



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



**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO
NA MUCOSA VAGINAL *IN VITRO* DE FORMULAÇÃO
PROPOSTA PARA O TRATAMENTO DA CANDIDÍASE
VAGINAL.**

Jaqueline Martins Gehlen

ARARAQUARA – SP

2012



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



AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO NA MUCOSA VAGINAL *IN VITRO* DE FORMULAÇÃO PROPOSTA PARA O TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VAGINAL.

Jaqueline Martins Gehlen

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa

ARARAQUARA – SP

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, obrigada pelo amor, apoio, incentivo e confiança sempre. Vocês são meu porto seguro, como é bom voltar para a casa quando as coisas na faculdade estão “difíceis”.

À república Lolitas, minha segunda família, obrigada pelos anos de amizade, companheirismo e aprendizado. Obrigada principalmente às moradoras atuais Martini, Mobilete, Rapunzel, Carolzinha, Riquelme, Talharim e Horta; Darla (que está longe e faz uma falta enorme!) e em especial à Diná, que sempre esteve ao meu lado, nas aulas, nos estágios: as coisas não teriam sido as mesmas sem você!

À minha orientadora Profa. Maria Virgínia, obrigada pela oportunidade, pelas orientações e conselhos!

A todos do laboratório de Controle de Qualidade Físico Químico, em especial a Fatiminha.

À Nati Ferri, sempre muito simpática, obrigada por tornar minhas tardes no laboratório mais divertidas e obrigada pela ajuda sempre que precisei.

À Flávia por ter ensinado os meus “primeiros passos” no laboratório.

Ao Marcelinho pelas informações sobre o extrato e pela ajuda na parte de validação de metodologia.

Ao laboratório de Cosmetologia, principalmente à Profa. Vera Isaac, por ter auxiliado na parte de reologia, e à Ilza, pela atenção e simpatia.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial ao Rodrigo e Irani, obrigada pela atenção.

A todos os professores, técnicos e funcionários que, direta ou indiretamente, contribuíram com esse trabalho.

Ao PIBIC/CNPq pelo incentivo em forma de bolsa de iniciação científica.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

I. INTRODUÇÃO	13
II.OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
III.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. <i>Syngonanthus nitens</i>	16
3.1.1. Atividade antifúngica do extrato de <i>Syngonanthus nitens</i>	18
3.2. Mucosa vaginal	19
3.2.1. A organização do tecido epitelial	19
3.2.2. Modelos de estudo da mucosa vaginal	20
3.3. Validação de Metodologia Analítica	22
3.3.1. Especificidade e Seletividade	25
3.3.2. Linearidade.....	25
3.3.3. Intervalo.....	26
3.3.4. Precisão	26
3.3.5. Limite de detecção	27
3.3.6. Limite de Quantificação	28
3.3.7. Exatidão	28
3.3.8. Robustez	28
3.4. Estabilidade Preliminar.....	29
3.4.1. Ensaios Organolépticos.....	30
3.4.2. Ensaios físico-químicos.....	31
3.5. Reologia	32
3.6. Liberação, permeação e retenção	39
3.6.1. Células de difusão para determinação da permeação cutânea <i>in vitro</i>	41

3.6.2. Modelos de liberação de fármacos.....	44
IV.MATERIAIS.....	49
4.1. Matéria-prima, Substâncias e Reagentes.....	49
4.2. Vidrarias e Materiais de Laboratório.....	50
4.3.Equipamentos	50
4.4.Softwarees	51
V. MÉTODOS.....	52
5.1. Coleta e obtenção do extrato de <i>Syngonanthus nitens</i>	52
5.2. Preparo da formulação	53
5.2.1. Creme vaginal	53
5.2.2. Gel vaginal	54
5.3. Validação de metodologia	55
5.3.1. Especificidade e Seletividade	55
5.3.2. Linearidade.....	57
5.3.3. Limite de Quantificação	57
5.3.4. Precisão	58
5.3.5. Exatidão	59
5.3.6. Robustez	60
5.4. Estabilidade Preliminar	61
5.4.1. Ensaios Organolépticos.....	62
5.4.2. Ensaios Físico-Químicos.....	62
5.5.Reologia	63
5.6. Liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal <i>in vitro</i>	64
VI. RESULTADOS.....	69
6.1.Validação de Metodologia	69
6.1.1. Especificidade/Seletividade	69
6.1.2. Linearidade.....	70
6.1.3. Limite de Quantificação	72
6.1.4. Precisão	74
6.1.5. Exatidão	78
6.1.6. Robustez	78
6.1.7. Quantificação de flavonóides totais.....	80

6.2. Estabilidade Preliminar.....	81
6.2.1. Ensaios organolépticos	81
6.2.2. Ensaios Físico-Químicos.....	82
6.3. Reologia	83
6.4. Liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal <i>in vitro</i>	86
6.4.1. Liberação.....	86
6.4.2. Permeação e retenção na mucosa vaginal <i>in vitro</i>	90
VII. CONCLUSÃO	95
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
IX. Anexo – Lista de equações.....	100

RESUMO

A pesquisa de novas substâncias com atividade anti-Candida é importante devido à ocorrência de resistência por parte de algumas destas espécies aos antifúngicos usuais. Araújo e colaboradores (2009) comprovaram a atividade antifúngica do extrato de *Syngonanthus nitens* e torna-se relevante a proposta de formulações e o estudo destas.

O objetivo geral deste trabalho foi a avaliação da liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal *in vitro* de formulação (creme) contendo o extrato de *Syngonanthus nitens*, em comparação com outra formulação proposta (gel), para averiguar qual das formulações apresenta mais vantagens para o tratamento da candidíase.

Foi validado um método analítico para quantificação do extrato de *S. nitens* por espectrofotômetro UV-VIS utilizando o padrão luteolina. Os parâmetros analíticos utilizados para avaliar a credibilidade do método analítico foram: seletividade e especificidade, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. O método analítico proposto mostrou-se satisfatório: apresentou seletividade e especificidade; linearidade (os pontos obtidos nas concentrações de 5 a 30 µg/mL apresentaram-se lineares e com um ótimo coeficiente de correlação linear: 0,99996); precisão e exatidão; robustez; e o limite de quantificação foi de 0,5 µg/mL, com coeficiente de variação menor que 5%.

Além disso, foram realizados testes de estabilidade preliminar e estudos reológicos, e a formulação creme apresentou resultados adequados para o uso proposto e também apresentou estabilidade.

Os ensaios de liberação demonstraram que ambas as formulações apresentam cinética de liberação conforme o modelo de Higuchi, ou seja, a velocidade de liberação do fármaco da matriz do sistema se dá por difusão controlada. Os resultados mostram que as duas formulações apresentam perfil de liberação muito semelhante; o creme apresentou fluxo(J) de 55,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e liberou 34,23% em 24 horas, enquanto que o gel apresentou fluxo de 52,41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e liberou 30,59%. Nos ensaios de permeação na mucosa vaginal *in vitro* após 12 horas, o creme permeou 14,48% e apresentou fluxo (J) de 32,77 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, enquanto que o gel permeou 5,84% e apresentou fluxo duas vezes menor, 15,66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. O creme apresentou retenção no estrato córneo de 10,38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e na derme + epiderme de 69,79 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; o gel apresentou retenção EC de 11,82 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e 80,95 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ficou retido na EP+D. Os resultados apresentados sugerem que a formulação gel é mais adequada de acordo com o propósito do estudo.

Palavras-chave: extrato de *Syngonanthus nitens*, atividade antifúngica, validação de metodologia analítica, liberação, permeação e retenção *in vitro*, mucosa vaginal de porca.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A-B, Artesanato produzido na região do Jalapão utilizando capim-dourado. C, Capítulo de <i>Syngonanthus nitens</i>	18
Figura 2: Curva de fluxo de um líquido Newtoniano.....	35
Figura 3: Curva de viscosidade de um líquido Newtoniano.....	36
Figura 4: Tipos de comportamento de fluxo.	37
Figura 5: Célula de Franz	43
Figura 6: Perfil teórico de concentração do fármaco num sistema matricial em contato direto com um meio de liberação em condições “sink”	47
Figura 7: Equipamento automatizado Microette HANSON 0700-52.....	64
Figura 8: Célula de Franz	65
Figura 9: Curva de linearidade da luteolina, equação de reta (y) e respectivo coeficiente de correlação (R^2).	70
Figura 10: Curva da linearidade incluindo concentrações próximas ao limite de quantificação.	73
Figura 11: Curva de linearidade do extrato de <i>S. nitens</i> , equação de reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (R^2).	81
Figura 12: Teste de varredura de tensão	83
Figura 13: Teste de varredura de frequência.	84
Figura 14: Curva de fluxo (em triplicata).	85
Figura 15: Teste de fluência e recuperação (em triplicata)	86
Figura 16: Modelo de cinética de liberação de zero ordem.	88
Figura 17: Modelo de cinética de liberação de primeira ordem.	89
Figura 18: Modelo de cinética de liberação com aplicação de Higuchi.	89
Figura 19: Permeação na mucosa vaginal <i>in vitro</i> das formulações creme e gel.....	92

Figura 20: Retenção no estrato córneo das formulações creme e gel em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1-
creme 8 horas; 2- creme 12 horas; 3- gel 12 horas).93

Figura 21: Retenção na derme e epiderme das formulações em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1- creme 8
horas; 2- creme 12 horas; 3- gel 12 horas).93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade	24
Tabela 2. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	24
Tabela 3. Composição da formulação de creme vaginal	54
Tabela 4. Composição da formulação de gel vaginal	55
Tabela 5. Teste de especificidade do extrato de <i>S. nitens</i>	69
Tabela 6. Dados do teste de linearidade do padrão luteolina	71
Tabela 7. Dados do teste de limite de quantificação do padrão luteolina	74
Tabela 8. Resultados obtidos na análise da precisão intra-corrida (mesmo analista em dias diferentes).....	75
Tabela 9. Resultado obtidos na precisão inter-corrida (analistas diferentes em dias diferentes)	77
Tabela 10. Valores obtidos no ensaio de exatidão	78
Tabela 11. Valores obtidos no teste de robustez	79
Tabela 12. pH da formulação.....	82
Tabela 13. Liberação do creme	87
Tabela 14. Liberação gel.....	87
Tabela 15. Permeação na mucosa vaginal <i>in vitro</i> creme	91
Tabela 16. Permeação na mucosa vaginal <i>in vitro</i> gel.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Abs – absorbância

CIM – Concentração Mínima Inibitória

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV - Coeficiente de Variação

DP - Desvio Padrão

EC – Estrato córneo

EP + D – Epiderme + Derme

FR - Fator de Resposta

HZ – Hertz

pH – Potencial Hidrogeniônico

R^2 – coeficiente de correlação

RPM – Rotações por minuto

UV-VIS – Ultravioleta Visível

I. INTRODUÇÃO

Syngonanthus nitens pertencem à família das Eriocaulaceae e são popularmente conhecidas como sempre-vivas. Elas possuem porte geralmente herbáceo e hábito caracterizado em roseta, escapos e capítulos. A família é típica dos campos rupestres, ecossistema associado à Cadeia do Espinhaço, que se estende pelos estados de Minas Gerais e Bahia em altitudes entre 900 a 2000 m (GIULIETTI et al., 1987).

Vários autores realizaram estudos com o objetivo de identificar substâncias biologicamente ativas de espécies desta família, apresentando algumas espécies como fontes de importantes compostos fenólicos. Araújo e colaboradores (2009), por exemplo, comprovaram a atividade antifúngica do extrato de *Syngonanthus nitens*. Aliado a importância da Candidíase vaginal e a ocorrência de resistência por parte de algumas destas espécies aos antifúngicos usuais, torna-se relevante a pesquisa de novas substâncias com atividade anti-*Candida*.

A formulação proposta será submetida ao teste de estabilidade preliminar, onde se verificará a estabilidade química desta. Os estudos de estabilidade têm por objetivo avaliar a capacidade de um produto manter as suas características organolépticas, físico-químicas, microbiológicas e de segurança e eficácia. Assim, o estudo da estabilidade deve ser visto como um requisito necessário para a garantia da qualidade do produto (ANVISA, 2004). A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de alguns fatores ambientais (como temperatura, umidade e luz, por exemplo), e de outros fatores que estão relacionados com o próprio produto; como as propriedades físicas e químicas das substâncias ativas e excipientes da

formulação, forma farmacêutica e composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (ANVISA, 2005).

As formulações de uso tópico são submetidas aos ensaios de liberação, permeação e retenção *in vitro* para estudar a cinética de liberação do princípio ativo e absorção dérmica, analisar a quantidade de princípio ativo que ficará retido nas camadas da mucosa vaginal e a quantidade permeada que poderá ser absorvida *in vivo* (CROSS et al., 2008).

Para quantificação do *Syngonanthus nitens* nos ensaios de liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal, foi necessário o desenvolvimento e validação de um método analítico adequado. De acordo com a ANVISA, a validação é um processo que tem como objetivos garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas e assegurar a confiabilidade dos resultados. Para tanto, os parâmetros avaliados são: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de quantificação, exatidão e robustez. A espectrofotometria na região UV-VIS é uma das técnicas analíticas mais empregadas, pois apresenta robustez, possui custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas (LOBINSKI, 1992).

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi a avaliação da liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal *in vitro* de formulação contendo extrato de *Syngonanthus nitens* para uso no tratamento da candidíase vaginal.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar formulação para uso vaginal e combate da Candidíase
- Avaliar estabilidade física preliminar da formulação (Estabilidade Preliminar)
- Validar método analítico para quantificação do *Syngonanthus nitens* por espectrofotômetro UV-VIS.
- Analisar a liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal do princípio ativo *in vitro*, através do estudo de duas formulações propostas (creme e gel).

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Syngonanthus nitens*

Syngonanthus nitens pertencem à família das Eriocaulaceae que são caracterizadas morfológicamente pelas folhas em forma de roseta, de onde partem os escapos e destes escapos surgem às inflorescências do tipo capítulos. Os capítulos e escapos permanecem com aparência de vivos durante muitos anos, mesmo depois de retirados do solo, por isso, muitas espécies desta família são conhecidas popularmente como “sempre-vivas” (SILVA, M. A., 2008).

Ruhland (1903) dividiu Eriocaulaceae em duas subfamílias: Eriocauloideae, incluindo os gêneros Eriocaulon e Mesanthemum, e Paepalanthoideae, incluindo Blastocaulon, Lachnocaulon, Leiostrix, Paepalanthus, Philodice, Syngonanthus e Tonina, sendo a separação basicamente feita através dos caracteres florais. A subfamília Eriocauloideae foi caracterizada por apresentar espécies com o número de pétalas igual ao dobro do número de estames enquanto que a Paepalanthoideae apresenta o número de estames igual ao de pétalas ou possui estas em número reduzido (BOSQUEIRO, 2000).

A importância econômica da família está relacionada à beleza e alta durabilidade das inflorescências que estimulam a comercialização como ornamentação. Mais recentemente, tem-se observado a sua utilização na confecção de acessórios e bijuterias (brincos, anéis, pulseiras e colares), principalmente envolvendo o escapo de *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland. As folhas, frutos e sementes também podem ser utilizados para fins ornamentais (WATANABE, 2009).

O gênero *Syngonanthus* inclui aproximadamente 200 espécies distribuídas na África e Américas, sendo o maior número encontrado na América do Sul, principalmente no Brasil, nos estados de Minas Gerais e Bahia (Cadeia do Espinhaço) (GIULIETTI, 1997).

S. nitens é uma espécie que possui ampla distribuição geográfica e é caracterizada por apresentar escapos longos e dourados. A partir do final da década de 1990, esta espécie passou a ter sua coleta intensificada. Popularmente conhecida como “sedinha” em Minas Gerais, esta espécie tornou-se um meio de subsistência das comunidades rurais na região do Jalapão (Tocantins), onde é conhecida como “capim-dourado” (WATANABE, 2009).

Em relação ao estudo químico, quatro subgêneros que são encontrados no Brasil (*Carpoccephalus*, *Dimorphocaulon* (*Syngonanthus*), *Eulepis* e *Thysanoccephalus*) foram estudados e foi identificada grande quantidade de flavonas, com predominância de O–glicosídeos e C–glicosídeos, derivados da luteolina, e com menor frequência, O–glicosídeos, derivados da apigenina (SILVA, M. A., 2008).



Figura 1: A-B, Artesanato produzido na região do Jalapão utilizando capim-dourado. C, Capítulo de *Syngonanthus nitens*. (Fonte: WATANABE, 2009).

3.1.1. Atividade antifúngica do extrato de *Syngonanthus nitens* (ARAÚJO, 2011)

Araújo (2011) comprovou atividade antifúngica do extrato de escapos de *S. nitens* frente a diferentes cepas clínicas de *C. albicans*. Os resultados obtidos mostraram que todas as cepas utilizadas no estudo foram suscetíveis ao extrato, apresentando valores de CIM entre 62,5 e 250 µg/mL.

Foi testada a atividade sobre a formação de hifas de três concentrações de extrato (1000, 500 e 250 µg/mL) e o extrato de escapos *S. nitens* apresentou capacidade de inibir a formação de hifas, um importante fator de virulência deste microrganismo, após 12 e 24 horas de tratamento.

