

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICOS PARA O ANTIINFLAMATÓRIO LUMIRACOXIBE:
OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS DE
PERMEAÇÃO *IN VITRO* EM PELE DE MODELO ANIMAL**

Tailane Sant' Anna Moreira

**Rio de Janeiro
2008**

TAILANE SANT' ANNA MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICOS PARA O ANTIINFLAMATÓRIO LUMIRACOXIBE:
OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS DE
PERMEAÇÃO *IN VITRO* EM PELE DE MODELO ANIMAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Riemma Pierre

Rio de Janeiro
2008

TAILANE SANT' ANNA MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICOS PARA O
ANTIINFLAMATÓRIO LUMIRACOXIBE: OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA
E ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* EM PELE DE MODELO ANIMAL**

Aprovada em 24 de abril de 2008.

Prof^a. Dr^a. Valeria Pereira de Sousa – Orientadora
Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do
Rio de Janeiro, RJ

Prof^a Dr^a Maria Bernadete Riemma Pierre – Co-orientadora
Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do
Rio de Janeiro, RJ

Prof^a Dr^a Nádia Maria Volpato
Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, RS

Prof^a Dr^a Renata Fonseca Vianna Lopez
Departamento de Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto - USP-RP, SP

Prof^a Dr^a Gisela Mraia Dellamora Ortiz
Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do
Rio de Janeiro, RJ

Á minha mãe, Miriam, pela maior e melhor companhia, pela eterna compreensão e carinho, pela disponibilidade plena e absoluta e pelos incontáveis esforços para que esta dissertação fosse realizada. Ao meu pai, Evandro, pelo incentivo eterno, exemplo de perseverança, garra e trabalho.

“A natureza concedeu aos grandes homens a faculdade de fazer e, aos outros, a de julgar”

Luc de Clapiers Vauvenargues

“Nós somos o que fazemos repetidamente, a excelência não é um feito, e sim, um hábito”

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Valéria Pereira de Sousa, por todos os anos de ótimo convívio, pelo companheirismo, pelos ensinamentos científicos e de vida, pela grande dedicação e por todas as oportunidades.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Maria Bernadete Riemma Pierre, pelas orientações e ensinamentos de grande valia.

Aos professores Carlos Alberto Manssour Fraga e Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima, pelas orientações e acompanhamento durante toda a dissertação.

Ao Prof. Fábio Almeida do Laboratório Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (LNRMN), pela utilização do aparelho de RMN. Ao André Figueira do Laboratório de Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), pela execução das análises de RMN.

Ao Prof. Cleber e à Técnica Rosana, do Laboratório do Departamento de Engenharia Química (LADEQ) da Escola de Química da UFRJ, pela realização das análises reológicas.

À Prof^a. Cláudia Regina Elias Manssour e às alunas Luciana Spinelli e Natalie Ramos, do Laboratório de macromoléculas e colóides aplicados à indústria de petróleo (LMCP) pertencente ao Instituto de Macromoléculas (IMA), pela realização das análises de temperatura de gelificação.

Ao Reitor Ricardo Motta Miranda e ao Prof. Nelson Matos, diretor do Departamento de Produção Animal, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela doação das orelhas suínas.

Ao Prof. Alexandre dos Santos Pyrrho e ao Sr. Souza, do Departamento de Análises Clínicas e Tóxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ, pelo auxílio nos ensaios de toxicidade dérmica.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

Aos meus pais, meu irmão, Xanda, Hanna, Teka e Luna pelo amor e carinho de todas as horas.

Ao meu namorado Raphael, pelo companheirismo, momentos de distração, alegria e divertimento, por me confortar nos momentos de angústia, pela paciência nos momentos de irritação e por me ajudar em todas as traduções e ferramentas de Excel.

À família Valente, pelo incentivo, generosidade e carinho nos finais de semana.

À Carol, por ser minha melhor amiga sempre, por me apoiar em tudo e por deixar todas as minhas figuras lindas.

Aos meus amigos, Mariana, Paula, Paola, Maura, Dudu, Guilherme e Rafa, pela força, por todos os momentos felizes e lembranças maravilhosas durante todos esses anos de convivência. Em especial à Bianca, pelo apoio, companheirismo e dedicação durante a graduação, habilitação e o mestrado.

À Laís, por todas as oportunidades, por ser minha mentora, “mãe”, amiga, uma inspiração e meu grande exemplo. Minha eterna gratidão.

À Yara, minha parceira no LabCQ, pela grande amizade, por dividir todas as dificuldades e comemorar todas as alegrias e vitórias comigo durante esses dois anos.

Aos amigos Daniel (NPPN) e Arthur (LASSBio), pela disponibilidade e paciência em todos os momentos que eu precisei.

À Eliane e à Maria do Socorro, pela companhia diária, pelo cafezinho das manhãs e por estarem sempre disponíveis para me auxiliar em todos os momentos.

À todos os amigos do LabCQ, Prof^a Sheila, Adriana, Yasmim, Vivi, Raquel, Viviane, Fernanda, Maria Thereza, Joyce e Monique pelo carinho de sempre.

RESUMO

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) seletivos para a COX-2 são agentes promissores para o tratamento da dor inflamatória, dor aguda, artrite, artrose e do câncer de pele tipo não-melanoma, porém com a vantagem de não causar o efeito adverso gastrointestinal. O lumiracoxibe (LM) é um novo AINE COX-2 seletivo, o qual num sistema de liberação tópico poderia constitui uma alternativa mais segura no tratamento da inflamação cutânea, sem o risco de produzir efeitos colaterais sistêmicos.

O estrato córneo (EC) age como uma barreira à penetração de fármacos na/atraves da pele. Sendo assim, pode-se considerar a utilização de promotores de penetração uma interessante proposta para otimizar a penetração cutânea de fármacos. O ácido oléico (AO) é um promotor de penetração cutânea capaz de promover a perturbação da função de barreira da pele, seja desordenando os domínios lipídicos intercelulares ou induzindo à separação das fases lipídicas do EC, resultando no aumento da permeabilidade para muitos fármacos

No presente trabalho, os sistemas de liberação estudados foram adicionados ao gel de poloxamer (PF-127) na concentração de 20, 25 e 30% (p/p) em diferentes concentrações de AO contendo LM a 1% (p/p).

Os ensaios de coeficiente de partição óleo/tampão, estrato córneo/tampão e pele/tampão, comprovaram a alta lipofilicidade do LM e baixa afinidade do fármaco pela pele e pelo estrato córneo, confirmando a função de barreira da pele exercida principalmente pelo estrato córneo. Na caracterização reológica do gel PF-127 observou-se que o gel de poloxamer possui um comportamento pseudoplástico, o que facilita seu fluxo e melhora a espalhabilidade da formulação. Além disso, sua viscosidade aumenta de acordo com o aumento da concentração do polímero no gel e do AO na formulação. A temperatura de transição sol-gel também é afetada pelo aumento da concentração do polímero e do AO. Em alguns casos, a formulação já é gel à temperatura ambiente. Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados a fim de verificar a cedência do LM a partir dos sistemas de liberação propostos. Apesar de o aumento da quantidade de AO na formulação ter promovido o aumento da viscosidade e, ao mesmo, reduzido a taxa de liberação de LM devido ao prolongamento da difusão

do fármaco através da matriz do gel, pôde-se observar que as formulações contendo 10% (p/p) de AO proporcionaram uma maior permeação através da pele. Além disso, a menor retenção de LM no EC em relação à retenção na [epiderme + derme], e o aumento da quantidade de LM retida na [epiderme + derme] de acordo com o aumento da concentração de AO na formulação pode ser explicado pelo efeito promotor de penetração cutânea do AO. Sendo um perturbador da barreira, o AO pode interagir facilmente com os lipídios intercelulares do EC, facilitando a transposição desta barreira pelo LM. Os estudos de toxicidade dérmica realizados em modelo animal (coelhos) revelaram que o sistema de liberação escolhido, gel de poloxamer 25% (p/p) contendo AO a 10% (p/p) e LM 1% (p/p), não proporciona toxicidade dérmica primária ou cumulativa.

ABSTRACT

The COX-2 selective non-steroidal antiinflammatories (NAIDs) are promising drugs in the treatment of inflammatory or acute pain, arthritis, arthrosis and non-melanoma cancer. Lumiracoxib (LM) is a new COX-2 NAID, which as a topical delivery system could provide a safer alternative in the treatment of cutaneous inflammation providing a decrease in inflammatory reaction without causing gastrointestinal adverse effect.

Being the stratum corneum (SC) a barrier in the drug penetration through skin, we could consider the use of penetration enhancers as an interesting proposal to optimize the drugs cutaneous penetration. The oleic acid (OA) is a cutaneous penetration enhancer that promotes skin barrier function perturbation interfering in the intercellular lipids or promoting the separation of phases in the lipidic domains.

In this present work, the studied formulations were made in a poloxamer gel (PF-127) at 20, 25 and 30% (w/w) containing OA in a range of concentration (from 1 to 10% w/w) and LM 1% (w/w).

The oil/buffer, SC/buffer and skin/buffer partition coefficient experiments proved the high lipophilicity and low SC and skin affinity of LM, confirming the SC barrier function. In the rheological characterization of PF-127 we observed that the gel had a pseudoplastic behavior, which facilitated the formulation flow and improved its spreading characteristics. Besides, the higher polymer concentration in the gel and the OA concentration in the formulation, the higher the viscosity became. The sol-gel transition temperature was also affected by the increase of polymer and OA concentration. In some cases the formulation was already a gel at room temperature. The *in vitro* delivery studies were developed in order to verify the transfer of LM from the delivery systems. Although the increase of OA amount provided an increase in viscosity and, at the same time, a decrease in the LM release rate due to the extension of drug diffusion through the gel matrix, we could observe that the formulation containing 10% (w/w) of OA provides a higher skin permeation. Besides, the lower LM retention in the SC compared to [epidermis + dermis]'s and the increase of the quantity of LM retained in the [epidermis + dermis] according to the increase of OA in the formulation could be

explained by the OA enhancer effect of cutaneous penetrations. As a barrier disturbing agent, the OA can easily interact with SC intercellular lipids, facilitating this barrier transposition by LM. The cutaneous toxicity evaluation developed in an animal model (rabbits) showed that the chosen delivery system, poloxamer 25% (w/w) with OA 10% and LM 1% (w/w) didn't provide any immediate or cumulative cutaneous toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila;

AINEs – Antiinflamatórios não esteroidais;

AO – Ácido oléico;

Bcl-xl – Proteína apoptótica;

C₈ – Octadecilsilano;

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência;

COX – Ciclooxigenase;

DMSOd – Dimetil sulfóxido deuterado;

DP – Desvio padrão;

DPR – Desvio padrão relativo;

EC – Estrato córneo;

EE – Estado estacionário;

FDA – Food and drug administration;

FDI – Fotodiodos;

FM – Fase móvel;

IL-10 – Interleucina 10;

K_{EC/T} – Coeficiente de partição estrato córneo/tampão;

K_{O/T} – coeficiente de partição óleo/ tampão;

K_{P/T} – Coeficiente de partição pele/tampão;

LD – Limite de detecção;

LM – Lumiracoxibe;

LQ – Limite de quantificação;

MDR1 – Proteína transportadora;

PF-127 – Pluronic F-127;

PG – Propilenoglicol;

POE – Poli óxido de etileno;

POP – Poli óxido de proprileno;

PS – Polissorbato;

r – Coeficiente de correlação;

R² – Coeficiente de determinação;

RMN – Ressonância magnética nuclear;

RPM – Rotações por minutos

SE – Solução estoque;

SR – Solução receptora;

UV – ultravioleta;

UVB – Ultravioleta B;

Λ – Comprimento de onda.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 – Síntese dos prostanóides e tromboxanos. p. 29
- Figura 1.2 – Representação das estrutura dos fármacos diclofenaco (a) e lumiracoxibe (b). p. 36
- Figura 1.3 – Representação das três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. p. 39
- Figura 1.4 - . As rotas de penetração transcelular e intercelular. p. 46
- Figura 1.5 – Representação esquemática de um gráfico de quantidade de fármaco liberada através do tecido em relação ao tempo. p. 47
- Figura 1.6 - Célula de difusão de Franz. p. 55
- Figura 3.1 – (a) Compartimento doador com membrana de acetato de celulose e (b) aplicação da amostra no compartimento doador. p. 81
- Figura 3.2 – Célula de difusão modificada p. 81
- Figura 3.3 – Retirada da amostra p.82
- Figura 3.4 - Limpeza de orelha suína. (a) Orelha suína. (b) Retirada da pele. (c) Retirada do tecido sub-cutâneo. (d) Segmento de pele limpo p. 84
- Figura 4.1 – Espectro de infravermelho de LM extraído em sohxlet após purificação com solvente orgânico em KBr. p. 92
- Figura 4.2 - Espectro de ^1H de RMN de lumiracoxibe extraído em sohxlet após a purificação com solvente orgânico. p. 93
- Figura 4.3 - Espectro de ^{13}C de RMN de lumiracoxibe extraído em sohxlet após a purificação com solvente orgânico. p. 94
- Figura 4.4 - Cromatograma obtido para LM empregando as seguintes condições: fase móvel tampão fosfato 0,1 M pH 7,4: H₂O: ACN (100:400:500), fluxo 1,0 mL/min, coluna ligada a ácido propilsulfônico (25 cm) e concentração da amostra a 30 µg/mL. p. 97

Figura 4.5 -. Cromatograma tridimensional obtido através do detector UV-FDI para uma amostra de LM na concentração de 30 µg/mL.	p. 98
Figura 4.6 - Pureza cromatográfica obtida por similaridade.	p. 99
Figura 4.7 - Pureza cromatográfica obtida pela razão cromatográfica.	p. 99
Figura 4.8 - Curvas padrão médias do primeiro(a) e segundo (b) dia de testes.	p. 100
Figura 4.9 – Coeficiente de partição médios $K_{O/T}$, $K_{P/T}$ e $K_{EC/T}$ (n = 6 para cada grupo). Valores expressos em erro padrão médios considerados não significativos ($P > 0,05$) entre $K_{P/T}$ e $K_{EC/T}$, e considerados significativos ($P < 0,001$) entre $K_{O/T}$ e $K_{P/T}$, e $K_{O/T}$ e $K_{EC/T}$. Teste estatístico One Way ANOVA (Teste de múltiplas comparações de Tukey). Valores considerados significativos para $P < 0,05$.	p. 103
Figura 4.10 - Gráfico de viscosidade (Pas) x taxa de cisalhamento (S^{-1}) a 25 °C. (a) Gel de poloxamer a 20, 25 e 30% (p/p), (b) Gel de poloxamer a 20, 25 e 30% (p/p) contendo LM a 1% (p/p), (c) Gel de poloxamer a 20% (p/p) contendo LM a 1% (p/p) e AO a 1; 2,5; 5 e 10% (p/p), (d) Gel de poloxamer a 25% (p/p) contendo LM a 1% (p/p) e AO a 1, 2,5, 5 e 10% (p/p) e (e) . Gel de poloxamer a 30% (p/p) contendo LM a 1% (p/p) e AO a 1, 2,5, 5 e 10% (p/p).	p. 107
Figura 4.11 – Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da tensão (T) para os géis PF 20%, PF 25% e PF 30%.	p. 109
Figura 4.12 – Representação gráfica da transição sol gel. Módulo elástico (G') em função da temperatura para formulações contendo 1% (p/p) de LM (p/p) e AO 1; 2,5; 5 e 10% (p/p): (a) Gel de poloxamer a 20% (p/p), (b) gel de poloxamer a 25% (p/p) e (c) gel de poloxamer a 30% (p/p)	p. 111
Figura 4.13 – Solubilidade de LM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 na presença de polissorbato 20 (0,5;1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% p/v) e polissorbato 80 (0,1; 0,5; 1,0;1,5; 2,0 e 3,0% p/v).	p. 113
Figura 4.14 - Cromatograma obtido LM empregando as seguintes condições: fase móvel ACN:tampão fosfato 0,01 M pH 2,5 (500:500), fluxo 1,0 mL/min, coluna octadecilsilano (15 cm) e concentração da amostra a 40 µg/mL.	p. 115

- Figura 4.15 -. Cromatograma tridimensional obtido através do detector UV-FDI para uma amostra de lumiracoxibe na concentração de 40 µg/mL. p. 116
- Figura 4.16 - Cromatograma obtido para solução receptora (branco) empregando as seguintes condições: fase móvel ACN:tampão fosfato 0,01 M pH 2,5 (500:500), fluxo 1,0 mL/min, coluna C₈ (15 cm). p. 117
- Figura 4.17 - Pureza cromatográfica obtida por similaridade. p. 117
- Figura 4.18 - Pureza cromatográfica obtida pela razão cromatográfica. p. 118
- Figura 4.19 - Curvas padrão médias do primeiro (a) e segundo (b) dia de testes. p. 118
- Figura 4.20. – Quantidade de LM liberada (µg/cm²) em função do tempo através de membrana de acetato de celulose a partir de propilenoglicol e das formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p). Formulações contendo 1 %(p/p) de LM. Valores médios e seus desvios padrão, (n = 12) para cada grupo (significativo para P < 0,05). Análise estatística: Two Way ANOVA. p. 123
- Figura 4.21. – Quantidade de LM liberada (µg/cm²) em função do tempo através de membrana de acetato de celulose na ausência e presença de AO (1; 2,5; 5; 10% p/p) a partir das formulações contendo como base gel de PF-127 a 20 (a), 25 (b) e 30% (c) (p/p). Formulações contendo 1% (p/p) de LM. Valores médios e seus desvios padrão, (n = 3) para cada grupo (significativo para P < 0,05). Análise estatística: Two Way ANOVA. p. 125
- Figura 4.22. – Quantidade de LM permeada (µg/cm²) em função do tempo através de pele de orelha suína na ausência e presença de AO (1; 2,5; 5; 10% p/p) a partir da formulação contendo como base gel de PF-127 a 25 % (p/p). Formulações contendo 1% (p/p) de LM. Valores médios e seus desvios padrão, (n = 3) para cada grupo (significativo para P < 0,05). Análise estatística: Two Way ANOVA. p. 127
- Figura 4.23. – Quantidade de LM permeada (µg/cm²) em função do tempo através de pele de orelha suína na ausência e presença de AO 10% a partir das formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p). Formulações contendo 1%(p/p) de LM. Valores médios e seus desvios padrão, (n = 3) para cada grupo (significativo para P < 0,05). Análise estatística: Two Way ANOVA. p. 128

Figura 4.24 - Fluxo (J) *in vitro* após 24 horas do LM (1% p/p) através da pele de orelha suína na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1; 2,5; 5 e 10%) na formulação contendo como base gel de PF-127 a 25% (p/p) e na presença de AO 10% (p/p) nas formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p). Valores médios e seus desvios padrão, ($n = 3$) para cada grupo (significativo para $P < 0,05$). Análise estatística: One Way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

p. 133

Figura 4.25 - Quantidade ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) média de LM retida no EC após 24 horas de estudos de permeação *in vitro* em pele de orelha suína para 3 replicatas e seus desvios padrão ($n = 3$). Valores considerados significativamente diferentes para $P < 0,05$. Teste estatístico: One Way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

p. 134

Figura 4.26 - Quantidade ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) média de LM retida na [epiderme + derme] após 24 horas de estudos de permeação *in vitro* em pele de orelha suína para 3 replicatas e seus desvios padrão ($n = 3$). Valores considerados significativamente diferentes para $P < 0,05$. Teste estatístico: One Way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

p. 135

Figura 4.27 – Ensaio de toxicidade dérmica primária (a) e cumulativa (b) em pele de coelho.

p. 139

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Formulações testadas e suas respectivas concentrações de AO e LM (% p/p)	p. 72
Tabela 4.1 - Faixa de fusão de LM extraído em sohxlet após purificação com solvente orgânico (n = 3).	p. 91
Tabela 4.2 - Análise quantitativa (doseamento) de LM extraído em sohxlet após a purificação com solvente orgânico por titulação de neutralização ácido-base.	p. 95
Tabela 4.3 - Fases móveis testadas para quantificação de LM no coeficiente de partição por CLAE.	p. 96
Tabela 4.4 – Análise estatística de regressão linear das curvas padrão.	p. 100
Tabela 4.5 - Resultados do teste de precisão inter e intra-dia.	p. 101
Tabela 4.6 - Resultados do teste de precisão de injeção.	p. 102
Tabela 4.7 – Resultados da determinação do coeficiente de partição $K_{o/T}$, $K_{P/T}$ e $K_{EC/T}$.	p. 104
Tabela 4.8 – Variação dos valores de viscosidade (Pas) de acordo com o aumento da taxa de cisalhamento (S^{-1}).	p. 108
Tabela 4.9 – Temperatura de transição sol-gel ($^{\circ}C$) obtida para todas as formulações desenvolvidas.	p. 112
Tabela 4.10 – Concentração de saturação de lumiracoxibe em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 na presença de diferentes concentrações de polissorbato 20 e 80	p. 114
Tabela 4.11 – Respostas obtidas para as cinco concentrações de LM, preparadas em duplicata, em cada dia de análise, DP, DPR e parâmetros da curva.	p. 119
Tabela 4.12 – Análise da regressão linear das curvas padrão.	p. 120

Tabela 4.13 - Porcentagem média de recuperação de LM no estrato córneo para três níveis do fármaco e seus desvios padrão (n=3).	p. 121
Tabela 4.14 - Porcentagem média de recuperação de LM na [epiderme + derme] suína para três níveis do fármaco e seus desvios padrão (n=3).	p. 121
Tabela 4.15 - Quantidade de LM acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) na SR de células de Franz modificadas equipadas com membrana de acetato de celulose calculada pela área de difusão e desvios padrão de 3 células para 3 concentrações diferentes de gel PF-127.	p. 122
Tabela 4.16 - Resumo dos dados estatísticos após 24 horas dos estudos <i>in vitro</i> de liberação de LM (1% p/p) em PG, na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1; 2,5; 5 e 10% p/p) nas formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p). ^a Considerando significativo para $P < 0,05$	p. 126
Tabela 4.17 – Quantidade de LM acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) na SR de células de Franz modificadas equipadas com membrana natural calculada pela área de difusão e desvios padrão de 3 células para 3 concentrações diferentes de gel PF-127.	p. 129
Tabela 4.18 – Resumo dos dados estatísticos após 24 horas dos estudos <i>in vitro</i> de permeação de LM (1% p/p) em PG, na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1; 2,5; 5 e 10% p/p) nas formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p). ^a Considerado valor significativo para $P < 0,05$	p.130
Tabela 4.19 - Valores de fluxo J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$), coeficiente de correlação (r) e <i>lag time</i> (min)	p.131
Tabela 4.20 – Valores médios de massa ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) médio de LM retido no EC e na [epiderme + derme] após 24 horas de estudos de permeação <i>in vitro</i> em pele de orelha suína para 3 replicatas e seus desvios padrão (n = 3).	p.133

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	p. 28
1.1. AGENTES ANTIINFLAMATÓRIOS	p. 29
1.1.1. AINEs não seletivos	p. 31
1.1.2. AINEs COX-2 Seletivos	p. 32
1.1.3. Lumiracoxibe	p. 33
1.2. A PELE HUMANA	p. 38
1.3. PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS NA/ATRAVÉS DA PELE	p. 42
1.4. ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA	p. 48
1.4.1. Métodos químicos	p. 49
1.4.2. Sistemas de liberação transdérmicos	p. 50
1.5. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	p. 55
1.6. ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	p. 56
2. OBJETIVOS	p. 58
2.1. OBJETIVOS GERAIS	p. 59
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	p. 59
3. MATERIAL E MÉTODOS	p. 60

3.1. MATERIAL	p. 61
3.1.1. Equipamentos e acessórios	p. 61
3.1.2. Reagentes	p. 62
3.1.3. Produtos Farmacêuticos	p. 64
3.2. MÉTODOS	p. 64
3.2.1. Obtenção do Lumiracoxibe	p. 64
3.2.2. Caracterização do fármaco	p. 65
3.2.2.1. Faixa de fusão	p. 65
3.2.2.2. Espectroscopia no infravermelho	p. 65
3.2.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	p. 65
3.2.3. Metodologia analítica para quantificação do fármaco por titulação de neutralização ácido-base	p. 66
3.2.4. Desenvolvimento e validação de método para quantificação de LM nos experimentos de coeficiente de partição por cromatografia líquida de alta eficiência	p. 66
3.2.4.1. Estabelecimento das condições cromatográficas	p. 66
3.2.4.1.1 <i>Fase móvel e vazão</i>	p. 67
3.2.4.1.2 <i>Volume de injeção e Detecção</i>	p. 67
3.2.4.2. Validação do Método	p. 67

3.2.4.2.1. <i>Especificidade</i>	p. 68
3.2.4.2.2. <i>Linearidade e precisão intra e inter-dia</i>	p. 68
3.2.4.2.3. <i>Precisão do volume de injeção</i>	p. 69
3.2.4.2.4. <i>Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)</i>	p. 69
3.2.4.2.5. <i>Preparo das amostras</i>	p. 69
3.2.5. Estudos de pré-formulação: caracterização dos parâmetros físico-químicos do LM	p. 70
3.2.5.1. Determinação do coeficiente de partição óleo/ tampão	p. 70
3.2.5.2. Determinação do coeficiente de partição pele/tampão	p. 70
3.2.5.3. Determinação do coeficiente de partição estrato córneo/ tampão	p. 71
3.2.6. Caracterização física do gel	p. 71
3.2.6.1. Preparo	p. 71
3.2.6.2. Estudos das propriedades reológicas	p. 73
3.2.6.3. Determinação da tensão de trabalho	p. 73
3.2.5.4 Determinação da temperatura de gelificação	p. 74
3.2.7. Escolha da solução receptora para os estudos <i>in vitro</i>	p. 75
3.2.7.1. Determinação da solubilidade do LM em diferentes soluções receptoras	p. 76

3.2.7.2. Determinação da concentração do LM	p. 76
3.2.8. Desenvolvimento e validação de método para quantificação de LM na solução receptora (SR)	p. 77
3.2.8.1. Estabelecimento das condições cromatográficas	p. 77
3.2.8.1.1. <i>Fase móvel e vazão</i>	p. 77
3.2.8.1.2. <i>Volume de injeção e Detecção</i>	p. 78
3.2.8.2. Validação do Método	p. 78
3.2.8.2.1. <i>Especificidade</i>	P 78
3.2.8.2.2. <i>Linearidade e precisão inter-dia</i>	p. 79
3.2.8.2.3. <i>Precisão do volume de injeção</i>	p. 79
3.2.8.2.4. <i>Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)</i>	p. 79
3.2.8.2.5. <i>Preparo das amostras</i>	p. 80
3.2.9. Estudos de liberação <i>in vitro</i> através de membrana sintética	p. 80
3.2.9.1. Preparo da membrana sintética de acetato de celulose	p. 80
3.2.9.2. Montagem da célula de difusão modificada	p. 80
3.2.9.3. Coleta da amostra	p. 82
3.2.10. Estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutânea através de pele animal	p. 83

3.2.10.1 Obtenção e limpeza de pele suína	p. 83
3.2.10.2. Estudos de permeação cutânea	p. 84
3.2.10.3. Coleta da amostra	p. 85
3.2.10.4. Estudos <i>in vitro</i> de retenção do fármaco no estrato córneo suíno (<i>tape stripping</i>)	p. 86
3.2.10.5. Estudos <i>in vitro</i> de penetração e retenção do fármaco na [epiderme + derme] suína.	p. 86
3.2.11. Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação de LM no EC e [epiderme + derme] suína.	p. 87
3.2.11.1. Estrato córneo	p. 87
3.2.11.2 Epiderme + derme	p. 87
3.2.12. Estudos de toxicidade dérmica	p. 88
3.2.12.1. Toxicidade dérmica primária	p. 88
3.2.12.2. Toxicidade dérmica cumulativa	p. 89
4. RESULTADOS	p. 91
4.1. OBTENÇÃO DO LUMIRACOXIBE	p. 91
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	p. 91
4.2.1. Faixa de fusão	p. 91
4.2.2. Espectroscopia do infravermelho	p. 92

4.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	p. 93
4.2.4. Metodologia analítica para quantificação do fármaco por titulação de neutralização ácido-base	p. 95
4.3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LM NOS EXPERIMENTOS DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO	p. 96
4.3.1. Fase móvel e vazão	p. 96
4.3.2. Detecção	p. 97
4.3.3. Especificidade	p. 98
4.3.4. Linearidade e precisão intra e inter-dia.	p. 100
4.3.5. Precisão do volume de injeção	p. 101
4.3.6. LD e LQ	p. 102
4.4. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LM	p. 103
4.4.1. Determinação do coeficiente de partição óleo/ tampão (K_{OT}), pele/tampão (K_{PT}) e estrato córneo/ tampão (K_{ECT}).	p. 103
4.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO GEL	p. 104
4.5.1. Estudo das propriedades reológicas	p. 104
4.5.2. Determinação da tensão de trabalho	p. 108
4.5.3. Determinação da temperatura de gelificação	p. 109

4.6. ESCOLHA DA SOLUÇÃO RECEPTORA PARA OS ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	p. 112
4.7. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LM NA SOLUÇÃO RECEPTORA.	p. 115
4.7.1. Fase móvel e vazão	p. 115
4.7.2. Detecção	p. 115
4.7.3. Especificidade	p. 116
4.7.4. Linearidade e precisão intra e inter-dia.	p. 118
4.7.5. LD e LQ	p. 120
4.7.6. Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação de LM no EC e [epiderme + derme] suína	p. 120
4.8. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DE MEMBRANA SINTÉTICA	p.121
4.9. ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO ATRAVÉS DE PELE ANIMAL	p. 127
4.9.1. Estudos de permeação cutânea	p. 127
4.9.2. Estudos de retenção cutânea	p. 132
4.10. ESTUDOS DE TOXICIDADE DÉRMICA	p. 135
5. DISCUSSÃO	p. 137
6. CONCLUSÕES	p. 164

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

p. 168

1. INTRODUÇÃO

1.1. AGENTES ANTIINFLAMATÓRIOS

A classe dos agentes antiinflamatórios é representada pelos glicocorticóides e pelos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), sendo estes últimos mais amplamente utilizados como agentes terapêuticos (RANG *et al.*, 1999). Os AINEs são fármacos cujo mecanismo de ação envolve a inibição da araquidonato ciclooxigenase (COX), enzima que catalisa a primeira reação da síntese de prostanóides e tromboxanos (Figura 1.1).

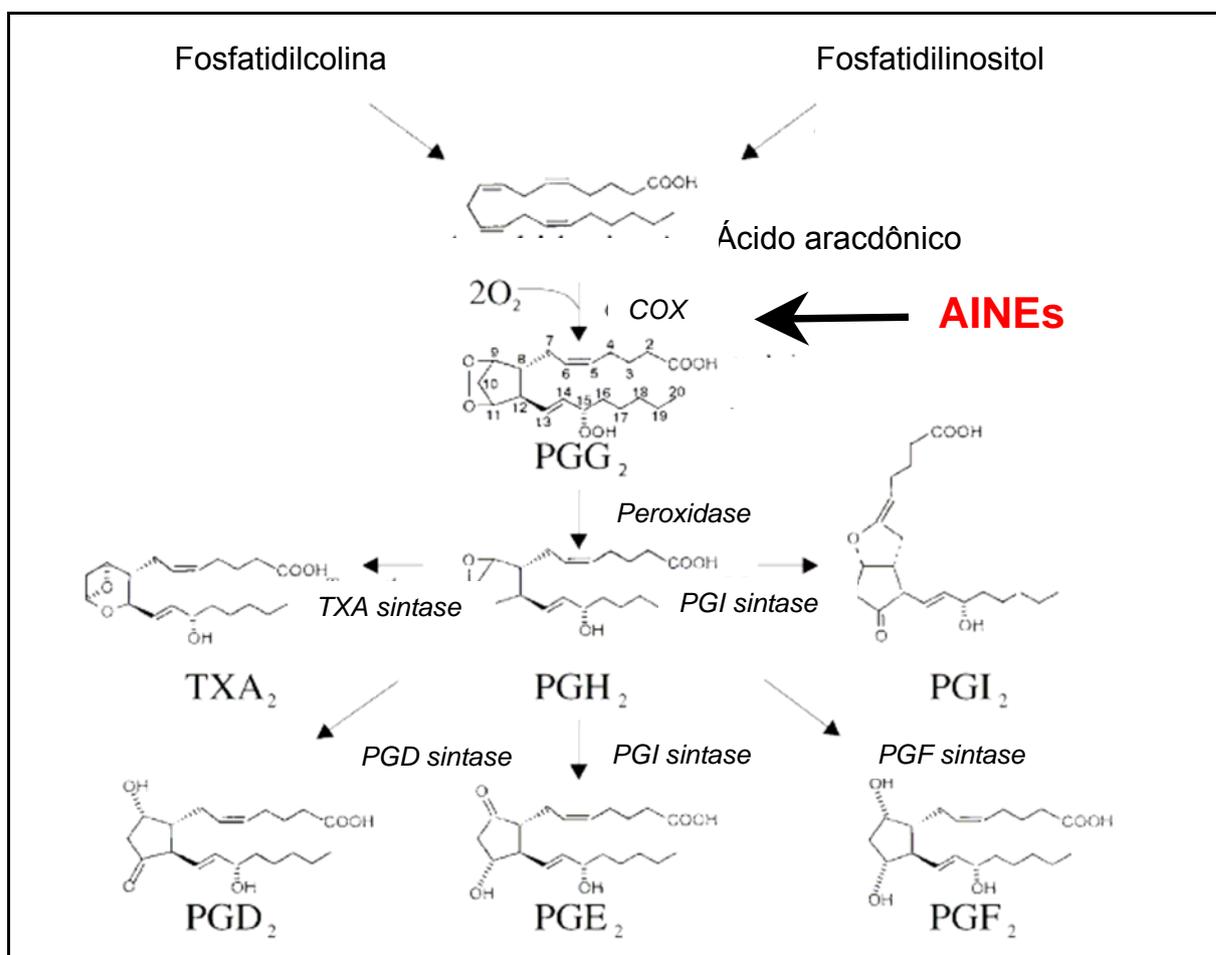


Figura 1.1 – Síntese de prostanóides e tromboxanos (BOS *et al.*, 2004).

Os prostanóides são mediadores lipídicos que modulam uma enorme variedade de processos fisiológicos e patológicos através de receptores de membrana localizados na superfície das células alvo (FITZPATRICK & SOBERMAN, 2001; BOS *et al.*, 2004). Sob condições fisiológicas, os prostanóides apresentam um importante papel na citoproteção da mucosa gástrica, hemostase, e hemodinâmica renal. Além disso, sua biossíntese é induzida em condições patológicas diversas, incluindo a inflamação e o câncer. Os prostanóides são formados a partir ácido araquidônico, pela sua mobilização da posição 2 de fosfolipídios de membrana fosfolipídica, por diferentes estímulos (PATRONO *et al.*, 2001; BOS *et al.*, 2004).

Através da inibição da COX os AINEs produzem efeitos antiinflamatórios (modificação da reação inflamatória), analgésicos (redução de certos tipos de dor) e antipiréticos (redução da elevação da temperatura) (VANE & BOTTING, 1998; RANG *et al.*, 1999). Além disso, compartilham numa maior ou menor extensão, de alguns efeitos adversos: dependendo da dose, podem causar ulcerações, sangramentos, perfurações e obstruções gastrintestinais; em altas doses podem causar contração uterina e induzir o parto; e em *overdose* podem causar insuficiência renal. Outro efeito adverso dos AINEs que, no entanto, passou a ter ação terapêutica é o efeito antitrombótico (CRYER & FELDMAN, 1998).

A incidência de sérios efeitos colaterais faz com que a duração do tratamento com AINEs deva ser curta, pois alguns desses efeitos, como a irritação gastrintestinal, podem levar a não adesão do paciente ao tratamento.

1.1.1. AINEs não seletivos

A descoberta de que existem duas isoformas da enzima COX, a COX-1 e a COX-2, que são expressas em diferentes tecidos, levantou a possibilidade de que o efeito terapêutico dos AINEs poderia ser separado do efeito adverso gastroirritante (MORITA *et al.*, 1995; CRYER & FELDMAN, 1998).

A isoforma COX-1, constitutiva (O'NEIL *et al.*, 2001), é expressa em vários tecidos do organismo, incluindo a mucosa gastrintestinal, e possui evidentes funções fisiológicas como agregação plaquetária e função renal (MERLIE *et al.*, 1988; VANCE & BOTTING, 1998). Por outro lado, a COX-2 é expressa em níveis menores na maioria das células, incluindo o estômago e o intestino. Diferente da COX-1, entretanto, a COX-2 pode ser expressa principalmente na inflamação, ou seja, induzida por citocinas e por produtos bacterianos.

Diferentes sais de diclofenaco, AINE não seletivo por exemplo, derivados do ácido fenil acético, são eficazes no tratamento da dor inflamatória (O'NEIL *et al.*, 2001) e disponíveis no mercado em diferentes formas farmacêuticas: comprimidos, drágeas, suspensão oral, supositórios, gotas e gel (RANG *et al.*, 1999). Este fármaco é não seletivo para COX-2, porém ainda apresenta importante atividade COX-1 inibitória, sendo assim, um potente inibidor da síntese de prostaglandinas na mucosa gástrica (CRYER & FELDMAN, 1998). Por isso, quando administrado por via oral, pode causar intolerância e sérios efeitos colaterais provenientes de sua ação sistêmica, incluindo efeitos renais, hepáticos e hematológicos (GALER *et al.*, 2000).

1.1.2. AINEs COX-2 Seletivos

A descoberta da COX-2 estimulou uma série de laboratórios a desenvolverem inibidores seletivos desta enzima devido à vantagem de apresentar o perfil antiinflamatório dissociado dos efeitos adversos gastrintestinais e renais (MERLIE *et al.*, 1988; MAIER *et al.*, 1990; CRYER & FELDMAN, 1998).

Os primeiros inibidores seletivos da COX-2, aprovados pelo órgão Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de artrite reumatóide, osteoartrite, alívio de dor aguda associada com cirurgia dental e dismenorréia primária, são derivados diarileterociclos, contendo um radical metilsulfona ou metilsulfonamida, o qual interage com sítio lateral da COX-2 através de uma cinética lenta (FITZGERALD & PATRONO, 2001).

Algumas linhas de pesquisa sugerem, além de ações antiinflamatórias com inibição dos efeitos adversos gastrintestinais, que a COX-2 possui um papel crítico na tumorigênese do câncer. Em vários tipos de cânceres a COX-2 é encontrada em múltiplas células: epiteliais, endoteliais, células do estroma e células inflamatórias (PRESCOTT, 2000).

A angiogênese, ou seja, desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, é uma etapa essencial no crescimento dos tumores, já que o crescimento das células malignas é limitado pela disponibilidade de nutrientes. A COX-2 tem se mostrado capaz de aumentar o fator de crescimento induzido da angiogênese de células fibroblásticas básicas através da indução do fator de crescimento endotelial vascular. Desta forma, os inibidores da COX-2 têm demonstrado bloquear a neovascularização, contribuindo dessa maneira, para a regressão do tumor (MAJIMA *et al.*, 2000). Outros estudos constataram que a super expressão da COX-2 em células tumorais está associada à inibição da apoptose (morte celular) através

da indução da expressão da proteína apoptótica Bcl-xl. Por isso, os inibidores da COX-2 induzem a resposta apoptótica. Além disso, é conhecido que a prostaglandina E₂ pode ter propriedades imunossupressoras, permitindo que o tumor escape dos mecanismos de sobrevivência (PRESCOTT, 2000). Em alguns estudos também foi constatado que a inibição da COX-2 reverte o aumento da indução tumoral de interleucina 10 (IL-10), citocina imunossupressora dos linfócitos e macrófagos, e a supressão da produção de IL-12, citocina ativadora de macrófagos (STOLINA *et al.*, 2000).

A COX-2 ainda pode estar envolvida na resistência dos tumores aos quimioterápicos, através do aumento da expressão da proteína transportadora MDR1, também chamada glicoproteína P. Então, o uso de inibidores de COX-2 pode diminuir a resistência dos tumores aos agentes quimioterápicos (PATEL *et al.*, 2002) sugerindo a inibição da evolução da neoplasia.

1.1.3. Lumiracoxibe

O uso tópico dos AINEs tem se tornado mais vantajoso e popular, visto que agem diretamente na área da injúria e reduzem a reação inflamatória, sem a indesejável atividade sistêmica (RADERMACHER *et al.*, 1991). Aplicado topicamente, a quantidade de diclofenaco absorvida através da pele é proporcional ao tempo de contato e à área da pele coberta e, além disso, depende da dose tópica total e da hidratação da pele. Estudos farmacocinéticos demonstraram que o diclofenaco, quando aplicado topicamente, penetra eficientemente na barreira epitelial, atinge as juntas, músculos e fluido sinovial, numa concentração suficientemente alta para causar o efeito terapêutico (RADERMARCHER *et al.*, 1991; ASSANDRI *et al.*, 1993).

A probabilidade de efeitos colaterais sistêmicos ocorrerem com a aplicação tópica do diclofenaco é pequena, comparada com a frequência de efeitos colaterais do diclofenaco por via oral. Entretanto, se aplicado em áreas de pele relativamente grandes e por prolongado período de tempo, a possibilidade de efeitos colaterais sistêmicos não é excluída (Voltarem Emulgel[®], Novartis, 1993, Bula). Apesar da comprovada eficácia e segurança no uso do diclofenaco a 1% em gel (PATEL & LESWELL, 1996) estudos de Radermacher e colaboradores (1991), utilizando diclofenaco topicamente (3 vezes ao dia durante 4 dias), revelaram que a quantidade de fármaco que chega a circulação sistêmica é considerável. Galer e colaboradores (2000) avaliaram os principais efeitos adversos decorrentes da aplicação tópica do diclofenaco 1% em gel (patches) após 14 dias. Foram observados “rash” e infecção cutânea, queixas de prurido e sintomas gastrintestinais.

