

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

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS MICRO E
NANOESTRUTURADOS PARA A ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE
ACETATO DE DEXAMETASONA

MÁRCIA HELENA OYAFUSO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marlus Chorilli

ARARAQUARA – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS MICRO E
NANOESTRUTURADOS PARA A ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE ACETATO
DE DEXAMETASONA**

MÁRCIA HELENA OYAFUSO

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

ARARAQUARA - SP
2012

Ficha Catalográfica

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

O98d Oyafuso, Márcia Helena
Desenvolvimento e caracterização de sistemas micro e nanoestruturados para a administração cutânea de acetato de dexametasona / Márcia Helena Oyafuso. – Araraquara, 2012
87 f.

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

Orientador: Marlus Chorilli

1. Sistemas de liberação de fármacos. 2. Microemulsões. 3. Cristais líquidos. 4. Acetato de dexametasona. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

COMISSÃO EXAMINADORA

A Comissão organizadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado em sessão pública realizada no dia 26 de Junho de 2012, consideram a candidata:

APROVADA

REPROVADA

Presidente da Banca: Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Membros:

Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO CORRÊA

Prof^a. Dr^a. MARIA VALÉRIA ROBLES VELASCO

Dedico este trabalho aos meus pais
Maria Helena e Antônio Massao
e ao meu irmão Marcelo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço **ao meu Deus** por todas as bênçãos que tem colocado em minha vida, sou grata à minha família, aos meus amigos, ao meu trabalho e aos meus mestres.

Agradeço **aos meus pais, Maria Helena e Antônio Massao**, que nunca mediram esforços em oferecer a mim e ao meu irmão apoio, segurança, educação, conduta pessoal e profissional. À minha mãezinha, mulher batalhadora e determinada, meu espelho para toda minha vida. Obrigada por todo o seu amor, incentivo e ativa participação em todos os momentos de minha vida. Ao meu pai, homem batalhador que nos ensinou o quanto temos que ser forte, mesmo nas situações mais extremas.

Ao meu irmão, Marcelo, pelo carinho, apoio e por ser minha referência em doçura de ser humano. Você é meu equilíbrio vital.

Em especial, agradeço **ao meu querido orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli**, pela amizade, orientação, paciência, confiança, incentivo e pela ajuda no meu crescimento profissional. Um exemplo de dedicação e amor à pesquisa. Obrigada por ser meu grande mestre e tornar meu sonho realidade.

O meu agradecimento especial à **querida Prof^a. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião**, grata por toda sua ajuda, por me receber de braços abertos, por dispor de todo apoio material, moral, intelectual e financeiro. Sem dúvida, será uma referência para toda minha vida, não só profissional como pessoal também. Grata pela sua amizade, pela sua sabedoria transmitida, confiança e dedicação.

“Se não fosse imperador, desejaria ser professor. Não conheço missão maior e mais nobre que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens do futuro” (Dom Pedro II)

Aos meus tios, tias, minha avó Maria e aos meus primos, pelo exemplo de caráter, sabedoria e determinação e por tanto confiarem na minha capacidade para realização desse trabalho.

Em especial as minhas tias: Sílvia, Cecília e Célia que desde pequena sempre, ofereceu a mim e ao meu irmão, suporte em todas as áreas, contribuindo para o nosso crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos do programa de pós-graduação, Andréia, Ana Luiza, Charlene, Priscileila, Giovana, Flávia, Lilian, Fernanda Kolenyak, Fernanda Carbinato, Gisela, Flávio, Jéssica, Roberta, Karisa, Liliane, Gustavo, Fabíola, Ana Cristina, Hilris, Graziela, Giselle, Leonardo, André, Valquíria, Bruna e Guilherme. Obrigada pela amizade, companheirismo, ideias e contribuição nos experimentos.

Em especial aos amigos do laboratório que se tornaram amigos pessoais e especiais em minha vida: Fernanda Carbinatto, Andréia Meneguim, Ana Luiza Ribeiro, Charlene Kill, Flávia Chiva, Giovana Calixto e Flávio Campos. Obrigada pela linda amizade, pelos momentos agradáveis em que passamos juntos, momentos de alegria e de desabafo, e pela contribuição indispensável de cada um de vocês para a realização deste trabalho.

À amiga Gabriela Marieli Luz, por ser um anjo que me trouxe até ao laboratório de farmacotécnica e me incentivou a fazer o estágio de iniciação científica na época de minha graduação. Apresentou-me à **Prof^ª. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião** e a doutoranda **Flávia Chiva**, as quais me receberam com maior atenção, dedicação e carinho.

À querida amiga Andréia B. Meneguim, primeira grande amizade que fiz no laboratório, e que se estendeu para minha vida pessoal, sempre a guardarei em meu coração. Grata por todos os momentos que passamos juntas, pelo conhecimento transmitido e por essa linda amizade.

Aos **alunos de iniciação científica,** Mohamed, Jovan e Nayara. Agradeço em especial à Marcela Brito e Camila Conforto por tanto contribuírem no auxílio dos experimentos. Obrigada pela amizade e dedicação.

Aos amigos Edson Tazawa e Fabíola Garavello Prezotti, pela ajuda nos textos em inglês. Obrigada pela dedicação e carinho.

As **amigas Ana Luiza Ribeiro (Velma) e Fernanda Carbinatto** por tanto me ajudarem nos momentos finais para a entrega desta dissertação.

Aos **meus amigos pessoais**: Daniela Zaniolo, Patrícia Oyafuso, Rosângela Tibana, Cristiane Oyafuso, Fabiana Arena, Lorena Ribeiro, Fernando Xavier, Cristiane Feriato, Silmara Vicentin, Camila Felipe e Helena Rocco; que apesar de não participarem da minha vida acadêmica, compartilharam comigo as alegrias e angústias de cada etapa deste trabalho.

Aos **funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas** da UNESP-Araraquara, em particular às queridas Margareth, Fátima e Queila.

À **Seção de Pós-graduação**, em especial à Cláudia, Daniela, Joyce e Márcia, pela atenção e apoio.

Ao **serviço técnico de Biblioteca e documentação e ao Serviço de apoio** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara

À **Prof^a. Dr^a. Daniele Ribeiro Araújo e ao Prof. Dr. Eduardo Molina**, pelo auxílio no exame geral de qualificação.

À **Prof^a. Dr^a. Maria Valéria Robles Velasco e ao Prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa**, pela contribuição na defesa de dissertação.

Ao **Prof. Dr. João Aristeu da Rosa**, pela colaboração com o uso do analisador de imagens.

Aos professores: **Prof. Dr. Vitor Hugo Vitorino Sarmiento e a Prof^a. Dr^a. Leila Aparecida Chiavacci**, pelo auxílio na realização das análises de espalhamento de

luz a baixo ângulo (SAXS) no Laboratório Nacional de Espalhamento de Luz Synchrotron – LNLS, e nos esclarecimentos de reologia.

À **Prof.^a Dr.^a Vera L.B. Isaac**, pela colaboração com o uso do reômetro,

Aos **professores do departamento de Fármacos e Medicamentos** pela ajuda, amizade e convivência, em especial Prof^a. Dr^a. Ana Dóris de Castro, Prof. Dr. Raul César Evangelista, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira e Prof^a. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião.

Ao **CNPQ**, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Mestrado.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

Clarice Lispector

RESUMO

O acetato de dexametasona (DXM) é um potente anti-inflamatório e imunossupressor utilizado principalmente no tratamento de doenças inflamatórias, auto-imunes e alérgicas; inibindo o acúmulo de células inflamatórias na zona de inflamação. A DXM promove uma série de efeitos colaterais sistêmicos, sobretudo a Síndrome de Cushing. Dessa forma, sua aplicação tópica pode ser conveniente de forma a localizá-lo no seu sítio de ação, evitando-se efeitos adversos sistêmicos. O polioxietileno 20 cetil éter forma sistemas de fase hexagonal e cúbica em contato com água. Os sistemas microemulsionados e líquido-cristalinos de fase hexagonal e cúbica têm demonstrado grande vantagem na liberação tópica de várias substâncias dada às características de interação com o estrato córneo e outras camadas da pele. Os objetivos desta pesquisa foram desenvolver e caracterizar sistemas micro e nanoestruturados acrescidos de DXM. Foram desenvolvidos sistemas empregando água, polioxietileno 20 cetil éter e polieter funcional siloxano. Após delimitação das regiões, foram selecionados alguns sistemas de fase hexagonal e cúbica e um sistema microemulsionado para incorporação do fármaco. A caracterização do sistema foi realizada empregando microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) e reologia. Realizaram-se ensaios de validação de metodologia analítica para quantificação de DXM por CLAE, comprovando que o método foi linear, exato e preciso. Os ensaios de SAXS corroboram com os de MLP e com as características reológicas dos sistemas, que evidenciaram que as microemulsões apresentaram módulo de perda maior que módulo elástico, resultando em um sistema pouco estruturado quando comparado às formulações líquido cristalinas que são sistemas mais estruturados. Os ensaios de perfil de textura demonstraram que os sistemas de fase cúbica e hexagonal são promissores para aplicação tópica, possuindo boa espalhabilidade e facilidade de aplicação. Os ensaios de bioadesão demonstraram que as formulações cúbicas são mais bioadesivas em relação às amostras hexagonais, sugerindo permanecer mais tempo aderida a pele. Testes de liberação mostraram que os sistemas F1D (microemulsão), F4D (cúbica), F6D (hexagonal) e AT (sistema binário água/tensoativo) liberam o fármaco, porém, de acordo com os ensaios de

Resumo

permeação, não houve permeação da DXM a partir dos sistemas desenvolvidos. Os testes de retenção mostraram que a DXM manteve-se no estrato córneo. Conclui-se que os sistemas são promissores para a administração cutânea de DXM, promovendo efeito local do fármaco, o que pode levar a uma melhor adesão do paciente aos tratamentos de doenças cutâneas, minimizando assim alguns efeitos colaterais.

ABSTRACT

The dexamethasone acetate (DXM) is a potent anti-inflammatory and immunosuppressive drug used mainly in the treatment of inflammatory diseases, autoimmune and allergic reactions, inhibiting the accumulation of inflammatory cells in the inflammation area. The DXM promotes a number of systemic side effects, especially Cushing's syndrome. Thus, topical application may be appropriate in order to find it on its site of action, avoiding systemic adverse effects. The polyoxyethylene 20 cetyl ether forms hexagonal and cubic phase systems in contact with water. The microemulsion and liquid-crystalline phase of hexagonal and cubic system have shown great advantage in topical delivery of various substances given to the characteristics of interaction with the stratum corneum and other skin layers. The objectives of this research were to develop and characterize micro- and nanostructured systems containing DXM. Systems have been developed using water, polyoxyethylene 20 cetyl ether and polyether functional siloxane. After defining the regions, some hexagonal and cubic phase systems and a microemulsion system were selected for incorporation of the drug. The system characterization was carried out using polarized light microscopy (MLP), SAXS and rheology. Validation assays of analytical methodology were performed for quantification of DXM by HPLC, showing that the method was linear, accurate and precise. The SAXS experiments corroborate with the MLP and the rheological characteristics of the systems, which showed that the microemulsions had loss modulus greater than the elastic modulus, resulting in a less structured system when compared to the liquid crystal formulations that are more structured systems. The texture profile tests showed that hexagonal and cubic phase systems are promising for topical application, possessing good spreading properties and facility of application. Bioadhesion tests showed that cubic formulations are more bioadhesive for hexagonal samples, suggesting that they could stay adhered to the skin for a longer time. Clearance tests showed that the systems F1D (microemulsion), F4D (cubic), F6D (hexagonal) and AT (binary water / surfactant system) release the drug, however, in accordance with the permeation tests, there was no permeation of the DXM from the developed systems. The retention tests showed that DXM remained in the stratum corneum. It can be

Abstract

suggested that these systems are promising for cutaneous administration of DXM, promoting local effect of drug, which can improve the adhesion of the patient to treatments of skin diseases, thus minimizing side effects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática da organização das ME	21
Figura 2. Microscopia de luz polarizada fase lamelar (sistema anisotrópico)	23
Figura 3. Microscopia de luz polarizada fase hexagonal (sistema anisotrópico)	23
Figura 4. Estrutura química do acetato de dexametasona.	29
Figura 5. Equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation) e Célula de Difusão de Franz.	39
Figura 6. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter como tensoativo, fase oleosa (silicone fluido) e fase aquosa água destilada. As regiões delimitadas representam: EM – emulsão, SF – separação de fases, CL – cristal	42
Figura 7. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter como tensoativo, fase oleosa (óleo mineral) e água destilada. As regiões delimitadas representam: EM – emulsão, SF – separação de fases, CL – cristal líquido e ME – microemulsão.	43
Figura 8. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com poloxietileno 20 cetil éter como tensoativo, fase oleosa (ácido oleico) e água destilada. As regiões delimitadas representam: EM – emulsão, SF – separação de fases, CL – cristal líquido, H/L – Fase de transição Hexagonal/Lamelar e ME – microemulsão.	44
Figura 9. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter como tensoativo, fase oleosa silicone fluido e água. As áreas delimitadas representam: ME - microemulsão, CL – cristal líquido, EM- emulsão, SF- separação de fases. Os pontos selecionados para estudo encontram-se assinalados no diagrama.	46
Figura 10. Fotomicrografias das formulações F1 a F6, obtidas por microscopia de luz polarizada após o preparo.	47
Figura 11. Reograma da formulação F1.	49
Figura 12. Reograma da formulação F1D	49
Figura 13. Reograma da formulação F2.	49
Figura 14. Reograma da formulação F2D.	49
Figura 15. Reograma formulação F3.	50
Figura 16. Reograma formulação F3D.	50
Figura 17. Reograma formulação F4.	50
Figura 18. Reograma formulação F4D.	50
Figura 19. Reograma formulação F5.	51
Figura 20. Reograma formulação F5D.	51
Figura 21. Reograma formulação F6.	51
Figura 22. Reograma formulação F6D.	51
Figura 23. Reograma evolução estrutural do módulo de armazenamento das amostras F1 a F6.	53
Figura 24. Reograma evolução estrutural do módulo de armazenamento das amostras F1D a F6D.	53
Figura 25. Caracterização por SAXS das formulações F1, F2, F3, F4, F5, F6 e F1D, F2D, F3D, F4D e F6D.	55
Figura 26. Evolução estrutural das formulações F1, F2, F3, F6 e F1D, F2D, F3D e F6D fixando o componente oleoso em 30 %.	56

Figura 27. Evolução estrutural das formulações F4, F6 e F4D, F5D e F6D fixando o componente tensoativo em 40 %.	57
Figura 28. Análise do perfil de textura das formulações F4, F4D, F6 e F6D (n=6)...	61
Figura 29. Ensaio de bioadesão das formulações F4, F4D, F6 e F6D.	62
Figura 30. Fotomicrografias das formulações F1 a F6, obtidas por microscopia de luz polarizada após seis meses de preparo.	63
Figura 31. Fotomicrografias das formulações F1D a F6D, obtidas por microscopia de luz polarizada após seis meses de preparo.	64
Figura 32. Espectro de absorção no UV-VIS da solução etanólica de DXM, de concentração de 20 µg mL ⁻¹ .	65
Figura 33. Cromatograma da DXM em metanol (20 µg mL ⁻¹). Fase móvel: (acetonitrila/metanol 1:1) e água 70/30 em 239 nm.	69
Figura 34. Cromatograma referente à injeção de fase móvel metanol.	69
Figura 35. Cromatograma referente injeção de solução tampão fosfato pH 7.4 contendo dexametasona (20 µg mL ⁻¹).	69
Figura 36. Curva analítica do DXM em tampão fosfato de potássio 0,01M pH 7.4 adicionado de 0,5 % de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado.	73
Figura 37. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) de DXM incorporada na formulação F6D (hexagonal), contendo DXM 0,1 % (média de n=6).	74
Figura 38. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) de dexametasona incorporada na formulação F1D (microemulsão) contendo dexametasona 0,1 % (média de n=6).	74
Figura 39. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) do DXM incorporado na formulação F4D (cúbica) contendo DXM 0,1 % (média de n=6).	75
Figura 40. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) de dexametasona incorporada no sistema binário AT (água/tensoativo 1:1), contendo dexametasona 0,1% (média de n=6).	75
Figura 41. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) de DXM incorporado nos sistemas F1, F4, F6 e propilenoglicol (PG). (média de n=6).	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações preparadas com diferentes concentrações de tensoativo. Para as formulações F1, F2 e F3 foram fixadas as concentrações de óleo. Para as formulações F4, F5 e F6 foram fixados os valores de tensoativo.	45
Tabela 2. Valores da resistência do gel (η') e do expoente viscoelástico (n) das formulações (tensão 5 Pa).	52
Tabela 3. Porcentagens dos componentes: óleo, água, tensoativo e fases estruturais.....	56
Tabela 4. Porcentagens dos componentes: óleo, água, tensoativo e fases estruturais.....	58
Tabela 5. Razão entre as distâncias interplanares para as formulações F1 a F6 e F1D a F6D, obtidos por SAXS.....	59
Tabela 6. Valores de pH obtidos para as diferentes formulações.....	65
Tabela 7. Quantidade de DXM incorporada nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6.	66
Tabela 8. Concentrações das soluções padrão utilizadas para a construção da curva analítica e os respectivos valores da área sob a curva (ASC) obtida por CLAE no comprimento de onda de 239 nm (n = 3).	68
Tabela 9. Resultados obtidos para ensaio de precisão por repetibilidade (n=3).....	70
Tabela 10. Resultados obtidos para ensaio de precisão intermediária (n=3)	71
Tabela 11. Cálculos dos parâmetros estatísticos da exatidão para validação do método de quantificação da DXM por CLAE.	72
Tabela 12. Porcentagem de DXM liberada, após 24h de experimento.	77
Tabela 13. Quantidade de dexametasona retida e ou permeada na pele em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, após 24h de experimento.	79

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Água
CL	Cristal Líquido
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio Padrão
DXM	Dexametasona
EM	Emulsão
ME	Microemulsão
MLP	Microscopia de Luz Polarizada
O	Óleo
SAXS	Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo
SF	Separação de fases
T	Tensoativo
AT	Água/ tensoativo
T/O	Tensoativo/oleo
H/L	Hexagonal / Lamelar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
1.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	19
1.1.1 Microemulsões e cristais líquidos.....	19
1.2 ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS	24
1.3 TERAPIA CUTÂNEA COM GLICOCORTICOIDES.....	26
1.3.1 Dexametasona.....	28
OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
MATERIAIS	31
3.1.1. Materias-primas e Reagentes	31
3.1.2. Equipamentos e Acessórios.....	31
MÉTODOS	32
3.2.1. Preparo das formulações	32
3.2.1.1. Diagrama de fases	32
3.2.2. Caracterização físico-química	32
3.2.2.1. Microscopia de luz polarizada	33
3.2.2.2. Comportamento reológico	33
3.2.2.3. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	33
3.2.2.4. Ensaio de perfil de textura.....	34
3.2.2.5. Ensaio de bioadesão <i>in vitro</i>	34
3.2.3. Testes de estabilidade	34
3.2.3.1. Avaliação visual	34
3.2.3.2. Teste de centrifuga	34
3.2.3.3. Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo	34
3.2.4. Ensaio de solubilidade do DXM.....	35
3.2.4.1. Determinação do espectro de absorção do DXM no ultravioleta-visível (UV-Vis)	35
3.2.4.2. Determinação da solubilidade do DXM na formulação	35
3.2.5. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação do DXM nos estudos de retenção cutânea <i>in vitro</i> , utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	35
3.2.5.1. Condições cromatográficas.....	35
3.2.5.2. Linearidade	36
3.2.5.3. Especificidade.....	36
3.2.5.4. Precisão.....	36
3.2.5.5. Exatidão – recuperação	37
3.2.5.6. Limite de detecção e limite de quantificação	37

3.2.6. Ensaio de liberação, permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	38
3.2.6.1. Metodologia analítica para quantificação da DXM nos estudos de permeação cutânea e liberação <i>in vitro</i> , utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	38
3.2.6.2. Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	38
3.2.6.3. Ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i>	40
3.2.6.4. Ensaio de retenção cutânea <i>in vitro</i>	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES	42
4.1.1. Escolha das regiões a serem estudadas.....	45
4.2. Caracterização físico-química do comportamento de fases das formulações	45
4.2.1 Microscopia de luz polarizada	46
4.2.2. Comportamento reológico	48
4.2.3. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)	54
4.2.4. Ensaio de perfil de textura	59
4.2.4.1. Ensaio de bioadesão <i>in vitro</i>	61
4.3. Teste de estabilidade das formulações	63
4.3.1. Avaliação visual da estabilidade das formulações.....	63
4.3.2. Teste de centrifuga	64
4.4. Determinação do espectro de absorção do DXM no ultravioleta-visível (UV-Vis)	65
4.5. Determinação da incorporação do DXM na formulação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	66
4.6. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação do DXM nos estudos de retenção cutânea <i>in vitro</i> , utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	67
4.6.1. Linearidade	67
4.6.2. Especificidade.....	68
4.6.3. Precisão.....	70
4.6.4. Exatidão – recuperação	71
4.6.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	72
4.7. Avaliação da liberação, permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	73
4.7.1. Metodologia analítica para quantificação do DXM nos estudos de permeação cutânea e liberação <i>in vitro</i> , utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	73
CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS	82

INTRODUÇÃO

Os fármacos são raramente administrados na forma de substâncias químicas puras; a sua administração é feita através de formulações ou de medicamentos. Estes últimos podem variar desde soluções relativamente simples até sistemas de liberação complexos, dependendo do uso apropriado de adjuvantes de formulação ou excipientes. Especificamente, são os adjuvantes de formulação que permitem entre outras funções, solubilizar, suspender, espessar, conservar, emulsionar, modificar a dissolução, favorecer a compressibilidade e corrigir as características organolépticas do fármaco, possibilitando a obtenção de diversas preparações ou formas farmacêuticas (AULTON, 2005).

