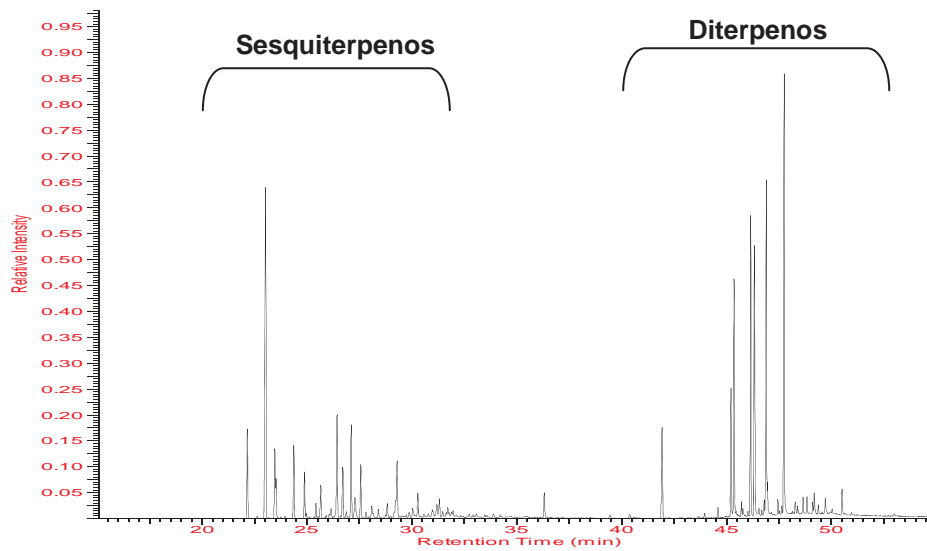


Figura 12. Cromatograma de Íons Totais do Óleo-Resina de *Copaifera sp* (OS).

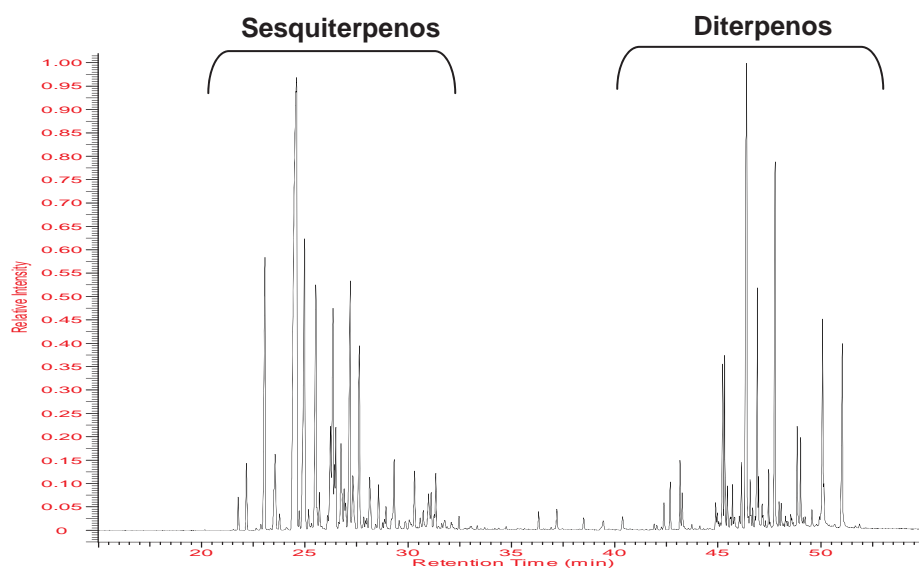
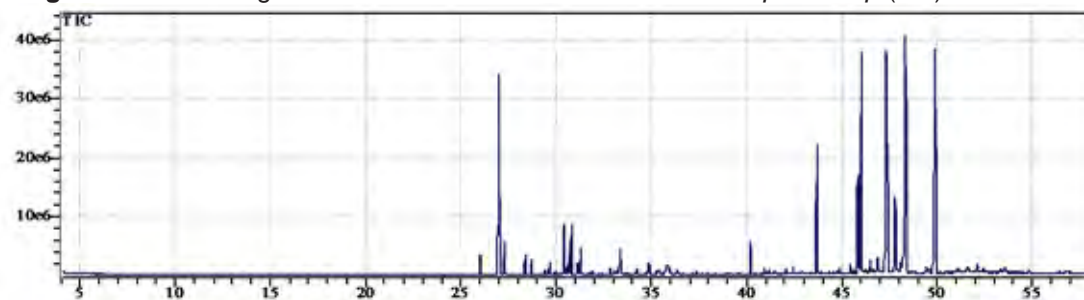


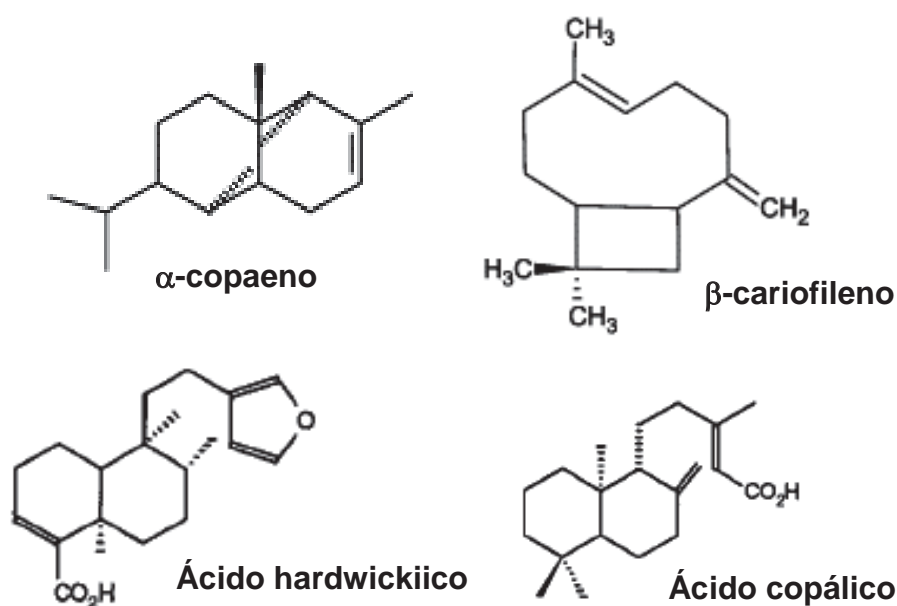
Figura 13. Cromatograma de Íons Totais do óleo-resina de *Copaifera sp* (OE).



Comparando-se os cromatogramas, não foi possível observar, para OE, as duas regiões de retenção características de óleos de copaíba, em especial para a região de sesquiterpenos (fração volátil), sugerindo um perfil químico diferente para este óleo. No entanto, uma análise mais precisa para confirmar esta composição deve ser feita, como a análise por RMN e o fracionamento para posterior caracterização.

Analisando as Figuras 11 e 12 e as Tabelas 4 e 5, verificou-se que OC apresenta como constituintes majoritários o α -copaeno e ácido hardwickiico (éster metílico), enquanto OS possui o β -cariofileno como constituinte majoritário. A Figura 14 mostra as estruturas dos principais constituintes dos óleos analisados.

Figura14. Principais constituintes encontrados nos óleos de copaíba analisados.



As Tabelas 4 e 5 mostram a composição percentual dos constituintes detectados nas análises dos óleos OC e CS, respectivamente, além do tempo de retenção e índice de *Kovats*. Há muita semelhança na composição de sesquiterpenos, ocorrendo maiores diferenças no teor de α -copaeno e β -cariofileno. Entre os diterpenos, observou-se que o teor também é semelhante, em especial para o ácido copálico (éster metílico), que foi o único composto detectado nos dois óleos com percentual relevante (aproximadamente 8,8%), podendo ser utilizado como biomarcador para o gênero *Copaifera*.

Tabela 4. Principais constituintes voláteis detectados no óleo-resina *Copaifera sp* (OC).

Composto	Tempo Retenção	IK _{Calculado}	Área Percentual
α - cubebeno	22,117	1352.0	2.92%
α - copaeno	22,986	1378.5	12.55%
β - elemeno	23,425	1391.5	2.30%
Cipereno	23,483	1393.3	1.10%
β - caryofileno	24,330	1421.0	2.38%
α -Bergamoteno	24,840	1437.9	1.31%
α - humuleno	25,381	1455.6	0.49%
Allo-Aromadendreno	25,611	1462.9	1.11%
α -eudesmeno	26,107	1478.6	0.38%
α -Eudesmeno	26,392	1487.5	3.80%
α - selineno	26,662	1495.8	1.83%
α -Bisaboleno	27,067	1509.7	3.03%
γ - cadineno	27,241	1516.0	1.18%
δ - cadineno	27,521	1526.0	1.79%
Germacreno B	28,786	1569.8	0.48%
ni	29,184	1583.2	0.69%
Óxido de cariofileno	29,250	1585.4	2.16%
ni	29,998	1611.9	0.42%
Junenol	30,243	1621.3	0.86%
α - candinol	30,929	1647.2	0.46%
ni	31,143	1655.2	0.52%
ni	31,269	1659.8	0.72%
ni	31,421	1665.4	0.25%
ni	31,669	1674.5	0.35%
Ni	31,924	1683.8	0.20%
Esclaral	36,268	1850.9	0.83%
(-)-Kaur-6-ene	41,884	2043.4	3.35%
ni	44,547	2184.6	0.26%
Ác. ladvp-8(20)-en ⁻¹ 5-oico, éster metílico	45,171	2229.2	3.51%
Clerod-3en ⁻¹ 5-ato de metila	45,316	2240.7	6.33%
ni	45,665	2268.4	0.36%
ni	45,737	2274.0	0.29%
ni	45,975	2292.7	0.14%
Ác. kaur ⁻¹ 6-en ⁻¹ 8-oic, éster metílico	46,109	2303.9	7.72%
Copalato de metila	46,280	2319.9	8.75%
ni	46,748	2363.5	0.35%
Colavenato de metila	46,853	2373.2	8.83%
ni	46,909	2378.4	0.72%
ni	47,406	2428.0	0.33%
Hardwickiato de metila	47,700	2459.1	11.64%
ni	48,233	2514.6	0.42%
ni	48,603	2552.0	0.40%
enantiagato de metila	48,790	2570.8	0.40%
ni	49,138	-	0.71%
ni	49,664	-	0.63%
ni	50,460	-	0.75%

ni = não identificado

Tabela 5. Principais constituintes voláteis detectados no óleo-resina *Copaifera sp* (OS).

Composto	Tempo Retenção	IK _{Calculado}	Área Percentual
δ - elemeno	21,732	1,340	0.40%
α - Cubebeno	22,130	1,352	0.89%
α - copaeno	23,025	1,380	4.85%
β - elemeno	23,520	1,394	1.79%
Cypereno	23,731	1,401	0.24%
β - cariofileno	24,555	1,429	20.30%
β - copaeno	24,686	1,433	0.22%
α -trans- bergamoteno	24,945	1,441	6.44%
β - farneseno	25,133	1,448	0.25%
α - humuleno	25,490	1,459	4.34%
Allo-Aromadendreno	25,664	1,465	0.42%
trans-9-epi-cariofileno	26,058	1,477	0.21%
α - amorpheno	26,202	1,482	1.88%
Germacreno D	26,323	1,485	3.97%
ni	26,388	1,487	0.71%
β -selineno	26,457	1,490	1.26%
α - selineno	26,709	1,497	1.66%
α -Muuroleno	26,862	1,502	0.54%
β -bisaboleno	26,928	1,505	0.39%
cis- α -bisaboleno	27,152	1,513	4.42%
γ - cadineno	27,281	1,517	1.24%
δ - cadineno	27,600	1,529	3.30%
trans-cadina ⁻¹ ,4-dieno	27,809	1,536	0.20%
ni	28,094	1546	1.04%
Germacreno B	28,527	1,561	0.59%
Palustrol	28,888	1,573	0.29%
Óxido de cariofileno	29,283	1,587	1.16%
Junenol	30,268	1,622	0.77%
α - candinol	30,950	1648	0.70%
Ni	31,074	1653	0.46%
Ni	31,299	1661	0.71%
Ni	32,422	1702	0.16%
Esclaral (lactol esclareolido)	36,281	1851	0.23%
ni	37,162	1885	0.33%
Ácido palmítico, éster metílico	38,462	1927	0.19%
ni	40,345	1983	0.22%
Epimanol	42,351	2064	0.37%
Esclareol	42,652	2078	0.58%
Ácido linoléico, éster metílico	43,130	2099	0.73%
Ácido oléico, éster metílico	43,234	2105	0.46%
Ni	44,848	2203	0.33%
ni	44,934	2210	0.19%
Ác. Ladp-8(20)-en ⁻¹ 5-oico, éster metílico	45,193	2231	1.99%
Clerod-3en ⁻¹ 5-ato de metila	45,286	2238	1.93%
ni	45,426	2249	0.45%
Ác. Labd-7-en ⁻¹ 5-oic, éster metílico	45,670	2269	0.34%
Ni	45,998	2295	0.17%
Ác. Kaur ⁻¹ 6-en ⁻¹ 8-oico, éster metílico	46,103	2303	0.63%
Copalato de metila	46,354	2327	8.78%
Colavenato de metila	46,873	2375	2.76%
ni	47,420	2429	0.48%

Hardwickiato de metila	47,728	2462	4.68%
Ácido Kauran ⁻¹ 9-óico, éster metílico	47,923	2483	0.23%
Enantiagato de metila	48,801	2572	1.08%
ni	48,966	2588	0.84%
3-acetoxi-copalato de metila	50,037	-	2.95%
ni	50,089	-	0.42%
ni	50,987	-	2.86%

ni = não identificado

5.1.1.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹H E ¹³C

Os espectros de RMN ¹H de OC e OS (Figuras 15 e 16) mostraram claramente a presença de substâncias de origem terpênicas, evidenciadas pela alta concentração de sinais entre δ 0,8 a 3,0, incluindo sinais de simpletos referentes a hidrogênios de CH₃ em carbono não hydrogenado. Adicionalmente os espectros apresentaram vários sinais entre δ 4,0 e 6,0 característicos de hidrogênios em carbonos olefínicos e/ou ligado a oxigênio, os quais juntamente com os sinais da região de alifáticos (δ 0,8 a 3,0) contribuem para confirmar a existências de substâncias de origem terpênica. Os dois espectros apresentam em comum 3 simpletos em δ 6,27; 7,21 e 7,41 característicos de hidrogênio em anel furano de diterpenóides isolados de óleo de copaíba. Os simpletos em δ 7,21 e 7,41 são dos hidrogênios ligados ao carbono α ao oxigênio do anel furano, enquanto que o simpleto a δ 6,27 é do hidrogênio ligado ao carbono β ao oxigênio.

Observou-se também, no espectro de RMN ¹H de OC (Figura 15), os 3 simpletos em δ 6,27; 7,21 e 7,41 característicos de hidrogênio em anel furano de diterpenóides isolados de óleo de copaíba, mais intensos. Isso confirma os dados de CG onde um dos componentes majoritários é o ácido hardwickiico. No espectro de RMN de ¹³C (Figura 16), verificou-se os sinais do anel furano δ 110, 97; 125,55; 142,7; 138,37. Os valores de δ podem ser confirmados pela literatura como segue: sinais do ácido hardwickiico (SANTOS et al., 2007) δ 16,0 (CH₃); 17,5 (CH₂); 18,2 (CH₂); 18,3 (CH₃); 20,6 (CH₃); 27,3 (CH₂); 27,5 (CH₂); 35,9 (CH₂); 36,3 (CH); 37,6 (C); 38,7; 38,9 (C); 46,79 (CH); 110,0 (CH); 125,6 (C); 138,4 (CH); 140,2 (CH); 141,5 (C); 142,7 (CH); 172,5 (C).

Além dos três simpletos que os dois espectros têm comuns, observou-se dois outros simpletos entre δ 4,5 e 5,0 que, no espectro de RMN ^1H OS (Figura 17), aparecem mais intensos, pois são referentes ao constituinte principal deste óleo. A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 18), mostra que se trata do 9 β -H-cariofileno. Os valores de δ podem ser confirmados pela literatura como segue: sinais do 9 β -H-cariofileno (RAHMAN, A.; AHMAD, V. U., 1992) δ 16,3 (CH₃); 22,6 (CH₃); 24,8 (CH₂); 28,4 (CH₂); 29,4 (CH₄); 30,1 (CH₃); 30,1 (CH₂); 40,0 (C); 40,4 (CH₂); 48,6 (CH); 53,6 (CH); 111,8 (CH₂); 124,5 (CH); 135,0 (C); 154,3 (C). Todos estes valores de δ são dos sinais mais intensos do espectro de RMN ^{13}C de OS.

O óleo comercial OE mostrou claramente não pertencer aos óleos do gênero *Copaífera* (Figuras 19, 20 e 21). Diferentemente dos espectros de OC e OS, de acordo com o RMN ^1H , apresenta menor concentração de sinais na região de δ 0,8 a 3,0, sugerindo substância com cadeia metilênica longa (Figura 19). Os dois duplos dupletos entre δ 4,15 e 4,33 são característicos de hidrogênios oximetilênicos (CH₂O) de triacilgliceróis, mostrando que se trata de óleos vegetais fixos. O sinal intenso entre δ 5,0 e 5,50 é referente a hidrogênios olefínicos e juntamente com o tripleto a δ 2,78 de hidrogênio em carbono duplamente alílico sugere tratar-se do óleo vegetal de soja, o qual é bastante insaturado, pois o componente majoritário é ácidos linoleíco (2 ligações duplas) além de apresentar quantidade significativa de ácido linolênico (3 ligações duplas). Isto já era até esperado devido a maior disponibilidade do óleo de soja. A Figura 21 mostra a comparação entre os espectros de RMN ^1H de OE e de óleo de soja, este último obtido do mesmo equipamento. Contudo, OE não é 100% óleo de soja, pois existem uns sinais de baixa intensidade entre δ 4,5 e 5,0 os quais são observados nos espectros de OC e OS.

Após a caracterização química dos óleos de copaíba, realizou-se ensaios biológicos *in vitro*, relatados a seguir, com o objetivo de estudar propriedades biológicas desses óleos bem como avaliar se a diferença no perfil químico de OE em relação a OS e OC influencia nas propriedades biológicas analisadas.

Figura 15. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de OC.

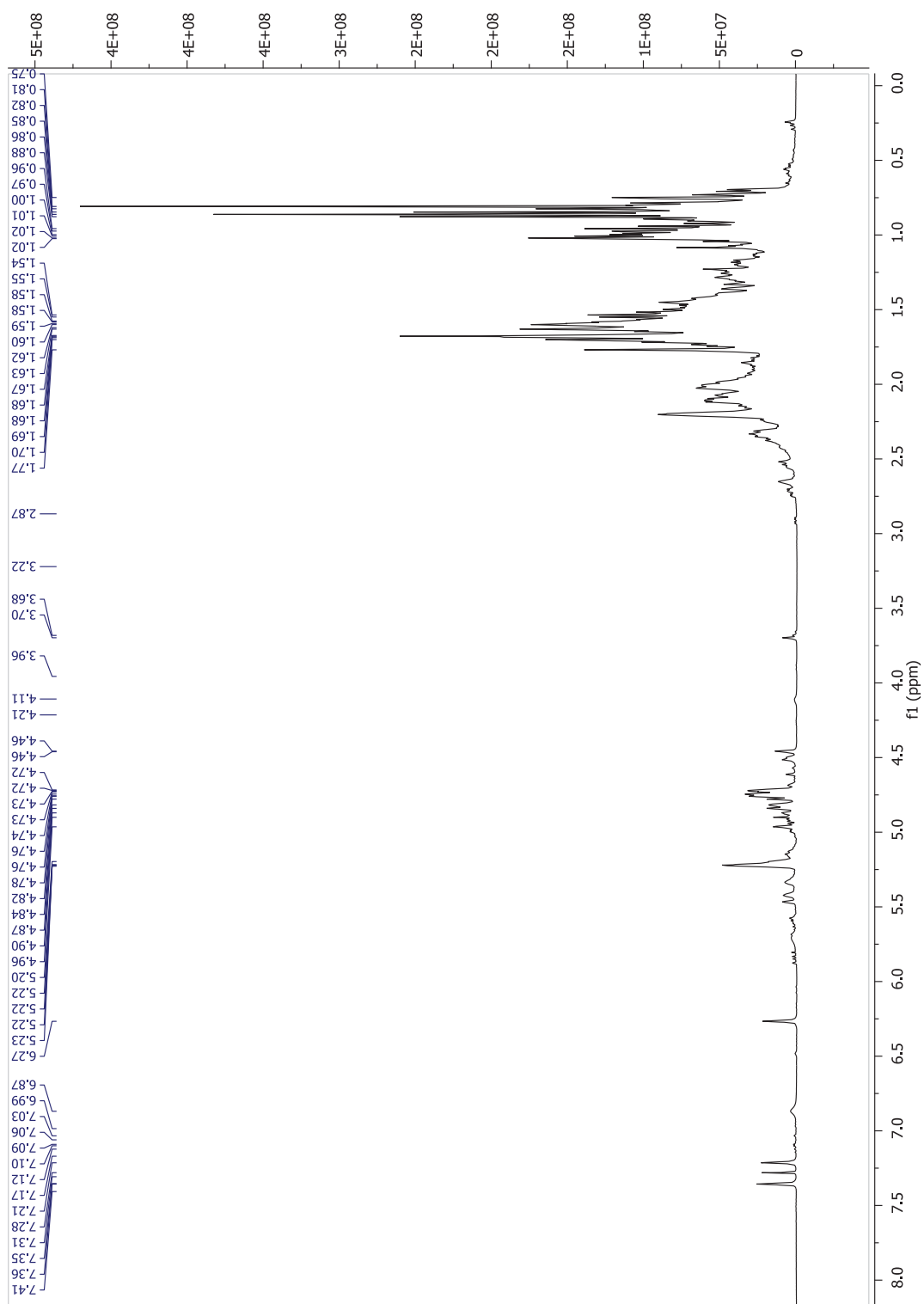


Figura 16. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de OC.

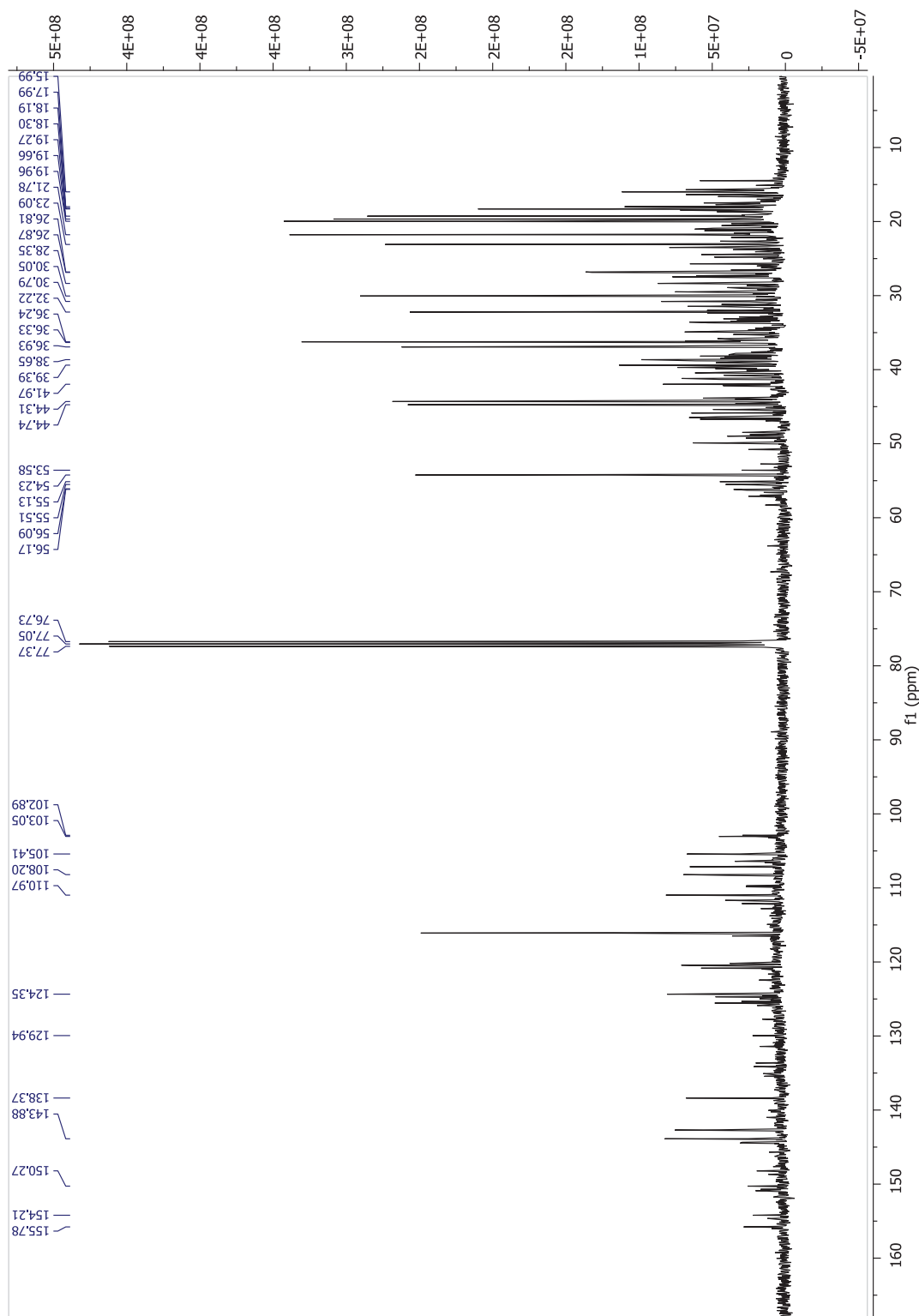


Figura 17. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de CS.

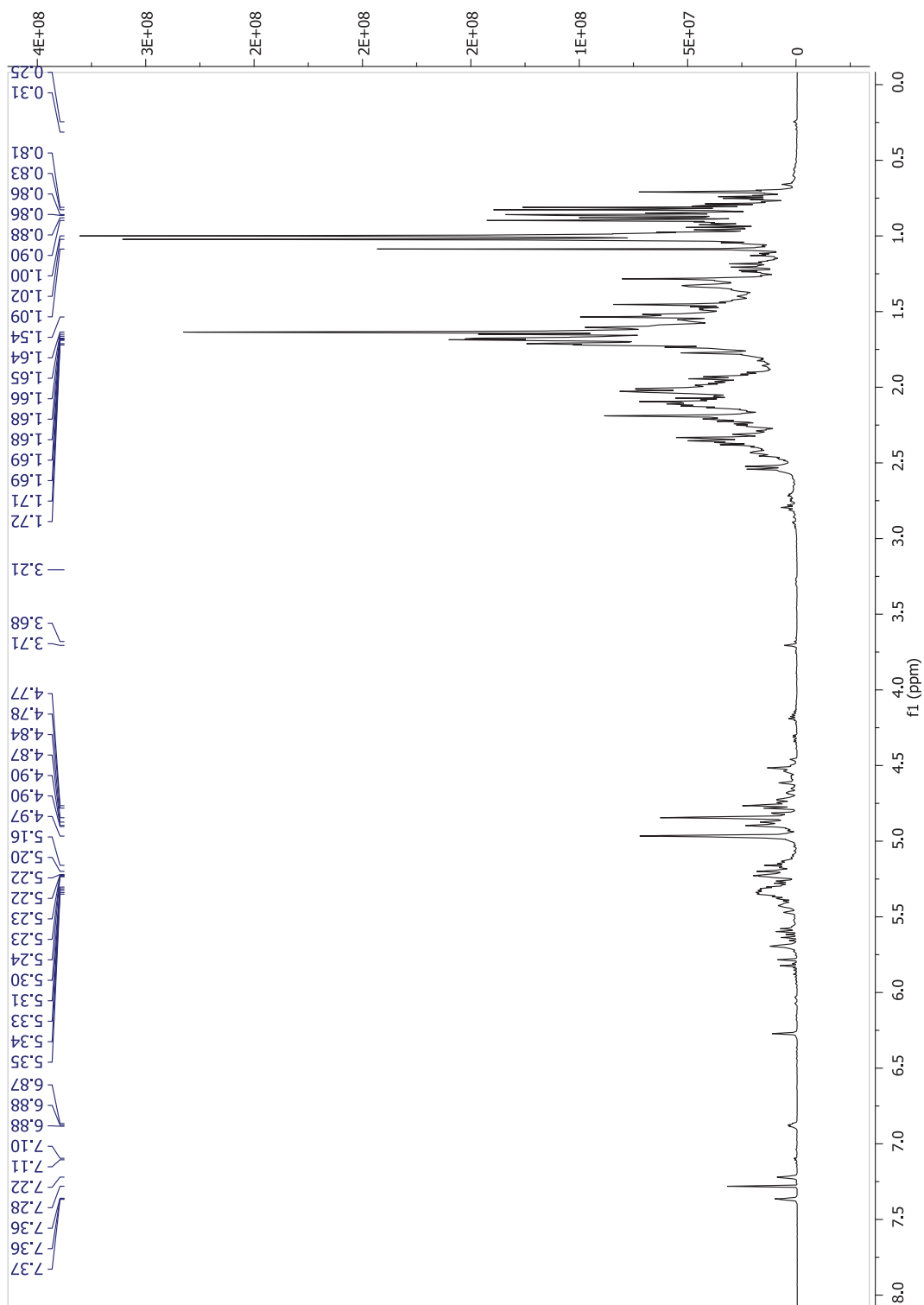


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de CS.

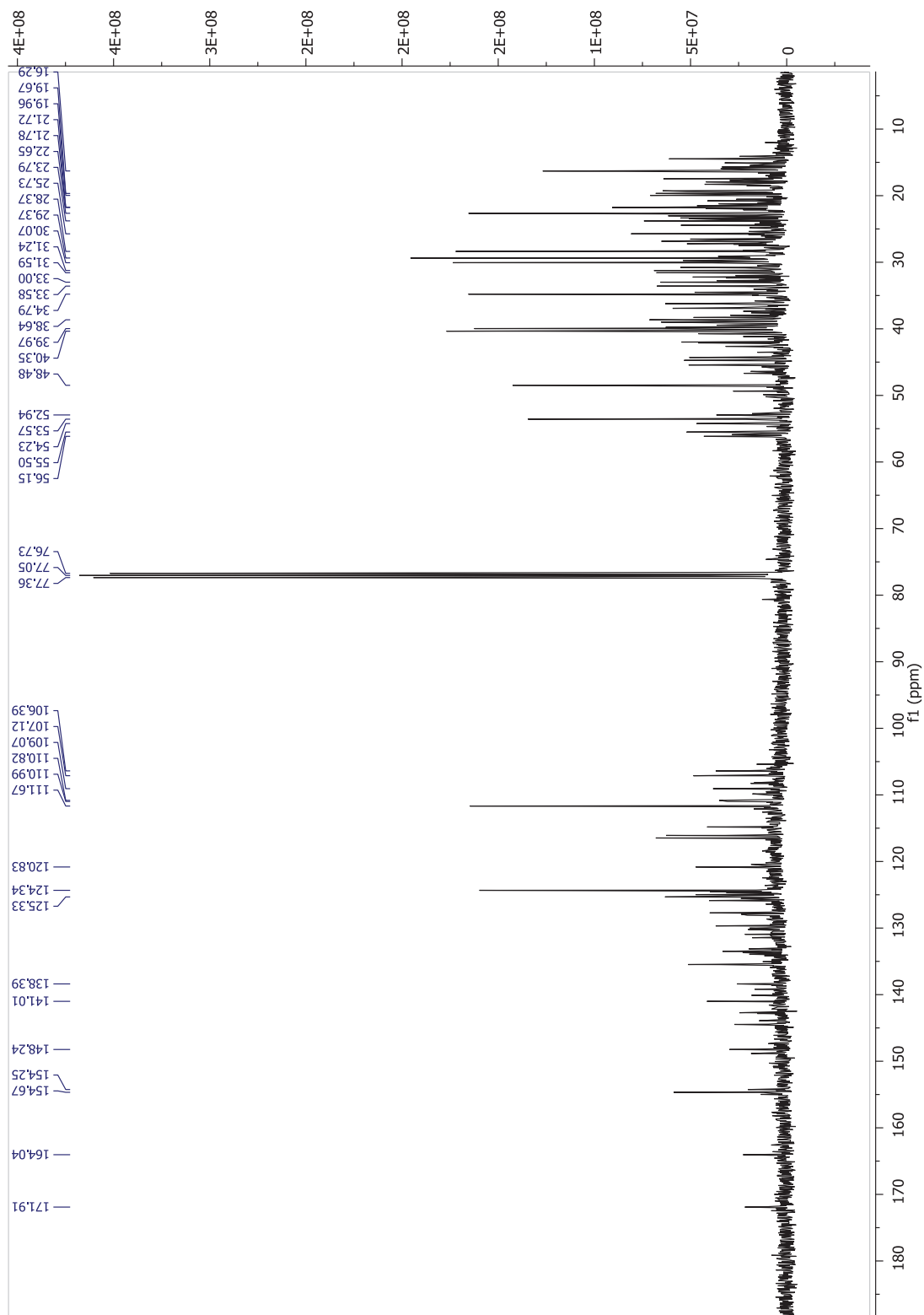


Figura 19. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de OE.