Os inibidores COX-2 seletivos têm também demonstrado eficácia promissora, principalmente no tratamento do câncer de pele, onde a exposição excessiva aos raios ultravioletas do tipo B (UVB) induz uma resposta inflamatória. Esta é caracterizada por edema, infiltração de leucócitos, indução da expressão de COX-2 e, conseqüentemente, aumento da produção de prostaglandinas. Esse processo pode levar a formação do tumor que pode ser tratado de maneira comprovadamente eficaz com inibidores seletivos da COX-2 tópicos (WILGUS *et al.*, 2000).

O lumiracoxibe (LM), quimicamente conhecido como, ácido 2-[(2-fluor-6-clorofenil)amino]-5-metil-benzenoacético, é um novo AINE COX-2 seletivo. É um ácido fraco de pKa 4,7 e alta lipofilicidade. O LM possui alta seletividade pela enzima COX-2 em torno de 500 vezes maior que para COX-1 (MYSLER, 2004). Lozano-

Cuenca e colaboradores (2005) demonstraram que o LM é capaz de inibir a produção de prostaglandina E_2 (PGE_2) *in vitro* na mesma intensidade que o rofecoxibe. Porém, ao mesmo tempo, é um inibidor extremamente fraco da síntese de TXA_2 . Na concentração plasmática máxima ($\sim 83 \mu M$) após a administração oral (800 mg) o LM inibiu 100% da produção de PGE_2 .

Dados experimentais revelaram que o LM possui um mecanismo de ação adicional à inibição da COX-2: a analgesia provocada pelo LM se deve, principalmente, pela ativação dos canais de potássio GMP cíclico óxido nítrico (LOZANO-CUENCA *et al.*, 2005).

Quando administrado via oral o LM, 400 mg, é rapidamente absorvido, seu $C_{m\acute{a}x}$ é de aproximadamente $8 \mu g/mL$ em torno de 1-4 horas e possui um tempo de meia-vida relativamente baixo 3-6 horas, dependendo da dose. O modelo farmacocinético observado é de dois compartimentos, ou seja, percebeu-se que ocorre uma rápida distribuição para os tecidos e lenta eliminação. O estudo deste modelo permitiu observar que o acúmulo do fármaco no líquido sinovial após 24 horas da administração é 2 a 3 vezes maior que no plasma (MYSLER, 2004).

Já existem no mercado o medicamento contendo o LM com o nome comercial de Prexige[®] (Novartis), na forma de comprimido oral com a posologia indicada de 100 ou 200 mg uma vez ao dia para uso crônico e 400 mg para uso de curta duração no tratamento da artrite reumatóide, osteoartrite, e dor aguda (GUENSENS *et al.*, 2003; FRICKE *et al.*, 2008). Em doenças que requerem um tratamento prolongado o LM é eficaz na posologia de uma ou duas vezes ao dia, apesar de seu tempo de meia-vida curto. A acidez desta substância proporciona uma distribuição que privilegia os sítios de inflamação aumentando o seu tempo de meia-vida nessas regiões, o que permite esta posologia. O curto tempo de meia-vida

do LM, também poderia resultar na diminuição de possíveis efeitos adversos (MYSLER, 2004).

No tratamento da osteoartrite sua segurança foi comprovada quando o LM foi utilizado em altas doses (400 mg/dia), não provocando indesejáveis efeitos gastrintestinais e cardiovasculares (infarto do miocárdio, evento trombótico cardiovascular, aumento da pressão, etc.) quando comparado com AINEs não seletivos (FARKOUH *et al.*, 2004; MATCHABA *et al.*, 2005; HAWKEY *et al.*, 2006, 2007).

Esser e colaboradores (2005) realizaram um estudo comparando as atividades do LM e do diclofenaco de sódio. Eles comprovaram que o LM inibe 6,6 vezes mais a formação de tromboxanos a partir da inibição da COX-1 e 2 vezes mais a formação de prostaglandina E2 (prostranóide inflamatório). Além disso, possui atividade analgésica imediata semelhante, atividade antipirética 7 vezes maior e atividade antiinflamatória 1,6 vezes maior que o diclofenaco de sódio no tratamento da artrite reumatóide e osteoartrite (ESSER *et al.*, 2005).

A Figura 1.2 representa a estrutura do diclofenaco, um AINE não seletivo (a) e a estrutura do LM, um AINE COX-2 seletivo.

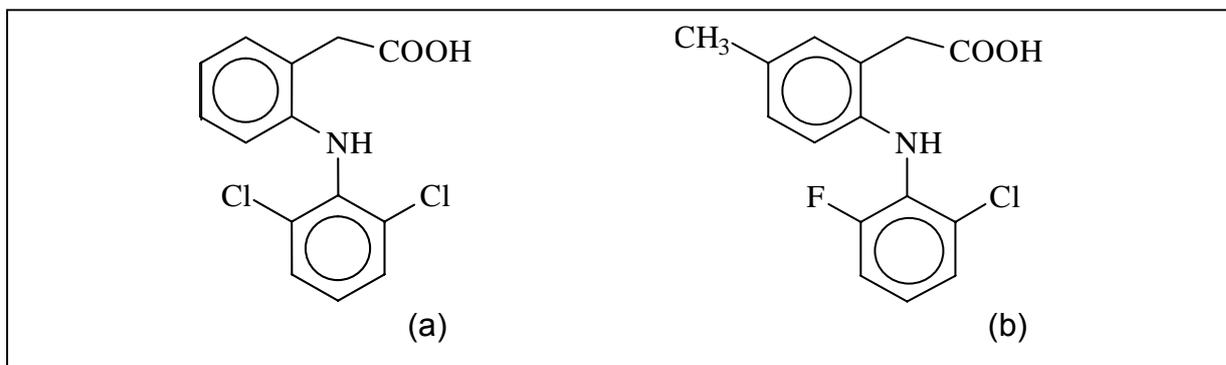


Figura 1.2 – Representação das estruturas dos fármacos diclofenaco (a) e lumiracoxibe (b).

As substâncias representadas são consideradas bioisómeros, ou seja, são compostos que possuem forma e volume moleculares quase idênticos, aproximadamente a mesma distribuição de elétrons e exibem propriedades físicas similares (BARREIRO & FRAGA, 2001). Desse modo, são moléculas que obedecem ao conceito de isosterismo no seu sentido mais amplo e geralmente apresentam similaridade na atividade biológica; porém podem apresentar atividade antagônica. Como já mencionado estes fármacos são AINEs, porém com seletividade diferente para a inibição da COX, ou seja, o diclofenaco não é seletivo e o LM por sua vez, é seletivo para a COX-2, o que constitui uma vantagem na sua administração oral, já que os efeitos colaterais são minimizados ou suprimidos. Mesmo a administração tópica do diclofenaco ainda produz efeito colateral decorrente de alguma absorção sistêmica e, portanto, o LM aplicado topicamente poderia constituir uma alternativa mais segura no tratamento da inflamação quando comparado com o diclofenaco, já que o risco de produzir efeitos colaterais sistêmicos é menor. Além disso, a aplicação tópica evita o metabolismo de primeira passagem hepático, sendo uma vantagem adicional, pois o fármaco aplicado atua diretamente no local da inflamação.

É possível evidenciar na literatura a utilização de sistemas de liberação tópicos contendo fármacos antiinflamatórios, como o diclofenaco de sódio, para o tratamento de patologias de cunho inflamatório (VARGHESE & KHAR, 1995; SINTOV & BOTNER, 2006); ibuprofeno (STOTT *et al.*, 1998; AL-SAIDAN, 2004); piroxicam (CURDY *et al.*, 2001; ZHAN *et al.*, 2005; PÉNZES *et al.*, 2005), meloxicam (YUAN *et al.*, 2007a e b) e cetoprofeno (PANUS *et al.*, 1997; RHEE *et al.*, 2001; SRIDEVI & DIWAN, 2002).

1.2. A PELE HUMANA

A pele não representa apenas a envoltura protetora do corpo. Na verdade, representa uma fronteira que se interpõe entre o organismo e o meio ambiente, controla a perda de fluídos, evita a penetração de substâncias estranhas, nocivas e também da radiação, atua como amortecedor frente a golpes mecânicos, regula a perda de calor e transmite estímulos (HARRY, 1990).

A superfície total da pele é de cerca de 18000 cm² para um adulto, pesa cerca de 4,8 Kg no homem e 3,2 Kg na mulher e apresenta espessura variável (1 a 4 mm) conforme a região (DANGELO & FATTINI, 2005).

A pele é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, da mais externa para a mais profunda, respectivamente (Figura 1.3) (AZULAY & AZULAY, 1999; DANGELO & FATTINI, 2005).

A epiderme é constituída de várias camadas que variam em espessura, oscilando desde 0,8 mm de espessura nas palmas das mãos e solas dos pés até 0,006 mm nas pálpebras (AULTON, 2005). A epiderme dá origem aos anexos cutâneos: unhas, pêlos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. As aberturas dos folículos pilosebáceos (pêlo e glândula sebácea) e das glândulas sudoríparas na pele formam os orifícios conhecidos como poros (ZATZ, 1993).

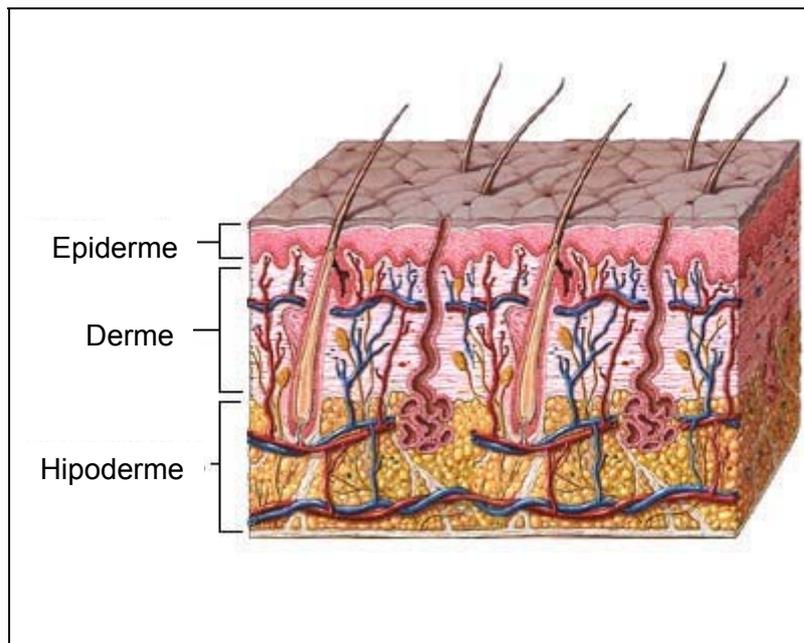


Figura 1.3 – Representação das três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/images/ency/fullsize/8912.jpg>

As camadas da epiderme podem ser divididas em camada basal, espinhosa, granulosa e estrato córneo (EC), da mais interna para a mais externa, respectivamente (Figura 1.3) (AZULAY & AZULAY, 1999).

A camada basal, também chamada de camada germinativa, é formada por células jovens, colunares, em multiplicação constante que vão se orientando no sentido da exteriorização e sofrem, então, modificações morfológicas e histoquímicas importantes, sendo assim responsáveis pela renovação das células da epiderme. As células da camada basal que sofreram modificações se transformam em células da camada espinhosa. Essas células são mais poligonais com estrutura laminada e apresentam aparência espinhosa devido ao grande número de desmossomos, placas de união de superfície, que ancoram as células umas às outras dando resistência ao atrito. As células da camada granulosa são bem achatadas e abundantes em grânulos de querato-hialina, sendo também secretoras

de substâncias fosfolipídicas e glicosaminoglicanos que vedam a passagem de água e outras substâncias (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990; AZULAY & AZULAY, 1999).

O EC é a camada mais superficial da pele e é constituído por células mortas, anucleadas, ricas em queratina, os chamados corneócitos, e conectadas por uma matriz lipídica, cuja espessura varia de acordo com a região do corpo (SUHONEN *et al.*, 1999). As fibras de queratina representam cerca de 80% do volume da camada córnea e são responsáveis pela resistência química e física do tecido (WARD & DU REAU, 1990; ZATZ, 1993).

A permeabilidade do EC à água é bastante reduzida: cerca de 1000 vezes menor que a maioria das outras membranas biológicas. Isto ocorre devido à composição lipídica única do EC e ao arranjo estrutural da matriz lipídica intercelular (POTTS & FRANCOEUR, 1991; SQUIER *et al.*, 1991). O EC já foi descrito por Junginger e colaboradores (1992) como uma “parede de tijolos”, representada pelos corneócitos, que possui regiões lipídicas que agem como uma “argamassa” para ligar estes corneócitos. Assim sendo, os lipídios são os responsáveis pela função de barreira à perda de água e entrada de substâncias do EC (ELIAS, 1983; BOMMANNAN *et al.*, 1990).

Os lipídios intercelulares do EC apresentam um importante papel na manutenção da função de barreira da pele. Estes lipídios representam 2 a 10% do EC em peso, formando uma camada hidrofóbica entre as células e inibindo, portanto, a difusão da água e de substâncias hidrofílicas através do EC. A lamela lipídica do EC consiste de ácidos graxos livres representados pelos ácidos palmítico e oléico (~17%); ceramidas (~70%); ester de colesterol (~5%) e colesterol (~28%), sendo destituídas de fosfolipídios, os quais são componentes formadores de

bicamadas em todas as outras membranas celulares e intercelulares (DOWNING *et al.*, 1993). Estes lipídios estão organizados em camadas duplas, formando estruturas lamelares, arredondadas, arranjadas com um alto grau de ordem e alta densidade e ocupam cerca de 20% do volume total do EC (HARADA *et al.*, 1992).

O EC e seus componentes estão constantemente expostos à degradação química e física causada pelo ambiente. Para manutenção da função barreira, é necessária sua constante renovação.

A derme consiste em uma matriz de tecido conectivo de 3 a 5 mm de espessura entremeada de proteínas fibrosas (colágeno, elastina e reticulina). Nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e os apêndices da pele (glândulas sudoríparas e unidades polisebáceas) a atravessam. A derme necessita de suprimento sanguíneo suficiente para transportar nutrientes, remover produtos de degradação e regular a pressão e a temperatura. Esse suprimento atinge cerca de 0,2 mm dentro da superfície da pele de modo que absorve rápido a maioria das substâncias que passam através da epiderme. O volume generoso de sangue na pele geralmente age como um sistema *sink*, mantendo as concentrações penetrantes da derme sempre bastante baixas e maximizando gradientes de concentração epidérmicos, promovendo, dessa forma, a absorção percutânea (AULTON, 2005).

A hipoderme é constituída de lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos. A gordura subcutânea funciona como amortecedor mecânico e barreira térmica que sintetiza e estoca rapidamente substâncias energéticas prontamente disponíveis (AZULAY & AZULAY, 1999; AULTON 2005).

1.3. PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS NA/ATRAVÉS DA PELE

Existe uma série de circunstâncias nas quais os métodos convencionais de administração de fármacos, como por exemplo pela rota oral, não são viáveis. Nesses casos é necessária a utilização de uma rota alternativa. Apesar do tratamento intravenoso eliminar grande parte dessas circunstâncias, como o metabolismo gastrointestinal e hepático, a característica invasiva impede sua utilização, especialmente no caso de tratamentos crônicos. Dessa forma, outras rotas de administração de fármacos foram desenvolvidas (NAIK *et al.*, 1995).

Existem três diferentes alternativas para utilização de produtos farmacêuticos aplicados na pele: (1) produtos destinados à manipulação da barreira funcional da pele, por exemplo: antibióticos e antimicrobianos tópicos que auxiliam uma barreira danificada a eliminar a infecção, protetores solares que protegem a camada córnea bem como tecidos viáveis da radiação solar e preparações emolientes que restabelecem a maleabilidade de uma camada córnea dessecada (2) produtos destinados a direcionar o fármaco para tecidos viáveis da pele sem usar outras rotas terapêuticas e (3) produtos destinados ao tratamento sistêmico através da pele, por exemplo: sistemas terapêuticos transdérmicos.

Embora a pele constitua uma barreira muito eficaz à penetração de fármacos, pode ser atravessada por pequenas quantidades de substâncias lipófilas capazes de penetrar nas camadas córneas, podendo até chegar a uma absorção sistêmica. Nesse processo, o estrato córneo constitui a principal barreira, enquanto, a epiderme e a derme se comportam como um gel aquoso e não apresentam função significativa de barreira, sendo marcantes seus efeitos reservatórios. É importante avaliar o grau de penetração, pois para determinados princípios ativos, uma penetração profunda pode provocar intoxicações (LE HIR, 1997; BONNABRY, 1999).

É importante que, dependendo da enfermidade, se vetorize a região-alvo principal: superfície da pele, camada córnea, epiderme viável, derme superior ou circulação sistêmica (AULTON, 2005). Contudo, a eficácia do tratamento dependerá da liberação do fármaco da formulação que o contém e de sua penetração/difusão pelas camadas da pele (SHAH *et al.*, 1991b).

A terapia tópica e a transdérmica vem sendo bastante utilizada nos últimos anos devido uma série de vantagens oferecidas: (1) a pele apresenta uma grande área de superfície de fácil acesso (cerca de 1-2 m²) de absorção; (2) a aplicação de um sistema transdérmico à pele é não invasivo e permite intervenção; (3) grande adesão dos pacientes ao tratamento; (4) novas tecnologias desenvolvidas para a liberação transdérmica de fármacos; (5) atinge níveis plasmáticos constantes, resultado da liberação contínua de fármaco por determinado período; (6) provoca menor incidência de efeitos colaterais, devido à ausência de picos de concentração; (7) promove eliminação do efeito de primeira passagem (SHAH *et al.*, 1993).

A administração transdérmica de fármacos possui limitações. Diversos fatores, biológicos e/ou físico-químicos, influenciam de maneira positiva ou negativa o transporte transdérmico de fármacos: (1) estado, idade da pele e local de aplicação; (2) fluxo sangüíneo; (3) metabolismo da pele; (4) grau de hidratação da pele; (5) temperatura; (6) grau de ionização do fármaco; (7) coeficiente de difusão; (8) concentração do fármaco; (9) coeficiente de partição e (10) forma e tamanho molecular (BORSADIA *et al.*, 1992; AULTON, 2005).

Portanto, as evidências disponíveis indicam que moléculas de baixo peso molecular, dotadas de solubilidade óleo/água adequada e não ionizadas penetram, primeiramente, através dos lipídios intercelulares, especialmente após grande tempo

de exposição. Dessa forma, podem penetrar passivamente na pele, a ponto de sofrerem absorção percutânea (MORGANTI *et al.*, 2001).

Também existem evidências de que a hidratação da pele promove o inchamento dos corneócitos com a entrada de água. De fato, a oclusão hidrata a queratina dos corneócitos e aumenta o conteúdo de água entre as lamelas de lipídios intercelulares adjacentes. O fármaco se difundindo através dos domínios lipídicos intercelulares vai se distribuir entre o interior da bicamada hidrofóbica e as regiões aquosas separando os grupos cabeça das bicamadas lipídicas adjacentes. A hidratação do EC leva à redução do coeficiente de partição EC/epiderme viável de um composto penetrante, ou seja, favorece a partição deste do EC para epiderme viável (RASHIR & MAIBACH, 1999). A eficácia de produtos tópicos/transdérmicos então pode ser determinada pela relação estabelecida entre o coeficiente de permeabilidade do EC e da estrutura característica do penetrante, como um princípio ativo, utilizado. Variando as características físico-químicas dos compostos ativos também pode haver variação no grau de absorção através da estrutura cutânea. De fato, o coeficiente de permeabilidade é influenciado pela hidrofobicidade e tamanho do penetrante, pela presença ou ausência de cargas, local de aplicação, etc. Ainda, a evaporação de componentes voláteis como água, na superfície da pele a partir das preparações tópicas influencia de maneira significativa a difusão dos princípios ativos no EC. Portanto, o penetrante pode ter ação tópica ou transdérmica, passando pelas etapas seguintes: (1) dissolução/partição nos lipídios superficiais do EC; (2) difusão através dos domínios lamelares do EC; (3) partição do EC para epiderme viável hidrofílica (ação tópica); (4) difusão através da epiderme para derme e (5) acesso à circulação sistêmica (ação transdérmica).

Deste modo, é extremamente importante a seleção do veículo, do fármaco a ser utilizado, do tipo de efeito esperado a partir da formulação desenvolvida e da área da pele a ser tratada.

As propriedades físicas da formulação dependem de vários fatores, dentre os quais a granulometria das partículas dispersas, a tensão interfacial entre as fases, o coeficiente de partição da substância ativa entre as fases e as características reológicas do produto (PRISTA *et al.*, 2003).

A permeação de fármacos através da pele envolve a difusão da molécula através da epiderme intacta e dos apêndices da pele, como os folículos e glândulas sudoríparas, os quais formam caminhos alternativos através da epiderme intacta. Portanto, existem três vias pelas quais os fármacos podem penetrar através da pele: via intercelular, transcelular e através dos apêndices. Porém, esses apêndices ocupam apenas 0,1% da superfície total da pele e a contribuição desta via para o transporte de fármacos é considerada bem pequena (ILLEL, 1997). Na via transcelular, a molécula primeiro atravessa os corneócitos do EC, encontra um meio essencialmente hidrofílico no interior das células e, posteriormente, encontra a matriz lipídica entre as células. Na via intercelular, a molécula passa somente pela matriz lipídica, ou seja, entre os corneócitos sem penetrar nestes (Figura 1.4) (POTTS, & GUY, 1992; MOSER *et al.*, 2001).

O processo de absorção cutânea pode ser definido como o movimento de massa da substância da superfície da pele para a circulação geral. Isto inclui penetração através do EC, difusão através de cada camada da pele, captação pelos capilares vizinhos à junção dermo-epidérmica e, transporte para os tecidos alvos para desencadear a ação terapêutica (AULTON, 2005).

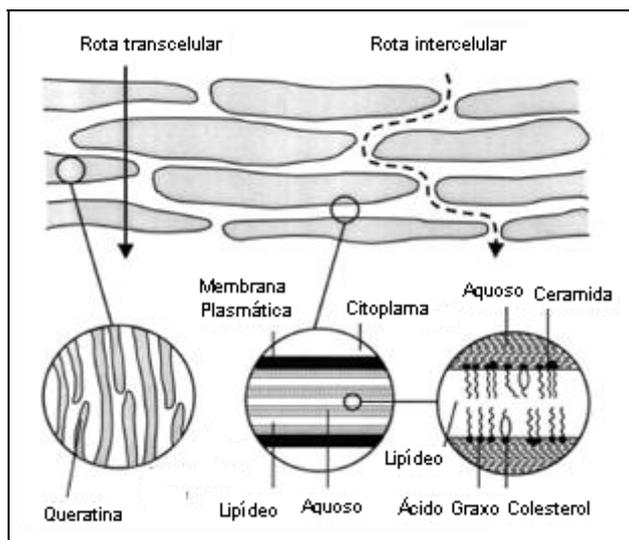


Figura 1.4 -. As rotas de penetração transcelular e intercelular. Fonte: MOSER *et al.*, 2001.

A pele se comporta como uma barreira passiva à difusão de substâncias (ZATZ, 1993). Na difusão passiva a matéria se move de uma região do sistema para outro sem que haja influência de outras moléculas e/ou gasto de energia. A hipótese básica é de que a taxa de transferência da substância difundida por unidade de área de uma seção é proporcional ao gradiente de concentração medido perpendicularmente a essa seção (AULTON, 2005). Isso é expresso pela primeira lei de difusão de Fick:

$$J = \frac{A \cdot D \cdot K_p (c_1 - c_2)}{h}$$

onde A é a área de contato, D é o coeficiente de difusão, Kp é o coeficiente de partição, c1-c2 é a diferença de concentração e h é a espessura da camada de difusão. O fluxo (J) é a taxa de passagem da substância através de uma unidade de superfície de área de pele em função do tempo (HADGRAFT, 2001; MOSER *et al.*, 2001; AULTON, 2005).

Este tipo de tratamento corresponde a situações simples, nas quais a difusão ocorre em um único meio isotônico. Porém, a pele é um tecido multicamada heterogêneo e, na absorção percutânea, o gradiente de concentração desenvolve-se ao longo de vários estratos, promovendo uma variação no coeficiente de permeabilidade ao longo de sua espessura e impedindo que o fluxo da passagem de uma substância seja constante desde o início. O perfil observado é uma curva no início do estudo e, em tempos maiores, uma reta representando o estado estacionário (EE) onde o fluxo é constante com o tempo. Se extrapolarmos o trecho constante do gráfico até o eixo do tempo, o intercepto obtido representa o *lag time* (Figura 1.5), que representa o tempo necessário para que a passagem de uma substância através de uma membrana atinja o estado estacionário (SHAH et al., 1993; AULTON, 2005).

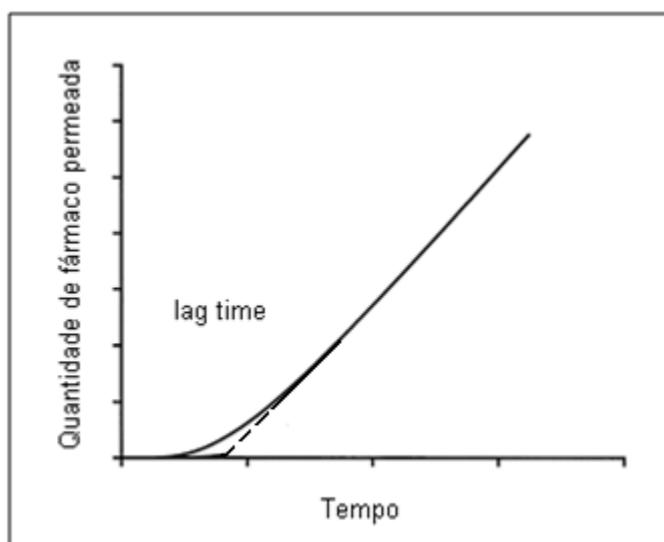


Figura 1.5 – Representação esquemática de um gráfico de quantidade de fármaco permeada através do tecido em relação ao tempo. Fonte: AULTON, 2005.

A taxa de permeação do fármaco é determinada pela quantidade permeada em função do tempo. O fluxo de permeação é calculado como a inclinação na porção linear da curva, sendo expresso em quantidade de fármaco por tempo por área (KOU *et al.*, 1993; MOSER *et al.*, 2001).

Sendo a molécula do LM altamente lipofílica, sua permeabilidade através do EC, bem como sua difusão através da derme e epiderme, tendem a ser prejudicadas quando o objetivo é desenvolver um sistema de liberação para ser aplicado sobre a pele. Assim, o desenvolvimento de um sistema de liberação apropriado, aliado à presença de promotores de absorção cutânea, deve ser considerado para aumentar a penetração de fármacos na/atraves da pele.

1.4. ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Fármacos de alta lipofilicidade ou hidrofílicidade não apresentam condições ideais para penetração nas barreiras biológicas, como a derme ou o EC, respectivamente. Com intuito de promover a penetração ou até mesmo absorção cutânea, diferentes estratégias para superar essas barreiras constituem objeto de estudo em várias instituições de pesquisa e laboratórios farmacêuticos.

Várias estratégias vêm sendo utilizadas objetivando aumentar as características de permeação de fármacos na pele, como por exemplo, métodos químicos (WILLIAMS & BARRY, 2004), físicos (GUY *et al.*, 2000; MITRAGOTRI & KOST, 2000; BOUCAUD *et al.*, 2001; LOPEZ *et al.*, 2001, 2003a e b; TOKUDOME & SUGIBAYASHI, 2003), farmacotécnicos (YAROSHI, 2001), modificações químicas na estrutura do fármaco ou na composição do veículo (BONINA *et al.*, 1995);

modificações na forma farmacêutica (KANTARIA *et al.*, 1999) e uso de agentes solubilizantes (LEVANG *et al.*; 1999).

1.4.1. Métodos Químicos

Dentre as estratégias para promover a permeação de fármacos na pele pode-se destacar o emprego de promotores de penetração de fármacos na pele (DEGIM *et al.*; 1999; ASBILL & MICHNIAK, 2000; GHAFOURIAN *et al.*, 2004; WILLIAMS & BARRY, 2004), os quais podem ser representados por solventes, tensoativos ou compostos de outra natureza, que são utilizados na formulação para alterar dinamicamente e reversivelmente a integridade da pele a fim de promover a penetração de fármacos (WILLIAMS & BARRY, 1992).

Muitos tipos de promotores de penetração, especialmente os ácidos graxos, vêm ganhando grande atenção já que são componentes naturais dos lipídios da pele e, conseqüentemente, não são estranhos ao organismo. O ácido oléico (AO) ou ácido *cis*-9-octadecenóico é um dos ácidos graxos mais abundantes da natureza; presente em todos os óleos e gorduras originados de plantas e animais e sua capacidade de atuar como promotor de permeação já foi bem esclarecida e comprovada em vários estudos *in vitro*. (NAIK *et al.*, 1995; SMITH & MAIBACH, 1995; TANOJO *et al.*, 1999; JIANG & ZHOU, 2003).

O AO é um ácido graxo de cadeia longa (cadeia de 18 carbonos), porém apresenta-se na forma líquida à temperatura ambiente devido à presença de uma ligação insaturada (C₉-C₁₀) na cadeia alquílica. Embora exista em abundância no organismo e apresente uma dupla ligação (cadeia mono-insaturada) não é essencial para os seres humanos (TANOJO *et al.*, 1999).

Estudos biofísicos, morfológicos e bioquímicos demonstraram que o EC forma um segmento contínuo de corneócitos ricos em proteínas e embebidos numa matriz rica em lipídios apolares organizados em camadas lamelares. O principal mecanismo de ação do AO é promover a fluidificação dos lipídios e a separação da fase lipídica, emulsificando e desorganizando as lamelas lipídicas do EC de maneira a aumentar a permeabilidade de fármacos na pele (JIANG & ZHOU, 2003).

O AO tem sido relatado por aumentar a permeação de muitos fármacos, incluindo ácido salicílico (COOPER, 1984); aciclovir, hidrocortisona, ácido retinóico e trifluorotimidina (LOFTSSON *et al.*, 1989a); naloxona (AUNGST *et al.*, 1986); indometacina (NOMURA *et al.*, 1990); progesterona (BENNETT & BARRY, 1987); nitroglicerina (LOFTSSON *et al.*, 1987); 5-fluorouracil (YAMANE *et al.*, 1995); metronidazol (HOELGAARD *et al.*, 1988); estradiol (GOODMAN & BARRY., 1988); triancinolona (LOFTSSON *et al.*, 1989b); propranolol (OGISO & SHINTANI, 1990); piroxicam (FRANCOEUR *et al.*, 1990); ibuprofeno e 6-mercaptopurina (YAMASHITA *et al.*, 1995); tenoxicam (LARRUCEA *et al.*, 2001); entre outros.

1.4.2. Sistemas de liberação transdérmicos

Vários tipos de sistema de liberação de fármacos, como polímeros sintéticos, microcápsulas, lipoproteínas, lipossomas, micelas, niossoma, entre outros, vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de minimizar a degradação prematura dos fármacos, prevenir efeitos indesejáveis em células sadias com fármacos citotóxicos e aumentar a biodisponibilidade e a fração do fármaco acumulada na área da patologia. A criação de sistemas biocompatíveis, que forneçam um pequeno tamanho de partícula, elevada capacidade de carga, tempo

de circulação estendido, capacidade de acumular na área da patologia e de liberar substâncias pouco solúveis ainda são um desafio farmacotécnico e tecnológico (TORCHILIN, 2007).

A utilização de micelas, preparadas a partir de copolímeros anfífilos, para solubilização de fármacos pouco solúveis tem atraído bastante atenção nos últimos anos. Este tipo de micela é formada normalmente por blocos de copolímeros, os quais consistem em unidades monoméricas hidrofílicas e hidrofóbicas. Se o tamanho da unidade hidrofílica é muito grande o copolímero existe na água na forma de monômeros (moléculas individuais). Se a cadeia hidrofóbica é maior, ocorre a formação de uma estrutura com morfologia não-micelar, como uma lamela. A maior força por trás da auto-associação do polímero é a diminuição da energia livre do sistema devido à remoção de fragmentos hidrofóbicos em torno com a formação do núcleo micelar estabilizado com a porção hidrofílica exposta para a água. Em outros tipos de copolímeros, alguns conjugados de blocos de monômeros desses copolímeros com diferentes hidrofobicidades podem se alternar, como no caso do gel pluronic (TORCHILIN, 2007).

O gel pluronic é um poloxamer feito de poli (óxido de etileno)-b-poli (óxido de propileno)-b-poli (óxido de etileno), três polímeros com inúmeras aplicações farmacêuticas. O gel pluronic mais utilizado no mercado atualmente é o Pluronic F-127 (PF-127) (MOORE *et al.*, 2000).

O segmento POP (poli oxido de propileno) de uma dessas cadeias é relativamente hidrofóbico quando comparado com o segmento POE (poli óxido de etileno). Conseqüentemente, quando várias cadeias são colocadas num solvente aquoso como a água sob alta temperatura, eles se agregam para minimizar a energia livre da solução. À baixas temperaturas, o PF-127 existe como monômero

na solução. Sob aquecimento, ocorre um equilíbrio entre os monômeros e as micelas e, em altas temperaturas, os agregados se formam (GOLDSTEIN, 1984; CABANA *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 2000).

Uma das características das soluções aquosas deste polímero é a gelificação termorreversível, ou seja, soluções contendo 20 a 30% do gel pluronic são fluidas à temperatura de aproximadamente 4 a 5 °C, mas formam um gel altamente viscoso à temperatura ambiente e à temperatura corporal (BASF, OS-796). Devido a esta propriedade, se torna um gel de considerável interesse na permeação de fármacos com liberação controlada (BROMBERG & RON, 1986). Os fármacos veiculados em PF-127 são geralmente administrados na forma líquida sobre a pele, permitindo um contato íntimo com a superfície antes da formação de um gel não oclusivo sob aquecimento. Como a formação do gel é reversível, a remoção é facilitada pela imersão em água ou irrigação com a mesma. Além disso, esta propriedade permite que o gel seja resfriado e aquecido muitas vezes sem que haja mudanças em suas características. (SCHMOLKA, 1972; SHARMA & BHATIA, 2004).

O PF-127 é um composto estável quando utilizado em preparações farmacêuticas e não tem demonstrado efeitos prejudiciais quando aplicado na pele por longo período de tempo. Sua baixa toxicidade, fraco potencial imunogênico e boa capacidade de solubilização fazem dele um ótimo veículo para sistema de liberação de fármacos (JOHNSTON & MILLER, 1985).

Muitos autores têm sugerido que o uso do gel de PF-127 tem utilidade como potencial sistema de liberação pela facilidade de aplicação e características de liberação de fármacos (CHEN-CHOW & FRANK, 1981; VEYRIES *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2002; NAIR & PANCHAGNULA, 2003). Assim, o gel de PF-127 tem sido

amplamente explorado como sistema de liberação transdérmico (MIYAZAKY *et al.*, 1995; SHIN *et al.*, 2000), injetável (KATAKAM *et al.*, 1997; BARICHELLO *et al.*, 1999; VEYRIES *et al.* 1999; PAAVOLA *et al.*, 2000, RICCI *et al.*, 2002, 2005) e tópico (BENTLEY *et al.*, 1995, 1997, 1999).

Miyazaki e colaboradores. (1992) demonstraram que o uso do gel PF-127 no tratamento do câncer de pele faz com que o fármaco ativo permaneça no local de ação por mais tempo, tendo, portanto, maior duração de ação do que formulações injetáveis do mesmo fármaco. Ou seja, o gel de PF-127 aumenta o tempo de retenção do fármaco no sítio de ação, promovendo uma liberação sustentada do fármaco, aumentando a eficácia terapêutica. O gel de PF-127 tem sido considerado um meio para liberação tópica de uma série de fármacos: naproxeno (ESCOBAR-CHAVES *et al.*, 2005), ceftiofur (ZHANG *et al.*, 2002), indometacina (SHAWESH *et al.*, 2002), piroxicam (SHIN *et al.*, 2000), diclofenaco (YONG *et al.*, 2001, 2005; PARK *et al.*, 2003), entre outros.

A penetração transdérmica também pode ser aumentada com o uso do gel de PF-127 como sistema de liberação em associação com promotores de penetração cutânea para os fármacos vasopressina e insulina, por exemplo (PILLAI & PANCHAGNULA, 2003).

O desenvolvimento de sistemas de liberação que proporcionem adequada liberação e retenção do LM na pele constituem uma maneira de otimizar a terapia tópica das inflamações, já que a atividade antiinflamatória neste caso é dependente da concentração do fármaco no tecido.

1.5. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

A utilização de métodos *in vitro* para avaliar a liberação de ingredientes ativos de formas farmacêuticas semi-sólidas tem recebido grande atenção tanto das indústrias farmacêuticas quanto dos órgãos regulatórios (SKELLY *et al.*, 1987; SHAH *et al.*, 1989, 1991a). Uma liberação adequada é um pré-requisito para prever a eficácia terapêutica de uma formulação.

Apesar da determinação das características da dissolução ter se tornado uma técnica padrão e de rotina para avaliar a liberação de formas farmacêuticas sólidas orais, ainda é necessário o estabelecimento de um método universalmente aceito para a avaliação da liberação de formas semi-sólidas. Atualmente, nenhum compêndio oficial preconiza um método específico para determinação da liberação *in vitro* de produtos semi-sólidos, como géis, cremes, emulsões, etc.

Uma grande quantidade de artigos, assim como *guidelines* do FDA, preconizam o uso de células de difusão, como a célula de Franz, para determinar a liberação *in vitro* de formulações tópicas e de sistemas transdérmicos (SHAH *et al.*, 1989; U.S.FDA/CDER, 1997; SHAH *et al.*, 1999).

A célula de difusão de Franz tornou-se um método popular de estudo da difusão de substâncias através da pele. (SHAH *et al.*, 1989, 1991a, 1993; CLEMENT *et al.*, 2000; MOSER *et al.*, 2001). Este sistema consiste em dois compartimentos, separados por membrana sintética e dispostos verticalmente. A formulação estudada é colocada na parte acima da membrana, no compartimento doador e o compartimento inferior possui uma saída lateral para coleta do meio receptor. A metodologia *in vitro* segue um processo estático, onde a solução receptora apresenta um volume fixo para a liberação do fármaco, e a intervalos de tempo selecionados, alíquotas do fluido receptor são retiradas e analisadas quanto ao

conteúdo de fármaco permeado (Figura 1.5). As amostras são submetidas à análise para quantificação do fármaco por técnica apropriada.

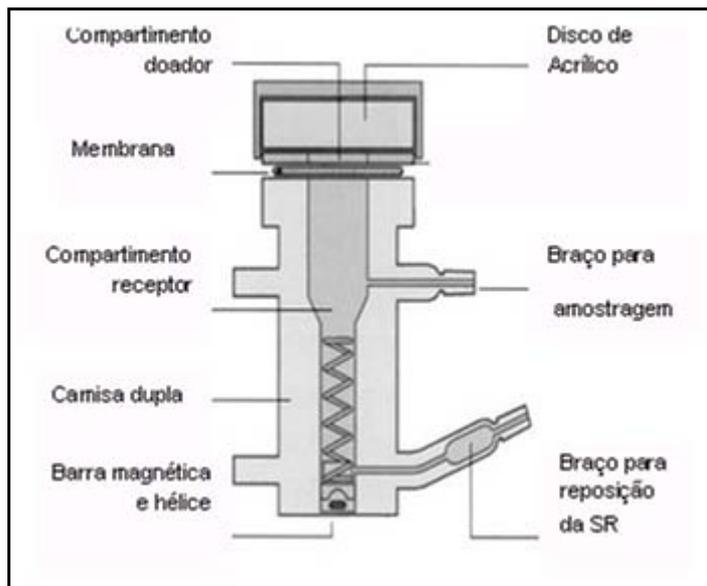


Figura 1.6 - Célula de difusão de Franz (www.Hansonresearch.com), acesso em 20 de março de 2008.

A solução receptora (SR) a ser utilizada deve ser escolhida com base na solubilidade do fármaco, obedecendo à condição *sink*, ou seja, condição que impede que a concentração na SR se aproxime da concentração de saturação do fármaco naquele meio. Dessa forma, evita-se que se tenha uma velocidade de dissolução lenta (SKELLY *et al.*, 1987, AULTON, 2005). Para compostos hidrofílicos, normalmente, se utiliza soluções tampão, enquanto que para compostos lipofílicos deve-se adicionar agentes solubilizantes para manutenção da condição “sink” (SKELLY *et al.*, 1987).

A técnica usual para os estudos de liberação *in vitro* é o uso de membranas sintéticas semi-permeáveis homogêneas que não limitem a passagem do fármaco. Dessa forma pode-se avaliar a partição do fármaco da formulação para a solução receptora, ou seja, a quantidade de fármaco capaz de ser liberado da formulação. A membrana de acetato de celulose tem sido amplamente utilizada como uma membrana com características hidrófilas em células de difusão para estudos de liberação *in vitro*.

1.6. ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Os métodos experimentais *in vitro* para medidas de permeação de fármacos através da pele são necessários para avaliar a passagem e/ou retenção dos mesmos na/atraves da pele, quando destinadas à aplicação tópica ou transdérmica. Os estudos de permeação *in vitro* aproximam-se mais das condições *in vivo* quando se utilizam sistemas com membranas naturais como, por exemplo, a pele humana. Porém, existe uma grande dificuldade de acesso às espécies de pele humana de tamanho, quantidade e qualidade adequada. Além disso, ainda se esbarra em obstáculos éticos e legais. As permeabilidades das peles de alguns animais já foram exaustivamente estudadas: homem, suíno, macaco, cachorro, gato, cavalo, coelho e rato (REIFENRATH *et al.*, 1984; SATO *et al.*, 1991; SURBER *et al.*, 1991; HADGRAFT & BEUTNER, 1993; HAIGH *et al.*, 1994).