Em outro teste, Araújo determinou a ação do extrato de *S. nitens* sobre a inibição de crescimento de *C. albicans* em células infectadas, o extrato diminuiu a viabilidade do sistema células/*C. albicans*, significando diminuição da infecção.

A atividade anti-candidíase foi testada através do tratamento de ratas fêmeas infectadas por *C. albicans*. Foram utilizados grupos de 6 animais: grupo controle (não infectados), grupo controle de infecção (infectados e não tratados), grupo controle positivo (infectados e tratados com antifúngico), grupos controle veículo (infectados e tratados com creme base) e grupos tratamentos (tratados com creme contendo o extrato). O creme foi preparado nas seguintes concentrações de extrato: 0,5, 1,0 e 2,0%. Os grupos tratados receberam o creme vaginal duas vezes por dia, por oito dias. No 4º dia após o início do tratamento, observou-se redução significativa da infecção dos grupos tratados, comparado aos grupos controle da infecção e veículo. No 8º dia, os grupos tratados com creme apresentaram redução total da carga fúngica, em todas as concentrações de extrato, comprovando assim a atividade anti-candidíase do extrato de escapos de *Syngonanthus nitens*.

3.2. Mucosa vaginal

3.2.1. A organização do tecido epitelial (SQUIER, 2008)

O epitélio é o tecido que reveste a superfície exterior do corpo e também o interior das cavidades corporais. A classificação do epitélio é baseada nas características, número de camadas celulares, formato das células e função. A pele humana e as mucosas vaginal, oral e do esôfago são compostas pelo epitélio estratificado escamoso. Este tipo de epitélio possui diferentes espessuras

dependendo do local; ele forma uma camada superficial que se adapta de acordo com a necessidade do tecido e protege os tecidos subjacentes de danos mecânicos, químicos e microbianos. O epitélio da pele (epiderme) e algumas regiões da cavidade oral se diferenciam porque são revestidos por uma camada de queratina (são queratinizados). Outras mucosas da cavidade oral, do esôfago e da vagina são cobertas por uma camada menos diferenciada e mais flexível chamada de epitélio não queratinizado. A superfície da mucosa é úmida por causa das secreções das glândulas entre ou adjacentes ao tecido. No caso da cavidade oral estas glândulas são as glândulas salivares, porém deve ser notado que na vagina não existem estruturas deste tipo; na mucosa vaginal a umidade é resultado de secreções de glândulas cervicais. O epitélio é sustentado por um tecido conectivo que possui um importante papel na manutenção e resposta a danos. Este é composto por colágeno com elementos vasculares e do sistema nervoso e fibroblastos com um variável número de células inflamatórias.

A camada epitelial da mucosa escamosa estratificada forma uma barreira de permeabilidade que protege os tecidos mais profundos. Se esta barreira estiver comprometida, então substâncias prejudiciais, se presentes na superfície, podem penetrar e iniciar mudanças patológicas gerando uma doença local ou até mesmo sistêmica.

3.2.2. Modelos de estudo da mucosa vaginal (SQUIER, 2008)

O uso de culturas *in vitro* evita muito dos problemas éticos e regulatórios que existem quando se trabalha com humanos e animais. Porém, na prática não tem sido fácil o crescimento de culturas de tecidos que reproduzam com eficácia a

função de barreira da mucosa vaginal, e a permeabilidade tende a ser 6-10 vezes maior que a determinada em um tecido normal correspondente.

O uso de biopsias de tecido humano ou espécimes cirúrgicos evita alguns dos inconvenientes do uso de modelos de cultura. Vários estudos têm sido feitos para caracterizar as propriedades de barreira da mucosa vaginal humana e estudar a permeação *in vitro*, entretanto a maioria destes estudos tem usado material de mulheres na pos menopausa que passaram por uma histerectomia. Existem vários fatores que precisam ser considerados na comparação de dados colhidos de estudos *ex vivo*; propriedades fundamentais como a idade do doador e o local anatômico podem influenciar os resultados.

Várias pesquisas têm utilizado ratos e camundongos de laboratório no estudo de irritação vaginal. No entanto, a espessa camada queratinizada que reveste a vagina dos roedores pode limitar a comparação dos resultados obtidos com o modelo humano. O coelho provavelmente tem sido o animal mais frequentemente utilizado para o estudo dos efeitos de substancias irritantes da mucosa vaginal e este modelo de estudo é recomendado pelo FDS para avaliação da segurança na fase pré-clínica. Embora uma parte da vagina das coelhas seja revestida por epitélio escamoso estratificado semelhante a vagina humana, a maior parte (aproximadamente dois terços) é revestida por epitélio colunar, que tende a ser mais permeável e menos resistente a danos do que o epitélio estratificado.

A semelhança entre a vagina de porca e humana em termos de pH, secreções, resposta inflamatória, entre outros sugere que o porco é um bom modelo de estudo.

Entre o vasto numero de animais experimentais que podem ser utilizados, o porco tem a vantagem de ser notavelmente similar ao humano em termos de

anatomia, fisiologia, metabolismo e patologias. Estudo comparando a mucosa vaginal de porcas e humanas revelaram semelhanças morfológicas entre as espécies, ambas possuem um epitélio não queratinizado, estratificado e escamoso. A semelhança na estrutura se estende até as células dendríticas no tecido intra-epitelial, e recentemente descobriram que a vagina da porca possui células CD1 e SLA-DR, assim como já descrito na vagina humana.

No nível estrutural, o epitélio da vagina da porca se assemelha muito a humana, incluindo a organização do estrato granuloso e as lamelas intracelulares lipídicas que compõe a barreira de permeabilidade. Dados sobre a composição lipídica do epitélio vaginal de porca e humana indicam concentrações parecidas de lipídeos, incluindo ceramidas, glucosil ceramidas e colesterol que são os componentes mais importantes da barreira. Essas semelhanças se estendem para outros componentes incluindo a água e vasopressina. Por outro lado, existe uma diferença significativa nos valores de compostos mais lipossolúveis, incluindo r-arecolina e ocitocina.

3.3. Validação de Metodologia Analítica

Para a quantificação de *Syngonanthus nitens*, nos testes de liberação, permeação e retenção cutânea, foi necessária a validação de um método analítico. A metodologia empregada na quantificação do ativo foi por espectrofotometria UV-VIS. Devido às suas propriedades e características, este método é muito útil nas análises de fármacos incorporados a cremes, pois não exige separações prévias. Além disso, o método em questão é uma alternativa menos dispendiosa e também eficiente, se comparada ao método da CLAE. A espectrofotometria UV-VIS é

também precisa, sensível, seletiva, reprodutiva e de baixo custo (PASCHOAL et al., 2003).

O principal objetivo da validação de metodologia é demonstrar se o método utilizado é apropriado para a finalidade desejada, seja ela a determinação qualitativa, semi-qualitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, e deve produzir resultados confiáveis. Para tanto, o método deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados à análise. No caso de metodologias analíticas já descritas em farmacopéias ou formulários oficiais, reconhecidos pela ANVISA, a metodologia pode ser considerada validada. Caso contrário, a metodologia será considerada validada desde que sejam avaliados os parâmetros descritos acima, conforme mostrado nas Tabelas 1 e 2 (BRASIL, 2003):

Tabela 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade:

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: BRASIL, 2003.

Tabela 2. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade:

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantita	Ensaio	III	IV
		tivo	limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: BRASIL, 2003.

3.3.1. Especificidade e Seletividade

Especificidade é a capacidade que o método analítico possui de medir um composto em presença de outros componentes (como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz) (BRASIL, 2003).

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz, e às vezes também de outros componentes que não queremos quantificar, mas que podem interferir na medição. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é específico, enquanto que um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são com frequência interpretados de maneiras diferentes (INMETRO, 2007).

3.3.2. Linearidade

A linearidade consiste na capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do princípio ativo na amostra, dentro de um intervalo de tempo específico. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes de analito. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação deve ser igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

A quantificação requer o conhecimento da relação entre a resposta medida e a concentração do analito. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é (INMETRO, 2007):

$$y = ax + b \quad \text{(equação 1)}$$

Na qual:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

3.3.3. Intervalo

O intervalo representa uma faixa de valores que contempla os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Geralmente deriva do estudo de linearidade e depende da aplicação desejada do método. É determinado pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo concentrações de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003).

3.3.4. Precisão

A precisão é determinada pela avaliação da proximidade dos resultados obtidos em várias medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis (BRASIL, 2003):

1. Repetibilidade (precisão intracorrida): é a concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo analista e com mesma instrumentação em um curto período de tempo.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações (baixa, média e alta) , com 3 réplicas cada. Pode ser verificada também com o mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

2. Precisão intermediária (precisão intercorridas): é a concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, porém em dias diferentes (com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes).

Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

3. Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como, por exemplo, em estudos colaborativos. Eles são geralmente aplicados em padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias.

3.3.5. Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra e que pode ser detectado pela metodologia, mas não necessariamente quantificado (BRASIL, 2003).

3.3.6. Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão adequadas sob as condições experimentais determinadas. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do princípio ativo até o menor nível que pode ser determinado (BRASIL, 2003).

3.3.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor considerado como verdadeiro.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade. Ela é verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações (baixa, média e alta), com 3 réplicas cada (BRASIL, 2003).

3.3.8. Robustez

A robustez de um método analítico é a sua capacidade em resistir a algumas variações dos parâmetros analíticos. Se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas for verificada, estas deverão ser controladas e precauções

para que estas variações não ocorram devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

3.4. Estabilidade Preliminar (BRASIL, 2004)

O estudo da estabilidade de produtos farmacêuticos é importante, pois fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa do produto, nas variadas condições que este pode ser submetido desde sua fabricação até o término de sua validade.

Essa estabilidade é relativa, pois pode variar com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações as características do produto. Modificações dentro de limites determinados não são motivos para reprovar o produto.

O estudo da estabilidade de produtos farmacêuticos contribui para orientar o desenvolvimento da formulação e escolha do material de acondicionamento adequado; fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações; estimar o prazo de validade; auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos.

Segundo Monografia da *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*– IFSCC o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo que é baseado em dados obtidos de produtos submetidos a situações que visam acelerar alterações que poderiam ocorrer nas condições de armazenamento de mercado. Como em todo procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso, por isso são considerados preditivos.

O estudo de estabilidade preliminar é realizado na fase inicial do desenvolvimento do produto. Ele emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre os componentes do produto e o surgimento de sinais de instabilidade que devem ser observados e analisados. Devido às condições em que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas serve para auxiliar na triagem das formulações.

A duração do estudo é geralmente de quinze dias, as formulações em teste são submetidas a condições de estresse que visam acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Geralmente as amostras são submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores e a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento.

De modo geral, avaliam-se as características organolépticas e físico-químicas do produto:

- Características Organolépticas: aspecto, cor, odor e sabor, quando aplicável.
- Características Físico-Químicas: valor de pH, viscosidade e densidade, ou outros.

3.4.1. Ensaios Organolépticos (BRASIL, 2004)

Os ensaios organolépticos fornecem parâmetros que permitem avaliar a amostra em estudo por meio de análises comparativas com uma amostra de referência e tem o objetivo de verificar alterações como: separação de fases, precipitação e turvação permitindo o reconhecimento primário do produto. Deve-se

utilizar uma amostra de referência, recentemente elaborada, ou uma amostra, armazenada a temperatura adequada, para evitar modificações nas propriedades organolépticas.

- Aspecto: Observam-se visualmente as características da amostra, verificando se ocorreram modificações macroscópicas.
- Cor: O método utilizado pode ser o visual, onde se compara a cor da amostra com a do padrão estabelecido, em um frasco de mesma especificação.
- Odor: Compara-se o odor da amostra com a do padrão estabelecido, diretamente através do olfato.

3.4.2. Ensaios físico-químicos (BRASIL, 2004)

As avaliações físico-químicas permitem prever problemas que podem afetar a estabilidade e a qualidade do produto.

- Potencial Hidrogeniônico (pH)

Na determinação potenciométrica utiliza-se o pHmetro (peagômetro) e a determinação é medida pela diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra em estudo. É importante utilizar o eletrodo adequado ao tipo de formulação a ser analisada.

- Viscosidade

A viscosidade é um parâmetro que caracteriza reologicamente um sistema e ajuda a determinar se um produto apresenta a consistência ou fluidez adequadas e estabilidade, ou seja, fornece indicação do comportamento do produto ao longo do tempo.

- Centrifugação

O teste de centrifugação produz estresse na amostra aumentando a mobilidade das partículas no seu interior e antecipando possíveis instabilidades. Estas instabilidades poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de *caking*, coalescência, entre outras.

A amostra é centrifugada em temperatura, tempo e velocidade padronizados e em seguida avalia-se visualmente a amostra.

3.5. Reologia

A reologia é estudo do fluxo e descreve a deformação de materiais sólidos, líquidos e semi-sólidos quando sofrem uma tensão (ANSEL, 2007)

A análise reológica permite avaliar a qualidade de um determinado produto, prevendo a sua estabilidade frente a situações de transporte e armazenamento.

Os sólidos ideais se deformam elasticamente, enquanto que os líquidos e gases (fluidos ideais) deformam-se irreversivelmente.

O comportamento reológico é classificado como viscoso ou elástico dependendo das condições de tensão, taxa de cisalhamento e tempo que o material é submetido. A viscosidade de um material é a habilidade que este tem de resistir a

qualquer alteração de suas características (deformação), enquanto que a elasticidade é a capacidade de uma substância retornar ao seu estado original após ter sofrido uma deformação e a tensão de cisalhamento ser reduzida ou interrompida. Os equipamentos que medem as propriedades viscoelásticas de corpos sólidos, semissólidos e fluidos são os reômetros. Os viscosímetros são equipamentos que medem apenas o comportamento de fluxo viscoso (SCHRAMM, 2006).

A elasticidade que também é conhecida como módulo de armazenamento (G'), é representada pela equação 2.

$$G' = (\sigma/\gamma) \cos \delta \quad \textbf{(equação 2)}$$

Na qual:

σ = tensão,

γ = deformação,

δ = retardação de fase (fase lag).

Outro módulo (G''), conhecido como módulo de perda (ou dissipação), é dado por pela equação 3:

$$G'' = (\sigma/\gamma) \sin \delta \quad \textbf{(equação 3)}$$

Este pode ser relacionado à viscosidade (η') através da equação 4:

$$\eta' = G''/\omega \quad \textbf{(equação 4)}$$

Na qual ω é a frequência de oscilação em rad (s^{-1}).

Podemos concluir então que:

$$G''/G' = \tan \delta \quad \textbf{(equação 5)}$$

A $\tan \delta$ é conhecida como tangente de perda (dissipação). Desta forma, um material perfeitamente elástico produzirá uma defasagem de 0° , enquanto que de um fluido perfeito, será 90° (AULTON, 2005).

O comportamento de fluxo de um líquido ideal é descrito pela lei básica da viscosimetria:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \textbf{(equação 6)}$$

Na qual :

τ = tensão de cisalhamento

η = viscosidade

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento

O comportamento de fluxo de um líquido é demonstrado graficamente pela “curva de fluxo” na figura 2, que relaciona a tensão de cisalhamento (τ) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) (SCHRAMM, 2006).

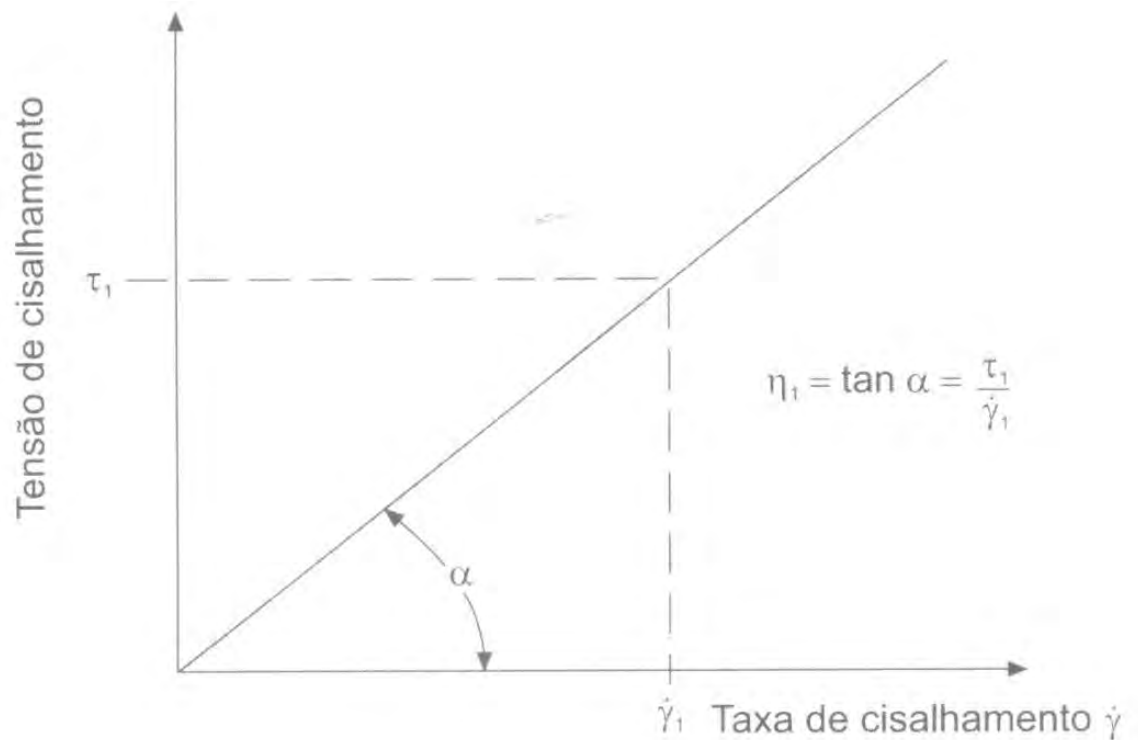


Figura 2: Curva de fluxo de um líquido Newtoniano.

