

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Farmácia



Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

“FORMAS FARMACÊUTICAS SEMI-SÓLIDAS DE USO TÓPICO
CONTENDO NIFEDIPINA: DESENVOLVIMENTO GALÊNICO E
AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA”

Ana Karla De Santis

Rio de Janeiro

2008

Ana Karla De Santis



“Formas Farmacêuticas Semi-sólidas de Uso Tópico Contendo
Nifedipina: Desenvolvimento Galênico e Avaliação Biofarmacotécnica”

Dissertação 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 Elisabete Pereira dos Santos
Co-Orientadora: Dr^a Zaida Maria Faria de Freitas

Ana Karla De Santis

Rio de Janeiro

2008

Ana Karla De Santis

S236f Santis, Ana Karla De.
Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica / Ana Karla De Santis; orientadora Elisabete Pereira dos Santos; co-orientadora Zaida Maria Faria de Freitas. – Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2008.

x, 156p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2008.

1. Nifedipina. 2 Liberação de fármacos.
3. Estudos reológicos. I. Santos, Elisabete Pereira dos. II. Freitas, Zaida Maria Faria de.

CDD:615.19

“FORMAS FARMACÊUTICAS SEM-ISÓLIDAS DE USO TÓPICO CONTENDO
NIFEDIPINA: DESENVOLVIMENTO GALÊNICO E AVALIAÇÃO
BIOFARMACOTÉCNICA”

Orientadora

Profª Drª Elisabete Pereira dos Santos
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Co-Orientadora

Drª Zaida Maria Faria de Freitas
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Banca Examinadora

Prof Dr Eduardo Ricci Júnior
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana
Departamento de Farmácia - UFPE

Profª Drª Nadia Maria Volpato
Faculdade de Farmácia - UFRS

DEDICATÓRIA

A Deus, pela Sua manifestação em iluminação, força, determinação e perseverança, que me permitiram concluir este trabalho.

A meus pais, Amália e José Carlos, exemplos de dedicação e trabalho, cujo amor, conforto, apoio e incentivo sempre me impulsionaram.

Ao meu marido Fábio, pela compreensão, cooperação, companheirismo e amor.

Àqueles que procuram deixar sua contribuição para o bem da humanidade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Elisabete Pereira dos Santos, que me acolheu e me proporcionou a oportunidade de realizar este trabalho.

À Dr^a. Zaida Maria Faria de Freitas, colega de vários anos de trabalho na Farmácia Universitária da UFRJ, pela coorientação neste projeto, pelo empenho em providenciar os recursos materiais e também o apoio moral, nos meus momentos de “crise”.

Aos meus pais, que sempre apostam na minha capacidade e se empenham de corpo e alma para proporcionar - me as oportunidades de caminhar em busca dos meus sonhos, e que vibram com cada uma de minhas conquistas como se fossem suas.

Ao meu marido, que se superou em cooperação moral, sentimental e intelectual neste período tão conturbado para que eu pudesse concluir mais este projeto de vida.

À Farmácia Universitária da UFRJ e toda a sua equipe, que participam da minha vida há tantos anos, pelo ambiente agradável e acolhedor, apoio físico e estrutural durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos – LabCQ, aqui representado pelas sempre solícitas Eliane, Tailane e Maria, pelo apoio técnico e incentivo.

À Venicio Feo da Veiga (IMPPG) pela colaboração nos trabalhos de microscopia óptica de luz polarizada.

À Prof^a. Dr^a. Lycia de Brito Gitirana do Laboratório de Histologia Animal e Comparada (DHE-ICB-UFRJ) pela colaboração na caracterização histológica dos estratos cutâneos de pele suína.

Ao Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Prof Everton, coordenador da Fazenda e à toda a sua equipe, pela gentileza e cooperação no fornecimento das orelhas suínas.

Ao Prof. Dr. Marcio Nele de Souza (Escola de Química da UFRJ) e à Kelly (LADEQ) pela colaboração nos ensaios de reologia.

Ao Prof. e amigo Marcos Kneip Fleury pela colaboração nos ensaios de microscopia óptica, e por dar aquela força para suavizar os momentos difíceis com palavras de incentivo.

À equipe da Biblioteca Setorial da Faculdade de Farmácia da UFRJ pela eficiência e simpatia na colaboração em localizar literatura para compor este trabalho.

Às minhas alunas, e agora colegas de profissão, Talita Brunoro e Marcela Ribeiro, pela disposição e barvura em aceitar o desafio do estágio, sem as quais o trabalho teria sido muito, muito mais árduo.

Às minhas amigas Gláucia Miranda e Bárbara Lorca, e colegas Mariana Sato e Vânia Bucco por compartilharem os momentos de alto astral, e também os de baixo, quando nos animávamos umas às outras.

Às professoras Sheila Garcia e Mônica Freiman pelas suas contribuições através da comissão de acompalhamento, ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Gisella Ortiz, pelo apoio e delicadeza no exercício do papel de coodenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRJ.

Aos professores Nadia Maria Volpato, Davi Pereira de Santana e Eduardo Ricci Junior, pela pronta disposição em contribuir com este trabalho.

À todos aqueles que intimamente sabem ter contribuído de maneira direta ou indireta para a concretização deste trabalho.

Agradecimento especial à minha amiga Lais Bastos da Fonseca, que muito me ensinou e me conduziu, durante todo este trabalho.

“O universo está cheio de coisas mágicas,
esperando pacientemente que nossa
inteligência se torne mais aguda.”

Eden Phillpotts

RESUMO

A nifedipina (NFD) é uma substância do tipo das dihidropiridinas, antagonista do cálcio. É preconizada primordialmente para tratamento de doença cardiovascular. Entretanto, a sua aplicação tem sido descrita para o tratamento de lesões cutâneas oriundas de doença vascular periférica e de úlceras diabéticas. Alguns autores reportam sucesso no tratamento de pacientes portadores de lesões cutâneas refratárias aos tratamentos tradicionais aplicando nifedipina (NFD) em base organogel de lecitina e polaxamer 407 (PLO), por via tópica. A eficácia da terapia tópica depende das características de liberação do fármaco, do veículo e da farmacocinética da substância ativa no tecido cutâneo, e portanto, de como ela se difunde através da pele. Neste estudo foram desenvolvidas três formulações contendo 8% de NFD: PLO+NFD, PLO+NFD+Transcutol e EMUL (uma emulsão o/a sem PLO), que foram estudadas quanto às características físico-químicas e quanto ao comportamento biofarmacotécnico. Um sistema bicompartimental de difusão vertical com membrana sintética (acetato de celulose) e membrana natural (pele suína) foi empregado para avaliar *in vitro* a taxa de liberação e a avaliação da penetração, e eventual permeação do fármaco, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com método previamente validado. Os ensaios de liberação *in vitro* resultaram em um fluxo de fármaco normalizado por área, correspondente a $4,026 \pm 0,081$; $6,26 \pm 0,288$ e $6,389 \pm 0,254$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para PLO+NFD+Transcutol, PLO+NFD e EMUL, respectivamente. A quantidade de NFD liberada por área não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as três formulações com $p > 0,05$, pela ANOVA com $\alpha = 0,05$. A quantidade de NFD nos estratos cutâneos da pele suína diminuiu com a profundidade, desta maneira, na derme foi detectada menor quantidade de fármaco após aplicação das formulações PLO+NFD, PLO+NFD+Transcutol e EMUL, e uma pequena quantidade foi quantificada na solução receptora após 24 horas. As formulações PLO+NFD, PLO+NFD+Transcutol e EMUL apresentaram um perfil de penetração cutânea na epiderme e na derme estatisticamente diferente ao nível de 5%, com $p < 0,0001$. Em todas as formulações detectou-se maior quantidade de NFD na epiderme em relação à derme. A interação quanto à solubilidade entre ativos e excipientes determina a atividade termodinâmica dos fármacos nas preparações semi-sólidas e penetração nas camadas cutâneas. Face aos resultados obtidos, a incorporação da NFD em diferentes formulações com PLO e/ou Transcutol alterou esse parâmetro físico-químico, conforme esperado. Uma vez que o transcutol aumentou a solubilidade do ativo nas formulações e promoveu sua penetração nos estratos cutâneos: epiderme e derme.

Palavras chave: nifedipina, transcutol, polaxamer, organogel de lecitina e pluronic.

ABSTRACT

Nifedipine (NFD) is a dihydropyridine calcium antagonist and is commonly prescribed to cardiovascular conditions. Its use in cutaneous lesions related to diabetes and cardiovascular conditions have also been described. Topic NFD formulations based on poloxamer 407 and lecithin organogel have been suggested as an alternative means to treat wounds that are refractory to conventional procedures. Topic treatment effectiveness relies on drug release features and its pharmacokinetics in cutaneous tissues, as well as how it diffuses through skin; vehicle properties are also of major importance. This work presents three 8% NFD formulations — PLO+NFD, PLO+NFD+Transcutol, and EMUL (a PLO free o/w emulsion) — and studies their physicochemical properties and its biopharmaceutical behavior. A bicompartamental vertical diffusion system — using either a synthetic (cellulose acetate) and a natural (swine skin) membrane — was used to assess drug release and penetration *in vitro*, and possible permeation. All samples were analysed with a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) validated protocol. PLO+NFD+Transcutol, PLO+NFD and EMUL showed, respectively, $4,026 \pm 0,081$, $6,26 \pm 0,288$ and $6,389 \pm 0,254$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ drug flux *in vitro*. The amount of NFD released had no statistically significant difference among formulations; $p > 0,05$ and $\alpha = 0,05$. In the swine skin layers, the amount of NFD decreased with depth. Therefore, a smaller amount of the drug was detected in dermis after PLO+NFD+Transcutol, PLO+NFD and EMUL formulations were applied, and a small amount was quantified in the receptor solution after 24 h. PLO+NFD+Transcutol, PLO+NFD and EMUL formulations penetration patterns were different from the 5% level, $p < 0,0001$. A higher amount of NFD was detected in epidermis for all formulations, in comparison to that found in dermis. Relative solubility of active principle and vehicle determines drug thermodynamics in semi-solid preparations and penetration into cutaneous layers. Results show NFD altered this physicochemical parameter when added to PLO and/or Transcutol formulations, as expected. Transcutol increased drug solubility and promoted its penetration into cutaneous layers: dermis and epidermis.