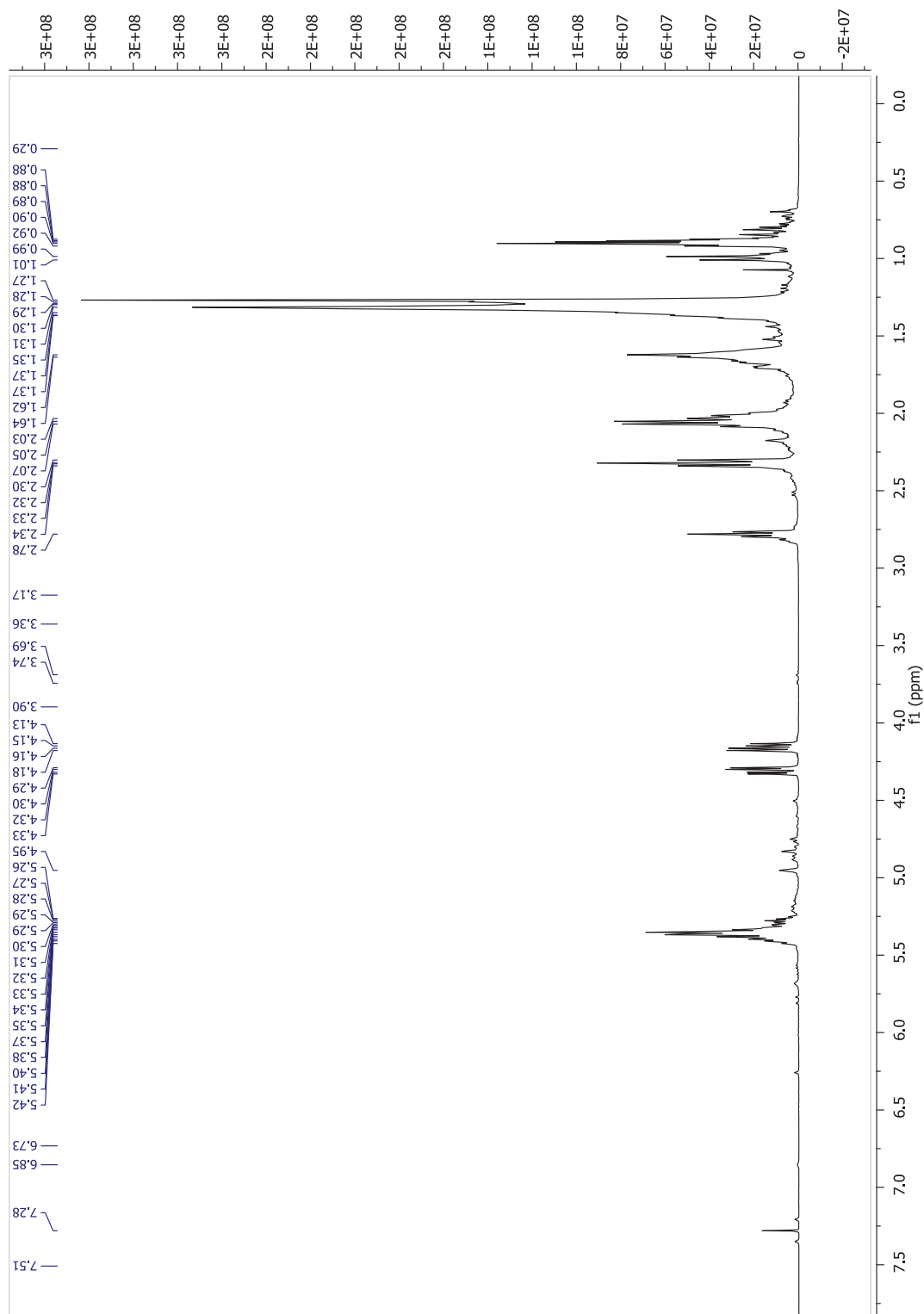


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de OE.

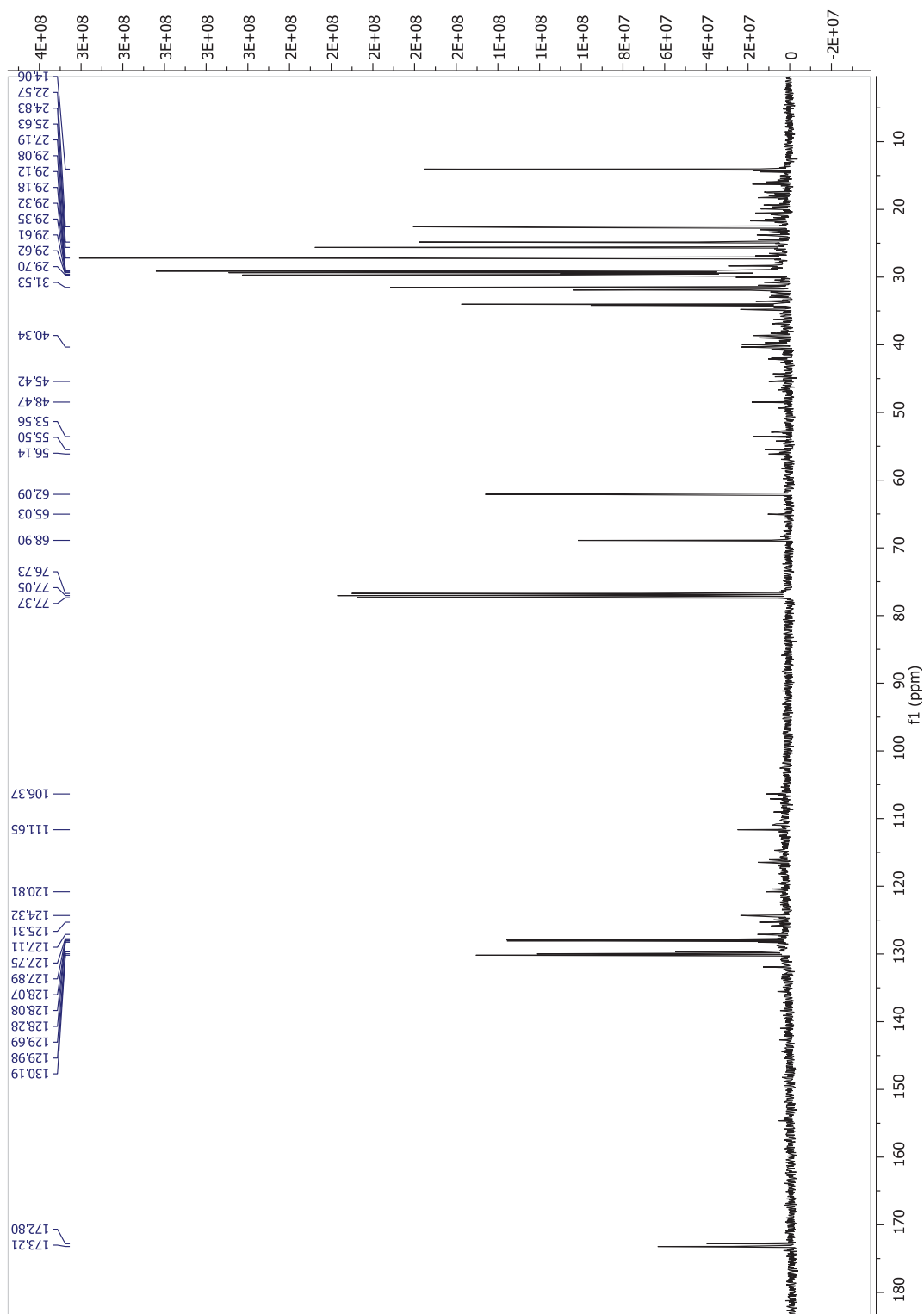
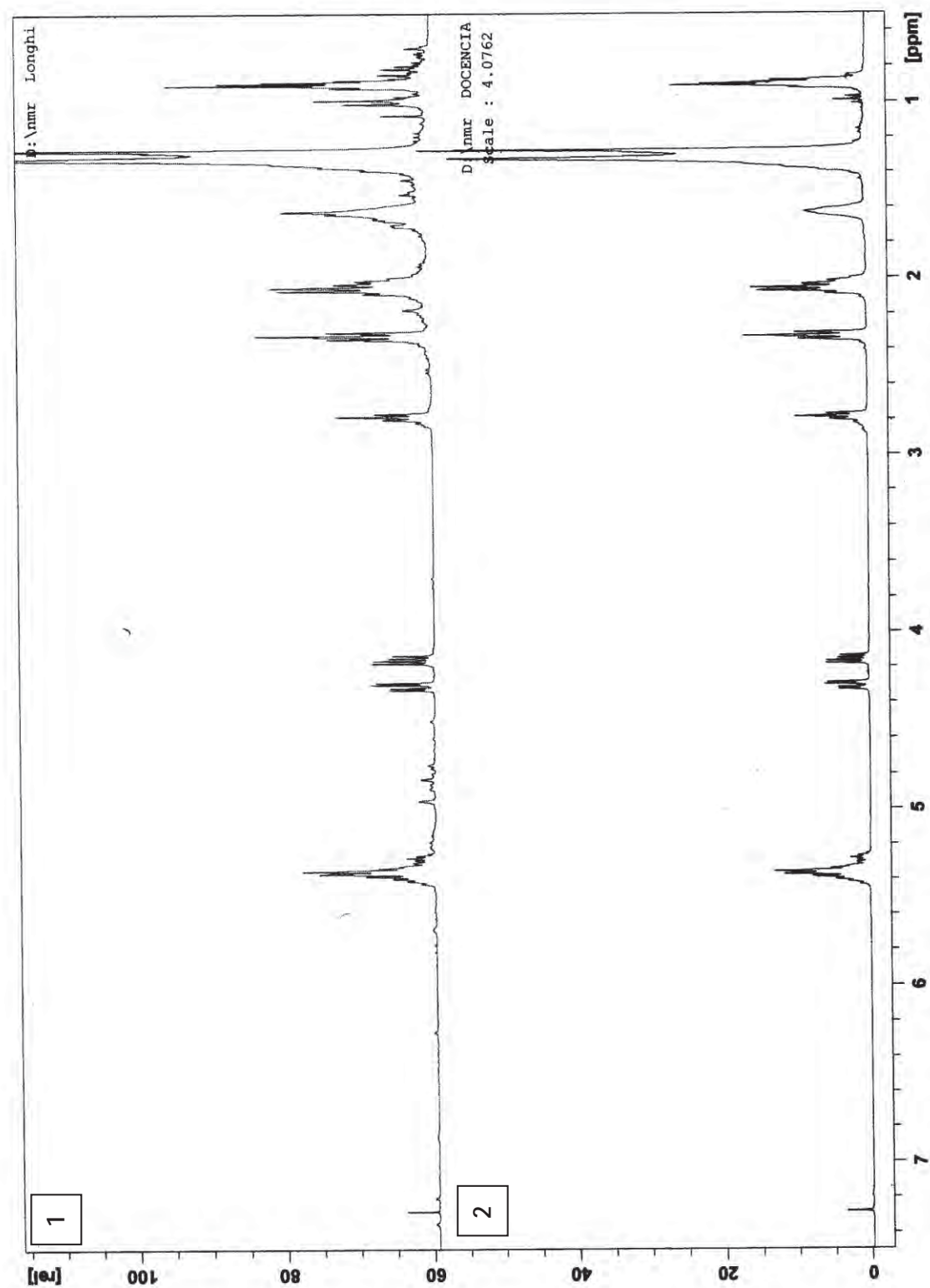


Figura 21. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de (1) OE e (2) Óleo de soja

5.1.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.1.2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Esse ensaio foi realizado com o objetivo de caracterizar os óleos de copaíba biologicamente, estudando uma propriedade presente em diversas espécies de óleo de copaíba. Além disso, os testes auxiliaram a confirmação da diferença de OE em relação a OS e OC.

5.1.2.1.1 Avaliação da viabilidade celular

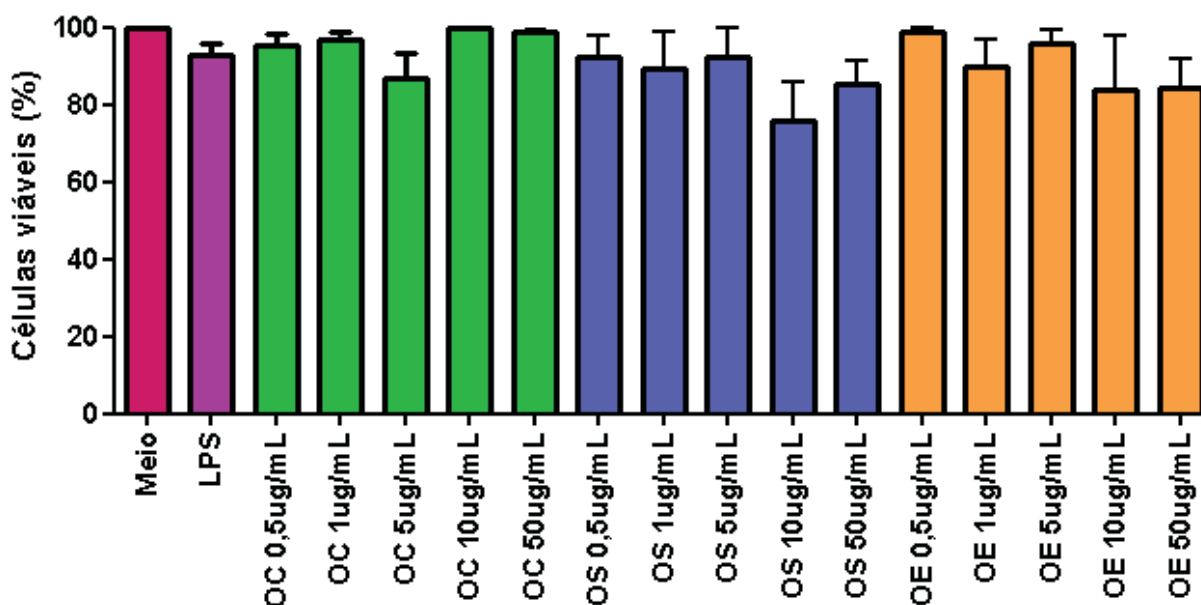
Inicialmente, foi realizado um teste para verificar o potencial tóxico das amostras de óleo de copaíba em estudo. Para isso, foi empregada a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico (MTT) para verificação da atividade e integridade mitocondrial, interpretada como uma medida da viabilidade celular (MOSMAN, 1983).

Foram usadas diferentes concentrações das amostras de óleos de copaíba, OC, OS e OE: 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 50 µg/mL, e constatou-se que a maior concentração apresentou uma viabilidade adequada para dar prosseguimento a todos os experimentos (Tabela 6). Na Figura 22, pode ser observado que todas as amostras apresentaram uma viabilidade celular de pelo menos 84,39% em relação ao controle negativo (meio de cultura). Isso mostra que a maior concentração escolhida de cada uma das amostras (50 µg/mL) foi adequada para prosseguir com a realização dos demais testes.

Tabela 6. Viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos, após exposição às amostras, OC, OS e OE, na concentração de 50µg/mL ou ao Meio (meio de cultura RPMI-1640-C) ou LPS (lipopolissacarídeo bacteriano).

Amostras	Viabilidade celular (% , média±DP)		
OC	98,67	±	2,65
OS	85,36	±	14,5
OE	84,39	±	15,0
Meio	10	±	
LPS	100	±	0

Figura 22. Resposta de OC, OS e OE sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. Os macrófagos peritoneais foram expostos aos óleos de copaíba ou Meio (meio de cultura RPMI-1640-C, como controle de viabilidade celular) ou LPS (lipopolissacarídeo bacteriano). Foi utilizada a metodologia de MTT. As células em presença somente de meio de cultura (Meio) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de duplicata de 5 animais.



5.1.2.1.2 Determinação da produção de óxido nítrico

Os experimentos realizados com macrófagos peritoneais foram: produção e inibição de NO (através da técnica de Griess) através do teste de ELISA.

Nos macrófagos peritoneais murinos, o LPS, utilizado como controle positivo, foi o composto que gerou uma maior produção de NO quando comparado ao controle negativo, conforme esperado, diferindo significativamente de todas as amostras ($p < 0,05$). (Figura 23, Tabela 7). Vale ressaltar que OC e OE, nas duas concentrações testadas, e OS a 100 ug/mL apresentaram uma produção de NO menor do que o controle negativo, apesar de esta diferença não ter sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 23. Efeito de OC, OS e OE sobre a produção de NO em culturas de macrófagos peritoneais. As células aderentes foram incubadas com LPS (controle positivo), óleos de copaíba ou Meio (meio de cultura RPMI-1640-C, como controle de viabilidade celular) ou LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C (meio, controle negativo) por 24 horas a 37°C. A concentração de nitrito foi determinada utilizando o reagente de Griess. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão de μ mols de nitrito de duplicatas de 5 animais.

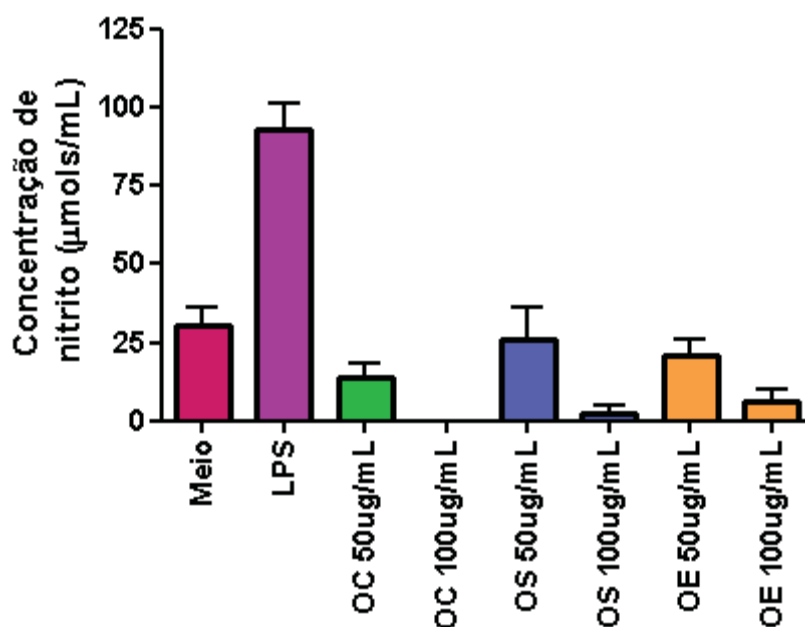


Tabela 7. Produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais após exposição às amostras OC, OS, OE, nas concentrações de 50 μ g/mL e 100 μ g/mL ou ao Meio (meio de cultura RPMI-1640-C) ou LPS (lipopolissacarídeo bacteriano).

Amostras (μ g/mL)	Concentração de NO (μ mol nitrito, média \pm DP)
OC 50	13,77 \pm 11,33
OC 100	0,01 \pm 0,02
OS 50	26,21 \pm 25,93
OS100	2,33 \pm 4,66
OE 50	20,63 \pm 13,42
OE 100	6,05 \pm 8,13
Meio	30,43 \pm 25,01
LPS	93,41 \pm 31,91

A produção de NO pode estar sendo influenciada negativamente por algumas das amostras, especialmente as que são ditas pela literatura como anti-inflamatórias

como o óleo de copaíba (CURIO et al., 2009), entretanto para se esclarecer esta possibilidade realizou-se o ensaio de inibição da produção de NO.

5.1.2.1.3. Determinação da inibição da produção de óxido nítrico

O presente ensaio confirmou os resultados obtidos no teste de produção de NO, uma vez que foi possível observar que quanto maior a concentração dos óleos de copaíba, maior a porcentagem de inibição variando de 49% de inibição para OS 100 µg/mL e 85% de inibição da produção de NO para OC 100 µg/mL. OE 100 µg/mL apresentou 70% de inibição (Tabela 8, Figura 24).

Quando comparadas ao controle positivo, as amostras na concentração de 50 µg/mL não apresentaram níveis de produção de NO significativamente diferentes ($p > 0,05$). Observou-se também que nesta concentração, OS e OC apresentaram porcentagem de inibição de NO de aproximadamente 14%, valor três vezes maior que o encontrado para OE (5%).

Figura 24. Efeito de OC, OS e OE sobre a inibição de NO em culturas de macrófagos peritoneais. As células aderentes foram incubadas com LPS (controle positivo), óleos de copaíba ou Meio (meio de cultura RPMI-1640-C, como controle de viabilidade celular) ou LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C (meio, controle negativo) por 24 horas a 37°C. A concentração de nitrito foi determinada utilizando o reagente de Griess. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão de µmols de nitrito de duplicatas de 5 animais.

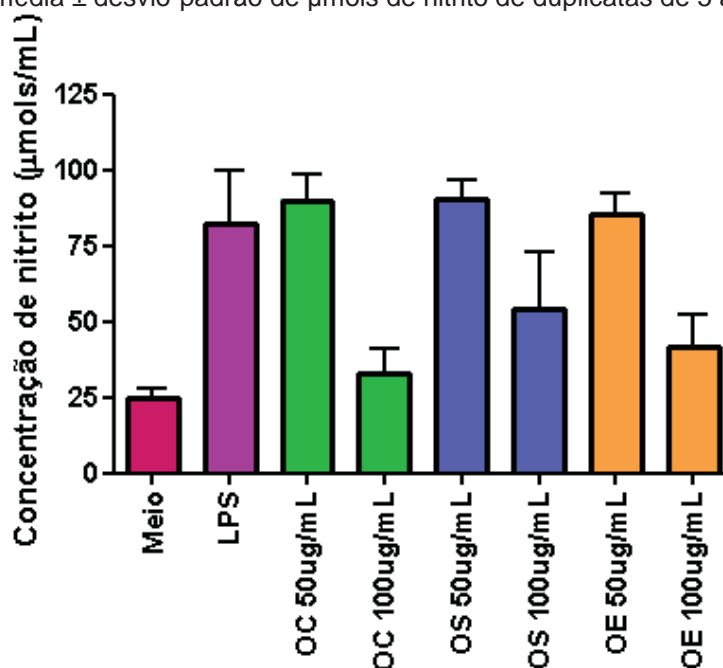


Tabela 8. Avaliação da inibição da produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais após exposição às amostras OC, OS, OE, nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL ou ao Meio (meio de cultura RPMI-1640-C) ou LPS (lipopolissacarídeo bacteriano).

Amostras	Concentração de NO (µmol nitrito, média±DP)	Inibição (%)
OC 50 µg/mL	90,03 ± 17,03	13,26
OC 100 µg/mL	33,21 ± 15,22	85,13
OS 50 µg/mL	90,31 ± 12,67	13,75
OS100 µg/mL	53,99 ± 37,39	49,15
OE 50 µg/mL	85,27 ± 13,58	5,02
OE 100 µg/mL	41,41 ± 21,83	70,92
Meio	24,62 ± 6,24	-
LPS	82,37 ± 34,68	-

Nos últimos anos tem se acumulado evidências de que em muitas doenças infecciosas os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune anormal. Em muitas dessas situações existe uma reação de hipersensibilidade com resposta imune exagerada e não modulada que tem como consequência dano tecidual (MACHADO et al., 2004).

O NO é um dos produtos de macrófagos ativados e apresenta inúmeras atividades, dentre elas antibacteriana, antiparasitária e antiviral. Porém, o descontrole na síntese de NO está implicado na patogênese de algumas doenças como hipertensão, sepse, doenças cerebrais degenerativas e câncer (COSTA et al., 2003).

Os óleos de copaíba, na concentração analisada de 50 µg/mL, não induziram à produção de NO a níveis estatisticamente significativos quando comparado ao controle negativo ($p > 0,05$), o que pode ser bom por evitar os possíveis efeitos maléficos que esse mediador poderia gerar, uma vez que, apesar de o óxido nítrico estar relacionado na defesa do organismo a invasores, a sua produção pode contribuir para a patogênese de várias doenças (ISOMAKI; PUNNONEN, 1997).

No ensaio de produção de NO, verificou-se que a resposta apresentada por OE foi diferente de OC e OS, confirmando o resultado encontrado para a diferente

composição química de OE em relação a OS e OC. A diferença entre OS e OC no ensaio de inibição da produção de NO pode ser devido à diferença entre os componentes majoritários de cada óleo. OS apresentou menor porcentagem de inibição de NO e possui como componente principal o β -cariofileno, que tem sido descrito na literatura como importante componente anti-inflamatório (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Portanto, o presente ensaio pode auxiliar no controle de qualidade e/ou composição química de óleos de copaíba de diferentes procedências.

Ramos (2006) avaliou o efeito da fração volátil (sesquiterpenos) de óleo de copaíba a 50 $\mu\text{g/mL}$ sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico, verificando 100% de viabilidade celular e 25% de inibição da produção de NO, corroborando os resultados aqui discutidos.

5.1.2.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM CÉLULAS HEPG2

Neste ensaio, avaliou-se a citotoxicidade *in vitro* dos óleos de copaíba através do modelo em células HepG2, amplamente usado em testes de citotoxicidade (NOOR et al., 2009; WILKENING, STAHL, BADER, 2003; JAVITT, 1990). Para isso, usou-se um indicador de viabilidade celular, o Alamar Blue (AB), que é reduzido por células metabolicamente ativas e diretamente proporcional ao número destas. Assim, determinou-se a porcentagem de redução de AB, que está diretamente relacionada à viabilidade e proliferação celular, refletindo na presença ou não de citotoxicidade.

As Figuras 25 a 27 mostram os resultados desta avaliação.

Figura 25. Efeito da concentração de **OC** no crescimento da linha celular HepG2. Células HepG2 em placas de cultura de 96-poços foram expostas a OC 24 h antes de se adicionar o AB. O efeito das várias concentrações de OC foi avaliado ao longo de 7 dias.

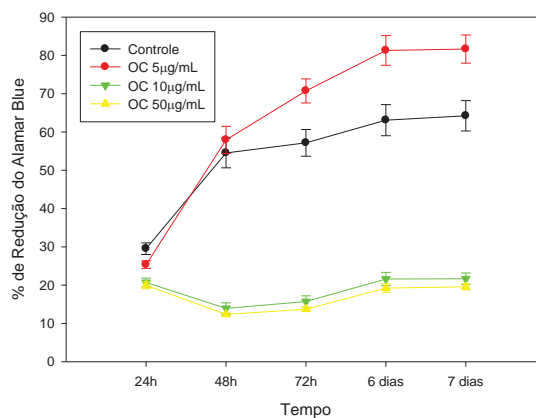


Figura 26. Efeito da concentração de **OS** no crescimento da linha celular HepG2. Células HepG2 em placas de cultura de 96-poços foram expostas a OC 24 h antes de se adicionar o AB. O efeito das várias concentrações de OC foi avaliado ao longo de 7 dias.

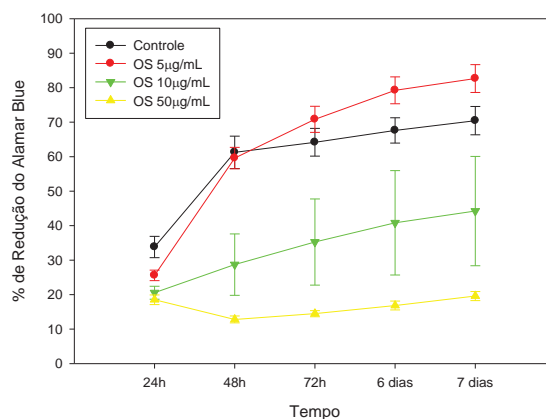
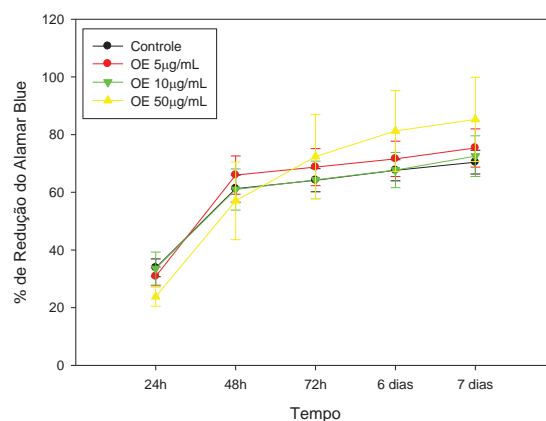


Figura 27. Efeito da concentração de **OE** no crescimento da linha celular HepG2. Células HepG2 em placas de cultura de 96-poços foram expostas a OC 24 h antes de se adicionar o AB. O efeito das várias concentrações de OC foi avaliado ao longo de 7 dias.



De acordo com as Figuras 25 e 26, pode-se observar que OC e OS, nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ praticamente diminuíram a viabilidade e proliferação celular (redução de Alamar Blue menor que 20%), mostrando citotoxicidade em células HepG2. Apenas para OS a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ainda observou-se um aumento da porcentagem de redução de Alamar Blue quando comparado com OC, entretanto bem menor que o controle, apresentando, portanto, citotoxicidade.

Na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, OC e OS não apresentaram citotoxicidade, permitindo a proliferação e mantendo a viabilidade celular refletida por porcentagem de redução de Alamar Blue de aproximadamente 80%, em 7 dias. Nesta concentração, a porcentagem de redução do AB ainda é maior quando comparada ao controle sugerindo uma estimulação do crescimento celular ou uma atividade mitocondrial aumentada. Contudo, para concentrações mais elevadas, observa-se, relativamente ao controle, uma diminuição da redução do AB, denotando citotoxicidade. Além disso, conforme é possível observar nos gráficos, OC e OS apresentaram perfil de citotoxicidade dependente da concentração utilizada.

Para as células tratadas com OE (Figura 27), pode-se observar que, independente da concentração, este óleo não apresentou citotoxicidade. OE permitiu a proliferação/viabilidade celular, ou seja, observou-se uma porcentagem de redução de Alamar Blue em mais de 80%, ao longo de 7 dias para a maior concentração, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Comparando-se as outras concentrações, observa-se que na de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a porcentagem de redução do Alamar Blue foi maior do que na de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e maior que o do controle, mostrando que a viabilidade celular e o crescimento celular não são afetados negativamente pela presença de OE. Apesar de se observar um aumento da redução do AB, relativamente ao controle, com a concentração de OE ao longo do tempo (mais acentuado para 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Podemos afirmar, portanto, que nestas concentrações OE não é tóxico para estas células.

Comparando-se os três óleos, verificou-se que OC e OS mostraram resposta semelhante no ensaio de avaliação da toxicidade em células HepG2 , com menor citotoxicidade na menor concentração, enquanto OE não apresentou toxicidade para qualquer concentração.