Os materiais são classificados em newtonianos e não newtonianos, dependendo das propriedades de fluxo. O fluxo newtoniano é caracterizado por apresentar viscosidade constante (independente da força), enquanto que no fluxo não newtoniano a viscosidade se altera com o aumento da força de cisalhamento aplicada, e esta alteração pode ser plástica, pseudoplástica ou dilatante (AULTON, 2005).

Para os líquidos que se comportam como líquidos Newtonianos o gráfico da curva de fluxo é uma reta, onde qualquer ponto desta reta define pares de valores para τ e $\dot{\gamma}$. A viscosidade (η) é obtida dividindo-se valores de τ por $\dot{\gamma}$, ou também pode ser definida pela tangente do ângulo de inclinação α : $\eta = \tan \alpha$ (SCHRAMM, 2006).

No caso de líquidos Newtonianos, que o gráfico é uma reta, a razão de todos os pares τ e $\dot{\gamma}$ pertencentes à curva de fluxo é constante, ou seja, a viscosidade não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2006).

Outro gráfico muito comum é o de “curva de viscosidade”, que relaciona η e $\dot{\gamma}$:

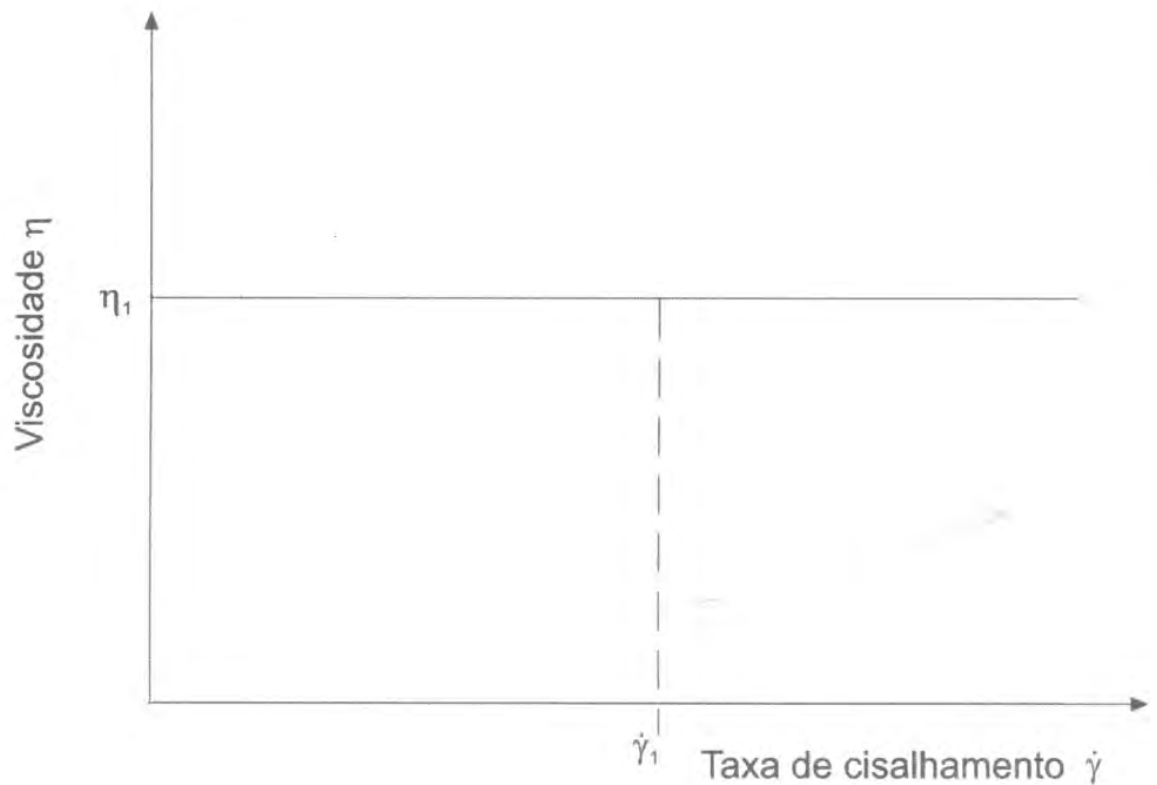


Figura 3: Curva de viscosidade de um líquido Newtoniano.

Os líquidos que não possuem esse comportamento de “fluxo ideal” são conhecidos como líquidos não Newtonianos (SCHRAMM, 2006).

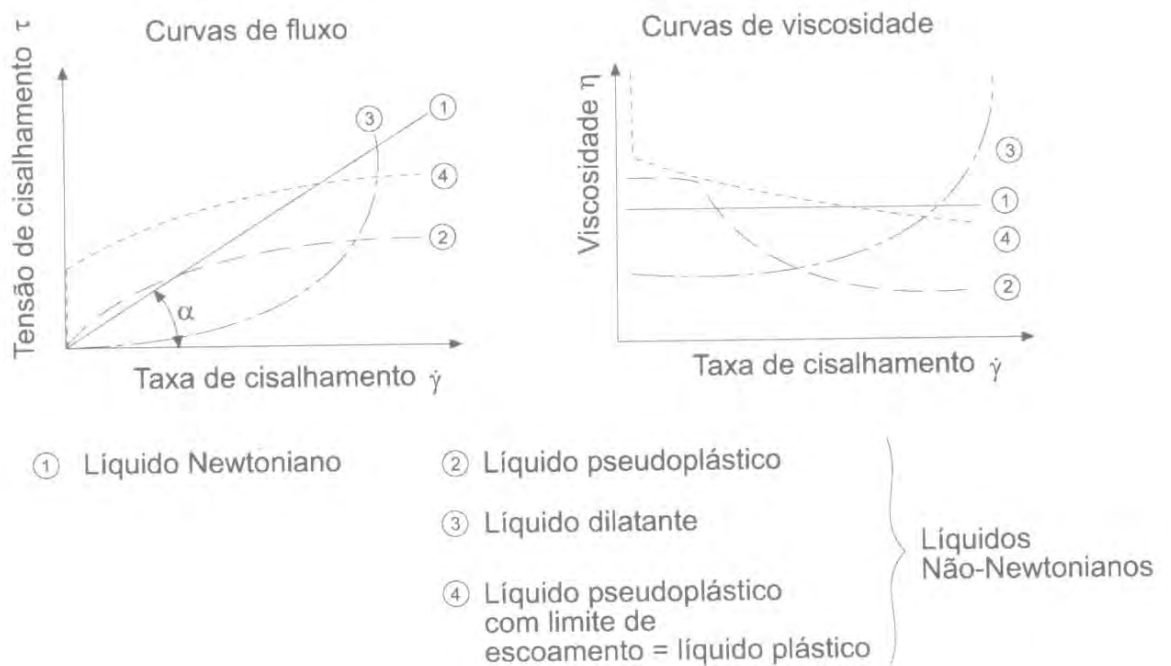


Figura 4: Tipos de comportamento de fluxo.

Os líquidos pseudoplásticos são caracterizados por apresentar diminuição na viscosidade conforme a taxa de cisalhamento aumenta. Para a maioria dos materiais pseudoplásticos o efeito da taxa de cisalhamento é reversível, ou seja, após algum tempo os líquidos recuperam sua viscosidade original quando a taxa de cisalhamento é reduzida ou cessada. Porém, o comportamento de fluxo de líquidos pseudoplásticos não é uniforme: em taxas de cisalhamento muito pequenas eles se comportam de forma semelhante aos líquidos newtonianos, possuindo viscosidade independente do cisalhamento (SCHRAMM, 2006).

As substâncias “dilatantes” também possuem a viscosidade dependente da taxa de cisalhamento, mas ao contrário dos líquidos pseudoplásticos, eles apresentam um comportamento de fluxo dilatante, ou seja, conforme a taxa de cisalhamento aumenta, a viscosidade também aumenta. A dilatância em líquidos é

rara e como este comportamento dificulta as condições de produção, recomenda-se alteração da formulação para reduzir a dilatância (SCHRAMM, 2006).

A plasticidade descreve o comportamento de líquidos pseudoplásticos que possuem limite de escoamento. Estas substâncias possuem um caráter sólido com uma viscosidade extremamente alta devido às forças ligantes no seu interior (forças polares, de Van der Waals, etc) (SCHRAMM, 2006).

Outro fenômeno reológico importante é a tixotropia. Este fenômeno descreve o comportamento de líquidos não Newtonianos sem limite de escoamento que quando o cisalhamento diminui ou é interrompido, este volta ao seu estado original. Em um gráfico de curva de fluxo a curva “superior” (taxa de cisalhamento crescente) se sobrepõe a uma curva “inferior” que corresponde à taxa de cisalhamento decrescente (SCHRAMM, 2006).

Se os fluidos não newtonianos forem submetidos a uma taxa de cisalhamento crescente, e em seguida, esta taxa de cisalhamento for interrompida de modo imediato, a curva descendente estará deslocada em relação à curva ascendente, e o reograma apresentará uma área de histerese. No caso de materiais plásticos e pseudoplásticos, as curvas giram em sentido horário, ou seja, a curva descendente está deslocada para a direita da curva ascendente, e para os materiais dilatantes nota-se o contrário. Esta área de histerese indica a energia necessária para quebrar a estrutura tixotrópica e é utilizada como índice do grau dessa ruptura (AULTON, 2005).

A propriedade de fluxo oposta da tixotropia é a reopetividade. Os líquidos reopéticos ou anti-tixotrópicos são caracterizados pelo aumento da viscosidade e quando a taxa de cisalhamento cessa, recuperam sua forma original, ou seja, de baixo nível de viscosidade (SCHRAMM, 2006).

3.6. Liberação, permeação e retenção

Durante a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos, procedimentos de liberação *in vitro* são importantes para ajudar a selecionar excipientes para as formulações, para que estas possam proporcionar uma atividade terapêutica adequada. Os estudos de liberação de fármacos proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os fármacos (SATO, 2007).

A escolha de um sistema adequado para incorporação de fármacos é de fundamental importância para a estabilidade do produto, para a disponibilidade no local de aplicação e, conseqüentemente, para a obtenção dos efeitos desejados. O veículo tem influência na absorção do fármaco, tendo um papel importante nas formulações tópicas (Florence, Atwood, 2003).

As características de liberação de um fármaco a partir de uma formulação podem ser avaliadas também através da determinação do coeficiente de partição óleo/água, mas os estudos de liberação *in vitro* e *in vivo* proporcionam dados mais significativos (SATO, 2007).

Os sistemas de difusão celular são empregados *in vitro* para determinar a velocidade de liberação dos princípios ativos das preparações tópicas. Nesses sistemas, membranas de pele ou sintéticas podem ser empregadas como barreiras ao fluxo do fármaco e do veículo, simulando assim um sistema *in vivo* (ANSEL, 2007).

A passagem de drogas através da pele (permeação cutânea) tem sido uma importante área de estudo há muitos anos. Experimentos de permeação pela pele *in vitro* são executados no início de vários estudos envolvendo absorção percutânea. Estes experimentos permitem a identificação de informações da formulação que são

importantes para entender a permeação de drogas através da pele. Desta forma, a permeação de drogas através da pele em condições *in vitro* pode ser usada para prever a absorção percutânea em humanos, diminuindo assim inúmeros testes em humanos (FRIEND, 1991).

Alguns fatores fisiológicos devem ser considerados durante a avaliação da permeabilidade da pele humana em ensaios *in vitro*. Um problema é o armazenamento da pele antes de utilizá-la no experimento *in vitro*. Preferencialmente, pele humana fresca deve ser utilizada em estudos de absorção percutânea quando a pesquisa tiver aplicações clínicas (FRIEND, 1991).

Porém é comum congelar a pele humana para armazenamento antes de utilizá-la. Harrison et al. (1984) descobriu que não existe diferença significativa entre a permeabilidade da pele humana armazenada congelada por mais de um ano e a mesma pele fresca. Franz (1975) também concluiu que o congelamento por mais de 3 meses não altera as propriedades de barreira da pele. Estudos mencionam sobre utilizar um único modelo de permeação e pele de apenas um local (FRIEND, 1991).

Os estudos de permeação *in vitro* que utilizam a pele humana são limitados devido às dificuldades de obtenção do material, armazenagem, custos e variabilidade das amostras, que podem variar em qualidade e permeabilidade (ANSEL, 2007).

Pesquisas têm usado por muitos anos peles retiradas de roedores e outros animais. Peles de animais são muito mais fáceis de serem obtidas, além disso, a idade e o sexo dos animais podem ser controlados e um grande número de amostras pode ser obtido (FRIEND, 1991).

Existem vários fatores que podem afetar a liberação da droga, a absorção na pele, a permeação pela pele e o transporte do fármaco para o sistema vascular. Uma forma farmacêutica aplicada topicamente que possui função terapêutica requer informações em relação a estes fatores. Desta forma, experimentos de permeação *in vitro* devem permitir a coleta de informações precisas e se a meta inicial desses experimentos é prever a permeação do fármaco em humanos, devem simular as condições que ocorrem *in vivo* (FRIEND, 1991).

Experimentos de absorção percutânea geralmente requerem equipamentos específicos como um equipamento designado “side-by-side ” ou um outro tipo “flow-through”. Nestes casos, a presença do fármaco na solução receptora ou a diminuição da quantidade de fármaco na forma farmacêutica utilizada é monitorada em função do tempo. Dados coletados são expressos como um perfil de permeação cutânea e existem varias relações matemáticas utilizadas para descrever a permeação de fármacos através da pele (FRIEND, 1991).

3.6.1. Células de difusão para determinação da permeação cutânea *in vitro*

Vários sistemas de difusão têm sido desenvolvidos para serem utilizados com membranas (por exemplo, pele humana ou de animais) em testes de permeação cutânea (FRIEND, 1991).

Estas células de difusão geralmente possuem alguns elementos em comum: dois compartimentos, um contendo o princípio ativo (formulação contendo o fármaco em estudo) e o outro contendo uma solução receptora, em agitação, separados por uma membrana que pode ser a pele. As células de difusão são dispostas geralmente lado a lado (“side-by-side”) ou verticalmente. No caso de compartimentos

“side-by-side” ambos os lados devem ser agitados homoganeamente. A agitação dos compartimentos é geralmente feita através de barras de agitação magnética, porém a agitação adequada em células de difusão pode ser um problema em alguns tipos de células de difusão dependendo do seu formato. A agitação deve ser suficiente para não permitir que o fármaco se concentre em um único local, e também para minimizar a resistência de difusão. O controle da temperatura pode ser realizado através de “banhos de água” externos ou simplesmente submergindo a célula inteira montada em um banho de água (FRIEND, 1991).

Inúmeros tipos de células têm sido utilizados nos últimos 30 anos. No entanto, a maioria destas é classificada em duas categorias gerais: células de difusão “side-by-side” e células de difusão que imitam situações *in vivo* (FRIEND, 1991).

As células de difusão projetadas para imitar condições *in vivo* são sistemas geralmente verticais, na qual o compartimento inferior recebe a solução receptora. Este compartimento é agitado na tentativa de se manter a condição “sink” durante o experimento. Uma vantagem da célula vertical é a habilidade de variar a natureza do veículo doador. Uma película de material pode ser aplicada por evaporação de solvente; pomadas, dispositivos transdérmicos também podem ser estudados. Condições atmosféricas (por exemplo, umidade) podem ser também controladas nessas células (FRIEND, 1991).

A célula de difusão de Franz é um dos sistemas mais utilizados nos estudos de permeação cutânea *in vitro*. Esta célula possui um pequeno compartimento doador e uma câmara receptora em formato de haltere. A parte inferior da câmara receptora se comunica com um tubo cilíndrico mais estreito que se estende para a parte superior do compartimento perto da área de contato com a membrana. No projeto inicial a célula era estática e depois adquiriu uma porta de amostragem por

onde é possível fazer coletas da solução receptora ao longo do experimento. A parte central do compartimento receptor é envolvida por uma câmara de água circulante que serve para controlar a temperatura. Assim como na maioria dos sistemas verticais, o compartimento receptor é agitado por uma barra magnética (FRIEND, 1991).