Os modelos de pele humana reconstituída, em princípio, poderiam constituir uma alternativa se a barreira à penetração deste tipo de pele fosse equivalente à pele humana (HAIGH *et al.*, 1994; SCHMOOK *et al.*, 2001). Contudo,

uma série de trabalhos demonstrou a permeabilidade à fármacos com o uso de pele humana, pele suína, de rato, sintética e epiderme humana reconstituída. Os estudos da estrutura histológica da pele suína, particularmente aplicável a estudos *in vitro*, forneceram resultados comparáveis aos obtidos com pele humana, sendo então a pele suína mais indicada para os estudos de permeação cutânea *in vitro* (ANDEGA *et al.*, 2001; MOSER *et al.*, 2001; SCHMOOK *et al.* 2001, MEYER *et al.*, 2007).

Apesar de o EC ser considerado a principal barreira limitante à penetração de fármacos na/atraves da pele, pode-se afirmar que as suas funções de barreira não são comprometidas pela remoção da pele do organismo (LEVIN & MAIBACH, 2005).

Vários estudos já demonstraram que a permeação de fármacos lipofílicos é significativamente diminuída quando a membrana natural utilizada inclui, em grande parte, a derme. Então, para fármacos lipofílicos, a difusão através da epiderme viável constitui o passo limitante para permeação de fármacos na/atraves da pele. Por outro lado, para fármacos hidrofílicos, o EC constitui uma excelente barreira à permeação cutânea, de forma que a presença ou ausência de tecido dérmico influencia de maneira insignificante a taxa de permeação. Assim, o EC constitui o passo limitante do processo de difusão passiva de fármacos hidrofílicos através da barreira (MOSER *et al.*, 2001).

Os estudos de permeação cutânea *in vitro* são realizados também em células de difusão de Franz ou em sistemas adaptados, sendo o protocolo destes estudos semelhantes ao dos estudos de liberação *in vitro*, descrito anteriormente.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento e a avaliação de sistemas de liberação transdérmicos utilizando o gel PF-127 para a veiculação de lumiracoxibe na presença de ácido oléico em diferentes concentrações que pode ser utilizado para o tratamento da inflamação associada à osteoartrite, inflamação cutânea e daquela associada ao câncer de pele mediado por UVB.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção, caracterização e determinação do teor da matéria-prima;
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação do fármaco LM, matéria-prima, na solução receptora e na pele suína, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por detecção no ultravioleta (UV);
- Determinação do coeficiente de partição do LM óleo/tampão (K_{OT}), pele/tampão (K_{PT}) e estrato córneo/tampão (K_{ECT});
- Caracterização física da formulação através do estudo das propriedades reológicas e da determinação do ponto de gelificação;
- Estudos de liberação *in vitro* de LM nas formulações desenvolvidas através de membrana de acetato de celulose;
- Estudos de permeação e retenção *in vitro* de LM nas formulações desenvolvidas em pele de orelha suína;
- Estudos de toxicidade dérmica primária e cumulativa na formulação proposta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos (Vortex) PHOENIX AP56;
- Balança analítica METTLER TOLEDO – AG 204;
- Balança de precisão METTLER TOLEDO – PB3002;
- Banho de ultra-som UNIQUE – USC 2850;
- Banho termostaticado FISATOM 802D;
- Centrífuga IEC (International Equipment Company) – CENTRA MP4R;
- Coluna cromatográfica empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo ácido propil sulfônico J. T. Baker (250 x 4,6 mm, 5 μ m);
- Coluna cromatográfica empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (150 x 4,6 mm, 5 μ m);
- Destilador de água QUIMIS;
- Eletrodo DME CV1 em KCl 3 M DIGIMED;
- Equipamento para determinação de ponto de fusão BÜCHI B-540;
- Espectrofotômetro ultravioleta SHIMADZU – UV PC 2401;
- Espectrômetro de infravermelho ABB FTLA 2000-100;
- Espectrômetro de RMN Bruker DRX400;
- Homogeneizador de tecidos ULTRA TURRAX T18;
- Membrana filtrante 0,45 μ m MILLIPORE;
- pHmetro/condutivímetro METTLER-TOLEDO – MPC227;

- Pipetas automáticas de 20, 200, 1000 e 5000 μL GILSON;
- Placa de agitação multipontos com 6 pontos METTLER;
- Placa de aquecimento e agitação CORNING;
- Potenciômetro METTLER TOLEDO – MPC 227;
- Reômetro HAAKE Rheostress 600 com thermocontroller HAAKE UTC, sensor HAAKE cone-placa 20 mm e banho de água HAAKE Phoenix II C25P;
- Rêometro Rheometric Scientific SR5;
- Resistência termostatzada INTEL RESISTÊNCIAS;
- Rotavapor QUIMIS Q-218-1;
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência SHIMADZU – bomba modelo LC-10AD vp, auto-injetor modelo SIL-10AD vp, detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M10A vp e sistema de dados (*software*) modelo CLASS-VP versão 6.1;
- Titulador automático METTLER – DL25;
- Ultrassom UNIQUE USC 2850;
- Unidade descartável filtrante 0,45 μm de poro MILLIPORE.

3.1.2. Reagentes

- Acetato de etila (Próquimios);
- Acetato de etila (VETEC);
- Acetonitrila p.a. (VETEC);

- Acetonitrila para CLAE (TEDIA);
- Ácido clorídrico (VETEC);
- Ácido oléico (SIGMA-ALDRICH);
- Álcool etílico absoluto p.a (VETEC);
- Bicarbonato de sódio (MERCK);
- Biftalato de potássio (MERCK);
- Brometo de potássio (MERCK);
- Cloreto de sódio (Queel);
- DMSO deuterado (SIGMA)
- Fita adesiva Durex (3M);
- Fosfato de sódio dibásico anidro (VETEC);
- Fosfato de sódio dibásico monohidratado (VETEC);
- Hexano (VETEC);
- Hidróxido de sódio em lentilhas (VETEC);
- Polissorbato 20 (TEDIA);
- Polissorbato 80 (VETEC);
- Metanol grau HPLC (VETEC);
- Propilenoglicol (VETEC);
- Sulfato de sódio (VETEC);
- Tripsina T82T3, lote 46H0029 (SIGMA);

3.1.3. Produtos Farmacêuticos

- Prexige[®] (Lumiracoxibe), medicamento referência nacional conforme a Lei 9.787/99. Fabricados por Novartis Biociências S.A. Caixa com 4 comprimidos revestidos. Lote Z20032, data de fabricação 06/2006, data de validade 05/2008.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção do Lumiracoxibe

O fármaco (matéria-prima) foi obtido a partir da extração de comprimidos de 400 mg de LM.

O processo de extração foi iniciado pela adição de 50 mL de hexano aos comprimidos previamente triturados em gral de porcelana. A mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos para a remoção da resina presente no revestimento do comprimido e, então, filtrada com papel de filtro. O triturado foi seco no dessecador por 24 horas, posteriormente extraído em água com auxílio de um sohxlet em refluxo por 2 horas. A fração aquosa foi descartada e o resíduo sólido foi, seqüencialmente, extraído com etanol e a solução etanólica obtida foi evaporada em rotavapor a 100 rpm em banho termostatizado à $70 \pm 2^\circ\text{C}$.

O LM resultante da extração com sohxlet foi posteriormente purificado com solvente orgânico. Para isso, cada 5,0 g do fármaco foi adicionado a 400 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M. Essa mistura foi filtrada com papel de filtro. O filtrado obtido foi acidificado com ácido clorídrico (HCl) 10% até pH 4,0 e após a precipitação foram adicionados 200 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). A solução resultante foi separada em duas porções de 300 mL e cada

porção foi extraída com 100 mL de acetato de etila. Completada a extração, a fase orgânica obtida foi separada em porções de 200 mL, as quais foram extraídas duas vezes com 100 mL de NaOH 0,1 M. Toda a fase aquosa foi recolhida e precipitada com a adição de HCl 10% até pH 4,0 em banho de gelo. O precipitado foi filtrado em papel de filtro e seco por 24 horas em dessecador.

3.2.2. Caracterização do fármaco

3.2.2.1. Faixa de fusão

As amostras em triplicata foram introduzidas em capilares de vidro e levadas ao equipamento para determinação da faixa de fusão pelo método do capilar (Farmacopéia Brasileira, 1988).

3.2.2.2. Espectroscopia no infravermelho

Foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) contendo 3% (p/p) de LM, as quais foram levadas ao espectrofotômetro de infravermelho, realizando-se varredura do espectro entre 400 e 4000 cm^{-1} . As bandas observadas foram caracterizadas de acordo com os grupos funcionais que as representam.

3.2.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

O equipamento foi calibrado utilizando-se referência externa. Em seguida as amostras de LM foram dissolvidas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO_d) e levadas ao espectrômetro de RMN, realizando-se análise para medida de carbono e hidrogênio, com aplicação de frequência de 100 e 400 MHz respectivamente.

3.2.3. Metodologia analítica para quantificação do fármaco por titulação de neutralização ácido-base

O doseamento de LM matéria-prima foi realizado por titulação de neutralização ácido-base com determinação potenciométrica do ponto final com o objetivo de determinar o teor da mesma.

A solução titulante de NaOH 0,1 M foi preparada e aferida antes da titulação das amostras. A aferição foi feita com biftalato de potássio previamente dessecado por 4 horas a 105 °C para obtenção do fator de correção da solução titulante.

Foram pesadas, analiticamente, cerca de 0,15 g de LM no copo do titulador automático, onde foram dissolvidos em 40 mL de etanol p.a. As amostras foram levadas ao ultra-som por 5 minutos com agitação manual até a completa solubilização. Foram realizadas 5 determinações além da análise do branco.

3.2.4. Desenvolvimento e validação de método para quantificação de LM nos experimentos de coeficiente de partição por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.2.4.1. Estabelecimento das condições cromatográficas

A análise procedeu-se em cromatógrafo líquido Shimadzu, providos de detector ultravioleta (UV) com arranjo de diodos (FDI). A coluna propilsulfônica foi mantida à temperatura ambiente.

Testes preliminares foram realizados para que as condições cromatográficas fossem bem definidas.

3.2.4.1.1 *Fase móvel e vazão*

Foram testadas 3 fases móveis: Tampão fosfato pH 7,4:água (H₂O):Acetonitrila (ACN) (132:438:400), Tampão fosfato pH 7,4:H₂O:ACN (110:390:500), Tampão fosfato pH 7,4:H₂O:ACN (100:400:500), observando-se os tempos de retenção da substância, número de pratos teóricos e assimetria do pico, além da pressão resultante do sistema. A vazão utilizada foi de 1 mL/min.

3.2.4.1.2. *Volume de injeção e Detecção*

O volume de injeção testado foi de 25 µL, observando-se a integração do pico de LM.

Foi realizada uma varredura no cromatógrafo Shimadzu que possui o detector UV/FDI entre 200 e 320 nm, com o objetivo de verificar as características de absorção do fármaco no UV, para selecionar o comprimento de onda (λ) mais adequado além de garantir que nenhum excipiente da formulação iria interferir na absorção do fármaco.

3.2.4.2. *Validação do Método*

Para validação da metodologia analítica de quantificação de LM por CLAE, foram realizados testes que comprovassem a especificidade do método, linearidade de resposta e precisão intra e inter-dia.

A validação foi baseada no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, anexo da RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (ANVISA, 2003).

3.2.4.2.1. *Especificidade*

É capacidade que o método possui de medir exatamente o composto desejado na presença de outros compostos (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004), ou seja, a capacidade do método em quantificar o fármaco. A especificidade foi medida utilizando o teste de pureza de pico com o auxílio do detector de FDI, que tem a capacidade de demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente através da comparação dos espectros obtidos em diferentes tempos.

3.2.4.2.2. *Linearidade e precisão intra e inter-dia*

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Foram preparadas duas curvas padrão de LM com faixa de concentração de 10 a 50 µg/mL. Em dias diferentes, foram feitas 5 pesadas, cada uma correspondente a um ponto da curva de calibração. Cada ponto foi injetado 5 vezes. A linearidade do método foi determinada pela análise de regressão linear com auxílio do *software* Excel[®] (Microsoft, 2002).

Para a precisão intra e inter-dia foram preparadas soluções com 3 níveis de concentração: baixo (10 µg/mL), médio (30 µg/mL) e alto (50 µg/mL). Tal procedimento foi realizado em dois dias diferentes.

A análise de precisão foi realizada através do desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) dos valores de áreas encontrados (RIBANI *et al.*, 2004).

3.2.4.2.3. *Precisão do volume de injeção*

A precisão de injeção foi avaliada em 5 níveis de concentração: 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, com cinco réplicas cada. Foi calculado o DP e o DPR para cada ponto a partir das áreas obtidas.

3.2.4.2.4. *Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)*

A estimativa dos limites pode ser feita com base na equação da reta, aplicando-se as equações:

$$LD = (DP_a \cdot 3)/IC$$

$$LQ = (DP_a \cdot 10)/IC$$

Em que, DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas e IC é a inclinação da curva de calibração.

3.2.4.2.5. *Preparo das amostras*

Foi transferida uma quantidade equivalente a 25 mg de LM para um balão volumétrico de 25 mL ao qual era adicionado 20 mL de ACN. O balão foi levado ao banho de ultra-som por 15 minutos e, em seguida avolumado. Diluições subseqüentes foram feitas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e realizadas de modo a obter concentração final de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL.

3.2.5. Estudos de pré-formulação: caracterização dos parâmetros físico-químicos do LM

3.2.5.1. Determinação do coeficiente de partição óleo/ tampão ($K_{O/T}$)

O método utilizado foi descrito por Wells (1988). O tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e o octanol utilizados foram previamente saturados após agitação por uma noite para saturação dos mesmos. Após a separação das fases, preparou-se uma solução aquosa de LM de modo a obter a solução mãe deste fármaco na concentração de 60 µg/mL. A cada 5,0 mL da solução mãe adicionou-se igual volume de octanol. As misturas foram agitadas em erlenmeyers a 500 rpm por 30 minutos e posteriormente colocadas em funis de separação sendo mantidas em repouso por 5 minutos. A fase aquosa de cada amostra foi retirada e centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. A identificação e quantificação do LM foram realizadas na fase aquosa, sendo as concentrações determinadas por CLAE, de acordo com o método desenvolvido para quantificação do LM (item 3.2.4). Foi realizada uma curva padrão na faixa de 6,0 a 60,0 µg/mL e um controle com tampão e octanol. A concentração de lumiracoxibe na fase aquosa foi quantificada antes (C_1) e depois da partição (C_2) e o $K_{O/T}$ foi determinado segundo a equação:

$$K_{O/T} = \frac{C_1 - C_2}{C_2}$$

3.2.5.2. Determinação do coeficiente de partição pele/tampão ($K_{P/T}$)

Esta metodologia é baseada no método proposto por Scheupelin e colaboradores (1969). Amostras de 200 mg de pele de porco foram cortadas e transferidas para tubos de extração contendo 6 mL da solução aquosa tamponada

do LM (60 µg/mL). As misturas de pele com solução aquosa do fármaco foram agitadas em vortex e posteriormente filtradas. A concentração do fármaco não partilhado na pele foi determinada por CLAE, de acordo com o método descrito no item 3.2.4. Foi realizada uma curva padrão na faixa de 6,0 a 60,0 µg/mL. O $K_{P/T}$ foi determinado através da fórmula descrita anteriormente. Um controle contendo apenas pele e água também foi testado.

3.2.5.3. Determinação do coeficiente de partição estrato córneo/ tampão ($K_{EC/T}$).

Primeiramente, foram obtidas as amostras EC da seguinte maneira: peles de orelha de porco foram dissecadas, e a parte inferior das mesmas, referente ao tecido subcutâneo, foi digerida por 14 horas com solução de tripsina 0,1% (p/v) e bicarbonato de sódio 0,5% (p/v) em água. As membranas de EC assim obtidas foram lavadas com água destilada para remover a tripsina e o tecido digerido e em seguida, armazenadas em dessecador. Amostras de 50 mg de EC foram cortadas e transferidas para tubos de extração contendo 5 mL das soluções aquosas tamponadas de LM, agitadas em vortex e filtradas. A identificação e a quantificação do fármaco na fase aquosa foram determinadas por CLAE, de acordo com o método descrito no item 3.2.4. Foi realizada uma curva padrão na faixa de 6,0 a 60,0 µg/mL. A concentração do fármaco na fase aquosa de cada amostra foi quantificada antes (C_1) e depois da partição (C_2) determinando-se, então, o $K_{EC/T}$ segundo a equação já descrita anteriormente.

3.2.6. Caracterização física do gel

3.2.6.1. Preparo do gel

O gel de poloxamer foi preparado de acordo com o método a frio descrito por Schmolka (1972). Uma quantidade suficiente do polaxomer para produzir um gel a 20, 25 e 30% (p/v) foi adicionada à água fria (5 °C) mantendo-se agitação constante e mantendo a dispersão refrigerada até a obtenção de uma solução clara. O fármaco (1% p/p) e o AO (1, 2,5, 5 e 10% p/p) foram dispersos em propilenoglicol (PG) (20% p/p) e então adicionados à solução fria de cada concentração do polímero. As formulações foram denominadas de acordo com a Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Formulações testadas e suas respectivas concentrações de AO e LM (% p/p)

Poloxamer (p/p)	Lumiracoxibe (p/p)	AO (p/p)	Nome (p/p)
20%	1%	1%	PF 20% + AO 1%
		2,5%	PF 20% + AO 2,5%
		5%	PF 20% + AO 5%
		10%	PF 20% + AO 10%
25%	1%	1%	PF 25% + AO 1%
		2,5%	PF 25% + AO 2,5%
		5%	PF 25% + AO 5%
		10%	PF 25% + AO 10%
30%	1%	1%	PF 30% + AO 1%
		2,5%	PF 30% + AO 2,5%
		5%	PF 30% + AO 5%
		10%	PF 30% + AO 10%
20%	1%	---	Controle PF 20%
25%		---	Controle PF 25%
30%		---	Controle PF 30%
20%	---	---	PF 20%
25%	---	---	PF 25%
30%	---	---	PF 30%

Além das formulações acima foi desenvolvido um controle de LM 1% (p/p) em propilenoglicol (PG) denominado Controle PG.

3.2.6.2. Estudos das propriedades reológicas

O estudo das propriedades reológicas foi realizado para a determinação da viscosidade do gel de PF-127 contendo AO em diferentes concentrações, de modo a determinar a influência do AO e da concentração do polímero na viscosidade do gel.

Foi utilizado o reômetro Rheometric Scientific SR5 de placa paralela com um espaçamento de 0,5 mm a 25 °C, variando a taxa de cisalhamento de 0 a 1000 rad/s. Colocou-se sobre a placa uma quantidade suficiente de gel a fim de cobrir toda a superfície da placa formando um filme.

3.2.6.3. Determinação da tensão de trabalho

Foi utilizado o reômetro HAAKE Rheostress 600 com sensor cone-placa de 20 mm de diâmetro e 1° de angulatura. Um banho termostaticado foi acoplado ao sensor com o objetivo de manter as amostras à 37 °C durante a realização da análise. O sensor foi coberto com uma tampa de acrílico a fim de evitar a evaporação das amostras. Estas foram previamente expostas a 37 °C, e em seguida, quantidade suficiente da amostra foi transferida, com auxílio de espátula, para o sensor. A análise, então, foi iniciada fixando uma frequência constante, 1 Hz, e submetendo as amostras ao estresse na faixa de 5 a 1200 Pa.

Em experimentos que utilizam o modo oscilatório, a resposta do gel ao estresse variando o cisalhamento de forma sinusoidal é medida como uma função

do tempo. A tensão de cisalhamento, o estresse e o ângulo da fase são determinados durante o ensaio: os parâmetros obtidos são o módulo complexo G^* , e o ângulo da fase δ . O módulo elástico (G'), o módulo viscoso (G'') e a viscosidade dinâmica (η') são calculados da seguinte maneira:

$$G' = G^* \cos(\delta)$$

$$G'' = G^* \sin(\delta)$$

$$\eta' = G'' \omega$$

onde ω é a frequência angular.

Para medir as propriedades viscoelásticas de um gel é necessário determinar sua região viscoelástica, pois dessa forma a estrutura interna do material é preservada durante a deformação. Essa região é determinada através das medidas de G' e G'' em função da tensão, onde G' e G'' são constantes.

A determinação das propriedades viscoelásticas foi realizada para os géis PF 20%, PF 25% e PF 30%.

3.2.6.4 Determinação da temperatura de gelificação

A temperatura de gelificação pode ser definida como a temperatura em que o material em solução se transforma em um gel. A temperatura de transição sol-gel foi determinada utilizando reômetro HAAKE Rheostress 600 com sensor cone-placa de 20 mm de diâmetro e 1° de angulatura. Um controlador de temperatura Thermocontroller HAAKE UTC foi acoplado ao sensor com o objetivo de promover a

variação da temperatura de 4 a 40 °C durante a realização da análise. O sensor foi coberto com uma tampa de acrílico a fim de evitar a evaporação das amostras.

As amostras foram previamente expostas à 4 °C. Em seguida, foi transferida quantidade suficiente da amostra para o sensor. A análise, então, foi iniciada fixando a frequência em 1 Hz, a tensão em 10 Pa, determinada previamente no item 3.2.6.3, e submetendo as amostras à variação de temperatura numa taxa de 2 °C/min.

Um gel é definido como uma preparação onde G' e G'' são independentes da frequência e o ângulo da fase δ é baixo em qualquer frequência ($\tan \delta = G'/G''$). Ao contrário, as soluções exibem G' e G'' dependentes da frequência e δ variando amplamente com a frequência (RICCI *et al.*, 2002).

O gráfico da temperatura de transição sol-gel foi elaborado colocando a temperatura em função do módulo elástico G' . A temperatura de transição sol-gel foi definida como o ponto onde o módulo elástico era metade do caminho entre G' para a solução e G' para o gel (EDSMAN *et al.*, 1998).

A temperatura de transição sol-gel foi medida para todas as formulações.

3.2.7. Escolha da solução receptora para os estudos *in vitro*

Segundo recomendação do FDA (U.S. FDA/CDER, 1997), misturas tamponadas com adição de tensoativos até 5 % (p/v) podem ser utilizadas como meio receptor em estudos de liberação e penetração *in vitro*, quando o fármaco tem baixa hidrofiliabilidade, como o LM.

A solubilidade do LM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 na presença de diferentes concentrações de polissorbato (PS) foi determinada com o objetivo de verificar se essas soluções obedeciam à condição *sink*, ou seja, não favoreceriam

proximidade a saturação para essa massa de fármaco. A solução receptora (SR) selecionada foi utilizada tanto nos estudos de liberação quanto nos estudos de permeação *in vitro*.

3.2.7.1. Determinação da solubilidade do LM em diferentes soluções receptoras (SR)

Para cada tubo de ensaio contendo, aproximadamente, 10 mg de LM, foram adicionados 5 mL da SR a ser avaliada, garantindo dessa forma, um excesso de LM no sistema. As soluções receptoras testadas foram: tampão fosfato 0,1M pH 7,4 + polissorbato 20 e 80 em diferentes concentrações.

Os tubos foram levados a um banho-maria a 37 °C, sob agitação magnética constante de 500 rpm. Após um período de 24 horas, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, numa velocidade de 1500 rpm e, imediatamente, o sobrenadante foi filtrado através de membrana de poro de 0,45 µm. A solução resultante da filtração foi analisada quantitativamente por UV com uma varredura na faixa de 200 a 400 nm, utilizando a SR sem o fármaco para ajuste do zero.

3.2.7.2. Determinação da concentração do LM

Para cada SR testada, preparou-se uma curva padrão para a quantificação do LM solubilizado. As concentrações definidas foram escolhidas de forma a englobar pontos de baixa, média e alta solubilidade do LM na solução em teste.

Para a obtenção desses pontos, pesou-se, aproximadamente, cerca de, 25 mg de LM padrão de trabalho, transferidos para balão volumétrico de 100 mL contendo ACN p.a.. A partir dessa solução estoque (SE), alíquota de 1 mL foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e alíquotas de 3 mL foram transferidas

para balões volumétricos de 50 e 25 mL contendo a SR. Dessa forma, foram obtidas as concentrações de 5, 15 e 30 µg/mL do fármaco em cada meio testado, respectivamente.

Com os valores de absorvância obtidos de cada amostra e a equação da reta, obtida pela curva padrão (item 3.2.7.1.) de cada meio, foram calculadas as concentrações em µg/mL de LM, fornecendo, assim, a concentração de saturação do fármaco nestes meios, nas condições empregadas.

3.2.8. Desenvolvimento e validação de método para quantificação de LM na solução receptora (SR)

3.2.8.1. Estabelecimento das condições cromatográficas

Após pesquisa na literatura, algumas condições analíticas para determinação do LM por CLAE com detecção no UV foram selecionadas e testadas em nosso laboratório. Também foram averiguadas condições empregadas para análise de outros fármacos da mesma categoria que apresentam grande semelhança estrutural em relação ao LM. Para escolha da melhor fase móvel (FM), o tempo de retenção, simetria e largura da base do sinal cromatográfico foram avaliados.

A análise procedeu-se em cromatógrafo Shimadzu provido de detector FDI. A coluna empacotada com sílica (5 µm) quimicamente ligada ao grupo octilsilano (C₈) de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno foi mantida à temperatura ambiente.

3.2.8.1.1. Fase móvel e vazão

Foram testadas 3 fases móveis: ACN e tampão fosfato 0,01M (80:20) pH 2,5, ACN e tampão fosfato 0,01 M pH 2,5 (50:50) e ACN e tampão fosfato 0,01 M pH

2,5 (30:70). Foram observados os tempos de retenção da substância, número de pratos teóricos e assimetria do pico, além da pressão resultante do sistema. A vazão utilizada foi de 1 mL/min.

3.2.8.1.2. *Volume de injeção e Detecção*

O volume de injeção testado foi de 50 μ L, observando-se a integração do pico de LM. Foi realizada uma varredura no cromatógrafo Shimadzu que possui o detector UV/FDI entre 200 e 320 nm, com o objetivo de verificar as características de absorção do fármaco no UV, para selecionar o comprimento de onda (λ) mais adequado, além de garantir que nenhum excipiente da formulação iria interferir na absorção do fármaco. O diluente das amostras foi a própria SR.

3.2.8.2. Validação do Método

A validação foi baseada no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, anexo da RE n^o 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (ANVISA, 2003).

3.2.8.2.1. *Especificidade*

A especificidade comprova a capacidade do método em quantificar o fármaco. Esta foi medida utilizando o teste de pureza de pico com o auxílio do detector de FDI, o qual pode provar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

3.2.8.2.2. Linearidade e precisão inter-dia

Para linearidade, foram preparadas duas curvas padrão de LM com faixa de concentração de 4 a 200 µg/mL. Em dias diferentes, foram feitas 5 pesadas, cada uma correspondente a um ponto da curva de calibração. Cada ponto foi injetado 5 vezes. A linearidade do método foi determinada pela análise de regressão linear com auxílio do *software* Excel[®] (Microsoft, 2002).

A análise de precisão foi feita através do DP e DPR dos valores de área encontrados.

3.2.8.2.3. Precisão do volume de injeção

A precisão de injeção foi avaliada em 5 níveis de concentração: 4, 40, 100, 140 e 200 µg/mL, com cinco réplicas cada. Foi calculado o DP e o DPR para cada ponto a partir das áreas obtidas.

3.2.8.2.4. Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

A estimativa dos limites pode ser feita com base na equação da reta, aplicando-se as equações:

$$LD = (DP_a \cdot 3)/IC$$

$$LQ = (DP_a \cdot 10)/IC$$

Em que, DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas e IC é a inclinação da curva de calibração.

3.2.8.2.5. *Preparo das amostras*

Foi transferida uma quantidade equivalente a 20 mg de LM para um balão volumétrico de 100 mL ao qual era adicionado cerca de 80 mL de meio. O balão foi levado ao banho com ultra-som por 15 minutos e, em seguida avolumado. Diluições subseqüentes foram realizadas de modo a obter concentração final de 4, 40, 100, 140 e 200 µg/mL.

3.2.9. Estudos de liberação *in vitro* através de membrana sintética

3.2.9.1. Preparo da membrana sintética de acetato de celulose

Segmentos de aproximadamente 5 cm da membrana de acetato de celulose (membrana de diálise) foram cortados e, subseqüentemente, lavados em água corrente e fervidas em cerca de 50 mL de água destilada por 5 minutos. O procedimento foi repetido por três vezes com novo volume de água destilada (BENTLEY, 2002).

3.2.9.2. Montagem da célula de difusão modificada

Foi montado um sistema adaptado de células de difusão modificada utilizando os recursos de um dissolutor para sólidos orais. O sistema foi constituído de um banho de água termostatizado a 37 °C em recipiente de vidro sobre uma placa de agitação de 6 pontos. Neste banho ficavam contidos 6 béqueres de 250 mL cada. O compartimento doador, feito de material inoxidável, com orifício de diâmetro interno de 12 mm, foi preso à haste para o aparato 1 (cestas) do dissolutor. A área de exposição das membranas foi de, aproximadamente, 1,13 cm². A membrana, recentemente preparada (item 3.2.9.1.), foi presa ao compartimento doador com um

anel de teflon (Figura 3.1), e foi colocada em contato com a solução receptora, tangenciando-a. O orifício do compartimento doador foi totalmente preenchido com, aproximadamente, 200 mg de formulação (Figura 3.1). Os béqueres foram cobertos com tampa de acrílico, a fim de evitar a evaporação do meio, que continha um orifício que permitia a passagem da cânula de amostragem.

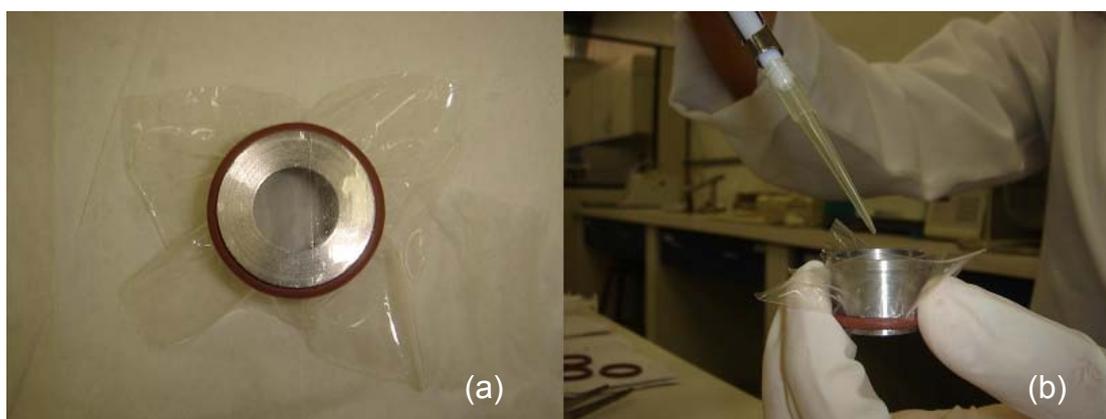


Figura 3.1 – (a) Compartimento doador com membrana de acetato de celulose e (b) aplicação da amostra no compartimento doador.

As células de difusão foram montadas conforme a Figura 3.2. O compartimento receptor foi preenchido com 100 mL de SR (Tampão fosfato 0,1M pH 7,4 + Polissorbato 20 3,0%) e mantido sob agitação (500 rpm) por meio de uma pequena barra magnética.

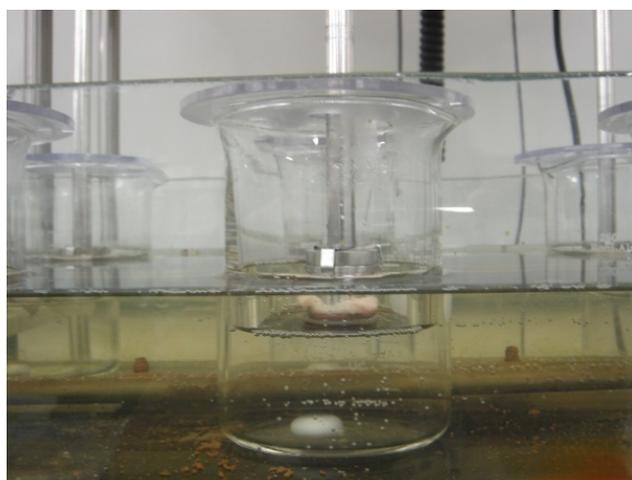


Figura 3.2 – Célula de difusão adaptada.

3.2.9.3. Coleta da amostra

A retirada de amostra foi realizada com auxílio de uma seringa (Figura 3.3) coletando 1 mL de SR através do orifício contido na tampa de acrílico e repostado, imediatamente, 1 mL de SR. Dessa forma, o volume da SR foi mantido constante durante todo o ensaio e a membrana foi mantida tangenciando a SR. Amostras foram retiradas após 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas da aplicação da formulação e submetidas à análise por CLAE, de acordo com as condições estabelecidas (item 3.2.8).

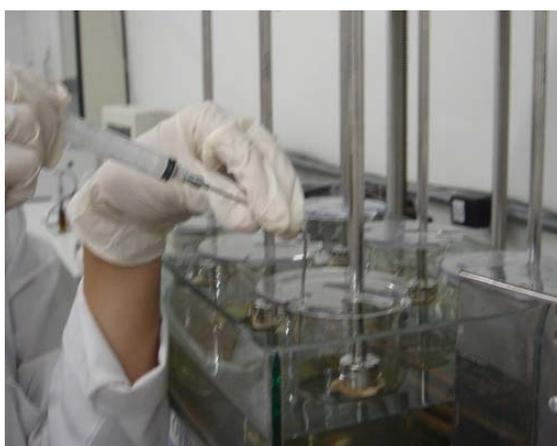


Figura 3.3 – Retirada da amostra

A massa de LM acumulada no compartimento receptor, em cada tempo, foi calculada, considerando o volume total do béquer, a quantidade de fármaco retirada nas coletas de amostras anteriores e a área efetiva para a liberação na célula, conforme a equação abaixo:

$$Q_{\text{real}, t} = (C_{\text{mensurada}, t} \times V_r) + (V_a \times \sum^{n-1} C_a)$$

Onde, Q = quantidade permeada acumulada;

Q_{real} = valor real no tempo t ;

$C_{\text{mensurada}}$, t = concentração da coleta medida no tempo t ;

V_r = volume da célula de difusão;

V_a = volume de amostra removido;

C_a = concentração da amostra removida.

Inicialmente, a quantidade de fármaco liberado foi dividida pela área de exposição da membrana e esses valores foram plotados em função do tempo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) para visualização do perfil de permeação do fármaco. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística empregando-se análise de variância (ANOVA com um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do *software* GraphPad prisma.

3.2.10. Estudos *in vitro* de permeação e retenção cutânea através de pele animal

3.2.10.1. Obtenção e limpeza de pele suína

Orelhas retiradas de suínos de até 6 meses de idade foram obtidas em matadouro devidamente fiscalizado pelo Ministério da Agricultura, localizado no município do Rio de Janeiro. Logo após sua obtenção, as orelhas foram lavadas em água corrente. A pele da parte externa da orelha foi cuidadosamente descolada com bisturi e o excesso de gordura sub-cutânea foi retirado com auxílio de tesoura e

pinça. As peles foram cortadas em pedaços de acordo com o teste a ser realizado, embaladas em filme de polietileno e papel alumínio e os segmentos foram armazenados em freezer (-20 °C) por no máximo 60 dias (Figura 3.4) (MEYER, *et al.*,2007).



Figura 3.4 - Limpeza de orelha suína. (a) Orelha suína. (b) Retirada da pele. (c) Retirada do tecido sub-cutâneo. (d) Segmento de pele limpo.

3.2.10.2. Estudos de permeação cutânea

Nos experimentos para avaliação cutânea de formulações contendo LM as células de difusão modificada foram montadas da mesma forma que no estudo de liberação *in vitro*, descrito no item 3.2.9.2. Após descongelamento, segmentos de pele foram presos ao compartimento doador da mesma forma que a membrana de acetato de celulose e com EC voltado para cima e a derme em contato com a SR evitando-se sempre a formação de bolhas.

3.2.10.3. Coleta da amostra

A retirada da amostra foi feita conforme descrito no item 3.2.9.3. Amostras foram retiradas após 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas da aplicação da formulação e submetidas à análise por CLAE, de acordo com as condições estabelecidas no item 3.2.8.

A massa de LM acumulada no compartimento receptor, em cada tempo, foi calculada, de acordo com o item 3.2.9.3.

Inicialmente, a quantidade de fármaco liberado foi dividida pela área de exposição da membrana e esses valores foram plotados em função do tempo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) para visualização do perfil de permeação do fármaco. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística empregando-se análise de variância (ANOVA com um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do *software* GraphPad prisma.

3.2.10.4. Estudos *in vitro* de retenção do fármaco no estrato córneo suíno (*tape stripping*)

Após o experimento na célula de difusão modificada, as peles foram retiradas, gentilmente lavadas com água destilada para retirar o excesso da formulação e levemente pressionadas com papel absorvente para retirar o excesso de água.

A área de pele exposta à difusão foi submetida à retirada do EC utilizando-se 10 pedaços de fita adesiva ($n= 10$). Os pedaços de fitas foram transferidos para

tubo Falcon e a extração do fármaco foi realizada pela adição de 10 mL de ACN p.a com subsequente agitação em vortex por 3 minutos.

Paralelamente, foi realizada uma curva-padrão no mesmo solvente para a quantificação do LM presente. Para a obtenção dos pontos da curva, pesou-se, aproximadamente, cerca de 20 mg de LM padrão de trabalho, transferidos para balão volumétrico de 100 mL contendo ACN p.a.. Diluições subsequentes no mesmo solvente foram realizadas de modo a obter concentração final de 4, 100, e 200 µg/mL.

As amostras e as soluções padrão foram submetidas à análise por CLAE, conforme descrito em 3.2.8. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade do fármaco retido no EC por área de exposição. Foi realizada a análise estatística empregando-se análise de variância (ANOVA com um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do *software* GraphPad prisma.

3.2.10.5. Estudos *in vitro* de penetração e retenção do fármaco na [derme + epiderme] suína

Após a retirada do EC, como descrito em 3.2.10.4, à área da pele restante foi recortada, picada, os fragmentos obtidos foram transferidos para tubo Falcon e foi adicionado 5 mL de ACN. Em seguida, foi feita a trituração do tecido em homogeneizador tipo Turrax por 1 minuto. Posteriormente, o tubo contendo os fragmentos de pele triturados foi submetido à sonicação em banho de ultra-som por 30 minutos a fim de promover o rompimento das células e liberação do fármaco.

A suspensão assim obtida foi filtrada em papel de filtro. Uma alíquota deste filtrado foi submetida à filtração em unidade filtrante (0,45 µm) e à quantificação por CLAE conforme descrito em 3.2.8.

Os resultados obtidos expressam a quantidade de fármaco retido na [epiderme + derme] por área de exposição. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística empregando-se análise de variância (ANOVA com um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do *software* GraphPad prisma.

3.2.11. Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação de LM no EC e [epiderme + derme] suína.

3.2.11.1. Estrato córneo

Com objetivo de comprovar a eficácia do método de extração e quantificação do fármaco no EC a partir da técnica de *tape stripping*, adicionou-se 20 μ L de diferentes soluções padrão de LM em ACN diretamente sobre um segmento de fita, de modo a obter 3 níveis de quantidade de LM (10, 20 e 30 μ g). Após 2 horas de contato para impregnação do fármaco na fita, a mesma foi submetida à secagem com auxílio de nitrogênio e procedeu-se conforme descrito em 3.2.10.4

Paralelamente, soluções contaminadas foram preparadas por adição de 20 μ L das diferentes soluções de LM (resultando nos mesmos 3 níveis de quantidade de LM) ao volume de ACN necessário para completar 10 mL. As soluções contaminadas foram analisadas por CLAE da mesma forma que as amostras. A recuperação foi investigada pela comparação da área obtida na solução contaminada (100%) e a área observada na amostra, sendo o resultado expresso em porcentagem de LM recuperada.

3.2.11.2 Epiderme + derme

Com objetivo de comprovar a eficácia do método de extração e quantificação do fármaco na [epiderme + derme] suína, separou-se os segmentos de

pele e procedeu-se a retirada do EC utilizando 10 pedaços de fita adesiva (n= 10). No segmento de [epiderme+derme] restante adicionou-se 50 µL de diferentes soluções padrão de LM em ACN p.a. diretamente sobre cada segmento de pele, de modo a obter 3 níveis de quantidade de LM (10, 100 e 200 µg). Após 2 horas de contato para penetração/impregnação do fármaco no tecido, a pele foi submetida à secagem com auxílio de nitrogênio e procedeu-se conforme descrito em 3.2.10.5.

Paralelamente, soluções contaminadas foram preparadas por adição de 50 µL das diferentes soluções de LM (resultando nos mesmos 3 níveis de quantidade de LM) ao volume de ACN necessário para completar 5 mL. As soluções contaminadas foram analisadas por CLAE da mesma forma que as amostras. A recuperação foi investigada pela comparação da área obtida na solução contaminada (100%) e a área observada na amostra, sendo o resultado expresso em porcentagem de LM recuperada.

3.2.12. Estudos de toxicidade dérmica

Os riscos a serem avaliados para produtos transdérmicos são do tipo irritativo, alergênico e sistêmico, este último relacionado à sua absorção oral ou permeação através da pele.

Os testes de toxicidade dérmica primária e dérmica cumulativa são indicados quando a formulação contendo o componente a ser testado é destinada ao uso regular, sem enxágüe. Neste trabalho, os testes foram utilizados para verificar a toxicidade da formulação PF 25% + AO 10%. Foram utilizados três coelhos diferentes para cada tipo de teste.

3.2.12.1. Toxicidade dérmica primária

Para a realização deste ensaio, depilou-se de véspera o dorso de um coelho albino de aproximadamente 1,5 kg. Dividiu-se o dorso depilado por uma linha imaginária em quatro quadrantes. Duas áreas de aproximadamente dois centímetros no quadrante direito foram superficialmente rasuradas com auxílio de uma agulha estéril, e as duas áreas no quadrante esquerdo permaneceram intactas. Aplicou-se uma única alíquota da formulação em teste, recentemente formulada, em cada uma das quatro áreas determinadas. As áreas foram cobertas com gaze estéril e fita crepe formando uma oclusão e evitando-se a retirada acidental do produto pelos coelhos. Observou-se as áreas para a verificação de uma possível formação de eritema ou edema após 4 horas de oclusão. Retirou-se o produto do dorso do coelho com auxílio de gaze e água corrente e observou-se após 24 horas da aplicação e nos 7 dias consecutivos.