Keywords: nifedine, transcutol, poloxamer, pluronic lecithin organogel.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Representação esquemática da pele mostrando as possíveis rotas de penetração.	34
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da camada córnea.	34
Figura 3 – Representação esquemática de uma célula de difusão na qual o compartimento doador contém o difusante na concentração C .	37
Figura 4 - Difusão através de um filme fino, onde as moléculas do soluto difundem da zona de maior concentração (C_1), para a de menor concentração (C_2). As concentrações em ambos os lados do filme são mantidas constantes. No estado de equilíbrio, as concentrações permanecem constantes em todos os pontos do filme. O perfil de concentração dentro do filme é linear e o fluxo é constante.	39
Figura 5 - Perfil para penetração em função do tempo de um fármaco ideal que se difunde através da pele humana. Após a instalação do estado de difusão estacionário.	40
Figura 6 - Estrutura química da Nifedipina	45
Figura 7 - Paciente com cicatriz hipertrófica antes do tratamento (a) e após três semanas (b) de tratamento tópico com nifedipina.	48
Figura 8 - Diagrama esquemático da preparação de organogéis de lecitina, proposto por Kumar e Ktare (2005). Fármacos lipofílicos são solubilizados na fase orgânica, enquanto compostos hidrofílicos podem ser solubilizados na fase polar. Para a preparação do PLO, o co-surfactante (polaxamer) é adicionado à fase polar.	56
Figura 9 - Área posterior da aurícula suína: A e B são recomendadas para utilização experimental.	63
Figura 10 - Seringas tipo <i>luer lock</i> com o corpo vedado com parafilme na extremidade anterior	69
Figura 11 - Seringas conectadas, uma à outra pela extremidade anterior, utilizando-se o adaptador (extrusor).	70
Figura 12 - Mecanismo de extrusão: o conteúdo das seringas foi homogeneizado empurrando-se lentamente um êmbolo por vez.	70

Página

Figura 13 - Acondicionamento da preparação em pote plástico preto par proteção contra a luminosidade.	71
Figura 14 - Esquema do reparo das amostras para determinação da exatidão	83
Figura 15 - Reômetro ARES -TA utilizado nas medidas de viscosidade.	86
Figura 16 - Etapas realizadas validação da metodologia para extração da NFD dos estratos cutâneos: epiderme e derme. Corte dos segmentos de pele (a) (b) e (c); separação dos extratos cutâneos (d) (e) (f); adição de NDF (g); transferência para <i>ependorf</i> (h); adição de fase móvel extratora (i); agitação em vortex (j); centrifugação (k); filtração para <i>ependorf</i> âmbar (l).	92
Figura 17 - Sistema de difusão vertical montado com membrana artificial de acetato de celulose	93
Figura 18 - Aplicação da amostra de formulação no compartimento doador do sistema de difusão.	85
Figura 19 - Espectro de absorbância obtido durante o doseamento da NFD pelo método de espectrofotometria de absorção ultravioleta (UV).	102
Figura 20 - Resolução do cromatograma da matéria prima NFD empregando as seguintes condições: fase móvel H ₂ O:AcN:MeOH (50:25:25), fluxo 1 mL/min, coluna C ₁₈ (15 cm) e concentração da amostra 100 µg/mL.	102
Figura 21 - Análise do cromatograma da NFD por arranjo de foto diodos, mostrando a pureza do sinal, modificando de intensidade nos tempos entre 3,20 3 3,70 minutos.	103
Figura 22 - Espectros de varredura no UV-vis de 200 a 1000 nm das amostras: Branco (solvente), Padrão (NFD+solvente), Placebo (excipientes) e Amostra (formulação contendo NFD)	104
Figura 23 - Soluções obtidas para a curva padrão realizada pelo método de UV-vis para o doseamento da NFD.	106
Figura 24 - Gráficos da recuperação isotérmica da consistência após a determinação da curva de consistência para as amostras em estudo: (a) PLO base, (b) PLO+NFD, (c) PLO+NFD+ TC e (d) EMUL.	112

	Página
Figura 25 - Gráficos obtidos no estudo da temperatura de transição sol-gel das amostras (com réplicas dos ensaios) de PLO base (a), PLO+NFD (b) e PLO+NFD+ TC (c), medindo-se a viscosidade em função da temperatura a uma taxa de cisalhamento constante..	114
Figura 26 - Mostra as microestruturas das formulações observadas por MO simples no aumento de 100X. PLO base (a), PLO+NFD (b), PLO+NFD+ TC (c) e EMUL (d).	120
Figura 27 - Fotomicrografias das formulações observadas por MO de imersão com luz polarizada no aumento de 100X. PLO base (a), PLO+NFD (b), PLO+NFD+ TC (c) e EMUL (d).contendo as medidas aleatórias: relativa homogeneidade no tamanho das micelas nas formulções contendo PLO, na ordem de 0,8 µm. Na formulação EMUL foi possível observar uma maior heterogeneidade e um tamanho médio maior das micelas, na ordem de 2,4 µm, onde as maiores chegaram a 10,4 µm, neste campo de observação	122
Figura 28 - Eluição de soluções padrão de NFD em três concentrações: a) 0,063 µg/mL, b) 0,15 µg/mL, c) 0,5 µg/mL. O tempo de retenção foi de 9,6 minutos.	125
Figura 29 - Representação gráfica das curvas analíticas, obtidas por CLAE, em três experimentos diferentes.	128
Figura 30 - Quantidade de NFD liberada por área. Erro de barras indica erro padrão da média (e.p.m.).	130
Figura 31 - Fotomicrografia em microscopia de luz da amostra pele suína submetida ao processo de separação de epiderme e derme. Coloração: hematoxilina-eosina; Barra = 20µm.	132
Figura 32 - Curvas analíticas de NFD 0,34 a 5,04 µg/mL	134
Figura 33 - Cromatogramas obtidos no experimento de extração da NFD da pele suína empregando solvente água:acetoneitrila:metanol (50:25:25), para a avaliação da especificidade do método. A) solução padrão de NFD, b) branco da epiderme, c) epiderme na presença de NFD, d) branco da derme, e) derme na presença de NFD. Tempo de retenção da NFD = 16 min.	135
Figura 34 - Massas absolutas de NFD extraídas da epiderme e derme após 24 horas de contato das formulações com a pele, em uma área de 1,54 cm ² .	136

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Principais formulações farmacêuticas contendo NFD comercializadas no Brasil	50
Tabela 2 - Resultados dos testes de perda por dessecação e ponto de fusão da NFD de acordo com a F. Brás IV (1996).	101
Tabela 3 - Análise quantitativa (doseamento) da matéria prima por espectrofotometria de absorção de acordo com a F. Brás IV (1996).	101
Tabela 4 - Análise estatística da regressão linear das curvas padrão	105
Tabela 5 – Resultados do teste de exatidão para PLO base+ TC	108
Tabela 6 – Resultados do teste de exatidão para PLO base	108
Tabela 7 – Resultados do teste de exatidão para EMUL base	108
Tabela 8 - Resultados das análises de teor de NFD nas três formulações em estudo, armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.	109
Tabela 9 - Valores de pH apresentados pelas formulações em estudo	110
Tabela 10 - Valores da viscosidade aparente a uma taxa de cisalhamento de 500 (s ⁻¹), para as formulações em estudo.	110
Tabela 11 - Valores de G' e G'' comparados entre as formulações PLO base (sem fármaco e sem transcuto) e PLO+NDF+Trc.	116
Tabela 12 - Faixa de temperatura que compreende a transformação sol-gel, bem como o valor médio, na formulação PLO+NFD	117
Tabela 13 - Valores obtidos para a solubilidade da NFD nas soluções testadas:	124
Tabela 14 - Apresenta os resultados das respostas obtidas para as cinco concentrações de NFD, preparadas em triplicata, em cada dia de análise, seus desvios padrão (DP), desvios padrão relativos (DPR) e parâmetros da curva.	127
Tabela 15 - Fluxo no estado estacionário (J _{ss}) para cada uma das formulações estudadas	129

	Página
Tabela 16 - Recuperação média de NFD dos tecidos para três níveis do fármaco e seus DPR. de 1,54 cm ² , após 24 horas de contato com a formulação.	133
Tabela 17 - Massas de NFD obtidas da derme e da epiderme suína em uma área	136
Tabela 18 - Quantidade de NFD (µg/mL) encontrada no meio receptor após 24h de ensaio.	138

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância
CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência
CTZ - Cetonazol
DP – Desvio padrão
DPR – Desvio padrão relativo
EC – Estrato córneo
EPM – Erro padrão da média
FB – Farmacopéia Brasileira
G' - Módulo elástico
G'' - Módulo viscoso
H₂O:AcN:MeOH – Mistura eluente de água, acetonitrila e metanol
IC – Coeficiente angular da curva analítica
IPM – Miristato de isopropila
IPP – Palmitato de isopropila
Jss – Fluxo no estado estacionário
K_p – Coeficiente de partição
LabCq – Laboratório de Controle de Qualidade da FF-UFRJ
LD – Limite de detecção
LO – Organogel de lecitina
LQ – Limite de quantificação
NFD – Nifedipina
nm – Nanômetro
PA – *pro analisi*
PaS - Pascal
PDA – Arranjo de fotodiodo
PLO – Gel de lecitina e polaxamero

PVC – Cloreto de polivinila

r – Coeficiente de correlação de Pearson

r^2 – Coeficiente de determinação

s^{-1} – Taxa de cisalhamento / segundo

SUPAC – *Scale-Up and Postapproval Changes*

TC – Transcutol[®] – monometil éter de dietilenoglicol

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

USP – *United States Pharmacopeia*

UV – Ultravioleta

UV-PDA – Detector ultravioleta com arranjo de fotodiodo

UV-Visível – Ultravioleta-visível

α – Nível de significância

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

ζ – Delta

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 Pele	31
3.2 Penetração de Fármacos pela Pele	33
3.3 Aspectos Físico-Químicos da Absorção Percutânea	36
3.3.1 <i>Efeitos do Fármaco na Penetração Cutânea</i>	41
3.3.2 <i>Efeitos do Veículo na Penetração Cutânea</i>	43
3.4 A Nifedipina (NFD)	44
3.4.1 Propriedades Físico-químicas da Nifedipina (NFD)	44
3.4.2 Aplicações da NFD para o Uso Tópico	45
3.5 Formulações Semi-Sólidas de Uso Tópico	51
3.5.1 Organogel de Lecitina e Polaxamer 407 (PLO)	52
3.5.1.1 Composição do Organogel	53
3.5.1.1.1 <i>A Lecitina</i>	53
3.5.1.1.2 <i>O Solvente Orgânico</i>	54
3.5.1.1.3 <i>O Solvente Polar</i>	54
3.5.1.1.4 <i>O Polaxamer 407</i>	55

	Página
3.5.1.1.5 O Monoetil Éter de Dietileniglicol - Transcutol® (TC)	56
3.5.2 Reologia dos Semi-sólidos	57
3.5.2.1 Sistemas Não Newtonianos	57
3.5.2.2 Tixotropia	59
3.5.3 Estudos <i>in vitro</i>	60
4 MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1 Material	64
4.1.1 Equipamentos e Acessórios	64
4.1.2 Reagentes e Matérias-primas	66
4.1.3 Substância Química de Referência (sqr) e Formulações	67
4.2 Métodos	67
4.2.1 Composição e Técnica de Preparação das Formulações Desenvolvidas	67
4.2.1.1 Formulação PLO+NFD: base PLO contendo 8% de nifedipina	68
4.2.1.1.1. <i>Técnica de Preparo da Formulação PLO+NFD</i>	68
4.2.1.2 Formulação PLO+NFD+TC: base PLO contendo 8% de nifedipina e 10% de transcutol	71
4.2.1.2.1 <i>Técnica de Preparo da Formulação PLO+NFD+TC</i>	72
4.2.1.3 Formulação EMUL: base PLO contendo 8% de nifedipina	73
4.2.1.3.1 <i>Técnica de Preparo da Formulação EMUL</i>	73
4.2.2 Análise da Matéria-prima Nifedipina	74
4.2.2.1 <i>Perda por Dessecação</i>	74
4.2.2.2 Análise Quantitativa (Doseamento) por Espectrofotometria de Absorção Ultravioleta (UV)	75

	Página
4.2.2.3 Análise Qualitativa do Pico da NFD Matéria-prima por CLAE com Detector de UV com Arranjo de Foto Diodos (PDA)	76
4.2.3 Análise Quantitativa da NFD nas Formulações por Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta visível (UV-visível) – Reação Colorimétrica	77
4.2.3.1 Preparo das Soluções de Trabalho	77
4.2.3.1.1 Solução de Ácido Sulfúrico 4M	77
4.2.3.1.2 Solução de Molibdato de Amônio 0,02M em ácido sulfúrico 4M	78
4.2.3.1.3 Solução tampão de ácido cítrico 0,1 M com fosfato de sódio 0,2 M de pH = 4,0	78
4.2.3.2 Preparo das amostras de formulação para determinação de teor de NFD	78
4.2.3.3 Preparo do placebo	79
4.2.3.4 Preparo do branco	80
4.2.3.5 Preparo da Curva Analítica	80
4.2.3.6 Validação do método espectrofotométrico	81
4.2.3.6 1 Especificidade	81
4.2.3.6 2 Linearidade	82
4.2.3.6 3 Exatidão	82
4.2.3.6 4 Precisão intra e inter dia	84
4.2.3.6 5 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	84
4.2.4 Caracterização Geral das Formulações	85
4.2.4.1 <i>Determinação do pH</i>	85
4.2.4.2 <i>Determinação da Reologia</i>	85
4.2.4.3 <i>Determinação do aspecto morfológico por microscopia óptica</i>	86
4.2.4.4 <i>Determinação do teor do fármaco nas formulações</i>	87