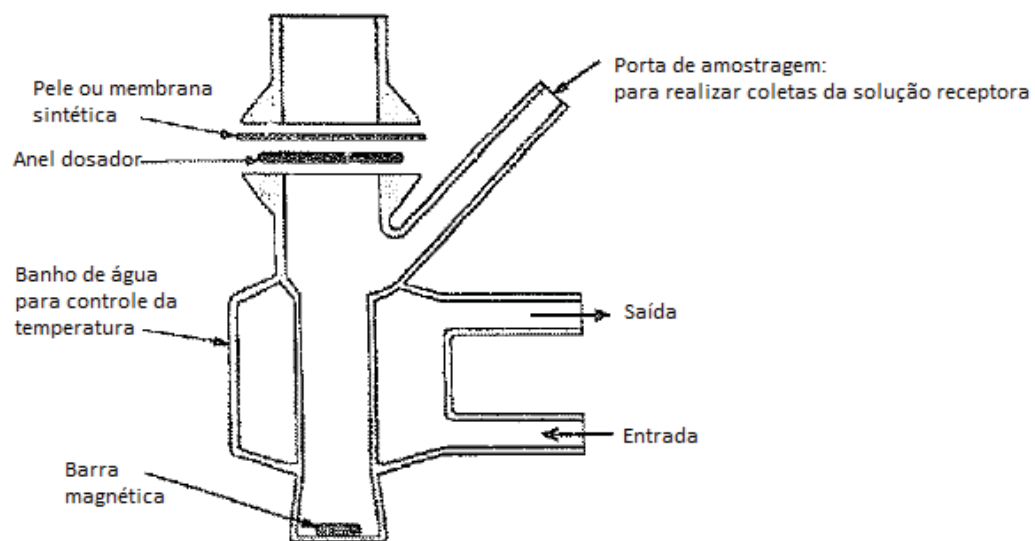


Figura 5: Célula de Franz (Fonte: Friend, 1991).

Várias modificações têm sido feitas na célula de Franz original: um segundo braço lateral foi adicionado para permitir passagem de fluxo durante o procedimento, o compartimento doador pode ser fechado, e pode ser feito em vários tamanhos (FRIEND, 1991).

3.6.2. Modelos de liberação de fármacos

3.6.2.1. Cinética de ordem zero

A equação 7 representa a dissolução de fármacos que ocorre pela liberação do princípio ativo de formas farmacêuticas que não se desagregam, sendo a área constante e desde que não se obtenha condições de equilíbrio.

$$W_0 - W_t = K_t \quad \text{(equação 7)}$$

W_0 é a quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica, W_t é a quantidade de fármaco na forma farmacêutica no tempo t e K é a constante de proporcionalidade. Dividindo esta equação por W_0 podemos transformar a equação e obtemos:

$$f_1 = K_0 t \quad \text{(equação 8)}$$

Sendo $f_1 = 1 - (W_t/W_0)$ **(equação 9)**, f_1 representa a fração de fármaco dissolvido no tempo t e K_0 é a taxa de dissolução ou a constante de liberação de ordem zero. Desta forma, e desde que as condições estabelecidas se mantenham, o gráfico da fração de fármaco dissolvido *versus* tempo será linear (COSTA, 2000).

Em uma reação de ordem zero, a velocidade da reação (decomposição, dissolução, liberação de fármaco) é independente da concentração do princípio ativo. A cinética de ordem zero é com frequência aplicada a processos que ocorrem nas fronteiras entre as fases, onde a concentração na superfície permanece constante porque os sítios de reação estão saturados (cinética enzimática, interação entre fármaco e receptor) ou porque as substâncias são continuamente repostas (ANSEL, 2007).

Nas formas farmacêuticas que seguem a cinética de ordem zero a quantidade de fármaco liberada é dependente do tempo, ou seja, liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo e este é o método ideal de liberação de fármacos quando se deseja um efeito terapêutico prolongado. A expressão seguinte, de um modo simplificado, representa este modelo:

$$Q_1 = Q_0 + K_0t \quad \textbf{(equação 10)}$$

Na qual, Q_1 é a quantidade de fármaco dissolvida no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de fármaco presente na solução (na maioria das vezes, $Q_0 = 0$) e K_0 é a constante de liberação de ordem zero (COSTA, 2000).

3.6.2.2. Cinética de primeira ordem

Na cinética de primeira ordem a velocidade é determinada pela concentração do princípio ativo. Muitas decomposições de fármacos em armazenamento e a passagem de fármacos de um compartimento do corpo para outro seguem a cinética de primeira ordem. A velocidade de reação é mais simplesmente definida como a variação da concentração dividida pela variação de tempo (ANSEL, 2007).

Este perfil de dissolução foi proposto primeiramente por Gibaldi e Feldman (1967) e posteriormente por Wagner (1969) (COSTA, 2000).

O fenômeno de dissolução de uma partícula sólida em um meio líquido é descrito pela Equação de Noyes-Whitney:

$$dC/dt = K (C_s - C) \quad \textbf{(equação 11)}$$

na qual C é a concentração de soluto no tempo t , C_s é a solubilidade no equilíbrio e K é a constante de primeira ordem (COSTA, 2000).

Hixson e Crowell modificaram esta equação da seguinte forma:

$$dW/dt = KS (C_s - C) \quad \text{(equação 12)}$$

Na qual W é a quantidade de soluto no tempo t, dW/dt é a taxa de passagem do soluto para a solução no tempo t e K é uma constante. Brunner et AL. (1900) incorporou o S na equação que é o valor da área de contato do sólido (COSTA, 2000).

A equação de Hixon e Crowell pode ser reescrita, aplicando a integral e os logaritmos decimais, obtém-se a seguinte equação:

$$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t / 2.303 \quad \text{(equação 13)}$$

Na qual Q_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t, Q_0 é a quantidade inicial de fármaco na solução e K_1 é a constante de liberação de primeira ordem. Desta forma, um gráfico do logaritmo decimal da quantidade de fármaco liberada em função do tempo será linear. Nas formas farmacêuticas que seguem esse modelo de dissolução a liberação do fármaco ocorre de forma proporcional à quantidade de fármaco remanescente no seu interior, desta forma, a quantidade liberada por unidade de tempo diminui (COSTA, 2000).

3.6.2.3. Modelo de Higuchi

Higuchi desenvolveu vários modelos teóricos para o estudo da liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis em água incorporados em matrizes sólidas ou semi – sólidas (COSTA, 2000).

A equação 14 exemplifica a dissolução de fármacos a partir de um sistema plano que contém uma matrix homogênea.

$$f_t = Q = [D(2C - C_s) C_s t]^{1/2} \quad \text{(equação 14)}$$

Na qual, Q é a quantidade de fármaco liberada no tempo t por unidade de área, C é a concentração inicial de fármaco, C_s é a solubilidade do fármaco no meio matricial e D é a difusividade das moléculas de fármaco (constante de difusão) na matriz (COSTA&LOBO, 2000).

Essa relação foi proposta pela primeira vez por Higuchi para descrever a dissolução de fármacos em suspensão em pomadas, mas serve para descrever também outros tipos de dissolução de diferentes formas farmacêuticas. Um perfil de concentração para estas formas farmacêuticas pode ser representado pela figura 6:

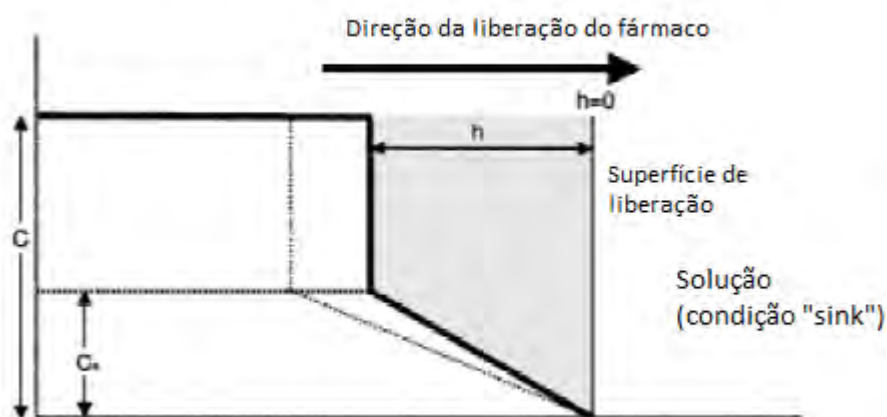


Figura 6: Perfil teórico de concentração do fármaco num sistema matricial em contato direto com um meio de liberação em condições “sink” (Fonte: COSTA&LOBO, 2000).

A linha sólida representa a variação da concentração de fármaco no sistema farmacêutico, após o tempo t , da camada matricial para a superfície de liberação, sendo todo o fármaco liberado rapidamente em condições “sink” perfeitas. A concentração total de fármaco é mostrada na distancia h e nenhuma dissolução

ocorre até que a concentração cai abaixo da solubilidade do fármaco na matriz (C_s). Em distâncias maiores que h , o gradiente de concentração será constante ($C \gg C_s$). No tempo t , a quantidade de fármaco liberado pelo sistema corresponde à área sombreada da figura (COSTA, 2000).

De maneira geral, o modelo de Higuchi é resumido à seguinte expressão (conhecida também como modelo simplificado de Higuchi):

$$F_t = K_H t^{1/2} \quad \textbf{(equação 15)}$$

Na qual K_H é a constante de dissolução de Higuchi (COSTA, 2000).

Higuchi descreve a liberação de fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, ou seja, depende da raiz quadrada do tempo. Esta relação pode ser usada para descrever a dissolução de fármacos de vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada, como no caso de alguns sistemas transdérmicos e comprimidos matriciais com fármacos hidrossolúveis (COSTA, 2000).

IV. MATERIAIS

4.1. Matéria-prima, Substâncias e Reagentes

- Água ultrapura obtida em Sistema Milli Q
- Ácido cítrico (Quemis)
- Ácido clorídrico (Synth)
- Álcool etílico (Quemis)
- Álcool metílico (Quemis)
- Cloreto de alumínio puríssimo hexahidratado (Vetec)
- Durex (Scotch 3M 750)
- Extrato de *Syngonanthus nitens*
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Glicerina (Ely Martins)
- Hidróxido de sódio (Vetec)
- Hidroxietilcelulose (Galena)
- Membrana sintética de acetato de celulose 0,45 µm (Sigma-Aldrich®)
- Metilparabeno (Henrifarma)
- Mucosa vaginal de porca
- Óleo mineral (Tec Lab)
- Padrão luteolina (Sigma-Aldrich®)
- Peróxido de hidrogênio (Synth)
- Polawax (Croda do Brasil)
- Propilenoglicol (Vetec)

- Propilparabeno (DEG)

4.2. Vidrarias e Materiais de Laboratório

- Balão volumétrico
- Bastão de vidro
- Béquer
- Cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm e volume de 2 mL, C9417 Lote 87HD619 (Sigma-Aldrich®)

- Espátula de metal
- Filtro de seringa porosidade 0,45 µm
- Pipetas volumétricas
- Tubos de ensaio
- Vidro relógio

4.3. Equipamentos

- Balança analítica e semi – analítica
- Centrífuga Fisher Scientific
- Espectrofotômetro UV-VIS, SHIMADZU, UV MINI-1240
- Estufa Binder
- Geladeira Consul biplex CDR36
- Microette HANSON 0700-1252
- Peagômetro digital Gehaka
- Reômetro HAAKE, modelo RHEOSTRESS RS-1
- Sensor tipo cone-placa (C35/2°Ti)

- Ultrassom, Branson, Modelo 1210
- Ultra Turrax[®] T25 basic
- Vórtex Phoenix mod.-AT:56

4.4. Softwares

- Software Rheowin 3.0

V. MÉTODOS

5.1. Coleta e obtenção do extrato de *Syngonanthus nitens*

O *Syngonanthus nitens* foi coletado em janeiro de 2008, na região de Diamantina (Minas Gerais) e foi identificado pelo Prof. Paulo Takeo Sano do Instituto de Biociências da USP. Uma exsicata de número **Sano3895** está depositada no herbário IB-USP-São Paulo.

Após secagem em estufa a 40 °C, por 48 horas, as partes aéreas do *S. nitens* foram separadas em capítulos, escapos e folhas e posteriormente foram trituradas em moinho de facas.

Neste estudo utilizou-se o extrato metanólico de escapos de *S. nitens*. A extração ocorreu por maceração e/ou percolação com solventes orgânicos, no caso metanol. As misturas foram filtradas e concentradas em rotoevaporador sob pressão reduzida (temperatura de 45°C). O extrato foi colocado em recipiente de vidro e mantido em capela de exaustão até completa evaporação dos solventes e depois foram armazenados em freezer.

O extrato de escapos de *Syngonanthus nitens* foi fornecido gentilmente pela Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos do Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP- Araraquara.

5.2. Preparo da formulação

Foram propostas duas formulações, creme e gel, para incorporação do extrato de *Syngonanthus nitens*. A utilização de duas formulações foi importante para comparar o perfil de liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal do princípio ativo *in vitro* em sistemas diferentes.

5.2.1. Creme vaginal

A composição da formulação está descrita na tabela 3 abaixo. O creme foi preparado aquecendo-se os componentes da fase oleosa (polawax, óleo mineral e conservantes) e aquosa (glicerina e água) até 70°C. Verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa, com agitação manual constante até o resfriamento. Na temperatura de 35°C, o extrato foi adicionado, dissolvido em propilenoglicol, previamente solubilizado em ultrassom (30 minutos). Verificou-se o pH da formulação, e não foi necessária a acidificação com o ácido cítrico.

Tabela 3. Composição da formulação de creme vaginal

Componente	Concentração (%)
Polawax	12
Óleo mineral	2
Glicerina	2
Água	q.s.p. 100
Metilparabeno	0,15
Propilparabeno	0,02
Propilenoglicol	6
Extrato	0,5
Ácido cítrico	q.s. pH 4,5

5.2.2. Gel vaginal

A tabela 4 mostra a composição da formulação, que foi realizada com o aquecimento de todos os componentes (exceto propilenoglicol, extrato e ácido cítrico) até a geleificação. Após resfriamento adicionou-se o propilenoglicol com o extrato solubilizado com o auxílio do ultrassom (por 30 minutos). Verificou-se o pH da formulação, e não foi necessário o ajuste de pH com o ácido cítrico, pois a formulação já encontrava-se ácida.

Tabela 4. Composição da formulação de gel vaginal

Componente	Concentração (%)
Hidroxietilcelulose	2
Glicerina	2
Água	q.s.p. 100
Metilparabeno	0,15
Propilparabeno	0,02
Propilenoglicol	6
Extrato	0,5
Ácido cítrico	q.s. pH4,5

5.3. Validação de metodologia

5.3.1. Especificidade e Seletividade

A avaliação da especificidade foi realizada com alíquotas de uma solução metanólica do extrato de *S. nitens* na concentração de 400 µg/mL submetidas a cinco condições de degradação por 1 hora: solução de hidróxido de sódio 0,1 N; solução de ácido clorídrico 0,1 N; solução de peróxido de hidrogênio 3%; luz ultravioleta (254 nm) e temperatura (37°C).

As soluções foram preparadas em balão volumétrico de 10 mL. Transferiu-se alíquotas de 1 mL da solução metanólica de extrato de *S. nitens* de concentração 400 µg/mL para balões volumétricos, adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5% e o volume final dos balões foram ajustados com as diferentes soluções propostas para a degradação. Nas amostras expostas à luz ultravioleta e

temperatura o volume foi ajustado com água. Desta forma, a concentração final de extrato em cada balão volumétrico de 10 mL é de 40 µg/mL.

As amostras ficaram ao abrigo de luz e após uma 1 hora foi feita a leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 351 nm.

Para o branco do sistema, foram preparadas soluções contendo 1 mL de metanol e 1 mL de solução de cloreto de alumínio 2,5% em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com as diferentes soluções de degradação.

Para a avaliação da seletividade preparou-se uma solução etanólica contendo 1 g da formulação (na qual o extrato de *S. nitens* encontra-se a 1%), solubilizado em ultra-som por 10 minutos em um balão volumétrico de 50 mL.

Alíquota de 2 mL dessa solução etanólica contendo a formulação foi colocada em um balão volumétrico de 10 mL, onde adicionou-se também 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5% e completou-se o volume com etanol. Obteve-se assim, uma amostra com concentração de extrato igual a 40 µg/mL.

Como branco do sistema utilizou-se alíquota de 2 mL de solução etanólica contendo somente placebo (formulação sem extrato) em balão volumétrico de 10 mL, onde adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio 2,5 % e ajustou-se o volume com etanol.

Ambos, branco e amostra ficaram sob abrigo de luz por meia hora e após esse tempo foram observados os picos de absorbância no espectrofotômetro UV-VIS.

5.3.2. Linearidade

Para avaliação da linearidade foram preparados seis padrões do flavonóide luteolina em diferentes concentrações, em duplicata: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL.

Primeiramente, preparou-se uma solução etanólica de luteolina a 50 µg/mL em um balão volumétrico de 50 mL. A partir desta solução, foram preparadas as 6 amostras contendo concentração entre 5 e 30 µg/mL: transferiu-se alíquotas de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mL da solução etanólica de luteolina a 50 µg/mL para balões volumétricos de 10 mL, contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5 %, e completou-se o volume final de cada balão com etanol. Obteve-se assim, soluções de concentração igual a 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL, respectivamente.