3.2.12.2. Toxicidade dérmica cumulativa

Os coelhos foram preparados da mesma forma que para o teste de irritação primária (item 3.2.12.1). Aplicou-se uma única alíquota da formulação em teste, recentemente formulada, em cada uma das quatro áreas determinadas. As áreas foram cobertas com gaze estéril e fita crepe para evitar a retirada do produto pelos coelhos. Observou-se as áreas após 24 horas de oclusão para a verificação da ocorrência de eritema ou edema. Após este período, retirou-se o produto do dorso do coelho com auxílio de gaze e água corrente. Reaplicou-se o produto seguindo-se o mesmo procedimento e observação da integridade da pele por 5 dias consecutivos. Observou-se novamente a integridade da pele após 24 e 72 horas da última aplicação.

3. RESULTADOS

4.1. OBTENÇÃO DO LUMIRACOXIBE

A técnica de extração utilizada mostrou-se eficaz para obtenção do fármaco. Após a purificação com solvente orgânico, o rendimento final foi de 57,72% em massa. O fármaco obtido tinha aspecto levemente amarelado e foi caracterizado quanto ao grau de pureza para sua utilização como padrão de trabalho.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

4.2.1. Faixa de fusão

Foram pesadas 3 amostras para a determinação da faixa de fusão do fármaco extraído. Todas as amostras de LM fundiram-se em faixas de temperatura em torno de 156 °C (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 -Faixa de fusão de LM extraído em sohxlet após purificação com solvente orgânico (n = 3).

Amostra	Faixa de fusão
1	154,1 – 156,5 °C
2	155,0 – 156,8 °C
3	154,8 – 156,5 °C

* Lumiracoxibe – Faixa de Fusão 157 – 159 °C (NOVARTIS WO 99/11605)

4.2.2. Espectroscopia do infravermelho

O espectro de infravermelho da amostra de LM em KBr está representado na Figura 4.1

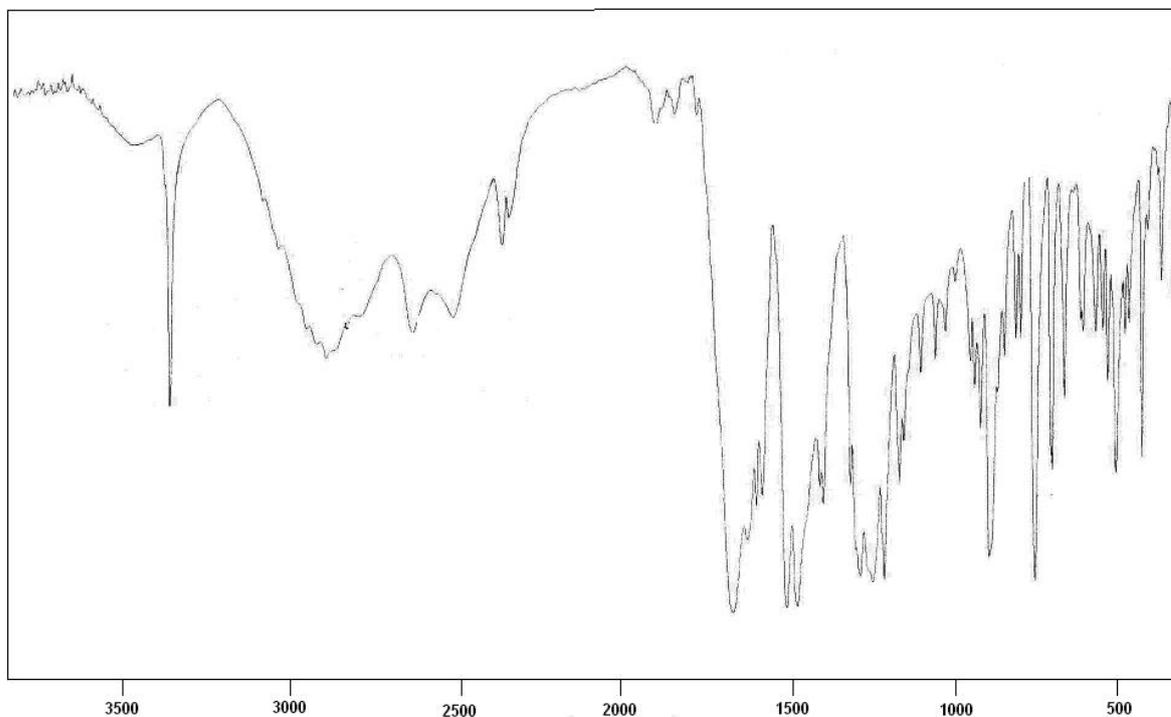


Figura 4.1 – Espectro de infravermelho de LM extraído em sohxlet após purificação com solvente orgânico em KBr.

O espectro abaixo revela uma banda de estiramento característica da ligação carbonila de ácido (C=O) em torno de 1600 cm^{-1} e uma banda harmônica de aromático entre 1800 e 2000 cm^{-1} que confirma a presença dos anéis aromáticos na molécula. Pode-se observar uma banda de estiramento O–H larga devido à associação inter e intramoleculares como consequência de deformação de ligações hidrogênio na região entre 3300 e 3500 cm^{-1} . Em torno de 3400 cm^{-1} está representada uma banda fina de deformação da ligação N-H demonstrando a presença de amina secundária. Ainda, há uma banda de estiramento da ligação C-N de aminas aromáticas entre 1400 e 1500 cm^{-1} . Por fim, pode-se observar bandas

referentes ao estiramento das ligações C-F e C-Cl entre 1000 e 1300cm^{-1} e entre 500 e 700cm^{-1} , respectivamente.

4.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de hidrogênio (Figura 4.2) e de carbono (Figura 4.3) estão representados abaixo, respectivamente.

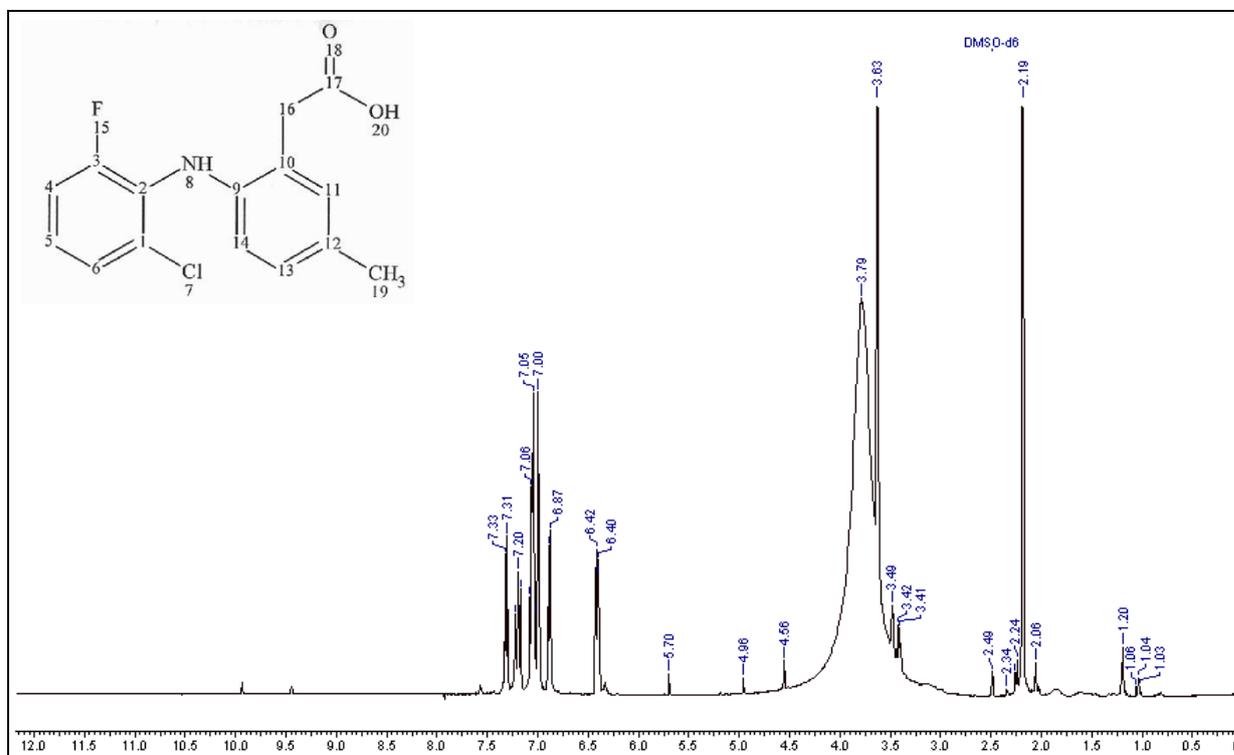


Figura 4.2 - Espectro de ^1H de RMN de lumiracoxibe extraído em sohxlet após a purificação com solvente orgânico.

O espectro de RMN de hidrogênio da amostra de LM em DMSO- d_6 mostra a presença de um sinal simples com deslocamento próximo a 2,2 ppm com integração de 3,48 que é atribuído aos hidrogênios da metila 19. Outro sinal simples, observado a 3,6 ppm com integração de 3,99, foi atribuído aos hidrogênios α -carbonila. O sinal observado a 3,8 ppm está relacionado com a presença de água no solvente (DMSO-

d6). O sinal duplo presente entre 6,35 e 6,45 ppm, com integração 1,00, corresponde ao hidrogênio da posição 14. O sinal dubleto observado entre 6,85 e 6,90 ppm com integração 1,14 representa o hidrogênio da posição 5. Na região de 7,00 ppm com integração 1,15 está presente um sinal simples que corresponde ao hidrogênio da amina na posição 8. Ainda entre 7,00 e 7,10 ppm pode ser observado uma sobreposição de dois sinais duplos com integração 1,15 e 2,17 que podem ser atribuídos aos hidrogênios 13 e 11 respectivamente. Entre 7,15 e 7,25 ppm está presente um sinal triplo, com integração 1,11, atribuído ao hidrogênio da posição 5. E, por fim, o sinal duplo entre 7,30 e 7,35 ppm com integração 0,93 indica a presença do hidrogênio 6.

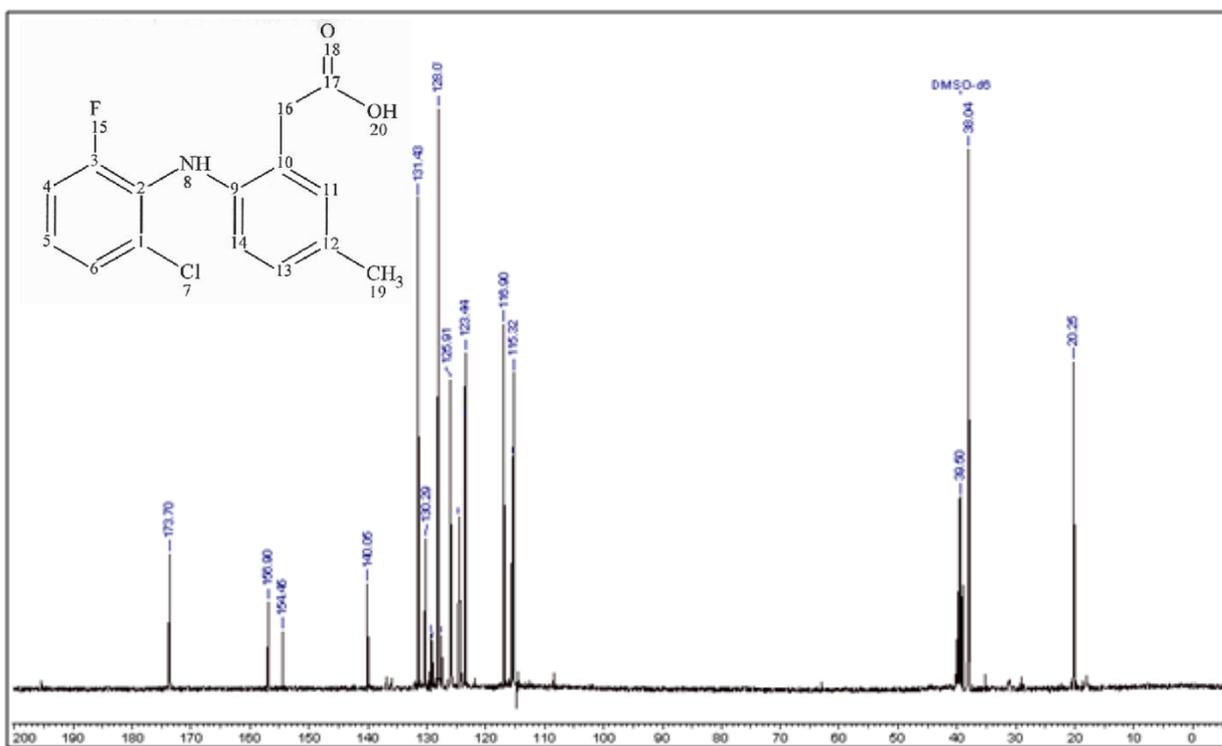


Figura 4.3 - Espectro de ^{13}C de RMN de lumiracoxibe extraído em sohxlet após a purificação com solvente orgânico.

O espectro de RMN de carbono da amostra de lumiracoxibe em DMSO-d6 mostra a presença de um sinal com deslocamento próximo a 20 ppm que representa

o carbono da posição 19. Outros sinais, observados a 38,0 e 39,5 ppm foram atribuídos ao solvente (DMSO-d6) e ao carbono 16, respectivamente. Por sua vez, o sinal presente em 116,9 ppm corresponde ao carbono da posição 14. O sinal observado em 123,4 ppm representa o carbono da posição 5. Na região de 125,9 ppm está presente um pico que corresponde carbono da posição 6. Ainda em 128,0 e 131,4 ppm foram observado dois picos que podem ser atribuídos aos carbonos 13 e 11, respectivamente. Em 140,0, 154,4, 156,9 ppm estão presentes picos que representam o carbono 3. E, por fim, o pico em 173,7 ppm indica a presença do carbono 17.

4.2.4. Metodologia analítica para quantificação do fármaco por titulação de neutralização ácido-base

O resultado do doseamento de LM por titulação de neutralização ácido-base encontra-se apresentado na Tabela 4.2. O cálculo utilizado para determinação do teor de LM foi realizado com base em 5 determinações e ensaio em branco em triplicata.

Tabela 4.2 - Análise quantitativa (doseamento) de LM extraído em sohxlet após a purificação com solvente orgânico por titulação de neutralização ácido-base.

Teor (%)	Média ± DP	DPR
97,89		
97,76		
97,92	97,89 ± 0,07	0,08%
97,96		
97,92		

4.3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LM NO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

4.3.1. Fase móvel e vazão

As fases móveis testadas na coluna propil-sulfônica estão descritas na Tabela 4.3, assim como o resultado obtido com cada uma delas.

Tabela 4.3 - Fases móveis testadas para quantificação de LM no coeficiente de partição por CLAE.

FM	Composição	Tempo de retenção	Observação
1	Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 :H ₂ O:ACN (132:438:400)	3,1	Base alargada e cauda
2	Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 :H ₂ O:ACN (110:390:500)	2,7	Base alargada
3	Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 :H ₂ O:ACN (100:400:500)	2,6	Base estreita

A FM selecionada foi tampão fosfato 0,1 M pH 7,4:H₂O:ACN (100:400:500), pois permitiu uma boa seletividade com um tempo de retenção adequado aos propósitos do presente trabalho, como mostra a figura a seguir:

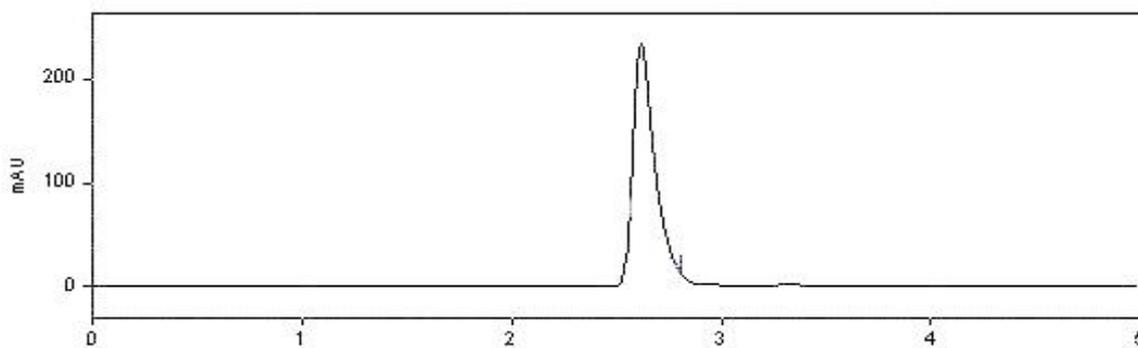


Figura 4.4 - Cromatograma obtido para LM empregando as seguintes condições: fase móvel tampão fosfato 0,1 M pH 7,4: H₂O: ACN (100:400:500), fluxo 1,0 mL/min, coluna ligada a ácido propilsulfônico (25 cm) e concentração da amostra a 30 µg/mL.

O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, o que resultou num tempo de retenção de cerca de 2,6 minutos e uma pressão no sistema controlada de cerca de 1500 psi.

4.3.2. Detecção

De acordo com o espectro de absorção no UV, realizado no cromatógrafo provido com detector UV-FDI (Figura 4.5), selecionou-se o comprimento de onda de 278 nm para a obtenção dos cromatogramas.

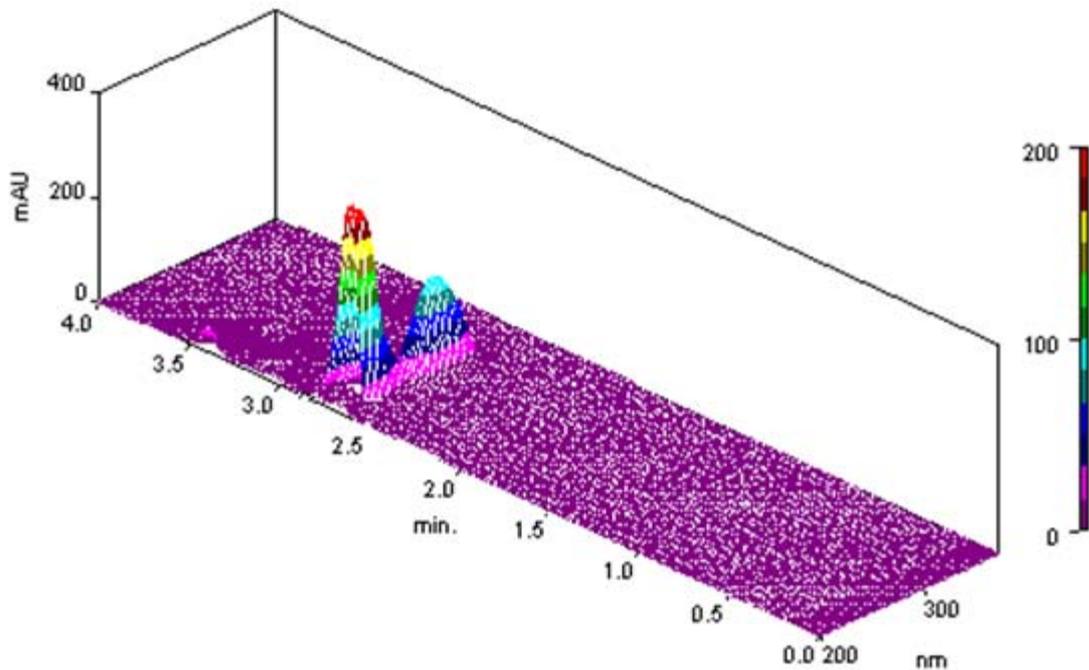


Figura 4.5 -. Cromatograma tridimensional obtido através do detector UV-FDI para uma amostra de LM na concentração de 30 µg/mL.

4.3.3. Especificidade

Por se tratar de um método cromatográfico, a especificidade foi comprovada com auxílio do *software* Class VP do detector de arranjo de fotodiodos do cromatógrafo Shimadzu, que permitiu fazer a análise de pureza de pico de lumiracoxibe por duas maneiras. A primeira foi por similaridade do pico, ou seja, analisou-se o começo, o meio e o fim do pico avaliando o espectro de absorção no UV em cada tempo, o resultado está apresentado na Figura 4.6. A segunda avaliação da pureza cromatográfica foi feita pela construção de “*radiograms*”, onde é plotado a razão entre as absorbâncias (que deve ser próximo a zero) em dois comprimentos de onda em função do tempo de corrida. Este tipo de gráfico deve ter a forma retangular mostrando que a razão é uma constante e evidenciando assim a pureza do pico (SNYDER *et al.*, 1997) como apresentado na Figura 4.7.

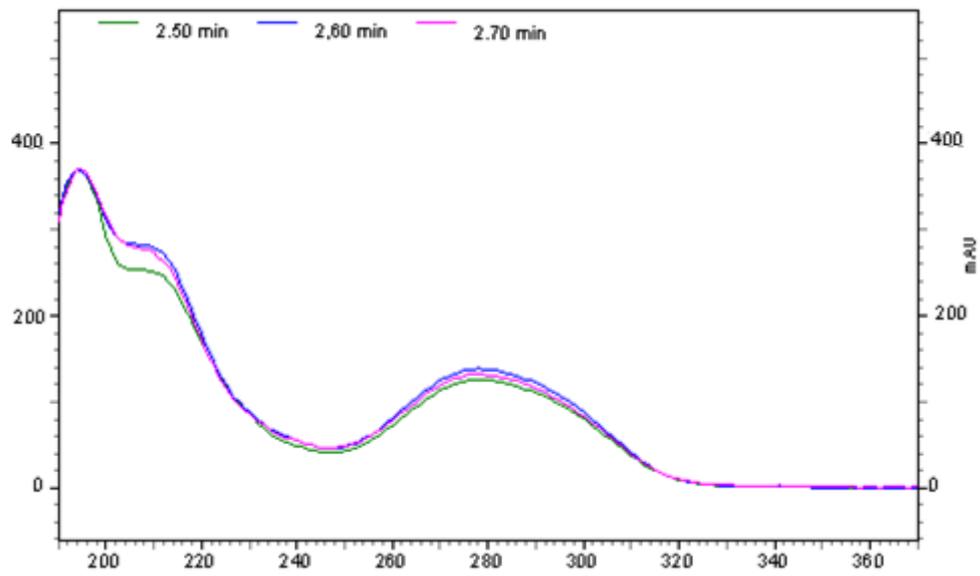
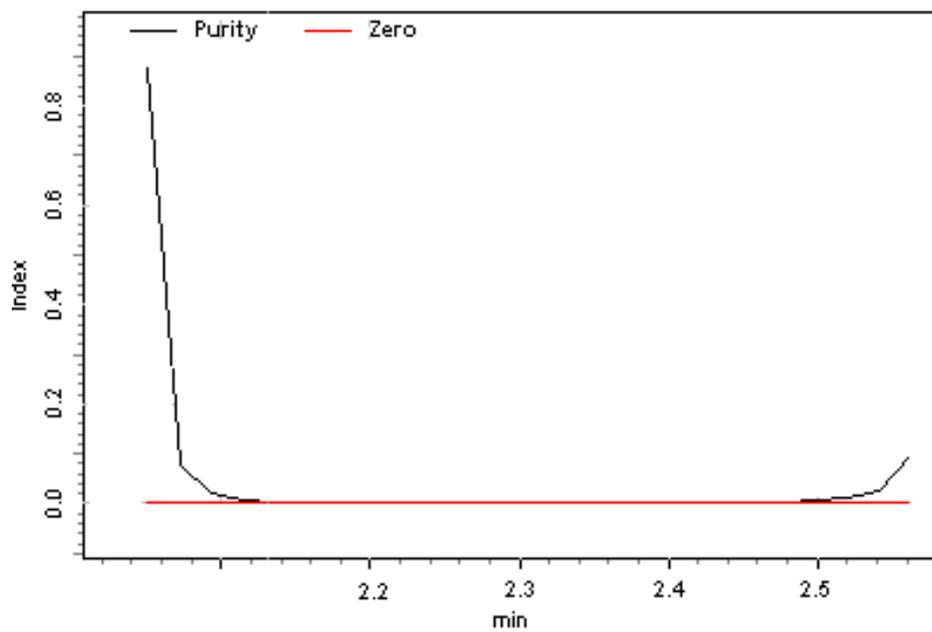


Figura 4.6 - Pureza cromatográfica obtida por similaridade.



Impurity :Not Detected

Peak purity index : 1.000000
 Single point threshold : 0.999562
 Minimum peak purity index : 438

Figura 4.7 - Razão cromatográfica obtida pela razão cromatográfica.

4.3.4. Linearidade e precisão intra e inter-dia.

As curvas padrão médias do primeiro e segundo dia de testes estão representadas na Figura 4.8 a e b, respectivamente.

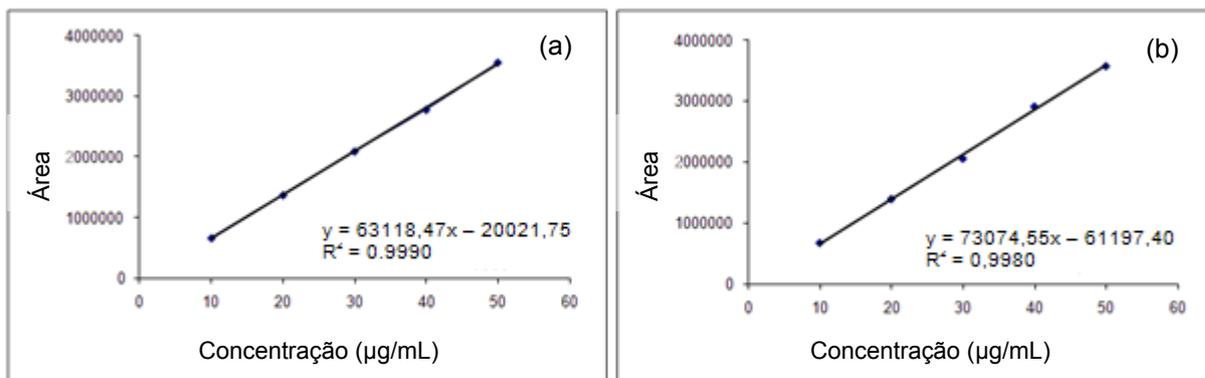


Figura 4.8 - Curvas padrão médias do primeiro (a) e segundo (b) dia de testes.

Os dados apresentados na Figura 4.8 estão destacados na Tabela 4.4 de forma mais detalhada, com intuito de demonstrar a análise estatística da regressão linear.

Tabela 4.4 – Análise estatística de regressão linear das curvas padrão

	DIA 1	DIA 2
Intercepto	-20021,75	-61197,40
Inclinação	63118,47	73074,55
Valor P - intercepto	0,3008	0,0109
Coefficiente de determinação (R ²)	0,9990	0,9980
Coefficiente de correlação (r)	0,9995	0,9990

A precisão intra e inter-dia foi avaliada segundo os valores de DPR apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Resultados do teste de precisão inter e intra-dia.

Concentração (µg/mL)	Dia	Área sob o pico	DP	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
10,0	1	672046	2491,02	0,37	1,54
		674778			
		677020			
	2	692631	1163,43	0,17	
		693250			
		694883			
20,0	1	1369979	1793,45	0,13	1,13
		1373485			
		1372388			
	2	1399657	855,55	0,06	
		1401347			
		1400270			
30,0	1	2091470	1784,79	0,09	0,53
		2094046			
		2090618			
	2	2065191	8378,42	0,40	
		2076697			
		2081494			
40,0	1	2776642	2996,92	0,11	2,05
		2779428			
		2782631			
	2	2904668	19427,80	0,67	
		2866738			
		2878402			
50,0	1	3524033	4826,42	0,14	0,70
		3532115			
		3532645			
	2	3574777	2583,35	0,07	
		3577245			
		3572080			

4.3.5. Precisão do volume de injeção

Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 4.6, tendo sido estabelecidos para 5 concentrações diferentes de LM.

Tabela 4.6 - Resultados do teste de precisão de injeção.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área sob o pico	Média	DP	DPR (%)
9,98	648399	667261,6	11625,7	1,74
	664065			
	672046			
	674778			
	677020			
19,96	1376403	1372893,8	2338,7	0,17
	1372214			
	1369979			
	1373485			
	1372388			
29,94	2087022	2090702,4	2522,0	0,12
	2091470			
	2094046			
	2090618			
	2090356			
39,92	2770818	2776379,4	4883,3	0,18
	2772378			
	2776642			
	2779428			
	2782631			
49,90	3524033	3533732,2	7035,6	0,20
	3532115			
	3532645			
	3536528			
	3543340			

4.3.6. LD e LQ

Para o cálculo do LD e do LQ, foram utilizadas as equações descritas em 3.2.4.2.4. Dessa forma, o LD calculado foi de 1,28 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ foi de 4,27 $\mu\text{g/mL}$.

4.4. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LM

4.4.1. Determinação do coeficiente de partição óleo/ tampão ($K_{O/T}$), pele/tampão ($K_{P/T}$) e estrato córneo/ tampão ($K_{EC/T}$).

Os resultados do estudo de coeficiente de partição estão resumidos na Figura 4.9 e demonstrados na Tabela 4.7

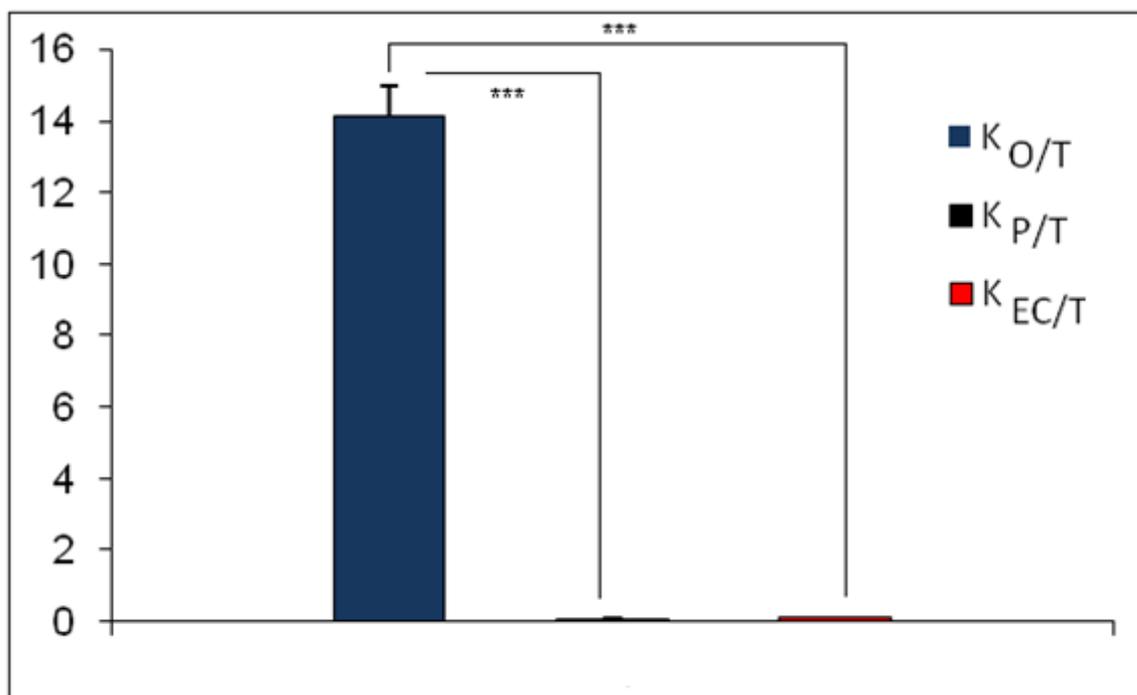


Figura 4.9 – Coeficiente de partição médios $K_{O/T}$, $K_{P/T}$ e $K_{EC/T}$ ($n = 6$ para cada grupo). Valores expressos em erro padrão médios considerados não significativos ($P > 0,05$) entre $K_{P/T}$ e $K_{EC/T}$, e considerados significativos ($P < 0,001$) entre $K_{O/T}$ e $K_{P/T}$, e $K_{O/T}$ e $K_{EC/T}$. Teste estatístico one way ANOVA (Teste de múltiplas comparações de Tukey). Valores considerados significativos para $P < 0,05$.

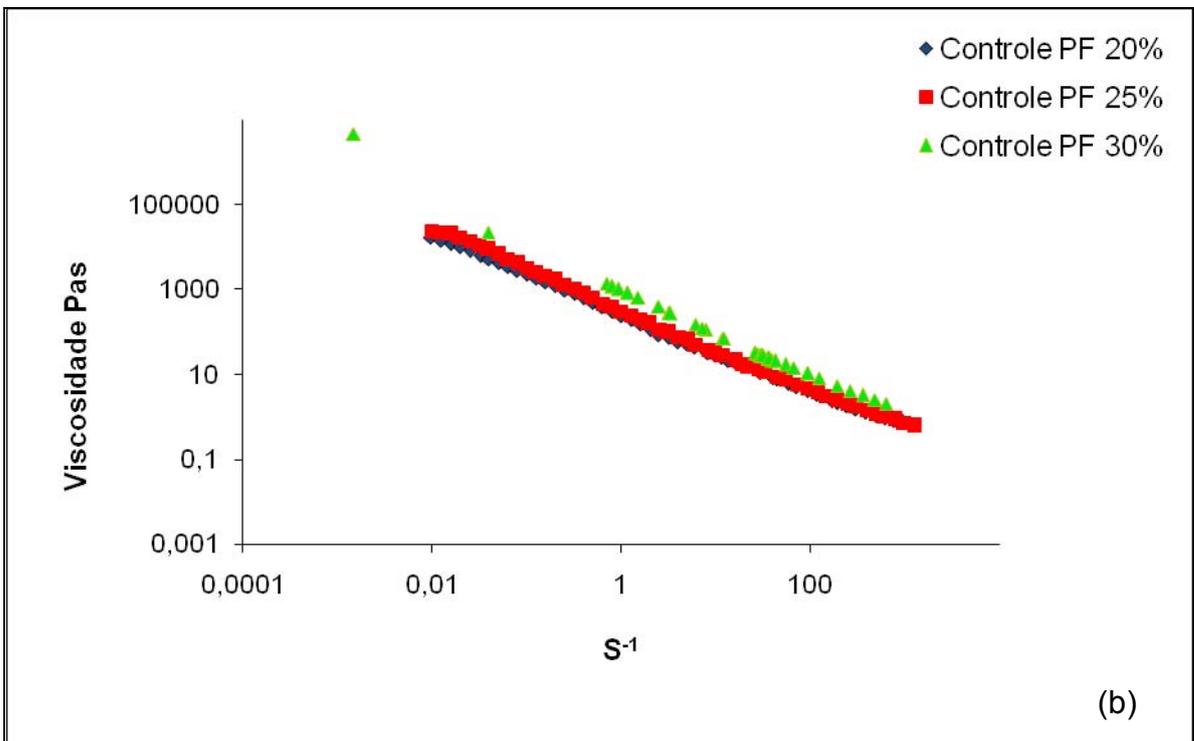
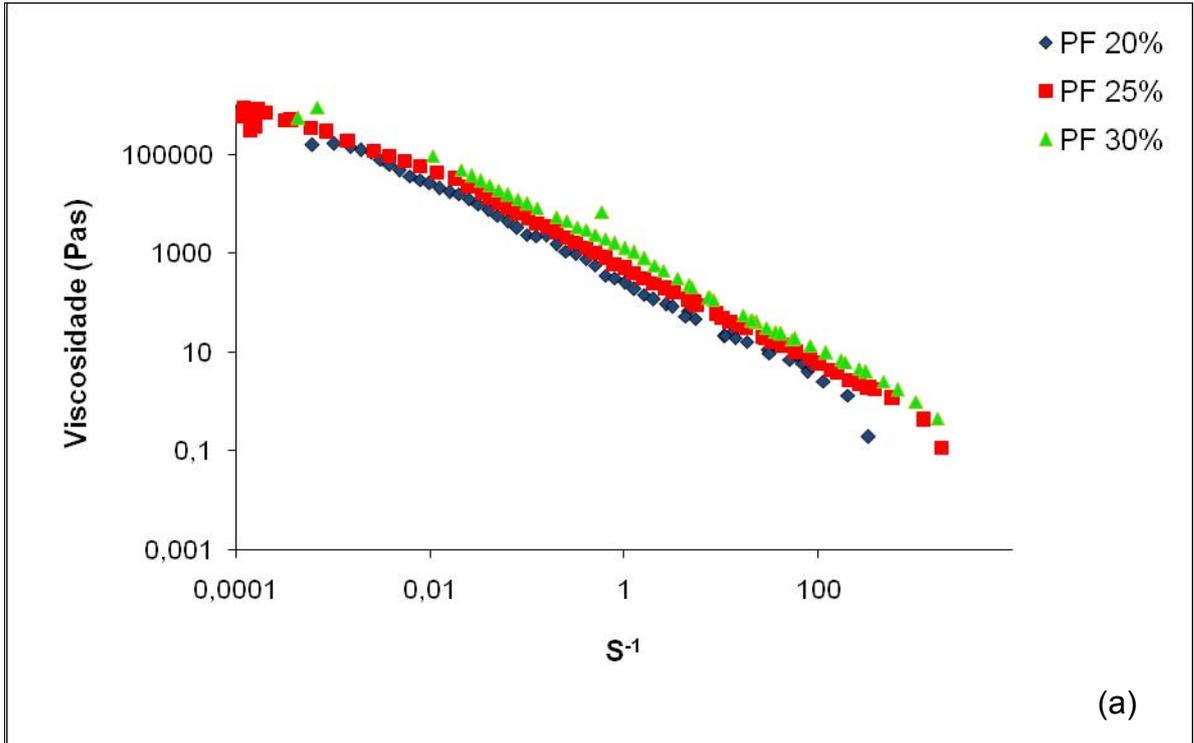
Tabela 4.7 – Resultados da determinação do coeficiente de partição $K_{O/T}$, $K_{P/T}$ e $K_{EC/T}$.

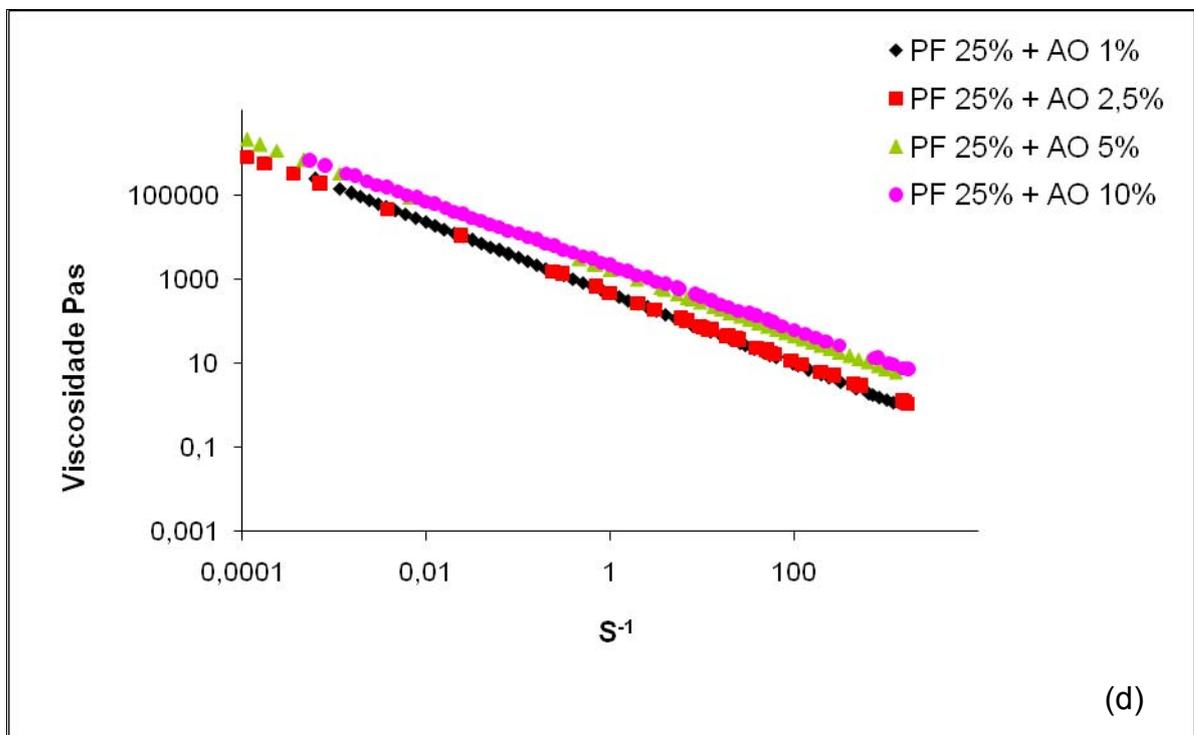
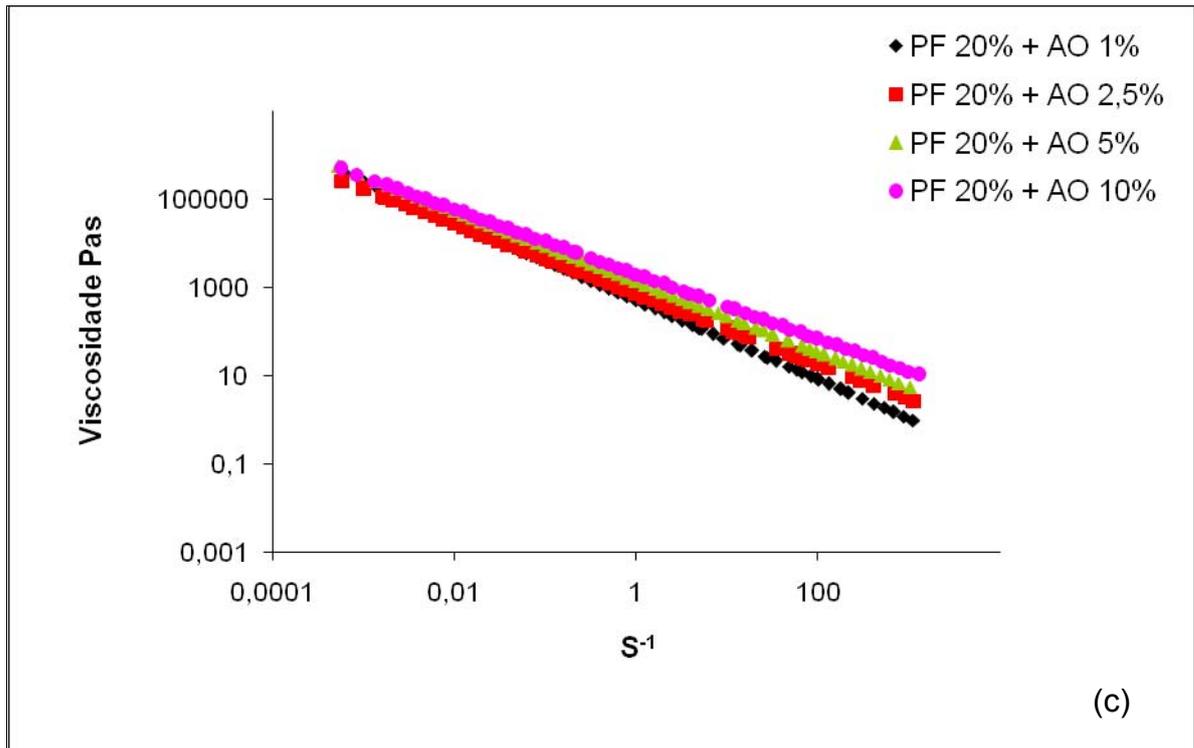
n	$K_{O/T}$	$K_{P/T}$	$K_{EC/T}$
1	15,6846	0,0826	0,1881
2	13,6316	0,0607	0,1070
3	13,7694	0,0665	0,1214
4	14,5426	0,0501	0,1028
5	13,5710	0,0661	0,1226
6	13,6685	0,0639	0,1169
Média ± DP	14,14 ± 0,83	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,03

4.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO GEL

4.5.1. Estudo das propriedades reológicas

Os resultados obtidos com a análise reológica foram resumidos em gráficos de viscosidade (Pas) x taxa de cisalhamento (S^{-1}) representados nas Figuras 4.10 a, b, c, d, e. A Tabela 4.8 demonstra os valores de viscosidade (Pas) encontrados para diferentes taxas de cisalhamento a 25 °C.