	Página
4.2.5 Liberação <i>in vitro</i> Através de Membrana Sintética	87
4.2.5.1 <i>Estudo da solubilidade da NFD e escolha da solução receptora</i>	87
4.2.5.2 <i>Estabelecimento das condições analíticas para a NFD por CLAE</i>	88
4.2.5.2.1 Parâmetros da validação da metodologia analítica para a NFD nas amostras por CLAE	89
4.2.5.2.2 Validação da metodologia para extração da NFD dos estratos cutâneos: epiderme e derme	90
4.2.5.2.3 Metodologia para extração da NFD da epiderme e derme suína	91
4.2.5.2.4 <i>Estudo de Liberação in vitro</i>	93
4.2.5.2.5 <i>Ensaio de liberação in vitro da NFD das formulações semi-sólidas</i>	94
4.2.6 Permeação / Penetração Através de Membrana Natural de Pele Suína	96
4.2.6.1 <i>Preparo da pele suína</i>	96
4.2.6.2 <i>Montagem do sistema de difusão</i>	97
4.2.6.3 <i>Caracterização Histológica dos Estratos de Cutâneos</i>	98
4.2.6.4 <i>Métodos em Microscopia de Luz</i>	99
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.1 Análise da Matéria-Prima Nifedipina (NFD)	101
5.2 Caracterização Geral das Formulações	103
5.2.1 Validação do Método para a Análise Quantitativa da NFD nas Formulações por Espectrofotometria de Absorção no UV-Vis – Reação Colorimétrica	103
5.2.1.1 <i>Especificidade</i>	104
5.2.1.2 <i>Linearidade</i>	105
5.2.1.3 <i>Precisão</i>	107
5.2.1.4 <i>Exatidão</i>	107

	Página
5.2.1.5 <i>Determinação do Teor de NFD nas Formulações</i>	109
5.2.2 Determinação do pH	110
5.2.3 Determinação da Reologia	110
5.2.4 Verificação do Aspecto Morfológico das Formulações por Microscopia Óptica (MO)	119
5.2.5 Liberação <i>in vitro</i> Através de Membrana Sintética	123
5.2.5.1 <i>Estudo da Solubilidade da NFD para a Escolha da Solução Receptora para os Ensaios de Liberação e Permeação/ Penetração Cutânea</i>	124
5.2.5.2 <i>Condições Analíticas para a Análise da NFD nas Amostras por CLAE</i>	125
5.2.5.2.1 Curva Analítica	126
5.2.5.3 Resultados dos Ensaios de Liberação <i>in vitro</i> Através de Membrana Sintética de Acetato de Celulose	128
5.2.6 Permeação / Penetração Através de Membrana Natural de Pele Suína	131
5.2.6.1 Caracterização Histológica dos Fragmentos de Pele Suína – Separação da Epiderme e Derme	132
5.2.6.2 <i>Validação da Metodologia para a Extração da NFD de Epiderme e Derme Suína</i>	133
5.2.6.2.1 Caracterização da Seletividade, da Recuperação e Precisão da Extração da NFD da Epiderme e Derme Suína.	133
5.2.6.3 Resultados da Penetração / Permeação <i>in vitro</i> das Formulações contendo NFD	135
6 CONCLUSÕES	141
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

1. INTRODUÇÃO

Segundo Ansel; Popovick e Allen (2007) a biofarmacotécnica é definida como a área de estudo que abrange as relações entre as ciências, química, física e biologia, segundo sua aplicação aos fármacos, à sua ação e às formas farmacêuticas. Ainda de acordo com os autores, formas farmacêuticas de aplicação tópica liberam o fármaco na pele, para o tratamento de alterações dérmicas, logo a pele é o órgão alvo.

A via tópica tem sido considerada como uma alternativa de interesse para a administração de fármacos (BARRY, 2001; KENDAL, CHONG, COCK, 2007), uma vez que, estas terapias apresentam boa adesão por parte dos pacientes (TORSIELLO e KOPACK 2000; ISRAEL, 2003).

A pele constitui a principal interface biológica entre o organismo humano e o meio ambiente (SAIJA et al., 1998; HADGRAFT, 2001; MARQUELE-OLIVEIRA, 2007; WILLIAMS, 2005; CEVEC e VIERL, 2006; SILVA *et al.* 2007), apresenta fundamental importância na manutenção da homeostase orgânica, como controle de perda de água, proteção contra agentes químicos e físicos provenientes do meio ambiente (HADGRAFT, 2001; SILVA *et al.* 2007). Devido a estas propriedades, a pele também representa a principal barreira a ser vencida pelos fármacos, principalmente, devido à sua camada mais externa, o estrato córneo (EC) (HADGRAFT, 2001; WILLIAMS, 2005; CEVEC e VIERL, 2006).

O EC, é um tecido queratinizado e se comporta como uma membrana artificial semipermeável. As moléculas das substâncias ativas, geralmente, penetram essa membrana por difusão passiva. Assim, a velocidade de difusão de um fármaco através

dessa camada da pele depende da concentração do mesmo no veículo, de sua solubilidade, do coeficiente de difusão e do coeficiente de partição entre o EC e o veículo. As substâncias que têm características de solubilidade tanto em água quanto em lipídios são boas candidatas à difusão através do EC, bem como nas camadas epidérmica e dérmica (SURBER et al., 1990, FREITAS, 2005).

A cicatrização de ferimentos tem recebido muita atenção por parte dos profissionais de saúde, campo no qual tem-se observado crescente aplicação de formulações de uso tópico (KINCAID, 2002; HELMKE, 2004). Uma vez que, a aplicação destas preparações pode produzir resultados positivos em tratamentos de fissuras anais, úlceras venosas e diabéticas e cicatrizes hipertróficas (HELMKE, 2004).

A carência de tratamentos para lesões cutâneas é uma das principais preocupações para os pacientes diabéticos, pois podem acarretar a perda de unhas, pés, dedos e, em alguns casos, de membros completos (WYNN, 2004). Existe uma grande variedade de terapias que incluem cirurgias com técnicas de reconstrução vascular, objetivando aumentar o fluxo sanguíneo para a lesão; assim como, a utilização de fatores de crescimento, como interleucina-6 e queratinócitos (BENNETT et al apud WYNN, 2004, HAIHONG Li, 2007). Entretanto, estas promissoras terapias ainda são muito onerosas, assim, muitos pacientes preferem optar pelo tratamento com formulações tópicas (WYNN, 2004).

A nifedipina (NFD) é uma substância do tipo das dihidropiridinas, antagonista do cálcio, sendo preconizada primordialmente para tratamento de doença cardiovascular (RANG, et. al.. 2003). Abbas e cols. (2003) relataram que o tratamento tópico com NFD promoveu a cicatrização na pele de ratos sadios e diabéticos. De acordo com estes autores, a NFD foi capaz de promover a cicatrização na fase inflamatória do processo,

entretanto não produziu modificações sensíveis na fase de maturação e não afetou a fase de proliferação da reparação tecidual. Além disso, a aplicação tópica da NFD tem sido descrita para o tratamento em humanos com lesões cutâneas oriundas de doença vascular periférica (BRANDT *et. al.* 1983; ANTROPOLI *et. al.* 1999); de úlceras diabéticas (TORSIELLO E KOPACK, 2000, WYNN, 2004) e cicatrizes hipertólicas (ISRAEL, 2003, HELMKE, 2004).

As formulações empregadas no tratamento das afecções tópicas são preparações de consistência semi-sólidas destinadas a serem aplicadas sobre a pele ou sobre determinadas mucosas a fim de exercer uma ação local ou de promover a passagem de princípios medicamentosos através do estrato córneo.

Dependendo do seu comportamento reológico e da sua bioadesão, os semi-sólidos podem aderir à superfície de aplicação por períodos suficientemente longos até serem removidos. Essa propriedade auxilia a prolongar a liberação do fármaco no local de aplicação, apresentando vantagens em termos de facilidade de aplicação (IDSON; LAZARUS, 2001).

Atualmente, novos veículos para a aplicação tópica de fármacos têm sido desenvolvidos com o objetivo de permitir a cicatrização de lesões cutâneas persistentes que não respondem aos tratamentos tradicionais (ISRAEL, 2003). Entre eles encontram-se o gel de polaxamer 407, que tem sido indicado para o tratamento de queimaduras e como pele artificial (PAOLETTI, 2004), e o PLO (gel de lecitina e polaxamer), também descrito pela sua capacidade de promover a penetração cutânea de fármacos (TORSIELLO e KOPACKI, 2000, KINCAID, 2002, ISRAEL 2003).

De acordo com Torsiello e Kopack (2000), formulações semi-sólidas contendo 8% de NFD induziram a vasodilatação local sem provocar efeitos sistêmicos. Acredita-

se que o referido fármaco possa promover um bloqueio do influxo de cálcio para a musculatura lisa, diminuindo o tônus vascular, facilitando o fluxo sanguíneo e a irrigação tecidual, promovendo a cicatrização de ferimentos (TORSIELLO e KOPACK 2000, WYNN, 2004).

Segundo Ansel, Popovick e Allen (2007), a resposta biológica a um fármaco é resultado de sua interação com os receptores celulares ou sistemas enzimáticos importantes, e decorrem de uma alteração dos processos biológicos anteriores à administração do fármaco. A magnitude da resposta biológica relaciona-se com a concentração que o fármaco atinge em seu local de ação, e essa concentração depende da dose administrada, da quantidade absorvida e da distribuição no local, e da velocidade e da quantidade eliminada do corpo. A constituição física e química do fármaco, particularmente a solubilidade lipídica, o grau de ionização e o tamanho molecular determinam, em grande parte, sua capacidade de produzir sua atividade biológica.

Sendo assim, é importante avaliar as propriedades físico-químicas das formulações semi-sólidas (microscopia, pH, viscosidade, teor do ativo). Assim como, a determinação da velocidade de liberação do fármaco destas preparações e a penetração/permeação do mesmo nas camadas da pele. Desta forma, pode-se prover o controle de qualidade das formulações sob aspecto biofarmacotécnico.

Nos estudos de liberação *in vitro*, pode ser empregado um modelo bicompartimental, conhecido como célula de difusão vertical e membrana sintética (UNITED STATES PHARMACOPEA, 1997). Para tal, podem-se empregar membranas artificiais como acetato de celulose, nitrato de celulose e polissulfona (HAIGH; SMITH, 1994), as quais não oferecem resistência à passagem do fármaco do compartimento

doador para o compartimento receptor, proporcionando, desta forma, a quantificação do fármaco neste último, em função da partição entre o veículo e o meio receptor.

No sistema de células de difusão, pode-se também utilizar pele natural (humana ou animal) para conhecer o comportamento biofarmacotécnico de uma formulação, no que diz respeito à penetração e/ou permeação do fármaco. Dentre os vários tipos de pele animal (rato, cobaia, camundongo com e sem pêlo, macaco rhesus, cobra) que podem ser utilizadas, recentemente, tem-se empregado a pele suína devido a sua similaridade com a pele humana. (HAIGH; SMITH, 1994; SEKKAT; KALIA; GUY, 2002; MEDI; SINGH, 2003).

O conhecimento do comportamento dessas formulações sob aspecto de biodisponibilidade *in vivo* e liberação *in vitro* permite aprimoramento dos produtos e melhor controle quando se fazem necessárias alterações de escala produtiva (de pequena para grande escala) e/ou componentes da formulação pós-aprovação do medicamento (FREITAS, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento, caracterização e avaliação biofarmacotécnica de formulações tópicas contendo nifedipina, para uso no tratamento de lesões cutâneas oriundas de doença vascular periférica e de úlceras diabéticas.