Os óleos de copaíba são compostos principalmente por misturas de sesquiterpenos e diterpenos, como relatado anteriormente na literatura (VEIGA JR.; PINTO, 2002; CASCON; GILBERT, 2000). Algumas dessas substâncias são conhecidas por serem citotóxicas e inibirem tumores, sendo os sesquiterpenos tóxicos possuidores de um ou mais grupos funcionais alquilantes, e mais sugestivos de serem mutagênicos e carcinogênicos (MAISTRO et al., 2005; LIMA et al., 2003; WALL et al, 1998; SENA; CHEN, 1998).

Vale ressaltar que na literatura, as informações disponíveis mostram que quando presente, o padrão de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade é semelhante para os de óleos de copaíba, apesar das diferenças na composição, em relação aos componentes majoritários. O mesmo foi observado no presente trabalho para OC e OS, que apresentaram perfil de citotoxicidade semelhante e de acordo com a caracterização química, possuem componentes majoritários diferentes. Já para OE, os resultados foram diferentes, o que já era esperado considerando-se o perfil químico diferenciado apresentado por este óleo.

Esses resultados, juntamente com a caracterização química dos óleos de copaíba, levaram a exclusão de OE dos testes posteriores. Entretanto, construiu-se o diagrama de fases também com OE a fim de se verificar a influência das propriedades químicas destes óleos no desenvolvimento farmacotécnico de formulações contendo os mesmos, bem como mostrar as diferenças entre óleos de copaíba de diferentes procedências ao serem usadas como matérias primas. O item a seguir mostra os resultados desta avaliação.

5.2. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS

5.2.1 DIAGRAMA DE FASES

A construção do diagrama de fases através da titulação é uma metodologia vantajosa, pois permite o estudo de um grande número de composições de forma significativa, permitindo descrever em que condições experimentais é possível se obter sistemas nanoestruturados como microemulsões e cristais líquidos, bem como as regiões de transição entre os sistemas obtidos.

As concentrações de cada componente nas nove formulações obtidas (Tabela 1) foram calculadas e plotou-se os pontos em que se observou, visualmente, a formação dos diferentes sistemas.

Nos quatro diagramas construídos, as regiões comuns identificadas no diagrama foram: microemulsão (ME), cristal líquido (CL), emulsão (EM) e separação de fases (SF), conforme Figuras 28 a 31. As formulações escolhidas para caracterização estão identificadas nos diagramas correspondentes às fases oleosas ácido oléico (AO), óleo de copaíba obtido de cooperativas do Acre (OC) e o obtido da Sigma (OS).

Os sistemas líquidos transparentes e com baixa viscosidade foram considerados ME. A região de CL corresponde aos sistemas transparentes e mais viscosos, que apresentaram pouca ou nenhuma fluidez ao verter o frasco em que estavam contidos. A região em que as formulações formadas têm aspecto leitoso, algumas apresentando média a alta viscosidade e outras com aspecto líquido e viscosidade alta ou baixa, foi denominada Emulsões – EM. A região SF corresponde aos sistemas que apresentaram duas fases separadas.

Figura 28. Diagrama de fases do sistema estabilizado com PROC, AO e fase aquosa. As áreas delimitadas representam: **ME** – microemulsão, **CL** – cristal líquido, **EM** – emulsão e **SF** – separação de fases. Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.

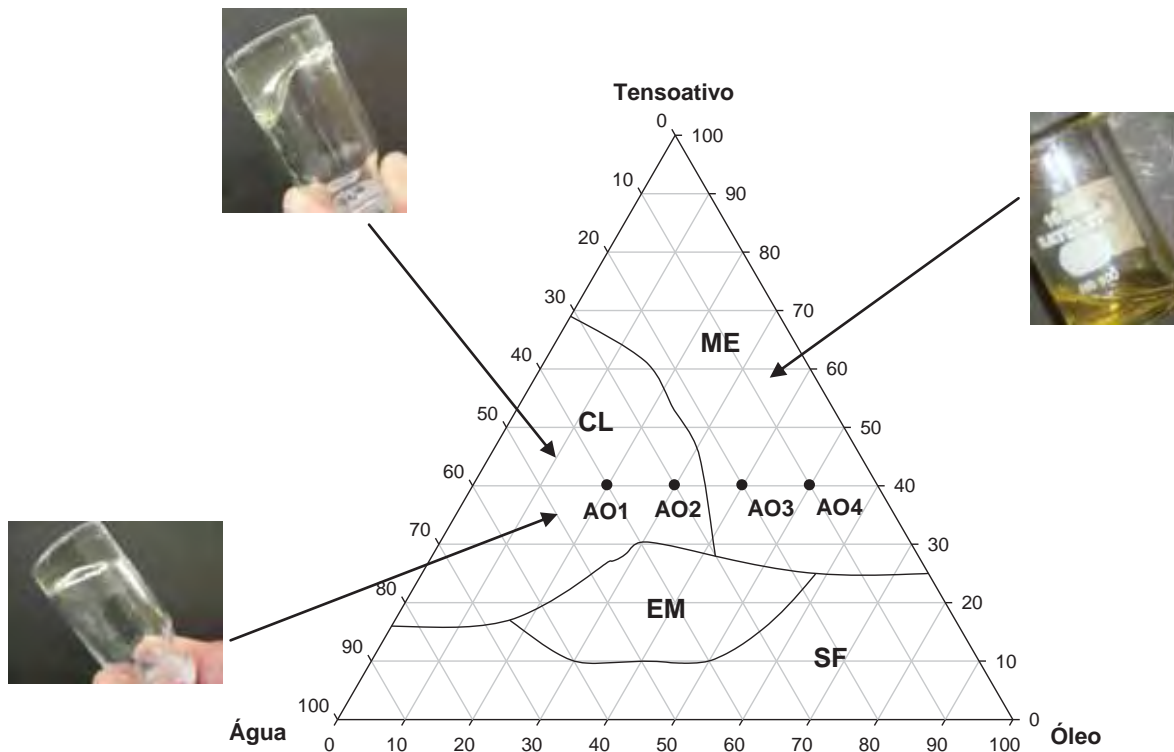


Figura 29. Diagrama de fases do sistema estabilizado com PROC, OC e fase aquosa. As áreas delimitadas representam: **ME** – microemulsão, **CL** – cristal líquido, **EM** – emulsão, **SF** – separação de fases e **DA** – diluição aquosa. Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.

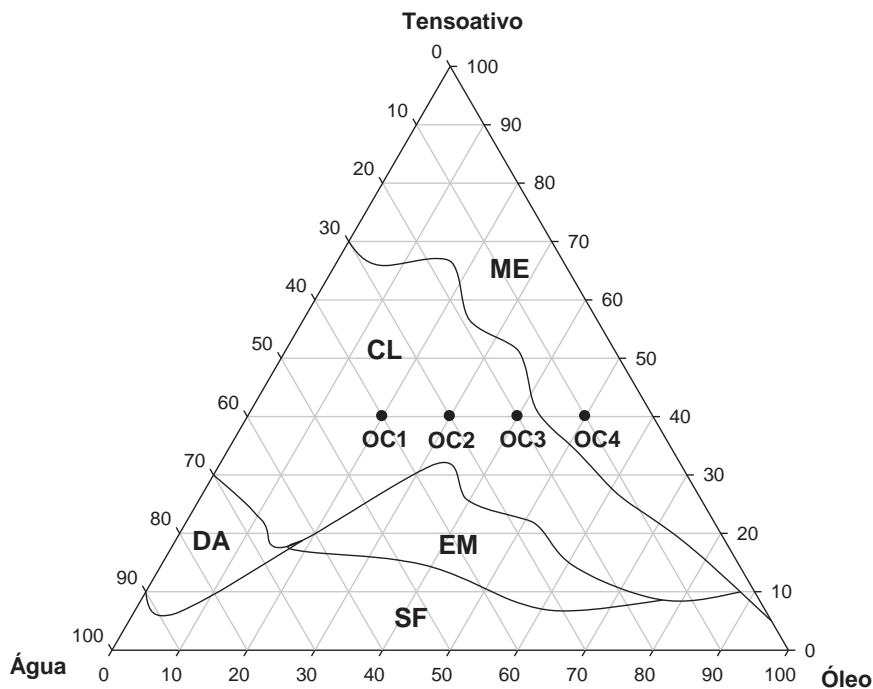


Figura 30. Diagrama de fases do sistema estabilizado com PROC, **OS** e fase aquosa. As áreas delimitadas representam: **ME** – microemulsão, **CL** – cristal líquido, **EM** – emulsão e **SF** – separação de fases. Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.

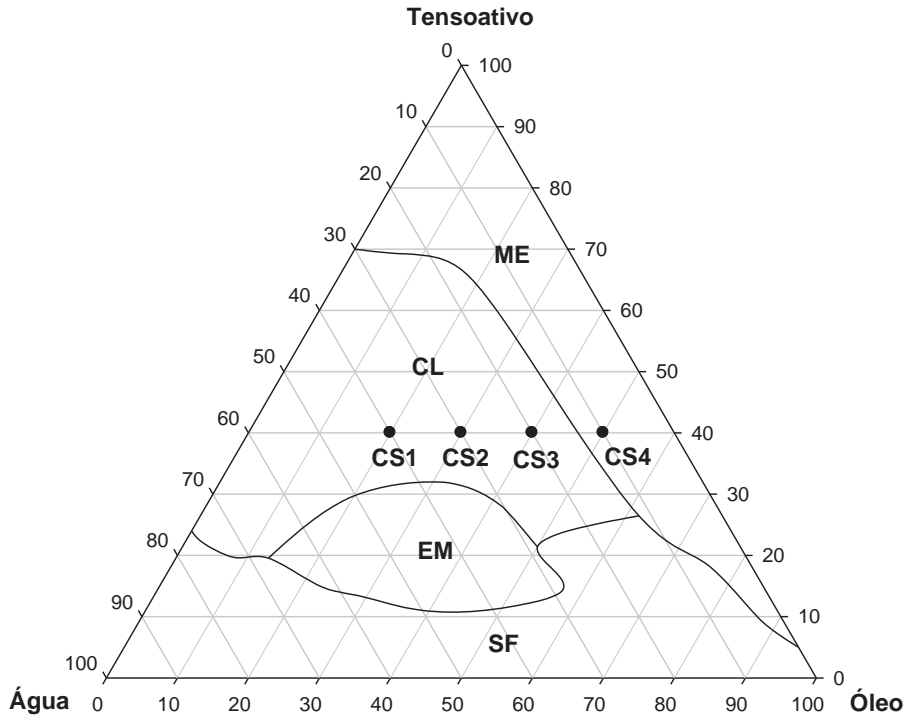
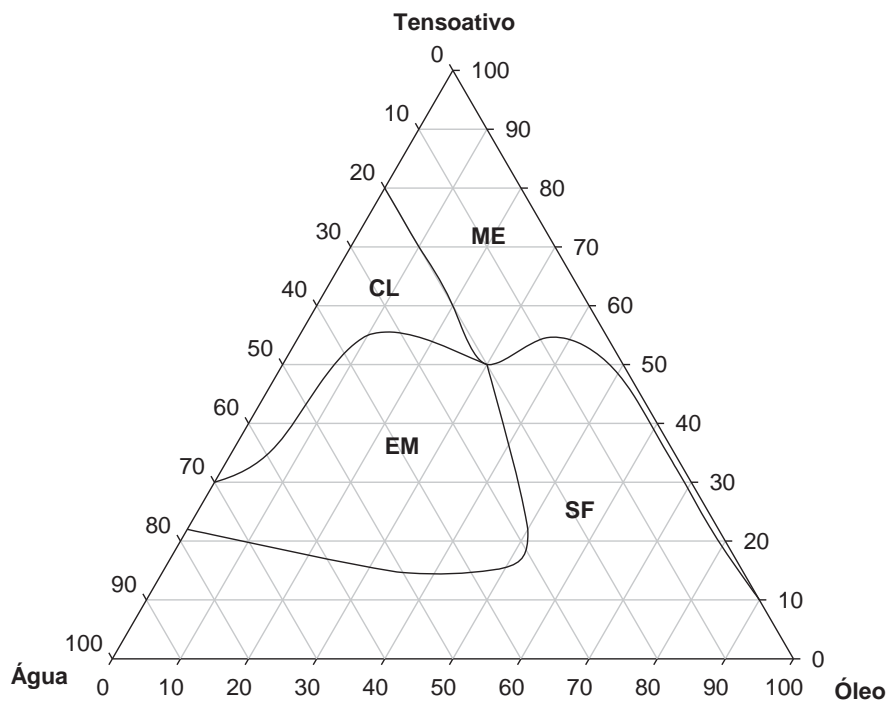


Figura 31. Diagrama de fases do sistema estabilizado com PROC, **OE** e fase aquosa. As áreas delimitadas representam: **ME** – microemulsão, **CL** – cristal líquido, **EM** – emulsão e **SF** – separação de fases. Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.



Observou-se que, nos diagramas de AO, OC e OS (Figuras 28 a 30), entretanto mesmo em baixas concentrações de tensoativos (10 a 30%), foi possível observar a formação de ME com quantidades significativas de fase oleosa (50 a 70%) e baixas quantidades de água, como nas formulações contendo OC e OS (Figura 29 e 30). Por outro lado, observando-se os diagramas das Figuras 28 a 30, verificou-se que a formação de CL, depende da presença de aproximadamente, 30 a 70% de água.

A formação desses sistemas dependente diretamente da concentração do tensoativo, podendo-se observar que em algumas regiões do diagrama com pequenas concentrações de tensoativo não é possível estabilizar a mistura dos componentes e ocorre separação entre as fases. Com o aumento da quantidade de tensoativo nas misturas, sistemas como ME e CL vão sendo formados.

Comparando-se os diagramas de fases obtidos com óleo de copaíba de diferentes procedências (Figuras 29 a 31) com o obtido com AO como fase oleosa, verificou-se que assim como no diagrama de AO (Figura 28), os diagramas de OC e OS apresentaram amplas regiões de ME e CL. Além disso, observou-se que estes óleos de copaíba contribuíram para a formação de ME e CL em região de baixa quantidade de tensoativo (10 a 25 %), um aspecto interessante no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, em especial para administração oral e cutânea, uma vez que pode diminuir os riscos de efeitos adversos e/ou toxicológicos.

No diagrama referente aos sistemas contendo OE (Figura 31), observou-se que, com esta fase oleosa, formaram-se pequenas regiões de ME e CL, constituídas por grandes quantidades de tensoativos (> 60%) e as regiões de 40 a 50% de tensoativo formaram SF e EM (Figura 31). Portanto, com base nestes resultados, aliado a precária qualidade do OE, descartou-se esta fase oleosa para continuação dos testes de caracterização.

As formulações escolhidas para estudo estão nas regiões de ME e CL e padronizou-se a concentração de tensoativo de 40%, por ser uma região de estabilidade estrutural e interessante, uma vez que quanto menor a quantidade de tensoativo, melhor a sua aplicabilidade em termos de uma menor possibilidade de irritação e toxicidade.

5.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS

Para caracterização física dos sistemas, foram selecionadas as formulações indicadas nas Figuras 28, 29 e 30 cujas concentrações dos componentes estão apresentadas na Tabela 9. As formulações contendo fluconazol tiveram seu nome acrescido de um F (ex.: AO1F, OS1F, OC1F, etc.).

Tabela 9. Composição (%) das formulações para caracterização física do sistema

Componentes Formulações	Fase oleosa (OC, OS ou AO)	Tensoativo	Fase aquosa
OC1; OS1; AO1	20	40	40
OC2; OS2; AO2	30	40	30
OC3; OS3; AO3	40	40	20
OC4; OS4; AO4	50	40	10

5.2.2.1 Índice de refração (IR)

O IR absoluto de um meio pode ser obtido experimentalmente e é dado pela equação 5:

$$n = \frac{c}{v} \quad (\text{Eq. 5})$$

onde: c = velocidade da luz no vácuo e v = velocidade da luz para um comprimento de onda específico num certo meio.

O desvio que a luz sofre quando passa de um meio para outro depende da velocidade da luz nos dois meios. A grandeza física que relaciona as velocidades nos dois meios é o IR relativo (n_{21}), que é definido como sendo a razão (equação 6) entre a velocidade da luz no primeiro meio (v_1) e a velocidade da luz no segundo meio (v_2):

$$n_{21} = v_1 / v_2 \quad (\text{Eq. 6})$$

Pode-se relacionar IR relativo com IR absoluto usando a equação 7:

$$n_{21} = n_2 / n_1 \quad (\text{Eq. 7})$$

Portanto, quando o meio 2 for mais refringente que o meio 1, o raio incidente passará com velocidade menor pelo meio 2 e, então, n_2 será maior que n_1 .

Nas análises realizadas, o meio 1 foi a água, com IR de 1,333 e o meio 2 foram as formulações.

Analisando-se separadamente os componentes das formulações (PROC, OC, OS, AO), observou-se que todos apresentaram índice de refração maior que o da água (Tabela 10), possivelmente devido à maior viscosidade que eles apresentam visualmente, sendo OC e OS um pouco mais viscosos que PROC e AO, além de apresentar cor amarela característicos destes óleos, refletindo num pequeno aumento do IR.

Tabela 10. Índice de refração dos componentes das formulações.

Componente IR	PROC	OC	OS	AO
Média	1,46	1,51	1,50	1,46
DP(±)*	0,2. 10 ⁻³	0,4. 10 ⁻³	0	0
CV(%)*	1,98	2,00	0	0

* DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação

As Tabelas 11, 12 e 13 mostram o IR das formulações estudadas, apresentadas na Tabela 1, segundo a fase oleosa utilizada.

Tabela 11. Índice de refração das formulações contendo OC.

Formulação IR	OC1	OC2	OC3	OC4
Média	1,44	1,44	1,46	1,47
DP(±)*	0,3. 10 ⁻³	0,8. 10 ⁻³	0,1. 10 ⁻²	0,5. 10 ⁻³
CV(%)*	0,02	0,05	0,06	0,03

* DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação

Tabela 12. Índice de refração das formulações contendo OS

Formulação IR	OS1	OS2	OS3	OS4
Média	1,43	1,44	1,46	1,47
DP(±)*	0,25. 10 ⁻²	0,7. 10 ⁻³	0,1. 10 ⁻²	0,1 10 ⁻²
CV(%)*	0,17	0,05	0,06	0,07

* DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação

Tabela 13. Índice de refração das formulações contendo AO.

Formulação IR	AO1	AO2	AO3	AO4
Média	1,42	1,43	1,44	1,45
DP(±)*	0,1. 10 ⁻²	0,1. 10 ⁻²	0,1. 10 ⁻²	0,2. 10 ⁻²
CV(%)*	0,12	0,12	0,12	0,16

* DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação

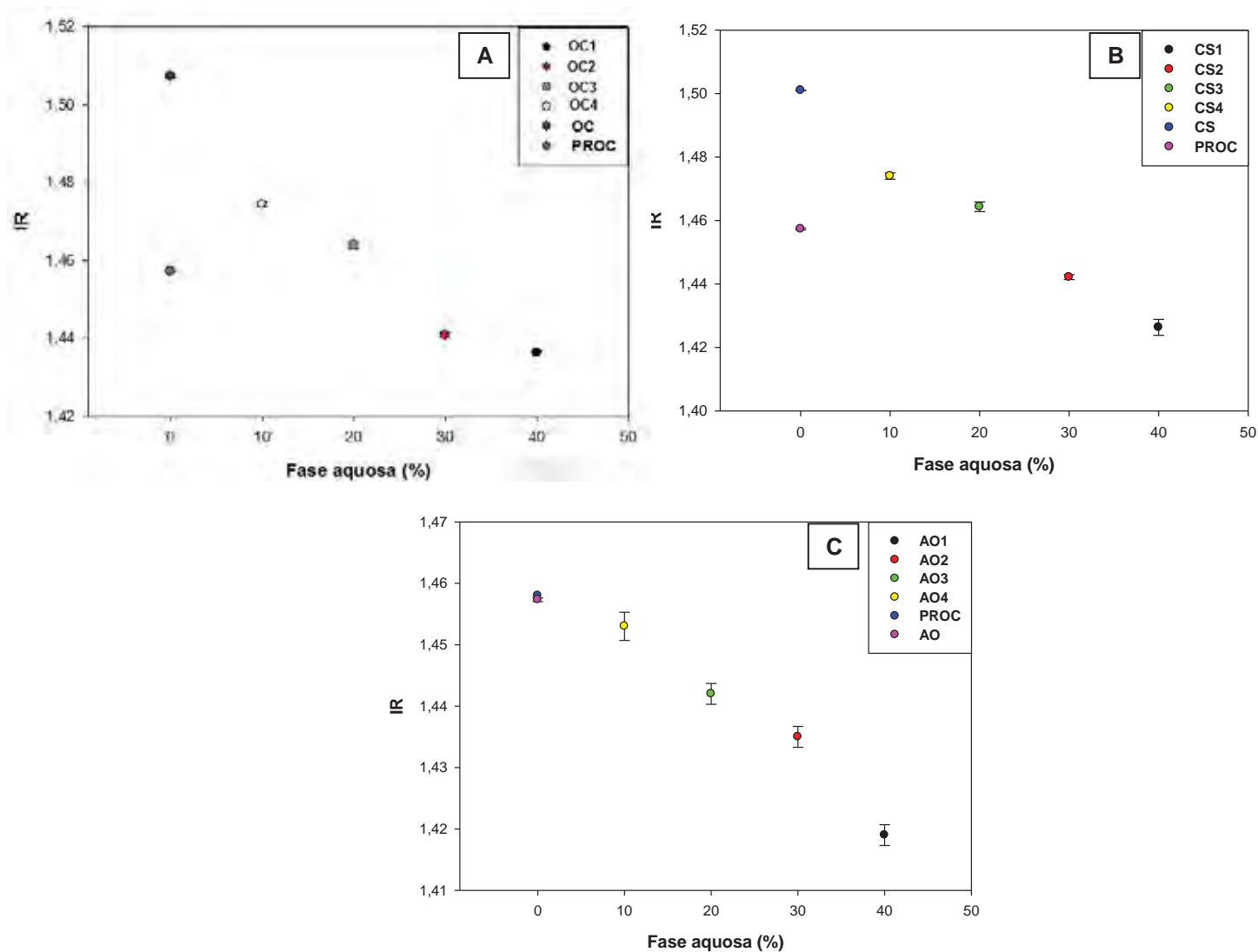
Nas formulações contendo fluconazol (1%), os valores dos índices de refração foram os mesmos quando comparados às formulações sem fluconazol.

De acordo com os resultados encontrados, num aspecto geral, observou-se que o aumento da concentração de fase aquosa nas formulações, promove uma diminuição do índice de refração (IR). Isso pode ser explicado pelo fato de a água ter um menor índice de refração, além de contribuir para uma maior transparência da formulação.

A Figura 32 mostra os valores de IR em função da concentração de fase aquosa. Observa-se, que os valores de IR estão diretamente relacionados com a fase aquosa, uma vez que, independentemente do tipo de fase oleosa, quanto maior a concentração de óleo nas formulações, e, portanto, menor concentração de água, mais os valores de IR para as formulações se aproximam do valor de IR para a fase oleosa. Como exemplo, OC4 possui 10% de água e 50 % de óleo, apresentando assim, IR mais próximo do IR da fase oleosa OC e mais distante do IR da água

quando comparado a OC1, que possui 20% de óleo de 40% de água. O mesmo ocorre para as formulações de OS e AO.

Figura 32. Índice de refração das formulações e seus componentes, em relação a concentração de fase aquosa, empregando as 3 fases oleosas: (A) sistemas contendo OC ; (B) sistemas contendo OS e (C) sistemas contendo AO.



5.2.2.2 Determinação do pH

A pele apresenta pH levemente ácido, entre 4,6 e 5,8, o que contribui para um aumento da proteção contra bactérias e fungos em sua superfície. Além disso, as secreções cutâneas apresentam importante capacidade tamponante, uma vez que o pH da pele é freqüentemente alterado em consequência da utilização de produtos

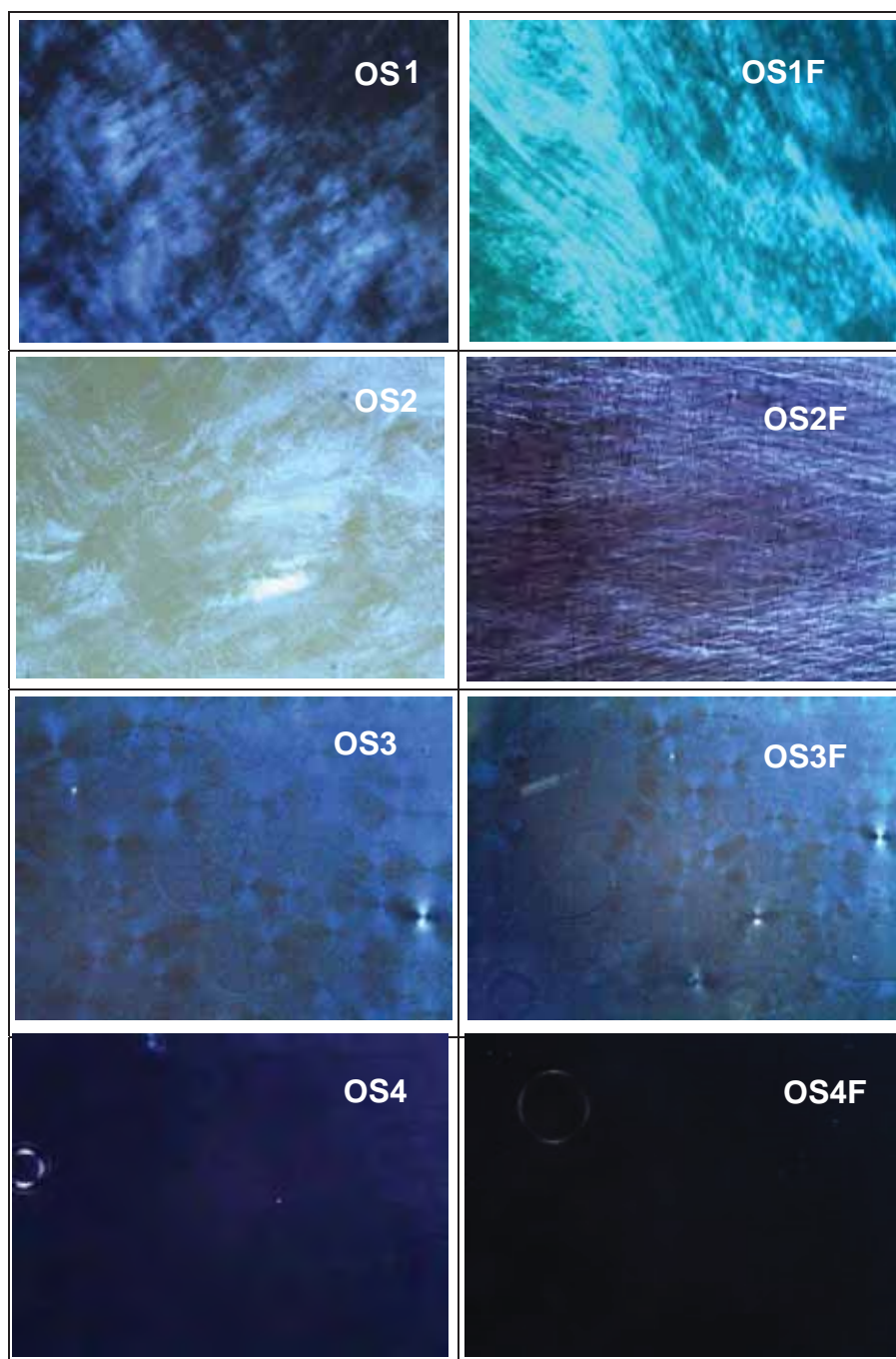
tópicos inadequados, expondo a pele a uma série de agentes agressores, em especial micro-organismos (LEORNADI et al., 2002). Esta capacidade tamponante também faz com que o estrato córneo seja capaz de tolerar variações de pH de 3 a 9.

Foi medido o pH tanto dos componentes (PROC, OC, OS, AO) como das formulações de interesse, com e sem fluconazol. A partir dos valores encontrados, observou-se que os componentes das formulações apresentam pH próximo ou dentro da faixa de pH da pele, numa faixa de 4,82 - 5,89. Para as formulações foi observado o mesmo, com pH variando de 4,15 a 5,21. A incorporação de fluconazol não variou o pH das formulações.

5.2.2.3 Microscopia de Luz Polarizada

As Figuras 33 a 35 apresentam as fotomicrografias correspondentes ao comportamento estrutural de fases das formulações contendo OS com ou sem fluconazol incorporado. Pode-se observar que nas fotomicrografias das amostras OS1, OS2 há a presença de estrias, típicas de fase hexagonal, enquanto para as amostras OS3 e OS4 observa-se, respectivamente, a presença de cruces de malta, típica de fase lamelar e campo escuro, característico de microemulsão. O mesmo comportamento foi observado para as amostras com fluconazol incorporado: OS1F, OS3F e OS4F, entretanto, para OS2F observa-se a presença de cruces de malta indicando que nesta formulação a fase lamelar é majoritária. Aparentemente a incorporação do fármaco não promoveu alterações significativas na estrutura do sistema para formulações contendo este tipo de fase oleosa, exceto para a OS2F. Os resultados a partir das fotomicrografias (Figura 33) revelam as modificações estruturais promovidas pela variação da proporção de fase oleosa e aquosa.

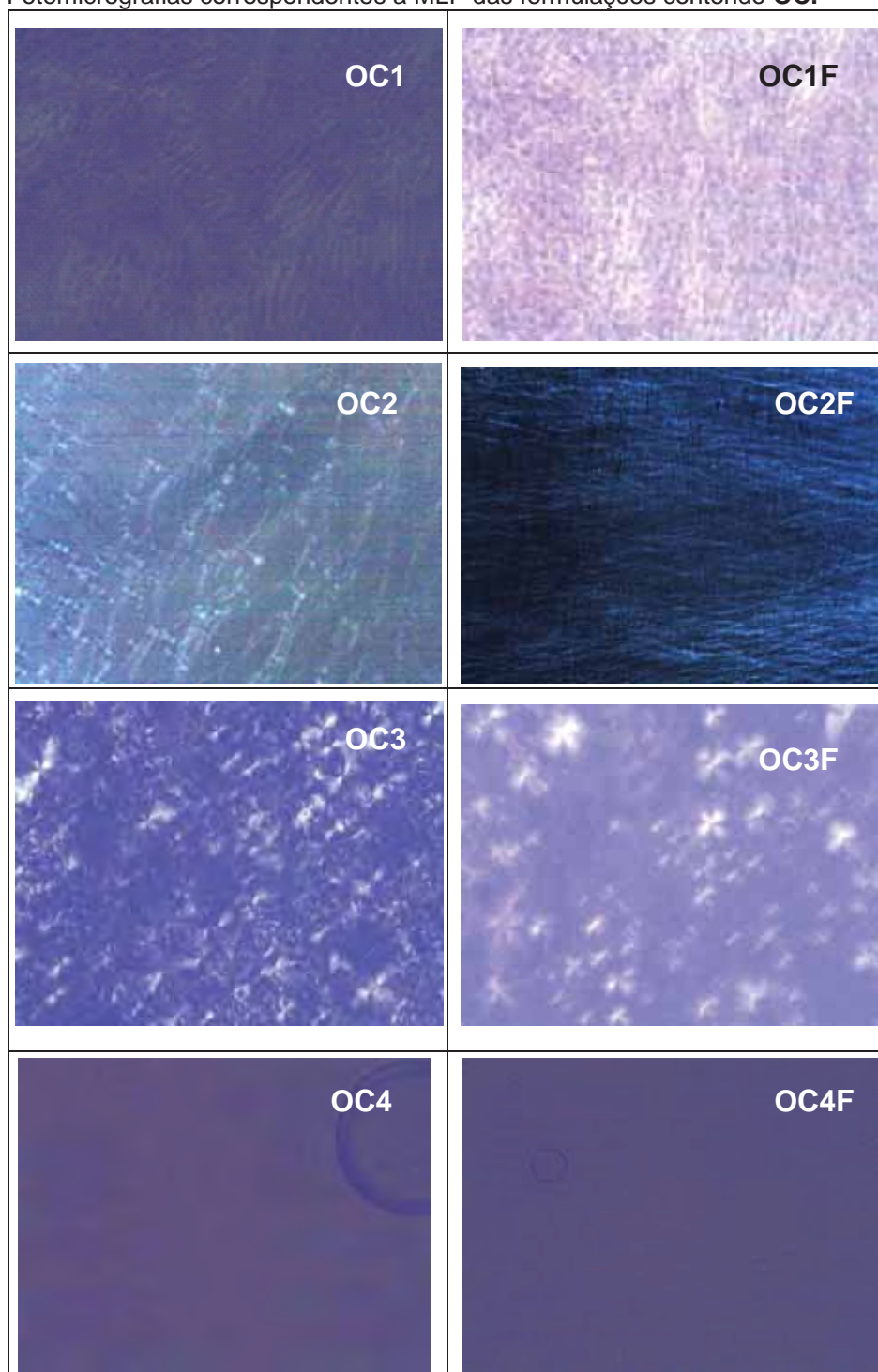
Figura 33. Fotomicrografias correspondentes a MLP das formulações contendo OS.