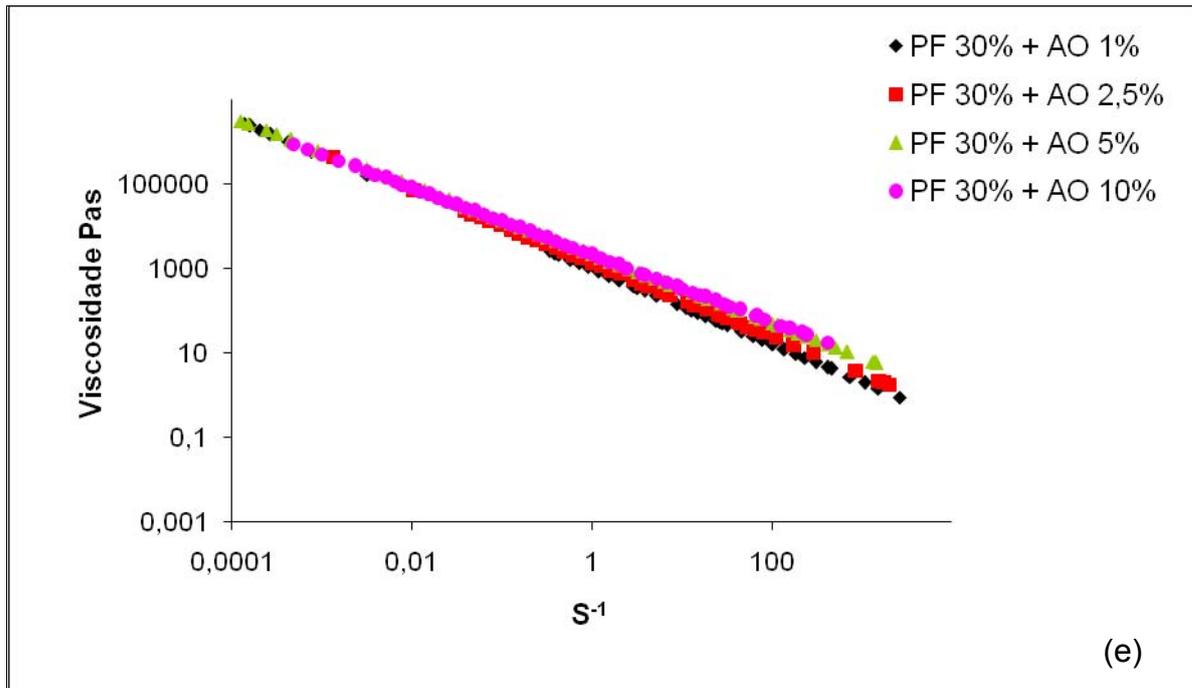


Figura 4.10 - Gráficos de viscosidade (Pas) x taxa de cisalhamento (S^{-1}) a 25 °C. **(a)** Gel de poloxamer a 20, 25 e 30% (p/p), **(b)** Gel de poloxamer a 20, 25 e 30% (p/p) contendo LM a 1% (p/p), **(c)** Gel de poloxamer a 20% (p/p) contendo LM a 1% (p/p) e AO a 1; 2,5; 5 e 10% (p/p), **(d)** Gel de poloxamer a 25% (p/p) contendo LM a 1% (p/p) e AO a 1; 2,5; 5 e 10% (p/p) e **(e)** Gel de poloxamer a 30% (p/p) contendo LM a 1% (p/p) e AO a 1; 2,5; 5 e 10% (p/p).

Tabela 4.8 – Variação do valores de viscosidade (Pas) de acordo com o aumento da taxa de cisalhamento (S^{-1})

Amostra	Taxa de cisalhamento (S^{-1})			
	0,1	1	100	400
PF 20%	2063,95	253,69	3,83	1,08
PF 25%	3004,00	343,40	4,49	1,22
PF 30%	7430,19	811,90	9,69	2,56
Controle PF 20%	2533,96	270,27	3,07	0,80
Controle PF 25%	5193,98	521,43	5,26	1,32
Controle PF 30%	9602,85	1013,91	11,30	2,92
PF 20% + AO 1%	3953,67	507,46	8,36	2,43
PF 20% + AO 2,5%	4417,74	711,70	18,47	6,15
PF 20% + AO 5%	8855,23	1408,96	35,67	11,79
PF 20% + AO 10%	10712,73	1979,25	67,56	24,44
PF 25% + AO 1%	4064,43	583,45	12,02	3,74
PF 25% + AO 2,5%	6279,14	956,75	22,21	7,16
PF 25% + AO 5%	9869,61	1625,17	44,07	14,87
PF 25% + AO 10%	15149,56	2627,24	79,01	27,52
PF 30% + AO 1%	6250,29	802,42	13,23	3,84
PF 30% + AO 2,5%	10365,73	1394,44	25,23	7,54
PF 30% + AO 5%	14282,36	2199,38	52,16	16,91
PF 30% + AO 10%	21517,91	3459,39	89,41	29,75

4.5.2. Determinação da tensão de trabalho

Na Figura 4.11 está representado o comportamento do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') em função da tensão (T) para os géis PF 20%, PF 25% e PF 30%.

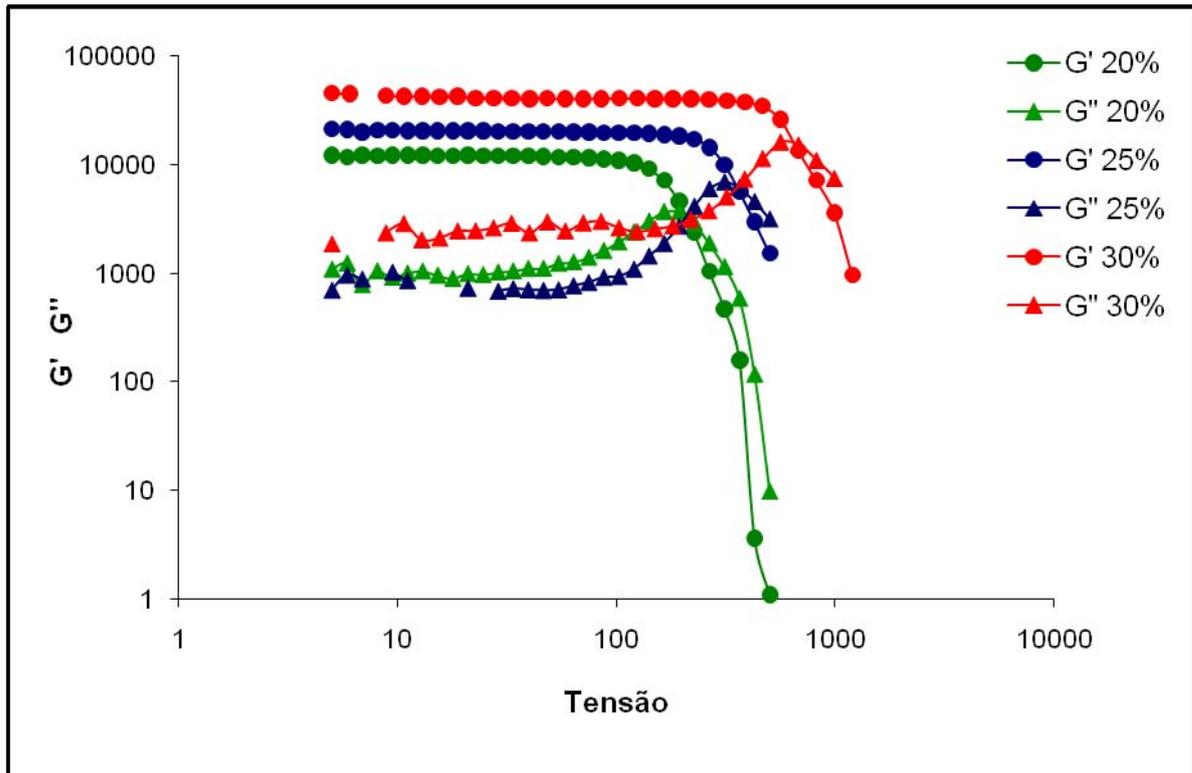
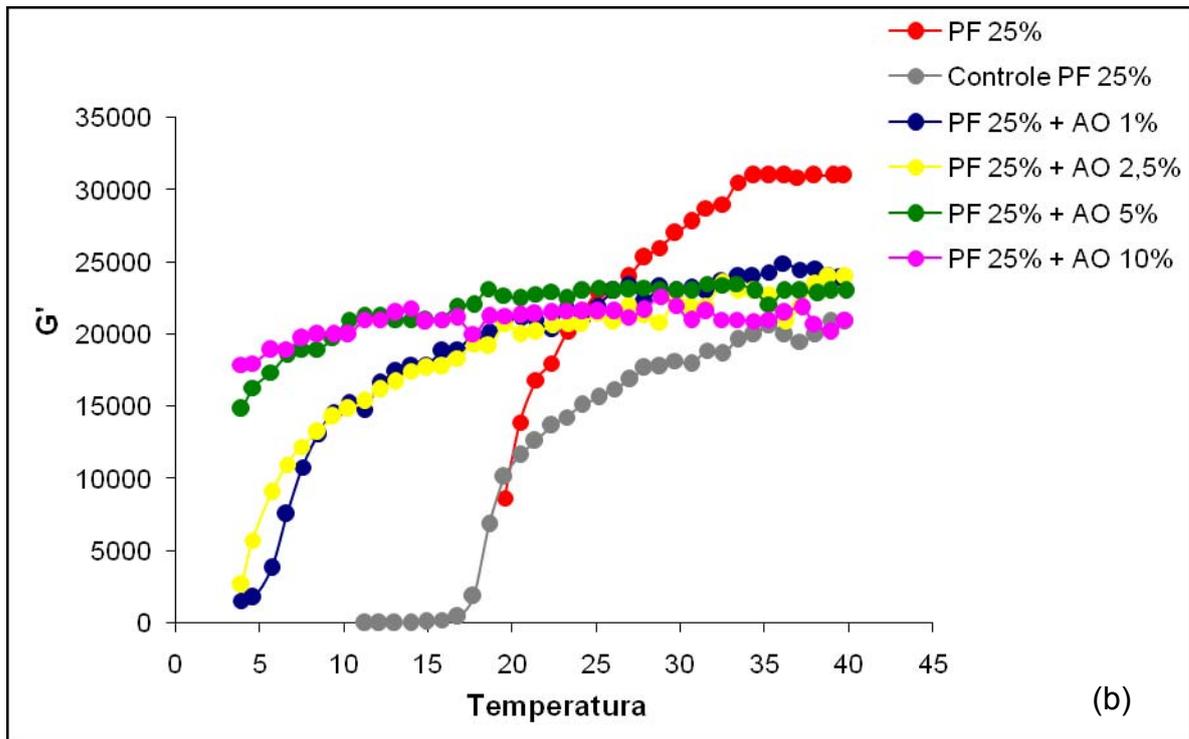
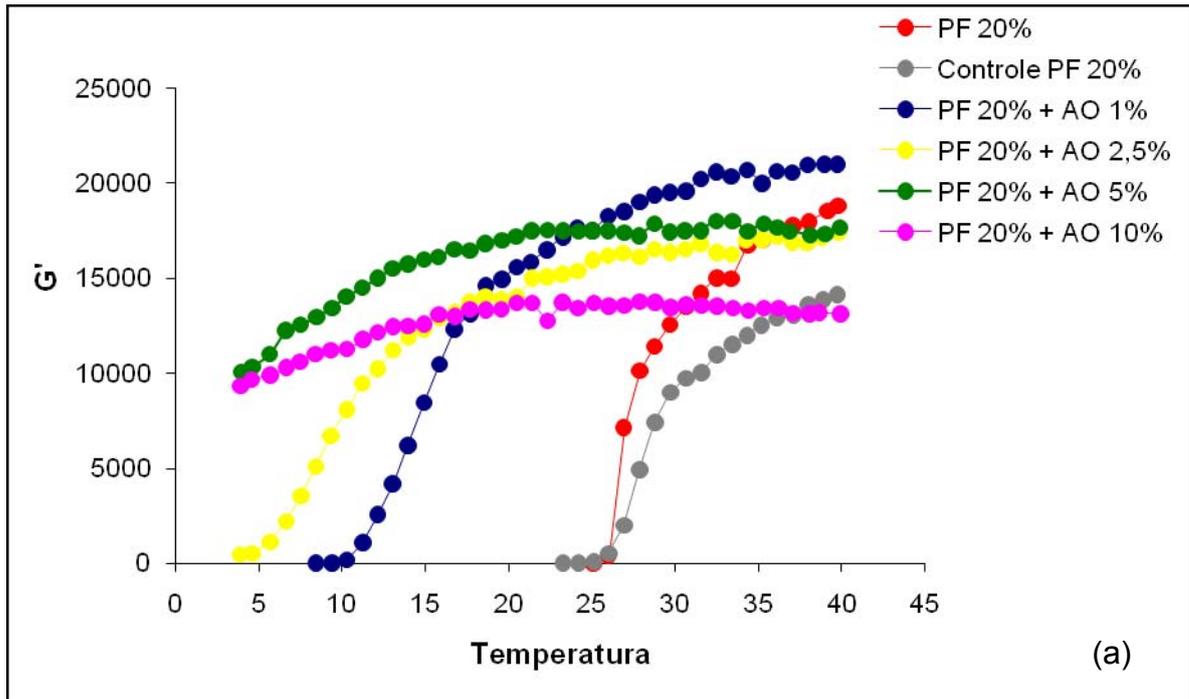


Figura 4.11 – Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da tensão (T) para os géis PF 20, 25 e 30% (p/p).

4.5.3. Determinação da temperatura de gelificação

As Figuras 4.12 a, b e c representam transição sol-gel das formulações desenvolvidas, através das medidas do módulo elástico (G') em função do aumento da temperatura de 4 a 40 °C em uma taxa de 2 °C/min.



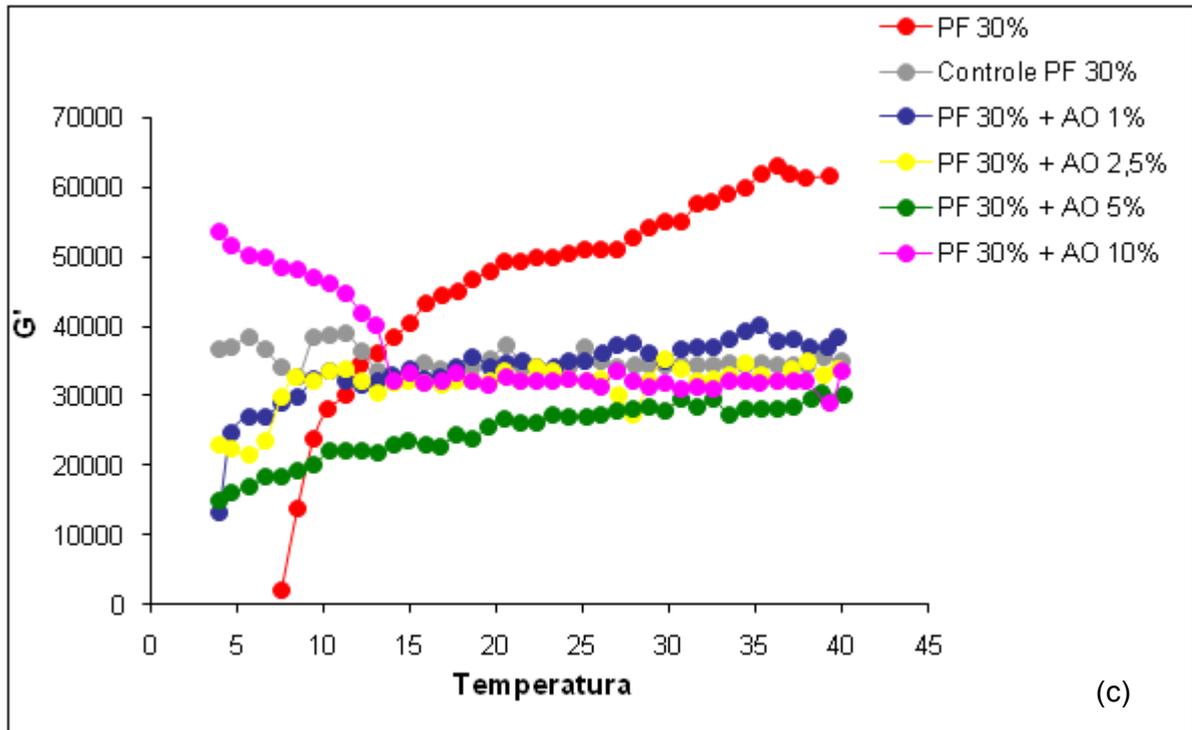


Figura 4.12 – Representação gráfica da transição sol-gel. Módulo elástico (G') em função da temperatura para formulações contendo 1% de LM (p/p) e AO 1; 2,5; 5 e 10% (p/p): **(a)** Gel de poloxamer a 20% (p/p), **(b)** Gel de poloxamer a 25% (p/p) e **(c)** Gel de poloxamer a 30% (p/p).

A Tabela 4.9 demonstra a temperatura de transição sol-gel obtida para cada formulação desenvolvida.

Tabela 4.9 – Temperatura de transição sol-gel (°C) obtida para todas as formulações desenvolvidas.

Amostra	Temperatura de transição Sol-gel (°C)
PF 20%	29,25
Controle PF 20%	30,29
PF 20% + AO 1%	18,35
PF 20% + AO 2,5%	12,94
PF 20% + AO 5%	--
PF 20% + AO 10%	--
PF 25%	19,33
Controle PF 25%	22,87
PF 25% + AO 1%	8,58
PF 25% + AO 2,5%	5,71
PF 25% + AO 5%	--
PF 25% + AO 10%	--
PF 30%	12,19
Controle PF 30%	15,23
PF 30% + AO 1%	4,21
PF 30% + AO 2,5%	--
PF 30% + AO 5%	--
PF 30% + AO 10%	--

4.6. ESCOLHA DA SOLUÇÃO RECEPTORA PARA OS ESTUDOS *IN VITRO*

Segundo recomendação do FDA (U.S. FDA/CDER, 1997), misturas tamponadas com adição de tensoativos até 5 % (p/v) podem ser utilizadas como meio receptor em estudos de liberação e penetração *in vitro*, quando o fármaco for muito lipossolúvel, como no caso do LM.

A solubilidade do LM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 na presença de diferentes concentrações de PS 20 e 80 está representada na Figura 4.13. Na Tabela

4.10 estão representados os valores de concentração de saturação de LM nas SR testadas.

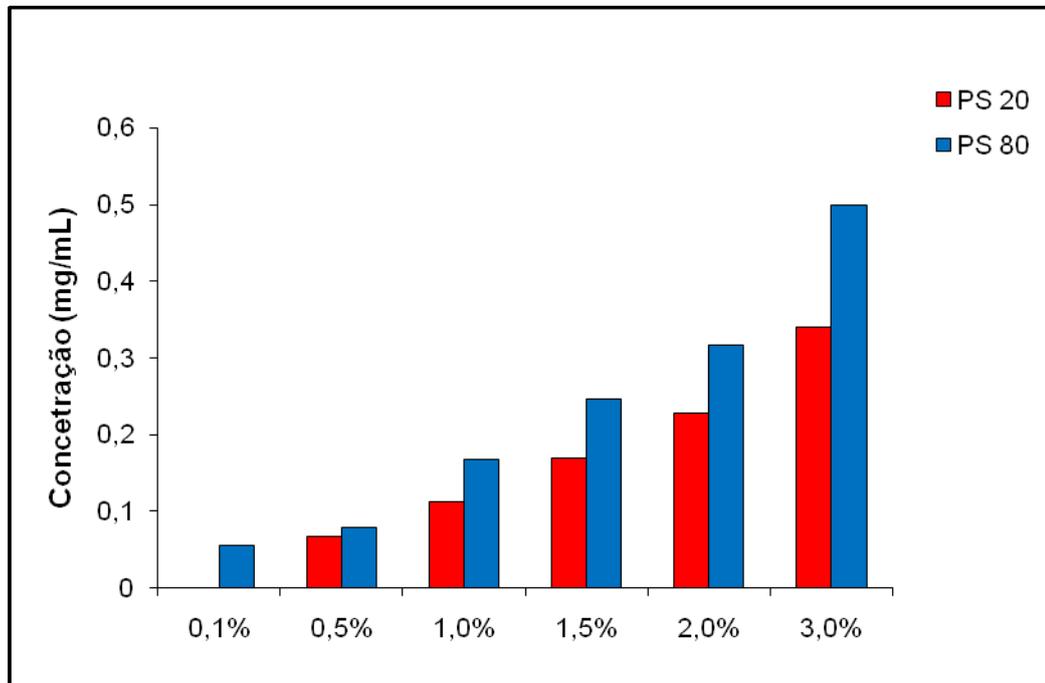


Figura 4.13 – Solubilidade de LM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 na presença de polissorbatos 20 (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% p/v) e polissorbatos 80 (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% p/v).

Tabela 4.10 – Concentração de saturação de lumiracoxibe em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 na presença de diferentes concentrações de polissorbato 20 e 80.

SR (Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 + PS %p/p)	Concentração (mg/mL)	
PS 20	0,5%	0,0670
	1,0%	0,1124
	1,5%	0,1686
	2,0%	0,2277
	3,0%	0,3407
PS 80	0,1%	0,0561
	0,5%	0,0786
	1,0%	0,1671
	1,5%	0,2463
	2,0%	0,3170
	3,0%	0,4987

A solução receptora selecionada para os estudos de liberação e permeação *in vitro* foi tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e PS 20 a 3,0% (p/p) pois permitiu uma solubilidade adequada do fármaco, obedecendo a condição *sink* para o volume de meio e quantidade de fármaco utilizada nos ensaios.

4.7. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LM NA SOLUÇÃO RECEPTORA.

4.7.1. Fase móvel e vazão

A FM selecionada foi ACN:tampão fosfato 0,01 M pH 2,5 (500:500), com a coluna de fase reversa C₈, pois permitiu uma boa seletividade com um tempo de retenção adequado aos propósitos do presente trabalho (Figura 4.14).

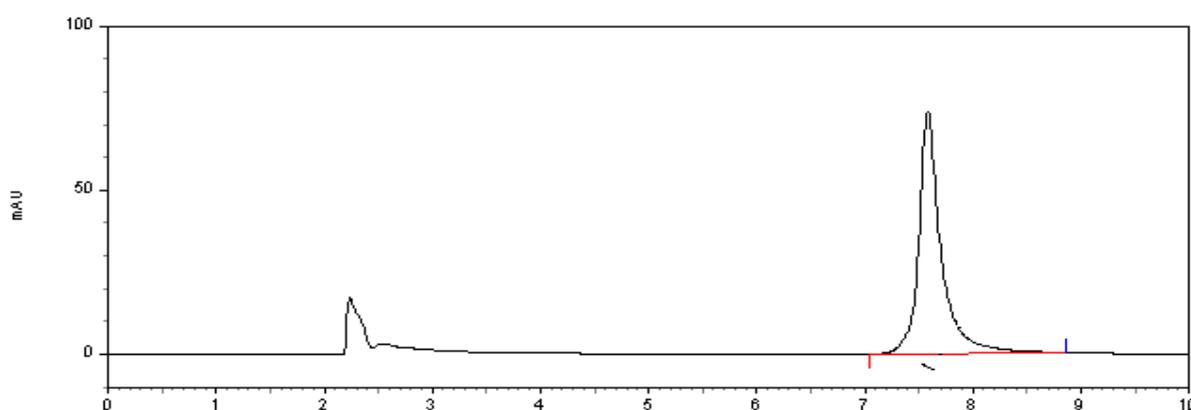


Figura 4.14 - Cromatograma obtido LM empregando as seguintes condições: fase móvel ACN:tampão fosfato 0,01 M pH 2,5 (500:500), fluxo 1,0 mL/min, coluna octadecilsilano (15 cm) e concentração da amostra a 40 µg/mL.

O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, o que resultou num tempo de retenção de, cerca de, 7,6 minutos e uma pressão no sistema controlada de cerca de 1300 psi.

4.7.2. Detecção

De acordo com o espectro de absorção no UV realizado no cromatógrafo provido com detector UV-FDI (Figura 4.15), selecionou-se o comprimento de onda de 278 nm para a obtenção dos cromatogramas.

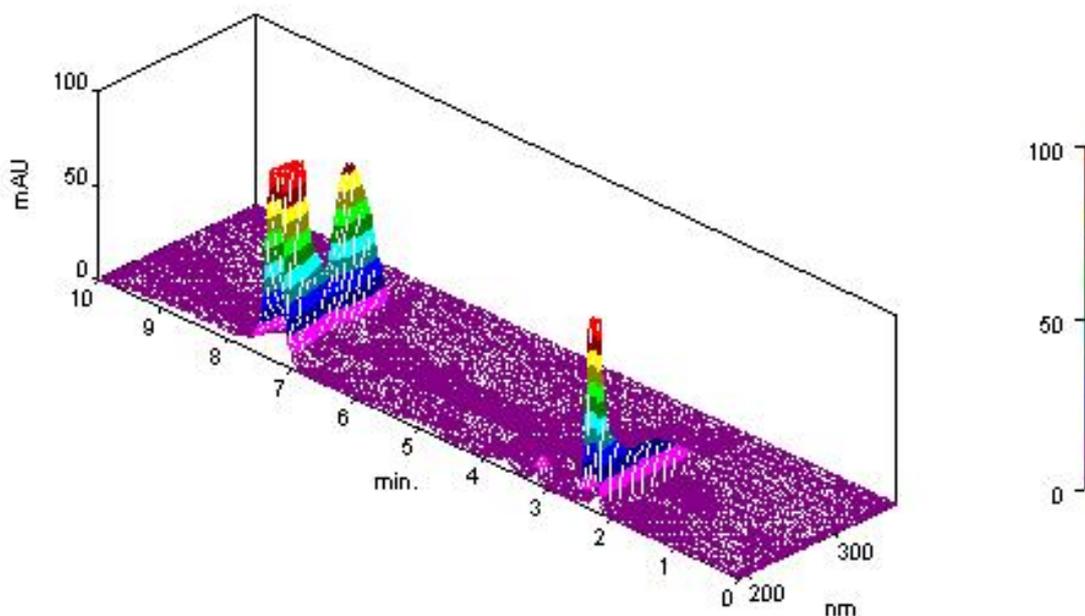


Figura 4.15 -. Cromatograma tridimensional obtido através do detector UV-FDI para uma amostra de lumiracoxibe na concentração de 40 µg/mL.

4.7.3. Especificidade

Este parâmetro já foi avaliado conforme descrito no item 4.3.3. A especificidade foi comprovada com a injeção do branco (solução receptora na ausência do fármaco) (Figura 4.16) e com o auxílio do *software* Class VP do detector de arranjo de fotodiodos do cromatógrafo Shimadzu, que permitiu fazer a análise de pureza de pico de LM por similaridade do pico (Figura 4.17) e por pureza cromatográfica, ou seja, construção de *"ratiograms* (Figura 4.18).

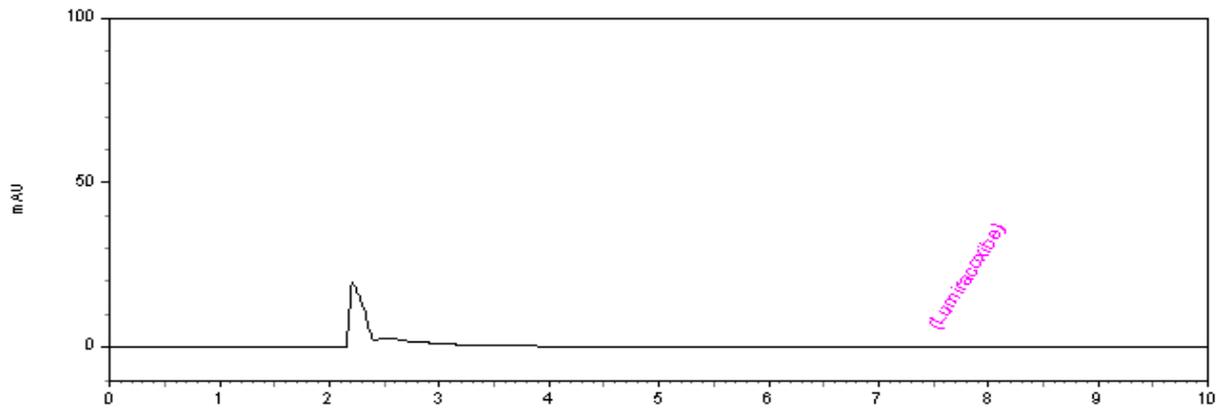


Figura 4.16 - Cromatograma obtido para solução receptora (branco) empregando as seguintes condições: fase móvel ACN:tampão fosfato 0,01 M pH 2,5 (500:500), fluxo 1,0 mL/min, coluna C₈ (15 cm).

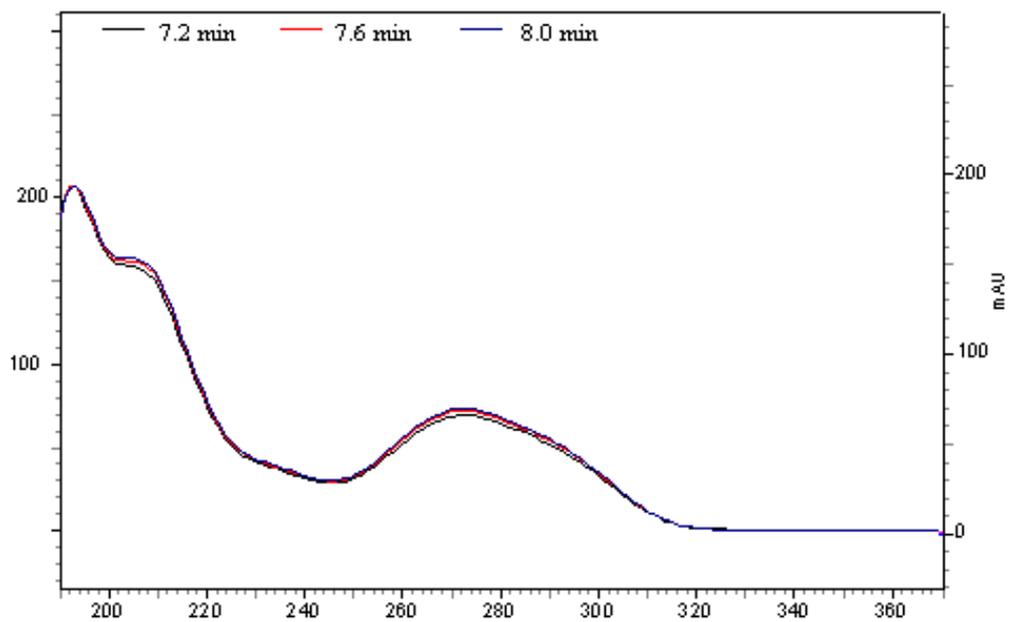
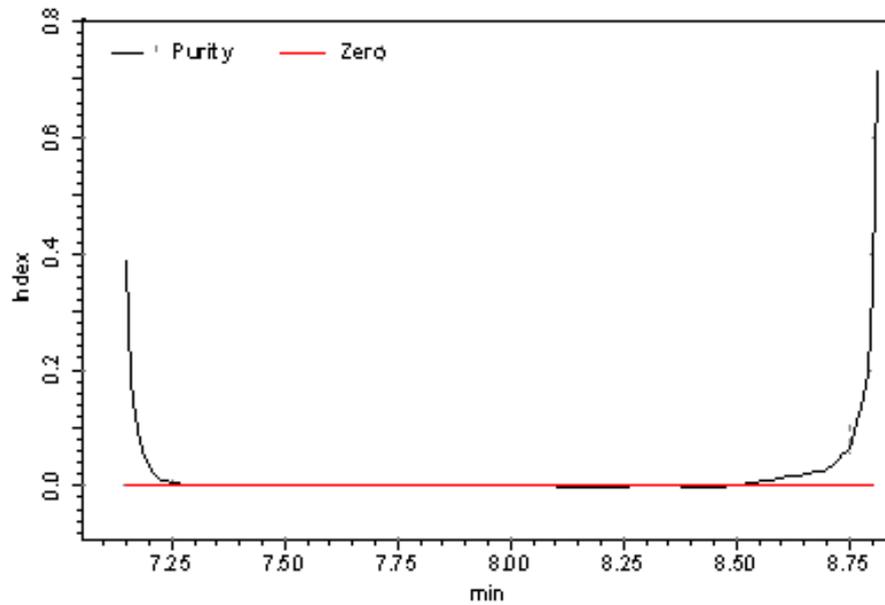


Figura 4.17 - Pureza cromatográfica obtida por similaridade.



Impurity: Not detected
 Peak purity index: 0.9999914
 Single point threshold: 0.999573
 Minimum peak purity index: 416

Figura 4.18 - Pureza cromatográfica obtida pela razão cromatográfica.

4.7.4. Linearidade e precisão intra e inter-dia.

As curvas padrão médias do primeiro e segundo dia de testes estão representadas na Figura 4.19 a e b, respectivamente.

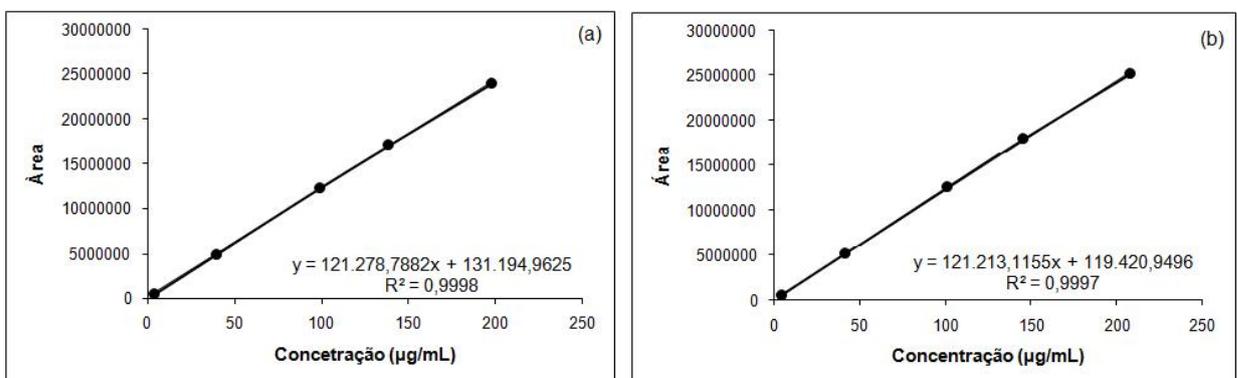


Figura 4.19 - Curvas padrão médias do primeiro (a) e segundo (b) dia de testes.

Na Tabela 4.11 estão dispostas as respostas obtidas para as cinco concentrações de LM, preparadas em duplicata, em cada dia de análise e seus DP e DPR.

Tabela 4.11 – Respostas obtidas para as cinco concentrações de LM, preparadas em duplicata, em cada dia de análise, DP, DPR e parâmetros da curva.

Concentração (µg/mL)	Dia	Área sob o pico	DP	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
4,0	1	477932	11223,76	2,29	3,43
		490154			
		500349			
	2	502211	12730,75	2,48	
		512301			
		527501			
40,0	1	4912316	9797,50	0,20	2,24
		4931545			
		4925195			
	2	5136372	7028,19	0,14	
		5126359			
		5122822			
100,0	1	12283278	21893,53	0,18	1,13
		12325125			
		12293039			
	2	12333756	152000,76	1,22	
		12637666			
		12479251			
140,0	1	17065225	117287,37	0,69	2,79
		16897634			
		17123570			
	2	17888255	17766,56	0,10	
		17922340			
		17913993			
200,0	1	23935005	43849,25	0,18	2,69
		23914167			
		23998360			
	2	24848258	297238,81	1,18	
		25029785			
		25429265			

A análise da regressão linear dos dados foi realizada e os parâmetros da curva: intercepto, inclinação, coeficiente de determinação e de correlação também estão apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Análise da regressão linear das curvas padrão

	DIA 1	DIA 2
Intercepto	131194	119420
Inclinação	121278	121213
Valor P - intercepto	0,3844	0,4466
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9998	0,9997
Coeficiente de correlação (r)	0,9997	0,9997

4.7.5. LD e LQ

Para o cálculo do LD e do LQ, foram utilizadas as equações descritas em 3.2.4.2.4. Dessa forma, o LD calculado foi de 0,20 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ foi de 0,68 $\mu\text{g/mL}$.

4.7.6. Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação do LM no EC e [epiderme + derme] suína.

Como descrito no item 3.2.11, foi avaliada a recuperação de LM adicionado à fita, para retirada do EC, e aos segmentos de [epiderme + derme] suína. Os resultados foram expressos em porcentagem de LM recuperada e estão apresentados nas Tabelas 4.13 e 4.14.

Tabela 4.13 - Porcentagem média de recuperação de LM no estrato córneo para três níveis do fármaco e seus desvios padrão (n=3).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperação	DP	DPR
10	88,12	1,13	1,28
20	92,46	0,98	1,06
30	91,29	0,50	0,55

Tabela 4.14 - Porcentagem média de recuperação de LM na [epiderme + derme] suína para três níveis do fármaco e seus desvios padrão (n=3).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperação	DP	DPR
10	97,61	1,71	1,75
100	99,63	1,02	1,02
200	102,08	0,85	0,83

4.8. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* ATRAVÉS DE MEMBRANA SINTÉTICA

Na Tabela 4.15 estão apresentadas as massas médias de LM encontradas no estudo de liberação *in vitro*, utilizando membrana de acetato de celulose, em cada tempo de coleta de amostra de SR, calculadas pela área de exposição da amostra, para cada concentração de gel PF-127.

Tabela 4.15 – Quantidade de LM acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) na SR de células de Franz modificadas equipadas com membrana de acetato de celulose calculada pela área de difusão e desvios padrão de 3 células para 3 concentrações diferentes de gel PF-127.