2.2. Objetivos específicos

1. Desenvolvimento galênico de formulações de uso tópico contendo 8% de NFD;
2. Avaliação das propriedades físico-químicas das formulações desenvolvidas;
3. Determinação do teor da NFD de trabalho a partir de padrão farmacopéico para sua utilização como padrão secundário;
4. Determinação do teor de NFD nas formulações por UV-vis;
5. Avaliação da formação da microemulsão por microscopia óptica;
6. Avaliação de parâmetros reológicos das formulações;
7. Avaliação da taxa de liberação de NFD *in vitro*, empregando células de difusão vertical com membrana artificial (acetato de celulose);
8. Avaliação da penetração e permeação de NFD empregando células de difusão com membrana natural (pele suína);
9. Determinação do meio acceptor adequado para os ensaios de liberação e penetração e permeação;

- 10.**Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação da NFD nas formulações em estudo e nos ensaios de liberação e permeação/penetração cutânea;
- 11.**Preparação da pele suína para os ensaios de penetração e permeação.
- 12.**Caracterização histológica dos segmentos cutâneos: epiderme e derme.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A PELE

A pele constitui a principal interface biológica do organismo humano com o meio ambiente e, devido a esta função de barreira, representa um órgão-alvo em potencial para estímulos externos de reações oxidativas como radiação ultravioleta, ação do ozônio, incidência de radiação ionizante, além da ação de diferentes agentes químicos tóxicos (SAIJA *et al.*, 1998, HADGRAFT, 2001; WILLIAMS, 2005; CEVEC e VIERL, 2006, MARQUELE-OLIVEIRA, 2007).

A elasticidade é uma das funções mais essenciais da pele constitui-se na proteção contra agressões mecânicas e é assegurada por uma estrutura que se deforma reversivelmente. É um tecido vivo e complexo com características viscoelásticas, composto por camadas heterogêneas (REIHSNER, BALOGH, MENZEL 1995; REIHSNER, MENZEL, 1998; HADGRAFT, 2001, WU, DONG, SMUTZ, 2003; WILLIAMS, 2005; CEVEC e VIERL, 2006, PAILLER-MATTEI, 2007).

A pele humana é composta principalmente por três camadas: epiderme, derme e hipoderme ou tecido adiposo subcutâneo, que se apresenta como um tecido extremamente viscoso e macio. A derme consiste em uma rede de colágeno entremeada por fibras elásticas, e elementos linfáticos, coberto por uma camada epidérmica. A espessura das camadas da pele sofre muitas variações em função da idade, sítio anatômico e do estado de hidratação. Geralmente, a espessura da epiderme apresenta-se entre 40 e 48 μm . A espessura da derme apresenta-se maior

que 800 μm e menor que 1.500 μm , e por fim, a espessura da hipoderme é muito dependente do sítio anatômico e do estado nutricional do indivíduo (AGACHE, 2000).

A camada epidérmica é composta por células parcialmente queratinizadas, que são progressivamente desidratadas durante a sua migração para a superfície externa da pele, constituindo o estrato córneo (EC) (HADGRAFT, 2001).

O EC constitui a camada mais externa da pele, atuando como barreira protetora para o organismo contra os fatores agressivos do meio ambiente; limitando a perda de água, a entrada de microorganismos e agentes químicos tóxicos (ELIAS, 1983). Permite ainda, sensações como pressão, frio e calor, que são detectadas por terminações nervosas específicas posicionadas na pele, sob a epiderme. Os corneócitos são unidos por uma matriz intercelular lipídica, resultando em uma estrutura que costuma ser referida como uma parede com tijolos e argamassa composta por queratina, lipídeos e desmossomos (ELIAS, 1983; FUCHS, RAGHAVAN, GETTING, 2002; NEMES, STEINERT, 1999; KENDALL, FOONG CHONG, COCK, 2007).

O EC constitui-se de uma camada heterogênea que contém cerca de 40% de queratina (proteína), 40% de água e 18 a 20% de lipídeos, principalmente triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e fosfolipídeos. (HADGRAFT, 2001, FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

A epiderme viável localiza-se logo abaixo do EC e é composta por uma faixa de células vivas, incluindo células de Langerhans com alta sensibilidade imunológica, queratinócitos, células tronco e melanócitos. Ao contrário da camada mais profunda constituída pela derme, a epiderme viável carece de vasos sanguíneos e terminações nervosas, o que confere características importantes de sítio indolor e não invasivo para a veiculação de fármacos. As células de Langerhans são responsáveis pela captação e

processamento de materiais estranhos, a fim de gerar uma resposta imunológica efetiva (CHEN, HAYNES, NEEDLE, 2002).

Provavelmente uma das funções mais importantes da pele seja a capacidade de funcionar como barreira para a difusão molecular, que é assegurada pela camada mais externa, o EC (KALIA *et.al.*, 2001, HADGRAFT, 2001). No entanto, é importante lembrar, que embora o EC apresente baixa permeabilidade, ele não é totalmente impermeável, a exemplo da pele saudável íntegra (MARKS, 2004). O EC está exposto a uma grande variabilidade de agentes químicos do ambiente, que podem afetar suas estruturas e suas funções (SILVA *et al*, 2007).

3.2 PENETRAÇÃO DE FÁRMACOS PELA PELE

Os meios pelos quais moléculas de um fármaco podem penetrar a pele incluem a penetração através do EC, ou através dos anexos cutâneos (folicúlos pilosos, ductos sudoríparos, glândulas sebáceas e sudoríparas) (Figura 1). Entretanto, como estes últimos representam uma fração pequena da área superficial da pele, admite-se que a penetração de fármacos por estas vias seja comparativamente de menor importância (HADGRAFT, 2001; HADGRAFT, LANE, 2005; KRETSUS *et. al.*, 2008).

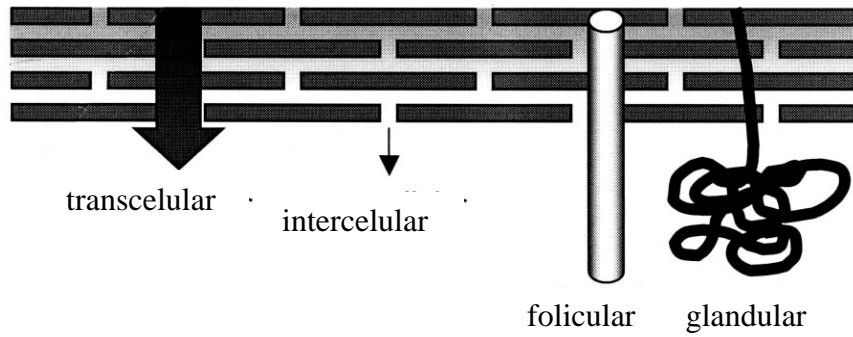


Figura 1. Representação esquemática da pele mostrando as possíveis rotas de Penetração. (HADGRAFT, 2001).

Moléculas de fármaco podem atravessar o EC por via transcelular ou intercelular, como mostra a figura 2, contudo é mais difícil determinar diferenças entre estas vias (JUNGINGER, 1992; HADGRAFT, 2001, KRETSUS *et. al.*, 2008).

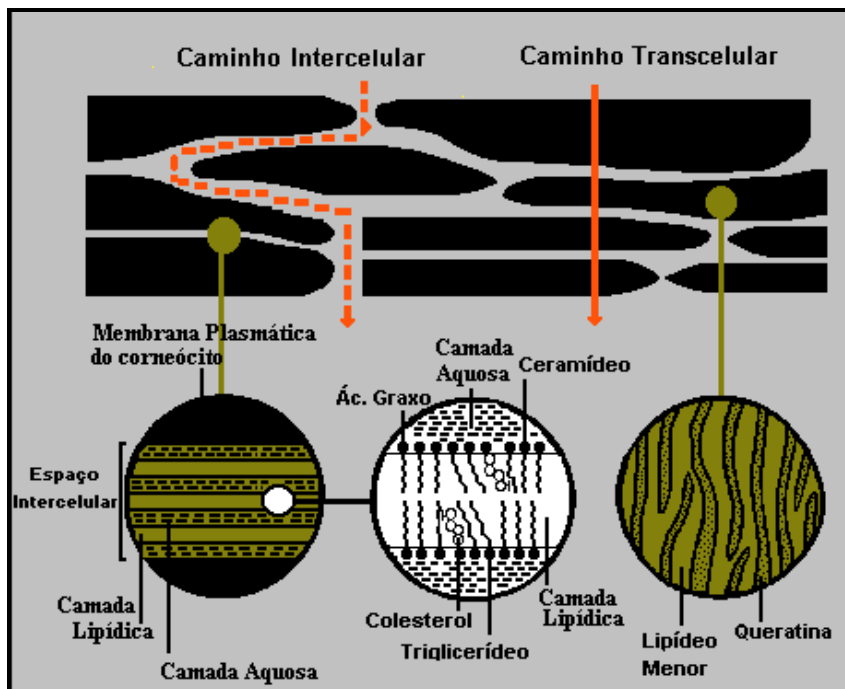


Figura 2. Representação esquemática da estrutura da camada córnea. (Adaptado de JUNGINGER, 1992).

Um estudo realizado por Albery e Hadgraft (1979) identificou a importância da rota intercelular considerando a espessura da pele, entretanto a natureza dos canais intercelulares não era completamente conhecida. Posteriormente, identificou-se a natureza destes canais como contendo uma mistura de ceramidas, ácidos graxos livres e seus ésteres, colesterol e seus sulfatos, e que estes lipídeos arranjavam-se em uma estrutura de bicamadas (HADGRAFT, 2001). Desta maneira, atribuiu-se a impermeabilidade da pele à dois fatores principais: ao caminho tortuoso e ao problema de partição repetida e da difusão através da estrutura de bicamadas (HADGRAFT, 2001).

Entre os fatores controladores da penetração cutânea de fármacos pela pele estão: a hidratação do EC, a temperatura, o pH, a concentração e as características moleculares, tanto do fármaco quanto dos componentes da formulação. O grau de absorção pode ser determinado pela hidratação do EC, uma vez que o aumento da hidratação diminui a resistência do mesmo, provavelmente por provocar um intumescimento das estruturas compactas da camada cornificada e a criação de canais aquosos que permitem a difusão de fármacos. Sabe-se que o pH influencia no percentual de ionização das moléculas e, embora apenas moléculas não ionizadas passem prontamente por membranas lipídicas, sabe-se que moléculas ionizadas efetivamente penetram no EC até um determinado nível, e uma vez que estas apresentam maior hidrossolubilidade do que as moléculas neutras em solução saturada ou próxima da saturação, elas podem exercer uma contribuição significativa para o fluxo total. A temperatura não sofre grandes variações durante o uso clínico de preparações de uso tópico, uma vez que, o uso de roupas em quase todo o corpo podem prevenir amplas flutuações de temperatura e das velocidades de penetração (AULTON, 2005).

3.3. ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DA ABSORÇÃO PERCUTÂNEA

Para que um fármaco possa ser absorvido e eliminado do organismo, bem como para que possa alcançar o sítio de ação em determinada célula faz-se necessário ocorrer à difusão através das membranas biológicas (SINKO, 2008). Assim, para que um fármaco aplicado topicamente possa fazer efeito local ou sistêmico é preciso que seja capaz de atravessar o EC. Este se comporta como uma barreira semi-permeável à difusão passiva, sem evidenciar processos metabólicos de transporte (CEVEC, VIERL, 2006).

A difusão passiva pode ser definida como um processo pelo qual a diferença de concentração é reduzida por um fluxo espontâneo de matéria. Nesse processo físico-químico o soluto passa espontaneamente de uma região de alta concentração para outra de baixa concentração, enquanto as moléculas de solvente movem-se na direção contrária, assim, admite-se que o fluxo do soluto é estabelecido como consequência (FLORENCE e ATTWOOD, 2003)

De acordo com Florence e Attwood (2003) a expressão que relaciona o fluxo de material ao gradiente de concentração é definida como a primeira lei de Fick, cuja equação descreve o processo de difusão sob condições de equilíbrio estacionário, onde o gradiente de concentração não muda com o tempo. Hadgraft (2001) descreve que a equação de primeira lei de Fick usada para descrever o fluxo no estado estacionário pode ser simplificada pela seguinte equação:

$$J = \frac{D K \Delta C}{h}$$

onde J é o fluxo por unidade de área, D é o coeficiente de difusão na pele, K é o coeficiente de partição do fármaco entre pele e veículo, Δ_c é a diferença de concentração através da pele e h é o comprimento do caminho difusional através da pele.