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos tem sido muito relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem a sua administração com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Tais sistemas possuem diversas aplicabilidades, como implantes cirúrgicos, suturas e curativos como agentes farmacêuticos (HO *et al.*, 2008), além de apresentarem como vantagens: redução da quantificação de dosagem, redução de efeitos adversos, melhor atividade farmacológica, aumento da adesão ao tratamento e garantia de efeito terapêutico mais uniforme (OURIEMCHI *et al.*, 1995).

1.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

1.1.1 Microemulsões e cristais líquidos

A introdução de um novo princípio ativo no mercado, além de levar vários anos de pesquisa, envolve custos altíssimos. A alternativa empregada para contornar estes elevados custos é recorrer à estratégia de desenvolvimento de sistemas de liberação para estes princípios ativos, o que tem permitido o aumento de sua eficiência, a reintrodução de outros princípios ativos anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novas substâncias antes que sejam efetivamente lançadas no mercado ou utilizadas na terapêutica (MAINARDES *et al.*, 2006).

Dessa forma, durante os últimos anos têm sido desenvolvidos novos veículos com o objetivo não só de aumentar a seletividade e eficácia de princípios ativos, como também permitir a redução da sua dose total necessária, minimizando os efeitos colaterais tóxicos, além de permitir o controle de sua liberação (GRILL *et al.*, 2009; VENUGOPAL *et al.*, 2009).

Em virtude do grande número de citações na literatura científica, as indústrias farmacêuticas têm se mostrado interessadas no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, os quais apresentam vantagens relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação controlada de fármacos, além de protegerem princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação (GUTERRES *et al.*, 2007; MOHANRAJ; CHEN, 2006).

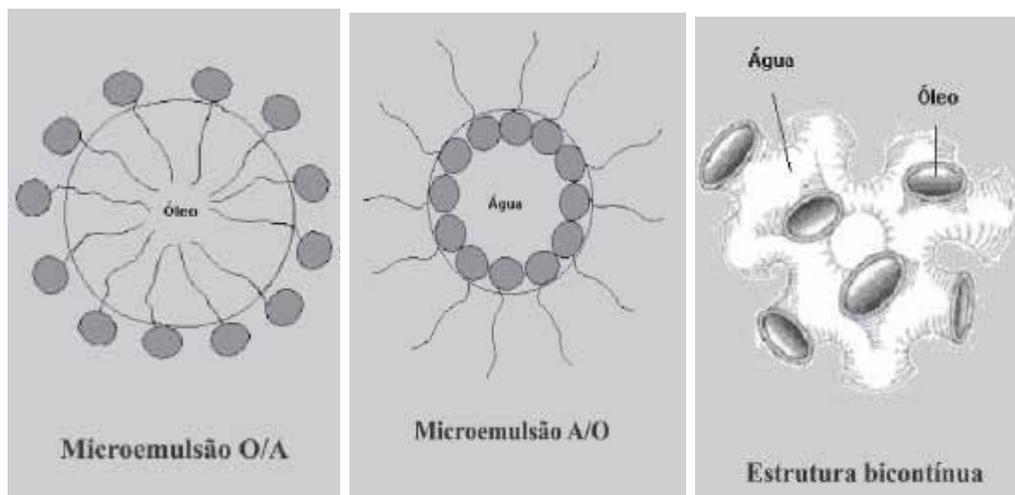
Dentre os sistemas de liberação controlada, destacam-se os sistemas micro e nanoestruturados, como as microemulsões e os sistemas líquido-cristalinos, os quais são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas das substâncias incorporadas (BHARGAVA *et al.*, 1987; FORMARIZ *et al.*, 2005).

As microemulsões (ME) são definidas como sistemas claros, transparentes e estáveis. Tratam-se de misturas isotrópicas contendo água, óleo e tensoativo, podendo ou não ser adicionado um co-tensoativo. Muitos cientistas e tecnólogos vêm estudando seu grande potencial em aplicações farmacêuticas pelo fato de propiciarem biodisponibilidade melhorada e aumento da absorção de fármacos, inclusive em aplicações tópicas (KOGAN; GARTI, 2006). Estes sistemas apresentam algumas vantagens tais como: modo de preparo prático, baixo custo, estabilidade elevada e capacidade de incorporar diferentes classes de fármacos (ABOOFAZELI; BARLOW; LAWRENCE, 2000).

Os sistemas microemulsionados podem ser classificados em três tipos diferentes: ME do tipo água em óleo (A/O), na qual ocorre dispersão de gotículas do componente hidrofílico no componente lipofílico; ME do tipo óleo em água (O/A), na qual ocorre o processo inverso, ou seja, a dispersão de gotículas do componente lipofílico no componente hidrofílico, e o terceiro tipo, que é ME com estrutura bicontínua, composta de água e óleo e que possui gotículas de ordem de 1-100 nm

(CRUZ; UCKUN, 2001; FORMARIZ *et al.* 2005). A Figura 1 apresenta a representação esquemática da organização das ME.

Figura 1 Representação esquemática da organização das ME



Fonte: FORMARIZ *et al.* (2005)

Lehmann (1889) descreveu um estado intermediário na transformação térmica a partir do estado sólido para o líquido, que ficou conhecido como cristais líquidos (CLs) (CHORILLI *et al.*, 2009; MULLER-GOYMANN; FRANK, 1986).

Os cristais líquidos são classificados em liotrópicos e termotrópicos. Quando ocorre a formação destes sistemas com a adição de solventes eles são chamados de liotrópicos, já para os termotrópicos, a sua formação é dependente da temperatura. Conforme ocorre alteração da concentração de tensoativo, diferentes formas líquido-cristalinas podem ser formadas, como lamelares, hexagonais e cúbicas. A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planares de bicamada de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede unidimensional. Já na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bidimensionais. Nos sistemas de fase cúbica, as moléculas estão arranjadas num sistema tridimensional, o qual consiste de duas redes congruentes de canais de água envolvidas por bicamadas lipídicas ou de tensoativo (FORMARIZ *et al.*, 2005).

A elucidação da estrutura interna destes sistemas, além de ser muito importante, é também muito complexa. Assim, técnicas sofisticadas são necessárias

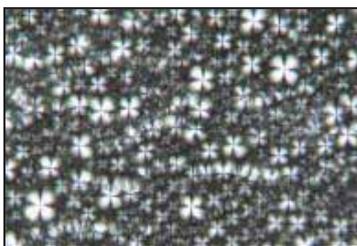
para atingir este objetivo. Métodos como espalhamento de raios-X a baixo ângulo – SAXS (RAMAN *et al.*, 2003), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo – SANS (REYNOLDS *et al.*, 2004), espalhamento de luz (*Light Scattering*) (SINTOV; SHAPIRO, 2004), microscopia eletrônica de transmissão e ressonância magnética nuclear (KREILGAARD, 2002) estão sendo cada vez mais utilizadas nas últimas duas décadas. Outros métodos como a condutividade iônica (SINTOV; SHAPIRO, 2004), viscosidade (SPICLIN *et al.*, 2003), espectroscopia de fotocorrelação (LEHMANN *et al.*, 2001), microscopia de luz polarizada (KREILGAARD, 2002), entre outros, também são frequentemente utilizados para o estudo do comportamento físico-químico interno dos sistemas nanoestruturados.

A identificação das formas líquido-cristalinas pode ser realizada através da combinação de várias técnicas físico-químicas, como difração de nêutrons, SAXS e reologia, juntamente com a microscopia de luz polarizada, a qual é muito empregada devido ao fato das formas serem facilmente detectadas devido à birrefringência (BRINON *et al.*, 1999; FERRARI, 1998; MORAIS, 2006; URBAN, 2004).

A microscopia de luz polarizada é uma ferramenta vital para a identificação e classificação dos materiais líquido-cristalinos. As fotomicrografias são provas de texturas observadas, normalmente pelo uso de luz polarizada (FERRARI, 1998). Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano de luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas são isotrópicas (FORMARIZ *et al.*, 2005; MORAIS, 2006; URBAN, 2004).

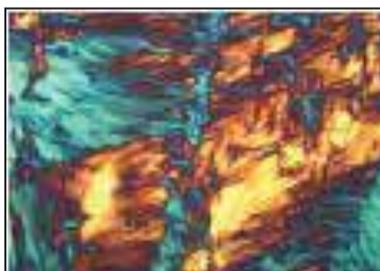
As Figuras 2 e 3 representam as fotomicrografias de sistemas anisotrópicos de fase lamelar e hexagonal, respectivamente, obtidas a partir da microscopia de luz polarizada.

Figura 2. Microscopia de luz polarizada fase lamelar (sistema anisotrópico)



Fonte: CUIHUA et al (2010)

Figura 3. Microscopia de luz polarizada fase hexagonal (sistema anisotrópico)



Fonte: PHELPS, BENTLEY, LOPES (2011).

Em um estudo reológico, propriedades como elasticidade, viscosidade e plasticidade são estudadas através de análises de deformação e fluxo dos materiais submetidos a tensões por um determinado tempo, permitindo assim obter informações estruturais e analisar quais efeitos são causados através da aplicação desta força e tempo (SCHRAMM, 2006). As aplicações destas medidas na área farmacêutica facilitam a caracterização de materiais, ajudam a estudar como um produto pode ser ejetado de um frasco, verificar a espalhabilidade de uma loção, creme ou gel aplicado sobre a pele (GENARO, 2000).

A densidade (D) é a razão entre a massa de uma substância e o volume ocupado por esta massa. Logo, a densidade é igual à massa por unidade de volume e é dada pela equação 1 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010):

$$D = \frac{\text{massa}}{\text{volume}} \quad (1)$$

A densidade é uma característica física da substância e pode ser usada para auxiliar na sua identificação. Em geral, quando se dá a densidade de um sólido ou líquido, a massa é expressa em grama, e o volume, em mililitro ou centímetros cúbicos. Uma vez que a densidade varia com a temperatura, é importante indicar a temperatura na qual foi realizado o ensaio de densidade (HEIN; ARENA, 1998).

A densidade relativa é a comparação da massa específica de uma substância com a de uma outra substância. No caso de sólidos e líquidos, a densidade relativa é tomada em relação à água. No caso de gases, a densidade relativa é tomada em relação ao ar ou hidrogênio (HEIN; ARENA, 1998).

De acordo com Farkas e colaboradores (2001), a grande vantagem de se fazer o uso de cristais líquidos como sistema de liberação é promover uma melhor estabilidade física e um amplo potencial de solubilização dos fármacos (CHORILLI *et al.*, 2011).

Estes sistemas são também muito utilizados na liberação de princípios ativos para uso tópico, principalmente quando apresentam arranjo lamelar, pois esta estrutura demonstra grande similaridade com a membrana lipídica intercelular da pele (MAKAI *et al.*, 2003).

1.2 ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, tendo uma superfície de dois metros quadrados e pesando cerca de 5 kg em indivíduos adultos. A sua principal função é proteger o corpo do meio envolvente, impedindo a perda de água e a entrada de materiais estranhos, tornando-se uma barreira eficiente na permeação de moléculas exógenas (GODIN; TOUITOU, 2007; HADGRAFT, 2001).

A camada mais externa da pele é a epiderme, que é separada da derme por uma fina camada de membrana basal; já a camada mais profunda é a hipoderme, conhecida também como tecido celular subcutâneo (POET; McDOUGAL, 2002).

Estudos mostram que muitos fármacos podem ser administrados pela via cutânea, a qual oferece vantagens como a supressão de efeito de primeira passagem hepática, estabilização dos níveis plasmáticos e ausência de degradação pelo trato digestório, resultando em diminuição de efeitos adversos (MACHET; BOUCAUD, 2002).

Existe uma gama muito grande nos índices de absorção cutânea entre diferentes compostos químicos, a qual é limitada pelo estrato córneo, sobretudo para substâncias hidrofílicas. Em geral, os produtos lipofílicos são absorvidos mais rapidamente, enquanto que os hidrofílicos podem penetrar mais lentamente na pele. (POET; McDOUGAL, 2002).

A permeabilidade é em geral inversamente proporcional à espessura do estrato córneo, o qual pode agir como um reservatório do fármaco, permitindo a penetração gradual para o interior das camadas viáveis da pele, durante um longo período de tempo (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).

Diversos trabalhos têm focado a utilização de microemulsões e sistemas líquido-cristalinos para uso tópico.

Peltola e colaboradores (2003) e Weiwei e colaboradores (2009) em seus estudos observaram que a aplicação tópica de microemulsões é vantajosa por promoverem aumento da concentração do fármaco na pele, uma vez que grande quantidade do fármaco pode ser incorporada na formulação. Além disso, os componentes da microemulsão podem reduzir a barreira de difusão do estrato córneo, favorecendo o aumento da taxa de permeação do fármaco através da pele.

A utilização de cristais líquidos para incorporação de princípios ativos de uso tópico apresenta vantagens funcionais relacionadas ao fato de: promoverem liberação controlada de substâncias ativas; incorporarem princípios ativos em matrizes líquido-cristalinas ou mesmo em formulações que os contenham, pois os cristais líquidos protegem as substâncias ativas sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação; promoverem aumento da retenção de água no estrato córneo proporcionando aumento na hidratação cutânea (BENITA, 2006; FERRARI, 1998; MORAIS, 2006; NESSEEM, 2001).

Spiclin e colaboradores (2003) verificaram que sistemas líquido-cristalinos foram empregados para promoverem liberação controlada do fosfato de ascorbil sódico. Santos e colaboradores (2005), por sua vez, observaram aumento da estabilidade do óleo de calêndula incorporado aos sistemas líquido-cristalinos.

1.3 TERAPIA CUTÂNEA COM GLICOCORTICOIDES

Os corticoides são moléculas de esteroides sintetizadas e secretadas pelo córtex supra-renal, Os principais esteroides são aqueles com atividade mineralocorticoide e glicocorticoide. Os que afetam o equilíbrio hidroeletrólítico são os mineralocorticoides e seu principal hormônio endógeno é a aldosterona. O cortisol é o principal glicocorticoide, atuando na função cardiovascular, na regulação do metabolismo, imunidade e crescimento. Os corticosteroides sintéticos se encontram em grande parte ligados à albumina, podendo assim ficar na forma livre, estando disponível para atuar na célula alvo, sendo representados, principalmente, pela hidrocortisona, corticosterona e dexametasona (KATSUNG, 2006; RANG; DALE; RITTER, 2001).

Uma vez que o hormônio esteroide está livre no líquido intersticial e no plasma, ele pode penetrar na célula e assim se ligar aos receptores, este complexo ligante receptor é transportado até o núcleo interagindo com proteínas nucleares e o DNA, obtendo resposta dos glicocorticoides (KATSUNG, 2006).

Os glicocorticoides induzem inibição da proliferação de várias células, incluindo fibroblastos. Esta é uma possível causa da atrofia cutânea, às vezes irreversível, observada com o tratamento a longo prazo (CASTRO, 2005).

A administração oral, nasal ou parenteral dos glicocorticoides pode levar a diversos efeitos adversos. CALDAS & SCHRANK (2001) relataram em seus estudos que a administração nasal de dexametasona no tratamento de rinite alérgica, pode levar ao desenvolvimento da Síndrome de Cushing (prolongada exposição de glicocorticoides, atingindo corrente sanguínea). Outros efeitos colaterais relatados devido ao uso prolongado de glicocorticoides por via sistêmica incluem alterações nos ossos, diminuição da velocidade de crescimento em crianças e alterações no tecido conjuntivo (KATSUNG, 2006).

Silva (2006) relatou que os glicocorticoides reduzem o número de mitoses, diminuindo a multiplicação celular. Dessa forma, ocorre menor formação da camada de queratina, tornando os fármacos possíveis candidatos à utilização de determinadas doenças dermatológicas, como a psoríase.

É de grande importância ressaltar que a solubilidade dos glicocorticoides em um veículo constitui um determinante na permeação cutânea de um glicocorticoide tópico (KATZUNG, 2006).

Os efeitos colaterais desta classe terapêutica são muito enfatizados, mas podem ser evitados quando prescritos corretamente e administrados na quantidade apropriada (VIVIER, 2000). Brunton, Lazo e Parker (2007) orientam quanto à necessidade de monitoramento da toxicidade dos glicocorticoides empregados topicamente, uma vez que podem causar atrofia cutânea, estrias, púrpura e erupções acneiformes.

Dentre os glicocorticoides, a dexametasona tem-se destacado nos últimos tempos. Este fármaco é considerado um potente anti-inflamatório e imunossupressor, utilizado para o tratamento de doenças inflamatórias, auto-imunes e no tratamento de alergias nasais, cutâneas e oftálmicas (BHARDWAJ; BURGESS, 2010; SCHIMMER; PARKER, 2001).