Tempo (horas)	PF 20% - Quantidade de LM liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP				
	Controle	AO 1%	AO 2,5%	AO 5%	AO 10%
0	0,15 \pm 0,17	0,25 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,10 \pm 8,71	0,36 \pm 0,02
0,5	170,87 \pm 70,41	181,95 \pm 14,39	75,75 \pm 9,67	96,93 \pm 2,19	93,28 \pm 4,28
1	327,06 \pm 105,73	354,92 \pm 40,23	190,48 \pm 13,68	166,78 \pm 4,60	134,14 \pm 9,12
2	598,07 \pm 141,82	636,60 \pm 99,29	418,02 \pm 13,63	336,60 \pm 7,34	189,42 \pm 14,15
4	987,73 \pm 189,63	1012,29 \pm 170,43	669,96 \pm 41,96	620,78 \pm 25,25	385,53 \pm 26,48
6	1276,59 \pm 224,26	1296,89 \pm 221,12	863,38 \pm 132,31	848,08 \pm 82,73	521,45 \pm 21,92
8	1477,64 \pm 246,77	1492,16 \pm 225,31	1031,36 \pm 75,17	1132,05 \pm 48,00	653,27 \pm 31,22
12	1687,28 \pm 268,42	1643,43 \pm 170,60	1200,65 \pm 65,67	1351,00 \pm 49,05	810,09 \pm 36,80
24	1952,69 \pm 299,11	1846,10 \pm 146,47	1380,61 \pm 46,51	1620,92 \pm 30,51	999,88 \pm 40,41

	PF 25% - Quantidade de LM liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP				
	Controle	AO 1%	AO 2,5%	AO 5%	AO 10%
0	0,35 \pm 0,06	0,32 \pm 0,00	0,37 \pm 0,01	0,27 \pm 0,00	0,28 \pm 0,01
0,5	118,10 \pm 17,50	104,78 \pm 22,24	119,76 \pm 68,20	89,98 \pm 50,56	68,76 \pm 8,41
1	225,98 \pm 54,91	176,13 \pm 44,97	245,19 \pm 27,82	187,16 \pm 28,60	144,85 \pm 22,45
2	445,50 \pm 95,48	326,45 \pm 81,81	425,85 \pm 48,70	321,27 \pm 32,23	237,69 \pm 34,80
4	835,96 \pm 150,36	642,04 \pm 152,10	781,60 \pm 48,70	550,79 \pm 23,51	418,98 \pm 59,90
6	1163,95 \pm 189,09	967,89 \pm 175,44	1093,24 \pm 97,35	780,10 \pm 82,75	604,16 \pm 62,60
8	1367,44 \pm 169,67	1245,05 \pm 191,33	1345,39 \pm 84,51	1016,16 \pm 179,71	740,84 \pm 100,01
12	1642,74 \pm 173,84	1545,89 \pm 179,04	1713,73 \pm 78,12	1346,14 \pm 106,69	985,93 \pm 99,47
24	2146,73 \pm 302,93	1862,10 \pm 135,73	2230,02 \pm 301,88	2037,99 \pm 44,28	1184,86 \pm 125,96

	PF 30% - Quantidade de LM liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP				
	Controle	AO 1%	AO 2,5%	AO 5%	AO 10%
0	0,39 \pm 0,07	0,31 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	0,48 \pm 0,03	0,61 \pm 0,20
0,5	90,06 \pm 13,15	68,07 \pm 1,19	87,04 \pm 14,54	85,52 \pm 14,02	74,86 \pm 8,56
1	161,58 \pm 20,56	129,92 \pm 5,38	139,54 \pm 20,04	133,96 \pm 30,78	127,57 \pm 20,97
2	275,22 \pm 36,67	219,58 \pm 2,22	237,01 \pm 16,39	211,30 \pm 52,57	219,70 \pm 35,51
4	498,00 \pm 58,11	409,98 \pm 30,16	409,83 \pm 36,70	360,29 \pm 91,39	387,00 \pm 62,79
6	732,59 \pm 86,46	594,88 \pm 60,70	610,05 \pm 35,08	501,56 \pm 122,92	533,83 \pm 81,56
8	973,14 \pm 122,91	799,45 \pm 87,43	767,96 \pm 43,03	646,29 \pm 155,91	665,43 \pm 97,13
12	1385,93 \pm 204,17	1063,23 \pm 109,30	1048,91 \pm 63,69	912,20 \pm 170,85	851,92 \pm 103,61
24	2127,82 \pm 350,73	1682,77 \pm 60,89	1974,03 \pm 316,54	1538,17 \pm 117,41	1147,86 \pm 82,34

A Figura 4.20 representa o perfil de liberação em membrana de acetato de celulose do LM (1% p/p) a partir do controle em PG e nos controles de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p), respectivamente (géis de PF-127 em diferentes concentrações de poloxamer contendo LM 1% p/p).

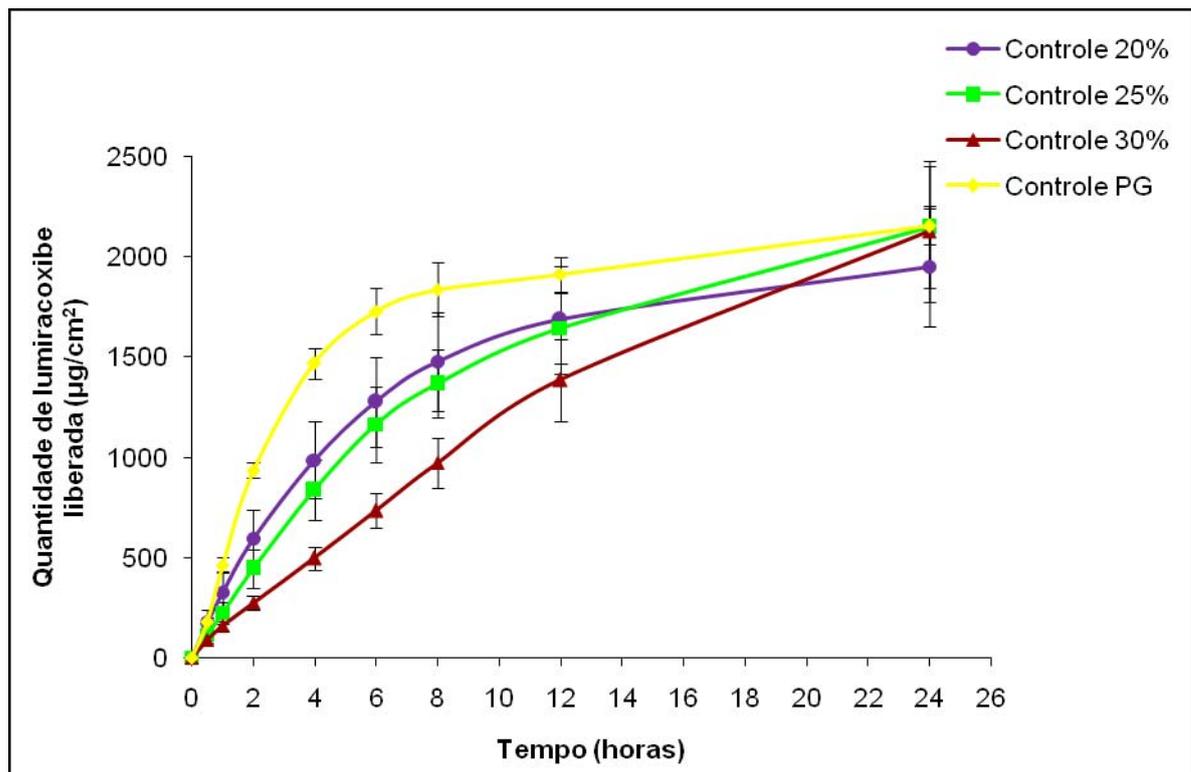
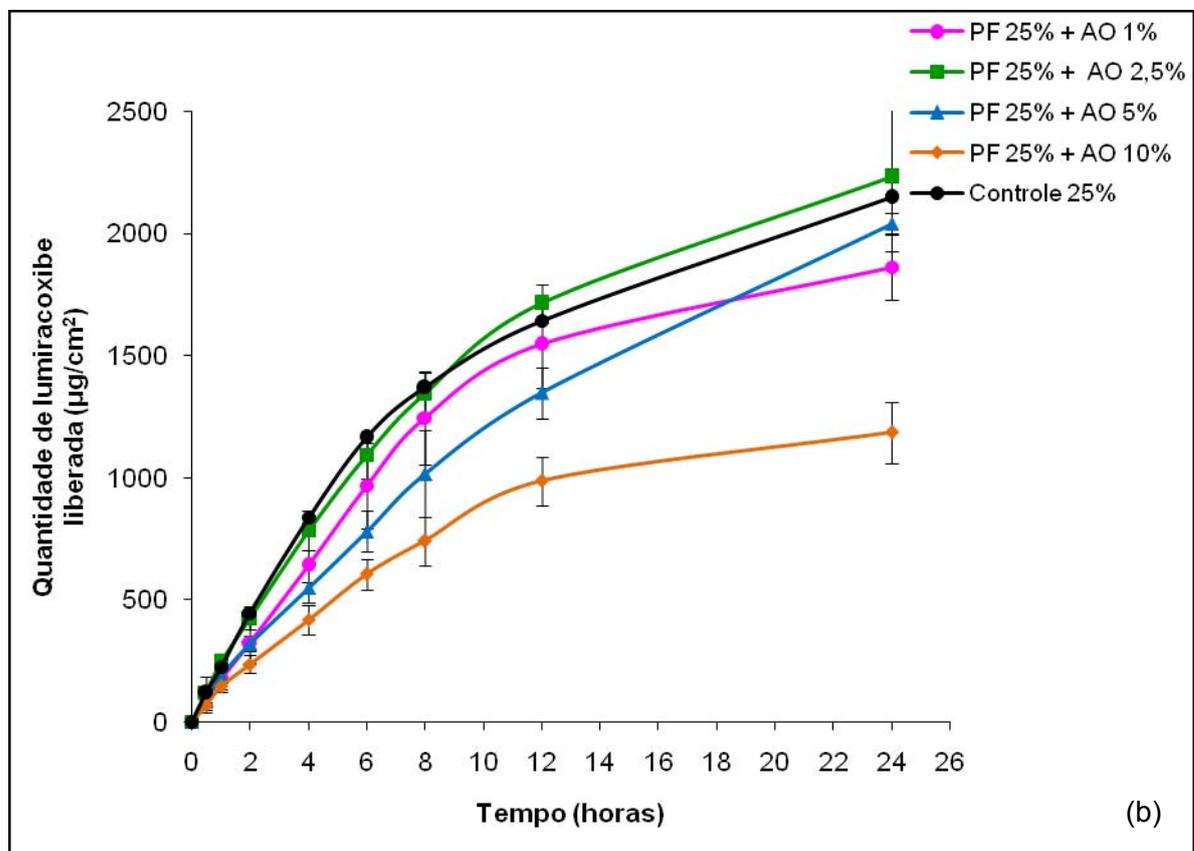
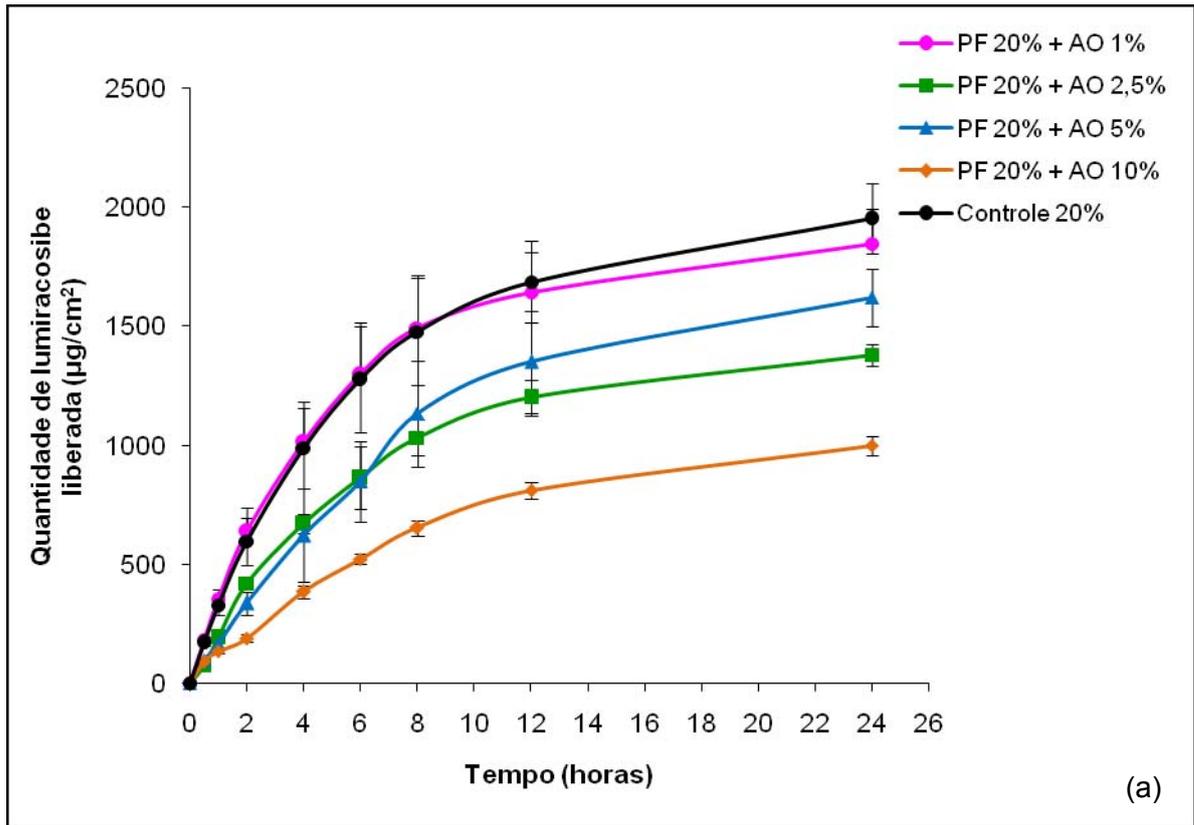


Figura 4.20. – Quantidade de LM liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo através de membrana de acetato de celulose a partir de propilenoglicol e das formulações controle contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p). Formulações contendo 1%(p/p) de LM. Valores médios e seus desvios padrão ($n = 12$) para cada grupo (significativo para $P < 0,05$). Análise estatística: Two Way ANOVA.

As Figuras 4.21 a, b e c mostram graficamente os dados demonstrados na Tabela 4.15 relacionados ao perfil de liberação em membrana de acetato de celulose do LM (1% p/p) nas formulações de PF 20, 25 e 30% (p/p) na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1; 2,5; 5 e 10% p/p).



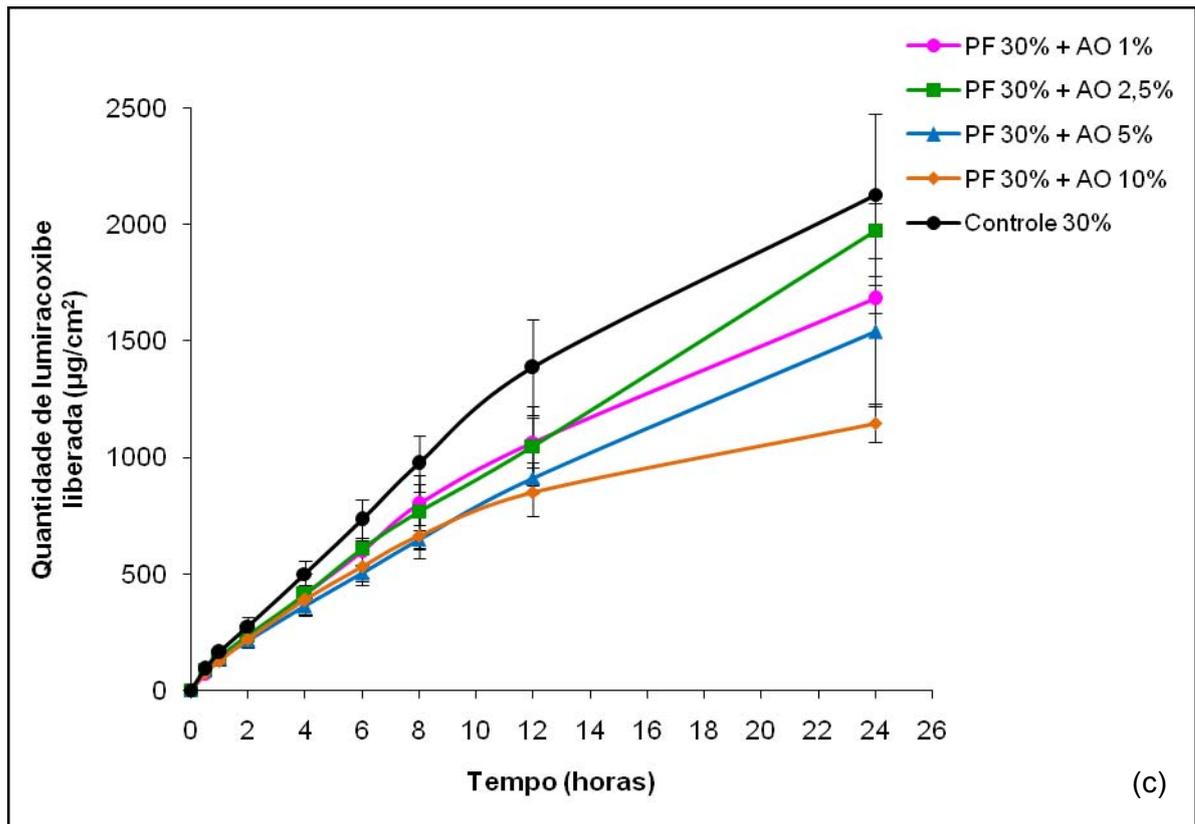


Figura 4.21. – Quantidade de LM liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo através de membrana de acetato de celulose na ausência e presença de AO (1; 2,5; 5 e 10% p/p) a partir das formulações contendo como base gel de PF-127 a 20 (a), 25 (b) e 30% (c) (p/p). Formulações contendo 1%(p/p) de LM. Valores médios e seus desvios padrão, ($n = 3$) para cada grupo (significativo para $P < 0,05$). Análise estatística: Two Way ANOVA.

A Tabela 4.16 apresenta o resumo dos dados estatísticos para os estudos *in vitro* de liberação (Figuras 4.20 e 4.21) após 24 horas de LM (1% p/p) em PG, na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1; 2,5; 5 e 10% p/p) nas formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p), respectivamente.

Tabela 4.16 – Resumo dos dados estatísticos após 24 horas dos estudos *in vitro* de liberação de LM (1% p/p) em PG, na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1; 2,5; 5 e 10% p/p) nas formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p). ^aConsiderando significativo para $P < 0,05$.

Comparação	Significância ^a
Controle PF 20% x Controle PF 30%	$P > 0,05$
Controle PF 20% x PG	$P > 0,05$
Controle PF 25% x PF 30%	$P < 0,001^{***}$
Controle PF 25% x PG	$P > 0,05$
Controle PF 30% x PG	$P > 0,05$
Controle PF 20% x PF 20% + AO1%	$P > 0,05$
Controle PF 20% x PF 20% + AO2,5%	$P < 0,001^{***}$
Controle PF 20% x PF 20% + AO 5%	$P < 0,01^{**}$
Controle PF 20% x PF 20% + AO10%	$P < 0,001^{***}$
PF 20% + AO 1% x PF 20% + AO 2,5%	$P < 0,01^{**}$
PF 20% + AO 1% x PF 20% + AO 5%	$P < 0,01^{**}$
PF 20% + AO 1% x PF 20% + AO 10%	$P < 0,001^{***}$
PF 20% + AO 2,5% x PF 20% + AO 5%	$P > 0,05$
PF 20% + AO 2,5% x PF 20% + AO 10%	$P < 0,05^*$
PF 20% + AO 5% x PF 20% + AO 10%	$P < 0,001^{***}$
Controle PF 25% x PF 25% + AO 1%	$P < 0,05^*$
Controle PF 25% x PF 25% + AO 2,5%	$P > 0,05$
Controle PF 25% x PF 25% + AO 5%	$P > 0,05$
Controle PF 25% x PF 25% + AO 10%	$P < 0,001^{***}$
PF 25% + AO 1% x PF 25% + AO 2,5%	$P < 0,05^*$
PF 25% + AO 1% x PF 25% + AO 5%	$P > 0,05$
PF 25% + AO1% x PF 25% + AO 10%	$P < 0,001^{***}$
PF 25% + AO 2,5% x PF 25% + AO 5%	$P < 0,05^*$
PF 25% + AO 2,5% x PF 25% + AO 10%	$P < 0,001^{***}$
PF 25% + AO 5% x PF 25% + AO 10%	$P < 0,001^{***}$
Controle PF 30% x PF 30% + AO 1%	$P < 0,001^{***}$
Controle PF 30% x PF 30% + AO 2,5%	$P < 0,01^{**}$
Controle PF 30% x PF 30% + AO 5%	$P < 0,001^{***}$
Controle PF 30% x PF 30% + AO 10%	$P < 0,001^{***}$
PF 30% + AO 1% x PF 20% + AO 2,5%	$P < 0,05^*$
PF 30% + AO 1% x PF 30% + AO 5%	$P > 0,05$
PF 30% + AO 1% x PF 30% + AO 10%	$P < 0,001^{***}$
PF 30% + AO 2,5% x PF 30% + AO 5%	$P < 0,001^{***}$
PF 30% + AO 2,5% x PF 30% + AO 10%	$P < 0,001^{***}$
PF 30% + AO 5% x PF 30% + AO 10%	$P < 0,01^{**}$

4.9. ESTUDOS *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA ATRAVÉS DE PELE ANIMAL.

4.9.1. Estudos de permeação cutânea

A Figura 4.22 representa graficamente o perfil de permeação em pele de orelha suína do LM (1% p/p) na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1, 2,5, 5 e 10% p/p) nas formulações contendo como base gel de PF-127 a 25% (p/p).

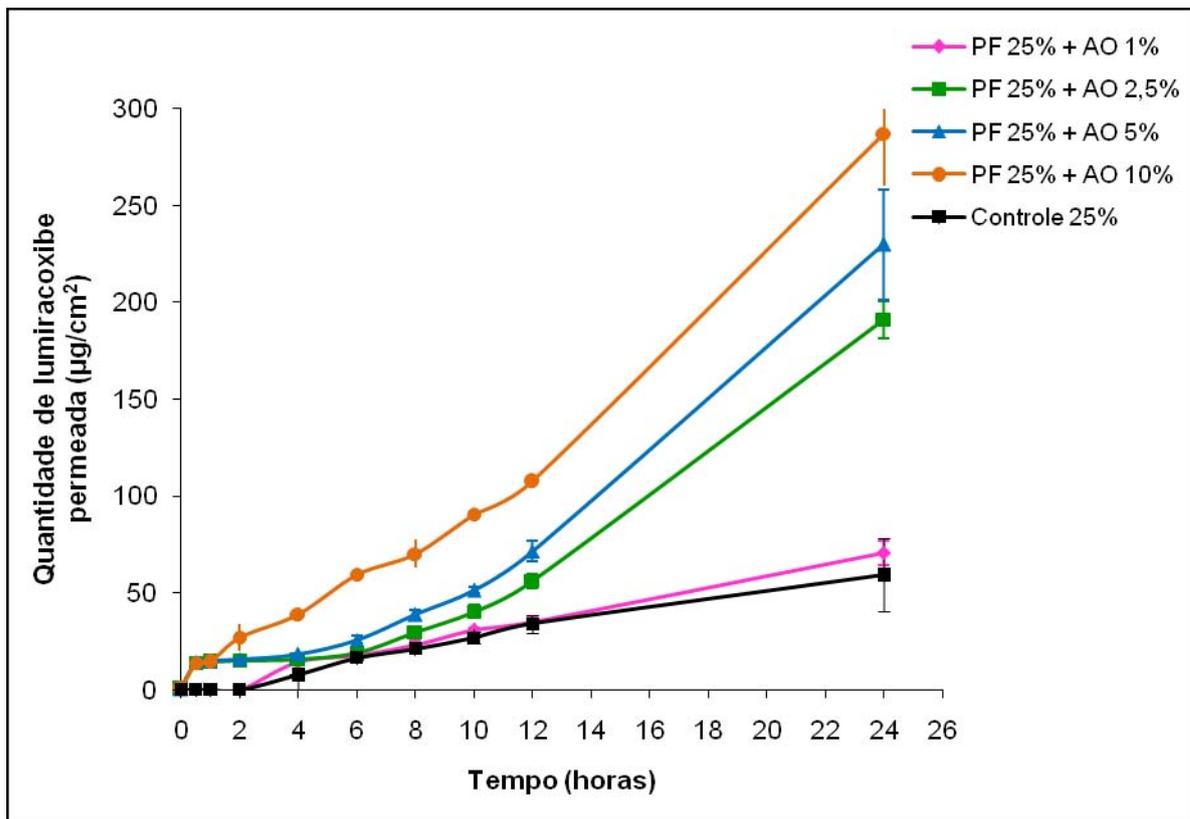


Figura 4.22. – Quantidade de LM permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo através de pele de orelha suína na ausência e presença de AO (1; 2,5; 5 e 10% p/p) a partir da formulação contendo como base gel de PF-127 a 25% (p/p). Formulações contendo 1% (p/p) de LM. Valores médios e seus desvios padrão, ($n = 3$) para cada grupo (significativo para $P < 0,05$). Análise estatística: Two Way ANOVA.

A Figura 4.23 representa o perfil de permeação em pele de orelha suína do LM (1% p/p) na ausência e na presença de AO 10% nas formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p).

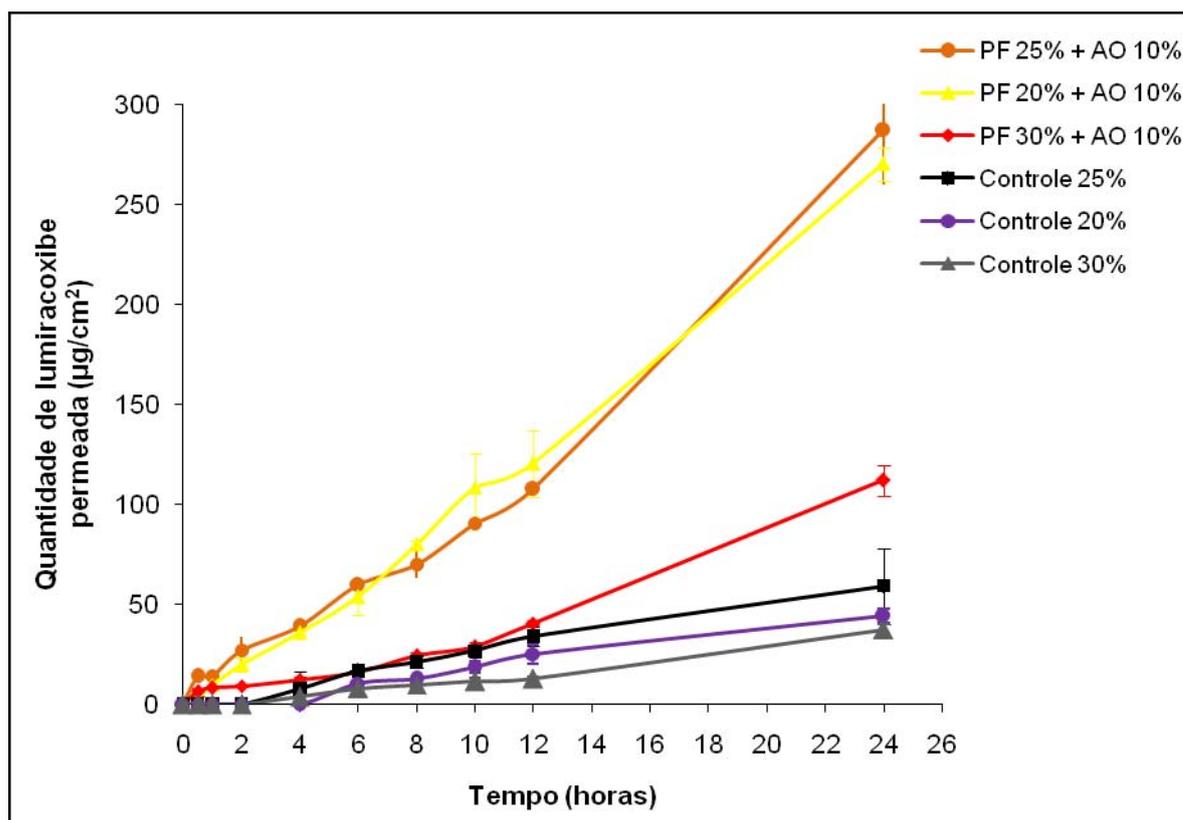


Figura 4.23. – Quantidade de LM permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo através de pele de orelha suína na ausência e presença de AO 10% (p/p) a partir das formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p). Formulações contendo 1%(p/p) de LM. Valores médios e seus desvios padrão, ($n = 3$) para cada grupo (significativo para $P < 0,05$). Análise estatística: Two Way ANOVA.

Na Tabela 4.17 estão apresentadas as massas médias de LM encontradas no estudo de permeação *in vitro*, referente às figuras 4.22 e 4.23, utilizando membrana natural suína, em cada tempo de coleta de amostra de SR, normalizadas pela área de contato, para cada concentração de gel de PF-127 estudada.

Tabela 4.17 - Quantidade de LM acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) na SR de células de Franz adaptadas equipadas com membrana natural calculadas pela área de difusão e desvios padrão de 3 células para 3 concentrações diferentes de gel PF-127.

Tempo (horas)	PF 25% - Quantidade de LM permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP				
	Controle	AO 1%	AO 2,5%	AO 5%	AO 10%
0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,14 \pm 0,00	0,14 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00
0,5	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	13,84 \pm 0,00	14,55 \pm 0,34	13,77 \pm 0,05
1	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	14,20 \pm 0,15	14,89 \pm 0,39	14,03 \pm 0,04
2	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	14,97 \pm 0,39	15,79 \pm 0,69	26,87 \pm 6,70
4	7,80 \pm 0,00	14,01 \pm 0,09	15,65 \pm 0,80	18,00 \pm 1,95	38,77 \pm 3,49
6	16,56 \pm 0,00	17,44 \pm 0,91	19,09 \pm 1,52	25,69 \pm 0,42	59,37 \pm 0,94
8	21,12 \pm 33,10	22,90 \pm 2,15	29,52 \pm 2,74	38,60 \pm 2,18	70,18 \pm 7,06
10	26,71 \pm 5,69	30,65 \pm 1,42	40,34 \pm 3,07	51,26 \pm 1,74	90,45 \pm 2,82
12	33,82 \pm 7,23	35,04 \pm 2,17	55,98 \pm 3,37	71,37 \pm 5,36	105,88 \pm 3,55
24	59,22 \pm 9,51	70,69 \pm 6,41	190,92 \pm 9,60	229,65 \pm 28,24	287,07 \pm 27,02

	PF 20% - Quantidade de LM permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP	
	Controle	AO 10%
0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
0,5	0,00 \pm 0,00	4,00 \pm 1,27
1	0,00 \pm 0,00	9,61 \pm 2,25
2	0,00 \pm 0,00	19,81 \pm 3,29
4	0,00 \pm 0,00	35,71 \pm 1,03
6	10,38 \pm 0,22	53,58 \pm 9,12
8	12,50 \pm 0,27	79,99 \pm 2,01
10	18,51 \pm 2,92	108,47 \pm 16,63
12	25,15 \pm 4,73	120,23 \pm 16,66
24	44,09 \pm 3,40	270,30 \pm 8,28

	PF 30% - Quantidade de LM permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP	
	Controle	AO 10%
0	0,00 \pm 0,00	0,02 \pm 0,02
0,5	0,00 \pm 0,00	6,25 \pm 1,46
1	0,00 \pm 0,00	8,12 \pm 2,03
2	0,00 \pm 0,00	9,27 \pm 0,97
4	3,74 \pm 0,72	12,25 \pm 0,34
6	7,90 \pm 0,68	16,16 \pm 1,43
8	9,76 \pm 0,87	24,19 \pm 1,23
10	11,37 \pm 1,69	28,58 \pm 2,04

12	12,73 ± 0,85	40,55 ± 1,15
24	37,26 ± 2,62	111,91 ± 7,54

*Estudos não realizados nestas concentrações

A Tabela 4.18 apresenta o resumo dos dados estatísticos para os estudos de permeação *in vitro* (Figuras 4.22 e 4.23) de 8 à 24 horas de LM (1% p/p) em gel de poloxamer a 25% (p/p) na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1, 2,5, 5 e 10% p/p) e em gel de poloxamer 20, 25 e 30% (p/p) na presença de AO 10% (p/p), respectivamente.

Tabela 4.18 – Resumo dos dados estatísticos de 8 à 24 horas dos estudos *in vitro* de permeação de LM (1% p/p) em PG, na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1; 2,5; 5 e 10% p/p) nas formulações contendo como base gel de PF-127 a 20, 25 e 30% (p/p). ^aConsiderado valor significativo para P < 0,05

Comparação	Significância ^a
Controle PF 25% x PF 25% + AO 1%	P > 0,05
Controle PF 25% x PF 25% + AO 2,5%	P < 0,001***
Controle PF 25% x PF 25% + AO 5%	P < 0,001***
Controle PF 25% x PF 25% + AO 10%	P < 0,001***
PF 25% + AO 1% x PF 25% + AO 2,5%	P < 0,001***
PF 25% + AO 1% x PF 25% + AO 5%	P < 0,001***
PF 25% + AO 1% x PF 25% + AO 10%	P < 0,001***
PF 25% + AO 2,5% x PF 25% + AO 5%	P < 0,001***
PF 25% + AO 2,5% x PF 25% + AO 10%	P < 0,001***
PF 25% + AO 5% x PF 25% + AO 10%	P < 0,001***
Controle PF 20% x Controle PF 25%	P > 0,05
Controle PF 20% x Controle PF 30%	P > 0,05
Controle PF 25% x Controle PF 30%	P < 0,05*
Controle PF 20% x PF 20% + AO 10%	P < 0,001***
Controle PF 30% x PF 30% + AO 10%	P < 0,001***
PF 25% + AO 10% x PF 20% + AO 10%	P > 0,05
PF 20% + AO 10% x PF 30% + AO 10%	P < 0,001***

PF 25% + AO 10% x PF 30% + AO 10% P < 0,001***

A Tabela 4.19 apresenta os valores de fluxo (J) de 8 à 24 horas e *lag time* *in vitro* do LM (1% p/p) para os dados de permeação *in vitro* relacionados na Tabela 4.17. O fluxo foi calculado por regressão linear e corresponde à inclinação dos pontos experimentais a partir do tempo de 8 horas, assumindo-se que a partir deste ponto o equilíbrio de difusão já estaria alcançado.

Tabela 4.19 – Valores de fluxo J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$), coeficiente de correlação (r) e *lag time* (hora)

Formulação	Fluxo (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$) \pm DP	Correlação linear (r)	<i>Lag time</i> (hora) \pm DP
Controle PF 25%	2,13 \pm 0,98	0,9898	3,06 \pm 0,88
PF 25% + AO 1%	2,94 \pm 0,37	0,9986	6,12 \pm 1,11
PF 25% + AO 2,5%	10,43 \pm 0,76	0,9925	5,91 \pm 0,50
PF 25% + AO 5%	12,84 \pm 1,33	0,9935	5,58 \pm 0,51
PF 25% + AO 10%	13,88 \pm 1,61	0,9941	3,50 \pm 0,62
Controle PF 20%	1,88 \pm 0,33	0,9753	0,19 \pm 0,64
PF 20% + AO 10%	11,86 \pm 1,10	0,9966	1,29 \pm 1,72
Controle PF 30%	1,78 \pm 0,12	0,9816	3,61 \pm 0,31
PF 30% + AO 10%	5,68 \pm 0,47	0,9939	4,48 \pm 0,47

Na Figura 4.24 está demonstrada a representação gráfica dos valores de fluxo (J) após 24 horas *in vitro* do LM (1% p/p) através da pele de orelha suína de acordo com os dados da Tabela 4.19.

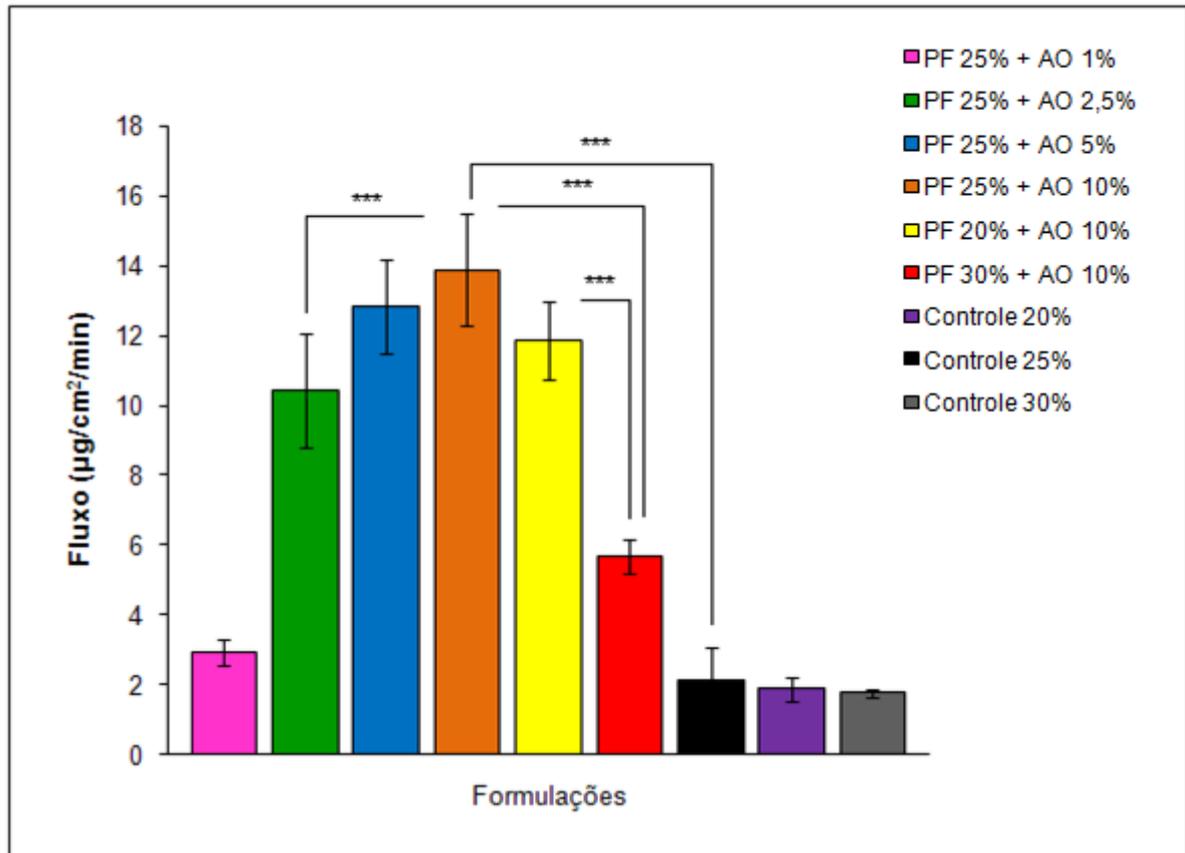


Figura 4.24 - Fluxo (J) *in vitro* após 24 horas do LM (1% p/p) através da pele de orelha suína na ausência e na presença de diferentes concentrações de AO (1; 2,5; 5 e 10%) na formulação contendo como base gel de PF-127 a 25% (p/p) e na presença de AO 10% (p/p) nas formulações contendo como base gel de PF-127 a 20 e 30% (p/p). Valores médios e seus desvios padrão, ($n = 3$) para cada grupo (significativo para $P < 0,05$). Análise estatística: one way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

4.9.2. Estudos de retenção cutânea

A Tabela 4.20 apresenta os valores de retenção médios da quantidade de LM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de LM retidas no EC e na [epiderme + derme] após 24 horas de estudos de permeação *in vitro* em pele de orelha suína, para as formulações de poloxamer 25% (p/p) com diferentes concentrações de AO (1, 2,5, 5 e 10% p/p) e para as formulações de poloxamer 20 e 30% (p/p) na presença de AO 10% (p/p).

Tabela 4.20 – Valores médios de massa ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) médio de LM retido no EC e na [epiderme + derme] após 24 horas de estudos de permeação *in vitro* em pele de orelha suína para 3 replicatas e seus desvios padrão ($n = 3$).

Formulação	Retenção EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Retenção [epiderme + derme] ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Controle PF 25%	9,16 \pm 1,44	101,08 \pm 7,55
PF 25% + AO 1%	9,63 \pm 0,75	104,13 \pm 5,65
PF 25% + AO 2,5%	9,39 \pm 0,41	123,44 \pm 4,42
PF 25% + AO 5%	8,71 \pm 0,60	141,13 \pm 7,57
PF 25% + AO 10%	14,31 \pm 0,52	199,09 \pm 4,26
Controle PF 20%	12,10 \pm 0,52	89,74 \pm 7,51
PF 20% + AO 10%	16,52 \pm 0,47	125,06 \pm 3,35
Controle PF 30%	48,14 \pm 5,97	40,02 \pm 0,63
PF 30% + AO 10%	26,69 \pm 1,45	115,22 \pm 2,88

A Figura 4.25 e 4.26 representa graficamente as quantidades de LM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retidas no EC e na [epiderme + derme], respectivamente, expressas na Tabela 4.20.