A Figura 34 apresenta as fotomicrografias correspondentes ao comportamento estrutural de fases das formulações contendo OC com e sem fluconazol incorporado. As amostras OC1, OC2, OC3 e OC4 apresentam, respectivamente, estrias (típico de fase hexagonal), cruces de malta (indicando a presença da fase lamelar), cruces de malta e campo escuro (característico de microemulsão). As mesmas fases foram observadas para as amostras com

fluconazol incorporado, indicando nenhuma modificação estrutural com a incorporação do fármaco.

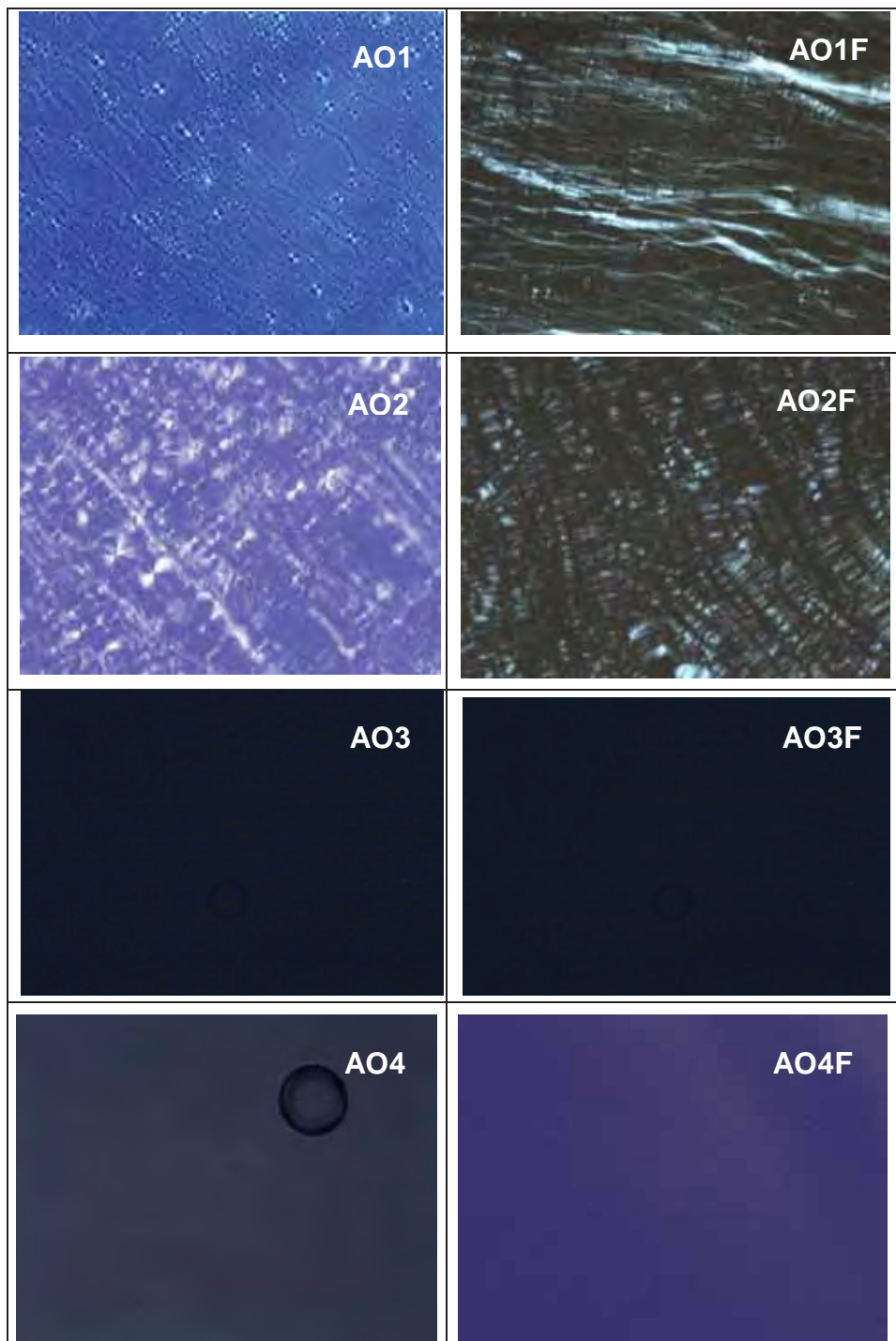
Figura 34. Fotomicrografias correspondentes a MLP das formulações contendo OC.



A Figura 35 apresenta as fotomicrografias correspondentes ao comportamento estrutural de fases das formulações contendo AO com e sem

fluconazol incorporado. As amostras AO1, AO2, AO3 e AO4 apresentam respectivamente, cruces de malta para as duas primeiras formulações e campo escuro para as duas últimas. Comportamento semelhante é observado para as formulações com fármaco.

Figura 35. Fotomicrografias correspondentes a MLP das formulações contendo AO.



Comparando-se as fotomicrografias das formulações com mesma proporção de componentes, observou-se que os sistemas contendo OC e OS apresentaram comportamento de fases semelhantes, e algumas mudanças quando comparadas com formulação contendo AO como fase oleosa.

As fotomicrografias das formulações OC1 e OS1 (Figuras 33 e 34) mostraram a presença de estrias, indicativo de CL de fase hexagonal, enquanto AO1 consiste de fase lamelar, conforme mostra a Figura 35.

As formulações AO2 e OC2 caracterizam-se como CL de fase lamelar (Figura 34 e 35), enquanto a formulação OS2 apresentou-se como CL constituído de fase hexagonal, uma vez que foi possível observar a presença de estrias.

As formulações OC3 e OS3 são CL de fase lamelar, entretanto observou-se pouca presença de cruces de malta na fotomicrografia de OC3, sugerindo a necessidade de outros testes para melhor caracterização do comportamento de fases. AO3 está numa região de transição e a fotomicrografia mostrou campo escuro, que associado a baixa viscosidade da formulação, o que indica ser ME.

A partir das observações, verificou-se que todas as formulações contendo 50% de fase oleosa, 40% de tensoativo e 10% de água (OC4, OS4 e AO4) constituem microemulsões, observando-se campos escuro nas fotomicrografias (Figuras 33 a 35).

A partir dos resultados obtidos por MLP, verifica-se que, quanto maior a quantidade de água e menor a de óleo, mais estruturados os sistemas tendem a ficar. Entretanto, dependendo do tipo de fase oleosa, é possível obter sistemas mais estruturados, como cristais líquidos, mesmo com concentrações de 40% de tensoativo e 20% de água, como observou-se para as formulações OC3 e OS3. Quanto às amostras com fármaco incorporado, apenas OS2 e OS2F obtiveram mudanças estruturais significativas, indicando que o fármaco preserva a estrutura inicial do sistema.

A Tabela 14 apresenta os resultados de MLP para as formulações sem e com fármaco (incorporação de 1% de fluconazol), respectivamente. A MLP é muito importante na determinação estrutural de ME e CL, entretanto não é considerada uma técnica conclusiva em casos que não há comportamento anisotrópico. Portanto,

a continuidade dos estudos de caracterização das formulações foi realizado com experimentos de SAXS.

Tabela 14. Composição (%) das formulações para caracterização física do sistema e resultados de MLP.

Componentes Formulações	Fase oleosa	Tensoativo	Fase aquosa	MLP
OC1	20	40	40	CL hexagonal
OC1F				CL hexagonal
OC2	30	40	30	CL lamelar
OC2F				CL lamelar
OC3	40	40	20	CL lamelar
OC3F				CL lamelar
OC4	50	40	10	ME
OC4F				ME
OS1	20	40	40	CL hexagonal
OS1F				CL hexagonal
OS2	30	40	30	CL hexagonal
OS2F				CL lamelar
OS3	40	40	20	CL lamelar
OS3F				CL lamelar
OS4	50	40	10	ME
OS4F				ME
AO1	20	40	40	CL lamelar
AO1F				CL lamelar
AO2	30	40	30	CL lamelar
AO2F				CL lamelar
AO3	40	40	20	ME
AO3F				ME
AO4	50	40	10	ME
AO4F				ME

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

Para confirmar os resultados obtidos na MLP, utilizou-se a técnica de SAXS que é mais sensível e fornece informações sobre a nanoestrutura de forma mais conclusiva. Os tensoativos podem formar diferentes tipos de agregados, os quais podem ser identificados de acordo com a posição dos picos no eixo do vetor de espalhamento q . O perfil de espalhamento de estruturas micelares, por exemplo, exibe apenas um máximo de intensidade num valor de $q \neq 0$, seguido de uma longa cauda (FANUN, 2008). Para determinar o tipo de estrutura de cada sistema verificou-se a posição dos picos (q_1, q_2, q_3 , etc...) e determinou-se a razão entre os diversos q em função do posição do primeiro pico (q_1). A partir dos valores obtidos foi possível determinar quais são as fases presentes (lamelar, hexagonal, etc.) (Tabela 15).

Tabela 15. Parâmetros para determinação estrutural dos sistemas.

d1/d2	d1/d3	Tipo de fase
2,0	-	Lamelar
2,0	3,0	Lamelar
1,73	-	Hexagonal
1,73	2,0	Hexagonal

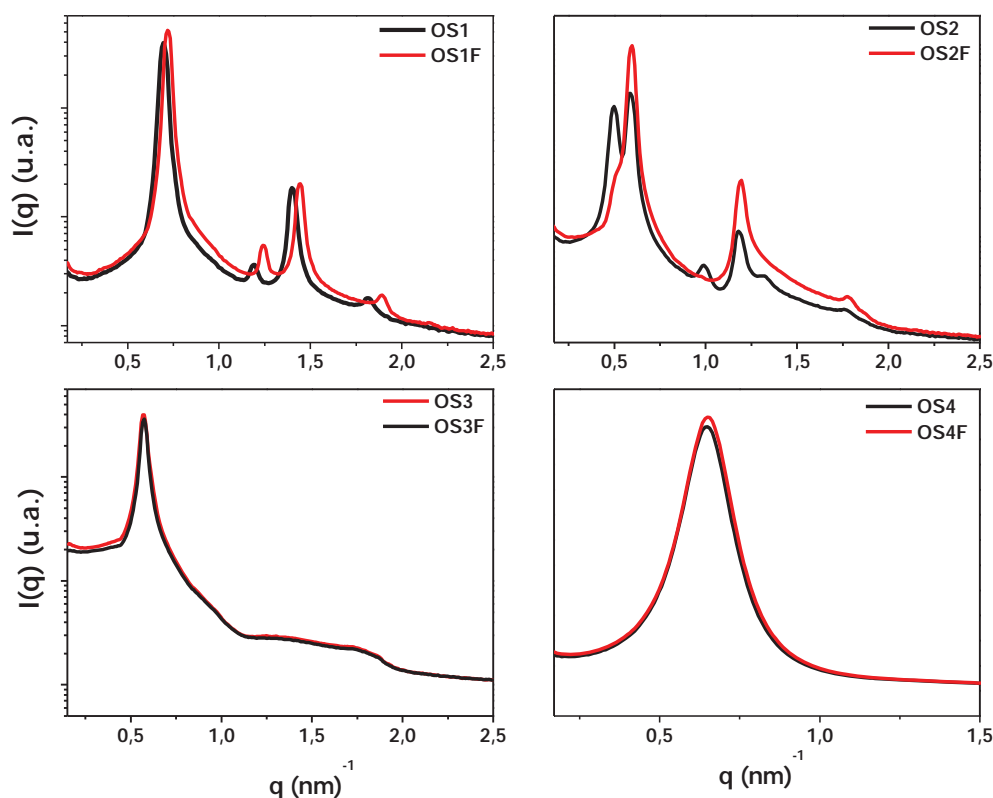
A Figura 36 apresenta a intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor espalhamento (q) para o sistema com OS como fase oleosa em várias composições. Os resultados de SAXS estão de acordo com a MLP o qual confirma a presença de fase hexagonal para OS1 (razões dos picos equivalentes a $1: \sqrt{3} : 2: \sqrt{3}$); para OS2 é uma composição que se encontra em transição de fase, por isso observa-se a mistura de fase hexagonal e lamelar (razão de 1:2:3). Para OS3, entretanto, observa-se por meio do perfil da curva de SAXS, um região a valores de q entre 0,1 e 0,2 Å. Para afirmar realmente que nesta composição a fase seria lamelar, seria necessário comprovar a existência de um pico definido cuja razão q_2/q_1 seria igual a 2, entretanto, este pico não foi observado, o que sugere que para OS3 ainda tem-se uma mistura de fases hexagonal e lamelar, sendo esta última a fase majoritária, visto que na microscopia observa-se cruces de malta. Para OS4, apesar do perfil da curva ser característico de uma microemulsão (confirmado por MLP), a presença de

um pequeno “ombro” para valores de q entre 0,1 e 0,2 Å e cuja razão entre este e o pico em q_1 ser próximo a de 2, os resultados sugerem que esta composição tem pequenas fases lamelares que não foram observadas em MLP.

Estes resultados mostram a sensibilidade na técnica comparada à microscopia. São informações importantes, uma vez que proporções escolhidas em regiões de transição de fase podem influenciar no perfil de liberação.

Para as amostras com o fármaco incorporado observa-se que, exceto para OS2F todas as outras apresentam praticamente sobreposição das curvas (OS3F, OS4F) sugerindo que a incorporação do fármaco não alterou a estrutura do sistema.

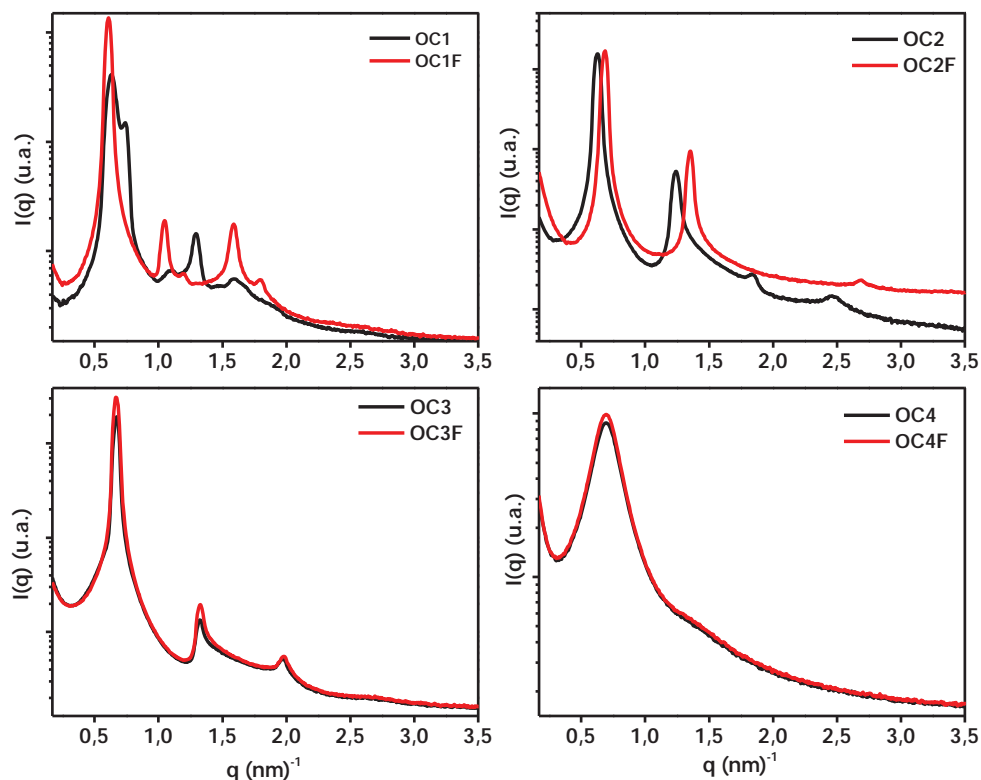
Figura 36. Espectros de SAXS de sistemas tensoativos contendo **OS**, com e sem fluconazol.



A Figura 37 apresenta a intensidade de espalhamento, $I(q)$ em função do vetor espalhamento (q) para o sistema com OC como fase oleosa em varias composições. Os resultados de SAXS corroboram com os de MLP, onde se observa as mudanças estruturais desde fase hexagonal (OC1), passando por lamelar (OC2, OC3) até microemulsão (OC4). Entretanto, o perfil da curva para a OC1 sugere uma mistura de fases que seria hexagonal e cúbica devido as razões de q obtidas além daquelas

características da fase hexagonal, contudo, mais estudos serão necessários para confirmar esta hipótese. Além disso, o perfil da curva de OC4 sugere a presença de uma pequena fase lamelar misturada com a fase micelar como observada nas amostras com OS. A adição de fármaco às formulações contendo OC como fase oleosa apresentaram características interessantes, por exemplo, para OC1F, observa-se a presença de uma fase hexagonal (confirmado por MLP) majoritária, ao contrário da mesma amostra sem o fármaco, além disso, para OC2F, os picos estão levemente deslocados para maiores valores de q e o que seria o q_3 (terceiro pico) não aparece.

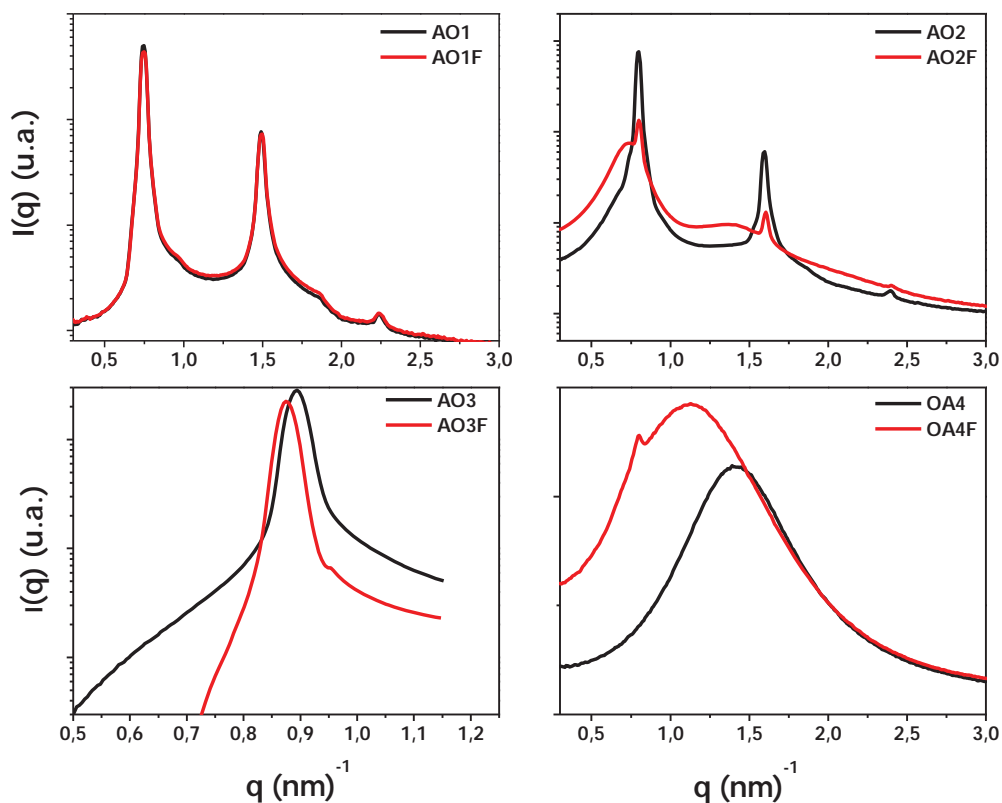
Figura 37. Espectros de SAXS de sistemas tensoativos contendo **OC**, com e sem fluconazol.



A Figura 38 apresenta a intensidade de espalhamento, $I(q)$ em função do vetor espalhamento (q) para o sistema com AO como fase oleosa em varias composições. Os resultados mais uma vez confirmam o que foi observado por MLP (fase lamelar para AO1 e AO2 e microemulsão para AO4 e AO3). A adição de fármaco, pelo perfil das curvas, parece ter uma leve influência na estrutura do sistema exceto para

AO1F. Nas outras composições observou-se diferentes perfis em relação às amostras sem o fluconazol.

Figura 38. Espectros de SAXS de sistemas tensoativos contendo **AO**, com e sem fluconazol.



A caracterização físico-química mostrou que, considerando-se uma proporção fixa de tensoativo, o aumento da proporção de água parece ser diretamente responsável pela formação de CL com estrutura lamelar ou hexagonal, e o aumento da fase oleosa parece justificar a diminuição da viscosidade dos sistemas e formação de microemulsões. Entretanto, em sistemas contendo 40% de fase oleosa observou-se diferença entre AO, OC e OS. Quando esta é o AO, formam-se ME e quando as formulações contem OC ou OS, formam-se CL em fase lamelar.

5.2.2.5 Comportamento Reológico

O estudo do comportamento reológico dos sistemas selecionados teve como objetivo avaliar características estruturais das formulações, determinando se a amostra tem comportamento Newtoniano ou não-Newtoniano, se o fluido é plástico,

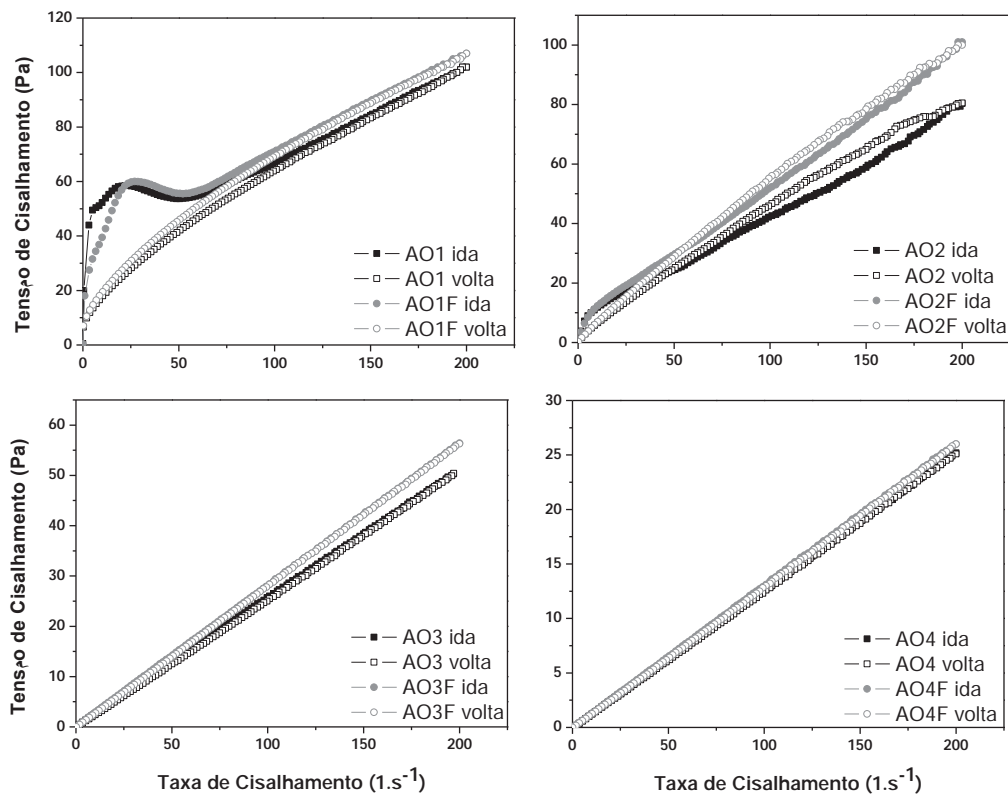
pseudoplástico ou dilatante, se apresenta tixotropia e se possui comportamento viscoelástico.

A Figura 39 apresenta reogramas em que a tensão de cisalhamento está em função da taxa de cisalhamento para as composições preparadas com AO como fase oleosa. Os reogramas mostram a diminuição da viscosidade em função da diminuição da porcentagem de fase aquosa e aumento da fase oleosa. Para as composições AO1 o perfil da curva é característico de um sistema pseudoplástico (as partículas escoam na direção do fluxo diminuindo a sua resistência interna e a viscosidade em função da taxa de cisalhamento) e pouco tixotrópico (grande habilidade de voltar a estrutura inicial após a perturbação do sistema) visto a pequena área de histerese entre a curva ascendente e descendente. A presença de um pico para valores de taxa de cisalhamento menores que 75 s^{-1} evidenciam o pronunciado grau de estruturação do sistema, que por ser lamelar, como observado por SAXS e MLP, é preciso romper as interações que mantem o sistema organizado para depois haver o escoamento (taxa de cisalhamento $> 75 \text{ s}^{-1}$).

Para AO2 há uma pronunciada diminuição da pseudoplasticidade e da tixotropia, indicando que, apesar da presença de fase lamelar, o sistema é formado por interações mais fracas e facilmente desestruturadas quando aplicado o cisalhamento. Para as amostras AO3 e AO4, observa-se o perfil de curvas newtonianas que é característico de partículas sem interação com as vizinhanças, ou seja, sem estruturação.

Os resultados de reologia confirmam os resultados de SAXS e de MLP aonde tem-se estruturas lamelares para AO1 e AO2 e consequentes reogramas com perfil de sistemas não newtonianos e estruturados. A tixotropia e pseudoplasticidade diminuem com o aumento da fase oleosa conforme pode-se observar. Na Figura 39, para AO3 e AO4, os reogramas obtidos são característicos de fluidos newtonianos o que são típicos de sistemas microemulsionados, confirmando os resultados obtidos por SAXS e MLP.

Figura 39. Reogramas de ensaios de fluxo de sistemas tensoativos contendo AO, com e sem fluconazol.

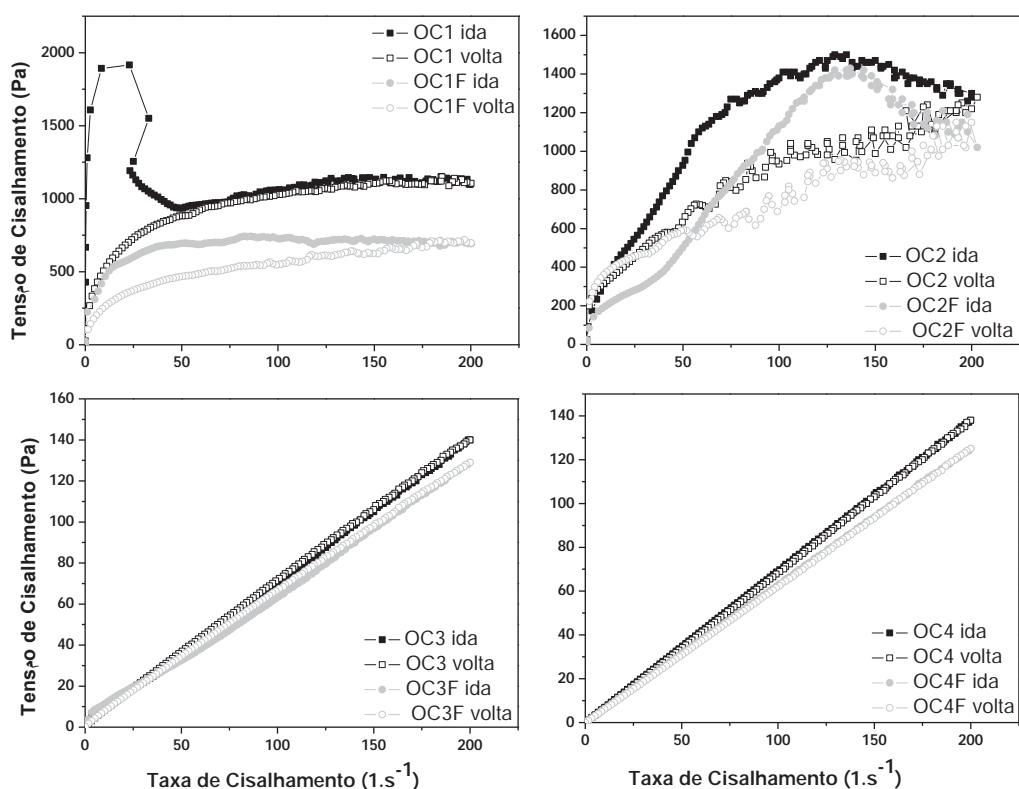


A Figura 40 apresenta reogramas nos quais a tensão de cisalhamento está em função da taxa de cisalhamento para as composições preparadas com OC como fase oleosa. A partir dos perfis dos reogramas, observa-se também uma diminuição da pseudoplasticidade até um perfil newtoniano com o aumento da porcentagem de fase oleosa (amostra OC4). Estes resultados indicam a variação estrutural com a composição que vai desde hexagonal (maior pseudoplasticidade) até a microemulsão.

Comparando o comportamento reológico entre as formulações preparadas com OC como fase oleosa daquelas preparadas com AO, pode-se observar que o primeiro promove uma organização um pouco maior do sistema, tendo em vista que é necessária uma maior tensão de cisalhamento para romper as interações e após isto o sistema escoar normalmente. A partir dos reogramas das amostras OC3 e OC4, observa-se que a adição do fármaco praticamente não altera a estrutura

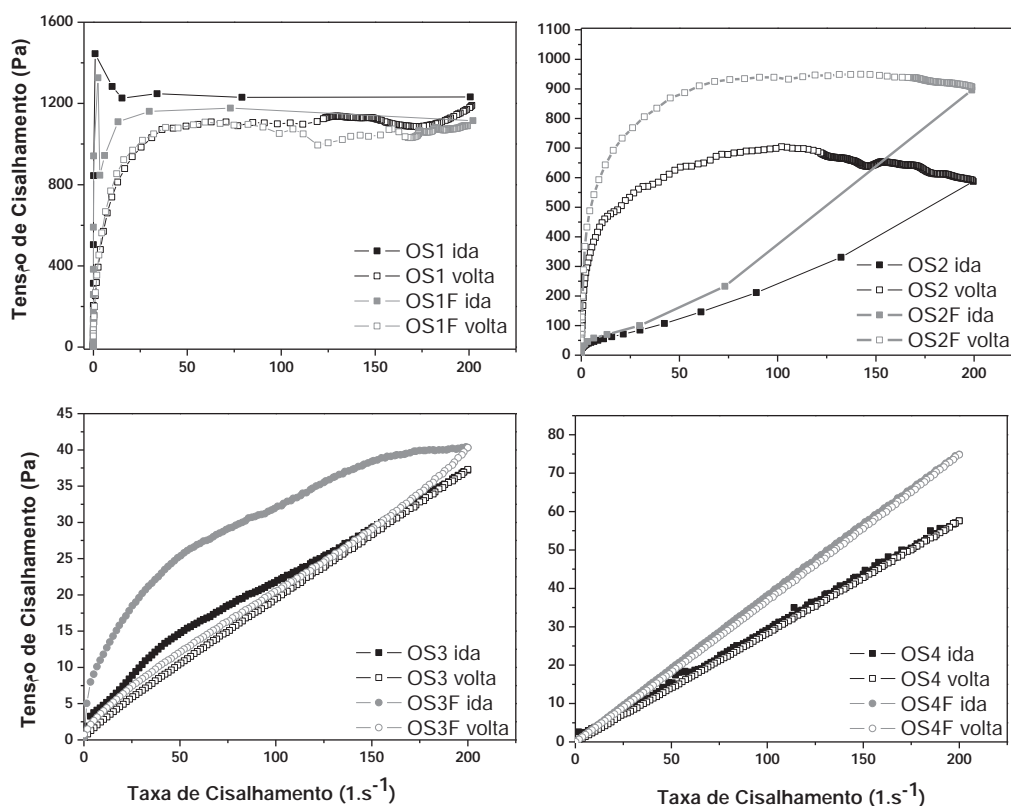
também no ponto de vista reológico o que corrobora com a sobreposição vista nos resultados de SAXS.