Este fármaco difunde-se através das membranas celulares formando complexos com os receptores citoplasmáticos específicos. Ao penetrarem no núcleo da célula, unem-se ao DNA e estimulam a transcrição do mRNA. Como anti-inflamatório inibe a acumulação de células inflamatórias na zona de inflamação, inibindo a fagocitose e a liberação de alguns mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório. Como imunossupressor reduz a concentração de linfócitos, diminui a união das imunoglobulinas aos receptores celulares da superfície e inibe a síntese ou liberação de interleucinas. Suas formas de administração são por via oral, intramuscular, intravenosa e tópica. Quanto ao uso tópico, recomenda-se cautela no uso em curativos oclusivos, fraldas e áreas cobertas devido ao aumento de sua absorção (AME, 2002). Salienta-se que ainda não existem no mercado sistemas micro e nanoestruturados, como o caso dos sistemas propostos neste trabalho acrescidos de dexametasona.

1.3.1 Dexametasona

A dexametasona (DXM) pode se apresentar nas formas de:

- 21-acetato de dexametasona, com fórmula molecular $C_{24}H_{31}FO_6$, massa molar de 434,50, ponto de fusão entre de 215 - 221 °C e comprimento de onda máximo de 239 nm;
- 21-(3,3-dimetilbutirato, terc-butilacetato com fórmula molecular de $C_{28}H_{39}FO_6$. Há a forma de 21-(fosfato de sódio) com fórmula molecular $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$ e peso molecular de 516,40;
- 17,21-dipropionato, com fórmula molecular $C_{28}H_{37}O_7$, peso molecular de 504,59;
- palmitato-21 com fórmula molecular de $C_{38}H_{59}FO_6$.

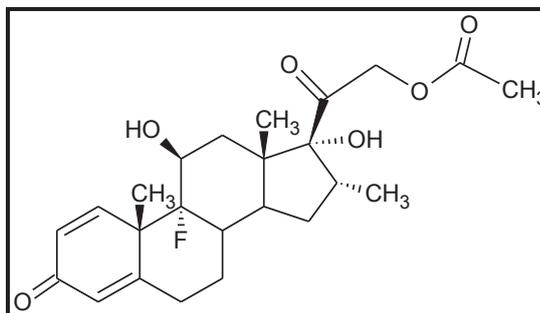
A dexametasona é solúvel em água a 25 °C na concentração de 0,1 mg mL⁻¹, solúvel também em acetona, álcool e clorofórmio, com absorvância no UV de 239 nm (MERK, 2006).

Dostal e Gameli (1990) observaram que o uso de dexametasona e hidrocortisona proporcionaram efeitos diferenciados sobre a cicatrização de lesões, retardam a dificuldade de cicatrização, comparado ao uso de metilprednisolona na minimização de problemas pós-cirúrgicos ou traumáticos da cicatrização.

A dexametasona é considerada fármaco de primeira linha no tratamento da dermatite atópica aguda e dermatite de contato (MAIA *et al.*, 2000).

Huches e Rustin (1997) e Fang e colaboradores (1997), relataram em seus estudos que a dexametasona-21-acetato, possui cerca de 20 a 30 vezes maior potência em relação à hidrocortisona. Sua fórmula molecular é $C_{22}H_{29}FO_5$ e sua fórmula estrutural está representada na Figura 4.

Figura 4. Estrutura química do acetato de dexametasona.



OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas micro e nanoestruturados estabilizados com polioxietileno 20 cetil éter (Brij[®] 58) utilizando poliéter funcional siloxano (DC[®] 193) e água, para a administração cutânea de acetato de dexametasona (DXM).

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sistemas nanodispersos líquido-cristalinos de fase hexagonal e cúbica acrescidos de DXM;
- Incorporar e quantificar DXM nos sistemas nanodispersos líquido-cristalinos obtidos;
- Caracterizar os sistemas obtidos utilizando recursos como microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) e reologia;
- Realizar ensaios de perfil de textura e bioadesão *in vitro*;
- Avaliar a estabilidade do acetato de dexametasona nos sistemas obtidos;
- Desenvolver e validar método analítico de quantificação do DXM por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Realizar ensaios de liberação *in vitro* das formulações escolhidas;
- Realizar estudos de retenção e permeação *in vitro* para as formulações escolhidas, empregando peles de modelo animal.

MATERIAIS

3.1.1. Materias-primas e Reagentes

- Acetato de dexametasona (Purifarma);
- Acetonitrila, J.T. Baker, HPLC;
- Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Procetyl[®] AWS, Croda);
- Água ultra pura (Milli[®]Q Plus);
- Fosfato de potássio monobásico (Quimis);
- Hidróxido de sódio (Quimis);
- Metanol, J.T. Baker, CLAE;
- Poliéter funcional siloxano (DC[®] 193) (Dow Corning);
- Polioxietileno 20 cetil ether (Brij[®] 58) (Sigma-Aldrich).
- Orelhas suínas (Frigorífico Olhos d'Água)

3.1.2. Equipamentos e Acessórios

- Cartucho SPE Strata C18-E 500mg/3mL (Phenomenex);
- Discos brancos de papel filtro esterilizados (Labroclin);
- Espectrofotômetro BECKMAN[®] modelo DU-530;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Varian[®] ProStar 310;
- Dermatômetro
- Kits seringas da BD Biosciences Pharmingen;
- Membrana de acetato celulose 0,45 µm (Sigma-Aldrich);
- Microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena;
- pH-Metro MicroNaI[®] B474;
- Reômetro HAAKE, modelo RS1, com software é Rheowin 3.5;
- Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus (Hanson Research Corporation[®]);
- Analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK).
- Ultra Turrax
- Vortex
- Lavadora ultrassônica
- Fitas adesivas (Scotch 750 3M)

MÉTODOS

3.2.1. Preparo das formulações

As formulações foram compostas pela mistura de água, poliéter funcional siloxano (DC[®] 193) e polioxietileno 20 cetil éter (Brij[®] 58). Estas foram levadas ao banho-maria até atingirem a temperatura de 60 °C, suficiente para fundir o tensoativo e homogeneizadas com auxílio de um bastão de vidro. As formulações foram preparadas em frascos transparentes e após seu resfriamento foram tampadas com tampas de borracha.

3.2.1.1. Diagrama de fases

Foram construídos três diagramas de fases, sendo fixado em cada um o tensoativo e a água, variando os tipos de óleos (ácido oleico, óleo mineral e óleo de silicone).

Para a obtenção dos diagramas de fases foram trabalhados os 36 pontos internos de cada diagrama utilizando as proporções de 5 a 95 % de cada componente, a saber, água, óleo e tensoativo. Também, foram estudadas as misturas binárias de água/tensoativo (A/T) e tensoativo/óleo (T/O) dos diagramas. Foram usadas as relações de A/T na faixa de 1:9 até 9:1. O mesmo procedimento foi utilizado para a mistura binária de T/O. Os sistemas formados foram detectados visualmente e identificados como cristal líquido (CL) - formulações viscosas transparentes; microemulsão (ME) - formulações líquidas transparentes; emulsão (EM) - formulações leitosas e separação de fases (SF) - formulações heterogêneas, sendo delimitadas estas regiões no diagrama.

3.2.2. Caracterização físico-química

Os sistemas selecionados foram caracterizados por estudos de microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), comportamento reológico, perfil de textura e bioadesão *in vitro*.

3.2.2.1. Microscopia de luz polarizada

As formulações foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio sob luz polarizada Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena. Avaliou-se a homogeneidade dos sistemas, verificando-se a presença de área de anisotropia, indicativo da presença de cristais líquidos. A análise foi realizada a temperatura ambiente.

3.2.2.2. Comportamento reológico

Os sistemas foram analisados por medidas reológicas utilizando Reômetro Haake, modelo RS1, acoplado a computador com software Rheowin 3.5, em que o equipamento funcionou pelo princípio de rotação de um dispositivo de placa e placa (sensor placa PP35Ti), diâmetro de 35 mm e distância entre as placas (gap) de 0,500 μm , sendo a temperatura mantida constante (32 °C).

As propriedades reológicas dos sistemas foram avaliadas por ensaios de escoamento e por ensaios mecânico-dinâmicos ou de oscilação. No ensaio de escoamento, realizou-se um estudo da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento na região de 0 a 100 s^{-1} . Nos ensaios reológicos por solicitação oscilatória, as medidas foram realizadas em função da frequência (0,1 – 100 Hz), aplicando uma tensão de 5 Pa.

3.2.2.3. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

As formulações foram avaliadas por SAXS de acordo com sua evolução estrutural em função do teor de água e do tensoativo. Os dados foram coletados na estação de medidas D-11 A do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP, que é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1,608 Å. O espalhamento por partículas existentes no sistema sem amostra foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

3.2.2.4. Ensaio de perfil de textura

As formulações foram submetidas ao teste TPA (*Texture profile analysis*) através do analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK). Este teste consistiu em dois ciclos de compressão da amostra, resultando numa curva força x tempo com a qual foi possível obter as características mecânicas do sistema, como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão (SENYIGIT, 2010).

3.2.2.5. Ensaio de bioadesão *in vitro*

Foi utilizado o analisador de textura TAXTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK), e como membrana a pele de orelha de porco dermatomizada. Com os resultados obtidos, foi construída a curva força x distância, que resultou no pico de adesão e no trabalho de adesão do sistema. Os ensaios foram realizados em triplicata (KOFFI *et al.*, 2006).

3.2.3. Testes de estabilidade

3.2.3.1. Avaliação visual

As amostras foram observadas visualmente quanto às alterações do tipo: cor, separação de fases e homogeneidade, no período de 6 meses e em temperatura ambiente.

3.2.3.2. Teste de centrifuga

A avaliação da estabilidade frente à centrifugação foi realizada empregando-se 5 g de cada amostra em estudo, as quais foram centrifugadas a 3000 rpm, por 30 minutos.

3.2.3.3. Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo

A medida de pH foi realizada em peagômetro, utilizando-se amostras diluídas em água destilada (5 %).

3.2.4. Ensaios de solubilidade do DXM

3.2.4.1. Determinação do espectro de absorção do DXM no ultravioleta-visível (UV-Vis)

Preparou-se uma solução etanólica de DXM de concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Partindo da solução-mãe, realizou-se uma diluição na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após a homogeneização, foi realizada a leitura espectrofotométrica na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

3.2.4.2. Determinação da solubilidade do DXM na formulação

Em 5 g da formulação foi adicionado o fármaco sob agitação. As amostras foram analisadas com uso de microscópio, para visualizar a presença de cristais de DXM. A porcentagem máxima solubilizada de DXM nos sistemas foi anotada. Após a certificação da adição do excesso de fármaco, as amostras foram deixadas em repouso, no período de 24 horas e à temperatura ambiente. Posteriormente as mesmas foram diluídas em etanol para a concentração do meio da curva $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e analisadas em espectrofotômetro.

3.2.5. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação do DXM nos estudos de retenção cutânea *in vitro*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a validação dos métodos analíticos foram utilizados os parâmetros analíticos preconizados pelas diretrizes do Comitê Internacional em Harmonização (ICH, 2005), os métodos foram: condições cromatográficas, determinação da linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação.

3.2.5.1. Condições cromatográficas

A detecção da DXM foi feita por CLAE, o equipamento utilizado foi um HPLC Varian com detector espectrofotométrico ProStar[®] 330 UV-VIS PDA e Rheodine VS 125, auto-amostrador Varian ProSar[®] modelo 410.

As condições experimentais foram: fase móvel constituída por uma mistura de metanol e acetonitrila (1:1) e água (70/30, v/v), coluna RP-18 (VARIAN-CHROMSEP®) dimensões 250 mm x 4.6mm e. 5µm de tamanho de partícula, fluxo 0,8 ml.min⁻¹, volume de injeção 50 µl, detecção a 239 nm e temperatura do forno de 25 °C. A validação da metodologia analítica foi realizada usando os parâmetros: linearidade, precisão intra-corrída e intermediária, exatidão, especificidade / seletividade, limite de detecção e limite de quantificação, sugeridos pelos guias ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2003).

3.2.5.2. Linearidade

As diluições foram preparadas partindo de uma solução mãe de DXM 100 µg mL⁻¹, utilizando metanol como diluente. Através do estudo de regressão linear, foi determinada a equação da reta. Com a construção de três curvas analíticas, em diferentes dias, foi possível avaliar a linearidade.

3.2.5.3. Especificidade

Injetou-se 1 % de cada amostra sem o fármaco, as quais foram diluídas em 10 mL de metanol, de forma a garantir que não houvesse interferência na detecção e quantificação do DXM com os componentes das formulações.

3.2.5.4. Precisão

A precisão foi avaliada através de ensaios de precisão instrumental, repetibilidade e precisão intermediária. No ensaio de precisão instrumental, foram realizadas três injeções consecutivas da solução padrão de DXM no nível de concentração de 100 %. Assim, foram calculados a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV). A repetibilidade foi avaliada através da análise de três amostras de SLC-DXM em um mesmo dia. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada pela análise de três amostras na mesma concentração, realizadas em três dias distintos.

3.2.5.5. Exatidão – recuperação

A exatidão foi avaliada através de teste de recuperação da concentração de DXM (baixa, média e alta) obtida na metodologia de quantificação comparada com a quantidade conhecida de DXM na amostra. Os experimentos de recuperação foram feitos em triplicata para cada concentração. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, calculada pela equação 2.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.5.6. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando valores de DP e inclinação das curvas analíticas obtidas. Os LD e LQ teóricos foram obtidos através do cálculo das equações 3 e 4, respectivamente.

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (4)$$

em que: DP = desvio padrão do intercepto com o eixo de Y; IC = inclinação da curva analítica.

3.2.6. Ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*

3.2.6.1. Metodologia analítica para quantificação da DXM nos estudos de permeação cutânea e liberação *in vitro*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi construída a curva analítica da DXM em tampão fosfato de potássio monobásico 0,01M pH 7.4, adicionado de 0,5 % de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP. A partir de solução estoque primária de 1 mg mL⁻¹ de DXM em metanol, foi preparada uma solução estoque secundária de 100 µg mL⁻¹ de DXM em tampão. Foram preparadas diluições correspondentes às concentrações de 0,1 – 20 µg mL⁻¹ a partir da solução estoque secundária. Cada concentração foi preparada em triplicata e as soluções resultantes foram filtradas em membranas de acetato de celulose (Millipore®) com poros de 0,22 µm de diâmetro e analisadas por CLAE. As condições utilizadas para detecção da DXM foram as mesmas descritas no item 3.2.5.1

3.2.6.2. Ensaio de liberação *in vitro*

A liberação da DXM das formulações escolhidas foi avaliada utilizando-se equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Microette HANSON 0700-1251, Figura 5), contendo seis células de Franz modificadas, de volume aproximado de 7 mL. A liberação do fármaco foi avaliada utilizando-se membrana sintética de acetato de celulose 0,45 µm (Sigma-Aldrich), com solução receptora composta por tampão fosfato 0,01M pH 7.4, contendo 5% de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Procetyl AWS®). As formulações foram previamente pesadas e transferidas com auxílio de espátula para o copo dosador colocado sobre a membrana disposta na célula de difusão de Franz (aproximadamente 300 mg e área de exposição de 1,77 cm²).

Figura 5. Equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Corporation) e Célula de Difusão de Franz.



Os experimentos foram conduzidos a 32,5°C e a solução receptora foi constantemente agitada a 300 rpm, por meio de um placa magnética agitadora, onde as células ficaram dispostas.

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

A equação 5 (USP, 2009) foi utilizada para calcular a quantidade real liberada/permeada (Q_{real}) em determinado tempo:

$$Q_{real,t} = C_t V_r + \sum V_c C_c \quad (5)$$

em que: $Q_{real,t}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t; C_t = concentração obtida referente ao tempo t; V_r = volume da solução receptora (7 mL); C_c = concentração da amostragem anterior; V_c = volume amostrado (coletado + limpeza).

O perfil de liberação das formulações foi avaliado matematicamente seguindo modelos de ordem zero (concentração *versus* tempo), pseudo-primeira ordem (concentração *versus* raiz quadrada do tempo) e primeira ordem (log da concentração

versus tempo). Os coeficientes de correlação (r) da fração linear das curvas de liberação foram estabelecidos pela inclinação da reta obtida por regressão linear.

Os coeficientes de difusão foram calculados usando a equação de Higuchi (equação 6) (HIGUCHI, 1962; LARRUCEA *et al.*, 2001):

$$Q = 2C_0 \left[\frac{D_t}{\pi} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

em que: Q = quantidade liberada em $\mu\text{g cm}^2$ no tempo t ; C_0 = quantidade inicial do fármaco adicionado em μg ; D = coeficiente de difusão; t = tempo de experimentação em segundos.

3.2.6.3. Ensaio de permeação cutânea *in vitro*

Para a realização deste ensaio foram utilizadas peles de orelha de porco, obtidas no Frigorífico Olhos d'Água logo após o abate rotineiro de animais para o consumo. As orelhas recebidas foram lavadas e os vasos sanguíneos, gordura, tecidos e pêlos não desejados em excesso foram removidos com o auxílio de tesoura, descartando-se as orelhas nas quais foram observados danos na pele. Em seguida, as orelhas foram dissecadas com auxílio de pinça e bisturi.

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

Uma porção da pele foi acondicionada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz de forma que o estrato córneo ficou mantido em contato com a formulação, e a derme em contato com a solução receptora (PRIMO *et al.*, 2008). Amostras da solução receptora foram coletadas nos intervalos de 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 horas.

A quantificação de DXM na solução receptora foi realizada por CLAE, utilizando a curva analítica obtida na validação do método. As peles submetidas ao estudo de permeação foram limpas com algodão embebido em água destilada e avaliadas quanto à retenção.

Os experimentos foram conduzidos a $32 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e a solução receptora foi mantida sobre agitação a $300 \pm 0,2 \text{ rpm}$.

3.2.6.4. Ensaio de retenção cutânea *in vitro*

Para análise de retenção cutânea *in vitro* a pele ficou exposta à formulação ($1,77\text{cm}^2$) por 24 horas, nas condições experimentais da permeação cutânea *in vitro*. Ao final do tempo, as peles foram retiradas da célula de difusão. Removeu-se o excesso de formulação na pele com papel absorvente, sendo mantidas em vidro de relógio durante a técnica de *tape stripping* para não haver perda do princípio ativo. O estrato córneo foi retirado com a técnica de *tape stripping*, utilizando-se 16 fitas adesivas (Scotch 750 3M), descartando-se a primeira fita. As fitas foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL de metanol, agitado em vórtex por um minuto e posteriormente submetido ao banho de ultrassom por 15 minutos. A solução foi filtrada em membrana $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e injetada em CLAE para quantificação da DXM .

Após a retirada do estrato córneo verificou-se a retenção da derme e epiderme, picotando-se o restante da pele com o auxílio de uma tesoura. Os fragmentos foram colocados em tubo para centrifuga. Adicionou-se 5 mL do solução extratora composta por metanol, agitado em vórtex por 2 minutos, levado ao homogeneizador Turrax[®] por um minuto e em seguida para lavadora ultrassônica por 30 minutos. Ao final, filtrou-se em membrana de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e quantificou-se por CLAE a DXM presente.