Foi utilizado como branco do sistema, 1 mL da solução de cloreto de alumínio a 2,5 % diluído em etanol em balão volumétrico de 10 mL. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz por meia hora. Depois, foram realizadas as leituras de absorbância em comprimento de onda 351 nm (FUNARI, 2006; ARAÚJO, 2009).

5.3.3. Limite de Quantificação

Para determinação do limite de quantificação utilizou-se uma solução etanólica de luteolina a 50 µg/mL, e a partir desta foram feitas diluições até encontrar a menor concentração de amostra que apresenta absorbância no espectrofotômetro.

A partir desta primeira solução etanólica de luteolina a 50 µg/mL, preparou-se uma segunda solução etanólica de concentração 10 µg/mL, transferindo-se alíquota de 2 mL da primeira para um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com etanol.

Tendo uma solução etanólica de luteolina a 10 µg/mL, obteve-se soluções de 1, 2, 3 e 4 µg/ mL transferindo-se alíquotas de 1, 2, 3 e 4 mL, respectivamente, para balões volumétricos de 10 mL. Em cada balão volumétrico colocou-se também 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5 % e completou-se o volume final de cada balão com etanol.

Sendo necessária a produção de amostras de luteolina de concentração ainda menor para se chegar ao limite de quantificação, preparou-se uma terceira solução etanólica de luteolina de concentração 1 µg/mL: transferiu-se alíquota de 1 mL da solução etanólica de luteolina a 10 µg/mL para um balão volumétrico de 10 mL e diluiu-se com etanol. A partir desta solução etanólica de concentração 1 µg/mL obteve-se amostras de concentrações menores: 0,5 e 0,1 µg/mL, transferindo-se 5 e 1 mL, respectivamente, para um balão volumétrico de 10 mL, na qual adicionou-se também 1 mL de solução de cloreto de alumínio e ajustou-se o volume final com etanol.

As amostras de 0,1; 0,5; 1; 2; 3 e 4 µg/mL foram feitas em duplicata e foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos. Após esse período, foi feita a leitura da absorbância das amostras no comprimento de onda de 351 nm.

Como branco do sistema utilizou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5 % em um balão volumétrico de 10 mL com o volume completado com etanol.

5.3.4. Precisão

A precisão foi avaliada realizando ensaios em dias diferentes com o mesmo analista (repetibilidade), e em dias diferentes com analistas diferentes (intermediária).

A avaliação da precisão intra-corrida (repetibilidade) foi realizada utilizando-se 3 concentrações do intervalo linear: baixa (5 µg/mL); média (15 µg/mL) e alta (30 µg/mL), com três réplicas cada.

Para tal, preparou-se uma solução etanólica de luteolina de 50 µg/mL em um balão volumétrico de 50 mL. Desta solução retirou-se alíquotas de 1, 3 e 6 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se assim, soluções de concentração 5, 15 e 30 µg/mL, respectivamente. A cada balão também se adicionou 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5 % e o volume final foi completado com etanol. As amostras foram mantidas as abrigo de luz por 30 minutos e depois foram lidas as absorbâncias no comprimento de onda de 351 nm. Como branco do sistema utilizou-se solução contendo 1 mL de cloreto de alumínio 2,5 % e etanol para completar o volume do balão volumétrico de 10 mL.

Para a avaliação da precisão inter corrida (intermediária) utilizou-se o mesmo procedimento.

Analizou-se desta forma a concordância dos resultados através do coeficiente de variação.

5.3.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada com três concentrações do extrato de *S. nitens*: 5; 15 e 30 µg/mL, com adição de placebo (formulação sem extrato), em triplicata.

Preparou-se uma solução etanólica de extrato de *S. nitens* 50 µg/mL e placebo. A quantidade de placebo adicionada foi calculada levando-se em consideração que a concentração de extrato na formulação é 1%. Esta solução foi colocada em ultrassom por 10 minutos para melhor solubilização do extrato.

Obtiveram-se amostras de 5, 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$ de extrato retirando-se alíquotas de 1, 3 e 6 mL, respectivamente, da solução etanólica citada acima. Estas alíquotas foram transferidas para balões volumétrico de 10 mL, na qual se adicionou 1 mL de solução de cloreto de alumínio e o volume final foi completado com etanol. Foram preparados 3 brancos para o sistema (um para cada concentração), cada um contendo placebo, solução de cloreto de alumínio 2,5 % e etanol. Os brancos foram preparados da mesma forma que as amostras, porém sem adição do extrato. As amostras e os brancos foram mantidos ao abrigo de luz por 30 minutos. Após esse tempo, foram lidas as medidas de absorbância das amostras em comprimento de onda 351 nm.

5.3.6. Robustez

Para a avaliação da robustez utilizou-se uma amostra do padrão luteolina na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ e três amostras do extrato *S. nitens* na concentração equivalente de padrão. Calculou-se através da linearidade do extrato e da linearidade do padrão que essa relação é de aproximadamente 20%, então se preparou amostras de extrato de concentração 75 $\mu\text{g/mL}$.

As medidas de absorbância foram realizadas variando-se dois parâmetros:

- 1- Tempo de reação com cloreto de alumínio 2,5 %;
- 2- Comprimento de onda.

No primeiro parâmetro, mediu-se a absorbância das amostras após 20, 30 e 50 minutos, no comprimento de onda 351 nm.

No segundo parâmetro variou-se o comprimento de onda para 354 nm.

Para o preparo da amostra de luteolina 15 µg/mL, retirou-se alíquota de 5 mL de uma solução etanólica 30 µg/mL e colocou-se em um balão volumétrico de 10 mL adicionado de 1 mL de solução de cloreto de alumínio 2,5 % e completou-se o volume com etanol. As amostras de extrato foram obtidas retirando-se alíquotas de 3 mL de uma solução etanólica de 250 µg/mL (deixar no ultrassom por 10 minutos para solubilizar extrato) e colocando-se em balões volumétrico de 10 mL. A estes balões também se adicionou 1 mL de solução de cloreto de alumínio e o volume foi completado com etanol. Como branco do sistema utilizou-se solução contendo cloreto de alumínio e etanol.

5.4. Estabilidade Preliminar

Inicialmente, as amostras foram submetidas ao teste de centrifugação a 3000 rpm, por 30 minutos, e avaliadas visualmente verificando seu aspecto, cor, odor, precipitações e separações de fases. As amostras que foram submetidas à centrifugação e não apresentaram sinais de instabilidade foram submetidas aos testes de estabilidade preliminar (ensaio organolépticos e físico-químicos) por um período de 15 dias. As formulações foram expostas à temperatura ambiente, geladeira ($T = 5 \pm 2^{\circ}\text{C}$), estufa ($T = 45 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de 24 horas entre geladeira e estufa. Foram analisados os aspectos macroscópicos, cor, odor, pH e viscosidade no primeiro, sétimo e décimo quinto dia, em triplicata.

A análise do primeiro dia é chamada de análise inicial (AI), sendo esta feita 24 horas após a manipulação da formulação.

Caso a formulação submetida ao teste de estabilidade preliminar não apresente sinais evidentes de instabilidade, esta será submetida aos testes de liberação, permeação e retenção.

5.4.1. Ensaios Organolépticos

As características organolépticas foram avaliadas quanto ao aspecto macroscópico, cor e odor.

5.4.2. Ensaios Físico-Químicos

5.4.2.1. PH

A determinação do pH foi realizada em peagômetro Gehaka, devidamente calibrado, empregando-se o método descrito no Manual of Cosmetic Analysis, no qual adiciona-se 9,0 mL de água destilada e 1,0 g da amostra (Newburger, S. H., 1997).

5.4.2.2. Viscosidade

A viscosidade foi determinada utilizando o Reômetro HAAKE, modelo RHEOSTRESS RS-1, com sensor do tipo cone-placa (C 35/2° Ti) acoplado a um controlador de temperatura HAAKE-C25P. A viscosidade mínima aparente foi obtida

através da curva de fluxo, sendo observada quando a taxa de cisalhamento máxima era alcançada. As análises foram realizadas em triplicata, à temperatura de 30°C. Os dados foram analisados pelo software RHEOWIN 3 Data em computador acoplado ao reômetro.

5.5. Reologia

A reologia da formulação foi analisada em Reômetro HAAKE, modelo RHEOSTRESS RS-1, com sensor do tipo cone-placa (C 35/2° Ti) acoplado a um controlador de temperatura HAAKE-C25P. Os dados foram analisados pelo software RHEOWIN 3.

O comportamento reológico foi avaliado determinando-se: propriedades de fluxo (flow curves) e fluência e recuperação (creep and recovery). Na curva de fluxo as condições utilizadas no ensaio foram taxa de cisalhamento de 0 – 100 s⁻¹ por um período de 120 segundos para curva ascendente e taxa de cisalhamento de 100 – 0 s⁻¹ durante 120 segundos para a curva descendente, à temperatura de 30 ± 0,5 °C.

No ensaio de fluência e recuperação foi utilizado tensão de cisalhamento de 1 Pa por 300 segundos, em temperatura de 30 ± 0,5 °C. A varredura de frequência, foi realizada usando a frequência de 0,1 até 100 Hz e tensão de cisalhamento de 1 Pa, enquanto que na varredura de tensão, a tensão de cisalhamento foi de 0 - 10 Pa, e a frequência de 1 Hz.

5.6. Liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal *in vitro*

Os estudos de liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal *in vitro* foram realizados no equipamento automatizado Microette HANSON 0700-1252, que contém seis células de Franz (figura 8) modificadas com volume aproximado de 7 mL, conforme a figura 7 abaixo:



Figura 7: Equipamento automatizado Microette HANSON 0700-52.



Figura 8: Célula de Franz.

A liberação do fármaco foi avaliada utilizando-se uma membrana sintética de acetato de celulose $0,45\ \mu\text{m}$ e a fase receptora utilizada foi tampão fosfato de potássio monobásico $0,01\ \text{M}$ pH 7,4.

Na formulação creme, a formulação foi colocada até completar o anel dosador do equipamento (aproximadamente 260 mg de formulação e área de exposição de $1,77\ \text{cm}^2$). Quando se utilizou a formulação gel, foi necessário o uso de um copo adaptador (figura), e a quantidade de formulação utilizada foi de aproximadamente 895 mg numa área de exposição de $1,77\ \text{cm}^2$.

Os experimentos foram conduzidos a $37,5\ ^\circ\text{C}$ e a solução receptora foi constantemente agitada a 300 rpm, por meio de um agitador magnético.

Alíquotas de 2 mL foram coletadas automaticamente nos tempos programados (1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas) e as amostras coletadas foram

quantificadas por espectrofotometria UV-VIS de acordo com metodologia validada anteriormente.

As alíquotas de 2 mL foram transferidas para um balão volumétrico de 5 mL com a ajuda de um pipetador, adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio 2,5% e completou-se o volume com etanol. As amostras permanecerem ao abrigo de luz por 30 minutos e após este tempo realizou-se a leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 351 nm. Utilizou-se a curva analítica obtida na validação do método analítico para quantificar o extrato de *Syngonanthus nitens*.

Os ensaios de permeação e retenção na mucosa vaginal *in vitro* foram realizados utilizando a mucosa de vagina de porcas. As vaginas foram obtidas de um abatedor de Araraquara, e após serem recebidas foram lavadas com água destilada e a membrana vaginal foi retirada com auxílio de pinça e bisturi.

A mucosa vaginal foi colocada na célula de difusão, com o lado da derme voltado para baixo, desta forma o estrato córneo ficou em contato com a formulação.

As condições de temperatura e agitação foram mantidas como as descritas no ensaio de liberação.

No ensaio de permeação os tempos de coletas foram 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas. A quantificação das amostras foi realizada por espectrofotometria UV-VIS nas mesmas condições do ensaio de liberação.

Para análise de retenção *in vitro* a mucosa vaginal ficou exposta à formulação por 8 e 12 horas, nas condições já descritas anteriormente.

Ao final do experimento o excesso de formulação foi retirado com auxílio de papel absorvente com suporte de um vidro relógio para não haver perda do princípio ativo. O estrato córneo foi retirado através da técnica de *tape stripping*, utilizando 16 pedaços de fita adesiva (Durex Scotch 3 M 750), e descartando sempre a primeira

fita. As fitas foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL da solução extrato (etanol), agitado em vórtex por 2 minutos e em seguida submetido ao ultrassom por 30 minutos. Uma alíquota de 2 mL foi coletada da solução obtida e foi transferida para um balão volumétrico de 2 mL, adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5%, o volume foi completado com etanol, e então a amostra foi filtrada em membrana 0,45 µm e quantificada por espectrofotometria UV-VIS.

Após a retirada do estrato córneo verificou-se a retenção da derme e epiderme. A mucosa foi picotada com auxílio de uma tesoura e os fragmentos foram transferidos em tubo para centrífuga e adicionou-se 5 mL da solução extratora (etanol). Os tubos foram agitados em vórtex por dois minutos, levados ao homogeneizador Ultra Turrax® por 1 minuto e por fim no ultrassom por 30 minutos. Alíquotas de 2 mL também foram coletados da solução obtida e seguiu-se com o mesmo procedimento do estrato córneo.

A equação abaixo (USP 2010) foi utilizada para calcular a quantidade real liberada/permeada ($Q_{real, t}$) em determinado tempo t :

$$Q_{real, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad \text{(equação 16)}$$

Na qual:

$Q_{real, t}$ = quantidade real liberada/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).

A avaliação do modelo de cinética foi realizada através de tratamento matemático dos resultados obtidos e determinação da ordem de reação: zero ordem (concentração versus tempo), primeira ordem (log da concentração versus tempo) e modelo de Higuchi (concentração versus raiz quadrada do tempo).

VI. RESULTADOS

6.1. Validação de Metodologia

6.1.1. Especificidade/Seletividade

Na tabela 5 abaixo se encontram os resultados obtidos das amostras no ensaio de especificidade, tendo as medidas de absorbância no comprimento de onda de 351 nm, a concentração de extrato correspondente à absorbância e o teor percentual.

Tabela 5. Teste de especificidade do extrato de *S. nitens*.

Condição	Absorbância (nm)	Concentração (µg/mL)	Teor (%)
NaOH 0,1 N	0,1212	8,74	19,42
HCl 0,1 N	0,4690	32,85	73,00
Peróxido 3%	0,4172	29,26	65,02
Luz	0,3948	27,71	61,57
Temperatura	0,4182	29,33	65,18

Calculou-se a concentração de extrato a partir da equação de reta $y = 0,0722x - 0,0049$, obtida no teste de linearidade (item 6.1.2) e também levou-se em consideração a quantificação do flavonóide luteolina no extrato de *Syngonanthus nitens* (item 6.1.7).

O teor percentual foi calculado considerando a concentração de 45 µg/mL como 100%, que foi a concentração real da solução metanólica de extrato de *S. nitens*.

No teste de seletividade foram observados dois picos de absorbância em espectros diferentes: um pico no comprimento de onda 359,0 (com absorbância igual a 0,5044) referente à amostra; e outro pico no comprimento de onda 258,0 (com absorbância de 1,3241) referente à formulação placebo (sem extrato). Assim, evidenciamos a não interferência do placebo no pico do extrato.

6.1.2. Linearidade

A figura 9 apresenta a curva de linearidade obtida a partir de 6 concentrações do padrão luteolina e os resultados obtidos encontram-se na tabela 6.

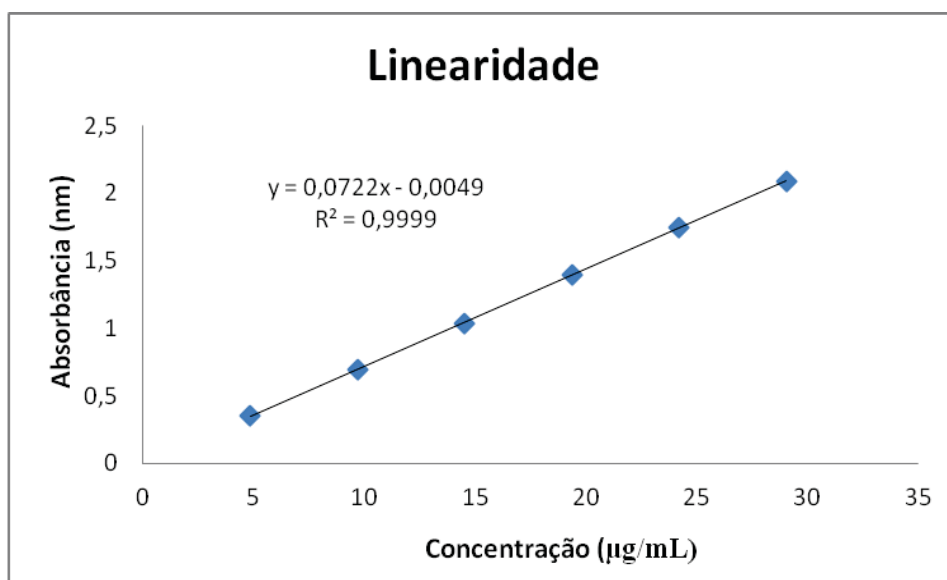


Figura 9: Curva de linearidade da luteolina, equação de reta (y) e respectivo coeficiente de correlação (R^2).