Figura 40. Reograma de ensaios de fluxo de sistemas tensoativos contendo OC, com e sem fluconazol.



A Figura 41 apresenta reogramas onde a tensão de cisalhamento está em função da taxa de cisalhamento para as composições preparadas com OS como fase oleosa. Observando os reogramas pode-se observar que este sistema possui maior pseudoplasticidade e maiores áreas de histerese do que as formulações contendo outras fases oleosas. Isto pode ser explicado pela fase hexagonal (sistema mais estruturado) existir em uma região mais ampla (OS1 e OS2). Conforme as modificações estruturais ocorrem com a diminuição da fase aquosa e aumento da fase oleosa, o grau de pseudoplasticidade diminui até alcançar a característica de um sistema micelar ou microemulsionado (newtoniano).

Figura 41. Reogramas de ensaio de fluxo de sistemas tensoativos contendo OS, com e sem fluconazol.



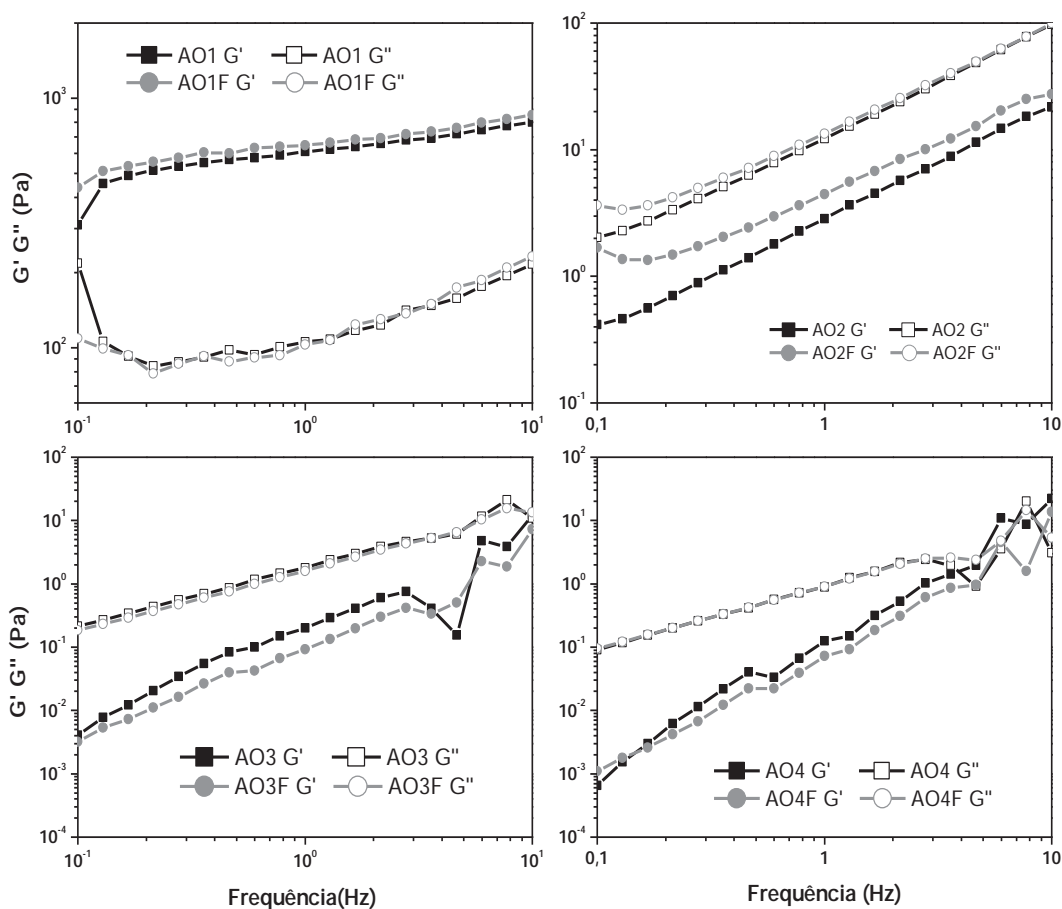
Os valores de G' e G'' são determinados através do ensaio de varredura de frequência, no qual é possível obter informações sobre a aparência das amostras e seu comportamento estrutural, auxiliando nos estudos de MLP e SAXS (SCHRAMM, 2006).

Testes preliminares ao estudo de comportamento viscoelástico, que são os de varredura de tensão oscilatória (não mostrado) que é preliminar aos estudos de comportamento viscoelástico, evidenciou que na faixa de tensão oscilatória entre 0 a 5 Pa não há deformação, ou seja, os valores do módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') mantiveram-se lineares nesta faixa, indicando que apresentam comportamento viscoelástico linear, podendo assim ser utilizados nos testes de varredura de frequência.

A Figura 42 mostra a evolução de G' e G'' em função da frequência aplicada para as formulações contendo AO. Observou-se que apenas para AO1 e AO1F, o

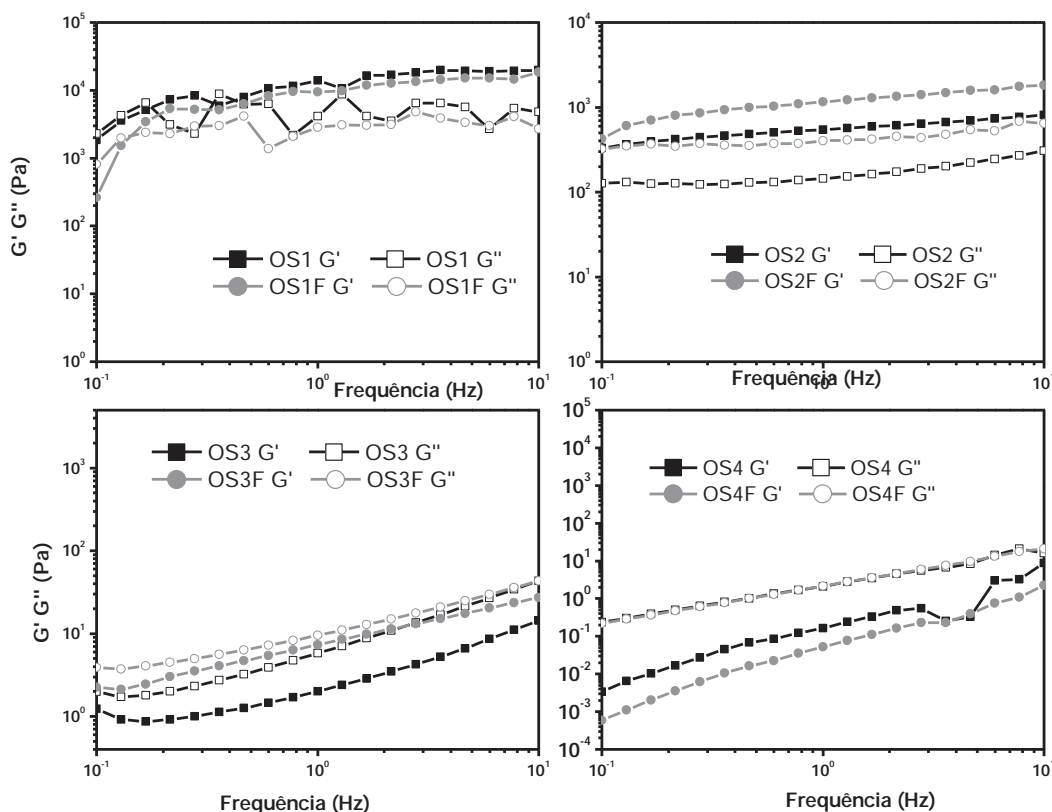
valor de G' foi maior que o de G'' . Estes resultados revelam que esta formulação apresenta maiores interações levando a formação de uma maior organização estrutural, o que corrobora com os resultados dos estudos de cisalhamento desta formulação, aonde observa-se que é necessário uma maior tensão de cisalhamento para romper estas interações e o fluxo ocorrer normalmente. É um comportamento característico de amostras viscoelásticas, com estrutura consideravelmente rígidas, como as formulações O/A. Foi possível observar também que os valores de G' para todas as formulações são próximos aos valores de G' encontrados para as formulações contendo fármaco. Isso mostra que a adição de fármaco não alterou a elasticidade das formulações, não alterando assim significativamente a estrutura do sistema.

Figura 42. Reogramas de varredura de frequência de sistemas tensoativos contendo **AO**, com e sem fluconazol. G' – módulo de armazenagem; G'' – módulo de perda.



A Figura 43 mostra a evolução de G' e G'' em função da frequência aplicada para as formulações contendo OS. Pode-se observar que OS1 e OS2 apresentam os módulos G' e G'' praticamente independentes da frequência, o que indica que estas formulações apresentam uma rede estrutural consolidada, característica de sistemas bem organizados como os que apresentam fase hexagonal. Estes resultados foram confirmados por SAXS e MLP. Comparando-se todas as formulações, observou-se que, independente da incorporação do fármaco, OS1 e OS2 apresentaram $G' > G''$. Verificou-se ainda que OS1 possui G' maior que o apresentado por OS1F, sugerindo que quando o fármaco está presente, a formulação perde sua estrutura mais rapidamente no momento do teste. Já a formulação OS2F mostrou G' maior que o G' de OS2, ou seja, o fármaco contribuiu para aumentar a elasticidade da formulação, estruturando-a mais.

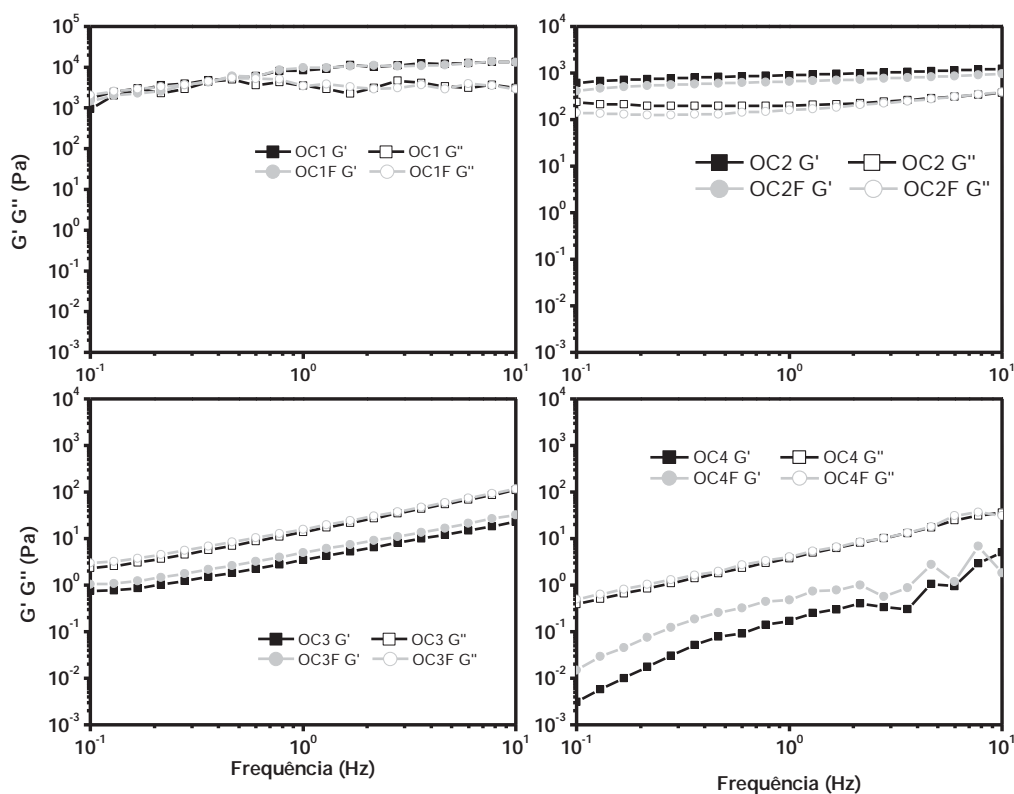
Figura 43. Reogramas de varredura de frequência de sistemas tensoativos contendo OS, com e sem fluconazol. G' – módulo de armazenagem; G'' – módulo de perda.



A Figura 44 mostra a evolução de G' e G'' em função da frequência aplicada para as formulações contendo OC. As formulações OC1 e OC2, com e sem fluconazol, apresentaram valores de $G' > G''$, ou seja, apresentam estrutura mais organizada que OC3 e OC4, as quais mostraram valores de $G'' > G'$, além disso, OC1 e OC2 apresentam valores dos módulos independentes da frequência, confirmando ainda mais a organização destes sistemas.

Comparando-se as figuras 42, 43 e 44, verificou-se que, na mesma proporção de tensoativo, o aumento da fase oleosa diminui a elasticidade das formulações, ou seja, elas têm estrutura menos organizada que sistemas contendo maior quantidade de água. que confirma o comportamento estrutural dos sistemas. Observou-se que as microemulsões (AO3, AO4, OS4 e OC4) apresentaram valores de G' menor que G'' e para os cristais líquidos de fase hexagonal (AO1, OC1 e OS1), onde os valores de G' foram maiores. A incorporação do fármaco, de um modo geral, não desestabilizou a estrutura das formulações.

Figura 44. Reogramas de varredura de frequência de sistemas tensoativos contendo **OC, com e sem fluconazol**. G' – módulo de armazenagem; G'' – módulo de perda.



5.3 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE FLUCONAZOL NAS FORMULAÇÕES

Os resultados referente à validação de metodologia analítica para quantificação do fluconazol por CLAE estão apresentados no **Apêndice**.

As formulações selecionadas para o ensaio de quantificação do fluconazol foram as mesmas escolhidas para caracterização (Tabela 9).

O ensaio prévio de incorporação do fluconazol foi realizado com a finalidade de prever a quantidade de fármaco possível de dispersar nas formulações e componentes. As Tabelas 16 a 18 mostram estes resultados, expressos pela porcentagem de fármaco que solubilizou em 2g de formulação ou componente e concentração em mg.g^{-1} . Esta metodologia foi utilizada devido à viscosidade média-alta da maioria das formulações.

Neste ensaio preliminar, foi possível verificar a influência da concentração dos diferentes componentes nos sistemas, da solubilidade do fármaco nestes componentes e da estrutura destes sistemas na incorporação do fluconazol nos mesmos.

É importante conhecer a solubilidade do fármaco em cada componente, pois as partículas do fármaco inicialmente precisam ser solubilizadas para que então possam sofrer difusão e partição para a interface veículo/estrato córneo, no caso da administração cutânea. Com o fluconazol, essa partição entre os componentes e difusão para a interface irá ocorrer com maior facilidade, pois ele apresentou solubilidade em todos os componentes do sistema.

Conforme mostra a Tabela 16, verificou-se que o fluconazol apresentou solubilidade no tensoativo álcool cetílico etoxilado e propoxilado (PROC) maior do que a quantidade usualmente incorporada em preparações para administração cutânea que é de 10 mg.g^{-1} (1%). Observando-se a solubilidade nas fases oleosas, verificou-se que o fluconazol mostrou ser mais solúvel no AO, provavelmente devido a interações das cadeias apolares deste com as do fármaco, de caráter lipofílico. Apesar do caráter apolar dos óleos de copaíba, há também a presença de substâncias polares que podem gerar mais interações e dificultar a solubilização do fluconazol.

Tabela 16. Solubilidade do fluconazol nos componentes empregado nas formulações mediante ensaio prévio.

Amostra	Fluconazol solubilizado (%)	Concentração (mg.g⁻¹)
Água	0,4	4
PROC	1,5	15
AO	3,6	36
OC	0,2	2
OS	0,2	2

A partir dos valores obtidos para a solubilidade do fluconazol nas formulações (Tabela 17), observa-se que, para as 3 fases oleosas utilizadas, as formulações conseguiram solubilizar uma quantidade de fármaco de 2 a aproximadamente 3 vezes maior que a concentração usual em formulações tópicas, que é de 10 mg.g⁻¹ (1%). Dentre as formulações selecionadas, AO3 e AO4, caracterizada como ME, com 40% e 50% de ácido oléico como fase oleosa, respectivamente, conseguiram incorporar a maior quantidade de fármaco, devido, principalmente à grande quantidade de fase oleosa, já que as formulações AO1 e AO2, que continham a mesma quantidade de tensoativo, no entanto, com menos fase oleosa, não conseguiram incorporar a mesma quantidade de fármaco. Além disso, comparando-se as fases oleosas, o ácido oléico foi o componente das formulações que mais incorporou fluconazol, como foi mostrado anteriormente, por isso, apesar da mesma concentração de tensoativo, o aumento da concentração de fase oleosa refletiu em um aumento da capacidade de incorporação do fármaco nas formulações. Este fato pode estar relacionado a característica lipofílica do fluconazol.

As formulações contendo óleo de copaíba, OC ou OS, incorporaram menos fluconazol que aquelas contendo AO, o que sugere menos solubilidade do fármaco em óleos de copaíba. Isso pode ser devido a composição complexa destes óleos, contendo diversos componentes apolares, e outros com cadeias polares que dificultam a solubilidade de fármacos lipofílicos como o fluconazol.

Tabela 17. Solubilidade do fluconazol nas formulações mediante ensaio prévio.

Amostra	Fluconazol solubilizado (%)	Teor (mg.g⁻¹)
AO1	2,2	22
AO2	2,4	26
AO3	3	30
AO4	2,6	26
OC1	1,4	14
OC2	1,4	14
OC3	1,8	18
OC4	1,8	18
OS1	1,2	12
OS2	1,2	12
OS3	1,2	12
OS4	1,2	12

Após o ensaio prévio, preparou-se diluição em fase móvel das formulações com fármaco de modo que a massa pesada fosse correspondente à concentração teórica de fármaco de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e quantificou-se. As análises foram realizadas em triplicada e os resultados expressos pelo teor de fluconazol na formulação, em mg.g^{-1} , conforme mostra a Tabela 19. A concentração calculada foi obtida a partir das áreas dos picos e através da equação da curva analítica obtida no ensaio de linearidade $y = 0,0005x + 0,0012$.

Comparando-se as Tabelas 16 e 17, verificou-se que o teor de fluconazol nas formulações após quantificação por CLAE, teve um perfil semelhante ao observado no ensaio prévio de solubilidade. Os teores apresentados na Tabela 18 são mais precisos, uma vez que a técnica usada é mais sensível, mostrando que algumas formulações, como AO3, OS1 e OS4 incorporaram menos fluconazol que o

observado no ensaio prévio, enquanto AO1, OC3 e OC4 incorporaram mais fármaco. Entretanto, a realização do ensaio prévio foi importante para se prever a solubilidade do fluconazol nas formulações e assim propor a metodologia analítica descrita.

Tabela 18. Resultados obtidos para o ensaio de quantificação do fluconazol nas formulações.

Amostra	Massa pesada (g)	Área*	CC fluco ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)¹*	DP	CV (%)	Teor (mg/g)*
AO1	0,0656	0,08134	160,28	1,58	0,99	24,43
AO2	0,0577	0,0772	152,00	1,53	1,00	26,34
AO3	0,0500	0,07565	148,90	2,50	1,68	29,78
AO4	0,0576	0,07690	151,40	2,10	2,08	26,28
OC1	0,1074	0,07902	155,64	0,70	0,45	14,49
OC2	0,1073	0,07849	154,58	2,65	2,57	14,41
OC3	0,0836	0,07956	156,72	1,72	1,10	18,75
OC4	0,0838	0,08036	158,32	1,89	1,19	18,89
OS1	0,1250	0,07561	148,82	1,96	1,32	11,90
OS2	0,1254	0,07901	155,62	2,81	1,80	12,41
OS3	0,1251	0,07637	150,34	2,19	1,45	12,02
OS4	0,1250	0,07307	143,74	0,80	0,56	11,50

*Média de três valores em função de CC. CC – concentração calculada; DP – desvio padrão; CV- coeficiente de variação.

5.4 TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA

5.4.1 Toxicidade Dérmica com componentes e formulações

Nesta primeira etapa da avaliação de toxicidade dérmica, foi realizado o teste limite com os componentes das formulações, controles negativo e positivo que consistiu em administrar em ratos uma dose máxima ou de pelo menos 2000 mg/Kg de peso das amostras e verificar a evolução durante 14 dias.

As Tabelas 19 a 24 mostram a evolução dos escores (Tabela 3) de toxicidade dérmica para as amostras submetidas ao teste limite.

Tabela 19. Escores de toxicidade em ratos após administração de **Prop** 2000 mg/Kg (controle negativo).

Animais	Dias													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 20. Escores de toxicidade em ratos após administração de **CB 15%** (1700 mg/Kg) (controle positivo)

Animal/dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	1	1	2	3	3	4	4	5	-	-	-	-	-	-
2	1	1	1	1	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
soma	+2	2	3	4	5	6	6	7	-	-	-	-	-	-

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

Tabela 21. Escores de toxicidade em ratos após administração de **PROC** 2000 mg/Kg.

Animais	Dias													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 22. Escores de toxicidade em ratos após administração de **OC** 2000 mg/Kg.

Animais/dias	Dias													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
2	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
3	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
4	0	1	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
5	0	1	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
Soma	0	+ 5	+ 5	+ 7	+ 10	+ 10	+ 10	+ 10	+ 10	+ 6	+ 6	0	0	0

*Dados significativamente diferentes em relação ao escore 0 ($p < 0,05$)

Tabela 23. Escores de toxicidade em ratos após administração de **OS** 2000 mg/Kg.

Animais	Dias													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma	0	+ 3	+ 3	+ 3	+ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Dados significativamente diferentes em relação ao escore 0 ($p < 0,05$)

Tabela 24. Escores de toxicidade em ratos após administração de **AO** 2000 mg/Kg.

Animais	Dias													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
4	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma	0	+4	+4	+4	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0

*Dados significativamente diferentes em relação ao escore 0 ($p < 0,05$)

As Figuras 45 a 49 mostram as fotografias representativas e detalhe dos escores de acordo com as observações realizadas durante o experimento.

Figura 45. Fotografia representativa do escore **0** do ensaio de TDA: normal; animal com pele intacta, presença de pequenas manchas características da pele; constituição do epitélio sem alterações. **45A** - Antes e **45B** - após a administração da substância (dia 1).

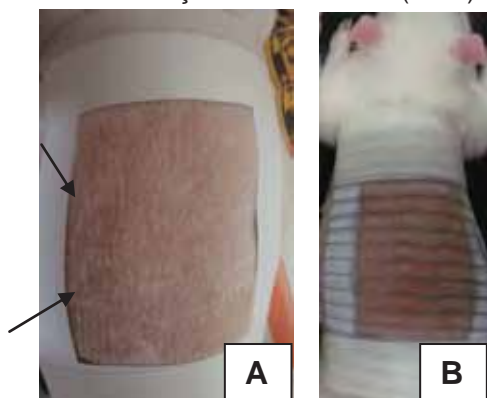


Figura 46. Fotografia representativa do escore 1 do ensaio de TDA: Coceira, pele áspera e mais escurecida que as outras regiões, manchas podem estar mais visíveis, com coloração marrom, pêlos da região como em camadas, podendo ocorrer vermelhidão. No controle positivo (CB), ocorre vermelhidão ao invés de região com coloração marrom e piloereção. **46A** - Escore 1 para OC; **46B** - Escore 1 para OS; **46C** - Escore 1 para AO; **46D** - Escore 1 para CB.

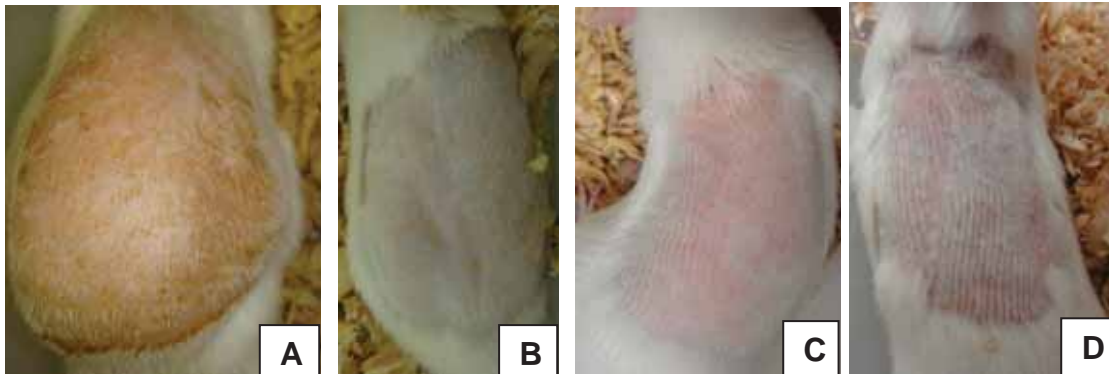


Figura 47. Fotografia representativa do escore 2 do ensaio de TDA: pequenas feridas formando escaras leves. **47A e 47B** - Escore 2 para OC; **47C** - Escore 2 para CB.

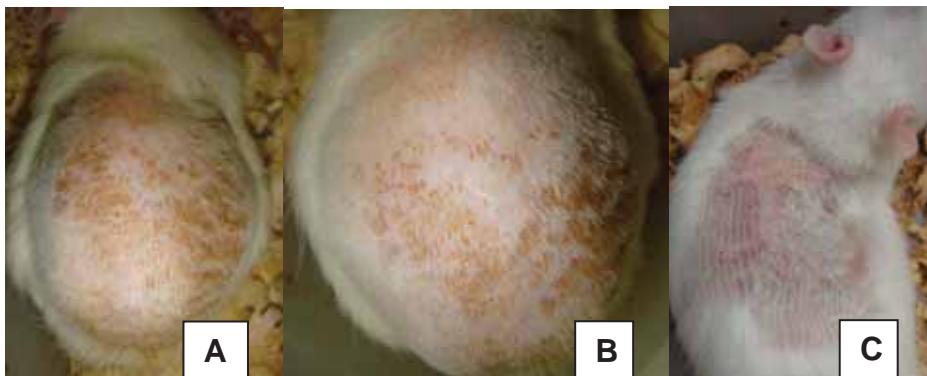


Figura 48. Fotografia representativa do escore 3 do ensaio de TDA: escaras moderadas, feridas com crostas maiores e escurecidas. **Escore 3 para CB.**

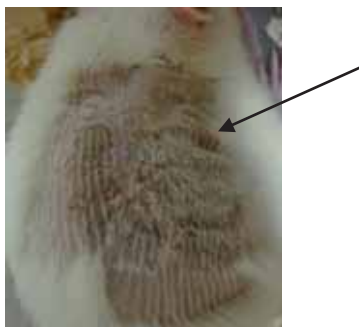


Figura 49. Fotografia representativa do escore 4 do ensaio de TDA: escaras graves, com desprendimento de crosta e ferida exposta **Escore 4 para CB.**



De acordo com os resultados, observou-se que o PROC, tensoativo usado nos sistemas, não apresentou sinais de toxicidade dérmica aguda, conforme observou-se para o controle negativo. Entretanto, nos animais nos quais foi administrado PROC, a região testada permaneceu levemente oleosa e de aspecto amarelado até o segundo dia do experimento, enquanto nos animais do grupo controle negativo nenhuma alteração foi observada, possivelmente devido ao material formar filme na pele e não devido a toxicidade do mesmo. Essa alteração ocorreu provavelmente devido a uma grande quantidade de PROC em relação a área aplicada. Portanto, sugere-se que este tensoativo pode ser usado no desenvolvimento dos sistemas de liberação de fármacos, como microemulsões e cristais líquidos.

O controle positivo CB foi usado com o objetivo de se verificar claramente, através do escore, os sinais mais comuns de toxicidade dérmica, como irritação e escaras leves a graves, podendo levar a morte. Os ratos submetidos a administração de CB foram eutanasiados no nono dia, devido as escaras graves e observação de sofrimento por parte do animal. Vale ressaltar que estas observações não foram verificadas para nenhum dos componentes das formulações.

As três fases oleosas (OC, OS e AO) utilizadas nos sistemas apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo (escore 0), entretanto todos os animais aos quais se administrou essas substâncias, não apresentaram sinais de toxicidade irreversíveis. Observou-se que quando OC, OS e AO foram administrados, os sinais desapareceram, respectivamente, nos dias 12, 6 e 9. Estes

efeitos mostram que estas substâncias, na concentração utilizada, são capazes de provocar alterações cutâneas temporárias.

Assim, fez-se necessário a realização de testes de avaliação de toxicidade dérmica aguda para esses componentes, usando concentrações menores, como segue.

Na segunda etapa, foram realizados testes de TDA com AO, OS e OC, primeiramente na dose de 600mg/Kg. Verificou-se que para os animais testados com AO, não houve aparecimento de sinais de TDA, entretanto nos animais nos quais se administrou OC observou-se escore 1, semelhante ao observado na Figura 45B, sinal referente ao escore reversível no terceiro dia de tratamento. Isto justificou a realização de teste de TDA com OC na dose de 500 mg/kg, no qual não se observou mais nenhum sinal de toxicidade dérmica.

Estabelecido assim, um limite de TDA para os componentes das formulações, foram realizados testes de toxicidade dérmica com dose repetida (TDDR), durante 21 dias com as formulações AO3, OS3, OC 3.

5.4.2 Avaliação histológica

5.4.2.1 Análise histométrica

Os resultados da espessura da epiderme e derme para os grupos experimentais, conforme os tratamentos estão presentes na Tabela 25 e Figura 50.

De acordo com o teste limite, após realização de análise estatística (Kruskal-Wallis), os dados obtidos sugerem que as amostras AO, OC e PROC provocaram aumento da espessura da epiderme e derme significativamente maior que o controle, sugerindo que estas amostras podem aumentar a hidratação cutânea, o que seria evidenciado por aumento de espaços intersticiais (Figuras 50 e 51). OS apresentou valor maior que o controle, entretanto não foi estatisticamente diferente. Apesar de OS não ter provocado um aumento na espessura da epiderme, acredita-se que esta fase oleosa não diminuiu a hidratação normal da pele. Além disso, OS bem como as outras amostras promoveram aumento da espessura da

derme, sugerindo que amostras promoveram oclusão na pele, evitando evaporação de água, o que é indicativo de hidratação cutânea.

Tabela 25. Espessura da epiderme e derme (média \pm DP) para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	Espessura (μm)	
Teste Limite	Epiderme	Derme
PROC	32,92 \pm 1,66	1136,76 \pm 37,20
AO	35,56 \pm 5,79	1097,83 \pm 47,64
OC	40,01 \pm 2,98	1234,48 \pm 33,55
OS	26,53 \pm 2,27	1199,92 \pm 59,48
Controle positivo	37,58 \pm 3,00	1269,11 \pm 53,04
Controle negativo	23,95 \pm 1,62	672,95 \pm 51,48
Teste Porcentagem	Epiderme	Derme
PROC60%	25,90 \pm 1,95	1215,39 \pm 38,20
AO60%	33,44 \pm 2,61	952,86 \pm 62,88
OC60%	26,81 \pm 1,89	1280,33 \pm 37,38
OC50%	25,19 \pm 2,17	1015,82 \pm 38,34
OS60%	48,89 \pm 4,34	1255,41 \pm 30,15
Controle negativo	23,95 \pm 1,62	672,95 \pm 51,48
Teste Dose Repetida	Epiderme	Derme
AO3F	30,24 \pm 3,63	1014,82 \pm 66,79
OC3F	33,88 \pm 6,66	1027,76 \pm 65,18
OS3F	35,7 \pm 2,97	1101,35 \pm 37,83
Controle negativo	23,95 \pm 1,92	672,95 \pm 51,48

Segundo LIBARDI (1999), o que faz a pele permanecer saudável, macia, com flexibilidade e elasticidade é a manutenção da hidratação cutânea e a capacidade que o organismo tem, não só de promover a renovação celular, mas também de sintetizar as substâncias que compõem a epiderme. Para um bom funcionamento do mecanismo de hidratação da pele, a camada córnea deve ser capaz de reter água, de modo que a taxa de evaporação da água sempre se mantenha num nível normal. PROKSCH e colaboradores (2005), por sua vez, afirmam que a hidratação cutânea está intrinsecamente relacionada com a integridade da camada córnea.