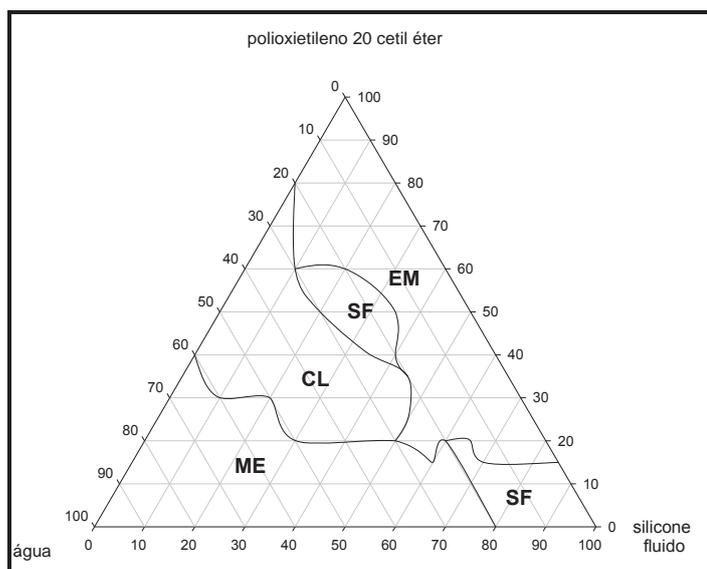
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES

A utilização do diagrama de fases permite delimitar as regiões formadas com diferentes porcentagens de tensoativo, água e óleo. Foram construídos três diagramas sendo possível comparar a influência do uso de diferentes tipos de fase oleosa (silicone fluido, óleo mineral e ácido oleico), fixando o uso do tensoativo polioxietileno 20 cetil éter.

A Figura 6 representa o diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter (Brij[®] 58), fase oleosa (DC[®]193) e água destilada.

Figura 6. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter como tensoativo, fase oleosa (silicone fluido) e fase aquosa água destilada. As regiões delimitadas representam: EM – emulsão, SF – separação de fases, CL – cristal

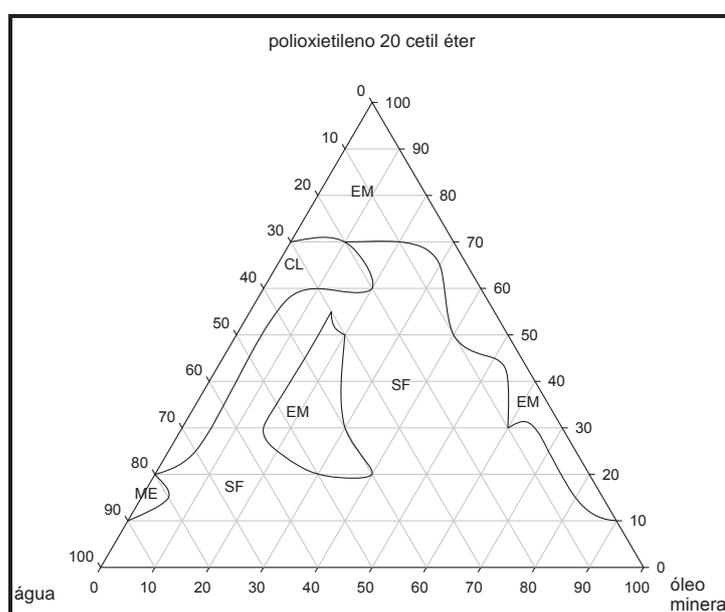


Pela Figura 6, foi possível delimitar várias regiões: uma área de emulsão na região de 5 a 80 % de óleo, utilizando fase aquosa na proporção de 5 a 30 % e variando de 15 a 90 % de tensoativo. Com o acréscimo de água ocorreu formação de sistema líquido-cristalino, em uma região com proporções de 20 a 60 % de água, 20 a 80 % de tensoativo e 5 a 50 % de fase oleosa. Acima de 60 % de fase aquosa, 5 a 80 % de óleo e até 40 % de tensoativo obteve-se a região de microemulsão.

Uma pequena região de separação de fases foi formada, podendo analisar que a proporção de tensoativo nesta região não foi suficiente para estabilizar o sistema.

A Figura 7 apresenta o diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter, óleo mineral e água.

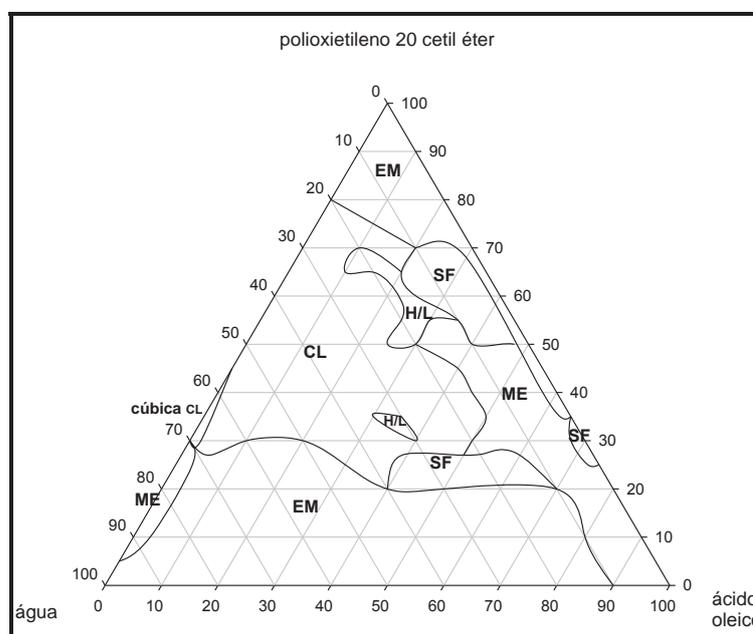
Figura 7. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter como tensoativo, fase oleosa (óleo mineral) e água destilada. As regiões delimitadas representam: EM – emulsão, SF – separação de fases, CL – cristal líquido e ME – microemulsão.



Pela Figura 7, a obtenção do diagrama de fases partindo dos componentes óleo mineral, polioxietileno 20 cetil éter e água, proporcionou uma maior região de separação de fases. Uma pequena região de microemulsão foi formada com proporções de tensoativo de 10 a 20 %, fase oleosa com 5 % e água nas quantidades de 80 a 90 %. Já a região de cristal líquido foi identificada aos 5 % de fase oleosa, contendo também água nas proporções de 30 a 80 % e tensoativo nas proporções de 20 a 70 %.

A Figura 8 representa diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter, ácido oleico e água.

Figura 8. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter como tensoativo, fase oleosa (ácido oleico) e água destilada. As regiões delimitadas representam: EM – emulsão, SF – separação de fases, CL – cristal líquido, H/L – Fase de transição Hexagonal/Lamelar e ME – microemulsão.



Pela Figura 8, ao utilizar água, ácido oleico e polioxietileno, verificou-se a formação de cristal líquido nos intervalos de 20 a 80 % de tensoativo, 5 a 50 % de fase oleosa e 20 a 70 % de água. Observou-se algumas regiões de transição, as quais foram delimitadas como hexagonais/lamelares. Já acima dos 70 % de água e no intervalo de 5 a 30 % de tensoativo, fixando ácido oleico em 5 %, foi possível delimitar a região de microemulsão.

Com o uso do diagrama de fases foi possível analisar as regiões formadas com diferentes proporções de água, óleo e tensoativo. O polioxietileno 20 cetil éter foi escolhido como agente tensoativo, sua fórmula molecular é $C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_{20}OH$ e apresenta equilíbrio hidrófilo lipófilo (EHL) de 15,7. O polioxietileno 20 cetil éter tem sido utilizado no desenvolvimento de cremes, loções e microemulsões (Product Information, 2006).

A escolha da fase oleosa foi definida comparando os diagramas, fixando o tensoativo e avaliando a influência dos diferentes tipos de óleo na formação dos sistemas. Com a formação de sistemas líquido-cristalinos em uma região bastante definida, optou-se pelo uso do silicone líquido de copolímero glicol (DC[®] 193), por

também apresentar benefícios tais como: proteção, formação de película, não irritante para a pele, facilidade de espalhamento e toque sedoso (CHORILLI *et al.*, 2009).

4.1.1. Escolha das regiões a serem estudadas

Os sistemas foram selecionados levando em conta a proporção de tensoativo, optando por regiões com baixas proporções, podendo assim minimizar possíveis irritações ao tecido cutâneo. As formulações selecionadas foram F1, F2, F3, F4, F5 e F6, cujas proporções estão registradas na Tabela 1.

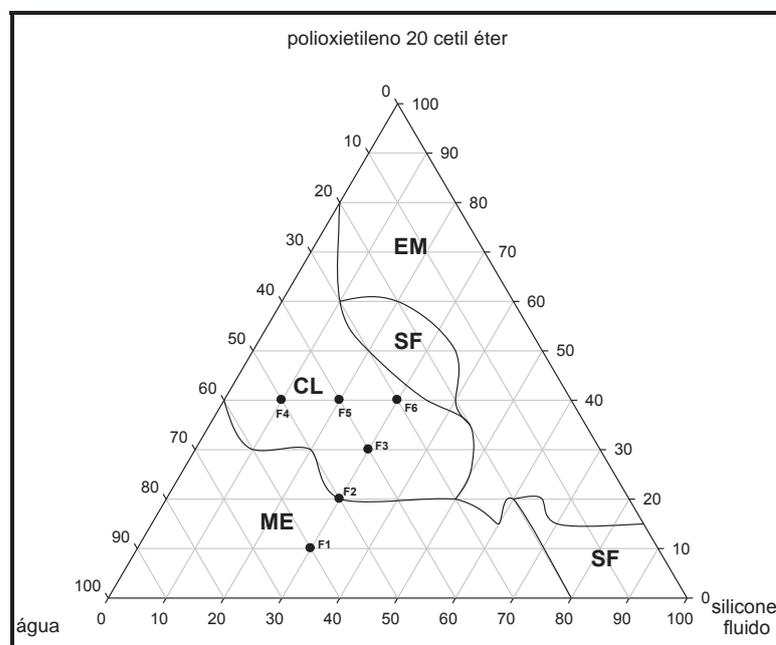
Tabela 1. Formulações preparadas com diferentes concentrações de tensoativo. Para as formulações F1, F2 e F3 foram fixadas as concentrações de óleo. Para as formulações F4, F5 e F6 foram fixados os valores de tensoativo.

Composição	Fórmulas (%)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
água	60	50	40	50	40	30
silicone fluido	30	30	30	10	20	30
polioxietileno glicol 20 cetil éter	10	20	30	40	40	40

4.2. Caracterização físico-química do comportamento de fases das formulações

As formulações selecionadas encontram-se assinaladas no diagrama de fases, apresentado na Figura 7. As mesmas foram preparadas através da mistura dos três componentes (água, óleo e tensoativo), aquecendo-os e promovendo leve agitação, adquirindo a homogeneização por completa.

Figura 9. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com polioxietileno 20 cetil éter como tensoativo, fase oleosa silicone fluido e água. As áreas delimitadas representam: ME - microemulsão, CL – cristal líquido, EM- emulsão, SF- separação de fases. Os pontos selecionados para estudo encontram-se assinalados no diagrama.



Optou-se por estudar os pontos F2, F3, F4, F5 e F6 devido à formação de cristal líquido em baixas concentrações de tensoativo. Já o ponto F1, por estar em uma região de microemulsão, foi escolhido para que possa ser comparado seu comportamento em relação aos cristais-líquidos.

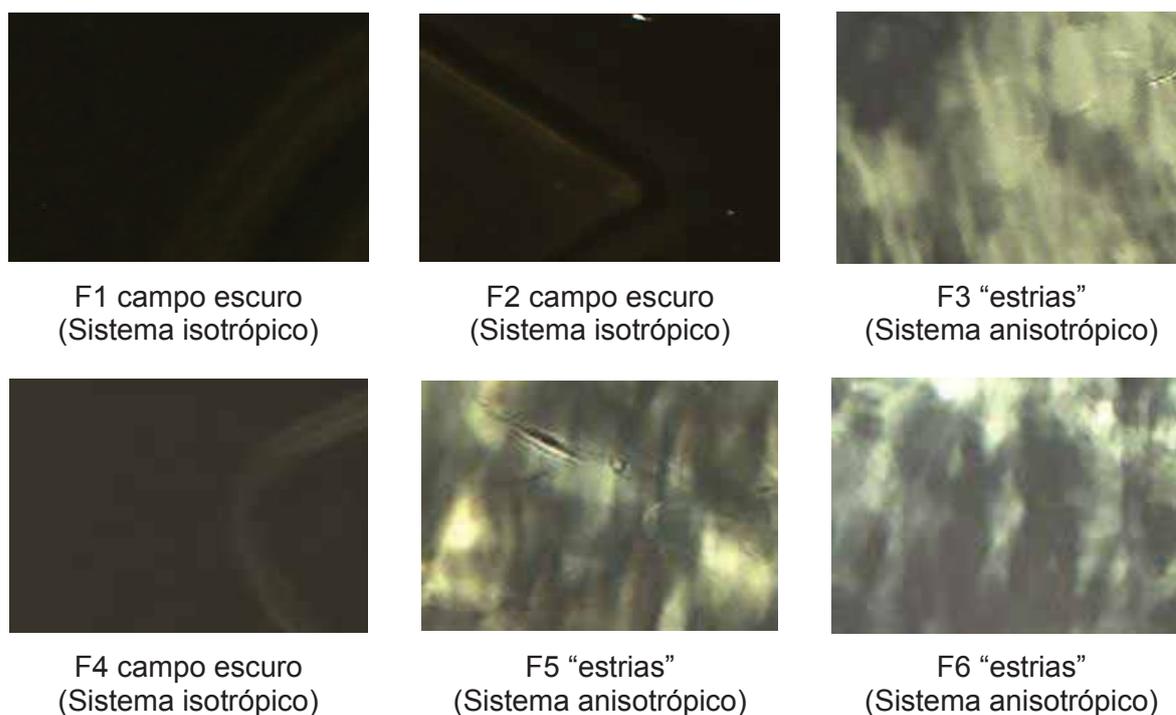
Os sistemas selecionados para estudo foram nomeados F1, F2, F3, F4, F5 e F6, que compreendem as formulações sem adição do fármaco; já os nomeados F1D, F2D, F3D, F4D, F5D e F6D compreendem as formulações em que se adicionou DXM na concentração usual de 0,1 %. A incorporação da dexametasona foi realizada na fase oleosa, sendo posteriormente adicionado polioxietileno 20 cetil éter e água.

4.2.1 Microscopia de luz polarizada

Na Figura 10 estão representadas as fotomicrografias obtidas por microscopia de luz polarizada, nas quais foram observadas as amostras F1 a F6, logo após o preparo. As formulações F1, F2 e F4 sob o plano de luz polarizada, não desviaram a luz demonstrando serem isotrópicas (campo escuro). As formulações F3, F5 e F6

desviaram o plano de luz polarizada, sendo observadas estruturas estriadas, características de mesofase hexagonal de cristais líquidos liotrópicos.

Figura 10. Fotomicrografias das formulações F1 a F6, obtidas por microscopia de luz polarizada após o preparo.



As formulações F1, F2 e F4 identificadas como sistemas isotrópicos, sob plano de luz polarizada não desviaram a luz. Sabendo que a formulação F1 obteve viscosidade relativamente baixa, pressupõe-se ser microemulsão, já as formulações F2 e F4, por possuírem viscosidade elevada, possivelmente devem ser mesofases cúbicas de cristais líquidos. As formulações F3, F5 e F6 apresentaram-se como características de mesofases hexagonais. Assim para confirmar a presença da microemulsão e das mesofases cúbicas e hexagonais observadas nas formulações, realizou-se estudo de SAXS, que será discutido posteriormente.

4.2.2. Comportamento reológico

As amostras foram estudadas em relação ao seu comportamento viscoelástico, com objetivo de avaliar as características estruturais das formulações.

A viscoelasticidade linear de um sistema deve ser avaliada respeitando o intervalo onde a tensão aplicada não deforme a estrutura dos sistemas, que por sua vez é totalmente dependente da frequência. Já a viscosidade não-linear acontece na região em que ocorre deformação dos sistemas, podendo destruir ligações internas ou agregados moleculares (SCHRAMM, 2006).

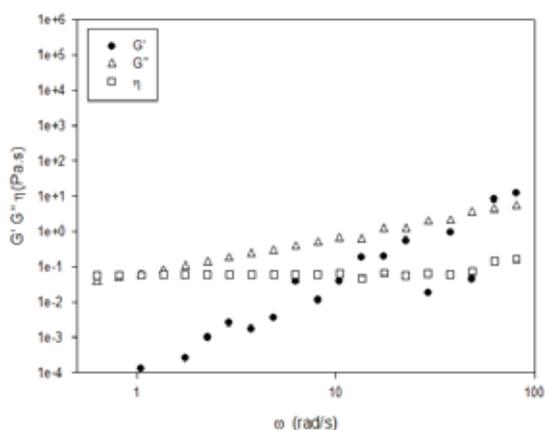
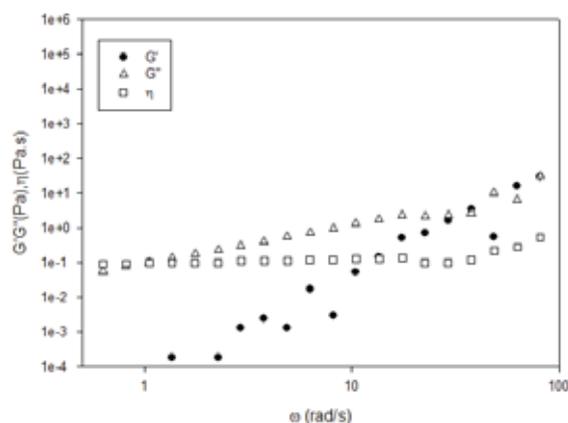
Com o intuito de avaliar a viscoelasticidade linear das amostras, foram realizados os ensaios de varredura de tensão, na faixa de 0 a 100 Pa, com uma frequência fixa de 1 Hz.

Através da análise dos gráficos de varredura de tensão, concluiu-se que a faixa de viscoelasticidade linear apresentou-se em regiões baixas e que a melhor tensão para se realizar os espectros mecânicos foi de 5 Pa.

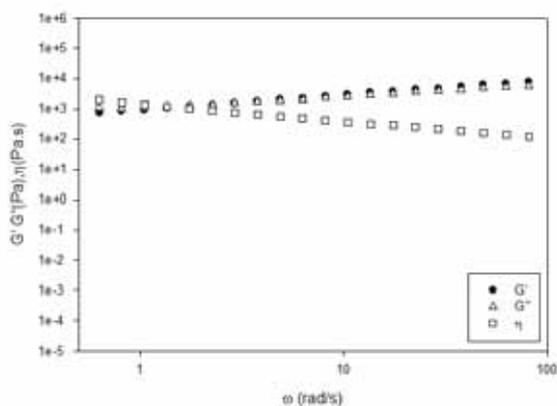
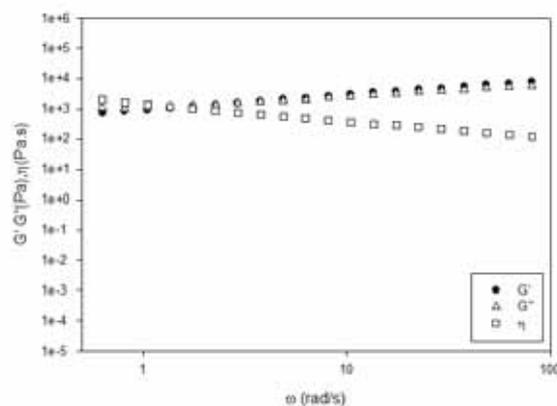
As medidas reológicas dependentes da frequência foram realizadas para caracterizar propriedades viscoelásticas dos sistemas, estabelecendo uma correlação entre as estruturas. Assim as propriedades viscoelásticas dos cristais líquidos são importantes na liberação transdérmica, no sentido de propor adesão à pele e penetração nas microfissuras (BENDER, 2008; YARIV *et al.*, 2010).