A curva da figura 9 apresentou-se linear no intervalo de concentração de 5 a 30 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,99996. O critério mínimo aceitável pela ANVISA é de 0,99 (BRASIL, 2003).

A equação de reta que correlaciona as duas variáveis (concentração e absorbância) é: $y = 0,0722x - 0,0049$.

Tabela 6. Dados do teste de linearidade do padrão luteolina.

[] teórica (µg/mL)	[] real (µg/mL)	Abs* (nm)	FR	DP	CV (%)	CV geral (%)
5	4,84	0,3498	13,83	0,0064	1,8393	
10	9,68	0,6889	14,05	0,0042	0,6158	
15	14,52	1,0377	13,99	0,0066	0,6337	0,6333
20	19,36	1,3916	13,91	0,0119	0,8587	
25	24,2	1,7504	13,82	0,0105	0,6019	
30	29,04	2,0873	13,91	0,0092	0,4404	

*média de dois valores, [] – concentração, abs – absorbância, FR – Fator de Resposta, DP – desvio padrão e CV – coeficiente de variação.

O fator de resposta foi calculado pela razão entre a concentração do padrão e a média da absorbância.

O coeficiente de variação foi calculado pela equação 17:

$$CV = \frac{DP}{M} \times 100$$

M

(equação 17)

Na qual:

CV = coeficiente de variação

DP = desvio padrão das medidas de absorbância

M = média das medidas de absorbância

A concentração real é consequente da quantidade de padrão pesada e as diluições feitas para o preparo das amostras. Observa-se na tabela 6 que o maior coeficiente de variação foi 1,84%, ainda dentro do valor permitido que é 5%. O coeficiente de variação entre todas as amostras é o coeficiente de variação geral e foi de 0,63%.

6.1.3. Limite de Quantificação

Na figura 10 encontra-se a curva obtida na linearidade, acrescida das concentrações 4,0; 3,0; 2,0; 1,0 e 0,5 µg/mL, utilizadas no ensaio de limite de quantificação.

O limite de quantificação obtido foi a menor concentração de padrão determinada e foi de 0,5 µg/mL. Não foram testadas concentrações menores, pois não é esperado encontrar valores menores que este nos testes de liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal.

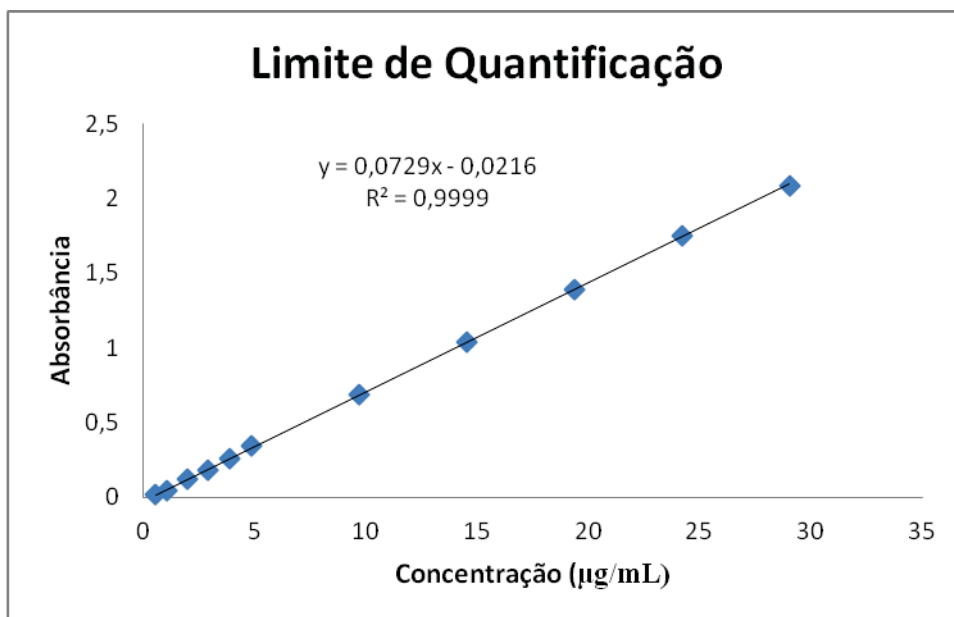


Figura 10: Curva da linearidade incluindo concentrações próximas ao limite de quantificação.

Observa-se que a curva analítica da linearidade acrescida de concentrações menores continua linear. Nota-se também que o valor obtido do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,99997$) ficou muito próximo ao obtido na análise de linearidade demonstrada na figura 9. Conclui-se que a inclusão de concentrações menores na curva analítica da linearidade não modificou significativamente os resultados da linearidade.

O coeficiente de variação da concentração 0,5 µg/mL foi 2,51%, ou seja, encontra-se dentro do limite especificado pela ANVISA que é de 5% (BRASIL, 2003). As concentrações menores apresentaram coeficiente de variação maior, mas não ultrapassaram os 5% permitidos.

A tabela 7 possui os dados obtidos no ensaio do limite de quantificação:

Tabela 7. Dados do teste de limite de quantificação do padrão luteolina.

[] teórica (µg/mL)	[] real (µg/mL)	Abs* (nm)	FR	DP	CV (%)
4	3,872	0,2583	14,9874	0,000636	0,2463
3	2,904	0,1855	15,6508	0,000495	0,2668
2	1,936	0,1206	16,0464	0,001485	1,2308
1	1,06	0,0482	21,9689	0,001626	3,3707
0,5	0,53	0,0196	26,9720	0,000495	2,5189
0,1	0,106	-0,0021	-	-	-

*média de dois valores, [] – concentração, abs – absorbância, FR – Fator de Resposta, DP – desvio padrão e CV – coeficiente de variação.

6.1.4. Precisão

Foram avaliadas a precisão por repetibilidade (intra-corrída) e a precisão intermediária (inter-corrída). A primeira com ensaios em dias diferentes com o mesmo analista e a segunda, com analistas diferentes em dias diferentes.

6.1.4.1. Repetibilidade

A tabela 8 apresenta os resultados obtidos na precisão por repetibilidade.

Tabela 8. Resultados obtidos na análise da precisão intra-corrida (mesmo analista em dias diferentes).

DIA	[] real (µg/mL)	Abs* (nm)	FR	DP	CV (%)	CV geral (%)
1	4,96	0,2538	19,5455	0,004285	1,6886	
	14,88	0,7884	18,8744	0,013109	1,6628	
	29,76	1,5816	18,8160	0,009508	0,6011	1,1443
2	4,84	0,3498	13,8345	0,006435	1,8393	
	14,52	1,0377	13,9918	0,006576	0,6337	
	29,04	2,0873	13,9127	0,009192	0,4404	

*média de três valores, [] – concentração, abs – absorvância, FR – Fator de Resposta, DP – desvio padrão e CV – coeficiente de variação.

O coeficiente de variação foi calculado pela equação 17:

$$CV = \frac{DP}{M} \times 100$$

M

(equação 17)

Na qual:

CV = coeficiente de variação

DP = desvio padrão das medidas de absorvância

M = média das medidas de absorvância

O fator de resposta é obtido pela razão entre a concentração e a absorvância de cada amostra.

Neste teste foram utilizadas três concentrações, baixa, média e alta (5, 15 e 30 μmL). Para a comparação entre os resultados, foram utilizadas as absorbâncias obtidas nas três concentrações no teste de linearidade e as absorbâncias do teste de precisão realizado em outro dia pelo mesmo analista.

O coeficiente de variação geral, de todas as amostras nos diferentes dias e diferentes concentrações foi de 1,14%. De acordo com a ANVISA, o valor máximo aceitável do coeficiente de variação é definido de acordo com a metodologia utilizada, a concentração do fármaco na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não são admitidos valores superiores a 5% (BRASIL, 2003). Conclui-se que o método possui concordância entre os resultados de diferentes dias efetuados pelo mesmo analista.

6.1.4.2. Precisão intermediária

A tabela 9 apresenta os resultados da precisão intermediária.

Tabela 9. Resultado obtidos na precisão inter-corrida (analistas diferentes em dias diferentes)

DIA	[] real (µg/mL)	Abs* (nm)	FR	DP	CV (%)	CV geral (%)
1	5	0,2493	20,0588	0,003262	1,3088	0,9559
	15	0,7370	20,3519	0,007525	1,0210	
	30	1,4657	20,4685	0,007217	0,4924	
2	4,84	0,3498	13,8345	0,006435	1,8393	
	14,52	1,0377	13,9918	0,006576	0,6337	
	29,04	2,0873	13,9127	0,009192	0,4404	

*média de três valores, [] – concentração, abs – absorvância, FR – Fator de Resposta, DP – desvio padrão e CV – coeficiente de variação.

Na precisão intermediária o coeficiente de variação e o fator de resposta foram calculados do mesmo modo que na precisão por repetibilidade (item 6.1.4.1.). Para comparação entre os valores, foram utilizadas as absorvâncias das três concentrações obtidas no teste de linearidade e as absorvâncias obtidas na precisão intermediária realizada por outro analista em dias diferentes.

O coeficiente de variação entre todas as análises com as amostras em diferentes dias e diferentes concentrações foi de 0,95%. Considera-se que o método analítico possui precisão se apresentar coeficiente de variação menor ou igual a 5% (BRASIL, 2003).

6.1.5. Exatidão

Na tabela 10 encontram-se os resultados obtidos na análise da exatidão do método analítico.

Tabela 10. Valores obtidos no ensaio de exatidão

[] teórica µg/mL	[] real µg/mL	Abs* (nm)	FR	DP	CV (%)	CV geral (%)
5	5,06	0,0548	92,3358	0,000557	1,0160	
15	15,18	0,1673	90,7533	0,000666	0,3981	1,3268
30	30,36	0,3375	89,9644	0,001097	0,3250	

*média de três valores, [] – concentração, abs – absorvância, FR – Fator de Resposta, DP – desvio padrão e CV – coeficiente de variação.

O fator de resposta foi obtido dividindo-se a concentração pela média de absorvância de cada amostra. O coeficiente de variação foi calculado através da equação 17 (item 6.1.4.1.).

Nota-se que o coeficiente de variação entre as amostras nas três concentrações foi de 1,33%, menor que 5% permitido pela ANVISA.

6.1.6. Robustez

A tabela 11 apresenta os resultados obtidos na robustez.

Nos três primeiros testes o parâmetro variado foi o tempo de reação com a solução de cloreto de alumínio a 2,5%. No primeiro, a medida da absorvância foi lida

após 20 minutos de reação, no segundo após 30 minutos e no terceiro após 50 minutos. No teste quatro variou – se o comprimento de onda para 354 nm.

Tabela 11. Valores obtidos no teste de robustez

Teste		Abs (nm)	Teor (%)	Média (%)	CV (%)
1	Padrão	1,0918			
	Amostra 1	0,8992	90,3247		
	Amostra 2	0,9329	93,7099	92,5179	2,0555
	Amostra 3	0,9310	93,5190		
2	Padrão	1,0828			
	Amostra 1	0,9261	93,8000		
	Amostra 2	0,9370	94,9041	94,4584	0,6161
	Amostra 3	0,9347	94,6711		
3	Padrão	0,9659			
	Amostra 1	0,9172	104,1419		
	Amostra 2	0,9360	106,2765	105,7050	1,2960
	Amostra 3	0,9397	106,6966		
4	Padrão	1,0713			
	Amostra 1	0,9342	95,6362		
	Amostra 2	0,9481	97,0592	96,5507	0,8220
	Amostra 3	0,9471	96,9568		

Abs – absorbância, CV – coeficiente de variação, Média – média dos três valores de teor.

O teor foi calculado utilizando a equação 18:

$$\frac{AA \times [Pd] \times 100}{AP \times [Am]}$$

(equação 18)

Na qual,

AA = absorbância da amostra

AP = absorbância do padrão

[Pd] = concentração do padrão

[Am] = concentração da amostra

Sabe-se que a concentração de luteolina no extrato de *S. nitens* é de aproximadamente 19,98% (item 6.1.7), então a concentração de cada amostra foi calculada em função do padrão luteolina.

6.1.7. Quantificação de flavonóides totais

Determinou-se a quantificação do flavonóide luteolina no extrato de *Syngonanthus nitens*. Para isto, realizou-se um teste de linearidade do extrato na qual foram medidas as absorbâncias de três soluções com diferentes concentrações: 30,72; 38,4 e 76,8 µg/mL.

Baseou-se na equação de reta $y = 0,0136x + 0,0238$ para obter a concentração da amostra em equivalente de luteolina. A figura 11 apresenta a curva de linearidade obtida a partir das três concentrações do extrato de *S. nitens*.

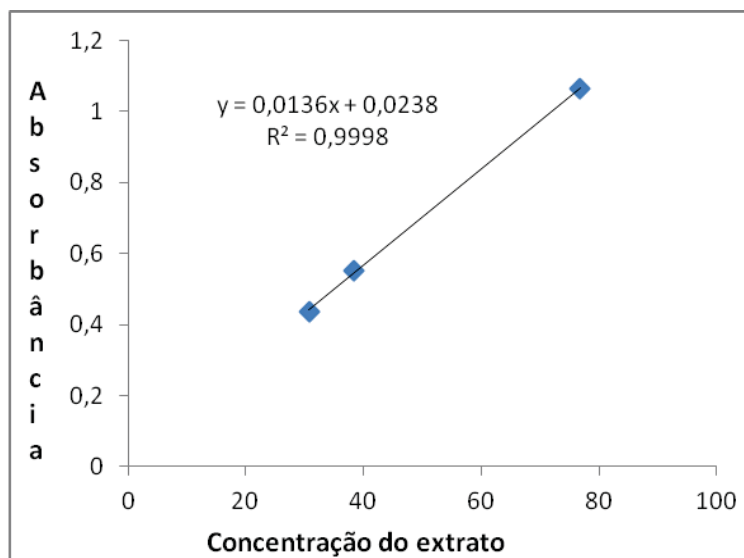


Figura 11: Curva de linearidade do extrato de *S. nitens*, equação de reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (R^2).

Calculou-se que a concentração de luteolina no extrato de *S. nitens* é de aproximadamente 19,98%.

6.2. Estabilidade Preliminar

6.2.1. Ensaio organolépticos

A formulação apresentou aspecto de creme homogêneo, de cor bege esverdeado, opaco, com odor característico do extrato de *S. nitens*.

Durante o período de análise, em nenhuma das condições, na qual a formulação foi exposta, houve alterações da formulação quanto ao aspecto, cor e odor.

6.2.2. Ensaio Físico-Químicos

6.2.2.1. pH

Na tabela 12 encontram-se os valores de pH medidos no primeiro, sétimo e décimo quinto dia.

Tabela 12. pH da formulação

	T.A.	5°C	45°C	Ciclo
1º dia*	4,32	4,32	4,32	4,32
7º dia*	4,31	4,3	4,25	4,25
15º dia*	4,23	4,25	4,11	4,13
DP	0,049	0,036	0,107	0,096
Média	4,286	4,29	4,226	4,233
CV (%)	1,151	0,840	2,53	2,27

*média de três valores; DP – Desvio Padrão; CV – Coeficiente de Variação

Conforme mostrado na tabela, o pH da formulação durante a estabilidade preliminar sofreu pequenas variações. O pH apresentou valores entre 4,11 e 4,32. Nota-se que os maiores coeficientes de variação são os referentes às condições de estufa e ciclo, enquanto o menor coeficiente de variação foi observado na geladeira. As médias obtidas na temperatura ambiente e geladeira foram muito semelhantes, assim como a da estufa e ciclo.

6.3. Reologia

A figura 12 representa os resultados da varredura de tensão e a varredura de frequência está representada da figura 13.