Como nos experimentos de difusão passiva, a solução do compartimento receptor é constantemente removida e substituída por outra porção de solvente a fim de manter a concentração baixa, a esta condição denomina-se condição *sink*, como mostra a Figura 3.

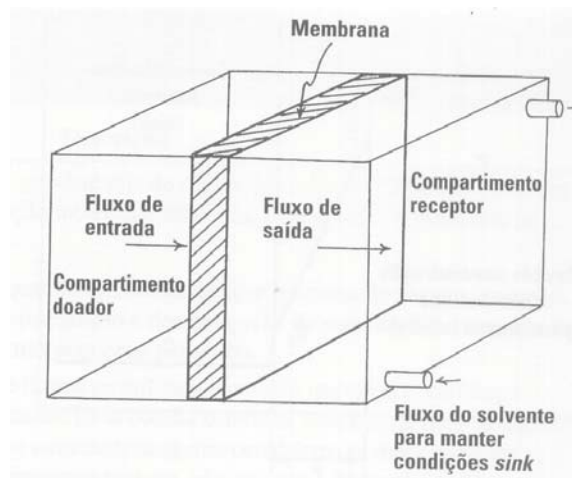


Figura 3 - Representação esquemática de uma célula de difusão na qual o compartimento doador contém o difusante na concentração C . Fonte: SINKO, 2008

Enquanto a primeira lei de Fick descreve o fluxo, ou taxa de difusão por unidade de área, no estado estacionário, a segunda lei de Fick refere-se a uma mudança de concentração do difusante ao longo do tempo a uma distância qualquer, isto significa um fluxo em estado não estacionário (SINKO, 2008). Portanto, a segunda lei de Fick estabelece que a velocidade de mudança de concentração em um elemento de volume interno ao campo difusional é proporcional à velocidade de mudança no gradiente de

concentração naquele ponto do campo, e a constante de proporcionalidade é o coeficiente de difusão (FLORENCE e ATTWOOD, 2003). Logo, a segunda lei de Fick é a equação de transporte de massa que enfatiza a variação da concentração em função do tempo em determinado local e não a difusão de massa através de uma unidade de área por unidade de tempo. Ela determina que a concentração em função do tempo em uma determinada região seja proporcional à alteração no gradiente de concentração naquela região do sistema (SINKO, 2008). Desta maneira a segunda lei de Fick pode ser definida pela equação:

$$\frac{dC}{dt} = D \frac{d^2C}{dx^2}$$

onde dC é a concentração de difusante em um determinado volume que muda em função do tempo dt e $D \frac{d^2C}{dx^2}$ representam as quantidades difundidas em função da distância dx^2 (SINKO, 2008).

No estado de equilíbrio $dC/dt = 0$, e a segunda lei de Fick pode ser lida como:

$$J = \frac{D (C_1 - C_2)}{h}$$

Como usualmente o termo D/h é designado como resistência difusional R , pode-se escrever a equação da seguinte maneira:

$$J = \frac{C_1 - C_2}{R}$$

onde J é o fluxo, $C_1 - C_2$ é a diferença de concentração entre os compartimentos doador (C_1) e receptor (C_2) e R é a resistência difusional (SINKO, 2008).

A difusão ocorre no sentido de maior concentração (C_1) para a de menor concentração (C_2). Após certo tempo o estado estacionário é atingido e as concentrações passam a ser constante em todos os pontos da membrana (SINKO, 2008), como mostra a Figura 4.

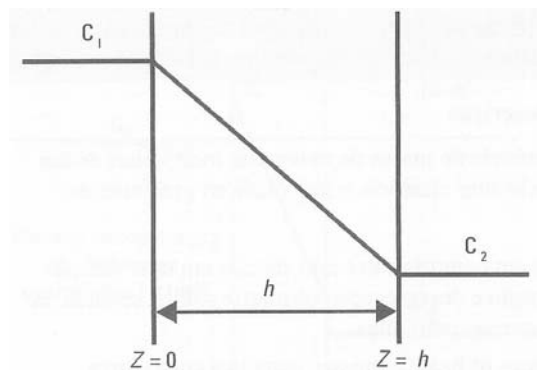


Figura 4 - Difusão através de um filme fino, onde as moléculas do soluto difundem da zona de maior concentração (C_1), para a de menor concentração (C_2). As concentrações em ambos os lados do filme são mantidas constantes. No estado de equilíbrio, as concentrações permanecem constantes em todos os pontos do filme. O perfil de concentração dentro do filme é linear e o fluxo é constante. Fonte: SINKO (2008).

Entretanto, para a pele, antes de ser alcançada a penetração estacionária, pode-se observar um aumento da velocidade de difusão ao longo do tempo, e uma fase de latência torna-se aparente (FLORENCE e ATTWOOD, 2003), como mostra a Figura 5.

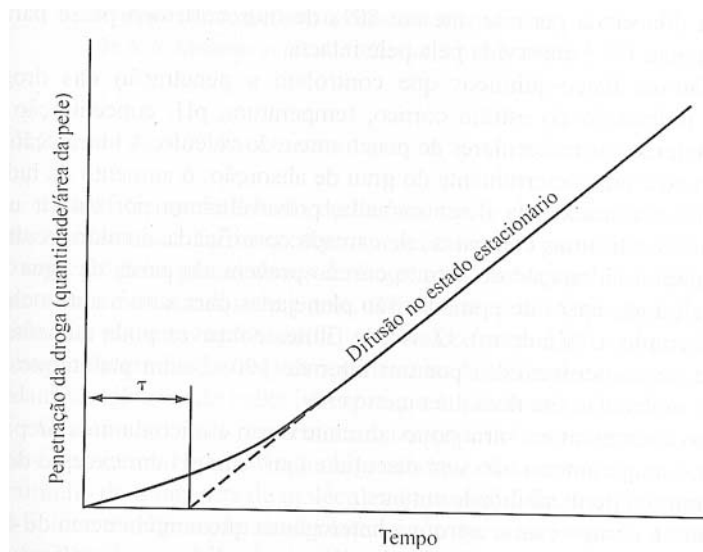


Figura 5 - Perfil para penetração em função do tempo de um fármaco ideal que se difunde através da pele humana. Após a instalação do estado de difusão estacionário. Fonte: FLORENCE e ATTWOOD (2003).

Isto ocorre porque formas farmacêuticas de ação modificada, como os semi-sólidos de uso tópico, podem não exibir o processo de estado estacionário durante o tempo inicial da liberação. No gráfico da Figura 5 observa-se uma condição inicial de estado não-estacionário, seguida de uma condição onde a velocidade de difusão é constante, e o sistema se apresenta em estado estacionário, onde a curva se apresenta linear. Extrapolando-se a porção da linha em estado de equilíbrio até o eixo do tempo, observa-se um ponto de inserção denominado tempo de latência ou *lag time* (t_L), que é o tempo necessário para que o difusante estabeleça um gradiente de concentração uniforme dentro da membrana que separa o compartimento doador do receptor (SINKO, 2008). O tempo de latência ou *lag time* (t_L) pode ser determinado pela equação:

$$t_L = \frac{h^2}{6D}$$

onde h é o comprimento difusional e D é a difusão.

3.3.1 Efeitos do Fármaco na Penetração Cutânea

O efeito do fármaco na penetração cutânea depende do seu coeficiente de difusão através da pele, da sua concentração na formulação e do seu coeficiente de partição óleo/água ($K_{o/a}$) (CEVC *et. al.*, 1995, GANEM-QUINTANAR *et. al.* 1997, AULTON, 2005).

O coeficiente de difusão de um fármaco na pele sofre influência do seu tamanho e forma molecular, da sua carga (CEVC *et. al.*, 1995), mas também depende do estado da matéria do meio de difusão (MCDAYD; DEASY, 1995, AULTON, 2005). Na pele os valores mais baixos de difusibilidade são observados dentro da matriz complexa do EC. Em temperatura constante pode-se dizer que a difusibilidade de um fármaco em um veículo tópico ou na pele é dependente das propriedades do fármaco e do meio de difusão, bem como da interação entre eles (MCDAYD; DEASY, 1995, AULTON, 2005). O caminho mais importante de transporte das moléculas solúveis em água é o transcelular, que envolve a passagem através das células e espaços intercelulares, enquanto o transporte de moléculas lipossolúveis é presumivelmente a via intercelular (FLORENCE e ATTWOOD, 2003, KRETSUS, 2008).

Como já foi dito, a permeação de fármacos segue a lei de Fick, considerando-se que o fluxo do fármaco é proporcional a um gradiente de concentração por toda a fase de barreira (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; KRETSUS, 2008). Para que isto ocorra é preciso que a solução doadora seja saturada e, isto pode ser obtido aplicando-se sistemas de co-solventes (GANEM-QUINTANAR *et. al.* 1997, AULTON, 2005). Entretanto a atividade termodinâmica de um fármaco na fase doadora ou na membrana pode ser alterada pela modificação do pH, pela formação de complexos ou pela

presença de tensoativos, micelas ou mesmo pelos co-solventes. Com a aplicação de sistemas co-solventes o coeficiente de partição do fármaco entre a membrana e a mistura de solventes geralmente cai à medida que a solubilidade em sistemas solventes aumenta. De modo que não é importante solubilizar demais um fármaco se o objetivo é promover a penetração (AULTON, 2005).

O coeficiente de partição é determinado pelas propriedades do fármaco e também do veículo, uma vez que este representa a fase doadora e a pele, a fase receptora (GANEM-QUINTANAR *et. al.* 1997; HADGRAFT, LANE, 2005; KRETSUS, 2008). No caso de um fármaco ser mais solúvel no EC do que no veículo no qual está apresentado, a concentração no EC poderá ser mais alta do que a do veículo, de maneira que conforme se observa a depleção nas camadas de contato do veículo com a pele, a natureza da formulação determinará a velocidade com que as camadas de contato serão reabastecidas por difusão, e em conseqüência, determinará a velocidade de absorção (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; KRETSUS, 2008).

Quanto ao tamanho e forma moleculares, é possível imaginar que moléculas pequenas penetrem de modo mais rápido que as grandes. Entretanto, o papel do coeficiente de partição é dominante, de modo que se torna difícil estudar o efeito da forma molecular sem alterar as características de solubilidade, conseqüentemente, muito pouco é conhecido a respeito do tamanho e forma moleculares na penetração na pele (GANEM-QUINTANAR *et. al.* 1997; AULTON, 2005).

3.3.2 Efeito do Veículo na Penetração Cutânea

Como se pode observar na primeira lei de Fick (expressa no item 3.3), o veículo tem influência na absorção de fármacos, pois uma das variáveis é justamente o coeficiente de partição dos fármacos (MCDAYD; DEASY, 1995, HO, CHEN, SHEU, 2000; FLORENCE e ATTWOOD, 2003; BABU *et. al.*2007).

Alterando-se a composição do veículo de modo a diminuir neste a solubilidade do fármaco, é possível se observar um aumento da permeabilidade deste fármaco. Assim, a atividade termodinâmica do fármaco torna-se o fator limitante da atividade biológica. De modo que, aumentando-se a solubilidade do fármaco no veículo pela adição de um co solvente, reduz-se o coeficiente de partição em relação à pele. Por outro lado, aumentando-se a quantidade de fármaco que pode ser incorporada no veículo o favorece-se o gradiente de concentração. Pode-se dizer que o veículo é capaz de afetar a penetração somente quando a liberação do fármaco constituir o fator limitante (MCDAYD; DEASY, 1995, HO, CHEN, SHEU, 2000; FLORENCE e ATTWOOD, 2003, KANG *et.al.*2007).