As caracterizações reológicas foram determinadas a partir dos módulos de armazenamento ou elástico (G') e módulo de perda ou viscoso (G'') em função da frequência, no entanto quando ocorrer o predomínio do módulo elástico (G') sobre o módulo viscoso (G'') compreende – se que o sistema possui uma maior estruturação, e fortes interações entre as moléculas (YARIV *et al.*, 2010).

Os reogramas das amostras F1 e F1D (Figuras 11 e 12) apresentaram módulo de perda (G'') maior que o módulo de armazenamento (G'). Esse comportamento indicou características de um comportamento predominantemente viscoso, sugerindo sistemas pouco organizados, evidenciado também pela dependência de G' pela frequência, ou seja, à medida que se aumenta a frequência angular, verifica-se o aumento do módulo de armazenamento (KHONDKAR *et al.*, 2007).

Figura 11. Reograma da formulação F1.**Figura 12.** Reograma da formulação F1D

As amostras F2 e F2D (Figuras 13 e 14) apresentaram os pontos de (G') e (G'') praticamente coincidentes, demonstrando um certo equilíbrio entre os compostos viscosos e elásticos, verificou-se também que a presença do fármaco na formulação não alterou a estrutura do sistema.

Figura 13. Reograma da formulação F2.**Figura 14.** Reograma da formulação F2D.

No comportamento reológico da formulação F3 (Figura 15), os módulos elástico (G') e o módulo viscoso (G'') resultaram em valores mais elevados em relação à formulação F3D (Figura 16), indicando que a adição do fármaco levou a uma diminuição da estabilidade do sistema. Mesmo com a diminuição da estabilidade na presença do fármaco, em F3D os módulos elástico e viscoso demonstraram um certo equilíbrio, pois seus pontos coincidiram-se.

Figura 15. Reograma formulação F3.

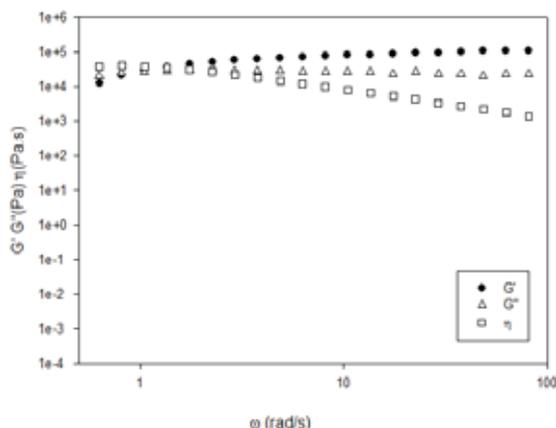
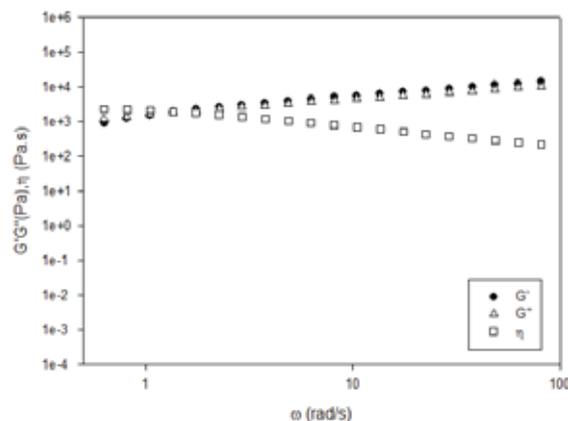


Figura 16. Reograma formulação F3D.



Tanto nas formulações F4 quanto na F4D (Figuras 17 e 18), o módulo de armazenamento (G') foi maior que o módulo de perda (G''). Esse resultado indicou características de um comportamento predominantemente elástico, sugerindo que os sistemas estão bem estruturados e possuem fortes interações entre as moléculas e que a adição do fármaco não causou desestruturação no sistema. O mesmo aconteceu para as formulações F5 e F5D (Figuras 19 e 20).

Figura 17. Reograma formulação F4.

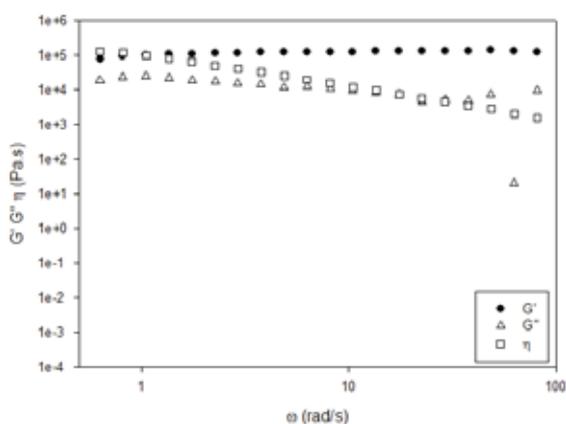


Figura 18. Reograma formulação F4D.

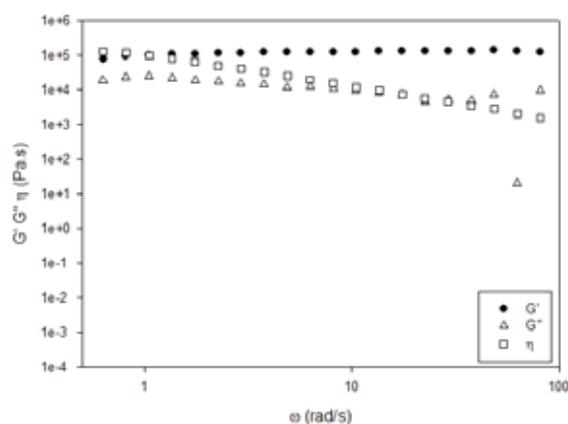


Figura 19. Reograma formulação F5.

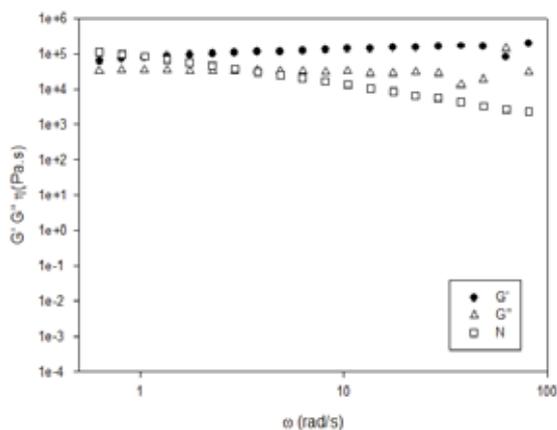
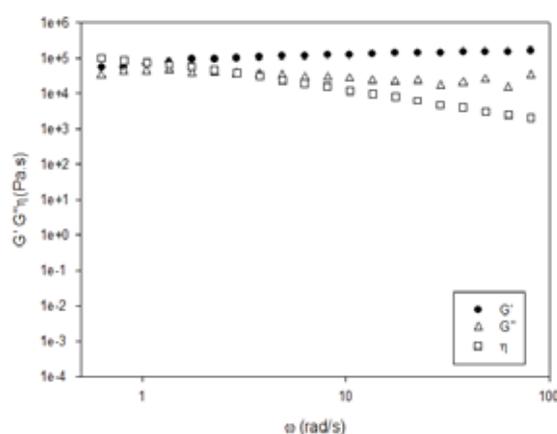


Figura 20. Reograma formulação F5D.



As amostras F6 e F6D (Figuras 21 e 22) demonstraram em baixas frequências certo equilíbrio entre os materiais viscosos e elásticos devido a coincidência dos pontos de (G') módulo elástico e (G'') módulo viscoso. No entanto, em frequências mais altas, o sistema obteve estruturas mais organizadas, pois o módulo de armazenamento (G') foi maior que o módulo de perda (G'').

Figura 21. Reograma formulação F6.

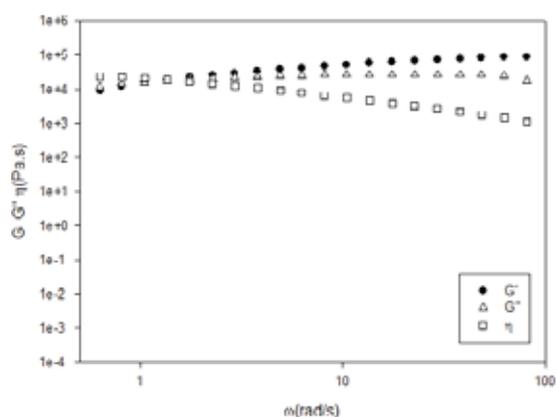
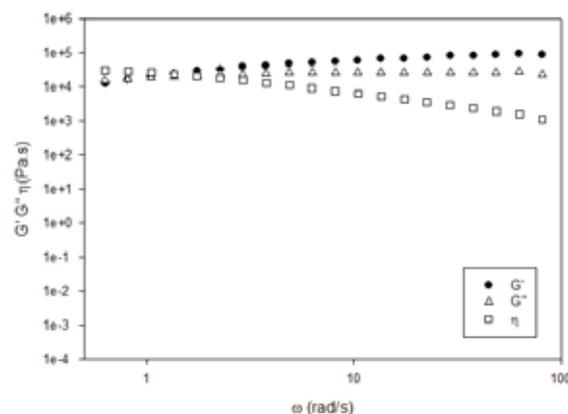


Figura 22. Reograma formulação F6D.



Com o intuito de estabelecer uma análise quantitativa estrutural dos sistemas obtidos, foi possível calcular a dependência de (G') pela frequência, utilizando regressão linear (r) dos dados do comportamento reológico das formulações. Além disso foi calculado o expoente n através do modelo de equação de power law “Lei da Potência” (SAXENA *et al.*, 2011):

$$G' = S\omega^n \quad (7)$$

em que: G' = módulo de armazenamento; ω = frequência oscilatória; S = resistência do gel; n = expoente viscoelástico.

Os parâmetros S e n são indicativos da densidade de reticulação no interior do gel, ou seja, quanto mais alto for o valor de S , mais reticulada e forte será a estrutura do gel. Contrariamente, o valor de n diminui com o aumento da reticulação, assim, valores de n altos indicam géis com estruturas mais fracas (SAXENA *et al.*, 2011).

Na Tabela 2 estão dispostos os valores da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) dos sistemas estudados.

Tabela 2. Valores da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) das formulações (tensão 5 Pa).

Amostras	S	n
F1	0,0042	2,80
F1D	0,229	2,79
F2	46098,3707	0,0695
F2D	2569,085	0,42
F3	4619,88	0,1691
F3D	4619,88	0,433
F4	114738,7597	0,0042
F4D	74713,87	0,058
F5	106820,7925	0,0318
F5D	109499,5456	0,0806
F6	30400,8861	0,2102
F6D	50425,4895	0,1901

Através dos resultados obtidos a partir da equação de *power law*, foi possível analisar os valores de S para cada amostra. Assim as amostras que apresentaram maiores valores de S foram as amostras que continham fixado o valor de tensoativo em 40 %, ou seja, F4, F5, F6 e F4D, F5D e F6D, sabendo que quanto maior o valor

de S , mais interações fortes entre as moléculas e estruturado será o sistema. Já as formulações F2, F3 e F6 e F2D, F3D e F6D, as quais continham fixado o valor de fase oleosa em 30 %, também obtiveram valores de S maiores que n , demonstrando serem sistemas bem estruturados, porém não tão elevados quanto as demais amostras. As amostras que demonstraram valores de n superiores ao de S para cada formulação foram as amostras F1 e F1D, indicando que os sistemas apresentaram estruturas mais fracas, sugerindo que a presença de água aos 60 % nestas formulações promoveu uma menor estruturação do sistema, que é coerente a sua caracterização haja vista ser uma microemulsão, diferente dos sistemas mais estruturados caracterizados como cristais líquidos.

Na Figura 23 está representada a evolução estrutural do módulo de armazenamento das formulações, onde foi possível verificar que F2, F3, F4, F5 e F6 resultaram em maiores valores de (G') , sendo sistemas mais estruturados que F1, o mesmo aconteceu para as amostras com adição de fármaco na Figura 24.

Figura 23. Reograma evolução estrutural do módulo de armazenamento das amostras F1 a F6.

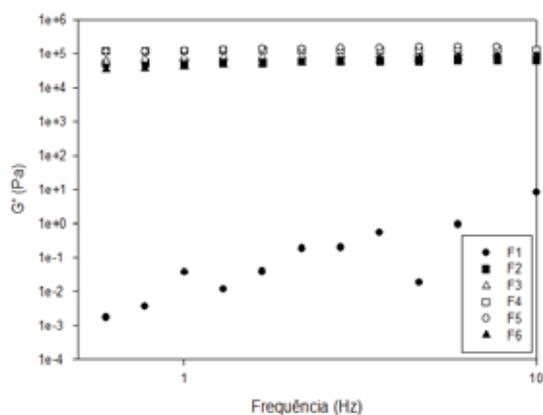
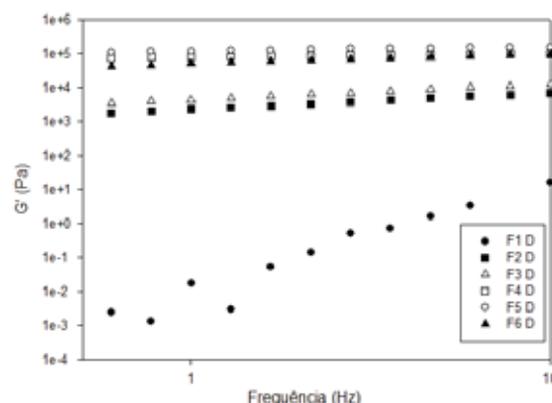


Figura 24. Reograma evolução estrutural do módulo de armazenamento das amostras F1D a F6D.



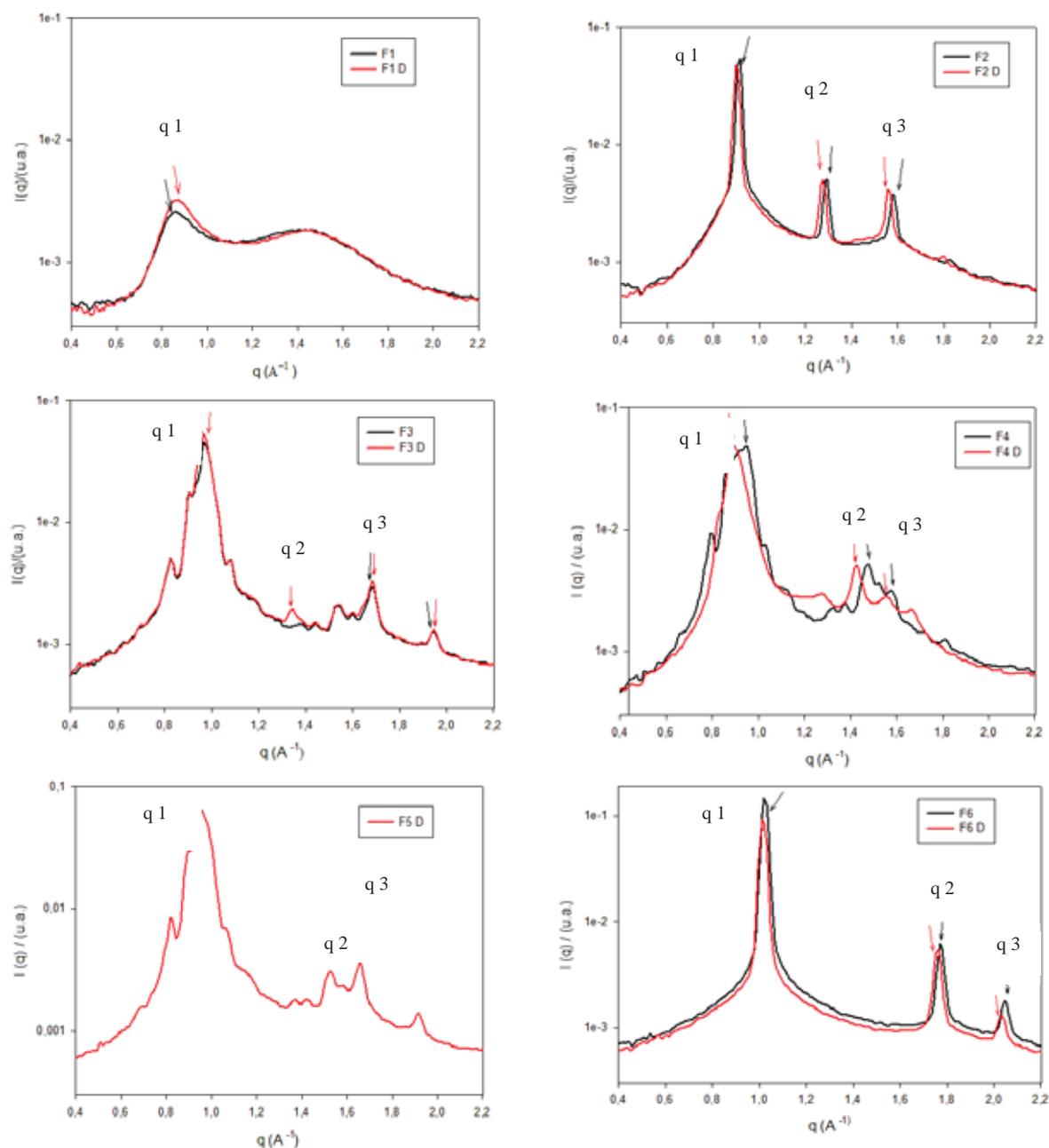
4.2.3. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos pela microscopia de luz polarizada, as medidas de SAXS foram realizadas, podendo assim fornecer resultados mais sensíveis e informações sobre a nanoestrutura de forma mais conclusiva.

Os sistemas foram caracterizados verificando-se a posição dos picos (q_1 , q_2 , q_3 , ...) e assim foi calculada a razão entre os (q) obtidos, em função da posição do primeiro pico (q_1). Com os valores obtidos foi possível caracterizar os sistemas em hexagonais, cúbicos e lamelares.

A Figura 25 revela a intensidade de espalhamento, $I(q)$, em função do vetor espalhamento (q) para os sistemas estudados. Os resultados de SAXS estão de acordo com a microscopia de luz polarizada, o qual confirma a presença de fases hexagonais, cúbicas e microemulsão.

Figura 25. Caracterização por SAXS das formulações F1, F2, F3, F4, F5, F6 e F1D, F2D, F3D, F4D e F6D.



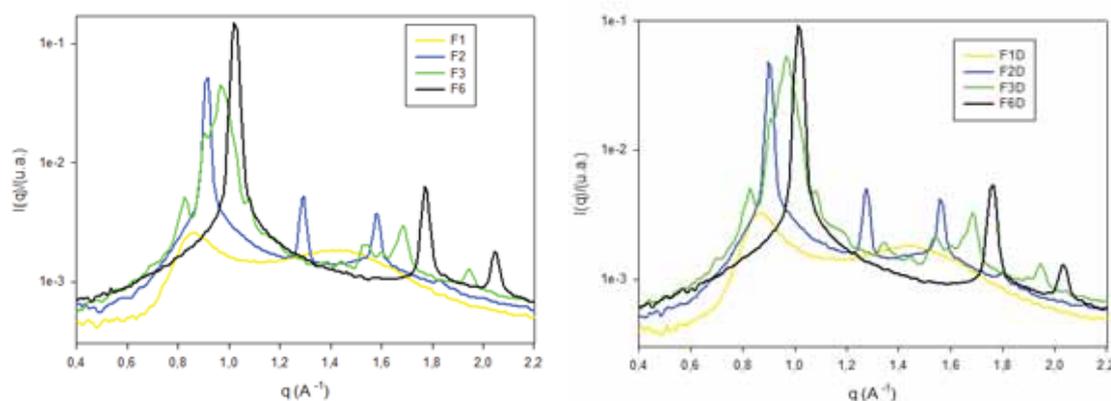
Para as amostras com o fármaco incorporado observa-se que, exceto para F4D, todas as outras apresentam praticamente sobreposição das curvas, sugerindo que a incorporação do fármaco não alterou a estrutura do sistema. Mesmo não ocorrendo a sobreposição da curva de F4D, seus valores de picos obtidos revelaram a presença de estrutura cúbica. Os resultados revelam a sensibilidade da técnica de

Márcia Helena Oyafuso

SAXS e as informações mais conclusivas que esta técnica fornece no estudo desses sistemas.