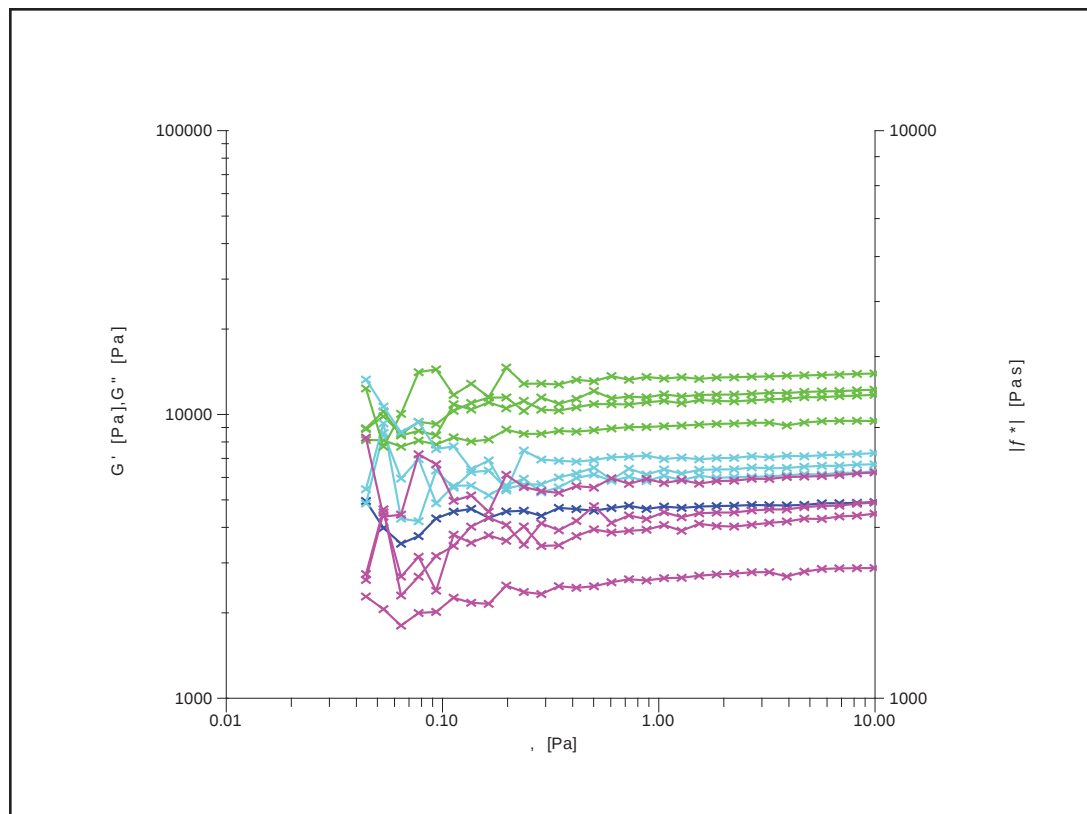


Figura 12: teste de varredura de tensão

G' (verde) = módulo elástico, G'' (azul) = módulo viscoso, η (rosa) = viscosidade complexa.

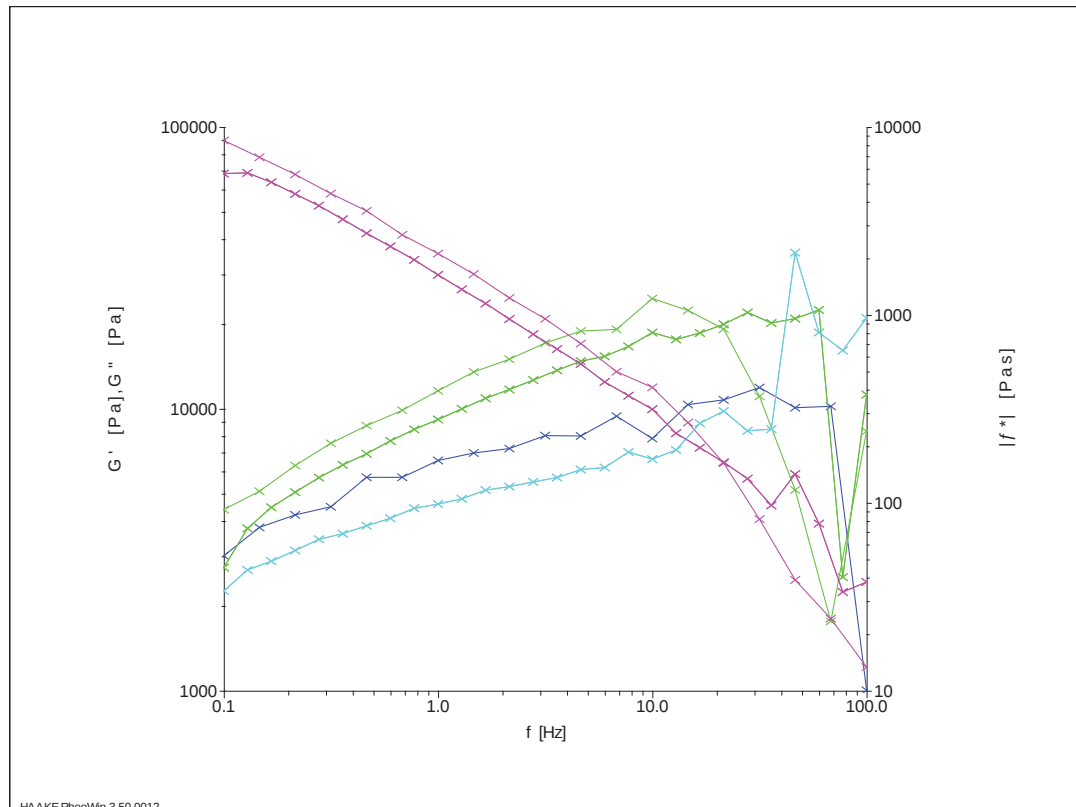


Figura 13: teste de varredura de frequência.

G' (verde) = módulo elástico, G'' (azul) = módulo viscoso, η (rosa) = viscosidade complexa.

No teste de varredura de tensão, figura 12, observa-se o módulo de estocagem (G), e verifica-se que G' encontra-se acima de G'' , indicando grande estabilidade da formulação, pois o módulo de armazenamento é maior que o módulo de perda. Podemos observar que até a tensão 10 Pa aplicada à formulação apresentou uma região quase linear de viscoelasticidade.

A caracterização do comportamento viscoelástico da formulação também foi avaliado através da observação dos módulos G' , G'' e η em função da frequência (Hz). Podemos verificar que o componente elástico G' (módulo de armazenagem) permanece em quase toda a faixa de frequência acima do componente viscoso G'' (módulo de perda), indicando comportamento mais elástico da amostra.

Abaixo na figura 14 pode-se observar a curva de fluxo.

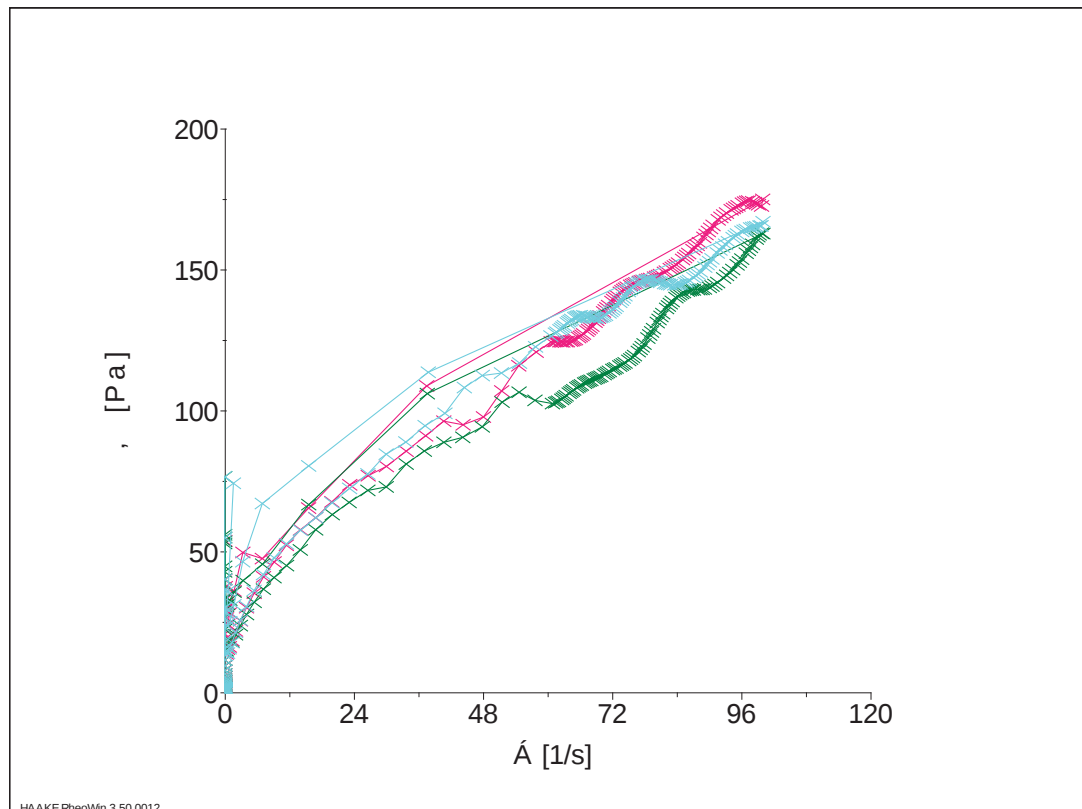


Figura 14: curva de fluxo (em triplicata).

De acordo com a curva de fluxo (figura 14), podemos caracterizar a formulação creme como um sistema não newtoniano, pois não apresentou linearidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento, sendo que o perfil da curva de fluxo é característico de um fluido pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. Além disso, podemos observar a formação de uma área de histerese, caracterizando um sistema tixotrópico.

No teste de fluência e recuperação (figura 15), na qual observamos se a característica inicial do sistema é recuperada após deformação causada por taxa de cisalhamento aplicada em uma tensão fixa, a recuperação foi quase 50 % como pode ser observado na figura 15.

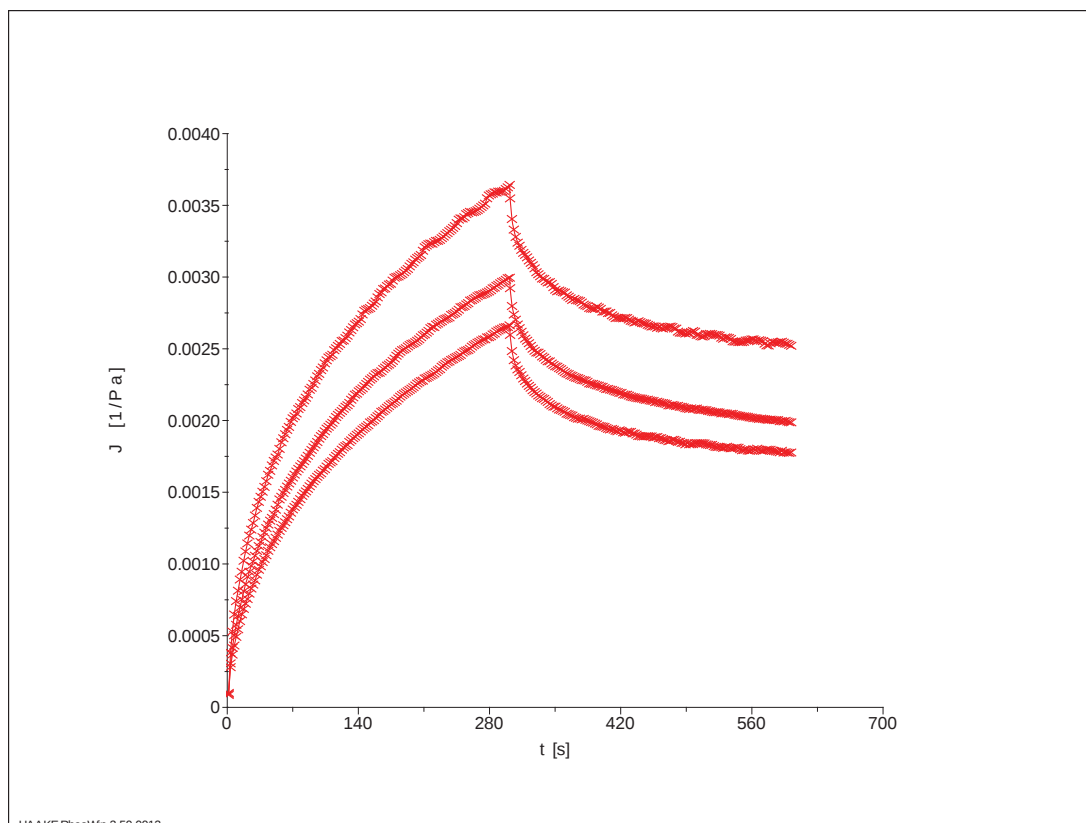


Figura 15: teste de fluência e recuperação (em triplicata).

6.4. Liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal *in vitro*

6.4.1. Liberação

O ensaio de liberação foi realizado para verificar a capacidade da formulação de liberar o fármaco e determinar a quantidade liberada deste em intervalos específicos de tempo. Também foi objetivo do estudo caracterizar os sistemas quanto ao modelo cinético de liberação.

Foram avaliadas as liberações das duas formulações propostas, creme e gel, nos seguintes tempos: 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas.

Os resultados estão apresentados nas tabelas 13 e 14:

Tabela 13. Liberação do creme

Tempo (horas)	Média Q real, t ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV %
1	37,34	5,11	1,24
2	60,19	8,24	2,04
4	92,17	12,62	2,34
6	117,33	16,07	3,98
8	140,70	19,27	3,93
12	176,91	24,23	5,92
24	249,99	34,23	4,27

CV% - Coeficiente de variação percentual

Tabela 14. Liberação gel

Tempo (horas)	Média Q real, t ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV %
1	23,18	3,17	4,44
2	40,26	5,51	2,51
4	63,00	8,63	2,73
6	87,81	12,02	3,59
8	115,95	15,88	2,94
12	148,14	20,29	2,04
24	223,33	30,59	2,79

CV% - Coeficiente de variação percentual

A quantidade real liberada (Q_{real}, t) em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ foi calculada utilizando a equação 16 descrita no item 5.6. A tabela apresenta também a % liberada por cm^2 que foi calculada levando em consideração a quantidade de amostra colocada no anel dosador (ou copo adaptador, no caso do gel) no ensaio de liberação e a concentração do princípio ativo presente na formulação. Calculou-se também o coeficiente de variação a partir do desvio padrão entre os valores de Q_{real}, t obtidos.

Os valores de coeficiente de variação obtidos entre as amostras são menores que 10%, atendendo às especificações, em ambas as formulações (SCCP, 2006).

As figuras 16, 17 e 18 apresentam as diferentes cinéticas de liberação e a comparação entre os dois sistemas, desta forma, podemos definir o modelo de cinética que melhor caracteriza a liberação do princípio ativo das formulações.

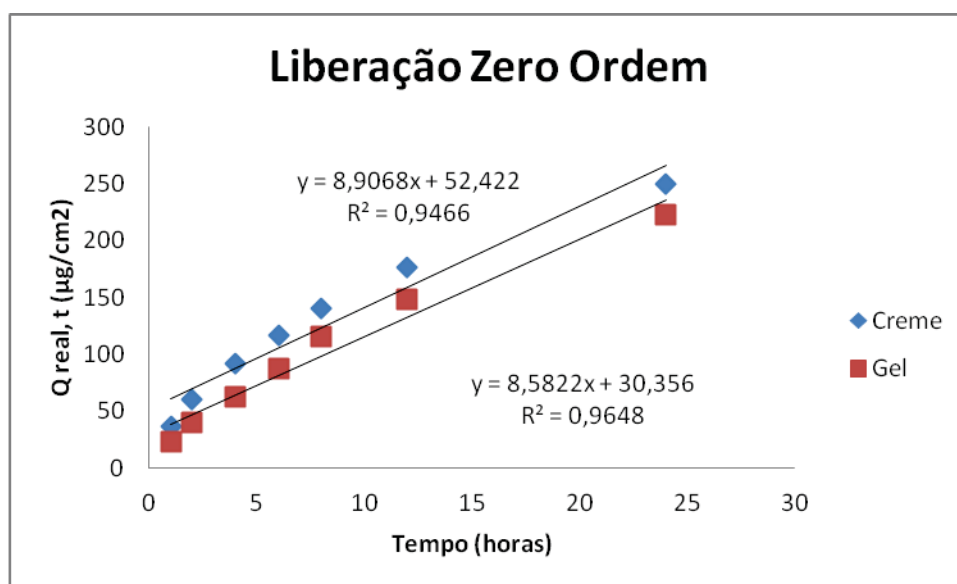


Figura 16: Modelo de cinética de liberação de zero ordem.

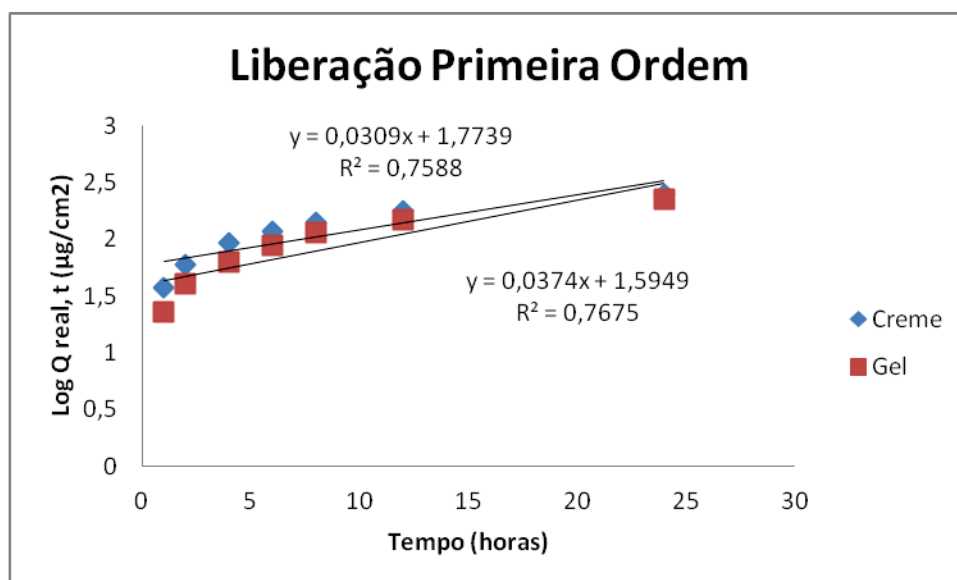


Figura 17: Modelo de cinética de liberação de primeira ordem.