As amostras do teste de porcentagem apresentaram comportamento semelhante aos do teste limite, sugerindo-se que a diluição das mesmas no controle negativo Prop não altera a hidratação da pele (Tabela 25).

As propriedades de oclusão e hidratação dos componentes foram observadas para as formulações OC3F, OS3F e AO3F, sendo as duas primeiras CL de fase lamelar e AO3F uma microemulsão. Observou-se aumento significativamente maior da espessura da epiderme e derme quando comparadas ao controle, possivelmente devido a efeito de hidratação, que aumentou os espaços intersticiais. Tal efeito já tem sido relatado na literatura para sistemas líquido-cristalinos (CHORILLI, 2007).

A atividade oclusiva conferida pelos cristais líquidos também foi citada em outros trabalhos, como os de BRINON e colaboradores (1998) e SANTOS e colaboradores (2005). Os autores sugerem que esta ação está relacionada à característica coloidal do sistema emulsionado, o qual possui organização no estado líquido-cristalino semelhante ao das bicamadas lipídicas que unem os queratinócitos, aumentando a coesão e, conseqüentemente, a capacidade de formação de filme (ROUX et al., 1994; KLEIN, 2002).

Figura 50. Fotomicrografia evidenciando epiderme de ratos após os tratamentos: (A)- controle negativo; (B) – AO; (C) – PROC; (D) – OS (E) – OC. Aumento 10x.

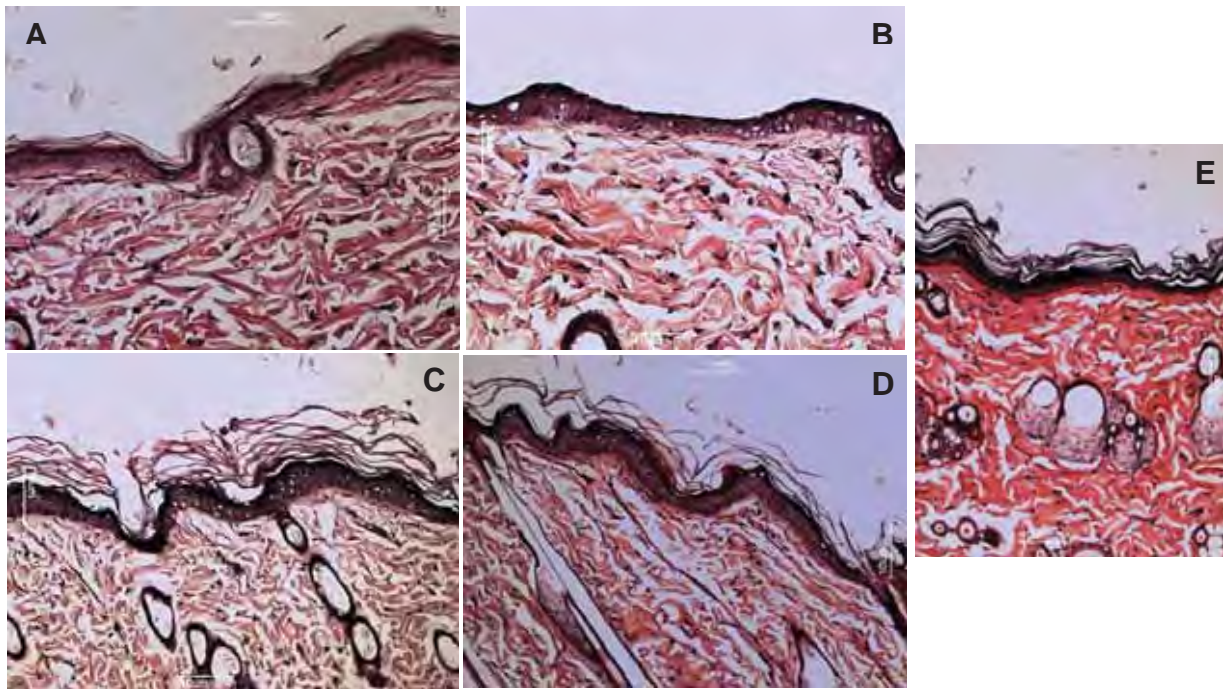
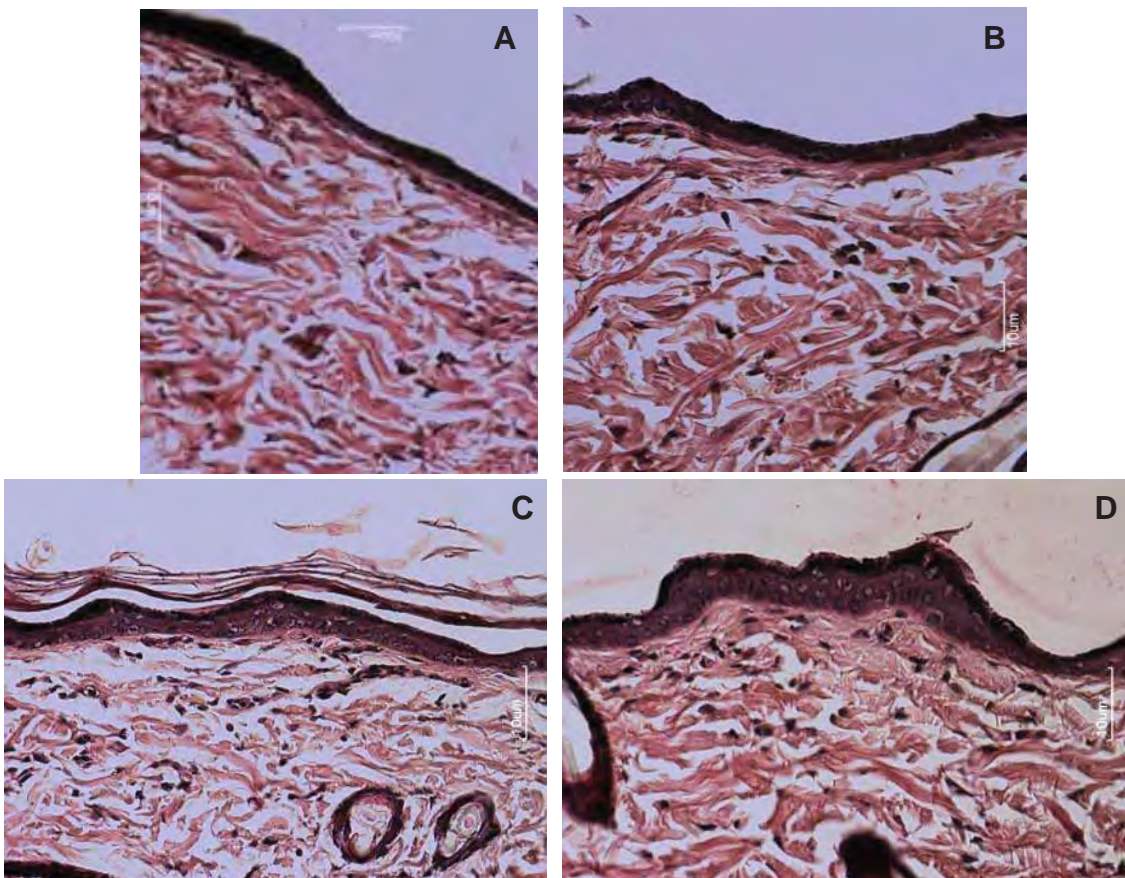


Figura 51. Fotomicrografia evidenciando epiderme de ratos após os tratamentos: A- controle negativo; (B) – AO3F; C – OS3F; D – OC3F. Aumento 10x.



5.4.2.2 Análise histopatológica

A evidência e interpretação de irritação no tecido cutâneo podem ser realizadas por meio de avaliação histopatológica e histométrica, uma vez que estas permitem a análise do tecido epitelial, da derme e também das características celulares. Além disso, pode auxiliar o delineamento experimental para a realização de estudos de eficácia de fármacos na derme e no desenvolvimento de novos produtos cosméticos (MAIA CAMPOS et al., 1990; TADINI, 2005).

A análise histopatológica consiste na observação visual de biópsias ao microscópio óptico que permite a avaliação qualitativa das diversas estruturas presentes no tecido cutâneo. A histopatologia, por ser uma análise qualitativa, deve ser complementada pela histometria, determinando a espessura da epiderme e da derme, como também quantificando os diversos tipos celulares, principalmente na derme (SILVA; MAIA CAMPOS, 2000).

Um processo irritativo irá liberar mediadores inflamatórios, mobilizando uma série de células, principalmente neutrófilos e linfócitos, com finalidade de combater o agente agressor ou levar os processos imunitários imunológicos que facilitariam este combate (ANDREWS, 1995).

Os mediadores inflamatórios funcionam como quimiotáticos e como fatores de crescimento para as células inflamatórias, sendo representados pelos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, os quais, por sua vez, podem liberar fatores de crescimento para células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. A liberação destes fatores pode levar, inclusive, à formação de tecido de granulação (FAZIO et al., 2001).

Uma vez que fibroblastos e leucócitos podem estar presentes em maiores quantidades numa pele irritada, podem ser usados para prever irritação cutânea. Os resultados do número de fibroblastos e leucócitos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar estão presentes na Tabela 26 e Figura 52. Trata-se do número de fibroblastos e leucócitos contados em uma área de 30000 μm^2 .

Figura 52. Fotomicrografia evidenciando a derme papilar de ratos após os tratamentos: (A)- controle negativo; (B)- AO3F; (C) – OC3F; (D) – OS3F.

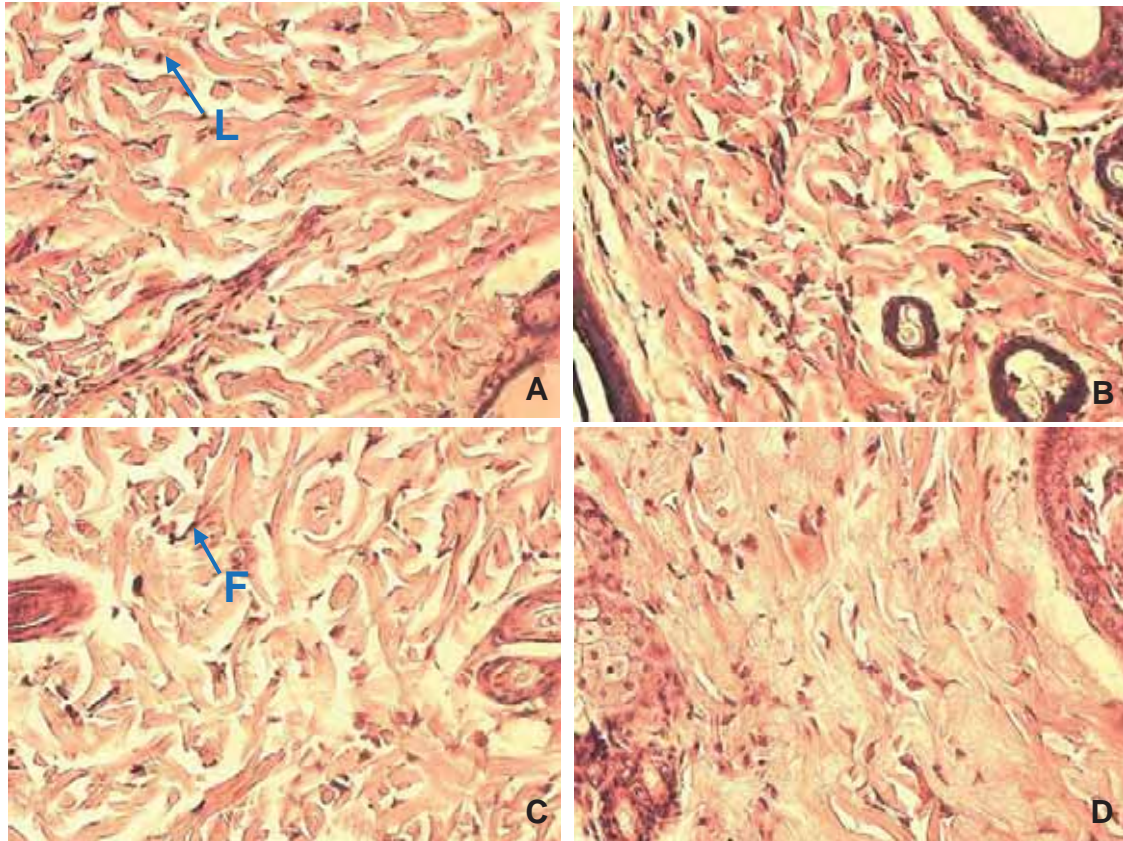


Tabela 26. Contagem de leucócitos e fibroblastos (média \pm DP) para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	Contagem	
Teste Limite	Leucócitos	Fibroblastos
PROC	2,6 \pm 1,65	12,47 \pm 2,30
AO	1,87 \pm 1,53	12,27 \pm 2,30
OC	3,7 \pm 2,18	11,77 \pm 1,70
OS	2,9 \pm 1,67	10,17 \pm 1,82
Controle positivo	6,1 \pm 3,00	7,83 \pm 1,68
Controle negativo	0,67 \pm 0,88	9,10 \pm 1,65
Teste Porcentagem	Leucócitos	Fibroblastos
PROC60%	3,77 \pm 1,57	11,93 \pm 1,72
AO60%	7,03 \pm 1,65	11,47 \pm 1,83
OC60%	0,50 \pm 0,86	6,13 \pm 1,04
OC50%	2,17 \pm 0,95	5,20 \pm 1,19
OS60%	1,47 \pm 1,01	6,47 \pm 1,61
Controle negativo	0,67 \pm 0,88	7,83 \pm 1,68
Teste Dose Repetida	Leucócitos	Fibroblastos
AO3F	0,27 \pm 0,52	12,67 \pm 2,59
OC3F	0,27 \pm 0,58	12,13 \pm 2,36
OS3F	0,17 \pm 0,46	16,27 \pm 2,86
Controle	0,67 \pm 0,88	7,83 \pm 1,68

Observou-se que as amostras avaliadas no Teste limite e no Teste Porcentagem apresentaram contagem de leucócitos e fibroblastos significativamente maior que o controle. Apenas OC50% apresentou menor contagem de leucócitos e OC50%, OS60% e OC60% apresentaram menor contagem de fibroblastos.

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

Desta forma, os resultados mais interessantes para o nosso grupo são aqueles obtidos no teste dose repetida, realizado durante 21 dias, em que não observou-se diferenças significativas entre os diversos tratamentos e o grupo controle, sugerindo não ocorrência de processos inflamatórios quando se administra as formulações contendo 40% de fase oleosa, 40% de tensoativo e 20% de água.

Outros dados promissores estão relacionados à contagem de fibroblastos. Observou-se que o número de fibroblastos foi significativamente maior para os diversos grupos experimentais comparados ao controle, indicando que as formulações podem, inclusive, melhorar aspectos relacionados à sustentação cutânea e regeneração celular, uma vez que estas células originarão fibras colágenas e elásticas.

O fibroblasto é a principal célula para a formação do tecido de granulação, sintetizando ácido hialurônico, fibronectina, colágenos tipo I e III, elastina e proteases, como a colagenase (KITCHEN & YOUNG, 1998). As formulações testadas (AO3F, OC3F e OS3F) aumentaram a produção de fibroblastos. Isto, por sua vez, aumentará a produção de colágeno, que é responsável pela firmeza e pela maior espessura e resistência de traumas na derme, promovendo reestruturação da pele de maneira satisfatória (CHORILLI, 2007; SHAPIRO & SALIOU, 2001).

As formulações caracterizadas como ME (AO3F) ou CL de fase lamelar (OC3F e OS3F) promoveram aumento da espessura da epiderme, ausência de toxicidade ou processos inflamatórios durante 21 dias, representados especialmente pela não produção de leucócitos, além de aumentarem a produção de fibroblastos. Portanto, essas estruturas podem melhorar a interação com a pele, como já relatado na literatura para sistemas líquido-cristalinos incorporados de substâncias como óleo de *Calendula officinalis* e palmitato de retinol (SANTOS, 2006; CHORILLI, 2007).

5.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS COMPONENTES E FORMULAÇÕES

Para avaliação da atividade antifúngica, foi utilizado o método de difusão em disco, cujo princípio consiste em colocar um reservatório impregnado com a amostra em estudo em contato com o meio de cultura inoculado o microorganismo e, ao final do período de incubação, fazer a medida do diâmetro de inibição de crescimento, sendo essa medida um bom indicador de atividade antimicrobiana (PAIVA et al., 2003).

5.5.1 Avaliação da atividade antifúngica dos componentes dos sistemas nanoestruturados

Nestes ensaios, a atividade antifúngica foi testada contra *Candida albicans*. A Tabela 27 e Figura 53 mostram os resultados dos halos de inibição para controles negativo e positivo, o OC e OS, com e sem fluconazol.

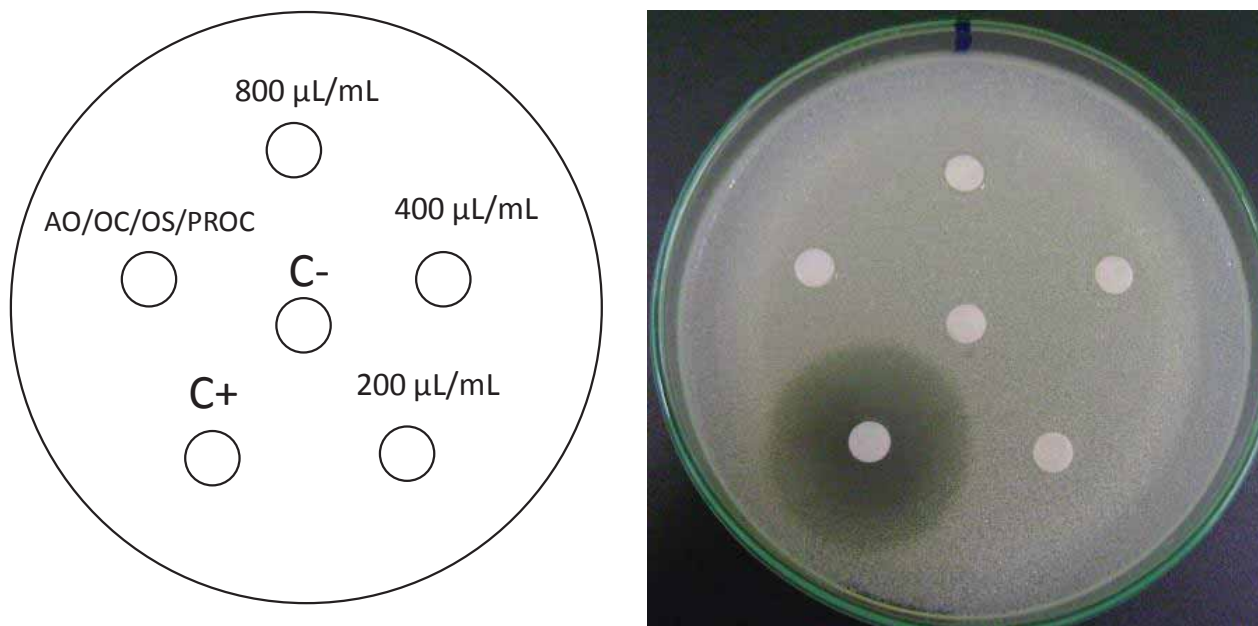
Apesar de a literatura relatar a atividade antifúngica dos óleos de copaíba, nas condições testadas, não foi observado nenhum halo de inibição, portanto, nenhuma presença de atividade contra *C. albicans*. Como esperado, o controle negativo não apresentou halo e o fluconazol apresentou com halo de inibição de 28,47 mm. Entretanto, quando os óleos de copaíba contendo fluconazol, os halos de inibição foram menores que os observados com fluconazol em solução (Figuras 53 e 54, Tabela 27).

Tabela 27. Halos de inibição obtidos para os óleos puros, óleos com fluconazol e controle positivo fluconazol contra *C. albicans*.

Amostra	Halos de inibição (mm±DP)
OC/OS	-
OC+fluco	16,73 ± 0,67 ^a
Fluconazol	28,07 ± 0,04 ^b
OS+fluco	19,55 ± 0,04 ^a
Fluconazol	27,99 ± 0,05 ^b

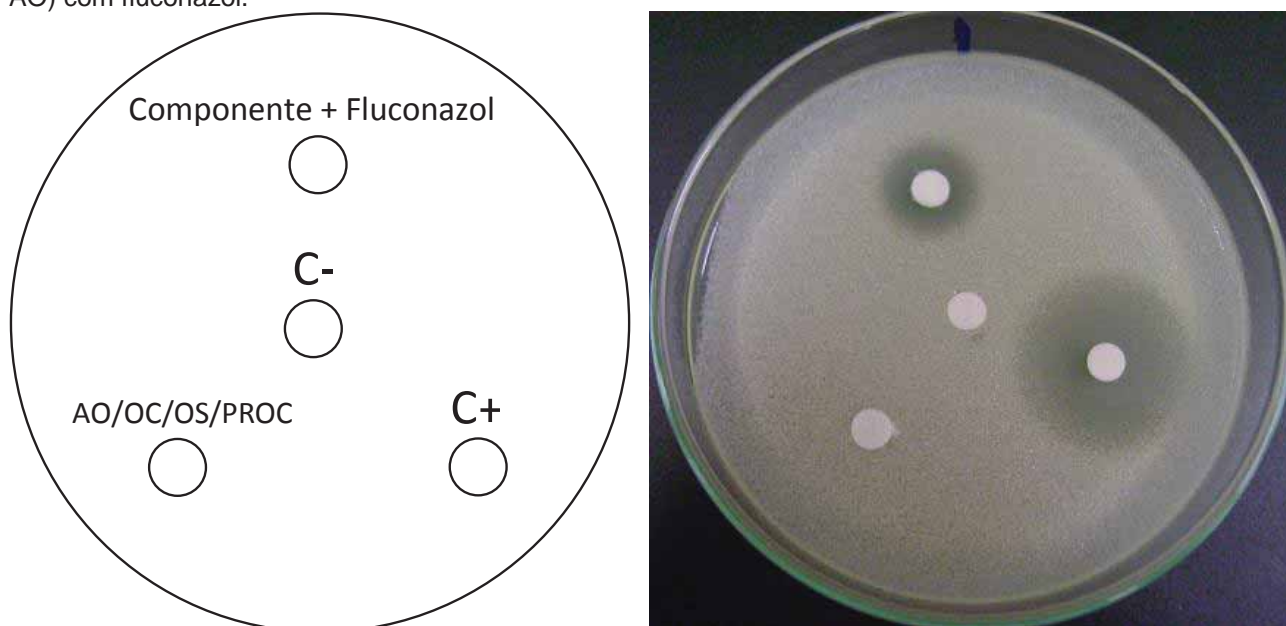
(-) ausência de halo de inibição. Valores médios com letras diferentes indicam diferença significativas (Tukey, $p \leq 0,05$).

Figura 53. Placas representativas dos testes antifúngicos frente aos componentes das formulações: AO, OC, OS, e PROC.



Verificou-se que comparando os halos de inibição de todos os componentes com fluconazol e do fluconazol em solução, houve diferença significativa, sugerindo atividade antifúngica diferente entre as amostras analisadas, sendo esta maior quando o fármaco foi avaliado como controle positivo, em solução. Um possível motivo seria a característica apolar dos óleos dificultando a difusão do fluconazol no meio ou a possibilidade do fármaco estar solubilizado nas gotículas de óleo, dificultando sua saída.

Figura 54. Placas representativas dos testes antifúngicos de sinergismo dos óleos (OC, OS, OE e AO) com fluconazol.



5.5.2 Avaliação da atividade antifúngica das formulações contendo fluconazol

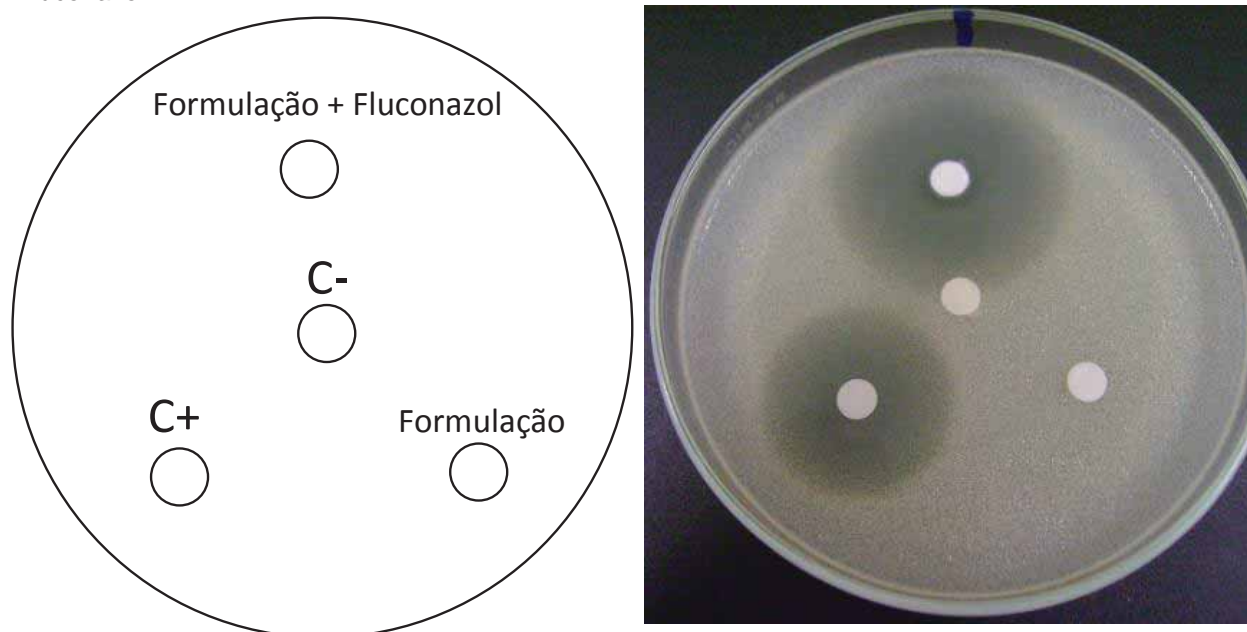
A Tabela 28 apresenta os halos de inibição encontrados para as formulações selecionadas com e sem fluconazol submetidas ao teste de atividade antifúngica contra *C. albicans*. As formulações com fluconazol apresentaram atividade antifúngica significativamente maior quando comparadas ao fármaco sozinho, caracterizando efeito sinérgico da formulação com o fluconazol (Figura 55). Este efeito pode estar associado ao fato dos componentes das formulações, apresentarem sinergismo com o fármaco devido a maior difusão destes.

Além disso, comparando-se as formulações contendo fluconazol, entre si, observou-se que não houve diferença significativa entre os halos de inibição que manteve-se na média de aproximadamente 36 mm. Esta observação mostra que a inclusão dos óleos de copaíba pode melhorar a atividade antifúngica da formulação provavelmente pela mudança nas características de difusão do fluconazol do disco para o meio de cultura, ao estar incorporado na formulação.

Tabela 28. Halos de inibição obtidos para as formulações testadas contra *C. albicans*.

Amostra	Halos de inibição (mm±DP)
OC2/OC4/OS2/OS4	-
OC2+fluco	38,69±0,44 ^a
Fluconazol	28,86 ± 0,06 ^b
OC4+fluco	36,28± ,08 ^a
Fluconazol	27,74 ± 0,30 ^b
OS2+fluco	36,06±1,80 ^a
Fluconazol	27,95 ± 0,02 ^b
OS4+fluco	37,24 ± 0,30 ^a
Fluconazol	28,84 ± 0,06 ^b

(-) ausência de halo de inibição. Valores médios com letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativas (Tukey, $p \leq 0,05$).

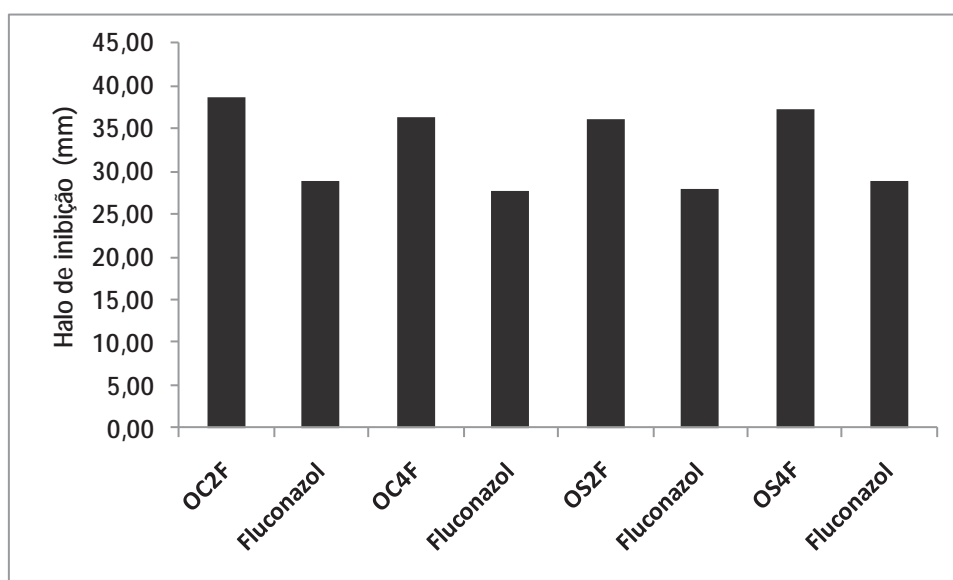
Figura 55. Placas representativas dos testes antifúngicos de sinergismo das formulações com e sem fluconazol.

O método de difusão em disco permitiu obter resultados seguros sem a interferência da cor das amostras utilizadas e ainda permitindo a solubilização dos compostos em solventes como o clorofórmio, que, embora considerado tóxico, seca

facilmente quando aplicado no disco, auxiliando no preparo das amostras. Com base na literatura, este método é um dos mais citados e utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais (RIOS et al., 1988).

A Figura 56 retrata a comparação dos resultados obtidos, onde é possível observar a influência dos óleos de copaíba na atividade antifúngica das formulações contendo fluconazol. Como os óleos são misturas complexas de várias substâncias, a atividade antifúngica observada não pode ser atribuída a uma substância isolada, mas ao conjunto delas. Portanto, a composição química dos óleos tem um papel importante na atividade antimicrobiana e essa atividade pode ser potencializada pela formulação.

Figura 56. Valores de halo de inibição das formulações e controle positivo frente à *Candida albicans*.



5.6 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *in vitro*

Nos estudos de liberação, permeação e retenção, a metodologia analítica empregada para a quantificação do fluconazol foi a CLAE, sendo que a curva analítica está apresentada no **Apêndice**. Nestes estudos, foram utilizadas como fases oleosas o OS, devido a viabilidade tecnológica do mesmo, uma vez que é

mais facilmente controlado em suas propriedades químicas do que OC. As amostras contendo AO foram utilizadas com o objetivo de comparar a permeação e retenção cutânea com as amostras contendo OS.