A Figura 26 representa as medidas de SAXS das formulações em que o componente oleoso foi fixado em 30 %.

Figura 26. Evolução estrutural das formulações F1, F2, F3, F6 e F1D, F2D, F3D e F6D fixando o componente oleoso em 30 %.



As medidas de SAXS analisadas com 30 % de fase oleosa fixada revelaram informações sobre a mudança de estruturas que ocorreram com a diminuição de água e acréscimo de tensoativo. Na Tabela 3 estão dispostas as porcentagens de água e tensoativo para melhor observação da mudança de fases ocorridas.

Tabela 3. Porcentagens dos componentes: óleo, água, tensoativo e fases estruturais.

Componentes	Formulações (%)			
	F1	F2	F3	F6
O	30	30	30	30
A	60	50	40	30
T	10	20	30	40
Estrutura	Microemulsão	Cúbica	Hexagonal	Hexagonal

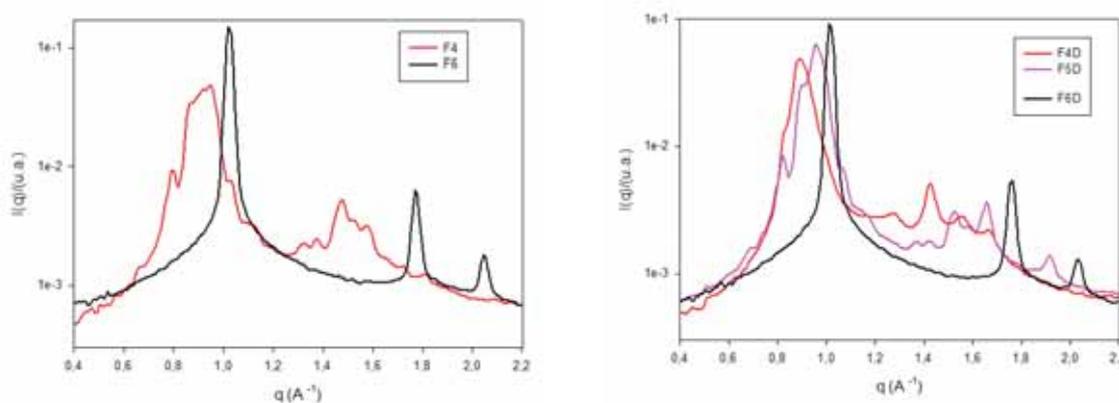
O = óleo; A = água; T = tensoativo

Ao analisar a evolução estrutural dos sistemas obtidos por SAXS, foi possível comparar as formulações em relação ao acréscimo de tensoativo e diminuição de

água, revelando que estruturas como a microemulsão, podem formar estruturas cúbicas e hexagonais. Estes resultados sugerem que a microemulsão seja um precursor para a formação de cristais líquidos. O mesmo ocorreu para as formulações contendo o fármaco.

Já na Figura 27, estão representadas as medidas das formulações em que o componente tensoativo foi fixado em 40 %.

Figura 27. Evolução estrutural das formulações F4, F6 e F4D, F5D e F6D fixando o componente tensoativo em 40 %.



As medidas de SAXS analisadas com 40 % de tensoativo fixada revelaram informações sobre a mudança de estruturas que ocorreram com a diminuição de água e acréscimo de fase oleosa. Na Tabela 4 estão dispostas as porcentagens de água e tensoativo para melhor observação da mudança de fases ocorridas.

Tabela 4. Porcentagens dos componentes: óleo, água, tensoativo e fases estruturais.

Componentes	Formulações (%)		
	F4	F5	F6
O	50	40	30
A	10	20	30
T	40	40	40
Estrutura	Cúbica	Hexagonal	Hexagonal

O = óleo; A = água; T = tensoativo

Com os resultados obtidos através das medidas de SAXS, ao comparar as porcentagens dos componentes das formulações, observou-se que ao fixar os 40 % de tensoativo, partindo da formulação F4 classificada como microemulsão, sua estrutura pode mudar com a diminuição da água e acréscimo de fase oleosa, podendo gerar fases cúbicas e hexagonais.

Uma série de parâmetros estruturais foram determinados através das medidas de SAXS, podendo assim caracterizar as estruturas das fases líquido cristalinas. Os valores de espalhamento do vetor q , correspondentes aos picos que são correlacionados $q_1:q_2:q_3:q_4 = 1:1,73:2,64$, mostra que estes valores de espalhamento são características de periodicidade de fase hexagonal, indicando que a amostra é um cristal líquido hexagonal. Os valores de (q) correspondentes aos picos em que se correlacionam $q_1:q_2:q_3 = 1:2:3$ exibem comportamento de cristais líquidos lamelares (ZHANG *et al.*, 2008). Já para os cristais líquidos de fase cúbica correlacionam-se os valores $1,41:1,73:2,82:3$ (YARIV *et al.*, 2010). Na Tabela 5 estão representados os valores obtidos da razão entre as distâncias dos picos.

Tabela 5. Razão entre as distâncias interplanares para as formulações F1 a F6 e F1D a F6D, obtidos por SAXS.

Formulação	$q_{\max 1}$	$q_{\max 2}$	$q_{\max 3}$	d_1/d_2	d_1/d_3	estrutura
F1	0,85	-	-	-	-	Microemulsão
F1D	0,86	-	-	-	-	Microemulsão
F2	0,91	1,29	1,58	1,41	1,73	Cúbica
F2D	0,90	1,27	1,56	1,41	1,73	Cúbica
F3	0,97	1,68	1,94	1,73	2,00	Hexagonal
F3D	0,96	1,67	1,94	1,73	2,02	Hexagonal
F4	1,03	1,47	1,79	1,42	1,73	Cúbica
F4D	0,89	1,26	1,54	1,41	1,73	Cúbica
F5D	0,95	1,65	1,91	1,73	2,01	Hexagonal
F6	1,02	1,77	2,04	1,73	2,00	Hexagonal
F6D	1,01	1,75	2,02	1,73	2,00	Hexagonal

Para determinar o tipo de estrutura de cada sistema verificou-se a posição dos picos (q_1 , q_2 , q_3 , etc...) e determinou-se a razão entre os diversos (q) em função da posição do primeiro pico (q_1). A partir dos valores obtidos foi possível identificar quais foram as mesofases das estruturas líquido-cristalinas presentes (hexagonal, cúbica). Os resultados obtidos através das medidas de SAXS corroboram com os de MLP, podendo analisar as estruturas com respostas mais conclusivas.

4.2.4. Ensaio de perfil de textura

Os testes de propriedades mecânicas das formulações são de grande importância na liberação de fármacos pela via cutânea e ajudam a analisar parâmetros para que se tenha uma boa aplicação da formulação, obtendo futura aceitação do paciente (SENYIGIT, 2011).

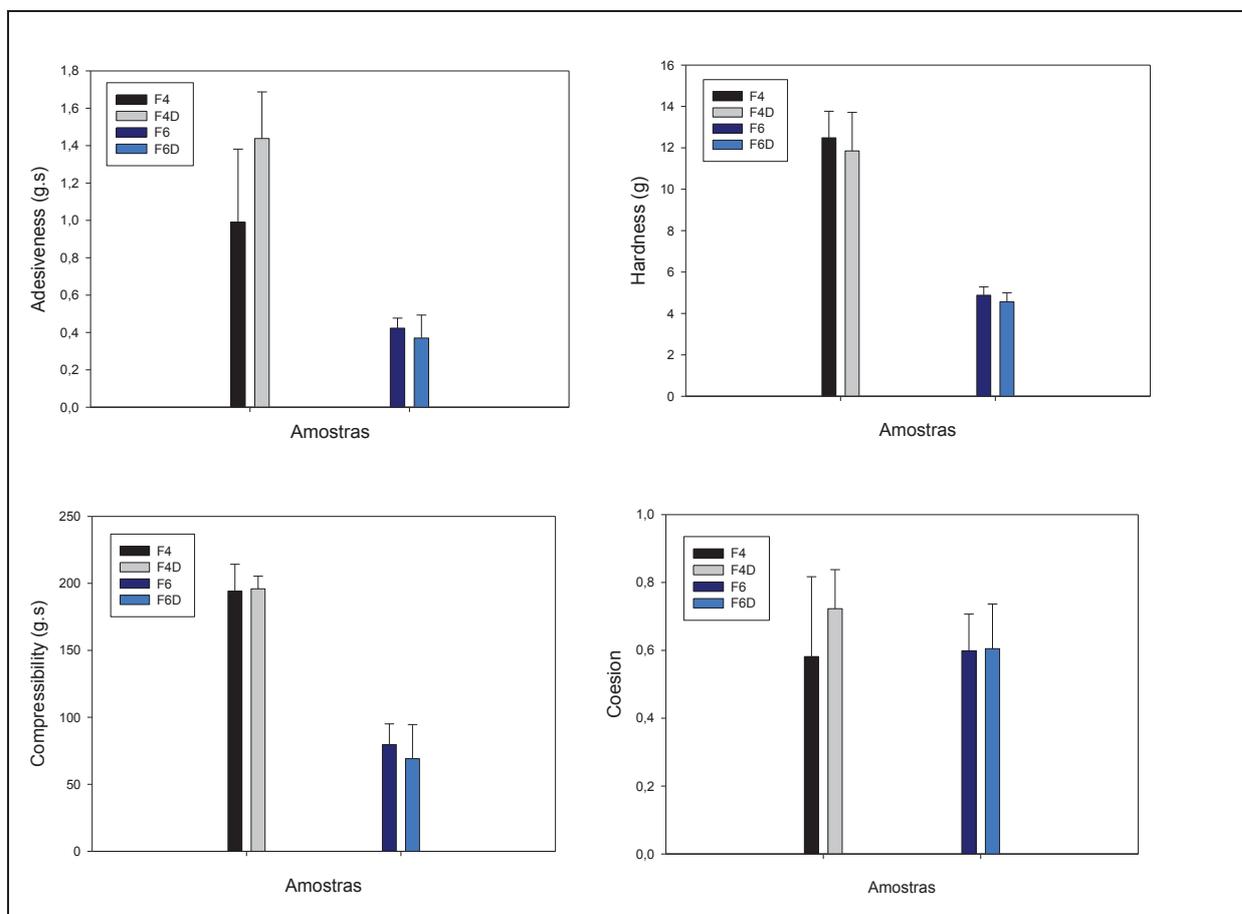
A análise do perfil de textura (TPA) das formulações foi realizada, sendo avaliados os parâmetros como: dureza (g), compressibilidade (g.s.), adesividade (g.s) e coesão.

Os parâmetros dureza e compressibilidade avaliam a facilidade de aplicação da formulação, simulando sua ejeção da embalagem e espalhabilidade na pele; a

adesividade e a coesão estão relacionadas à sua adesividade (bioadesão), sendo que na coesão é analisada a força existente entre as moléculas relacionada à recuperação estrutural da formulação para uma seguinte aplicação (TAN *et al.*, 2000).

As formulações identificadas como microemulsões (F1 e F1D) não foram sujeitas às análises de propriedades mecânicas, como dureza, compressibilidade, adesividades (g.s) e coesividade, pois não impuseram resistência mecânica ao fluxo.

Os resultados obtidos a partir da análise do perfil de textura das amostras F4, F4D; F6 e F6D revelaram que as formulações F4 e F4D apresentaram nos parâmetros adesividade (g.s), compressibilidade (g.s), dureza (g) e coesão maiores valores comparados às formulações F6 e F6D. Sugere-se então que o sistema de fase cúbica (F4 e F4D) possui melhor facilidade de aplicação da formulação na pele, sendo de fácil espalhabilidade; com melhor poder de reestruturação para uma próxima aplicação do produto. Foi avaliado que a presença do fármaco nas formulações não alterou suas propriedades mecânicas. A Figura 28 representa os gráficos de TPA.

Figura 28. Análise do perfil de textura das formulações F4, F4D, F6 e F6D (n=6)

4.2.4.1. Ensaios de bioadesão *in vitro*

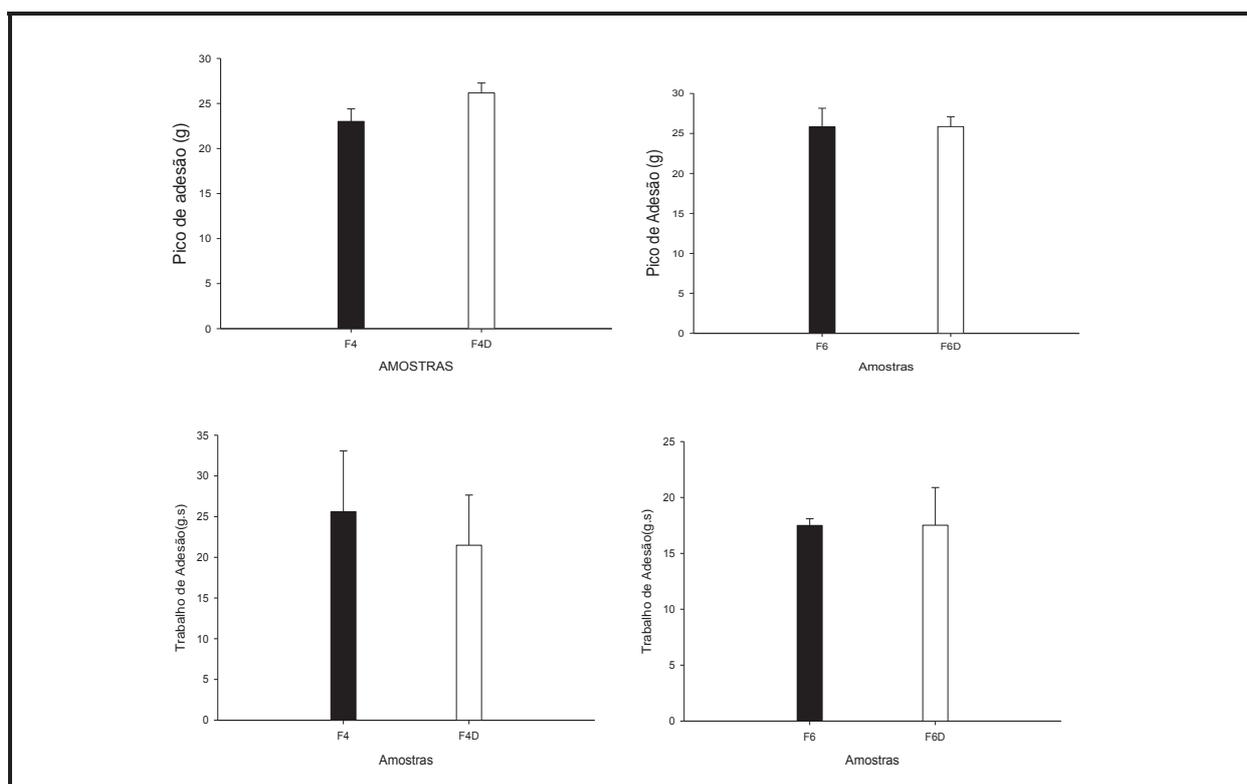
Os ensaios de bioadesão das formulações F4, F4D, F6 e F6D foram avaliados sobre pele suína e está representada na Figura 29.

Todas as amostras analisadas em pele suína foram hidratadas antes de cada ensaio de adesão, e como apresentam estruturas diferentes, o contato com a água também contribuiu para diferenças nos picos e trabalho de adesões encontradas entre as formulações.

As formulações F4 e F6 foram classificadas como fases cúbica e hexagonal por microscopia de luz polarizada, respectivamente, como já haviam sido relatadas. As formulações F4 e F4D, caracterizadas como bem viscosas, ao entrarem em contato com a pele hidratada podem adsorver mais água, aumentando a viscosidade e estruturação, tornando-as mais bioadesivas que as formulações F6 e F6D, que

apresentam fase hexagonal e menor viscosidade mesmo em contato com a água, o que justifica os valores menores de bioadesão.

Figura 29. Ensaio de bioadesão das formulações F4, F4D, F6 e F6D.



Os ensaios do pico de adesão podem ser explicados pela teoria do umedecimento, onde as amostras ao entrarem em contato com água, adquirem uma viscosidade maior e, conseqüentemente, uma maior bioadesão em contato com a pele suína.

Quanto aos resultados de trabalho de adesão, as amostras F4 e F4D também apresentaram maior trabalho de adesão em relação às formulações F6 e F6D, como mostra a figura 29. Devido à maior viscosidade da formulação F4, ela precisa de uma maior força para remover a formulação da pele do que a formulação de fase hexagonal que é menos viscosa.

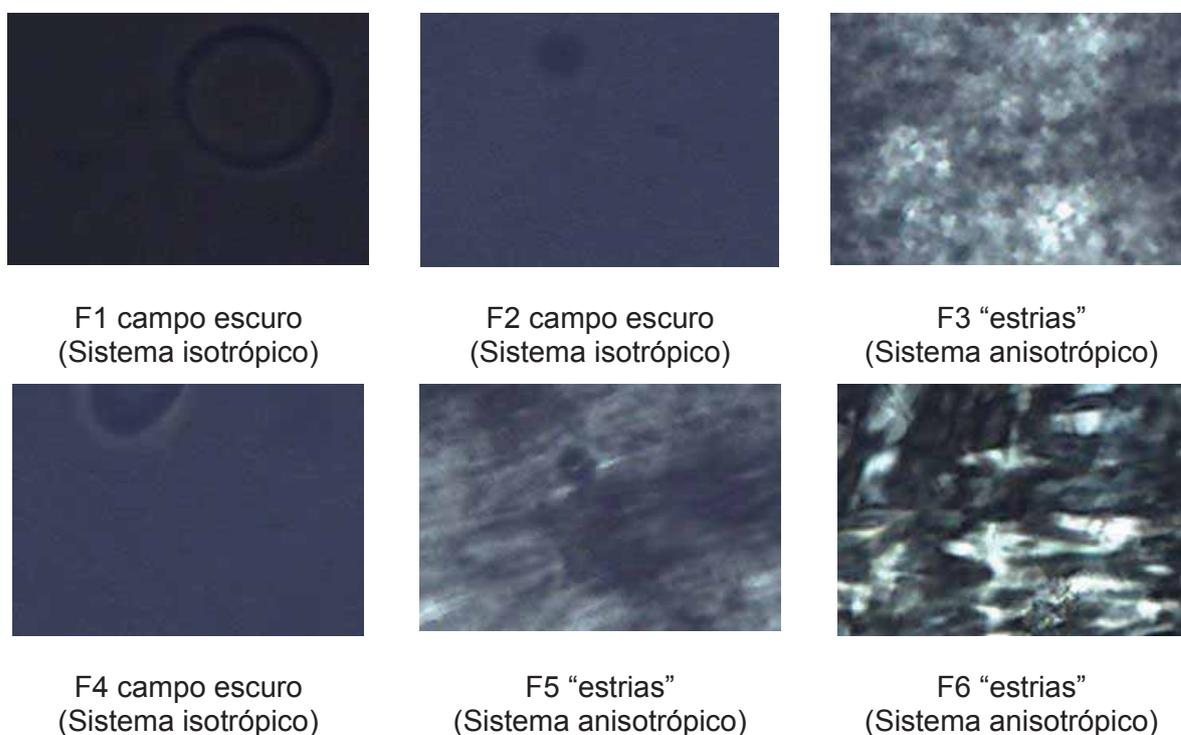
Portanto, os resultados demonstraram que a formulação F4 apresentou maior bioadesão, o que a torna uma alternativa para a administração tópica de fármacos, pois permite que a formulação permaneça mais tempo aderida a pele.