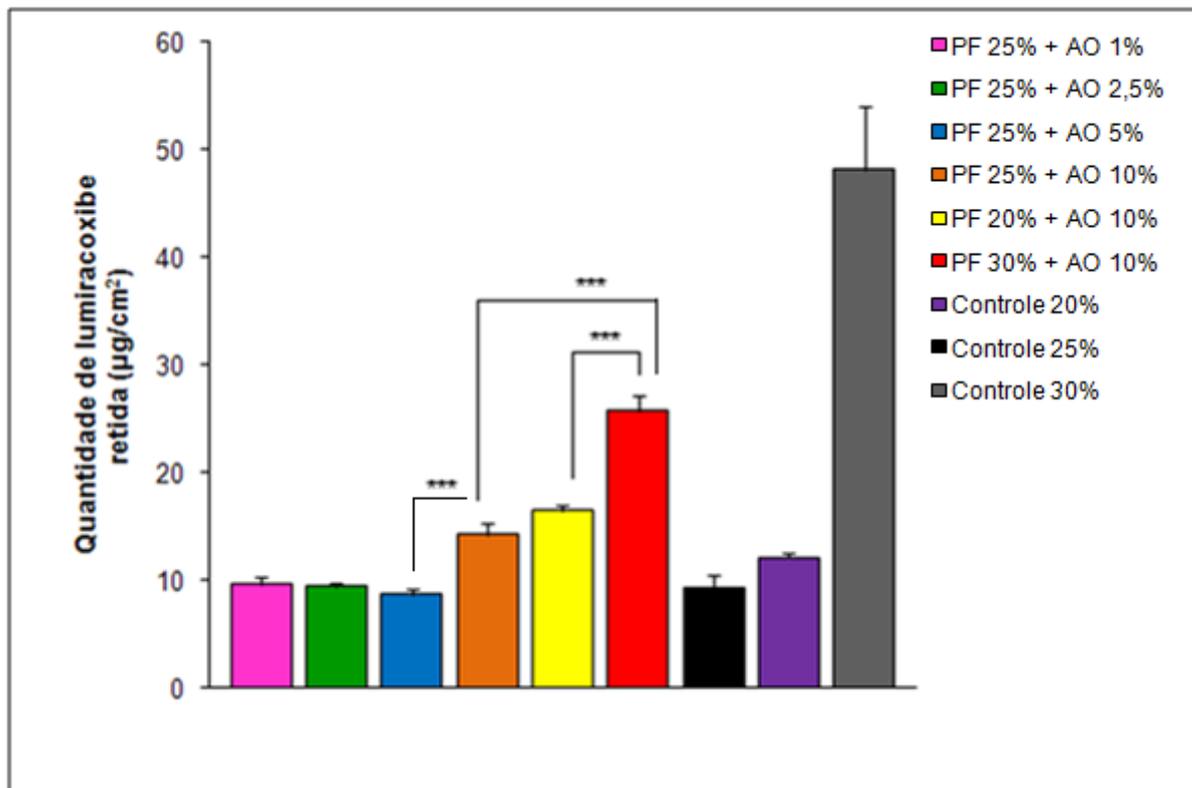


Figura 4.25 - Quantidade ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) média de LM retido no EC após 24 horas de estudos de permeação *in vitro* em pele de orelha suína para 3 replicatas e seus desvios padrão ($n = 3$). Valores considerados significativamente diferentes para $P < 0,05$. Teste estatístico: One Way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

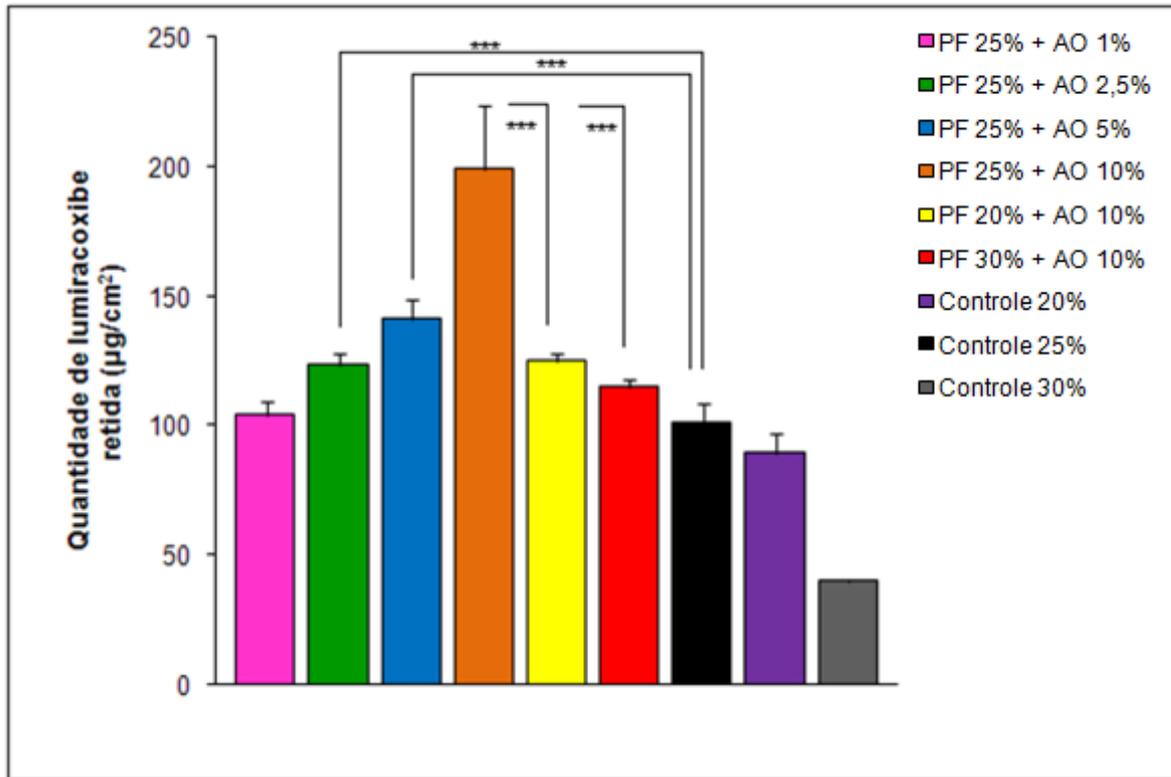


Figura 4.26 - Quantidade ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) média de LM retido na [epiderme + derme] após 24 horas de estudos de permeação *in vitro* em pele de orelha suína para 3 replicatas e seus desvios padrão ($n = 3$). Valores considerados significativamente diferentes para $P < 0,05$. Teste estatístico: One Way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

4.10. ESTUDOS DE TOXICIDADE DÉRMICA

A Figura 4.27 representa o ensaio de irritação dérmica. Pode-se observar que não houve sinal de irritação dérmica primária (a) ou cumulativa (b) nos coelhos testados, para a formulação LM 1% (p/p) + AO 10% (p/p) em PF-127 a 25% (p/p).



Figura 4.27 – Ensaio de toxicidade dérmica primária (a) e cumulativa (b) em pele de coelho.

5. DISCUSSÃO

Inibidores seletivos de COX-2 são substâncias que exercem efeitos antiinflamatórios similares aos fármacos AINEs clássicos não-seletivos, porém não causam o efeito adverso gastrointestinal (FITZGERALD & PATRONO, 2001). O perfil de segurança gastrointestinal desses fármacos foi bem caracterizado em estudos clínicos de fase III em um total de, cerca de, 35.000 pacientes (BOMBARDIER *et al.*, 2000; SILVERSTEIN *et al.*, 2000; SCHNITZER *et al.*, 2004). Recentemente, os coxibes têm sido associados a um aumento da incidência de efeitos colaterais cardiovasculares (NUSSMEIER *et al.*, 2005; SOLOMON *et al.*, 2005). Dessa forma, os coxibes são atualmente contra-indicados para pacientes com doenças cardíaca/isquêmica e vascular cerebral bem estabelecidas e devem apenas fazer uso da menor dose efetiva possível para um tratamento de curta duração. Porém, os coxibes possuem, ainda assim, grandes vantagens no tratamento da dor e inflamação em um grande número de pacientes, demonstrando uma significativa redução da toxicidade gastrointestinal e diminuição do risco de sangramento em pacientes com baixa atividade coagulante (BRUNE, 2005).

Os inibidores de COX-2 normalmente utilizados são os derivados das sulfonamidas (como o celecoxibe) ou metilsufona (como o etoricoxibe). O LM, desenvolvido para o tratamento da artrite reumatóide, osteoartrite e dor aguda, é quimicamente diferente dos outros coxibes por não possuir um grupamento sulfona e sim um ácido carboxílico, que confere à substância propriedades ácidas fracas (pKa 4,7). Esta estrutura pode explicar seu diferente perfil farmacocinético e farmacodinâmico. Este composto ácido mimetiza, aparentemente, o diclofenaco e a indometacina, os quais alcançam grandes concentrações na circulação sangüínea, rins e tecido inflamado e baixas concentrações em outros compartimentos (BRUNE & HINZ, 2004). Conseqüentemente, este fármaco é caracterizado por uma

concentração alta e sustentada no fluido sinovial em pacientes com artrite reumatóide (SCOTT *et al.*, 2004).

Recentemente, Laine e colaboradores (2008) observaram num estudo de inibidores de COX-2 que houve uma elevação do nível da enzima aminotransferase em 3% dos pacientes testados durante a utilização na dose de LM 400 mg/dia (4 vezes a dose aprovada na Europa para o tratamento da osteoartrite). Porém, nenhum aumento significativo em eventos hepáticos foi identificado durante estudos utilizando doses clínicas (LAINE *et al.*, 2008).

A utilização do LM num sistema de liberação aplicado diretamente sobre a pele poderia constituir uma alternativa mais segura no tratamento da inflamação cutânea, sem o risco de produzir os efeitos colaterais sistêmicos. Além disso, evita o metabolismo de primeira passagem pelo fígado, sendo uma vantagem adicional, pois o fármaco aplicado atua diretamente no local da inflamação.

Considerando que a maior parte das doenças inflamatórias ocorre localmente e próximas à superfície do corpo, o uso transdérmico de AINEs pode ser uma estratégia interessante para a liberação destes fármacos diretamente no local de ação desejado e também para aumentar a concentração local da substância em questão. Além disso, a COX-2 tem sua produção induzida em maior parte nos locais inflamados, e o LM tem alta afinidade por tais tecidos; o que torna ainda mais interessante a liberação transdérmica deste fármaco.

O LM foi recentemente lançado no mercado (2005) e ainda está sob proteção patentária. Portanto, para o desenvolvimento deste trabalho, o fármaco foi obtido através da extração de comprimidos comerciais de 400 mg. A técnica utilizada para extração e purificação do fármaco (item 3.2.1) foi eficaz para obtenção do princípio ativo. Após a purificação com solvente orgânico o rendimento final foi de

57,72% em massa. Assim, esta técnica foi empregada para a obtenção de todo o fármaco utilizado neste trabalho. O fármaco obtido foi caracterizado para sua utilização como substância química de referência (NOVARTIS WO 99/11605).

Para caracterização do fármaco extraído dos comprimidos foi realizada, primeiramente, a determinação do ponto de fusão. O ponto de fusão de um sólido cristalino é a temperatura na qual o sólido começa a se tornar líquido sob a pressão de uma atmosfera. Um composto orgânico cristalino puro tem um ponto de fusão bem definido com um pequeno intervalo e a presença de impurezas miscíveis ou parcialmente miscíveis faz com que essa diferença entre a primeira formação do líquido e a fusão total aumente bastante, causando o início do ponto de fusão a uma temperatura mais baixa. Um composto com alto grau de pureza tem um ponto de fusão bem definido. O ponto de fusão é usado como um ensaio preliminar para avaliar o grau de pureza de um composto, ou ajudar na sua identificação através de valores de pontos de fusão publicados em compêndios oficiais ou de substâncias químicas de referência (GIL, 2007).

A **Tabela 4.1** demonstra a faixa de fusão encontrada para o fármaco extraído e purificado. Todas as amostras de LM fundiram-se em faixas de temperatura em torno de 156 °C, estando próximas à faixa de 157,0 – 159 °C, relatada na literatura (NOVARTIS WO 99/11605).

As técnicas analíticas modernas incorporam uma série de metodologias capazes de determinar a pureza de fármacos. A espectroscopia no infravermelho, baseada em medidas de refletância, apresenta estas características e se mostra com potencial para ser empregada na monitoração da qualidade de fármacos de forma rápida e sem pré-tratamento (SCAFI & PASQUINI, 2000). Dessa forma, o espectro de infravermelho do LM obtido (**Figura 4.1**) confirmou a identidade da substância

analisada e a ausência de impurezas devido à ausência de bandas que pudessem ser atribuídas a grupos funcionais não presentes na amostra.

RMN é uma técnica instrumental que permite o estudo de diversos tipos de moléculas. Entre as orgânicas, por exemplo, são analisadas desde as mais simples até as muito complexas, como DNA, RNA, proteínas e carboidratos. A técnica auxilia no levantamento de diversas informações contidas nesses arranjos atômicos, como os tipos de átomos que os compõem, as ligações que existem entre eles, as distâncias que os separam, suas interações com outras substâncias ou presença ou ausência de impurezas (GIL & GERALDES, 1987). Esta técnica foi utilizada durante e após o processo de extração do LM para garantir a caracterização e confirmar a grau de pureza do fármaco extraído. Ambos os espectros de RMN, de hidrogênio e de carbono (**Figuras 4.2 e 4.3**), confirmaram a identidade da molécula em questão e indicaram a ausência de impurezas orgânicas na amostra obtida em laboratório.

Após a obtenção do fármaco por extração e sua caracterização pelos ensaios já descritos foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação do teor desta substância. A molécula de LM possui um grupamento ácido carboxílico, que confere à molécula propriedades ácidas fracas (pKa 4,7) (BRUNE & HINZ, 2004). Devido a esta forte característica, foi determinado o teor do fármaco extraído através de titulação de neutralização ácido-base, utilizando NaOH 0,1 M como titulante. Cada 1 mL de NaOH 0,1 M consumiu 29,362 mg de LM. A **Tabela 4.2** demonstra os resultados obtidos com a análise do teor de LM em 5 replicatas e análise do branco através da titulação de neutralização ácido-base. Tendo em vista os resultados satisfatórios na análise da matéria-prima de LM, esta foi utilizada como padrão de trabalho no decorrido estudo, com pureza estabelecida de

97,89%. Assim, se considerou o LM obtido adequado para condução do estudo em questão.

Para a avaliação do coeficiente de partição, parâmetro que determina a afinidade do fármaco entre uma fase aquosa tamponada e uma fase oleosa, pele e estrato córneo, foi necessário o desenvolvimento e validação de um método por CLAE para quantificar o LM na fase aquosa devido à ausência de descrição oficial de métodos quantitativos para análise do fármaco. Tentou-se, primeiramente devido à similaridade estrutural, reproduzir as condições de ensaio estabelecidas para análise cromatográfica de diclofenaco de sódio pela Farmacopéia Brasileira, porém não era obtida linearidade e o cromatograma exibia picos negativos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2001). Para o desenvolvimento desta metodologia foram feitos diversos outros testes preliminares afim de escolher a composição e fase móvel adequada (**Tabela 4.3**). A FM escolhida foi a que continha as seguintes proporções: tampão fosfato 0,1 M pH 7,4:H₂O:ACN (100:400:500) por ser a condição em que o pico apresentou base mais estreita e menor tempo de retenção, o que possibilita um maior número de análises no dia (**Figura 4.4**). A vazão da fase móvel foi ajustada em 1,0 mL/min.

De acordo com o espectro de absorção no UV realizado no cromatógrafo provido com detector UV-FDI (**Figura 4.5**), selecionou-se o comprimento de onda de 278 nm para obtenção dos cromatogramas para análise quantitativa. Nesse comprimento de onda, não foi observada a presença de interferentes, além de ser uma região de elevada absorvidade do fármaco.

Afim de garantir que os métodos selecionados forneçam informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação de procedimentos

analíticos, foram avaliados neste trabalho os parâmetros da validação: seletividade/especificidade, linearidade e precisão.

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar de modo inequívoco o analito de interesse na presença de componentes que possam interferir em sua determinação. A especificidade de um método é definida como sua capacidade de detectar apenas uma única substância de interesse. Como há poucos métodos com esta característica, o termo seletividade é o mais apropriado e mais comumente usado (RIBANI, *et al.*, 2004).

De acordo com as **Figuras 4.6** e **4.7**, pode ser observado que a seletividade/especificidade foi comprovada. Na **Figura 4.6** pode ser visto que o espectro obtido em 2,60 minutos não apresenta diferenças significativas dos espectros obtidos em 2,50 e 2,70 minutos, mostrando a ausência de interferentes. Já na **Figura 4.7**, é visto um gráfico do tipo “*ratioqram*” retangular, mostrando que a razão foi constante e próxima a 0, mas maior que o ruído (*threshold*) comprovando, mais uma vez, a seletividade do método.

A linearidade de um método analítico é a capacidade de se demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo de concentração especificado. A correlação é avaliada através de tratamento estatístico adequado, como cálculo da regressão linear (ANVISA, 2003).

Verificou-se a linearidade dos métodos através da determinação de uma curva de calibração com cinco níveis de concentração em dois dias diferentes (**Figura 4.8**). A análise da regressão linear dos dados foi realizada e os parâmetros da curva foram calculados. Os coeficientes de correlação obtidos, apresentados na **Tabela 4.4**, foram adequados, demonstrando boa linearidade do método na faixa de 10 – 50

$\mu\text{g/mL}$ de LM. A análise da regressão linear mostrou intercepto estatisticamente não diferente de zero para os primeiro dia de análise, com nível de significância de 5% (valor de P do intercepto maior do que 0,05). A análise estatística do intercepto para o segundo dia de análise demonstrou um resultado pouco significativo (Valor P do intercepto menor que 0,05, porem maior que 0,01). Apesar disso, seu valor representa um pequeno valor da concentração de trabalho. Com a linearidade comprovada pelo coeficiente de correlação próximo a 1 e pelo intercepto não significativo, nos dias sucessivos de análise, a curva foi preparada com apenas os três pontos intermediários.

A precisão de um método é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas repetidas e pode ser expressa como desvio padrão relativo (ANVISA, 2003). Os valores obtidos (**Tabela 4.5**), avaliados nos 5 níveis da curva-padrão, foram satisfatórios, ou seja, menores que 5% (ANVISA, 2003), demonstrando boa precisão do método. Para cálculo do DP e do DPR, foram utilizadas as áreas, embora as concentrações teóricas não fossem exatamente as mesmas, uma vez que, a cada dia, uma nova solução mãe foi preparada, com uma massa de LM ligeiramente diferente.

A precisão do volume de injeção (**Tabela 4.6**) também demonstrou ser adequada, uma vez que nenhum dos valores de DPR encontrados para cada concentração analisada foi maior que 2% (USP 31, 2008).

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003). O LQ calculado foi de $4,27 \mu\text{g/mL}$ e o LD foi de $1,28 \mu\text{g/mL}$.

Os resultados da validação da metodologia por CLAE foram bastante satisfatórios. Dessa forma, o método se mostrou eficaz para ser empregado na análise quantitativa de LM no coeficiente de partição.

Procedeu-se, dessa forma, a análise do coeficiente de partição do LM em relação a uma fase oleosa ($K_{O/T}$), à pele ($K_{P/T}$) e ao EC ($K_{EC/T}$) com um meio aquoso tamponado de acordo com a metodologia descrita em 3.2.5.

O coeficiente de partição é normalmente usado para descrever a forma pela qual um composto se distribui entre duas fases. O valor do coeficiente para a distribuição de um composto entre dois solventes, por exemplo, é uma constante a uma dada temperatura. Normalmente, o grau de lipofilicidade, que pode ser expresso através do coeficiente de partição aparente entre octanol e uma solução aquosa (água ou tampão), tem sido reconhecido como um fator chave na absorção percutânea. O coeficiente de partição é um parâmetro pH-dependente e muda de acordo com o grau de ionização da molécula (RUBAS & CROMWELL, 1997).

Os fármacos que apresentam excessiva hidrofiliicidade ou lipofilicidade não demonstram um transporte passivo ótimo através da pele e outras barreiras biológicas. O grau de lipofilicidade é um dos parâmetros chave que define a biodisponibilidade de fármacos topicamente aplicados. Neste estudo, o coeficiente de partição do LM foi determinados como uma medida relacionada a esta propriedade, a fim de verificar o comportamento do LM em meio oleoso, em relação à pele e ao EC. A análise do coeficiente de partição principalmente em relação à uma fase oleosa foi necessária devido a ausência de descrição oficial desses valores.

Como já mencionado anteriormente, os valores de coeficiente de partição expressam o grau de lipofilicidade do LM ($K_{O/T}$), o grau de afinidade entre o LM e a

pele ($K_{P/T}$) e o grau de afinidade entre o LM e o EC ($K_{EC/T}$). Os valores obtidos para K estão representados na **Figura 4.9** e na **Tabela 4.7**.

Os resultados do $K_{O/T}$ confirmaram a alta afinidade do fármaco pela fração apolar e, portanto, sua alta lipofilicidade. E os resultados do $K_{P/T}$ e $K_{EC/T}$ demonstram a baixa afinidade do fármaco pela pele e pelo estrato córneo, confirmando a função de barreira da pele exercida principalmente pelo estrato córneo (ELIAS, 1983; BOMMANNAN *et al.*, 1990; POTTS & FRANCOEUR, 1991). Além disso, os resultados encontrados foram estatisticamente iguais ($P > 0,05$) entre $K_{P/T}$ e $K_{EC/T}$. Ainda, o valor de coeficiente de partição óleo/tampão encontrado para o LM está de acordo com o descrito para o diclofenaco (13,4), pois a presença de uma metila no lugar de um hidrogênio e de um flúor no lugar de um cloro eleva ligeiramente a lipofilicidade do LM em relação ao diclofenaco.

A pele apresenta limitações quanto à penetração de fármacos topicamente aplicados. Vários métodos vêm sendo utilizados na tentativa de melhorar a permeação cutânea, tanto pelo desenvolvimento de novos veículos como pela adição de substâncias que promovam o aumento da penetração cutânea. Os sistemas de liberação transdérmicos são sistemas/formulações que quando aplicados na pele intacta permitem a passagem de fármacos através desta, liberando-os em velocidade controlada.

O poloxamer é extensivamente utilizado no campo farmacêutico na forma de gel como um sistema de liberação de fármacos (KABANOV & ALAKHOV, 2002). Sua característica temperatura-dependente e seu comportamento de gelificação termorreversível já está bem esclarecido. De fato, o poloxamer possui a habilidade de se modificar em meio aquoso de um bloco de moléculas (monômeros) de copolímero à micelas. Esses monômeros formam soluções em água abaixo da concentração

micelar crítica (cmc), enquanto que acima desta concentração ocorre o fenômeno de agregação, culminando no processo de “micelinização”. A elevadas temperaturas esses sistemas demonstram separação de fases, o que se deve à completa desidratação dos blocos de óxido de propileno e óxido de etileno (GOLDSTEIN, 1984). Diferentes propostas já foram feitas para explicar este fenômeno. A transição sol-gel já foi correlacionada com mudanças intrínsecas nas propriedades das micelas, ou à variação entrópica das moléculas ordenadas próximo aos segmentos poli-óxido de propileno, ou à possibilidade de formação de uma estrutura tridimensional e com ligação cruzada capaz de segurar a água na sua rede (BONACUCINA *et al.*, 2007). Então, os processos de “micelinização” e gelificação dependem de fatores como: temperatura, concentração do polímero, de comprimento do bloco de poli-óxido de etileno (PANDIT & WANG, 1998).

Sendo o EC uma barreira à penetração de fármacos na/atraves da pele, pode-se considerar a utilização de promotores de penetração uma interessante proposta para otimizar a penetração cutânea de fármacos. Outros autores já demonstraram que os promotores de penetração podem alterar a composição e/ou organização dos lipídios do EC, diminuindo assim a função de barreira e proporcionando uma adequada difusão dos fármacos através da pele (SANTUS & BAKER, 1993). Uma interessante classe de compostos, os ácidos graxos, tem sido utilizada como promotores de penetração cutânea, principalmente devido à presença destas substâncias como componentes naturais da pele e de outras membranas do corpo.

O ácido oléico (AO) apresenta 3 características importantes: (1) a cabeça polar formada pelo grupo carboxila, (2) presença de 18 átomos de carbono em cadeia linear e (3) uma única dupla ligação. A presença do grupo carboxila no AO fornece

uma maior facilidade para este composto se misturar nas regiões lipídicas ou protéicas e, portanto, possuir uma alta afinidade para lipídios (KAMP & HAMILTON, 1992). O principal mecanismo de ação do AO é a perturbação da função de barreira da pele, seja desordenando os domínios lipídicos intercelulares ou induzindo à separação de fases nos domínios lipídicos do EC, resultando no aumento da permeabilidade para muitos fármacos (TOUITON *et al.*, 1998; MOSER *et al.*, 2001)

As concentrações de poloxamer escolhidas para condução dos estudos (20, 25 e 30% p/p) foram feitas com base nas concentrações usuais utilizadas na literatura para a obtenção de sistemas de liberação controlada. (CHEN-CHOW & FRANK, 1981; VEYRIES *et al.*, 1999; PAAVOLA *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2002; NAIR & PANCHAGNULA, 2003; RICCI *et al.*, 2002, 2005). Além disso, a variação da concentração de AO estudada está de acordo com a literatura. A concentração máxima não tóxica de AO recomendada para utilização em formulações de aplicação tópica é de 10% (p/p) (TANOJO, 1994). Após a definição e manipulação das formulações a serem estudadas (item 3.2.6.1) as mesmas foram submetidas a ensaios para determinação de suas características físicas.

Procedeu-se conforme descrito em 3.2.6.2 para análise reológica dos géis. Foi observado na **Tabela 4.8** e **Figuras 4.10** que a viscosidade das formulações propostas aumentou com o aumento da concentração de poloxamer e AO. A presença do LM promoveu um ligeiro aumento na viscosidade dos sistemas quando comparado com o controle (gel de poloxamer sem AO). Além disso, o comportamento reológico observado permite afirmar que o gel de poloxamer possui um comportamento pseudoplástico, ou seja, sua viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e o gel se torna mais fluído, o que facilita o fluxo do seu material de embalagem. Ainda, já foi comprovado que este tipo de comportamento melhora a

espalhabilidade da formulação (BRUMMER & GODERSKY, 1999; CORRÊA *et al.*, 2005).

O aumento da concentração do polímero de 20 a 30% (p/p) torna o gel mais viscoso, o que pode modificar a liberação do LM do gel. O processo de liberação do fármaco de uma preparação farmacêutica depende da dissolução do fármaco a partir do gel para o meio aquoso, e os géis mais viscosos liberam o fármaco mais lentamente que os menos viscosos. Os géis mais viscosos possuem a dissolução mais lenta e uma liberação mais sustentada do fármaco (RICCI *et al.*, 2002). Também a presença de LM e o aumento da concentração de AO promoveu um aumento na viscosidade para todas as concentrações do gel. Este fato pode ser atribuído à diminuição da quantidade de água na formulação, resultado da adição de AO. O sistema desenvolvido provavelmente promoveu a formação de um sistema emulsionado, onde as micelas são formadas, aumentando o grau de rigidez da estrutura do gel. Essas observações são aplicáveis também aos estudos das temperaturas de transição sol-gel.

O comportamento termorreversível e não tóxico dos poloxameres estimulou o desenvolvimento de várias formas farmacêuticas e diferentes aplicações para o tal polímero. Porém, é claro que o controle da liberação do fármaco a partir da formulação contendo poloxamer depende da rigidez final do “termogel”, o que é proporcional à concentração do polímero. Já é comprovado que o aumento da concentração do polímero promove diminuição da temperatura de gelificação, fazendo com o que o sistema se torne um semi-sólido já à temperatura corporal.

Para determinação da temperatura de transição sol-gel de cada formulação proposta, inicialmente, foi necessária a escolha da tensão de trabalho para a análise oscilatória. Este ensaio permite visualizar a região viscoelástica linear para uma dada

amostra e, conseqüentemente, a escolha da tensão a ser utilizada no ensaio oscilatório. Acima de uma certa amplitude de tensão a rede tridimensional do gel é destruída. Por isso, medidas acima deste nível não avaliam, de maneira relevante, as propriedades físicas do gel.

Este ensaio foi realizado com o branco de todas as concentrações do gel de poloxamer propostas para o trabalho (PF 20%, PF 25% e PF 30%). A freqüência foi fixada em 1 Hz e as amostras foram submetidas ao stress na faixa de 5 a 1200 Pa. De acordo com a **Figura 4.11** pôde-se observar que a tensão para romper a malha do gel aumentou de acordo com o aumento da concentração do polímero e, conseqüentemente, de sua viscosidade. Além disso, para cada concentração de poloxamer, G' e G'' são constantes entre 5 e 80 Pa. Por isso, foi escolhida a tensão de 10 Pa, por ser uma região seguramente viscoelástica, para trabalhar nos ensaios de temperatura de gelificação.

O ensaio de temperatura de gelificação permite a determinação da temperatura de transição sol-gel e da quantificação do aumento do caráter elástico das amostras. A temperatura de transição sol-gel é caracterizada por um drástico aumento em G' e G'' . Nesta temperatura o valor de G' medido é a metade do valor de G' para solução e metade do valor de G' para um gel (BONACUCINA *et al.*, 2007). A **Tabela 4.9** informa a temperatura de transição sol-gel para todas as formulações desenvolvidas e a **Figura 4.12** demonstra o perfil da mudança das características elásticas (valores de G') de cada formulação em função da variação da temperatura. Já é estabelecido que a temperatura de transição sol-gel pode ser alterada com a adição de diferentes substâncias (MILLER & DRABIK, 1984; GILBERT *et al.*, 1987; EDSMAN *et al.*, 1998; RICCI *et al.*, 2002). Observando os gráficos pode-se perceber que, com a presença de LM, assim como com o aumento da concentração do

polímero e de AO, ocorre um aumento nos valores de G' (característica elástica) e, conseqüentemente, diminuição na temperatura de transição sol-gel. Além disso, as três concentrações dos géis contendo AO 5,0% e 10,0% e também PF 30% AO 2,5% não exibiram temperatura de transição sol-gel, ou seja, já possuíam forma de gel a baixas temperaturas. A ausência da característica termorreversível representa apenas uma perda de uma vantagem farmacotécnica, ou seja, a manipulação se torna mais fácil quando a formulação está na forma líquida permitindo a incorporação dos adjuvantes. Porém, não constitui um limitante da eficácia da formulação.

Os parâmetros reológicos e as temperaturas de transição sol-gel foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) para os géis contendo a mesma concentração do polímero, porém diferentes concentrações de AO, diferente dos géis em branco (0% p/p LM e 0% p/p AO) em relação os controles (1% p/p LM e 0% p/p AO).

Na avaliação da liberação e permeação *in vitro* de produtos farmacêuticos contendo fármacos com baixa solubilidade em água, soluções receptoras (SR) contendo surfactantes ou solventes orgânicos são necessárias para garantia de solubilidade adequada, ou seja, para manutenção da condição *sink* (SKELLY *et al.*, 1987). Segundo recomendação do FDA (U.S. FDA/CDER, 1997), misturas tamponadas com adição de tensoativos até 5 % (p/v) podem ser utilizadas como meio receptor em estudos de liberação e permeação *in vitro*, quando o fármaco for muito pouco hidrossolúvel.

Devido à baixa solubilidade do LM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, evidenciada com o alto K_{OT} , analisou-se a solubilidade do LM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 na presença de diferentes concentrações de polissorbato (PS) (**Figura 4.13**). Na **Tabela 4.10** estão apresentados os valores de concentração de saturação de LM nas SR testadas. Nas soluções com PS 80 obteve-se extensiva formação de

espuma, o que poderia ocasionar a formação de bolhas, interferindo no processo de liberação ou permeação *in vitro*. Portanto, a escolha da SR foi feita utilizando PS 20. A solubilidade determinada para LM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 na presença de PS 20 (3,0% p/v) à temperatura ambiente, após 24 horas de agitação, foi de 340,7 µg/mL. Para a escolha da SR deve-se levar em consideração a liberação total da quantidade de LM colocada no compartimento doador, o volume de SR a ser utilizado nas células de difusão adaptada. Dessa forma, pode-se afirmar que a condição *sink* foi obedecida com a SR escolhida. Além disso, a SR selecionada é compatível com o método analítico empregado, possibilitando a injeção direta das amostras no sistema cromatográfico eleito para quantificação do fármaco (SHAH *et al.*, 1999).

Devido à inaplicabilidade do método utilizado para quantificação de LM nos ensaios de coeficiente de partição devido à presença do tensoativo na solução tampão e à necessidade de seletividade para detecção de LM na pele, foi necessário o desenvolvimento e a validação da metodologia analítica empregada para a condução dos estudos de liberação e permeação *in vitro* e quantificação de LM na SR selecionada e na pele. Após tentativas de adequação do sistema cromatográfico à fase estacionária e à FM, a FM selecionada foi ACN:tampão fosfato 0,01 M pH 2,5 (500:500) pois permitiu uma boa seletividade com um tempo de retenção adequado aos propósitos do presente trabalho (**Figura 4.14**). A fase estacionária foi de fase reversa C₈, fluxo de 1,0 mL/min, o que resultou em um tempo de retenção de cerca de 7,6 minutos e uma pressão no sistema monitorada de cerca de 1300 psi.

De acordo com o espectro de absorção no UV-Vis, realizado no cromatógrafo provido com detector UV-FDI (**Figura 4.15**), selecionou-se o comprimento de onda de 278 nm para obtenção dos cromatogramas para análise

quantitativa. Nesse comprimento de onda, não foi observada a presença de interferentes, além de ser uma região de elevada absorvidade do fármaco.

A fim de garantir que os métodos selecionados forneçam informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação de procedimentos analíticos, foram avaliados neste trabalho os parâmetros da validação: seletividade, linearidade e precisão.

Na **Figura 4.16** está representado o cromatograma do branco, ou seja, apenas com a injeção da solução receptora. Pode-se observar que nenhum pico é detectado no tempo de retenção esperado para o LM. De acordo com as **Figuras 4.17 e 4.18**, pode ser observado que a seletividade/especificidade foi comprovada. Na **Figura 4.17** pode ser visto que o espectro obtido em 7,60 minutos não apresenta diferenças significativas dos espectros obtidos em 7,20 e 8,00 minutos, mostrando a ausência de interferentes. Já na **Figura 4.18**, é visto um gráfico do tipo “*ratioqram*” retangular, mostrando que a razão foi constante e próxima a zero, porém maior que o ruído (*threshold*) comprovando, mais uma vez, a seletividade do método.

Verificou-se a linearidade dos métodos através da determinação de uma curva de calibração com cinco níveis de concentração em dois dias diferentes (**Figura 4.19**). A análise da regressão linear dos dados foi realizada e os parâmetros da curva foram calculados.

Na avaliação da precisão os valores de área obtidos (**Tabela 4.11**), foram avaliados nos 5 níveis da curva-padrão, foram satisfatórios, ou seja, menores que 5% (ANVISA, 2003), demonstrando boa precisão do método. Para cálculo do DP e do DPR, foram utilizadas as áreas, embora as concentrações teóricas não fossem exatamente as mesmas, uma vez que, a cada dia, uma nova solução mãe foi preparada, com uma massa de LM ligeiramente diferente.

Os coeficientes de correlação obtidos, apresentados na **Tabela 4.12**, foram adequados, demonstrando boa linearidade do método na faixa de 4 – 200 µg/mL de LM. A análise da regressão linear mostrou intercepto estatisticamente não diferente de zero para os dois dias de análise, com nível de significância de 5% (valor de P do intercepto maior do que 0,05). O LQ calculado foi de 0,68 µg/mL e o LD foi de 0,20 µg/mL.

Os resultados da validação da metodologia por CLAE foram bastante satisfatórios. Dessa forma, o método se mostrou eficaz para ser empregado na análise quantitativa de LM na SR para os estudos de liberação e permeação *in vitro*.

De acordo com os resultados apresentados nas **Tabelas 4.13 e 4.14** as taxas de recuperação foram bastante satisfatórias, ainda que, no geral, a recuperação na [epiderme + derme] foi maior do que no EC. Os desvios padrão entre os três experimentos realizados para cada nível também foram considerados aceitáveis para o método bioanalítico, ou seja, menor que 15% (SHAH *et al.*, 1992; ANVISA, 2003), caracterizando adequada precisão do mesmo para os objetivos do estudo.

Embora o teste de dissolução tenha sido inicialmente desenvolvido e seja reconhecidamente importante para as formas farmacêuticas sólidas, ultimamente a aplicação desse teste atinge uma grande variedade de outras formas farmacêuticas. Para as formas não orais, como por exemplo os supositórios, óvulos vaginais, cremes, géis e adesivos transdérmicos, é comum se referir ao teste como teste de liberação do fármaco ou teste de liberação *in vitro*. Os princípios gerais relativos aos testes de dissolução referentes às formas farmacêuticas sólidas também se aplicam para as outras formas farmacêuticas. O objetivo principal dos testes é análogo ao das formas sólidas, ou seja, utilizar o ensaio para avaliar o comportamento do produto e

como forma de assegurar a qualidade lote a lote dentro das especificações estabelecidas (SIEWERT *et al.*, 2003).

Os ensaios de liberação *in vitro* para produtos semi-sólidos devem ser realizados empregando células de difusão, membrana sintética e SR adequada. A membrana sintética serve como suporte para separar a formulação da SR, deve ser quimicamente inerte para não reagir com a formulação ou com a SR, além de não ser limitante da velocidade nos processos de liberação do fármaco (U.S.FDA/CDER, 1997).

A liberação sustentada de uma formulação semi-sólida vem recebendo grande atenção das indústrias farmacêuticas devido as grandes vantagens frente aos sistemas de liberação tradicionais, como prolongamento da duração da ação, redução ou eliminação de efeitos colaterais, redução da frequência de administração e, conseqüentemente, maior adesão dos pacientes e normalmente maior eficiência na liberação dos fármacos (DANCKWERTS & FASSIHI, 1991; PANG, 1998; PEPAS, 2000). A **Figura 4.20** é a representação gráfica das formulações controle e do fármaco disperso em PG. Pode-se observar que o perfil de liberação do LM através da membrana artificial é mais sustentado, à medida que ocorre o aumento na concentração de poloxamer. O controle de LM em PG foi o que liberou maior quantidade do fármaco em todos os tempos testados. Assim, de acordo com o que já foi descrito na literatura, é possível comprovar que os sistemas contendo poloxamer promovem uma liberação mais sustentada do fármaco ao longo do tempo (KATAKAM *et al.*, 1997; VEYRIES *et al.*, 1999; PAAVOLA *et al.*, 2000). Vários autores já demonstraram que a liberação controlada de fármacos aumenta seu efeito terapêutico. Inclusive, já é bem reconhecido o potencial do gel de poloxamer na

liberação tópica sustentada de antiinflamatórios (MIYAZAKI *et al.*, 1995; SHIN *et al.*, 2000).

Na **Tabela 4.15** estão apresentadas as massas médias de LM encontradas no estudo de liberação, utilizando membrana de acetato de celulose, em cada tempo de coleta de amostra de SR, calculadas pela área de exposição da formulação, para cada concentração de gel PF-127. A **Figura 4.20** representa os perfis de liberação de LM a partir dos géis de poloxamer controles sem AO nas três concentrações testadas e também um controle sem poloxamer e AO, sendo somente o LM disperso em propilenoglicol (PG). Pode-se observar que o controle do LM em PG foi o que apresentou maior liberação de LM nos tempos testados exceto no tempo de 24 horas, onde as quantidades liberadas de LM não foram estatisticamente diferentes entre o controle de PG e os controles de PF 25 ou 30% (p/p). Na **Figura 4.21** observa-se a representação gráfica do perfil de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas.

A variação na viscosidade do gel formado pode alterar a dissolução e o processo de liberação do LM a partir da formulação. O processo de liberação da formulação depende da dissolução do gel no meio aquoso (RICCI *et al.* 2005). Os géis de maior viscosidade (PF 20, 25 e 30% + AO 10% p/p) apresentaram menor liberação do LM do que os géis menos viscosos. Além disso, pode-se observar que para todas as concentrações de poloxamer o perfil de liberação do LM nos géis contendo diferentes concentrações de AO foram semelhantes, porém, as taxas de liberação do LM foram diferentes para os tempos entre 2 e 12 horas. Basicamente, ao aumentar a concentração do polímero e do AO na formulação se promove o aumento da viscosidade, ao mesmo tempo em que se reduz a taxa de liberação de LM. Isso ocorre devido ao aumento no tempo de difusão do fármaco através da matriz do gel (RICCI *et al.* 2005). Desse modo, pode-se observar que para todas as concentrações

de poloxamer estudadas, as formulações contendo AO 10% (p/p) foram as que apresentaram menor quantidade de LM liberada (**Figura 4.21**).

O teste de liberação *in vitro* não é preditivo para avaliação de bioequivalência entre formulações semi-sólidas (U.S.FDA/CDER, 1997) por que uma maior quantidade de fármaco liberado pela formulação nos experimentos *in vitro* não é garantia de maior disponibilidade de fármaco no local de ação, face às particularidades da penetração cutânea de fármacos de produtos semi-sólidos. As características de permeação de cada formulação irão ditar a quantidade de fármaco presente em cada camada de pele.

Na **Tabela 4.17** estão apresentadas as quantidades médias de LM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) encontradas no estudo de permeação *in vitro*, utilizando membrana natural (pele de orelha suína), em cada tempo de coleta de amostra de SR, calculadas pela área de exposição, para cada concentração de gel PF-127. As **Figuras 4.22 e 4.23** representam graficamente os dados demonstrados na **Tabela 4.17**. Estão demonstrados os perfis de permeação em pele de orelha suína do LM (1% p/p) na presença de diferentes concentrações de AO (1, 2,5, 5 e 10,0% p/p) na formulação contendo como base gel de PF-127 a 25% (p/p) e o perfil de permeação em pele de orelha suína do LM (1% p/p) na ausência e na presença de AO 10% (p/p) nas formulações contendo gel de PF-127 a 20 e 30% (p/p), respectivamente. Os controles de PF 20, 25 e 30% (gel com 1% p/p LM sem AO) também estão representados. Pode-se observar na **Figura 4.22** e na **Tabela 4.18** que a quantidade de LM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através da pele de orelha suína após 24 horas foi significativamente maior para formulação com PF 25% (p/p) contendo 1% ($P < 0,05^*$), 2,5% ($P < 0,001^{***}$), 5% ($P < 0,001^{***}$) e 10% (p/p) ($P < 0,001^{***}$) de AO comparados ao controle (1% de LM em poloxamer na ausência de AO). Ao mesmo tempo, houve diferença estatisticamente

significativa entre as formulações contendo 1, 2,5, 5 e 10% (p/p) de AO ($P < 0,001^{***}$). Para o sistema de liberação contendo PF 25% (p/p), a formulação que proporcionou maior quantidade de LM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) permeada através da pele de orelha suína após 24 horas foi a que continha 10% (p/p) de AO, comprovando a eficácia desta substância como promotor de penetração cutânea nesse sistema.

Desta forma, procedeu-se a análise da permeação cutânea apenas para as formulações contendo 10% (p/p) de AO também nos géis de poloxamer 20 e 30% (p/p). Na **Figura 4.23 (Tabela 4.12)** pode-se observar que não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre a formulação de PF 25% + AO 10% comparada com a PF 20% + AO 10% após 24 horas de permeação. Além disso, a formulação de PF 30% + AO 10% mostrou que a permeação cutânea de LM foi significativamente menor após 24 horas comparada às outras formulações de PF 20 e 25% contendo AO 10% (p/p). Assim, os sistemas de liberação que apresentaram maior permeação cutânea para o LM foram aqueles formulados com gel PF 20 e 25% (p/p) contendo AO 10 % (p/p).