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

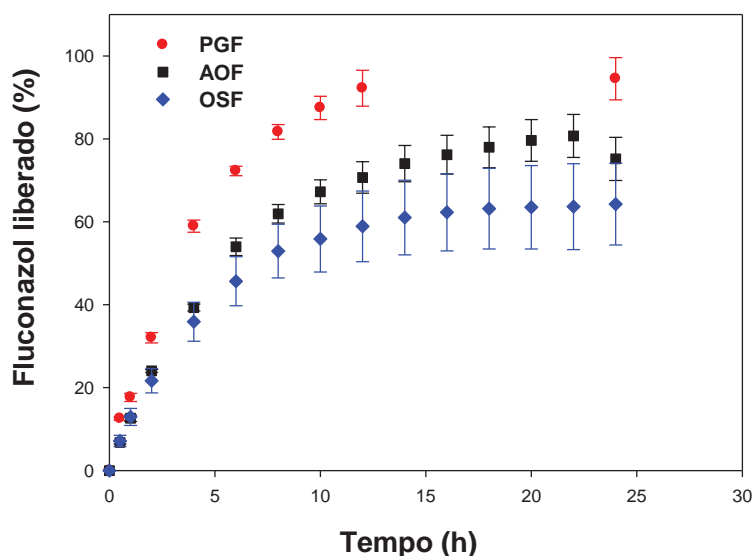
O estudo da solubilidade do fármaco na solução receptora é muito importante para garantir a condição *sink* do experimento. Os resultados dos estudos de solubilidade com o fluconazol em tampão fosfato monobásico 0,01 M pH 7,4 mostraram que a solubilidade do fluconazol neste meio foi de aproximadamente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

O resultado encontrado assegura que os ensaios de permeação e liberação estão dentro da condição *sink* e confirma dados da literatura quando ao uso desta solução receptora em experimentos de liberação e permeação cutânea *in vitro* com o fluconazol (AYUB et al., 2007).

5.6.2 Liberação *in vitro*

A avaliação da liberação *in vitro* do fluconazol nas formulações contendo AO ou OS como fases oleosas permitiu analisar o perfil de liberação do fármaco que pode ser relacionado com a saída do mesmo da matriz farmacêutica (PRAÇA et al., 2010; CHOWDRAY et al., 1987). Foram avaliadas as formulações AO1, AO2, AO3, AO4, OS1, OS2, OS3 e OS4, nas mesmas condições experimentais por 24 horas, todas contendo 1% de fluconazol. Avaliou-se também a liberação de fluconazol incorporado nas fases oleosas AO e OS, entretanto OS foi avaliada contendo 0,2% de fluconazol, que foi a máxima quantidade de fármaco possível de ser incorporada nesta amostra. O perfil de liberação do fluconazol incorporado em propilenoglicol (PG) foi utilizado como controle (Figura 57).

Figura 57. Perfil de liberação *in vitro* (% de liberação) do fluconazol incorporado nas fases oleosas AO, OS e no controle PG (média de n=6).



As tabelas 29 e 30 mostram as porcentagens de fluconazol liberado em função do tempo, a quantidade liberada por área ($Q_{\text{real}} \mu\text{g}/\text{cm}^2$), o fluxo, durante 24 horas, para as formulações contendo OS e AO, respectivamente. Observou-se que em 24h o PG liberou 94% de fluconazol, quantidade estatisticamente maior que os valores apresentados por AOF (81%) e OSF (64%). Vale ressaltar que em 8h de experimento, o PG já havia liberado 87%, enquanto AOF e OSF haviam liberado aproximadamente 62% e 52%, respectivamente, sugerindo-se que as fases oleosas podem reter a saída do fármaco da matriz com o tempo (Figura 57). Comparando-se as duas fases oleosas empregadas nos sistemas, observou-se diferença significativa nos valores de fluconazol liberado. Sugere-se que a composição complexa de OS contribui para possíveis interações do fluconazol com esta fase oleosa, uma vez que, sabendo que OS dissolve muito pouca quantidade de fluconazol (0,2% em detrimento de 3,6% para AO), era esperado que ele liberaria o fármaco facilmente.

Para as amostras contendo OS como fase oleosa (Tabela 29, Figura 58), verificou-se que quase a totalidade de fármaco foi liberada da formulação para a solução receptora, numa porcentagem que variou entre 87 a 99% em relação a quantidade inicial de fármaco. Já a amostra contendo apenas OS liberou 64% de fármaco, sugerindo que a formulação facilita a liberação do fármaco, já que nesta ele terá mais afinidade pelo tensoativo e fase aquosa.

Comparando-se as formulações contendo OS em diferentes proporções (Figura 58 e Tabela 29), verificou-se que as formulações OS1F, OS2F e OS4F não diferem entre si estatisticamente quanto a porcentagem de fluconazol liberado, entretanto diferiram estatisticamente de OS3F. A maior quantidade de liberação de fármaco a partir de OS1F, CL - fase hexagonal, quando comparado ao OS2F e OS3F (CL lamelar) pode estar relacionado a presença do fármaco no interior dos tubos cilíndricos que compõem os CL de fase hexagonal, facilitando assim o fluxo do fármaco pela estrutura, possibilitando saída do fármaco. OS2F liberou fármaco num porcentagem mais semelhante a formulação OS1F, enquanto OS3F liberou menor porcentagem em relação as duas amostras, provavelmente devido a presença do fármaco entre as lamelas dispostas como “sanduíche”, dessa forma retendo mais fármaco. OS4F, microemulsão liberou aproximadamente 98% de fluconazol em 24h, devido a estrutura da microemulsão menos viscosa que pode ter facilitado a liberação do fármaco para o meio. Estes resultados sugerem que a estrutura do sistema pode modular a liberação do fármaco com o tempo, sem contudo dificultar a liberação do fármaco, uma vez que a menor porcentagem de fármaco liberado foi de 87%, valor obtido para OS3F, CL de fase lamelar.

Figura 58. Perfil de liberação *in vitro* (% de liberação) do fluconazol incorporado em formulações contendo OS como fase oleosa (média de n=6).

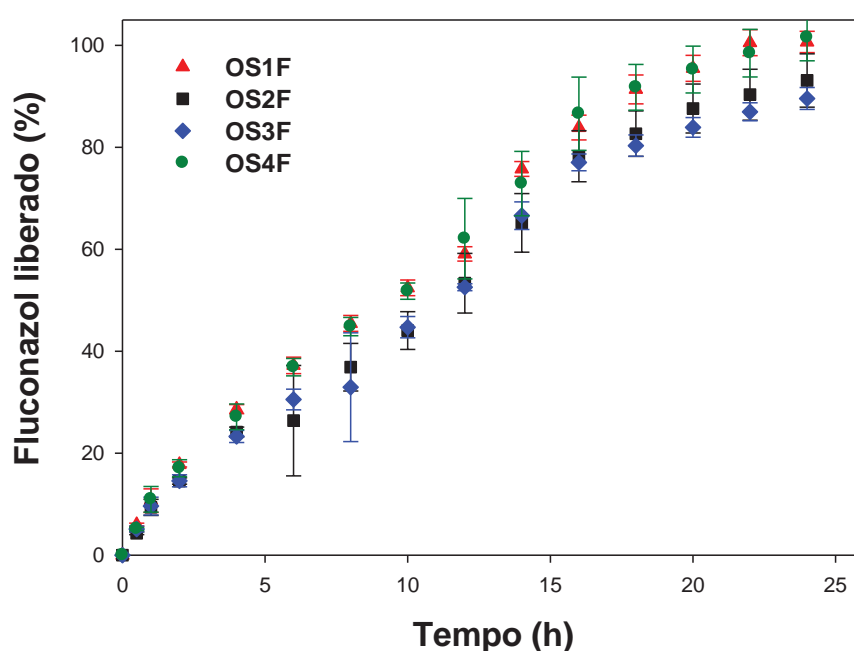


Tabela 29. Quantidade de fluconazol liberado a partir de formulações contendo OS, por área e porcentagem liberada, após 24h de experimento

Amostra	Estrutura	Fármaco inicial ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 24 horas	Fluxo (J) $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h} / R^2$	Liberação (%)
PG	-	1694,92	1601,70	173,55/ 0,9502	94,50 \pm 6,39
OSF	-	338,98	217,2	22,07/ 0,9651	64,25 \pm 9,05
OS1F	CL hexagonal	2259,89	2249,35	118,37/ 0,9703	99,05 \pm 3,94
OS2F	CL lamelar	2259,89	2169,26	96,35/ 0,9583	93,13 \pm 5,61
OS3F	CL lamelar	2259,89	1972,23	91,03/ 0,9709	87,27 \pm 4,17
OS4F	ME	1694,92	1674,84	81, 78/ 0,9574	98,81 \pm 6,41

A Figura 59 apresenta o perfil de liberação do fluconazol em formulações contendo AO como fase oleosa, por um período de 24 horas. Observando esta figura, juntamente com a Tabela 29, verificou-se que a amostra contendo apenas o AO, liberou quantidade de fármaco significativamente maior quando comparada as formulações contendo esta fase oleosa, liberando cerca de 81% de fluconazol em 24 horas. Dentre as formulações, AO3F liberou significativamente ($p < 0,05$) mais fármaco (67%), seguido por AO4F, AO2F e AO1F (Tabela 30). Verificou-se que a liberação aumenta, proporcionalmente ao aumento da quantidade de fase oleosa nas formulações AO1 para AO3F. Provavelmente a alta viscosidade de AO1F, CL de fase hexagonal, associada a maior afinidade do fármaco pela fase oleosa, disposta na parte externa entre os tubos, ajudou a reter mais o fármaco na sua estrutura. AO2F, CL de fase lamelar liberou porcentagem intermediária entre AO1F e

AO3F. Esta última juntamente com AO4 caracterizada como ME, proporciona a presença do fármaco se movimentando mais facilmente na interface óleo-água e ficando disponível mais rapidamente para liberação. AO3F e AO4F liberam maior quantidade de fármaco em 24h, sendo que AO3F liberou maior porcentagem de fármaco neste período. Neste caso a ME que mais liberou foi AO3F.

Comparando-se as formulações contendo AO e OS como fase oleosa, verificou-se que a quantidade de fluconazol liberado por OS1F, OS2F, OS3F e OS4F, após 24h foi significativamente maior que as formulações contendo AO, (AO1F, AO2F, AO3F e AO4F). Portanto, sugere-se que as formulações contendo OS facilitam a liberação comparado ao óleo puro diferindo de formulações com AO que sustentam a liberação quando comparado a AOF

As tabelas 29 e 30 apresenta os valores de fluxo (J) calculados para todas as formulações com base na porção linear da curva de liberação em função da quantidade de fármaco liberado por tempo. Conforme é possível observar nas Figuras 57 a 59, as formulações tiveram valores de fluxo correspondentes ao verificado nos perfis de liberação bem como na quantidade de fluconazol liberado no período de 24 horas, quando se compara as mesmas.

Figura 59. Perfil de liberação *in vitro* (% de liberação) do fluconazol incorporado em formulações contendo **AO** como fase oleosa (média de $n=6$).

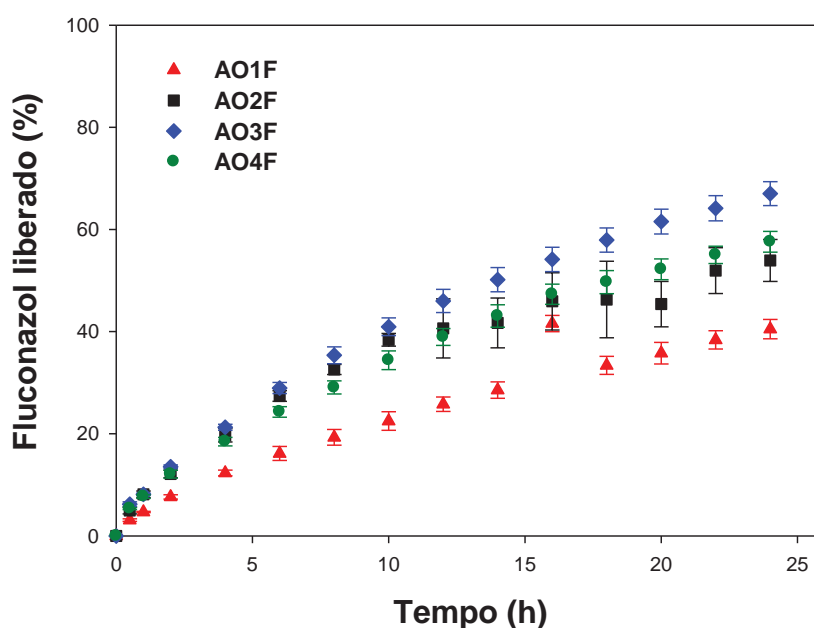


Tabela 30. Quantidade de fluconazol liberado por área e porcentagem liberada, a partir de formulações contendo AO, após 24h de experimento

Amostra	Estrutura	Fármaco inicial ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 24 horas	Fluxo (J) $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h} / R^2$	Liberação (%)
PG	-	1694,92	1601,70	173,55/ 0,9502	94,50 \pm 6,39
AOF	-	1694,92	1387,56	132,12/ 0,9758	81,86 \pm 6,35
AO1F	CL lamelar	2259,89	914,94	52,39/ 0,9744	40,48 \pm 4,67
AO2F	CL lamelar	1694,92	914,17	59,89/ 0,9953	53,17 \pm 7,62
AO3F	ME	1694,92	1135,90	71,09/ 0,9806	67,01 \pm 3,47
AO4F	ME	1694,92	976,05	53,38/ 0,9901	57,58 \pm 3,54

5.6.3 Permeação e retenção cutânea *in vitro*

Os estudos de permeação e retenção cutânea são importantes para se avaliar a interação de uma formulação com a pele, que influencia na liberação do fármaco e também a difusão do fármaco nas camadas da pele. Essa difusão pode resultar em penetração do fármaco na pele, permanecendo ou no estrato córneo ou na região que engloba a epiderme e início da derme ou a permeação propriamente dita do fármaco através da pele, atravessando todas as suas camadas.

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

Os ensaios de permeação foram realizados com as mesmas condições do ensaio de liberação, com exceção da membrana utilizada e o tempo de experimento. Escolheu-se comparar a retenção cutânea no tempo de 6h e 12h após testes

preliminares onde foi possível verificar que, para a maioria das formulações, o fluconazol não permeou através da pele.

As Tabelas 31 e 32 apresentam a quantidade de fluconazol em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ permeado através da pele de orelha de porco, retido no estrato córneo (EC) e na epiderme+derme (EP+D), para as formulações contendo OS e AO, respectivamente.

Tabela 31. Quantidade de fluconazol, incorporado em formulações contendo AO como fase oleosa retido e permeado na pele após 6 ou 12h de experimento

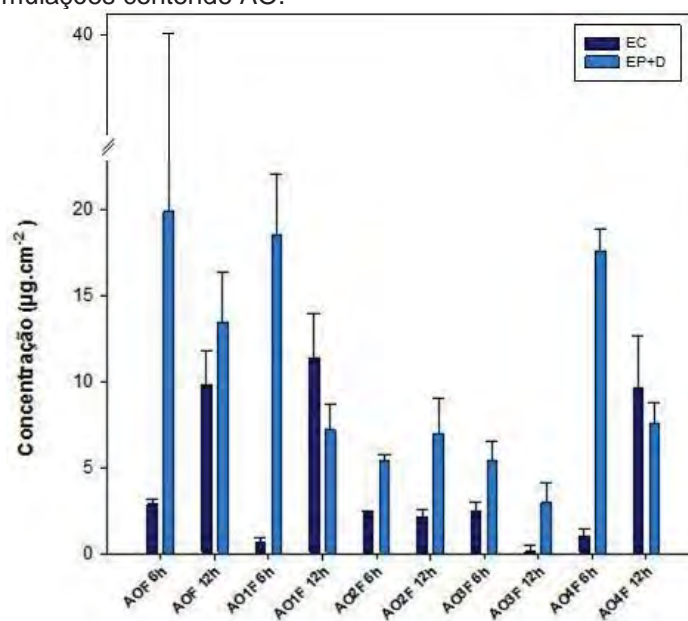
		Retenção EC ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{DP}$)	Retenção EP+D ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{DP}$)	Permeação ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{DP}$)
AOF	6h	2,87 \pm 0,31	19,87 \pm 8,39	319,19 \pm 37,19
	12h	9,79 \pm 2,33	13,43 \pm 1,58	673,64 \pm 10,57
AO1F	6h	0,61 \pm 0,32	18,50 \pm 3,55	0,00
	12h	11,38 \pm 2,56	7,19 \pm 1,52	0,00
AO2F	6h	2,35 \pm 0,12	5,37 \pm 0,41	0,00
	12h	2,15 \pm 0,43	6,96 \pm 2,08	0,00
AO3F	6h	2,44 \pm 0,54	5,42 \pm 1,09	0,42 \pm 0,13
	12h	0,10 \pm 0,40	2,96 \pm 1,14	4,29 \pm 1,45
AO4F	6h	1,02 \pm 0,37	17,59 \pm 1,23	85,94 \pm 28,44
	12h	9,60 \pm 3,03	7,59 \pm 1,19	130,30 \pm 5,77

A quantidade de fluconazol permeado quando este foi incorporado em AO (AOF) foi maior que o verificado para todas as amostras testadas. A retenção de fluconazol na EP+D foi maior tanto após 6 horas como 12 horas. Para AO1F, CL de fase lamelar, observou-se retenção após 6h, predominantemente na EP+D, e quantidade semelhante a observada para AOF, mas não houve permeação e após 12h, observou-se que houve retenção de fluconazol entre EP+D e EC. Já para AO2F, CL de fase lamelar, observou-se que o fármaco não permeia nos dois tempos avaliados, houve uma distribuição e os valores de retenção na EP+D não variaram

estatisticamente com o tempo, o que pode indicar a saturação da membrana biológica em 6h (Figura 60).

A formulação AO3F, uma microemulsão, apresentou maior permeação após 12h. Os valores de retenção no EC e EP+D após 12h foram menores que os de 6h, indicando que ocorre penetração do fármaco e posterior permeação. Já AO4F, microemulsão, apresentou maior permeação, tanto após 6 ou 12 horas, que as outras formulações contendo AO, sendo maior a permeação após 12 horas. Apesar do AO ser um promotor de permeação, as formulações foram capazes de modular a penetração do fármaco nas camadas da pele. Foram também observados resultados semelhantes para outros sistemas relatados na literatura contendo AO (LOPES et al., 2006) e sistemas microemulsionados contendo fluconazol (SALERNO, CARLUCCI, BREGNI, 2010). É interessante observar que os valores apresentados para EP+D foram superiores aos valores retidos no EC nas primeiras 6 horas. As diferenças observadas para a permeação de fluconazol a partir das microemulsões AO3F e AO4F sugere que provavelmente esses sistemas tenham estrutura interna diferente, influenciada pela proporção diferente de óleo de água. A literatura relata que diferenças na estrutura interna de ME pode modificar a atividade termodinâmica do fármaco, que favorece a partição nas diversas camadas da pele (ARAÚJO, THOMAZINE, LOPEZ, 2010; ZHU et al., 2009)

Figura 60. Retenção cutânea, no estrato córneo (EC) e na epiderme +derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), de fluconazol incorporado em formulações contendo AO.



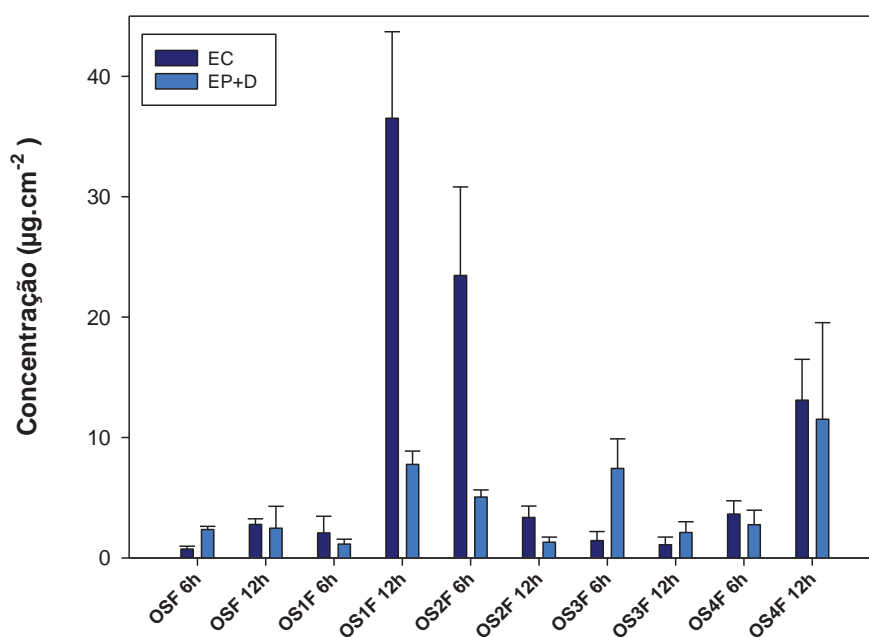
Para as amostras contendo OS como fase oleosa (Figura 61, Tabela 32), observou-se que OSF (fase oleosa OS contendo fluconazol) não promoveu permeação cutânea. Com o fluconazol solubilizado no óleo, as quantidades retidas na EP+D foram inferiores aos valores observados quando o fármaco foi dissolvido em AO apenas (Tabelas 31 e 32). Observou-se que após 12h, a quantidade de fluconazol retida na EP+D foi semelhante ao observado após 6 horas, podendo ter ocorrido saturação da membrana biológica.

A formulação OS1F, CL de fase hexagonal, não promoveu permeação do fluconazol, entretanto promoveu retenção do fármaco, principalmente no EC, uma vez que após 6h a retenção na EP+D e EC não foram diferentes significativamente, mas após 12h, ela aumentou nas camadas da pele, sendo significativamente predominante no EC. Já OS2F, caracterizada como um CL de fase lamelar apresentou maior permeação em 6h do que em 12h e maior retenção do fármaco nas camadas da pele quando submetida ao experimento de 6 horas, sendo observada retenção de fluconazol significativamente maior no EC. Após 12h, a retenção foi maior no EC, entretanto valor menor que o observado para 6 horas.

A formulação OS3F, CL de fase lamelar, apresentou após 6 horas maior retenção de fluconazol na EP+D e ausência de permeação. Após 12 horas, observou-se permeação cutânea e diminuição da retenção do fármaco nas camadas da pele. A formulação OS4F apresentou o mesmo comportamento que OSF em relação a permeação, onde se observou permeação, em que após 6 horas e ausência de permeação após 12 horas de experimento, sendo que neste período de tempo verificou que OS4F apresentou maior retenção no EC e na EP+D quando comparado com o período de 6 horas, sendo a retenção significativamente maior no EC (Figura 61).

Tabela 32. Quantidade de fluconazol, incorporado em formulações contendo OS como fase oleosa retido e permeado na pele após 6 ou 12h de experimento

		Retenção EC ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{DP}$)	Retenção EP+D ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{DP}$)	Permeação ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{DP}$)
OSF	6h	0,74 \pm 0,24	2,36 \pm 0,27	5,43 \pm 1,38
	12h	2,78 \pm 0,47	2,47 \pm 1,82	0,00
OS1F	6h	2,08 \pm 1,38	1,16 \pm 0,40	0,00
	12h	36,51 \pm 7,19	7,77 \pm 1,11	0,00
OS2F	6h	23,46 \pm 7,35	5,06 \pm 0,59	23,35 \pm 3,25
	12h	3,36 \pm 0,95	1,31 \pm 0,43	6,29 \pm 0,91
OS3F	6h	1,45 \pm 0,74	7,44 \pm 2,45	0,00
	12h	1,1 \pm 0,64	2,11 \pm 0,90	9,16 \pm 1,54
OS4F	6h	3,64 \pm 1,11	2,76 \pm 1,21	0,00
	12h	13,10 \pm 3,40	11,52 \pm 8,02	0,00

Figura 61. Retenção cutânea, no estrato córneo (EC) e na epiderme +derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), de fluconazol incorporado em formulações contendo OS.

A escolha de uma das formulações estudadas vai depender de fatores como, por exemplo, o tipo de lesão em dermatomicoses a serem tratadas. No caso de lesões abertas, onde há a presença de fluido biológico, de caráter aquoso, a administração de ME no local da lesão pode ser vantajoso, uma vez que ao entrar em contato com o fluido biológico, pode absorvê-lo e transformar-se em CL, possibilitando a formação de um filme, melhorando a oclusão e permanência da formulação no local de ação. Em inflamações, o uso tanto de ME como CL pode ser vantajoso, porque tanto neste caso como no primeiro estas formulações podem ser promissoras, devido a melhora das propriedades do fármaco, facilidade de administração, controle da liberação do fármaco e manutenção da hidratação e regeneração da pele.

6 CONCLUSÕES

✓ Os óleos de copaíba de diferentes procedências apresentaram constituintes majoritários diferentes. O OE não apresentou perfil característico de óleo de copaíba, mostrando perfil químico predominante de óleos fixos. OC apresentou α -copaeno e ácido hardwickiico como constituintes predominantes e OS possui β -cariofileno como constituinte majoritário.

✓ Os testes de atividade anti-inflamatória mostraram que nenhum dos componentes das formulações nem o fluconazol apresentaram características nem pró nem anti-inflamatória, o que pode ser uma vantagem visto que quando algumas das citocinas são produzidas em grande quantidade podem gerar danos ao organismo. Os resultados sugerem que esta atividade possa estar relacionada com a concentração das amostras testadas. OE apresentou comportamento diferente em relação à OC e OS, o que confirma as diferenças observadas quando se comparou os diagramas de fases construídos, bem como estudos de composição química dos 3 óleos de copaíba relatados anteriormente.

✓ Os testes de toxicidade em células HepG2 mostraram a citotoxicidade concentração-dependente observada para os óleos de copaíba OC e OS, ressaltando a importância do controle no uso popular destes óleos. Os resultados obtidos para OC e OS foram semelhantes, entretanto diferentes dos encontrados para OE, corroborando com os resultados de CG/EM que mostraram a composição química diferente apresentada por este último.

✓ Com a construção dos diagramas de fases foi possível visualizar o comportamento de fases de sistemas estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado e os óleos OC, OS, OE e AO. O tensoativo possibilitou a formação de várias estruturas e interferiu na estruturação e no comportamento reológico das formulações. Os sistemas contendo OC e OS mostraram regiões consideráveis de ME e CL e semelhantes ao observado para o AO, resultados confirmados pelas análises de MLP e SAXs. Esses resultados, juntamente com a caracterização química e biológica dos óleos de copaíba, levaram a exclusão de OE dos testes posteriores.

- ✓ Nos testes de avaliação da toxicidade dérmica aguda (TDA) dos componentes, verificou-se que PROC é um tensoativo seguro para ser usado em formulações tópicas. As três fases oleosas utilizadas nos sistemas, OC, OS e AO em doses menores como 500 mg/Kg e 600 mg/Kg, semelhantes as concentrações usadas nas formulações, não apresentaram sinais de toxicidade dérmica aguda.
- ✓ Na avaliação da toxicidade dérmica de dose repetida, pôde-se concluir que as formulações testadas (AO2F, OC2F e OS2F) são seguras para administração cutânea, mesmo quando administrada repetidamente, não causando toxicidade nos animais quando comparado ao controle negativo.
- ✓ Nos testes histológicos foi verificado o aumento da espessura da epiderme e derme com a administração destes componentes. O aumento do número de fibroblastos mostrou que a regeneração da pele dos ratos não foi interferida após administração das formulações.
- ✓ Os resultados dos testes de atividade antifúngica contra *Candida albicans* mostraram que o fluconazol interagiu melhor com o meio quando incorporado nas formulações, provavelmente devido às propriedades dos sistemas de liberação como ME e CL de melhorarem as propriedades biofarmacotécnicas dos fármacos, favorecendo a interação com sistemas biológicos. Além disso, as formulações contendo OS mostraram atividade antifúngica maior que as contendo AO, sugerindo que o óleo de copaíba pode melhorar a atividade antifúngica das formulações contendo fluconazol.
- ✓ Os ensaios de liberação *in vitro* mostraram que as formulações contendo AO e OS podem modificar a liberação de fluconazol quando comparadas com o PG, utilizado como controle. As formulações contendo OS liberaram maior quantidade de fluconazol em 24 horas do que as contendo AO, sendo OS1F (CL de fase hexagonal) e OS4F (microemulsão) as que mais liberam, cerca de 99% de fármaco. Já as formulações contendo AO, liberam menor quantidade de fluconazol que AOF, sugerindo que elas podem controlar a liberação de fármaco.
- ✓ Os estudos apresentados neste trabalho permitem planejar de maneira mais racional os sistemas utilizados para melhorar a eficiência e a aplicação do

fluconazol. Portanto, as microemulsões e cristais líquidos estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado podem ser usadas para administração cutânea de fluconazol no tratamento de dermatomicoses.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M; GUERRA, R. O.; VIEIRA, B. J.; CUNHA, R. M. C. Oral manifestation of sporotrichosis in AIDS patients. **Oral Dis.**, v. 7, p. 134–136, 2001.

ABRAMOWITZ, M.; PARRY-HILL, M. J.; DAVIDSON, M. Polarized light microscopy. The Florida State University and Olympus American Inc. 2006. Disponível em: <http://www.microscope.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index.html>. Acesso em 19 fev. 2008.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography /Mass spectroscopy.** 4th ed. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007

ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M. G.; SICA, A.; MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. **Curr. Opinion Genetic & Develop.**, v. 18, p. 3-10, 2008.

ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético farmacêutica. **Cosm. Toil.**, v. 15, p. 96-100, 2003.

ANDREWS, J. M. **Cirurgia plástica.** São Paulo: Atheneu, p.1-2, 1995.

ARANGO, H. G. **Bioestatística teórica e computacional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 235 p.

ARAÚJO, L. M.; THOMAZINE, J. A.; LOPEZ, R. F. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 75, n.1, p. 48-55, 2010.

ARAÚJO, T.; MARQUES, A. C.; KERDEL, F. Sporotrichosis (Review). **Int. J. Derm.**, v. 40, p. 737-742, 2001.

AULETTA, C. S. Acute, Subchronic, and Chronic Toxicology. In: Derelanko, M. J.; HOLLINGER, M. A. **Handbook of Toxicology.** USA: CRC-Press: 2 ed., 2002.

AYUB, A. C.; GOMES, A. D. M.; LIMA, M. V. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; FERREIRA, L. A. M. Topical Delivery of Fluconazole: In Vitro Skin Penetration and Permeation Using Emulsions as Dosage Forms. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 33, p. 273-280, 2007.

BAROLI, B.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A.; DELGADO-CHARRO, M. B.; FADDA, A. M.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen **J. Control. Release**, v.69, p. 209-218, 2000.

- BARROS, M. B. L.; DO VALE, F. A. C.; GALHARDO, G. M. C.; SILVA, C. F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; MARZOCHI, K. B. F.; WANKE, B.; CONCEIÇÃO, O. M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clin Infect Dis.**, v. 38, p. 529–535, 2004.
- BONIFAZ, A. M. B.; SAU´L, A.; PAREDES-SOLIS, V.; FIERRO, L.; ROSALES, A.; PALACIOS, C.; ARAIZA, J. Sporotrichosis in Childhood: Clinical and Therapeutic Experience e in 25 Patients. **Pediatric Dermatol.**, v. 24, n. 4, p. 369–372, 2007.
- BORNÉ, J., NYLAMDER, T., KHAN, A. Phase behavior and aggregate formation for the aqueous monoolein system mixed with sodium oleate and oleic acid. **Langmuir**, Baltimore, v. 17, p. 7742-7751, 2001.
- BOYD, B. J.; WHITTAKER, D. V.; KHOOB, S. M.; DAVEY, G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, v. 309, p. 218–226, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Assistência Farmacêutica. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF), 02 de junho de 2003.
- BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J. TRANCHANT, J-F.; COURRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J. Control. Rel.**, v. 60, n. 1 (28), p. 67-76, 1999.
- BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; TRANCHANT, J. F.; POUGET, T.; COUARRAZE, G. Influence of lamellar liquid crystal structure on percutaneous diffusion of hydrophilic tracer from emulsions. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.49, n.1, p.1-11, 1998.
- BRITISH PHARMACOPEIA. London: The Stationery Office, 2010.
- BRUSCHI, M. L., DE FREITAS, O., LARA, E. H.G., PANZERI, H., GREMIAO, M. P. D., JONES, D. S. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: Development and characterization. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 34, n. 3, p. 267-278, 2008.
- BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; LUCCHESI, M. B. AND GREMIÃO, M. P. D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **Int J. Pharm.**, v. 264, p. 45-55, 2003.
- BRUSCHI, M. L.; PANZERI, H.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G.; GREMIÃO, M. P. D. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Rev. Bras. Cien. Farm.** v. 42, p. 26-47, 2006.