4.3. Teste de estabilidade das formulações

4.3.1. Avaliação visual da estabilidade das formulações

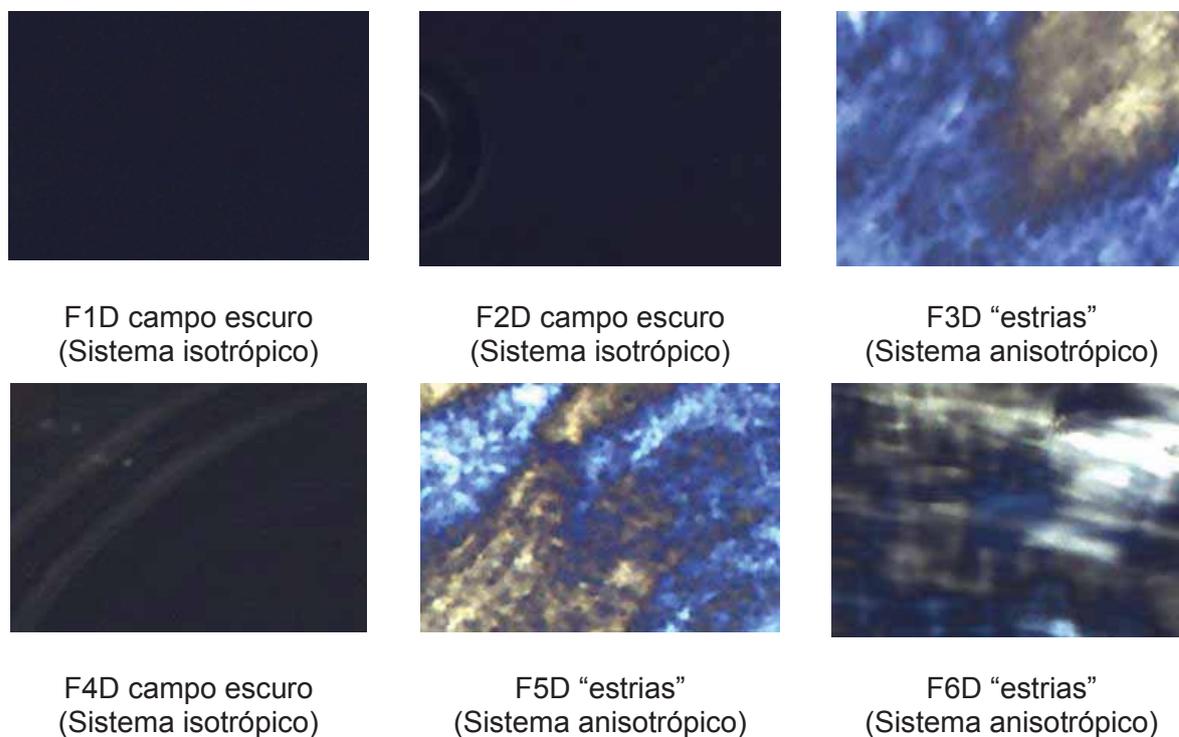
Após o preparo das formulações as mesmas foram armazenadas em temperatura ambiente no período de seis meses. As fotomicrografias das formulações F1 a F6 obtidas por microscopia de luz polarizada são apresentadas na Figura 30.

Figura 30. Fotomicrografias das formulações F1 a F6, obtidas por microscopia de luz polarizada após seis meses de preparo.



A Figura 31 apresenta as fotomicrografias das formulações F1D a F6D (com DXM) obtidas por microscopia de luz polarizada após seis meses de armazenamento das formulações.

Figura 31. Fotomicrografias das formulações F1D a F6D, obtidas por microscopia de luz polarizada após seis meses de preparo.



Devido a grande estabilidade termodinâmica estes sistemas não registraram qualquer tipo de alteração física, como separação de fases, precipitação, mudança de cor e odor. As análises feitas por microscopia de luz polarizada também não demonstraram alterações quanto à estabilidade das estruturas líquido-cristalinas.

4.3.2. Teste de centrifuga

O teste da centrifugação foi realizado utilizando 5 g de cada amostra em estudo, as quais foram centrifugadas a 3000 rpm, por 30 minutos, e nenhuma alteração quanto a separação de fases foi observada, demonstrando que as formulações mantiveram-se estáveis.

4.3.3. Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo

Os valores de pH obtidos para as diferentes formulações à temperatura ambiente estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de pH obtidos para as diferentes formulações.

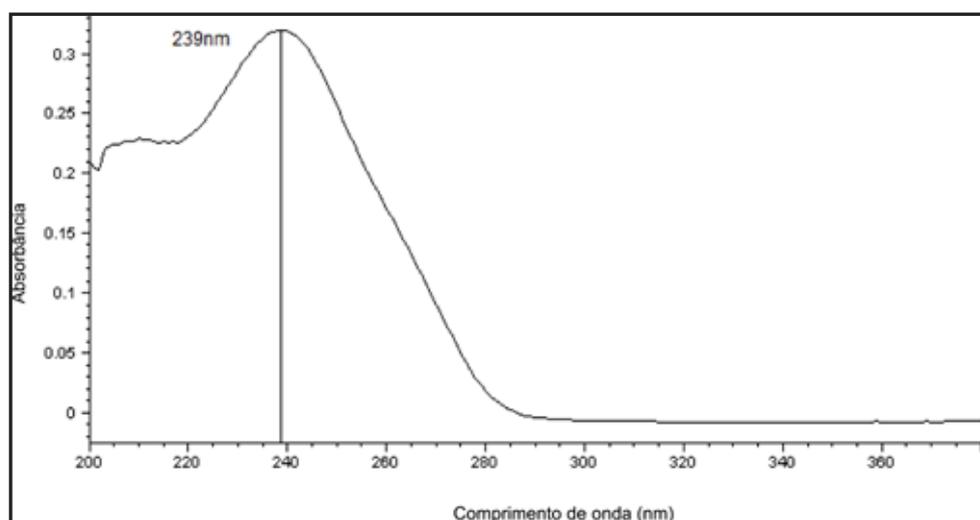
Formulações	F1	F2	F3	F4	F5	F6
pH	4,18	3,93	3,70	4,33	4,52	3,93
Formulações	F1D	F2D	F3D	F4D	F5D	F6D
pH	4,14	3,69	3,60	3,64	3,63	3,62

Observou-se na Tabela 6 que não houve alterações significativas nos valores de pH após a adição de DXM.

4.4. Determinação do espectro de absorção do DXM no ultravioleta-visível (UV-Vis)

O espectro de absorção de DXM utilizando o etanol como solvente está representado na Figura 32 e foi obtido contra branco de etanol.

Figura 32. Espectro de absorção no UV-VIS da solução etanólica de DXM, de concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Segundo a Figura 32, a solução etanólica de dexametasona apresentou $\lambda = 239 \text{ nm}$. Este dado corrobora os obtidos na literatura (MERK, 2006; USP, 2006).

4.5. Determinação da incorporação do DXM na formulação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A partir dos valores obtidos e a equação da reta, foram calculadas as quantidades máximas de fármaco incorporado nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6. A curva analítica do DXM em metanol encontra-se detalhada no subtítulo Validação.

A Tabela 7 apresenta a quantidade de dexametasona incorporada nas formulações, obtidas por CLAE.

Tabela 7. Quantidade de DXM incorporada nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6.

Parâmetros Estatísticos	dexametasona incorporada (mg g ⁻¹ formulação)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Média (n=3)	1,28	2,26	5,30	4,26	4,00	4,13
DP*	0,014	0,037	0,049	0,20	0,12	0,15
CV **(%)	1,10	1,67	0,92	4,71	3,18	3,76

DP*= desvio padrão; CV** = coeficiente de variação

A formulação F3, caracterizada como um sistema líquido-cristalino de fase hexagonal, quando comparada à F6, também sistema hexagonal, foi a que apresentou maior quantidade de DXM incorporada, sugere-se que este comportamento de solubilizar uma maior quantidade de fármaco pode estar relacionado à formulação, por apresentar maiores valores de água.

4.6. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação do DXM nos estudos de retenção cutânea *in vitro*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Embora existam métodos farmacopeicos para quantificação do DXM por CLAE (USP, 2006), a composição dos sistemas de liberação, como o tensoativo e a fase oleosa, pode interferir na quantificação do fármaco; por isso, fez-se necessário desenvolver e validar o método para quantificá-la nestes sistemas.

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, para a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Assim, por meio de estudos experimentais, a validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados. Ao considerar uma metodologia validada, alguns parâmetros devem ser avaliados: linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003).

4.6.1. Linearidade

É a capacidade de um método analítico assegurar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). A linearidade deve ser determinada pela análise de no mínimo 5 concentrações diferentes e obter como coeficiente de correlação (r) o valor de 0,99.

Na Tabela 8 estão dispostos os valores das áreas sobre a curva, obtidos a partir da leitura das soluções de diferentes concentrações. Para estes valores foram calculados a regressão linear. O intercepto no eixo Y obtido foi 0,0007 e a inclinação da linha de regressão foi 0,0021. Equação onde $y = 0,0007x + 0,0021$.

Tabela 8. Concentrações das soluções padrão utilizadas para a construção da curva analítica e os respectivos valores da área sob a curva (ASC) obtida por CLAE no comprimento de onda de 239 nm (n = 3).

[DXM] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ASC (mAU)	DP	CV (%)
1,0	0,002495	0,000070	2,83
2,5	0,005460	0,000062	1,14
5,0	0,0115923	0,000245	2,12
10,0	0,022098	0,000628	2,84
15,0	0,031586	0,000593	1,88
20,0	0,042841	0,000706	1,65
25,0	0,053016	0,001143	2,16

DXM = acetato de dexametasona; ASC= área sobre a curva; DP =desvio padrão; CV=coeficiente de variação.

4.6.2. Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impureza e produtos de degradação. É necessário demonstrar a capacidade de seletividade do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contenham o fármaco (BRASIL, 2003).

A representação dos cromatogramas nas Figuras 33, 34 e 35, demonstram que o método é específico para a determinação da dexametasona, pois o pico da DXM eluiu no tempo de 9,5 minutos e para os demais componentes, a eluição ocorreu abaixo deste tempo.

4.6.3. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, na qual se avalia.

Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por no mínimo nove determinações, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta com três replicas cada.

Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância dos resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) segundo a equação 8:

$$CV = \frac{DP}{CDM} \times 100 \quad (8)$$

em que: *DP*= desvio padrão; *CDM*= concentração média determinada. O valor máximo aceitável do coeficiente de variação é até 5 % (BRASIL, 2003).

Dois tipos de ensaios foram realizados para avaliar a precisão: a repetibilidade no mesmo dia e a precisão intermediária em dias diferentes.

Na Tabela 9 estão representados os valores obtidos para o ensaio de repetibilidade.

Tabela 9. Resultados obtidos para ensaio de precisão por repetibilidade (n=3)

[DXM]_{teórica} (µg mL⁻¹)	Área	DP	CV (%)
1,0	0,002512	0,000068	2,74
10,0	0,02213	0,000625	2,83
30,0	0,06351	0,000825	1,31

DXM = acetato de dexametasona; DP =desvio padrão; CV=coeficiente de variação.

Os valores de CV foram avaliados em relação à área dos picos encontrados, para 3 concentrações da curva analítica, ou seja, baixa, média e alta (1, 10 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O coeficiente de variação entre as amostras teve seu maior valor em 2,83. De acordo com BRASIL (2003), o valor máximo aceitável para o coeficiente de variação é de 5 %. Assim os resultados obtidos demonstraram que o método é preciso.

Na Tabela 10, estão dispostos os resultados para o ensaio de precisão intermediária, realizada em três dias consecutivos.

Tabela 10. Resultados obtidos para ensaio de precisão intermediária (n=3)

[DXM]_{teórica} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área	DP	CV (%)
1,0	0,002139	0,000026	1,22
10,0	0,02274	0,000150	0,66
30,0	0,06504	0,000464	0,71

DXM = acetato de dexametasona; DP =desvio padrão; CV=coeficiente de variação.

Os valores obtidos do coeficiente de variação, para o ensaio de precisão intermediária, encontraram-se abaixo de 5 %, demonstrando que o método é preciso

4.6.4. Exatidão – recuperação

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Com os dados do coeficiente de variação de cada concentração foi possível analisar a precisão. A exatidão foi expressa com a porcentagem de recuperação da concentração de DXM na quantificação comparada com a quantidade conhecida de DXM na amostra. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11. Cálculos dos parâmetros estatísticos da exatidão para validação do método de quantificação da DXM por CLAE.

	Concentrações determinadas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	1,0	10,0	30,0
Média	0,85	10,18	29,51
DP	0,000070	0,000608	0,000773
CV (%)	0,008	0,0059	0,0026
Recuperação	85,41	101,8	98,36

DP =desvio padrão; CV=coeficiente de variação.

Os resultados dos cálculos dos coeficientes de variação e porcentagem de recuperação demonstraram que o método foi preciso, pois os valores de CV % foram inferiores a 5 %. A exatidão foi comprovada por resultar em valores de recuperação dentro da faixa de 80 a 110 % (BRASIL, 2003).

4.6.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. É estabelecido por meio de análises de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes, até o menor nível detectável (ICH, 2005).

O LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. É estabelecido por meio das análises de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável (ICH, 2005).

Os valores das concentrações 1,0; 2,5 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ calculados a partir das leituras das áreas sob a curva das amostras, foram substituídos na equação para o cálculo de LD e LQ. O valor de LD obtido foi de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o valor de LQ foi de 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo consideravelmente abaixo que a menor concentração empregada na curva analítica.

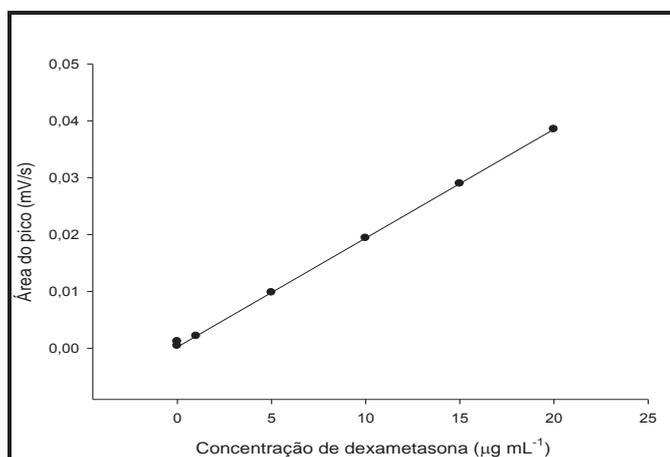
4.7. Avaliação da liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*

4.7.1. Metodologia analítica para quantificação do DXM nos estudos de permeação cutânea e liberação *in vitro*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A linearidade do método de quantificação da DXM por CLAE foi determinada através da construção da curva analítica da DXM em tampão fosfato de potássio monobásico 0,01M pH 7.4, adicionado de 0,5 % de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5OP (Procetyl AWS®). As áreas médias dos picos da DXM *versus* os dados de concentração foram tratados por regressão linear. O desvio padrão para a inclinação e o intercepto da curva analítica foi calculado (Figura 36).

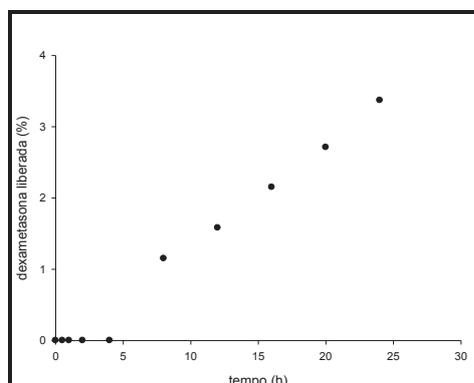
Os resultados obtidos foram utilizados nos ensaios de liberação *in vitro* e permeação cutânea. Esta curva apresentou-se linear, com equação $y = 0,0019x + 0,0002$ e coeficiente de regressão linear 0,9997, onde encontram-se dentro do preconizado pela legislação BRASIL (2003).

Figura 36. Curva analítica do DXM em tampão fosfato de potássio 0,01M pH 7.4 adicionado de 0,5 % de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado.



Realizou-se teste de liberação *in vitro* na formulação F6D (hexagonal), contendo 0,1 % de DXM. O experimento permitiu avaliar o perfil de liberação do fármaco, relacionado com a saída do mesmo do sistema matricial. A Figura 37 apresenta o ensaio de liberação da formulação F6D.

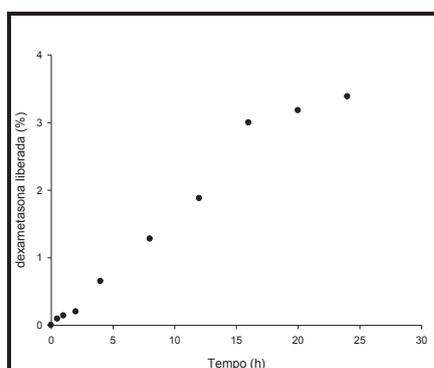
Figura 37. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) de DXM incorporada na formulação F6D (hexagonal), contendo DXM 0,1 % (média de n=6).



Os resultados mostraram que a liberação do fármaco se inicia após 8 horas de experimento e continua em escala crescente até o intervalo de 24hs.

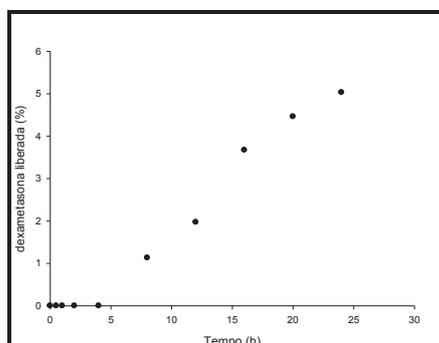
Para a formulação F1D (microemulsão), o ensaio de liberação permitiu avaliar que a partir de 30 minutos de experimento, foi possível avaliar a liberação do fármaco da matriz. A Figura 38 representa o perfil de liberação deste sistema.

Figura 38. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) de dexametasona incorporada na formulação F1D (microemulsão) contendo dexametasona 0,1 % (média de n=6).



A Figura 39 apresenta o perfil de liberação in vitro do DXM incorporado na formulação F4D (cúbica).

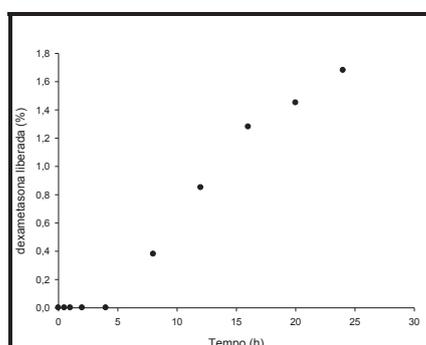
Figura 39. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) do DXM incorporado na formulação F4D (cúbica) contendo DXM 0,1 % (média de n=6).