Enquanto todo o gradiente de atividade estiver contido no veículo, não se observa influência das propriedades da pele, pois a concentração do fármaco no veículo, o coeficiente de difusão do fármaco no sistema e a sua solubilidade serão os fatores significativos. Quando estes fatores não forem importantes, a atividade termodinâmica do fármaco no veículo será o único fator significativo (GWAK, CHUN,2001 ;FLORENCE e ATTWOOD, 2003, BABU *et. al.*2007). Pode-se dizer, então, que o formulador pode manipular a biodisponibilidade do fármaco a partir de formulações semi-sólidas em

suspensão pela alteração do coeficiente de difusão, da concentração total ou da solubilidade do fármaco (AULTON, 2005, LIU *et.al.* 2006).

Todas as formulações semi-sólidas que contém partículas finamente pulverizadas do fármaco, nas quais a atividade termodinâmica é semelhante àquela do fármaco sólido (onde a concentração do fármaco solúvel é muito menor do que a do fármaco suspenso), apresentarão a mesma velocidade de penetração, desde que a passagem do fármaco pela pele constitua o fator limitante (GANEM-QUINTANAR *et. al.* 1997, FLORENCE e ATTWOOD, 2003, BABU *et. al.*2007).

Para que um fármaco em suspensão possa ter ação, é preciso que apresente alguma solubilidade no veículo, para que exista uma solução saturada do fármaco na fase contínua. Desta maneira somente o material solúvel penetrará no EC, e a camada esgotada do veículo será, então reabastecida pela dissolução de partículas suspensas e pela difusão das moléculas do fármaco para a camada esgotada (FLORENCE e ATTWOOD, 2003, BABU *et. al.*2007).

3.4 A Nifedipina

É uma substância do tipo das dihidropiridinas, antagonista do cálcio, sendo denominados como “bloqueadores dos canais de cálcio” (Rang *et al.*, 2003).

3.4.1 *Propriedades físico-químicas*

A nifedipina (NFD) (Figura 6) apresenta-se como cristais amarelos, com ponto de fusão na faixa de 172-174°. Ela é praticamente insolúvel em água; levemente solúvel

em álcool; muito solúvel em clorofórmio ou acetona. As soluções são extremamente fotossensíveis. Apresenta coeficiente de partição octanol / água ($\text{Log } P$) igual a 2,2 (GENNARO, 2000; MOFFA, OSSELTON, WIDDOP, 2004).



Figura 6 - Estrutura química da Nifedipina

Sabe-se que a solubilidade da NFD em água, e sua biodisponibilidade são muito baixas, além de possuir um tempo de meia-vida muito curto. (BOLDRI *et. al.* 1994). Adicionalmente, a NFD é mais bem absorvida no intestino delgado, com substancial efeito de metabolização hepática (SORKIN, CLISSLOD, BROGDEN, 1985).

3.4.2 Aplicações da NFD para o Uso Tópico

Considerações acerca da farmacologia da NFD são descritas apenas para o uso sistêmico do fármaco, segundo Rang e colaboradores (2003):

Os antagonistas dos canais de cálcio afetam diferentes processos fisiológicos, incluindo a secreção, contração muscular, função plaquetária e liberação de neurotransmissores. Entretanto, seus principais efeitos são produzidos no coração e no músculo liso vascular. Todas as substâncias de cada uma das três classes de antagonistas do cálcio (fenilalquilaminas, dihidropiridinas e benzotiazepinas) ligam-se à subunidade α_1 do canal de cálcio cardíaco do tipo L, porém em sítios distintos, cada um dos quais interage de modo alostérico entre si e com a estrutura de “comporta” do canal, impedindo indiretamente a difusão do Ca^{2+} através do seu poro no canal aberto. As dihidropiridinas do tipo antagonista (nifedipina) ligam-se seletivamente aos canais no modo O (quando ele não se abre em resposta à despolarização), favorecendo, assim, este estado de não abertura. A NFD, assim como a maioria das dihidropiridinas, exerce maior efeito sobre o músculo liso. No músculo liso vascular, os antagonistas do cálcio causam dilatação arteriolar generalizada, mas não causam grande alteração venosa. As dihidropiridinas produzem acentuada vasodilatação sem grande efeito direto sobre o coração, enquanto que outros antagonistas do cálcio são menos seletivos.

Embora o mecanismo de ação pelo qual a NFD aplicada topicamente promova a cicatrização de ferimentos não esteja completamente elucidado, acredita-se que ela promova um bloqueio do influxo de cálcio para a musculatura lisa e assim diminua o tônus vascular facilitando o fluxo sanguíneo e a irrigação tecidual (TORSIELLO e KOPACK 2000, WYNN, 2004).

A nifedipina (NFD) é preconizada primordialmente para tratamento de doença cardiovascular (RANG, *et. al.*, 2003). Entretanto, Squillante e cols (1998) estudaram a otimização da promoção de penetração cutânea da NFD em pele de camundongos sem pelo. Os autores verificaram valores de fluxo quatro vezes maiores que os requeridos

para distribuir uma dose oral equivalente no homem, sugerindo que, de acordo com o veículo escolhido, a distribuição percutânea de NFD em doses usuais pode ser aplicada clinicamente.

Um estudo desenvolvido por Abbas e cols. (2003) aplicou tratamento tópico com NFD a fim de promover a cicatrização na pele de ratos saudáveis e diabéticos. De acordo com estes autores, a NFD foi capaz de promover a cicatrização na fase inflamatória do processo, entretanto não produziu modificações sensíveis na fase de maturação e não afetou a fase de proliferação da reparação tecidual. Entretanto, a aplicação tópica da NFD tem sido descrita para o tratamento em humanos com lesões cutâneas oriundas de doença vascular periférica (BRANDT *et. al.*1983; ANTROPOLI *et. al.* 1999); de úlceras diabéticas (TORSIELLO E KOPACK, 2000, WYNN,2004) e cicatrizes hipertólicas (ISRAEL, 2003, HELMKE, 2004).

De acordo com Torsiello e Kopack (2000), uma mulher diabética de quarenta e três anos apresentava significativos danos decorrentes do diabetes, incluindo uma ferida no calcanhar direito. Devido ao longo período de sete anos sem cicatrização, foi decidido pela aplicação de nifedipina tópica para acelerar o processo, induzindo a vasodilatação local sem provocar efeitos sistêmicos. Para tal, foi prescrito uma formulação semi-sólida, organogel de lecitina e Pluronic® (PLO) com 8% de nifedipina, para ser administrada 1 mL pela paciente duas vezes ao dia. Foi observada cicatrização em um período de seis a oito semanas. Efeitos adversos não foram observados pelos autores com esta terapia.

Problemas que tornam as úlceras diabéticas de difícil cicatrização incluem fluxo sanguíneo inadequado para as áreas da ferida e o aumento do risco de infecções.

Desta forma, formulações contendo bloqueadores de canal de cálcio, como a nifedipina, têm mostrado eficácia neste propósito (HELMKE,2004).

Outro caso relatado por Torsiello e Kopack (2000), um menino de oito anos, submetido a uma cirurgia ortopédica há anos, apresentava uma cicatriz hipertrófica que prejudicava a correção cirúrgica, além de comprometer o suprimento de sangue para a região (Figura 7a). Para contornar o problema, foi necessário inserir um expansor para tecido na cicatriz que foi mantido por quatro dias. Este procedimento ocasionou necrose com quatro dias de pós-operatório. Após a remoção do expansor, a área foi tratada com nifedipina tópica para acelerar a cicatrização e prevenir a formação de nova cicatriz hipertrófica. Para tal, foi prescrito uma formulação semi-sólida, PLO com 2% de nifedipina (20 mg/mL), para ser administrado 1 mL, duas vezes ao dia. Após três semanas foi observada completa cicatrização (figura 7b).

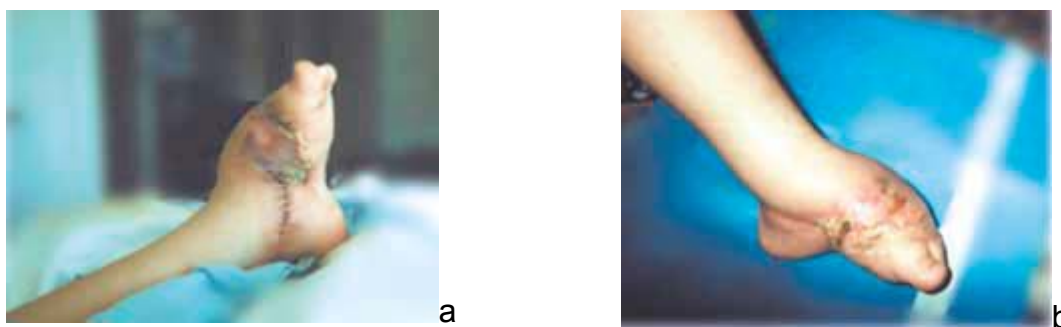


Figura 7 - Paciente com cicatriz hipertrófica antes do tratamento (a) e após três semanas (b) de tratamento tópico com nifedipina. (Torsiello e Kopack, 2000).

De acordo com Lee (*apud* HELMKE,2004) cicatrizes hipertróficas formam-se devido ao excesso de colágeno produzido durante a fase de remodelamento da cicatrização e podem reduzir a mobilidade da área se a cicatriz for muito extensa. A

aplicação tópica de bloqueadores de canal de cálcio tem mostrado grande eficácia na redução da formação dessas cicatrizes.

Israel (2003) relatou o caso de um homem de cinquenta e cinco anos que apresentava fratura de todos os dedos do pé esquerdo, do tornozelo e da tíbia após um acidente de trabalho. Observou-se o desenvolvimento de uma grande úlcera na perna do paciente. Durante dois anos, médicos dedicaram-se ao tratamento da úlcera utilizando técnicas de drenagem linfática e curetagem, que aumentaram a área da lesão. Duas formulações de uso tópico (uma para controle da dor e outra para a revascularização tecidual contendo NFD em PLO) foram utilizadas no tratamento por quarenta e dois dias. Foi prescrita uma aplicação ao dia, por três semanas, na clínica. Após este período o paciente foi orientado a continuar o tratamento em casa por mais vinte e um dias, realizando a aplicação das formulações duas vezes ao dia, retornando a clínica uma vez por semana. Após o quadragésimo segundo dia já não se fizeram necessárias visitas a clínica. Este protocolo mostrou que a terapia tópica para a revascularização tecidual apresentou resultados satisfatórios, reduzindo o tempo de internação do paciente.

No mercado brasileiro, a NFD é encontrada apenas sob a forma de comprimidos e cápsulas contendo de 10 a 60 mg do fármaco, descritas no Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF, 2007/2008).

As principais formulações farmacêuticas contendo NFD comercializadas no Brasil estão relacionadas na tabela 1 (DEF, 2007/2008).