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

CARVALHO, F. C. ; BARBI, M. S. ; SARMENTO, V. H. V. ; CHIAVACCI, L. A. ; NETTO, F. M. ; GREMIAO, M. P. D. . Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **J. Pharmacy and Pharmacol.**, v. 62, p. 430-439, 2010.

CARVALHO, F. C. et al. Influence of oil phase on stabilization of PPG-5-CETETH-20 based systems. **JBN-special-LatinAm-20-R1**, *In press*, 2011.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIAO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.46, n.1, p. 1-17, 2010a. .

CARVALHO, F. C.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; BARBI, M. S.; GREMIAO, M. P. D. Development and in vitro evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, p. 2367-2374, 2010.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, p. 773-778, 2000.

CERA, R. F. L. **Estudo da Incorporação do Diclofenaco Sódico com Microemulsão Lipídicas: Formulação e Liberação in vitro**. 145f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

CHARALAMPOS, A.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. **J. Hematol.**, v. 129, p. 583-596, 2005.

CHORILLI, M. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo**. 196f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CHOWDRAY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharmaceutical New Delhi**, v. 30, n. 350, p. 51-54, 1987.

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.

COSTA, M.T.; FABENI, R.C.; APTEKMANN, K.P.; MACHADO, R.R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 967-974, 2003.

CRESPO-ERCHIGA, V.; DELGADO-FLORENCIO, V. Micosis cutâneas. **Med Clin (Barc)**, v. 125, n. 2, p. 467-474, 2001.

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.

CURIO, M., JACONE, H., PERRUT, J., PINTO, A.C., VEIGA FILHO, V.F., SILVA, R.C.B. Acute effect of *Copaifera reticulata* Ducke copaiba oil in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **J. Pharm. and Pharmacol.**, v. 61, p. 1105-1110, 2009.

DASH, A. K.; ELMQUIST, W.F. Fluconazole. In: **Analytical profiles od drugs substances and excipients**. Brittain, HG: San Diego: Academic Press, v. 27, p. 67-113, 2001.

DAVIDSON, M. W.; ABRAMOWITZ, D. Polarized Light Microscopy. Olympus America Inc. and The Florida State University. Disponível em <<http://microscope.fsu.edu/primer/techniques/polarized/polarizedhome.html>>. 2003. Acesso em: 10 dez. 2008.

DE DONCKER, P.; GUPTA, A. K.; MARYNISSEN, G.; STOFFELS, P.; HEREMANS, A. Itraconazole pulse therapy for onychomycosis dermatomycoses: An overview. **J Am Acad Dermatol**; v. 37, p. 969-974. 1997.

DE LIMA, S.G.; FEITOSA, C.M.; CITÓ, A.M.G.L.; MOITA NETO, J.M.; LOPES, J.A.D.; LEITE, A.S.; BRITO, M.C.; DANTAS, S.M.M.; MELO CAVALCANTE, A.A.C. Effects of immature cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae* and inhibition of acetylcholinesterase activity. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 806-818, 2008.

DEBORA. Microemulsões. Disponível em: <<http://www.iqm.unicamp.br/~wloh/offline/qp433/seminarios/2002/debora.pdf>> 2002. Acesso em: 10 ago. 2010.

DEL NUNZIO, M. J. Copaiba oils and its uses in cosmetics. **Aerosol Cosmetol**, 1985.

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

DOLDANI L. Z.; AQUINO V. R.; DARGEL A. A. Disseminated cutaneous sporotrichosis in an AIDS patient receiving maintenance therapy with fluconazole for previous cryptococcal meningitis. **Clin Infect Dis.**, v. 28, p. 1337-1338, 1999.

DONABEDIAN, H.; O'DONNELL, E.; OLSZEWSKI, C.; MACARTHUR, R. D.; BUDD, N. Disseminated cutaneous and meningeal sporotrichosis in an AIDS patient. **Diag Microbial Infect Dis.**, v. 18, p. 111-115, 2004.

EPA (1988). United States Environmental Protection Agency Prevention, Pesticides and Toxic Substances: **Acute Dermal Toxicity (OPPTS 870.1200)**. Disponível:
[http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-1200.pdf]. Acessado em: 17/09/2009.

FAERGEMANN, J. Pharmacokinetics of fluconazole in skin and nails. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 40, p. S14-S20, 1999.

FANUN, M. A study of the properties of mixed nonionic surfactants microemulsions by NMR, SAXS, viscosity and conductivity **J. Mol. Liq.**, v. 142, p. 103-110, 2008.

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

FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; TÖRÖK, Gy.; RÁCZ, I.; MARTON S. Influence of chlorhexidine species on the liquid crystalline structure of vehicle. **Int. J. Pharm., Amsterdam**, v. 213, p. 1-5, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FAZIO, M. J.; ZITELLI, J. A.; GOSLEN, J. B. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN, W. P.; HANK, C. W.; ASKEN, S. **Cirurgia cosmética: princípios e técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian J. Pharmaceut. Scienc.**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA J. R, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Braz J. Pharmaceut. Scienc.**, v. 41, p. 301-313, 2005.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy**, v. 4, p. 281-286, 2005.

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

GARTI, N.; YAGHMUR, A.; ASERIN, A.; SPERNATH, A.; ELFAKES, R.; EZRAHI, S. Solubilization of active molecules in microemulsions for improved environmental protection. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.**, v. 230, p. 183-190, 2004.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v. 43, p. 374-379, 2008.

GHS (2003). **GHS Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals.**

Disponível: www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev00/00files_e.html. Acessado em 30/01/2009.

GILBERT, B.; MORS, W.B.; BAKER, P.M.; TOMASSINI, T.C.B.; GOULART, E.G.; HOLANDA, J.C.; COSTA, J.A.R.; LOPES, J.N.C.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.J.; TURCO, A.M.T.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J.L.G.; THAMES, A.W.; PELLEGRINO, J.; KATZ, N. - A atividade antihelmíntica de óleos essenciais e de seus componentes químicos. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 44, p. 423-428, 1972.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **J. Ethnopharmacol.** V. 109, p. 486–492, 2007.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

HAN, Y. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v. 14, n. 11, p. 733-738, 2007.

HASHIGUCHI, T. YASUTAKE, T.; MANAKO, T. OTAGARI, M. *In vitro* percutaneous absorption of prednisolone derivatives based on solubility parameter. **Int. J. Pharm.**, v. 158, p. 11-18, 1997.

HELLWEG, T. Phase structures of microemulsions. **Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.**, v. 7, p. 50-56, 2002.

- HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINE, J. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; LOPEZ, R. F. V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **Int. J. Pharmaceutic.**, v. 329, n. 1-2, p. 88-93, 2007.
- HEUSCHKEL, S.; GOEBEL, A.; NEUBERT, R. H. H. Microemulsions—Modern Colloidal Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery. **J. Pharm. Sci.**, v. 97, n. 2, p. 603 – 631, 2008.
- HOELLER, S.; KLANG, V.; VALENTA C. Skin-compatible lecithin drug delivery systems for fluconazole: effect of phosphatidylethanolamine and oleic acid on skin permeation. **JPP**, v. 60, p. 587–591, 2008.
- HOLMQVIST, P.; ALEXANDRIDIS, P.; LINDMAN, B. Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer-Water-“Oil” Systems by Varying the “Oil” Type. **Macromolecules**, v. 30, p. 6788-6797, 1997.
- HOSMER, J.; REED, R.; VITÓRIA, M.; BENTLEY, L.B.; NORNOO, A.; LOPES, L.B. Microemulsions Containing Medium-Chain Glycerides as Transdermal Delivery Systems for Hydrophilic and Hydrophobic Drugs. **American Association of Pharmaceutical Scientists: Pharmaceutical Sciences Technology**, v. 10, n. 2, p. 589-596, 2009.
- HYDE, S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: **Handbook of applied surface and colloid chemistry**. Holmberg, K. (Ed.): New York: John Wiley & Sons, p. 299-332, 2001.
- IMURA, T.; HIKOSAKA, Y.; WORAKITKANCHANAKUL, W.; SAKAI, H.; ABE, M.; KONISHI, M.; MINAMIKAWA, H.; KITAMOTO, D. Aqueous-Phase Behavior of Natural Glycolipid Biosurfactant Mannosylerythritol Lipid A: Sponge, Cubic, and Lamellar Phases. **Langmuir.**, v. 23, n. 4, p. 1659-1663, 2007.
- ISOMAKI, P.; PUNNONEN, J. pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Annals of Medicine**, v. 29, n. 6, p. 499-507, 1999.
- ICH-Q2B **Validation of analytical procedures: Methodology**. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical Human Use, Geneva, Switzerland, 2005.
- JAVITT, N. B. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. Division of Hepatic Diseases, **The FASEB Journal**, v. 4, p. 161-168, 1990.
- KISHIMOTO, T. The biology of interleukin-6. **Blood**, v.74, n.1, p.1-10, 1989.
- KITCHEN, S.; YOUNG, S. Reparo dos tecidos. In: **Eletroterapia de Clayton**, Kitchen, S.; Bazin, S.. 10.ed. São Paulo: Manole, p.46-58, 1998.

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

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

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

KLUG, H. P. X-ray Diffraction Procedures. New York: John Wiley & Sons, cap. 1, 1954.

KOVACEVIC, A.; SAVIC, V.; VULETA, G.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M.; Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. **Int. J. Pharm.**, v. 406, p. 163-172, 2011).

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 54, p. 77-98, 2002.

KWON, K. S.; YIM, C-S.; JANG, H-S.; CHUNG, T-A; O. C-K. Verrucous sporotrichosis in an infant treated with itraconazole. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 38, p. 112-114, 1998.

LACAZ, C. S., E. PORTO, J. E. C. MARTINS, E. M. HEINS-ACCARI & N. T. DE MELO. **Tratado de micologia médica**, 5. Ed. São Paulo: Sarvier, p. 252-340, 2002.

LACEY, L. A., SCHRECK, C. E., MCGOVERN, T. P. Native and experimental repellent against black flies in the Amazon basin of Brazil. **Mos News.**, v. 41, p. 376-379, 1981.

LANDGRAF, D. S.; GREMIÃO, M. P. D.; URBAN, M. C. C.; QUEIROZ, M. D. L.; CHIVACCI, L. A.. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos empregando álcool cetílico etoxilado e propoxilado. In: 58ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2006, FLORIANOPOLIS, 2006.

LARSON, E. M.; DOUGHMAN, D. J.; GREGERSON, D. S.; OBRITSCH, W. F. A new, simple, nonradioactive, nontoxic in vitro assay to monitor corneal endothelial cell viability. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 38, n. 10, 1997.

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

- LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Buccal permeation of [D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **Int. J. Pharm.**, v.195, p. 35-38, 2000.
- LEHMANN, L.; KEIPERT, S.; GLOOR, M. Effects of microemulsion on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 52, p. 129-136, 2001.
- LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Medfarma, 2004.
- LIBARDI, F. S. Lato de amônio. **Cosmet. Toiletries**, v.11, n.4, p.50-53, 1999.
- LIMA S. R., JUNIOR V. F., CHRISTO H. B., PINTO A.C.; FERNANDES, P. D. *In vivo e in vitro* sobre a atividade anticancerígena de *Copaifera multijuga* Hayne e suas frações. **Phytotherapy Res.**, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, 2003.
- LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 105, p. 137-147, 2006.
- LOPES, L. B.; LOPES, J. L. C.; OLIVEIRA, D. C. R.; THOMAZINE, J. A.; GARCIA, M. T. J.; FANTINI, M. C. A.; COLLET, J. H.; BENTLEY, M. V. B. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: Characterization and study of in vitro and in vivo delivery, **Eur. J. Pharmaceutic Biopharma.**, v. 63, n. 2, p. 146-155, 2006.
- LOPEZ, R.F.V.; BENTLEY, M.V.L.B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. **Journal of Controlled Release**, v. 14, p. 65-70, 2003.
- MACHADO, P. R.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, S.; CARVALHO, E. M. Mecanismos da resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol**, v. 79, n. 6, p. 647-662, 2004.
- MAGHRABY, G. M. E. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. **International J. Pharm**, v. 355, p. 285-292, 2008.
- MAIA CAMPOS, P. M. B. G. **Determinação de vitaminas lipossolúveis, D3, E e A em cremes cosméticos por cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1990.
- MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. **Cur Drug Delivery.**, v. 3, p. 275-285, 2006.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Colloidal Carriers for Ophthalmic Drug Delivery. **Curr. Drug Targ.**, v. 6, n. 2, p. 363-371, 2005.

MAISTRO, E. D.; CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; KAPLAN, M. A. C. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology.**, v. 28, n. 4, p. 833-838, 2005.

MALMSTEN, M. **Surfactants and polymers in drug delivery. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)**. New York: Marcel Dekker, 368p., 2002,.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAUREJ, R. Two diterpenoids from copaíba oil. **Phytochemistry.**, v. 42, p. 1653-1656, 1996.

MOSER, K., KRIWET, K; NAIK, A.; KAILA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 52, p. 112-113, 2001.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and survival: Application and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 958-969, 2008.

MOURÃO, S.C.; COSTA, P.I.; SALGADO, H.R.M.; GREMIÃO, M.P.D. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholinecontaining liposomes. **Int. J. Pharm.**, v. 295, p. 157-162, 2005.

MULLER-GOYMAMM, 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, n. 2, p. 343-356, 2004.

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; LEONARD, S. S.; YOUNG, S. H.; KOMMINENI, C.; KAGAN, V. E.; CASTRANOVA, V.; SHVEDOVA, A. A. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. **Toxicol.**, v. 257, p. 161-171, 2009.

NACHT, S. Encapsulation and other topical delivery systems. **Cosmetol. Toil., Oak Park.**, v. 110, n. 9, p. 25-30, 1996.

NARISHETTY, S.T.K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. **J. Control. Release**, v. 95, p. 367– 379, 2004.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, COMMITTEE FOR THE REVISION OF NAS PUBLICATION 1138, **Principles and Procedures for Evaluating the Toxicity of Household Substances**, Washington, 1977.

NEGRONI, R. Historical aspects of dermatomycoses, **Clin Dermatol, Mycol**, v. 28, n.2, p. p. 125-132, 2010.

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

NIELSEN, J.A. IN: BARUCHEL, J.; HODEAN, J.L.; LECHMAN, M.S.; REGNARD, J.R.; SCHLENKER, C. **Diffraction, refraction and absorption of x-rays and neutrons: a comparative exposition**. Paris: Spring Verlag, p. 3-21., 1993

NOOR, F.; NIKLAS, J.; MULLER-VIEIRA, U; HEINZLE, E. An integrated approach to improved toxicity prediction for the safety assessment during preclinical drug development using Hep G2 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, p. 221-223, 2009.

O'NEIL, M.J. et al. **The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, 14th Ed. New Jersey: Merck & Co, 2006.

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

OECD 402. **OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Toxicity**, 1987. Disponível:[http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html]. Acessado em: 25/03/2008.

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

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

OECD 434. **OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Toxicity – Fixed Dose Procedure, 2004**. Disponível em: [<http://www.oecd.org/dataoecd/63/24/32037747.pdf>]. Acessado em: 10/07/2008.

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. **Quim. Nova**, v. 27, p. 131-138, 2004.

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

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; DE SOUSA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 51–56, 2004.

PAIVA, S.R., FIGUEIREDO, M.R., ARAGÃO, T.V., KAPLAN, M.A.C. Antimicrobial Activity In Vitro of Plumbagin isolated from Plumbago Species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 959-961, 2003.

PATITUCCI, M. L., VEIGA, V. F., PINTO, A. C, DASGRACAS, M, ZOGHBI, B. S. Use of high-resolution gas-chromatography in the classification of terpenes in crude plant-extracts. **Quim. Nova.**, v. 18, p. 262-266, 1995.

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

PAUL, B.; MOULIK, S. P. Uses and applications of microemulsions. **Curr. Sci.**, v. 80, n. 8, 2001.

PEREIRA, D. G. IMPORTÂNCIA DO METABOLISMO NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS. **Quim. Nova.**, v. 30, p. 171-177, 2007.

PHELAN, M. C.. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. In: **Current Protocols in Cell Biology.**, John Wiley & Sons, Inc, 2007

PIÉRARD, G. E.; ARRESE, J., E.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. Treatment and prophylaxis of tinea infections. **Drugs**, v. 52, p. 209-224, 1996.

PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA, V. F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **J. Brazilian Chem. Society.**, v. 11, p. 355-360, 2000.

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

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

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticle and microparticles for skin drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 63, p. 470-491, 2011.

RAHMAN, A.; AHMAD, V. U. ¹³C-NMR of Natural Product: monoterpenes and sesquiterpenes, 1992.

RAMOS, M. F. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica.** Ribeirão Preto, Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. USP-RP, 2006.

REX, J. H. O desafio das infecções fúngicas no século XXI. Disponível em: <http://ccih.med.med.br/fungos21.html>. Acessado em 20 de março de 2008.

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. **Colloid Surface A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 232, p. 55-65, 2004.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C. **Copaíba: estrutura populacional, produção e qualidade do óleo-resina em populações nativas do sudoeste da Amazônia.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Acre, 2004.

RIOS, J. L., RECIO, M. C., VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **J Ethnopharmacol**, v. 23, p.747-749, 1988.

ROBERTS, M. S.; CROSS, S. E.; PELLET, M. A. Skin Transport. In: **Dermatologic and transdermal formulations.** Walters, K: Marcel Dekker; p. 97-215, 2002.

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

SALERNO, C.; CARLUCCI, A. M.; BREGNI, C. Study of In Vitro Drug Release and Percutaneous Absorption of Fluconazole from Topical Dosage Forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, 2010

SAMPAIO, Sebastião A.P; RIVITTI, Evandro A. **Dermatologia.** 2ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. 3-43p.

SANTOS, A. G.; PEREZ, C. P.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. D.; CAVALHEIRO, A. J. CLERODANE DITERPENES FROM LEAVES OF *Casearia sylvestris* SWARTZ. **Quim. Nova.**, v 30, n. 5, 1100-1103, 2007.

SANTOS, O. D. H. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética *in vivo* de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristal líquido.** 133p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SANTOS, O. D. H.; MIOTTO, J. V.; MORAIS, J. M.; ROCHA-FILHO, P. A.; OLIVEIRA, W. P. Attainment of emulsions with liquid crystals from marigold oil using the required HLB method. **J. Dispersion Sci. Technol.**, v. 26, p. 243-249, 2005.

SARCIAUX, J.M.; ACAR, L.; SADO, P.A. Using microemulsion formulations for delivery of therapeutic peptides. **Int. J. Pharm.**, v. 120, p. 127-136, 1995.

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

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

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

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

SENA, M. A.; CHEN, L. C. Avaliação da mutagenicidade do óleo de Copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desfon) em eritrócitos da medula óssea de camundongos. **Genet Mol Biol**, 1998, 21, 65.

SERQUEIRA, J. A. Optimization of the skin availability of topical products. **Cosmetol. Toil.**, v. 105, p. 114-121, 1990.

SHAPIRO, S.S.; SALIOU, C. Role of vitamins in skin care. **Nutrition**, v. 17, n.10, p.839-844, 2001.

SIDDIG, M. A.; RADIMAN, S.; JAN, L. S.; MUNIANDY, S. V. Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucopone (APG) surfactant. **Colloid Surface A: Physicochemical Eng. Aspects.**, v. 276, p. 15-21, 2006.

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

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

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

STALLARD, N. Statistical evaluation of an acute dermal toxicity test using the dermal fixed dose procedure. **Human Experim. Toxicol.**, v. 23, n. 8, p. 405-412, 2004.

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

TADINI, K.A. **Desenvolvimento e avaliação de formulações dermocosméticas contendo Dimetilaminoetanol (DMAE)**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

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

THOMAS, N.S.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 18, p. 71-79, 2003.

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 33nd. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2010.

VEIGA JR., V. F.; ROSAS, E. C. CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 248–254, 2007.

VEIGA JR., V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M.; PINTO, A. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 476-80, 2001.

VEIGA J. R., V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Quim. Nova.**, v. 25, p. 273-286, 2002.

VEIGA J. R., Valdir F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Quím. Nova**, v. 20, n. 6, 1997.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; HUGHES, T. J.; TAYLOR, H. Plant antimutagenic agents. 1. General bioassay and isolation procedures. **J Nat Prod.**, v. 51, p. 866-873, 1998.

WALTERS, K; ROBERTS, M. S. The structure and function of skin. In: **Dermatologic and transdermal formulations**. Walters, K: Marcel Dekker; p. 1-41, 2002.

WANG, Z.; ZHOU, W.; Li, G. Ternary cubic phases containing ionic liquid. **J. Coll. Interf. Sci.**, v. 318, n. 2, p. 405-410, 2008.

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

WILKENING, S.; STAHL, F. BADER, A. COMPARISON OF PRIMARY HUMAN HEPATOCYTES AND HEPATOMA CELL LINE HEPG2 WITH REGARD TO THEIR BIOTRANSFORMATION PROPERTIES. **DRUG METABOLISM AND DISPOSITION by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 31, n. 8, p. 1035-1042, 2003.

WILLARD H.H., MERRITT L.L., DEAN J.A. Ultraviolet and visible absorption methods. In: *Instrumental Methods of Analysis*. Princeton, NJ: D Van Norstrand; 1965:94-95.

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

APÊNDICE

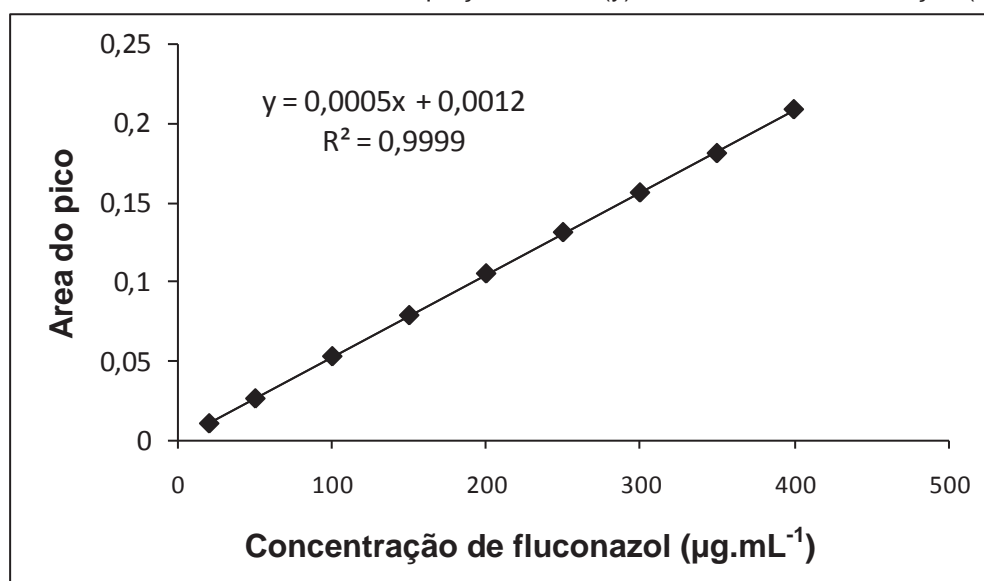
1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO FLUCONAZOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

1.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela obtenção de uma curva (Figura 62) construída a partir das médias de três curvas obtidas com 10 concentrações do fluconazol em solução de fase móvel. Os resultados são apresentados na Tabela 31.

A curva apresentou-se linear, com coeficiente de correlação (r) de 0,9999, dentro do aceitável pela ANVISA que é de 0,99 (BRASIL, 2003).

Figura 62. Curva analítica do fluconazol, equação da reta (y) e coeficiente de correlação (r^2).



Observa-se que o coeficiente de variação entre as amostras foi baixo, sendo o maior de 2,119%. De acordo com a ANVISA, o CV não deve ser superior a 5% nestes ensaios (BRASIL, 2003).

Tabela 33. Resultados obtidos para o ensaio de linearidade

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

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

1.2 Precisão

Foram realizados dois tipos de ensaios para avaliar a precisão: a repetibilidade, no mesmo dia e a intermediária, em dias diferentes.

A Tabela 32 mostra os resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade.

Tabela 34. Resultados obtidos para o ensaio de precisão por repetibilidade.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área*	Desvio Padrão	CV (%)
20	0,01096	1,09801E-04	1,00162
200	0,10386	2,34862E-04	0,22612
400	0,20392	1,58324E-03	0,77639

*Média de três valores. CV- coeficiente de variação.

Na precisão por repetibilidade foi avaliado o CV em relação à área dos picos encontrados para 3 concentrações da curva analítica, baixa, média e alta

(20, 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O CV entre as amostras teve seu maior valor de 1% para a concentração mais baixa, dentro do valor aceitável pela ANVISA

Observa-se que o coeficiente de variação entre as amostras foi baixo, sendo o maior de 2,119%. De acordo com a ANVISA, o CV não deve ser superior a 5% nestes ensaios (BRASIL, 2003) conforme relatado no ensaio de linearidade. O método mostrou-se, portanto preciso.

A Tabela 33 mostra os resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária, realizada em 3 dias consecutivos.

Tabela 35. Resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área*	Desvio Padrão	CV (%)
20	0,01104	1,29853E-04	1,17604
200	0,10484	8,48326E-04	0,80914
400	0,20776	3,42698E-03	1,64952

*Média de três valores. CV- coeficiente de variação.

Observou-se que os valores de CV obtidos estão dentro do aceitável pela ANVISA (<5%).

1.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada usando as mesmas concentrações usadas no ensaio de Precisão, tendo os resultados analisados pelo percentual de recuperação da amostra, expresso pela relação entre as concentrações médias e teóricas, conforme mostra a Tabela 34.

Observa-se que o CV para as amostras de mesma concentração foi menor que 1%, sendo maior na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A recuperação ficou entre 99 e 102%, dentro do limite permitido pela ANVISA que é de 80 a 120%, refletindo um método exato

Verificou-se que o coeficiente de variação entre as amostras foi baixo, sendo o maior de 2,12%. De acordo com a ANVISA, o CV não deve ser superior a 5% nestes ensaios (BRASIL, 2003).

Tabela 36. Resultados obtidos para o ensaio de exatidão.

C. teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área*	DP	CV (%)	Rec (%)
20	0,01111	7,51022E-05	0,67589	99,12
200	0,10317	7,71213E-04	0,74755	101,97
400	0,20362	1,20190E-03	0,59026	101,21

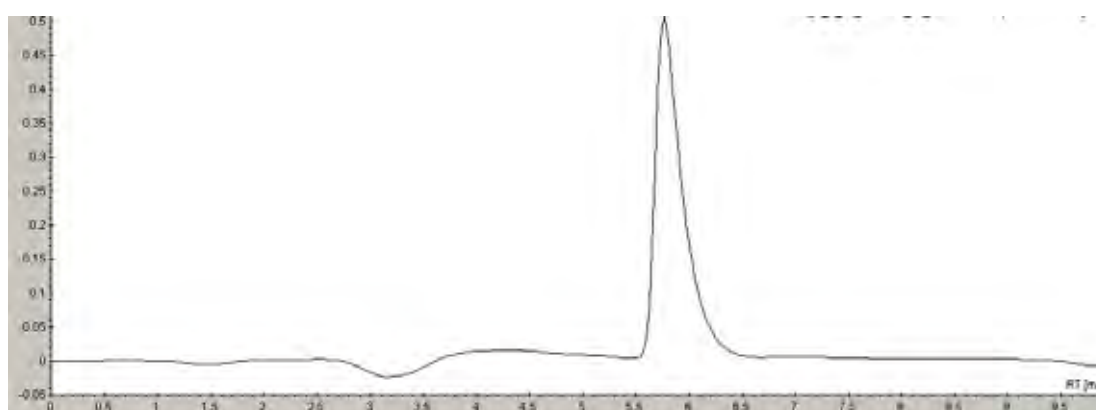
*Média de três valores. CV- coeficiente de variação. Rec – recuperação.

1.4 Especificidade ou seletividade

Foram analisadas amostras de tampão fosfato pH 7,4 contendo fluconazol na concentração de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e nas formulações AO4, OC4 e OS4, com e sem fluconazol.

A Figura 63 mostra a injeção de alíquota do tampão com fluconazol. O teste foi realizado em triplicata e é possível observar que o tampão não interferiu na análise, uma vez que não se observa interferência no pico do fármaco, com tempo de retenção em aproximadamente 6 minutos e 09 segundos.

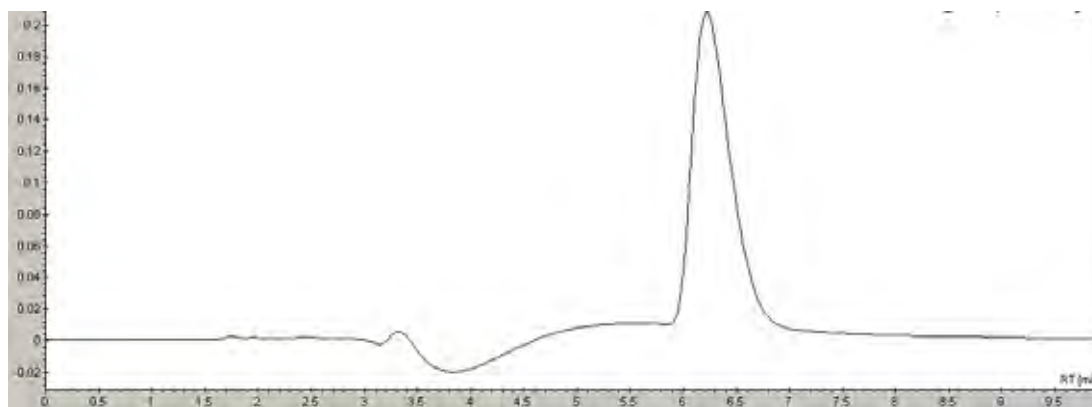
Figura 63. Cromatograma referente injeção de solução tampão fosfato pH 7,4 contendo fluconazol ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$).



Na Figura 64, representativa da injeção de alíquotas das formulações com fluconazol, observou-se que os componentes das formulações não

interferem na análise do fármaco, nem a fase móvel, já que as soluções foram preparadas com a mesma.

Figura 64 Cromatograma de solução das formulações selecionadas contendo fluconazol (150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).



1.5 Limite de detecção e limite de quantificação

limite de detecção e limite de quantificação da análise foram determinados com base nos dados da análise de variância. A metodologia utilizada foi a descrita na literatura (A. A. 2003, 2005; A. A. 2010).

O LD e LQ foram obtidos injetando-se diluições do fármaco referentes às 3 concentrações mais baixas usadas no ensaio de linearidade (20, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), obtendo-se 3 curvas analíticas. Obteve-se os valores dos desvios padrão das médias dos coeficientes angulares das retas (**a**) e os coeficientes lineares (**b**) das mesmas e a partir daí calculou-se LQ e LD com base nas equações 8 e 9:

$3,3 \times \sigma$	$10 \times \sigma$
---------------------	--------------------

1.6 Robustez

Neste ensaio, avaliou-se a interferência de alguns parâmetros na quantificação/recuperação do fármaco. Verificou-se que ao mudar marca da coluna, marca do HPLC e tipo de detector, não houve interferência no pico e tempo de retenção do fármaco. Portanto, o método pode ser considerado robusto.

2 CURVA ANALÍTICA DE FLUCONAZOL EM SOLUÇÃO RECEPTORA TAMPÃO FOSFATO 0,01 M PH 7,4

A curva analítica (Figura 65) construída a partir da análise de fluconazol em tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 pH 7,4 em CLAE foi utilizada nos ensaios de liberação *in vitro*, permeação e cutânea. Esta curva apresentou-se linear, com equação $y = 30,523x + 66,25$ e coeficiente de correlação linear 0,9988, dentro do preconizado pela ANVISA, que é de 0,99 (BRASIL, 2003).

Figura 65. Curva analítica de fluconazol em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4.