Este ensaio revelou resultados semelhantes aos ensaios de liberação da formulação F6D (hexagonal). A liberação do fármaco para este sistema teve início no intervalo de tempo de 8 horas. No período de 24hs, a porcentagem máxima liberada foi em torno de 6%, enquanto que F6D liberou em torno de 4% de fármaco.

Ensaio com sistemas binários (água e tensoativo) também foram realizados com o objetivo de avaliar se a presença do silicone fluido de copolímero glicol poderia contribuir para a retenção do fármaco na pele em sistemas mais estruturados como cristais líquidos de fases hexagonais e cúbicas, bem como para as microemulsões. A Figura 40 representa a liberação do sistema binário, cujos componentes são: 50% de água e 50% de tensoativo (fase hexagonal).

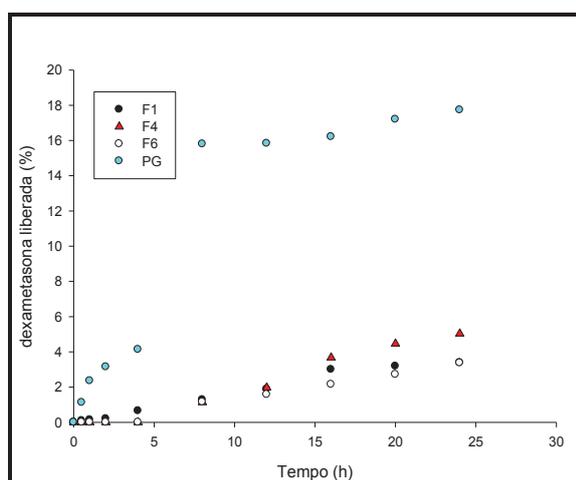
Figura 40. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) de dexametasona incorporada no sistema binário AT (água/tensoativo 1:1), contendo dexametasona 0,1% (média de n=6).



O perfil de liberação do sistema binário AT revelou semelhança aos demais sistemas estudados, a liberação do fármaco teve início após 8 horas de experimento

sugerindo assim que a presença do silicone no sistema binário não interferiu no tempo de liberação do fármaco da matriz, mas na quantidade liberada sim.

Figura 41. Perfil de liberação in vitro (% de liberação) de DXM incorporado nos sistemas F1, F4, F6 e propilenoglicol (PG). (média de n=6).



Comparando-se as amostras F1D, F4D e F6D, estatisticamente, verificou-se que as formulações não diferem entre si, quanto à porcentagem de DXM liberado em 24 h, porém, estas liberaram quantidade de fármaco significativamente ($p < 0,05$) maior, sendo 3,38, 5,03 e 3,37% respectivamente, quando comparada a formulação AT (sistema binário água/tensoativo), que liberou 1,68%. Tais dados sugerem que a presença de silicone no sistema facilita a liberação de DXM. Foi possível observar a liberação de DXM em propilenoglicol, sendo estatisticamente maior que as demais formulações (17,73%). Estes resultados sugerem que a estrutura do sistema pode modular a liberação do fármaco em relação ao tempo.

A Tabela 12 apresenta a porcentagem de DXM liberada após 24 horas de experimento.

Tabela 12. Porcentagem de DXM liberada, após 24h de experimento.

Amostra	Estrutura	Liberação(%)
F1D	Microemulsão	3,38
F4D	Cúbica	5,03
F6D	Hexagonal	3,37
AT	Hexagonal	1,68
Propilenoglicol controle	-	17,73

AT= sistema binário água/tensoativo

A partir dos ensaios de liberação, foi possível avaliar e comparar a liberação do fármaco de cada sistema estudado, F1D, F4D, F6D e AT. Na literatura constam vários modelos cinéticos para representar os perfis de liberação dos fármacos dos sistemas. Assim, foram aplicados os modelos matemáticos: Baker e Lonsdale, Peppas, Hixon e Crowell, Higushi, Primeira Ordem e Weibull para cada sistema.

De acordo com o maior valor de r^2 ajustado às formulações (COSTA & LOBO, 2001), F1D, F4D e AT seguem o modelo matemático de Weibull e a formulação F6D o modelo matemático de Peppas. O modelo matemático de Weibull (equação 9) pode ser aplicado para o processo de dissolução e liberação, assim o valor de b da equação de Weibull ajuda a definir o mecanismo de transporte do fármaco, onde $b = 1$ expressa liberação de primeira ordem, $b (0,75 - 1)$ expressa mecanismo de liberação fickiniano e transporte de caso 2; $b > 1$ indica curva sigmoideal e mecanismo complexo de liberação, onde ocorre intumescimento e erosão simultaneamente para liberação do fármaco (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006; COSTA & LOBO, 2001).

$$m = 1 - \exp\left[\frac{-(t - T_i)b}{a}\right] \text{ (equação 9)}$$

onde: m é fração acumulada de fármaco; t é o tempo final; T_i é o tempo de latência, até que o processo de dissolução ocorra; b é a curva como forma exponencial e a é o parâmetro de escala, relacionado com tempo decorrido de ensaio.

O modelo matemático de Peppas (equação 10) também pode ser expresso através da análise do valor de n contido na equação, onde n é o expoente de liberação, caracterizando os diferentes mecanismos de liberação, os valores de $n=0,5$ expressa modelo de difusão de Fick, os valores de n que vão de 0,5 a 1, expressam um modelo não fickiano, onde ocorre transporte anômalo, $n=1$ transporte de caso II e $n>1$ expressa modelo de super transporte de caso II.

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = at^n \quad (\text{equação 10})$$

onde: a é a constante cinética de liberação controlada; n é o expoente de liberação e Mt/M_{∞} é a fração do fármaco liberado ao longo do tempo.

Dessa forma, os ensaios de liberação para as formulações F1D e F4D demonstraram seguir o modelo de liberação de Weibull, que resulta em um mecanismo complexo de liberação, onde ocorre intumescimento e erosão simultaneamente para a liberação do fármaco. Para a formulação F6D, foi utilizado o modelo de Peppas, onde o valor de n foi maior que 1, revelando modelo de super transporte de caso II.

Os estudos de permeação e retenção cutânea são de grande importância no sentido de avaliar as interações de uma formulação com a pele, como se dá a difusão do fármaco nas diferentes camadas da pele, onde é possível analisar a penetração do fármaco, retendo ou não no estrato córneo ou nas demais camadas da pele, como epiderme e derme.

Os ensaios de permeação dos sistemas estudados (F1D, F4D, F6D e o sistema binário A/T) não apresentaram indícios de fármaco permeado em nenhum dos intervalos de tempo. Os estudos de retenção demonstraram que ocorreu retenção de dexametasona no estrato córneo, os dados estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13. Quantidade de dexametasona retida e ou permeada na pele em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, após 24h de experimento.

Amostra	Estrutura	Retenção EC ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Retenção Ep+Derm ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Permeação
F1D	microemulsão	37,29 \neq	-	-
F4D	cúbica	22,82 \neq	-	-
F6D	hexagonal	18,19 \neq°	-	-
AT	hexagonal	15,36 $^{\circ}$	-	-

EC=estrato córneo; Ep+Derm =epiderme + derme; AT= sistema binário água/tensoativo

Nos estudos de retenção observou-se que todos os sistemas apresentaram retenção de dexametasona no estrato córneo (EC) não havendo retenção na epiderme + derme e na permeação. Os resultados obtidos revelaram que as formulações F1D, F4D e F6D são iguais do ponto de vista estatístico. F1D e F4D são diferentes de AT e F6D tem comportamento de retenção igual ao do sistema AT que também é de fase hexagonal.

A amostra F1D é a que apresentou maior quantidade de DXM retida no estrato córneo. Observou-se também que o sistema binário AT não apresentou diferença significativa quando comparado a formulação F6D, sendo ambos de estruturas hexagonais, porém sem a presença da fase oleosa. Neste sentido sugere-se que a ausência de silicone no sistema binário AT demonstrou perfil de retenção semelhante aos demais sistemas. Os resultados sugerem que os sistemas desenvolvidos podem ser utilizados para a administração cutânea de fármacos como a DXM, em que se objetiva efeito de ação local.

CONCLUSÕES

- Através da construção do diagrama de fases, foi possível analisar as diversas regiões formadas com diferentes formas estruturais, em função da proporção dos componentes água, óleo e tensoativo, levando assim a diferentes comportamentos de liberação de fármacos;
- Foi possível obter sistemas com diferentes formas de estruturação utilizando polioxietileno 20 cetil éter como tensoativo e poliéter funcional siloxano como fase oleosa e água ultra pura;
- A técnica de SAXS, juntamente com a microscopia de luz polarizada e reologia, foram de extrema importância na caracterização dos sistemas. As utilizações de técnicas diferentes complementaram-se, reforçando os resultados obtidos na identificação estrutural dos sistemas;
- Os ensaios de análise de perfil de textura revelaram que o sistema de fase cúbica (F4 e F4D) possui melhor facilidade de aplicação na pele e é de melhor espalhabilidade que o sistema de fase hexagonal (F6 e F6D), sendo também mais bioadesivo.
- Os métodos analíticos para quantificação do DXM nos ensaios de permeação e retenção cutânea *in vitro* por CLAE demonstraram-se sensíveis, exatos e precisos;
- Os ensaios de liberação revelaram que os sistemas F1D(microemulsão), F4D(cúbica) e F6D(hexagonal) liberam o fármaco na porcentagem de 3 a 5%. Quando comparado ao sistema binário AT (1%), sem a presença do silicone fluido, notou-se, que o sistema AT libera uma quantidade de fármaco significativamente menor em relação aos demais sistemas, sugere-se então que a ausência da fase oleosa no sistema e sua estruturação, podem modular a liberação do fármaco em relação ao tempo.

- As formulações F1D, F4D e F6D promoveram retenção de DXM no estrato córneo, sugerindo serem sistemas que ao serem administrados pela via cutânea, facilitam o efeito de ação local da DXM, minimizando possíveis efeitos adversos, promovendo melhor adesão do paciente ao tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **APPS PharmSci.**, v. 2, n. 3, 2000.
- AME. **Dicionário de Administração de Medicamentos na Enfermagem**. 3 ed. Rio de Janeiro: EPUB, 2002.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BAROLI, B.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A.; DELGADO-CHARRO, M. B.; FADDA, A. M.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. **J. Control. Release**, v. 69, p. 209-218, 2000.
- BENDER, J.; SIMONSSON, C.; SMEDH, M.; ENGSTRÖM, S.; ERICSON, M. B. Lipid cubic phases in topical drug delivery: Visualization of skin distribution using two-photon microscopy. **J. Control. Release**, v. 129, p. 163-169, 2008.
- BENITA, S. (Ed.) **Microencapsulation: Methods and Industrial Applications**. 2 ed. New York: Taylor and Francis, 2006.
- BHARDWAJ, U.; BURGESS, D. J. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. **Int. J. Pharm.**, v. 388, n. 1-2, p. 181-189, 2010.
- BHARGAVA, H. N.; NARURKAR, A.; LIEB, L. M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharm. Technol.**, p. 45-54, 1987.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, DF, 2003.
- BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J. F.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J. Control. Release**, v. 60, n. 1, p. 67-76, 1999.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.) **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.
- CASTRO, M. Efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos dos glicocorticoides: concordância ou discordância? **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 49, n. 3, 2005.
- CHORILLI, M.; PRESTES, P. S.; RIGON, R. B.; LEONARDI, G. R.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Structural characterization and *in vivo* evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloid. Surface B**, v. 85, p. 182-188, 2011.
- CHORILLI, M.; PRESTES, P. S.; RIGON, R. B.; LEONARDI, G. R.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.

- COSTA, P.; LOBO, J.M.S. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J.Pharm. Sci.**, v. 13, p. 123-133, 2001.
- CUIHUA, L. , JINHUA, H., JIANHONG, L., ZHENGIANG, Y., QIANLING,Z., CHUANXIN, H., WEILIANG, H., Self-assembly of lyotropic liquid crystal phases in ternary systems of 1,2-dimethyl-3-hexadecylimidazolium bromide/1-decanol/water. **J. Colloid Interf. Sci.** v.342, p 354–360, 2010.
- D'CRUZ, O. J.; UCKUN, F. M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v. 64, p. 113-123, 2001.
- DOSTAL, G. H.; GAMELLI, R. L. The differential effect of corticosteroids on wound disruption strength in mice. **Arch. Surg.**, v. 125, n. 5, p. 636-640, 1990.
- FANG, J. Y.; FANG, C. L.; SUNG, K. C.; CHEN, H. Y. Effect of low frequency ultrasound on the *in vitro* percutaneous absorption of clobetasol 17-propionate. **Int. J. Pharm.**, v. 191, p. 33-42, 1999.
- FARKAS, E.; ZELCÓ, R.; TOROK, G.; RACZ, I.; MARTON, S. Influence of chlorhexidine species on the liquid crystalline structure of vehicle. **Int. J. Pharm.**, v. 213, p. 1-5, 2001.
- FARMACOPÉIA brasileira. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba e copaíba.** 1998. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.
- FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.
- GAO, K.; JIANG, X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 310, p. 213-219, 2006.
- GENNARO, A. R. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy.** 20 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 655.
- GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 59, n. 11, p. 1152-1161, 2007.
- GRILL, A. E.; JOHNSTON, N. W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Pat. Drug Delivery Formulation**, v. 3, n. 2, p. 137-142, 2009.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **Int. J. Pharm.**, v. 224, p. 1-18, 2001.

- HEIN, M.; ARENA, S. **Fundamentos de química geral**. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1998. p. 31-33.
- HIGUCHI, W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **J. Pharm. Sci.**, v. 51, p. 802-804, 1962.
- HIGUSHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instrum.**, v. 4, p. 117-212, 1965.
- HO, M. L.; FU, Y. C.; WANG, G. J.; CHEN, H. T.; CHANG, J. K.; TSAI, T. H.; WANG, C. K. Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite. **J. Control. Release**, v. 128, p. 142–148, 2008.
- HUGHES, J.; RUSTIN, M. Corticosteroids. **Clin. Dermatol.**, v. 15, p. 715-721, 1997.
- ICH. International Conference on Harmonization. Topic Q2(R1). **Validation of analytical procedures: text and methodology**. 2005.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- KHONDKAR, D.; TESTER, R. F.; HUDSON, N.; KARKALAS, J.; MORROW, J. Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinized waxy maize starch with pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1296–1301, 2007.
- KOFFI, A.A.; AGNELY, F.; PONCHEL, G.; GROSSIORD, J.L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 27, p. 328-335, 2006.
- KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 123–126, p. 369–385, 2006.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 54, p. S77-S98, 2002.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 45, n. 1, p. 89-121, 2000.
- LEHMANN, L.; KEIPERT, S.; GLOOR, M. Effects of microemulsion on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 52, n. 2, p. 129-136, 2001.
- MACHET, L.; BOUCAUD, A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. **Int. J. Pharm.**, v. 243, p. 1-15, 2002.
- MAIA, C. S.; MEHNERT, W.; SCHÄFER-KORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. **Int. J. Pharm.**, v. 196, n. 2, p. 165-167, 2000.
- MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Curr. Drug Delivery**, v. 3, p. 275-285, 2006.

- MAKAI, M.; CSÁNYI, E.; NÉMETH, Z.; PÁLINKÁS, J.; ERŐS, I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **Int. J. Pharm.**, v. 256, p. 95–107, 2003.
- MERCK index. 14 ed. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories, 2006. p. 500.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Trop. J. Pharm. Res.**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.
- MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- MULLER-GOYMANN, C. C.; FRANK, S. G. Interaction of lidocaine and lidocaine-HCl with the liquid crystal structure of topical preparations. **Int. J. Pharm.**, v. 29, n. 2-3, p. 147-159, 1986.
- NESSEEM, D. I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 26, p. 387–399, 2001.
- OURIEMCHI, E. M.; BOUZON, J.; VERGNAUD, J. M. Modelling the process of controlled release of drug in in vitro. **Int. J. Pharm.**, v. 113, n. 2, p. 231-240, 1995.
- PELTOLA, S.; SAARINEN-SAVOLAINEN, P.; KIESVAARA, J.; SUHONEN, T. M.; URTTI, A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. **Int. J. Pharm.** v. 254, p. 99–107, 2003.
- PHELPS, J.; Bentley, M.V.L.B.; Lopes, L.B. In situ gelling hexagonal phases for sustained release of an anti-addiction drug. **Colloid. Surface. B: v.87, p. 391– 398, 2011.**
- PAPADOPOULOU, V., KOSMIDIS, K., VLACHOU, M., MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **Int. J. Pharm.**, v.309, p.44–50, 2006.
- POET, T. S.; McDOUGAL, J. N. Skin absorption and human risk assessment. **Chem.-Biol. Interact.**, v. 140, p. 19-34, 2002.
- PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of foscan/nanoemulsion (NE) applicable to PDT skin cancer treatment. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 8, p. 340-347, 2008.
- PRODUCT INFORMATION. Sigma Aldrich – Brij58[®]. 2006.
- RAMAN, I. A.; SUHAIMI, H.; TIDDY, G. J. T. Liquid crystals and microemulsions formed by mixtures of a non-ionic surfactant with palm oil and its derivatives. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 106, p. 109-127, 2003.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REYNOLDS, P. A.; HENDERSON, M. J.; WHITE, J. W. A small angle neutron scattering study of the interface between solids and oil-continuous emulsions and oil-based microemulsions. **Colloid. Surface A**, v. 232, n. 1, p. 55-65, 2004.

ROSA, F. S.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; PIERRE, M. B. R.; LANGE, N.; ROTTA, J. C. G.; MARCHETTI, J. M.; BENTLEY, M. V. L. B. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **J. Control. Release**, v. 89, n. 2, p. 261-269, 2003.

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

SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H.B. Rheological properties of binary and ternary protein-polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 48, p. 263-270, 2011.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogues; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed). **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11 ed. New York: McGraw-Hill, 2006. p. 1587-1612.

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

SENYIGIT, T.; TEKMEK, I.; SONMEZ, U.; SANTI, P.; OZER, O. Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for topical use: In vitro and in vivo evaluation. **Int. J. Pharm.**, v.403, p.123-129, 2011.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **J. Control. Release**, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004.

SPICLIN, P.; HOMAR, M.; ZUPANCIC-VALANT, A.; GASPERLIN, M. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. **Int. J. Pharm.**, v. 256, n. 1-2, p. 65-73, 2003.

TAN, Y.T.F.; PEH, K.K.; AL-HANBALI, O. Effect of Carbopol and Polyvinylpyrrolidone on the Mechanical, Rheological, and Release Properties of Bioadhesive Polyethylene Glycol Gels. **AAPS.PHARMSC.**, v.1(3), p.69-78, 2000.

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2004.

USP 29. The United States Pharmacopeia. Rockville, USP Convention, 2006.

VENUGOPAL, J.; PRABHAKARAN, M. P.; LOW, S.; CHOON, A. T.; DEEPIKA, G.; DEV, V. R.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Curr. Pharm. Des.**, v. 15, n. 15, p. 1799-1808, 2009.

VIVIER, A. **Atlas de Dermatologia Clínica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1995.

YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloid. Surface B**, v. 78, p. 185–192, 2010.

ZHANG, J.; DONG, B.; ZHENG, L.; LI, N.; LI, X. Lyotropic liquid crystalline phases formed in ternary mixtures of 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide/*p*-xylene/water: A SAXS, POM, and rheology study. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 321, p. 159–165, 2008.

ZHU, W.; GUO, C.; YU, A.; GAO, Y.; CAO, F.; ZHAI, G. Microemulsion-based hydrogel formulation of penciclovir for topical delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 378, n. 1-2, p. 152-158, 2009.