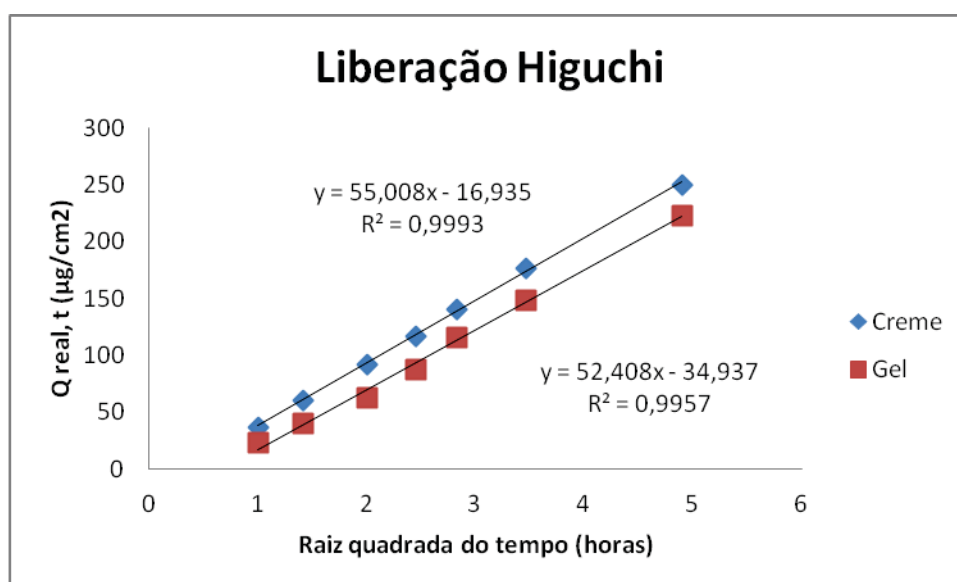


Figura 18: Modelo de cinética de liberação com aplicação de Higuchi.

A avaliação do modelo de cinética no teste de liberação foi realizada a partir dos gráficos: de zero ordem (concentração em função do tempo), de primeira ordem (log da concentração liberada em função do tempo) e modelo de Higuchi (concentração liberada em função da raiz quadrada do tempo).

Após a determinação dos modelos matemáticos e comparação dos coeficientes de correlação linear (R^2) das formulações creme e gel, podemos

observar que os modelos de cinética de liberação que apresentam os maiores R^2 , ou seja, mais próximos de 0,99, são os que seguem o modelo de Higuchi. Este modelo sugere que a velocidade de liberação do fármaco da matriz se dá por difusão controlada.

O valor do fluxo (J) de liberação é obtido a partir do coeficiente angular (a) da reta de regressão do modelo de cinética aplicável a formulação. O fluxo obtido para a formulação creme foi de 55,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, e para a formulação gel foi de 52,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Comparando o fluxo das duas formulações não observamos diferenças significativas, pois o creme apresentou um fluxo de liberação apenas um pouco maior que o gel.

6.4.2. Permeação e retenção na mucosa vaginal *in vitro*

Os ensaios de permeação e retenção na mucosa vaginal *in vitro* foram realizados utilizando-se as mesmas condições que o teste de liberação. Nas tabelas 15 e 16 encontram-se os resultados da quantidade real permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a porcentagem em relação ao total de princípio ativo utilizado no teste e o coeficiente de variação para as formulações creme e gel.

Tabela 15. Permeação na mucosa vaginal *in vitro* creme

Tempo (horas)	Média Q real, t ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV %
1	23,48	3,21	3,87
2	37,38	5,12	10,03
4	52,26	7,16	11,68
6	66,68	9,13	13,99
8	81,38	11,14	14,88
12	105,71	14,48	14,64

CV% - Coeficiente de variação percentual

Tabela 16. Permeação na mucosa vaginal *in vitro* gel

Tempo (horas)	Média Q real, t ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV %
1	5,18	0,71	16,81
2	7,40	1,01	6,93
4	14,12	1,93	11,53
6	21,56	2,95	9,07
8	31,34	4,29	14,75
12	42,64	5,84	19,05

CV% - Coeficiente de variação percentual

Os coeficientes de variação apresentaram valor menor que 30%, o que está de acordo com as especificações que determinam que o valor máximo de CV permitido para ensaios de permeação e retenção é 30% (SCCP, 2006). O

coeficiente de variação para o teste de permeação é maior, pois a utilização de modelos animais (mucosa vaginal) aumenta as variações e os desvios, pois existem variações entre os animais.

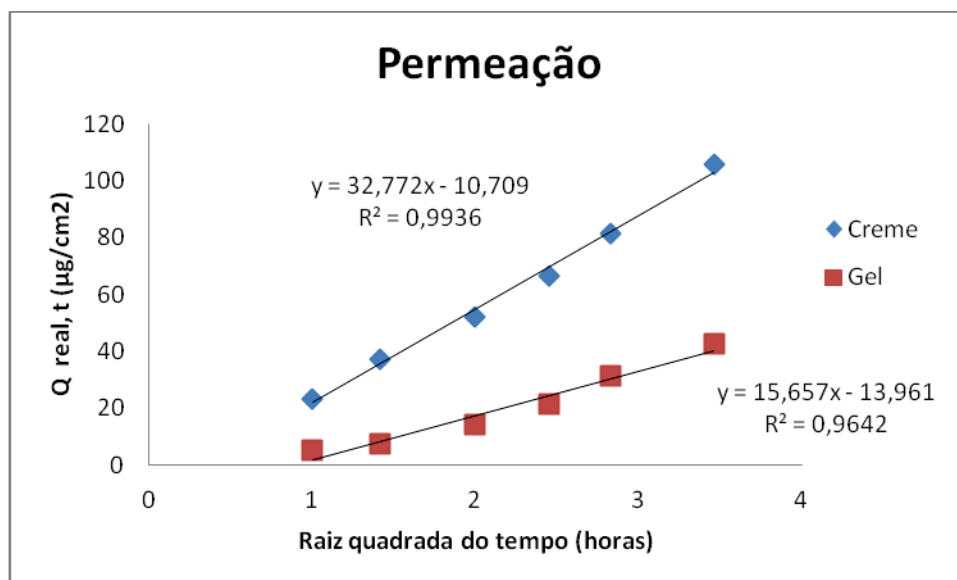


Figura 19: permeação na mucosa vaginal das formulações creme e gel.

Como pode ser observado na figura 19, o fluxo (J) de permeação, obtido para a formulação creme, foi de 32,77 µg/cm²/h e para o gel foi de 15,66 µg/cm²/h, ou seja, o creme permeou com uma velocidade mais rápida que o gel.

Apesar das formulações possuírem perfil de liberação muito semelhante, a porcentagem de permeação do creme foi maior comparada com a do gel, isso significa que o fluxo da formulação gel é mais dependente do tipo de membrana e não do sistema.

As figuras 20 e 21 apresentam os valores obtidos no teste de retenção na mucosa vaginal das duas formulações.

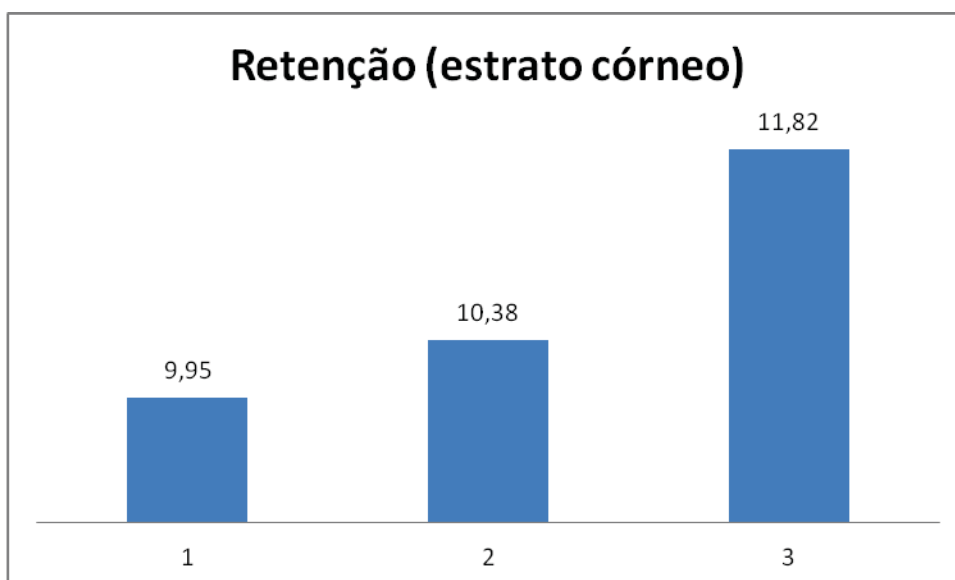


Figura 20: Retenção no estrato córneo das formulações creme e gel em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1- creme 8 horas; 2- creme 12 horas; 3- gel 12 horas).

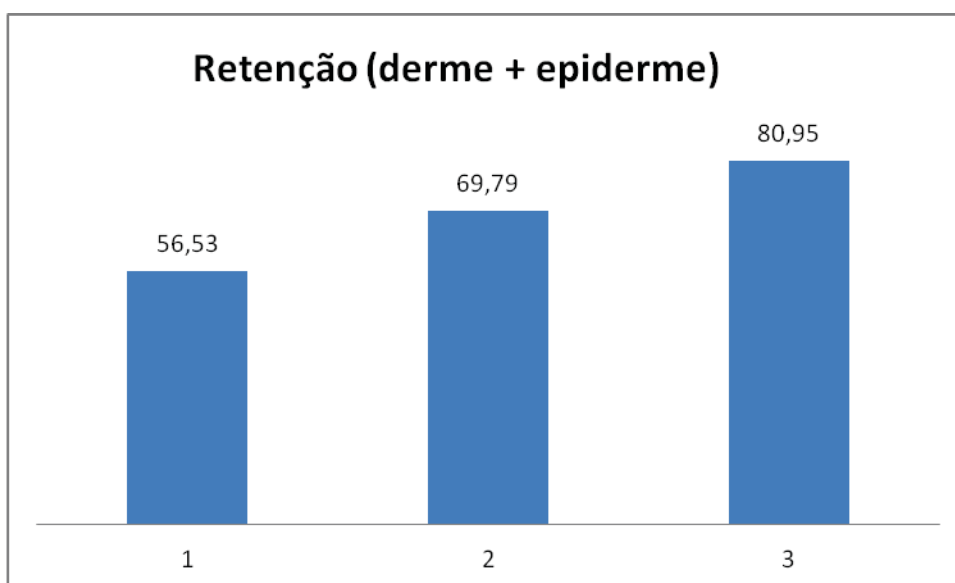


Figura 21: Retenção na derme e epiderme das formulações em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1- creme 8 horas; 2- creme 12 horas; 3- gel 12 horas).

Na retenção na mucosa vaginal o menor coeficiente de variação foi 11,03% e o maior foi 18,0%.

A formulação creme ficou apenas um pouco menos retida no estrato córneo do que o gel, após 12 horas de ensaio. Os valores obtidos para a formulação creme nos tempos 8 e 12 horas foram semelhantes, isto sugere que a formulação provavelmente atingiu a concentração máxima de retenção no estrato córneo. No perfil de retenção da derme e epiderme verifica-se que o gel ficou mais retido nestas camadas do que o creme.

VII. CONCLUSÃO

O método proposto para quantificação do extrato de *S. nitens* por espectrofotômetro UV-VIS mostrou-se adequado. O método apresentou especificidade e seletividade. Na linearidade, a curva analítica apresentou-se linear no intervalo de concentração entre 5 e 30 µg/mL e obteve-se um excelente coeficiente de correlação; 0,99996. A precisão (repetibilidade e intermediária) apresentou coeficiente de variação menor que 5%, permitido pela ANVISA. O método apresentou também exatidão e robustez adequados; mesmo com pequenas variações no método, os resultados da robustez foram satisfatórios. O limite de quantificação determinado foi de 0,5 µg/mL, com coeficiente de variação menor que 5%.

Os resultados obtidos no teste de estabilidade preliminar foram satisfatórios, comprovando que nas condições testadas a formulação creme apresentou estabilidade. A formulação creme também se apresentou adequada para o uso tópico no que diz respeito às suas características reológicas.

Nos ensaios de liberação, permeação e retenção na mucosa vaginal *in vitro* a formulação creme foi comparada com outra formulação (gel) para o uso no tratamento da candidíase. Os perfis de liberação das duas formulações foram semelhantes, porém o creme apresentou melhor perfil de permeação e ficou menos retido na derme e epiderme do que o gel, isso é importante, pois nas formulações de uso local espera-se que o fármaco penetre além da superfície, mas não é desejável que ele seja absorvido pela circulação sistêmica. Portanto sob estes aspectos o gel mostrou-se mais adequado.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ARAÚJO, M.G.F. **Caracterização do Potencial Biológico de *Leiothrix Spiralis* Ruhland e *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae)**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2011.

ARAÚJO, M. G. F. ; HILARIO, F. ; COSTA, G. T. ; SANTOS, L. C. ; BAUAB, T. M. . **Antifungal activity of phenolic compounds of *Leiothrix spiralis* Ruhland (Eriocaulaceae)**. In: 2º Brazilian Conference on Natural Products, 2009, São Pedro. Anals of 2º Brazilian Conference on Natural Products, 2009.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BOSQUEIRO, A.D. **Estudo Fitoquímico e Implicação Taxonômica em *Paepalanthus* Mart. (Eriocaulaceae)**. 2000. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Resolução RE nº 899, **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília:ANVISA, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Resolução – RE nº. 1, de 29 de julho de 2005, Guia para a realização de estudos de estabilidade, **D.O.U-Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 01 de agosto de 2005.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.13, p.123-133, 2001.

CROSS, S.E; RUSSEL, M.; SOUTHWELL, I.; ROBERTS, M.S. Human skin penetration of the major components of Australian tee tree oil applied in it pure form and as a 20% solution *in vitro*. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.69, p. 214-222, 2008.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico químicos em farmácia**. São Paulo: Edusp, 2003. 732p.

FRIEND, D.R. *In vitro* skin permeation techniques. **J. Control. Release.** v.18, p.235-248, 1992.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v26, p. 171-178, 2006.

GIULIETTI, A. M. **Análise crítica da evolução da morfologia e da sistemática das Eriocaulaceae**. 1997.161 f. Tese (Titular em Sistemática de Vegetais Superiores) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 1997.

GIULIETTI, A .M.; MENEZES, N. L.; PIRANI, J. R.; MEGURO, M.; WANDERLEY, M. G. L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. **Bol. Bot.** v 9, p. 1-152, 1987.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Rev 02. Rio de Janeiro, 2007.

LOBINSKI, R.; MARCZENKO, Z. Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **Crit. Rev. Anal. Chem.** v.23, p.55, 1992.

SENZEL, A. J. (Ed.). **Newburger's Manual of Cosmetic Analysis.** 2nd. ed. Washington, DC: AOAC, 1997.

PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W.A.; PRADO, M.R.D.; VILELA, A.P.O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v.39, n. 1, p.105-113, 2003.

SATO, M.E.O.; PONTAROLO, F.G.R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.43, n.2, p.531-537, 2007.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria:** Fundamentos Teóricos e Práticos. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006.

SCCP/0970- SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS. Basic Criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetics ingredients, Brussels, Belgium, 2006.

SILVA, M. A. **Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae.** 2008.157f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

SQUIER, C. A. ; MANTZ, M. J. ; SCHLIEVERT, P.M. ; DAVIS, C. C. Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. **J. Pharm. Sci.**, v.97, n.1, p.9-21, 2008.

WATANABE, M. T. C. **Análise morfométrica e variabilidade morfológica em populações de *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae)**. 2009. 72f. Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

IX. Anexo – Lista de equações

- **Equação 1:** $y = ax + b$
- **Equação 2:** $G' = (\sigma/\gamma) \cos \delta$
- **Equação 3:** $G'' = (\sigma/\gamma) \sin \delta$
- **Equação 4:** $\eta' = G''/\omega$
- **Equação 5:** $G''/G' = \tan \delta$
- **Equação 6:** $\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$
- **Equação 7:** $W_0 - W_t = K_t$
- **Equação 8:** $f_1 = K_0 t$
- **Equação 9:** $f_1 = 1 - (W_t/W_0)$
- **Equação 10 :** $Q_1 = Q_0 + K_0 t$
- **Equação 11:** $dC/dt = K (C_s - C)$
- **Equação 12:** $dW/dt = KS (C_s - C)$
- **Equação 13:** $\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t/2303$
- **Equação 14:** $f_t = Q = [D(2C - C_s) C_{st}]^{1/2}$
- **Equação 15:** $F_t = K_H t^{1/2}$
- **Equação 16:** $Q \text{ real, } t = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c$
- **Equação 17:** $CV = \frac{DP}{M} \times 100$
- **Equação 18:** $\frac{AA \times [Pd]}{AP \times [Am]} \times 100$