Tabela 1 - Principais formulações farmacêuticas contendo NFD comercializadas no Brasil (DEF, 2007)

Medicamento	Apresentação	Fabricante	Substância Ativa
Adalat	10mg / 60 caps	Bayer	Nifedipino
Adalat oros	30 mg / 15 comp	Bayer	Nifedipino
Adalat oros	60 mg / 15 comp	Bayer	Nifedipino
Adalat oros	20 mg / 15 comp	Bayer	Nifedipino
Adalat retard	20 mg / 30 comp	Bayer	Nifedipino
Adalat retard	10 mg / 30 comp	Bayer	Nifedipino
Adalex retard	20 mg / 30 comp	Herald's	Nifedipino
Cardalin retard	20 mg / 30 comp	Solvay farma	Nifedipino
Caprilat	10 mg / 30 comp	Hearst	Nifedipina
Caprilat	20 mg / 20 comp	Hearst	Nifedipina
Dilaflux	10 mg / 60 caps	Medley	nifedipino
Dilaflux	10 mg / 30 comp sublingual	Medley	nifedipino
Dialflux retard	20 mg / 20 comp	Medley	Nifedipino
Dilavax	10 mg / 30 comp	Sanval	Nifedipino
loncord	40 mg / 20 comp	Diffucap-chemobras	Nifedipino
loncord	20 mg / 20 comp	Diffucap-chemobras	Nifedipino
Neo fedipina	10 mg / 30 comp	Neo química	Nifedipino
Neo fedipina	20 mg / 30 comp	Neo química	Nifedipino
Nifedax	10 mg / 30 comp	Royton	Nifedipino
Nideficard cp	10 mg / 30 comp	Kinder	Nifedipino
Nideficard cp	20 mg / 30 comp	Kinder	Nifedipino
Nifedipress retard	10 mg / 30 comp	Medquimica	Nifedipino
Nifedipress retard	20 mg / 30 comp	Medquimica	Nifedipino
Nifelat	25+10 mg / 28 caps	Biossintética	Atenolol+nifedipino
Nifelat	50+20 mg / 28 caps	Biossintética	Atenolol+nifedipino
Nioxil	10 mg / 30 comp	Geolab	Nifedipino
Nioxil	20 mg / 20 comp	Geolab	Nifedipino
Normopress	20 mg / 30 comp	Delta	nifedipino
Orosprevent	20+100 mg / 28+7 comp	Bayer	Nifedipino+acido acetilsalicilico
Orosprevent	30+100 mg / 28+7 comp	Bayer	Nifedipino+acido acetilsalicilico
Orosprevent	60+100 mg / 28+7 comp	Bayer	Nifedipino+acido acetilsalicilico
Oxicord	20 mg / 20 comp	Biossintetica	Nifedipino
Oxicord	10 mg / 30 comp	Biossintetica	Nifedipino
Oxicord retard	20 mg / 30 comp	Biossintetica	Nifedipino
Oxicord retard	20 mg / 60 comp	Biossintetica	Nifedipino
Prenilan rtd	10 mg / 30 comp	Laboris	Nifedipino
Prenilan rtd	20 mg / 30 comp	Laboris	Nifedipino
Prenilan rtd	20 mg / 60 comp	Laboris	Nifedipino

3.5. Formulações Semi-Sólidas de Uso Tópico

A utilização de formulações tópicas para o tratamento de lesões cutâneas apresenta inúmeras vantagens: preservam o fármaco da ação do pH do estômago; promovem efeito local quando a distribuição sistêmica não é desejada (WAGNER *et al.* 1002, ROBERTS, 1996) ou quando promovem efeitos adversos (HELMKE, 2004; DUBEY *et al* 2007).

As formulações semi-sólidas de uso tópico são as que se destinam à aplicação sobre a pele. Do ponto de vista farmacotécnico as mais utilizadas são classificadas como pomadas, cremes, géis, pastas e emplastos (ANSEL; POPOVICK; ALLEN, 2007). Entretanto, sob o ponto de vista físico-químico as preparações semi-sólidas têm sido classificadas como organogéis, hidrogéis e cremes (SINKO, 2008). Elas podem ser classificadas, quanto à solubilidade, em lipofílicas (gordurosas) de fase única como as bases hidrofóbicas, as bases de absorção e os lipogéis, ou lipofílicas bifásicas, como emulsões água/óleo; e em hidrofílicas (miscíveis com água) de fase única como os macrogols e os hidrogéis e hidrofílicas bifásicas como emulsões óleo/água (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

Ou podem ser classificadas, ainda, conforme o tipo de sistema de liberação dérmica, em curativos oclusivos, adesivos transdérmicos oclusivos, materiais lipofílicos, bases de absorção, bases emulsificantes, emulsões a/o, emulsões o/a, umectantes e pós (AULTON, 2005).

Uma ampla variedade de matérias-primas está disponível para a preparação de uma forma farmacêutica. De acordo, com a literatura, os mais utilizados são: glicerídios; ceras; hidrocarbonetos; silicones polioxietilenoglicóis e homólogos; géis de produtos

minerais: bentonita; silício; géis de polímeros orgânicos: alginatos, gelose, pectina, metilcelulose e carboximetilcelulose, amido (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995; LE HIR, 1997).

Atualmente, novos veículos para a aplicação tópica de fármacos têm sido desenvolvidos com o objetivo de permitir a cicatrização de lesões cutâneas persistentes que não respondem aos tratamentos tradicionais (ISRAEL,2003). Entre eles encontram-se o gel de polaxamer 407, que tem sido indicado para o tratamento de queimaduras e como pele artificial (PAOLETTI, 2004), e o PLO (gel de lecitina e polaxamer), também descrito pela sua capacidade de promover a penetração cutânea de fármacos (TORSIELLO e KOPACKI, 2000, KINCAID, 2002, ISRAEL 2003).

É importante avaliar as propriedades físico-químicas das formulações semi-sólidas (microscopia, pH, reologia, teor do ativo). Assim como, a determinação da velocidade de liberação do fármaco destas preparações e a penetração/permeação do mesmo nas camadas da pele. Desta forma, pode-se prover o controle de qualidade das formulações sob aspecto biofarmacotécnico.

3.5.1. *Organogel de Lecitina e Polaxamer 407 (Pluronic® Lecitin Organogel -PLO)*

PLOs são microemulsões, semelhantes a um gel, compostas por fosfolipídios (lecitina), solvente orgânico apropriado, água e Polaxamer 407 (Pluronic® F127). As fases, semelhantes a um gel, consistem de uma rede tridimensional de micelas cilíndricas reversas emaranhadas, imobilizando a fase contínua, promovendo a gelificação. Segundo Kumar e Katare (2005), o PLO é capaz de promover a penetração

cutânea de fármacos até as camadas mais profundas. A melhora na distribuição tópica de fármacos é atribuída, principalmente, à solubilidade bifásica do fármaco, ao seu particionamento desejado e à modificação da função de barreira da pele pelos componentes do PLO (KUMAR e KATARE, 2005).

3.5.1.1 *Composição do Organogel*

A matriz do organogel consiste de um surfactante (lecitina) como moléculas gelificantes, um solvente orgânico não polar como fase externa ou contínua, e um agente polar, usualmente água. (KUMAR e KATARE, 2005).

3.5.1.1.1 *A Lecitina*

Vários estudos demonstraram a importância da lecitina estar em sua forma *in natura*, que contém ácidos graxos insaturados afim de produzir o estado semelhante a um gel (WALDE *et al.*, 1990; WENDEL, 1995; CAPITANI *et al.*, 1996; HANAHAN, 1997; SCHNEIDER, 1997; SHUMILINA *et al.* 1997; SHCHIPUNOV, 2001)

A insaturação nas moléculas fosfolipídicas é desejada para a formação do organogel de lecitina devido ao efeito de auto-agregação entre essas moléculas e a formação de microestruturas. A insaturação contribui para o fator volume da região não polar das moléculas fosfolipídicas e pode afetar o parâmetro de empacotamento crítico (CPP), favorecendo a formação de estruturas micelares reversas. A lecitina deve conter

pelo menos 95% de fosfatidilcolina para a preparação do organogel. (SCARTAZZINI E LUISI, 1988; SCHURTENBERGER *et al*,1990; SHCHIPUNOV, 2001).

3.5.1.1.2 O Solvente Orgânico

O solvente orgânico também desempenha papel importante na gelificação das moléculas do organogel (SCARTAZZINI E LUISI, 1988; SHCHIPUNOV, 2001). Uma grande variedade de solventes são capazes de formar gel em presença de lecitina, entretanto, os ésteres de ácidos graxos são particularmente interessantes para as aplicações tópicas dos Organogéis de Lecitina (LOs), por exemplo, o miristato de isopropila (IPM) e o palmitato de isopropila (IPP). Isto se deve ao seu poder de promover a penetração cutânea em adição a sua natureza biocompatível e biodegradável (MOORE, 1982; PARSAAEE,2002).

3.5.1.1.3 O Solvente Polar

O agente polar atua como um agente formador e estabilizador, e tem papel crucial no processo de gelificação. A habilidade de gelificar do solvente polar é determinada pelas suas propriedades físico-químicas (SHCHIPUNOV e SHUMILINA, 1995; SHCHIPUNOV e SHUMILINA, 1996; SHCHIPUNOV e HOFFMANN, 1998). Os solventes polares gelificadores devem apresentar alta tensão superficial, relativa permissividade (constante dielétrica), polaridade do solvente (índice de polaridade), e

uma forte tendência à formação de pontes de hidrogênio. A água é o agente polar comumente mais empregado (SHCHIPUNOV e SHUMILINA, 1995).

3.5.1.1.4 O Polaxamer 407

O Polaxamer 407 (Pluronic[®] F127) é um polímero sintético que tem sido incorporado aos LOs pelas suas características como co-surfactante e estabilizador, tornando possível a constituição dos organogéis com lecitina de relativa pureza (75%) (BERTI e LIPSKYS, 1995; CRANDALL, 2001).

Denomina-se Polaxamer (Pluronic[®]) a uma série de copolímeros não iônicos e estreitamente relacionados de óxido de etileno e óxido de propileno (COLLETT *et al*, 2000). São também denominados lutróis e foram aplicados primariamente em preparações farmacêuticas como surfactantes, emulsificantes, agentes suspensores e estabilizadores. Os LOs contendo polaxamer são denominados, então, como organogéis de lecitina e polaxamer (PLO), organogel de polaxamer, organogel de pluronic, PLO gel, ou simplesmente PLOs (KUMAR e KATARE, 2005). A Figura 8 mostra uma proposta para a preparação do PLO, segundo Kumar e Ktare (2005).

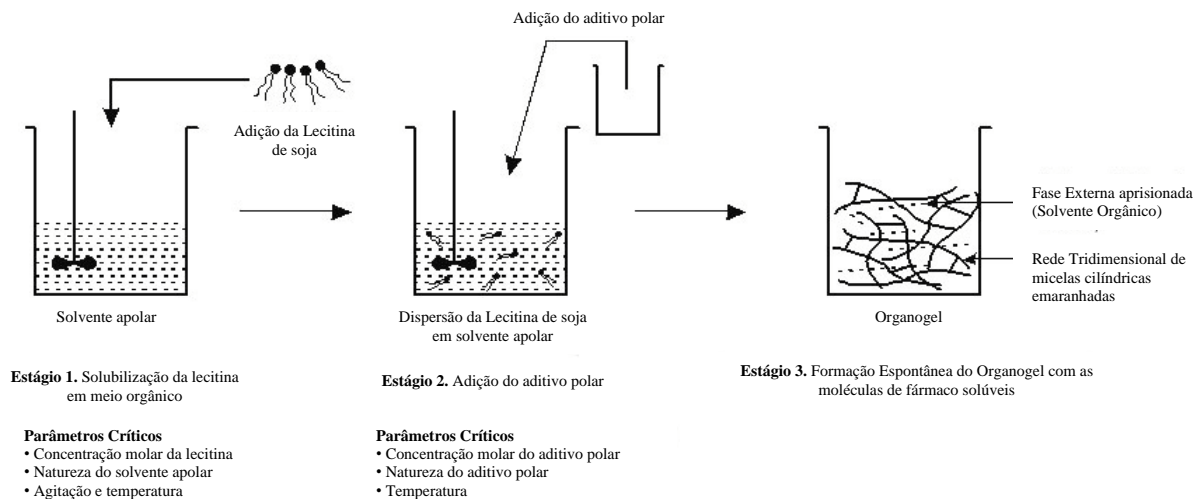


Figura 8 Diagrama esquemático da preparação de organogéis de lecitina, proposto por Kumar e Ktare (2005). Fármacos lipofílicos são solubilizados na fase orgânica, enquanto compostos hidrofílicos podem ser solubilizados na fase polar. Para a preparação do PLO, o co surfactante (polaxamer) é adicionado à fase polar. Fonte: KUMAR e KATARE, 2005.

3.5.1.1.5 O Monoetil Éter de Dietilenoglicol - Transcutol® (TC)

O Monoetil éter de dietilenoglicol, ou, Transcutol® (TC) é também chamado de etoxi diglicol, dietileno glicol etil éter ou, ainda carbitol. É líquido incolor, de odor suave e agradável. É higroscópico e miscível com água e com os solventes orgânicos mais comuns (USP 24, 1999; ASH e ASH, 1995).