O fluxo J , ou a velocidade de difusão do fármaco através da pele em função do tempo é representado pela inclinação da porção linear da curva de permeação do fármaco em estudo. O *Lag time* representa o tempo necessário para que a passagem de uma substância através de uma membrana atinja o equilíbrio (SHAH, 1993; AULTON, 2005). O *lag time* tanto quanto o fluxo foram influenciados pela quantidade de AO presente no gel de poloxamer. Os resultados apresentados na **Tabela 4.19 e Figura 4.24** mostram que com o aumento da concentração de AO, há um aumento no J e diminuição do *lag time*. Este aumento do fluxo é significativo entre as formulações contendo poloxamer 25% com 2,5, 5 e 10% de AO em relação ao seu controle sem AO ($P < 0,001^{***}$). Porém, o valor de J foi em torno de 2 vezes maior,

para as formulações de poloxamer a 20 e 25% (p/p) contendo 10% (p/p) de AO ($P < 0,001^{***}$) em relação ao poloxamer 30% (p/p) contendo a mesma concentração de AO. Não houve diferença estatística significativa para o fluxo entre as formulações PF 25% + AO 5 e 10% quando comparada à PF 20% + AO 10% ($P < 0,05^*$). Portanto, as formulações que apresentaram maior fluxo foram as que continham AO 10% (p/p) e poloxamer 20 e 25% (p/p). O *lag time* foi em torno de 2,7 vezes maior para a formulação de poloxamer 20% (p/p) em relação à de poloxamer 25% (p/p). Ainda na **Tabela 4.19** pode-se observar uma correlação linear (r) da quantidade de LM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) permeada em função do tempo, caracterizando um modelo difusional.

A fim de avaliar a quantidade de LM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida no EC e na [derme + epiderme] foi feita a avaliação da recuperação de LM adicionado à fita e aos segmentos de [epiderme + derme] suína por meio da comparação das respostas obtidas nas amostras e nas soluções contaminadas correspondentes a cada nível de massa de LM total adicionada.

Em relação à retenção do LM no EC (**Tabela 4.20** e **Figura 4.25**), a quantidade de LM retida no EC entre as formulações PF 25% + AO 10% e PF 20% + AO 10% não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$), enquanto que a formulação PF 30% + AO 10% promoveu maior retenção quando comparada com as formulações de poloxamer 20 e 25% (p/p) com 10% (p/p) de AO ($P < 0,001^{***}$). A quantidade de LM retida no EC para formulação controle (sem AO) contendo 30% (p/p) de poloxamer foi bastante alta quando comparada com os outros controles, provavelmente devido à ausência do AO e à alta viscosidade da formulação. Dessa forma, a liberação do LM é mais sustentada e a quantidade de LM liberada não atinge à epiderme viável, ficando retida no EC devido à ausência do promotor de penetração cutânea. Por outro lado, a quantidade de LM retida na

[epiderme + derme] (**Tabela 4.20 e Figura 4.26**) foi significativamente maior para as formulações contendo poloxamer 25% (p/p) com 2,5, 5 e 10% (p/p) de AO quando comparadas ao seu controle também sem AO. Entre as formulações PF 25% (p/p) contendo 5 ou 10% (p/p) de AO houve diferença significativa ($P < 0,001^{***}$), sendo que a retenção da formulação contendo AO 10% (p/p) foi em torno de 1,4 vezes maior quando comparada à concentração de AO 5% (p/p). A formulação que apresentou maior retenção na [epiderme + derme] foi aquela contendo AO 10% (p/p).

Apesar de o aumento da quantidade de AO na formulação promover o aumento da viscosidade e, ao mesmo, reduzir a taxa de liberação de LM devido ao prolongamento da difusão do fármaco através da matriz do gel, pode-se observar que as formulações contendo 10% de AO proporcionaram uma maior penetração através da pele. Além disso, a menor retenção de LM no EC em relação à retenção na [epiderme + derme] e o aumento da quantidade de LM retida na [epiderme + derme] de acordo com o aumento da concentração de AO na formulação, podem ser explicados pelo efeito promotor de penetração cutânea do AO. Sendo um perturbador da barreira, o AO pode interagir facilmente com os lipídeos intercelulares do EC, facilitando a transposição desta barreira pelo LM, atingindo assim as camadas mais profundas da pele, ou seja, a epiderme viável.

Mesmo tendo demonstrado um *lag time* 2 vezes maior que a PF 20% + AO 10% a formulação eleita foi a PF 25 % + AO 10%, por ter promovido maior fluxo, maior quantidade de LM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) permeada e retida na [epiderme + derme] e quantidade relativamente baixa de LM retida no EC. Ainda, apesar de a alta viscosidade apresentada por esta formulação ter provocado uma menor liberação de LM, foi a que proporcionou maior quantidade de LM permeada através da pele suína devido à ação promotora do AO. Também, apesar de a concentração utilizada de AO

(10% p/p) ter influenciado na temperatura de gelificação, fazendo com que a formulação já se apresentasse na forma de gel à temperatura ambiente, sua utilização e aplicabilidade não foram descartadas, pois este fator não é determinante para eficácia da formulação.

Sabe-se que o estrato córneo constitui a principal barreira à penetração de fármacos através da pele, enquanto, a epiderme e a derme se comportam como um gel aquoso e não apresentam função significativa de barreira, sendo marcantes seus efeitos reservatórios. É importante conhecer exatamente o grau de penetração, pois para determinados princípios ativos, uma penetração profunda pode provocar intoxicações (LE HIR, 1997; BONNABRY, 1999). De acordo com a literatura, o acúmulo de fármacos antiinflamatórios no tecido está diretamente relacionado com o fluxo e com a absorção percutânea, já que o tecido serviria como reservatório para a posterior passagem do fármaco para a circulação sistêmica (SING & ROBERTS, 1994; GARCIA *et al.*, 2001). E este fato é particularmente interessante no caso do fármaco estudado pois, por ser um antiinflamatório, se destina ao tratamento da dor e da inflamação que acomete, normalmente, sítios como músculo, líquido sinovial além de tecidos superficiais. Além disso, estudos já revelaram que o LM parece possuir uma maior afinidade pelo tecido inflamado (MYSLER, 2004).

Os ensaios de toxicidade dérmica foram realizados com a formulação PF 25% + AO 10%. Tanojo e colaboradores (1994) já haviam demonstrado que sistemas contendo 5 a 10% de AO em PG eram mais eficazes como sistemas de liberação tópicos. Dados da literatura revelam que a utilização de formulações contendo 5% ou mais de AO não promoveram mudanças morfológicas na epiderme quando o estrato córneo permaneceu intacto. Porém, promoviam aumento da expressão do RNAm da interleucina 1 (IL-1 – citocina pró-inflamatória) após 6 horas de contato com a pele

(BOELSMA *et al.*, 1996). Sendo o LM um fármaco antiinflamatório, pode-se sugerir que a formação desta citocina seria evitada pela inibição da enzima ciclooxigenase e, assim, o efeito de irritabilidade seria anulado pela ação do fármaco.

O ensaio de toxicidade dérmica realizado demonstrou não haver sinal de irritação na pele dos coelhos utilizados (**Figura 4.27**). Este teste demonstrou a segurança da formulação proposta para a utilização como um medicamento de uso diário.

Estudos de biodisponibilidade *in vivo* demonstraram que o LM administrado via oral na dose de 400 mg/dia é capaz de atingir um pico de concentração plasmática de, aproximadamente, 6 µg/mL em um intervalo de 2 horas ($T_{MÁX}$) (MYSLER, 2004). Posteriormente o fármaco é rapidamente distribuído para os tecidos e eliminado lentamente. No presente estudo, a concentração do fármaco atingida na SR após 24 horas de ensaio de permeação cutânea *in vitro* foi, em torno de, 3 µg/mL com a aplicação de 200 mg da formulação eleita, ou seja, PF 25% + AO 10%. Esta concentração alcançada poderia ser considerada uma concentração segura, visto que constitui metade da concentração encontrada no pico de concentração plasmática máximo ($C_{MÁX}$) quando o fármaco é administrado via oral, e que neste caso a aplicação e a ação do fármaco se dá diretamente no local de ação. Além disso, a concentração alcançada na SR após 24 horas pela formulação proposta foi 15 vezes maior que a concentração plasmática alcançada pelo diclofenaco a 1%, no mesmo tempo, quando aplicado na forma de Voltarem Emulgel[®] (SINTOV & BOTNER, 2006).

O desenvolvimento de sistemas de liberação que proporcionem uma adequada liberação e retenção do LM na pele constituem uma maneira de otimizar a terapia tópica das inflamações, já que a atividade antiinflamatória neste caso é dependente da concentração do fármaco no tecido alvo. Além disso, a liberação

transdérmica de LM constitui uma alternativa interessante e inovadora para o tratamento da dor inflamatória, artrite reumatóide e artrose já que existe uma carência no mercado de formas farmacêuticas semi-sólidas para fármacos COX-2 seletivos.

6. CONCLUSÕES

- O método aplicado na extração de LM, a partir de comprimidos comerciais de Prexige® 400 mg, foi eficaz para obtenção do fármaco com elevado grau de pureza e confiabilidade para ser utilizado no desenvolvimento de novas formulações.
- Os ensaios de coeficiente de partição demonstraram a alta afinidade do fármaco pela fração apolar e, portanto, sua alta lipofilicidade (K_{OT}), a baixa afinidade do fármaco pela pele (K_{PT}) e pelo estrato córneo (K_{ECT}), confirmando a função de barreira da pele exercida principalmente pelo estrato córneo.
- O sistema de liberação proposto contendo AO e poloxamer apresentou um comportamento reológico pseudoplástico, facilitando o fluxo da formulação a partir do material de embalagem e melhorando sua espalhabilidade. O aumento da concentração de polímero e de AO provocou um aumento na viscosidade do sistema, ao mesmo tempo em que diminuiu a temperatura de transição sol-gel; significando que o sistema, em alguns casos, como no caso da formulação escolhida (PF 25% + AO 10%), já se encontrava na forma de gel à baixas temperaturas. A ausência da característica termorreversível representa apenas uma perda de uma vantagem farmacotécnica e não constitui um limitante da eficácia da formulação.
- Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que com o aumento da concentração de AO e de polímero ocorreu a diminuição da liberação de LM. Isso, provavelmente, está atribuído ao aumento da viscosidade do sistema que, dessa forma, reduziu a taxa de liberação de LM devido ao prolongamento da difusão do fármaco através da matriz do gel. Assim, os sistemas de liberação formulados com gel PF 20, 25 e 30% contendo AO 10% apresentaram menor liberação do LM.

- Os estudos de permeação cutânea *in vitro* demonstraram perfis de permeação semelhantes, porém com diferentes inclinações (fluxos) e *lag times*. O aumento da concentração de AO (de 1 para 10% p/p) aumentou a permeação cutânea de LM, sendo que os maiores fluxos foram observados para as formulações de poloxamer 20 e 25% (p/p) contendo 10% (p/p) de AO (diferença não significativa entre eles $P > 0,05$).
- Os estudos de retenção cutânea *in vitro* demonstraram que as formulações que proporcionaram uma maior retenção no EC e na [epiderme + derme] foram PF 30% + AO 10% e PF 25% + AO 10%, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os experimentos de permeação cutânea *in vitro*, onde a formulação contendo 30% (p/p) de poloxamer e 10% (p/p) de AO apresentou menor permeação cutânea e aquela contendo 25% (p/p) de poloxamer e 10% (p/p) de AO apresentou a maior permeação cutânea.
- O efeito promotor de penetração cutânea do AO foi evidenciado, garantindo a permeação de um fármaco com alta lipofilicidade, superando a barreira representada pelo EC, atingindo as camadas da epiderme viável [epiderme + derme] e apresentando maior retenção nesta porção da pele. Desse modo, pôde-se verificar o efeito reservatório da epiderme viável, contribuindo para o aumento do efeito sustentado.
- Apesar de apresentar um *lag time* 2 vezes maior que a formulação PF 20% + AO 10%, a formulação eleita foi a PF 25% + AO 10%, por ter promovido maior fluxo, maior quantidade de LM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) permeada e retida na [epiderme + derme] e quantidade relativamente baixa de LM retida no EC.

- Os estudos de toxicidade dérmica demonstraram não haver sinal de irritação na pele dos coelhos utilizados e confirmaram a segurança da formulação proposta para a utilização como um medicamento de uso diário.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-S Aidan, S. M. Transdermal self-permeation enhancement of ibuprofen. **Journal of Controlled Release**, vol. 100, p. 199-209, 2004.
- ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. **Journal of Controlled Release**, vol. 77, p. 17-25, 2001.
- ANVISA. Resolução RDC n. 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 24 de fevereiro de 2008.
- ANVISA. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 24 de fevereiro de 2008.
- ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, vol. 3, p. 36-41, 2000.
- ASSANDRI, A.; CANALI, S.; GIACHETTI, C.; Local tolerability and pharmacokinetic profile of a new transdermal delivery, diclofenac hydroxyethylpyrrolidine plaster,. **Drugs Experimental Clinical Research**, vol. 19, p. 89-95, 1993.
- AULTON, M. E.; **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2ª Edição, Editora Artmed, Porto Alegre, 2005, p.513-531.
- AUNGST, B. J.; ROGERS, N. J.; SHEFTER, E. Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, vol. 33, p. 225-234, 1986.
- AZULAY, R.D.; & AZULAY, D.R. **Dermatologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.
- BARICHELLO, J. M. *et al.* Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.184, 189–198, 1999.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- BASF Technical Data on pluronic polyols, BASF, Wyandotte, MI (Publication No. OS-796)
- BENNETT, S. L.; BARRY, B. W. Effectiveness of skin penetration enhancers propylene glycol, azone, decylmethyl sulphoxide and oleic acid with model polar (mannitol) and nonpolar (hydrocortisone) penetrants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, vol 37, p.84, 1987..
- BENTLEY, M. V. L. B. *et al.* Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 193, p. 49-55, 1999.

- BENTLEY, M. V. L. B. *et al.* The influence of lecithin and urea on the in vitro permeation of hydrocortisone acetate through skin from hairless mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 146, p. 255-262, 1997.
- BENTLEY, M. V. L. B., VIANNA, R. F., KEDOR, E. R. M., Use of poloxamer gels as vehicle for cutaneous drug delivery: in vitro evaluation of skin retention and percutaneous absorption through hairless mouse skin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 47, p. 1128, 1995.
- BOELSMA, E. *et al.* Assessment of the potential irritancy of oleic acid on human skin: Evaluation in vitro and in vivo. **Toxicology in Vitro**, vol. 10, p. 729-742, 1996.
- BOMBARDIER, C. *et al.* VIGOR Study Group. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. **New England Journal of Medicine**, vol. 323, p. 1520-1528, 2000.
- BOMMANNAN, D.; POTTS, R. O.; GUY, R. H. Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy. **The Journal for Investigative Dermatology**, vol.95, n. 4, p. 403-408, 1990.
- BONACUCINA, G. *et al.* Effect of hydroxypropyl β -cyclodextrin on the self-assembling and thermogelation properties of Poloxamer 407. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 32, p. 115-122, 2007.
- BONINA, F. P. *et al.* In vitro percutaneous absorption evaluation of phenobarbital through hairless mouse, adult and premature human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 98, p. 93-99, 1993.
- BONNABRY, C. Mise au point et validation de modeles d'étude *in vitro* du passage percutané – Université d'auvergne – UFR de pharmacie, 1999.
- BORSADIA, S. *et al.* Factors to be considered in the evaluation of bioavailability and bioequivalence of topical formulations. **The Journal of Clinical Pharmacology**, vol.5, p.129-145, 1992.
- BOS, C. L. *et al.* Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 36, p.1187-1205, 2004.
- BOUCAUD, A. *et al.* In vitro study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, vol 228, p. 69-77, 2001.
- BROMBERG, L. E.; RON, E. S.; Temperature-responsive Gels and Thermo gelling Polymer Matrices for Protein and Peptide Delivery. **Advanced Drug Delivery** , vol. 31, 197–221, 1986.
- BRUMMER, R.; GODERSKY, S.; Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects**, vol. 152, p. 89–94, 1999.

- BRUNE, K. . COX-2 selective inhibitors—they are still the best treatment for many patients! **Swiss Medicine Weekly**, vol. 43, p. 467-478, 2005.
- BRUNE, K.; HINZ, B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities und differences. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, vol 33, p. 1-6, 2004.
- CABANA, A.; AIT-KADI, A.; JUHASZ, J.; Study of the Gelation Process of Polyethylene Oxide-Polypropylene Oxide-Polyethylene Oxide Copolymer (Poloxamer 207) Aqueous Solution. **Journal of Colloidal & Interface Science**, vol.190, p.307-312, 1997.
- CHEN-CHOW, P.; FRANK, S. G. In vitro release of lidocaine from Pluronic F127 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 8, p. 89–100, 1981
- CLEMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J. P. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated w/o emulsions, **Journal of Controlled Release**, vol. 66, p. 243-254, 2000.
- CORRÊA, N. M.C *et al.*, Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, p. 73-78, 2005.
- CRYER, B.; FELDMAN, M.; Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used non-steroidal anti-Inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**, vol 104, p.413-421,1998.
- CURDY, C. *et al.* Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion, **Journal of Controlled Release**, vol. 76, p. 73-79, 2001.
- DANCKWERTS, M. S.; FASSIHI, A. Implantable controlled release drug delivery systems: a review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, vol. 17, p. 1465-1502, 1991.
- DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- DEGIM, I. T. *et al.* The effects of azone and capsaicin on the permeation of naproxen through human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 179, p. 21-25, 1999.
- DOWNING, D. T. *et al.* Partition of sodium dodecyl sulfate into stratum corneum lipid liposomes. **Archives of Dermatological Research**, vol. 285, p. 151-157, 1993.
- EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETERSON, R.; Rheological evaluation of efficacy in poloxamer as a in situ gel for ophthalmic use. **European. Journal of Pharmaceutical Science**, vol. 6, p.105–112, 1998.
- ELIAS, P.M. Epidermal lipids, barrier function and desquamation. **The Journal of Investigative Dermatology**, vol. 80, p. 44s-49s, 1983.

- ESCOBAR-CHAVEZ JJ, QUINTANAR-GUERRERO D, GANEM-QUINTANAR A., In vivo skin permeation of sodium naproxen formulated in pluronic F-127 gels: effect of Azone and Transcutol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, vol 31, p.447-54, 2005.
- ESSER *et al.*, Preclinical pharmacology of lumiracoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. **British Journal of Pharmacology**, vol.144, p. 538-550, 2005.
- FARKOUH, M. E.; Comparison of lumiracoxibe with naproxen and ibuprofen in the therapeutic arthritis research and gastrointestinal event trial (TARGET), cardiovascular outcomes: randomized controlled trial. **The Lancet**, vol. 364, p. 675-684, 2004.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. Monografia Diclofenaco de sódio, 4ª ed., São Paulo: Atheneu, p.144, 2001.
- FIALHO, S. L.; JUNIOR, A. S. C. Iontoforese no transporte ocular de fármacos. **Arquivo Brasileiro de Oftamologia**, vol. 67, p. 839-845, 2004.
- FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C.; The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2, **National English Journal of Medicine**, vol. 345, p.333-442, 2001.
- FITZPATRICK, F. A.; SOBERMAN, R.; Regulated formation of eicosanoids. **Journal of Clinical Investigation**, vol.107, p.1347-1351, 2001.
- FRANCOEUR, M. L.; GOLDEN, G. M.; POTTS, R. O. Oleic acid: its effects on stratum corneum in relation to (trans) dermal drug delivery. **Pharmaceutical Research**, vol. 7, p. 621-627, 1990.
- FRICKE, J.; DAVIS, N; Y. U., KRAMMER, G. Lumiracoxib 400 mg compared with celecoxib 400 mg and placebo for treating pain following dental surgery: A randomized controlled trial. **The Journal of Pain**, vol. 9, p. 20-27, 2008.
- GALER, B. S. *et al.* Topical diclofenac patch relieves minor sports injury pain: results of a multicenter controlled trial. **Journal of Pain and Symptom Management**, vol. 19, N° 4, p.287-294, 2000.
- GARCIA, M. T. J. *et al.* Ketoprofen transdermal delivery from lipid/propylene glycol system: *in vitro* permeations studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 13, s.129, 2001.
- GHAFOURIAN, T. *et al.* The effect of penetration enhancers on drug delivery through skin: a QSAR study. **Journal of Controlled Release**, vol. 99, p. 113-125, 2004.
- GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**, 2ª edição, Ed PHARMABOOKS, 2007, São Paulo.
- GIL, V. M. S.; GERALDES, F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear - Fundamentos, Métodos e Aplicações**, Fundação Calouste Gulbenkian, Coimbra, 1987.

- GILBERT, J. C. *et al.* The effect of solutes and polymer on the gelation properties pluronic F-127 solution for controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, vol. 5, p.113–118, 1987.
- GOLDSTEIN, R. E. 1984. On the theory of lower critical solution pointing hydrogen-bonded mixtures. **Journal of Chemical Physics**, vol. 80, p. 5340, 1984
- GOODMAN, M., BARRY, B. W. Action of penetration enhancers on human skin as assessed by the permeation of model drugs 5-fluorouracil and estradiol. I. Infinite dose technique. **J. Invest. Dermatol.**, New York, vol. 91, p. 323, 1988.
- GUENSENS, P. *et al.* Efficacy, safety, tolerability of lumiracoxibe in patients with rheumatoid arthritis: results of a randomized, double-blind study. **Arthritis Rheumatoid**, vol. 48 (Suppl. 9): 242, 2003.
- GUY, R. H. *et al.* Iontophoresis: electropulsion and electrosmosis. **Journal of Controlled Release**, vol.64, p. 129-132, 2000.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 224, p. 1-18, 2001.
- HADGRAFT, J.; BEUTNER, D. In vivo-in vitro comparisons in the transdermal delivery of nitroglycerin. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 89, p. R1-R4, 1993.
- HAIGH, J. M.; SMITH, E. W. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 2, p. 311-330, 1994.
- HARADA, K. *et al.* Role of intercellular lipids in stratum corneum in the percutaneous permeation of drugs. **The Journal for Investigative Dermatology**, vol. 99, n. 3, p. 278-282, 1992.
- HARRY, R. G. **Cosmetologia de Harry**: Editora Diaz de Santos, 1990, Madrid, p. 3-22.
- HAWKEY, *et al.* Gastrointestinal Tolerability of Lumiracoxib in Patients With Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, vol. 4, p. 57-66, 2006.
- HAWKEY, C. J. *et al.* Effect of risk factors on complicated and uncomplicated ulcers in the TARGET lumiracoxib outcomes study. **Gastroenterology**, vol. 133, p. 57-64, 2007.
- HOELGAARD, A.; MOLLGAARD, B.; BAKER, E. Vehicle effect on topical drug delivery. IV. Effect of N-methylpyrrolidone and polar lipids on percutaneous drug transport. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, vol. 43, p. 233-240, 1988.
- ILLEL, B. Formulation for transfollicular drug administration: some recent advantages. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 14, p. 207-219, 1997.

- JIANG, S. J.; ZHOU, J. X. Examination of the mechanism of oleic acid-induced percutaneous penetration enhancement: an ultrastructural study. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 26, p. 66-68, 2003
- JOHNSTON, T. P.; MILLER, S.; Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular uses, **Parenteral Drug Association**, vol. 39, p. 83-88, 1985.
- JUNGINGER, H. E.; HOLLAND, H. E. J.; BOUSTRA, J. Lipossomas e niossomas: interações com a pele humana. **Cosmetics & Toiletries**, vol. 4, p. 19-25, 1992.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. P. 272-280.
- KABANOV, A. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® block copolymer in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, vol. 19, p. 1-73, 2002.
- KAMP, F.; HAMILTON, J. F. pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids, **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online**, vol. 89, p. 11367–11370, 1992.
- KANTARIA, S.; REES, G. D. and LAWRENCE, M. J. Gelatin-stabilized microemulsion-based organogels: rheology and application in iontophoretic transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, vol. 60, p. 355-365, 1999.
- KATAKAM, M.; RAVIS, W. R.; BANGA, A. K. Controlled release of human growth hormone in rats following parenteral administration of poloxamer gels. **Journal of Controlled Release**, vol. 49, p. 21-26, 1997
- KIM, E. *et al.* hEGF/HP-β-CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 233, p. 159-167, 2002.
- KOU, J. H. *et al.* Effect of receiver fluid pH on in vitro skin flux of weakly ionizable drugs. **Pharmaceutical Research**, vol. 10, n. 7, p. 986-990, 1993.
- LAINE, L. *et al.* COX-2 Selective Inhibitors in the Treatment of Osteoarthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, *In press*, 2008.
- LARRUCEA, E.; ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 52 (2), p. 113-9, 2001.
- LE HIR, A. Noções de Farmácia Galênica, 6º edição, organização Andrei Editora Ltda., 1997.
- LEVANG, A. K.; ZHAO, K., SINGH, J. Effect of ethanol/propylene glycol on the in vitro percutaneous absorption of aspirin, biophysical changes and acroscopic barrier properties of the skin **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 181, p. 255-263, 1999.

- LEVIN, J.; MAIBACH, H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *Journal of Controlled Release*. Vol. 103, p. 291-299. 2005.
- LOFTSSON, T.; GILDERSLEEVE, N.; BODOR, N. The effect of vehicle additives on the transdermal delivery of nitroglycerin. **Pharmaceutical Research.**, vol 4, p. 436-437, 1987.
- LOFTSSON, T.; GILDERSLEEVE, N.; SOLIMAN, R.; BODOR, N. Effect of oleic acid on diffusion drugs through hairless mouse skin. **Acta Pharmaceutical Nord.**, vol. 1, p. 17-22, 1989b.
- LOFTSSON, T.; SIMOGYI, G.; BODOR, N. Effect of choline esters and oleic acid on the penetration of acyclovir, estradiol, hydrocortisone, nitroglycerin, retinoic acid and trifluororthymidine across hairless mouse skin in vitro. **Acta Pharmaceutical Nord.**, vol 1, p. 279-286, 1989a.
- LOPEZ, R. F. V *et al.* Iontophoresis delivery of 5-aminolevulinic acid esters: potential application in the photodynamic therapy of skin cancer?. **Photochemistry and Photobiology**, vol. 77, n 3., 2003b
- LOPEZ, R. F. V *et al.* Iontophoresis delivery of 5-aminolevulinic acid: effect of pH. **Pharmaceutical Research**, vol. 18, p. 311-315, 2001.
- LOPEZ, R. F. V *et al.* Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. **Journal of Controlled Release**, vol. 88, p. 65-70, 2003a.
- LOZANO-CUENCA, J.;CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; GRANADOS-SOTO, V. Peripheral and spinal mechanisms of antinociceptive action of lumiracoxib, **European Journal of Pharmacology**, vol. 513, p. 81-9, 2005.
- MAIER, J. A.; HLA, T.; MACIAG, T. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 265 (19), p.10805–10808, 1990.
- MAJIMA, M.; *et al.* Cyclooxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. **British Journal of Pharmacology**, Vol. 130, p.641–649, 2000.
- MATCHABA, P. *et al.* Cardiovascular safety of lumiracoxib: A meta-analysis of all randomized controlled trials ≥ 1 week and up to 1 year in duration of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Clinical Therapeutics**, vol. 27, p. 1196–1214, 2005.
- MERLIE, J. P. *et al.* Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, p. 3550–3553, 1988.
- MEYER, W. *et al.* Observations on the actual structural conditions in the stratum superficiale dermidis of porcine ear skin, with special reference to its use as

- model for human skin. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, vol. 189, p. 143-156, 2007.
- MILLER, S. C.; DRABIK, B. R. Rheological properties of poloxamer neous absorption of piroxican from the poloxamer gel in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 22, p. 207-218., 1984.
- MITRAGOTRI, S. et al. Transdermal drug delivery using low frequency sonophoresis. **Pharmaceutical Research**, vol. 13, p. 411–420, 1996.
- MITRAGOTRI, S.,KOST, J. Low-frequency sonophoresis: a noninvasive method of drug delivery and diagnostics. **Biotechnology Progress**, vol. 16, p. 488-92, 2000.
- MIYAZAKI, S. *et al.* Anti-tumor effect of pluronic F-127 gel containing mitomycin C on sarcoma-180 ascites tumor in mice. **Chemical Pharmacology** , vol. 40 (8), p. 2224-2226, 1992.
- MIYAZAKI, S., *et al.* Percutaneous absorption of indomethacin from pluronic F-127 gels in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 47, 455–457, 1995
- MOORE, T. *et al.* Experimental Investigation and Mathematical Modeling of Pluronic F127 Gel Dissolution: Drug release in Stirred Systems", **Journal of Controlled Release**; vol. 67, p. 191-202, 2000.
- MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous Absorption and delivery systems. **Clinics in dermatology**, v.19, p.489-501, 2001.
- MORITA *et al.* Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and 2. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 210, n. 18, p. 10902-10908, 1995.
- MOSER, K. *et al.* Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 52, p. 103-112, 2001.
- MYSLER, E. Lumiracoxib (Prexige_): a new selective cox-2 inhibitor, **International Journal of Clinical Practice**, vol. 58, p. 606-611, 2004.
- NAIK, A. N. *et al.* Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement in vivo in humans. **Journal of Controlled Release**, vol. 37, p. 299-306, 1995.
- NAIR V, PANCHAGNULA R.; Poloxamer gel as vehicle for transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin: evaluation of in vivo performance in rats. **Pharmacological Research**, vol 47, p. 555-562, 2003.
- NOMURA, H. *et al.* Percutaneous absorption of indomethacin from mixtures of fatty alcohol and propylene glycol (FAPG bases) through rat skin: Effects of oleic acid added to FAPG base. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 38, p. 1421-1424, 1990.

- NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGS-GESELLSCHAFT MBH. Roger Aki Fugimoto, Benjamin Mugrare, Leslie Wighton Mcquire, John Henry Van Duzer. Certain 5-alkyl-2-arylaminophenylacetic acids and derivates. WO 99/11605, 26 agosto 1998.
- NUSSMEIER, O. E. *et al.* Efficacy and safety of the cyclooxygenase 2 inhibitors parecoxib and valdecoxib in patients undergoing coronary artery bypass surgery. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, vol. 125, p. 1481-1492, 2003.
- O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; OBENCHAIN, J. R.; GALLIPEAU, J. A. R.; D'ARECCA, M. A.; BUDAVARI, S.; **The Merck Index – An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals**. 3^a Edição, Editora Merck & CO., INC., Whitehouse Station, NJ, 2001.
- OGISO, T., SHINTANI, M. Mechanism for the enhancement effect of fatty acids on the percutaneous absorption of propranolol. **The Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 79, p. 1065-1071, 1990.
- PAAVOLA, A. Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 199, p. 85-93, 2000.
- PANDIT, N. K.; WANG, D. Salt effect on the diffusion and release rate of propranolol from Poloxamer 407 gel. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 167, p. 183-189, 1998.
- PANG, D. C. Advances in drug delivery. **Pharmaceutical Technology**. Vol. 22, p. 62-68, 1998.
- PANUS, P. C. *et al.* Transdermal iontophoretic delivery of ketoprofen through human cadaver skin and in humans. **Journal of Controlled Release**, vol. 44, p. 113-121, 1997.
- PARK, Y. *et al.* Effect of sodium chloride on the release, absorption and safety of diclofenac sodium delivered by poloxamer gel. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 263, p. 105-111, 2003.
- PATEL, R. K.; LESWELL, P. F., GENERAL PRACTICE STUDY GROUP; Comparison of ketoprofen, piroxicam, and diclofenac gels in the treatment of acute soft-tissue injury in general practice. **Clinical Therapeutics**, vol. 18, p. 497-507, 1996.
- PATEL, V. A.; DUNN, M. J.; SOROKIN, A.; Regulation of MDR-1 (P glycoprotein) by cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, p. 38915–38920, 2002.
- PATRONO, C.; PATRIGNANI, P.; GARCIA, R.; Cyclooxygenase selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 108, p.7-13, 2001.
- PEPAS, N. A. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 50,p. 27–46, 2000

- PILLAI, O., PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of insulin from poloxamer gel: ex vivo and in vivo skin permeation studies in rat using iontophoresis and chemical enhancers. **Journal of Controlled Release**, vol. 14, p. 127-40, 2003.
- POTTS, R. O.; FRANCOEUR, M. L. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. **The Journal for Investigative Dermatology**, vol. 96, n. 4, p. 495-499, 1991.
- POTTS, R. O.; GUY, R. H. Predicting skin permeability. **Pharmaceutical Research**, vol. 9, p. 663-669, 1992.
- PRESCOTT, S. M.; Is Cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 105 p.1511–1513, 2000.
- PRISTA, L. N. *et al.*, **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.
- RADERMACHER, J. *et al.* Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, vol. 31, p. 537-541, 1991.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Farmacologia**: 4^a Edição, Editora Guanabara Koogan S.A., 1999, Rio de Janeiro, p.189.
- RASHIR, S. J.; MAIBACH, H. I. **Cutaneous metabolism of xenobiotics**. In Bronaugh RI, Maibach HI, editors. New York: Marcel Dekker Inc., 1999:57– 64.
- REIFENRATH, W. G. *et al.* Evaluation of animal models for predicting skin penetration in man. **Fundamental and Applied Toxicology**, vol. 4, p. S224-230, 1984
- RHEE, Y. *et al.* Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 228, p. 161-170, 2001.
- RIBANI, M. *et al.* Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, n^o 5, p. 771-780, 2004.
- RICCI, E. J. *et al.* Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 17, p. 161-167, 2002.
- RICCI, E. J. *et al.* Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 288, p. 235-244, 2005.
- RUBAS, W.; CROMWELL, M. E. M. The effect of chemical modifications on octanol/water partition (log D) and permeabilities across Caco-2 monolayers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 23, p. 157-162, 1997.
- SANTUS, G. C.; BAKER, R. W. Transdermal enhancer patent literature. **Journal of Controlled Release**, vol. 25, p. 1-20, 2003.

- SATO, K. *et al.*, Eccrine sweat glands. **Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin**, Oxford Universit Press, Nova Yorque, p. 741-762.
- SCAFI, S. H. F.; PASQUINI, C. Avaliação do uso da espectroscopia no infravermelho próximo na identificação de medicamentos, Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, 23 a 26 de maio de 2000 na cidade de Poços de Caldas, MG, 23º reunião anual da sociedade brasileira de química, <http://www.sbg.org.br/ranteriores/23/resumos/0453/index.html>.
- SCHEUPLEIN, R. J. *et al.* Percutaneous absorption of steroids. **Journal of Investigative Dermatology**, vol.52, p. 63-70, 1969.
- SCHMOLKA, I. R. Artificial skin. I. preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. **The Journal of Biomedical Materials Research**, vol. 6, 571–582, 1972.
- SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 215, p. 51-56, 2001.
- SCHNITZER, T. J. *et al.* Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial. **The Lancet**, vol. 354, p. 665-674, 2004.
- SCOTT, G. *et al.* Pharmacokinetics of lumiracoxib in plasma and synovial fluid. **Clinical Pharmacokinetics**, vol. 43, p. 467-478, 2004.
- SHAH, V. P. *et al.* Determination of in vitro drug release form hydrocortisone creams. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 53, p. 53-59, 1989.
- SHAH, V. P. *et al.* In vitro release of hydrocortisone from topical preparations and automated procedure. **Pharmaceutical Research**, vol. 8, n. 1, p. 55-59, 1991a.
- SHAH, V. P. *et al.* In vivo percutaneous penetration / absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 74, p. 1-8, 1991b.
- SHAH, V. P.; ELKINS, J.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development Technology**, vol. 4, n. 3, p. 377-385, 1999.
- SHAH, V.P. *et al.* Bioavailability and bioequivalence of transdermal drug delivery systems. In Shah e Maibach: Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration. Nova lorque: Plenum Press, 1993. P. 415-424.
- SHARMA, P. K.; BHATIA, S. R.; Effect of Anti-Inflammatories on Pluronic® F127: Micellar Assembly, Gelation and Partitioning. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 278, p. 361–377, 2004.
- SHAWESH A. *et al.* Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical formulations of indomethacin and rheological behavior of these formulations. **Pharmazie.**, vol 57, p. 186-90, 2002.

- SHIN, S. C., CHO, C. W., OH, I. J., Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.17, p. 213–218, 2000.
- SIEWERT, M *et al.* FIPAAPS Guidelines for dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. **Dissolution Technology**, vol. 10, n. 1, p. 6-15, 2003.
- SILVERSTEIN, F. E. *et al.* Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: a randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. **Journal of the American Medical Association**, vol. 284, p. 1247-1255, 2000.
- SING, P.; ROBERTS, M. S. Skin permeability and local tissue concentration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 286, p. 144-151, 1994.
- SINTOV, A. C.; BOTNER, S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 311, p. 55-62, 2006.
- SKELLY, J. P. *et al.* FDA and AAPS Report of the workshop on principles and practices of *in vitro* percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence. **Pharmaceutical Research**, vol. 4, n. 3, p. 265-267, 1987..
- SMITH, E. W.; MAIBACH, H. I.; **Percutaneous Penetration Enhancers**, CRC Press, Florida, p. 277-278, 1995.
- SNYDER, L. K.; KIRKLAN, J. J.; GLAJCH, J. L.; Practical HPLC method development. 2^a ed., John Wiley & Sons, p. 77-79, 1997.
- SOLOMON, S. D. *et al.* Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. **New England Journal of Medicine**, vol. 352, p. 1071, 2005
- SQUIER, C. A.; COX, P.; WERTZ, P. W. Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 96, p. 123-126, 1991.
- SRIDEVI, S.; DIWAN, P. V. R. Optimized transdermal delivery of ketoprofen using pH and hydroxypropyl- β -cyclodextrin as co-enhancers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 54, p. 151-154, 2002.
- STOLINA, M. *et al.* Specific Inhibition of Cyclooxygenase-2 Restores Anti-tumor Reactivity by Altering the Balance of IL-10 and IL-12 Synthesis. **Journal of Immunology** , vol. 164, p.361– 370, 2000.
- STOTT, P. W.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Transdermal delivery from eutetic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. **Journal of Controlled Release**, vol. 50, p. 297-308, 1998.

- SUHONEN *et al.* Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release**. Vol. 59, p.149–161, 1999
- SURBER, C. *et al.* Partitioning of chemicals into human stratum corneum: Implications for risk assessment following dermal exposure. **Fundamental and Applied Toxicology**, vol. 15, p. 99-107, 1991.
- TANOJO, H. *et al.* In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: a laser Doppler velocimetry study. **Journal of Controlled Release**, vol. 58, p. 97-104, 1999.
- TOKUDOME, Y.; SUGIBAYASHI, K. The synergic effects of various electrolytes and electroporation on the in vitro skin permeation of calcein. **Journal of Controlled Release**, vol. 92, p. 93-101, 2003.
- TORCHILIN, V. P. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. **Pharmaceutical Research**, vol 24, p. 1-16, 2007.
- TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, vol. 56, p. 7-21, 1998.
- U.S. FDA/CDER. Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation. 1997.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. General chapters, *high-pressure-liquid chromatography*. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.
- VANBEVER, R.; LEROY, M.; PREAT, V. Transdermal permeation of neutral molecules by skin electroporation. **Journal of Controlled Release**, vol. 54, p. 243-250, 1998.
- VANCE, JOHN R.; BOTTING, REGINA M.; Mechanism of Action of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. **The American Journal of Medicine**, vol. 104 (3A), p.2S-8S, 1998.
- VANE, J. R.; BOTTING, R. M.; Mechanism of Action of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. **The American Journal of Medicine**, vol. 104 (3A), p.2S-8S, 1998.
- VARGHESE, E.; KHAR, R. K. Enhanced skin permeation of diclofenac by iontophoresis: in vitro and in vivo studies. **Journal of Controlled Release**, vol. 38, p. 21-27, 1996.
- VEYRIES, M. L. *et al.* Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 192, p.183-193, 1999.
- VOLTAREM EMULGEL[®]: Diclofenaco emulgel, São Paulo: Novartis Biociências S.A., 1993, Bula.

- WARD, A. J. L.; DU REAU, C. Modeling permeability properties of skin. **Cosmetics & Toiletries**, vol. 105, p. 53-59, 1990.
- WILGUS, T. A.; ROSS, M. S.; PARRETT, M. L.; OBERYSZYN, T. M.; Topical application of selective cyclooxygenase suppresses UVB **Mediated Cutaneous Inflammation. Prostaglandins & other Lipid Mediators**, vol. 62, p. 367-384, 2000.
- WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 56, p. 603-618, 2004
- WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W.; Skin Absorption Enhancer. **Critical Review of Therapy Drug Carrier System**, vol. 9, Issues 3-4, p.305-353, 1992
- YAMANE, M. A.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Effects of terpenes and oleic acid as skin penetration enhancers towards 5-fluorouracil as assessed with time: permeation, partitioning and differential scanning calorimetry **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 116, p. 237-251, 1995.
- YAMASHITA, F. *et al.* Analysis of in vivo skin penetration enhancement by oleic acid based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 117, p. 173-179, 1995.
- YAROSH, D. B. Liposomes in investigative dermatology. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, vol. 17 (5), p. 203-212, 2001.
- YONG, C. S. *et al* Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 266, p. 195-205, 2001.
- YONG, S. C. *et al.* Physicochemical characterization and in vivo evaluation of poloxamer-based solid suppository containing diclofenac sodium in rats. **International Journal of Pharmaceutics** vol. 301, p. 54-61, 2005.
- YUAN, Y. *et al.* Physicochemical Properties and Evaluation of Microemulsion Systems for Transdermal Delivery of Meloxicam. **Chemical Research in Chinese Universities**, vol. 23, p. 81-86, 2007a.
- YUAN, Y.; CHEN, X.; ZHONG, D. Determination of meloxicam in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry following transdermal administration. **Journal of Chromatography B**, vol. 852, p. 650-654, 2007b.
- ZAHN, J. *et al.* Transdermal Delivery of Piroxicam by Surfactant Mediated Electroporation. **Tsinghua Science & Technology**, vol. 10, p. 542-547, 2005.
- ZATZ, J. L. Skin Permeation - Fundamentals and Application. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993.
- ZHANG, L. *et al.* Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. **Journal of Controlled Release**, vol. 13; p. 73-81, 2002.