O TC é um líquido higroscópico que apresenta miscibilidade com solventes polares e apolares. É reconhecido como um potente promotor da permeação cutânea devido à sua atoxicidade e biocompatibilidade com a pele, além de suas excelentes propriedades solubilizadoras. Entretanto, são também descritas suas propriedades, como veículo isolado ou em mistura com água, objetivando aumentar a retenção de

ativos na pele sem promover concomitantemente a permeação cutânea (RITSCHER *et.al.*,1991; GODWIN KIM FELTON,2002).

3.5.2 Reologia dos Semi-sólidos

O estudo do comportamento reológico das formas farmacêuticas semi-sólidas é importante devido à sua natureza complexa e passível de influenciar seus processos de fabricação, embalagem e utilização (FREITAS, 2006, SINKO,2008).

Através da reologia pode-se descrever o fluxo de líquidos e a deformação de sólidos. A resistência ao escoamento, ou fluxo, é expressa através da viscosidade de modo que, quanto maior for a viscosidade, maior será também a resistência (BARRY, 1974 *apud* BENTLEY *et.al.*1999; SINKO, 2008). As formas farmacêuticas semi-sólidas aplicadas neste trabalho constituem-se de dispersões heterogêneas e possuem propriedades reológicas complexas, e por este motivo não se pode expressar a viscosidade em termos de um valor absoluto, como se faz para líquidos simples (FREITAS, 2006; SINKO, 2008).

A reologia de um produto específico pode afetar a aceitação por parte do paciente, a estabilidade física e, eventualmente, a sua biodisponibilidade. As propriedades reológicas podem influir ainda na seleção do equipamento de fabricação a ser utilizado (RICCI, 2002; FREITAS, 2006, SINKO, 2008).

3.5.2.1 *Sistemas Não-newtonianos*

Segundo os tipos de fluxo e a deformação, os materiais que não seguem a lei de fluxo de Newton são classificados como não-newtonianos (SINKO, 2008), e a maioria dos fluidos farmacêuticos não segue essa lei, pois a viscosidade varia com a velocidade de cisalhamento (AULTON, 2005).

Comportamento não-newtoniano é observado em dispersões heterogêneas, como dispersões coloidais, emulsões e suspensões (SINKO, 2008), atualmente muito aplicadas a sofisticados sistemas de liberação baseados em polímeros (AULTON, 2005).

Segundo o fluxo, os sistemas não-newtonianos podem se apresentar como plásticos (ou de Bringham), pseudoplásticos ou dilatantes (FLORENCE e ATTWOOD, 2003, AULTON, 2005, SINKO, 2008). Os sistemas que apresentam fluxo do tipo plástico não fluem até que determinado valor de cisalhamento, denominado valor cedência, seja ultrapassado e a valores menores do que o valor de cedência o material se comporta como um sólido (AULTON, 2005). Nos sistemas que apresentam fluxo do tipo dilatante observa-se um aumento da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento (AULTON, 2005).

Neste trabalho será dada maior ênfase aos sistemas que apresentam fluxo do tipo pseudoplástico, nos quais se observa a fluidez logo assim que uma tensão de cisalhamento é aplicada e, portanto, não há valor de cedência (AULTON, 2005, SINKO, 2008). A viscosidade de um sistema pseudoplástico diminui com o aumento da tensão de cisalhamento, entretanto, não há um valor unívoco de viscosidade que possa ser considerado característico. As viscosidades são calculadas como a inclinação da

tangente à curva em um ponto específico e são conhecidas como viscosidades aparentes, apenas tendo significado indicando-se a tensão de cisalhamento na qual a determinação foi realizada (AULTON, 2005, SINKO, 2008). Por este motivo a representação mais satisfatória para a viscosidade de sistemas pseudoplásticos é feita por meio de uma curva de consistência (AULTON, 2005, SINKO, 2008).

De acordo com Sinko (2000) o reograma curvado dos sistemas pseudoplásticos é decorrente da ação de cisalhamento sobre moléculas de cadeia longa de materiais como os polímeros lineares. À medida que a tensão de cisalhamento é aumentada, as moléculas desordenadas passam a alinhar seu eixo longitudinal na direção do fluxo. Esta orientação reduz a resistência interna no material, permitindo assim uma maior velocidade de cisalhamento para cada tensão de cisalhamento sucessiva. Além disso, parte do solvente associado às moléculas pode ser liberada, resultando em um abaixamento efetivo da concentração e do tamanho das moléculas dispersas, o que irá também abaixar a viscosidade aparente (SINKO, 2008).

3.5.2.2 *Tixotropia*

A tixotropia pode ser descrita como um fenômeno no qual se observa a recuperação isotérmica e relativamente lenta da consistência, perdida pelo cisalhamento de um material deixado em repouso (REINER e SCOTT-BLAIR, 1967 *apud*. SINKO, 2008). Embora o termo deva ser aplicado apenas a uma transformação isotérmica do tipo sol-gel, tornou-se comum descrever como tixotrópico qualquer

material que exiba um decréscimo reversível de sua viscosidade aparente dependente do tempo (AULTON, 2005).

Os sistemas tixotrópicos geralmente são constituídos por partículas assimétricas ou macromoléculas, que são capazes de interagir mediante várias ligações secundárias, produzindo uma frouxa estrutura tridimensional, de forma que o material tem aspecto de gel quando não foi submetido ao cisalhamento. (AULTON, 2005). Conforme um cisalhamento é aplicado e o fluxo inicia, a estrutura começa a se desintegrar à medida que os pontos de contato são desfeitos e as partículas se alinham umas em relação às outras. Desta maneira o material sofre uma transformação de gel para sol e apresenta uma quebra da estrutura. Quando a tensão de cisalhamento é retirada, a estrutura inicia sua reestruturação. Este processo de reestruturação constitui-se de uma restauração progressiva da consistência conforme as partículas assimétricas entram em contato umas com as outras por efeito do movimento browniano aleatório (SINKO, 2008).

3.5.3 Estudos *In Vitro*

Os testes de liberação *in vitro* das substâncias ativas têm chamado muita atenção após a edição do GUIDANCE FOR INDUSTRY - FDA (UNITED STATES, 1997).

De acordo com a edição do GUIDANCE FOR INDUSTRY - FDA (UNITED STATES, 1997), a liberação *in vitro* do fármaco é uma propriedade da formulação que o contém. A velocidade de liberação dos produtos tópicos dermatológicos pode ser

medida empregando um sistema bicompartimental como célula de difusão vertical com membrana sintética e meio acceptor adequado. A membrana sintética serve como um suporte para separar a formulação do meio receptor, devendo ser quimicamente inerte para não reagir com a formulação ou com o meio acceptor, e não deve ser limitante da velocidade nos processos de liberação do fármaco, sendo empregados acetato de celulose, nitrato de celulose e polisulfona (HAIGH e SMITH, 1994). A solução receptora deve ser compatível com a metodologia analítica empregada para quantificação do fármaco (FREITAS, 2005).

Soluções receptoras como misturas hidro-alcólicas e água são empregadas como meio acceptor, obedecendo a condição *sink*, ou seja, o volume empregado é cinco vezes maior que o ponto de saturação do fármaco (ZATZ, 1995).

Segundo o GUIDANCE FOR INDUSTRY - FDA (1997) o meio receptor pode consistir de tampão aquoso, meio hidroalcoólico ou qualquer outro tipo, com a justificativa apropriada. De acordo com Siewert e cols. (2003), dependendo da solubilidade do fármaco, o meio receptor pode necessitar conter surfactantes.

Os dados obtidos podem ser empregados como medida de equivalência para produtos de formulações semi-sólidas sujeitas a alterações especificadas pela SUPAC (*Scale-Up and Postapproval Changes*), ou seja, como controle de qualidade para assegurar a uniformidade lote a lote dos produtos (GUIDANCE FOR INDUSTRY - FDA, 1997; SHAH; ELKINS; WILLIAMS, 1999; FLYNN et al., 1999).

A atividade termodinâmica e a viscosidade têm um efeito dominante sobre a liberação da substância ativa do veículo (DAVIS; KHANDERIA, 1972). A velocidade de liberação do fármaco da formulação pode ser manipulada pela mudança da sua

concentração, variação do coeficiente de partição e aumento de sua solubilidade na formulação (WELIN-BERGER; NEELISSEN; BERGENSTAHL, 2001).

Pesquisas crescentes têm sido realizadas em busca do aparato mais adequado para avaliar a velocidade de liberação *in vitro* para produtos tópicos dermatológicos, uma vez que, oficialmente, não existe uma padronização que possa ser aplicada para todas as formulações semi-sólidas.

Sendo assim, encontram-se descritos na literatura vários modelos de células de difusão, tipos de membranas artificiais, que são empregados na avaliação da velocidade de liberação *in vitro* de fármacos em diferentes formas farmacêuticas (KNORST; NEUBERT; WOHLRAB, 1997; REGE; VILIVALAM; COLLINS, 1998; KIERSTAN et al., 2001; WELIN-BERGER; NEELISSEN; BERGENSTAHL, 2001; WISSING; MÜLLER, 2002; GALLAGHER; TROTTEED; HEARD, 2003; CSÓKA et al., 2005).

A avaliação *in vitro* da penetração e permeação cutânea de fármacos também pode ser avaliada por um sistema bicompartimental de difusão vertical, empregando membrana natural. Dentre os vários tipos de pele animal (rato, cobaio, camundongo com e sem pele, macaco rhesus, cobra) que podem ser utilizadas, recentemente, tem-se empregado a pele suína devido a sua similaridade com a pele humana (HAIGH; SMITH, 1994; LOPES; KANEKO, 2000; SEKKAT; KALIA; GUY, 2002; MEDI; SINGH, 2003).

A pele de orelha suína tem sido empregada em pesquisas de produtos dermatológicos para uso humano. Neste contexto as camadas da pele de maior importância são a epiderme e a derme (BHATTI, SCOTT, DYER, 1989; MEYER, ZSCHEMISCH, 2002). Entretanto há uma região específica da porção posterior da

orelha suína que é mais adequada na aplicação como modelo de correlação para a pele humana (MEYER *et.al.*2007), como mostra a figura 9.

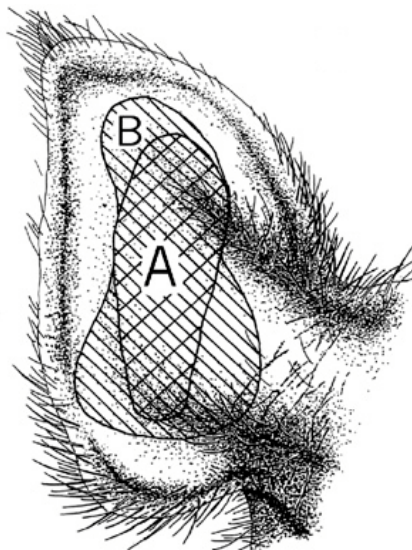


Figura 9: Área posterior da aurícula suína: A e B são recomendadas para utilização experimental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos e Acessórios

- Agitador mecânico Phoenix tipo Vortex[®] modelo AP 56
- Balança analítica Bioprecisa[®] modelo FA2104N
- Balões volumétricos de 100,0 mL, 50,0 mL e 10,0 mL, marca Quimex
- Béquer de 50, 100, 250 e 500 mL marca Quimex
- Centrífuga Beckman Coulter Avanti[®] J25;
- Coluna cromatográfica Hibar[®] LiChrosorb RP 18 de 5 μ e 15 cm;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência WATERS – bomba modelo 510, detector de UV modelo 486 e integrador modelo 746;
- Cubetas de cristal de quartzo com caminho óptico de 1.0 cm
- Destilador QUIMIS modelo NT 425
- Espectrofotômetro Cary50[®]
- Espectrofotômetro SHIMADZU UV modelo 2401PC
- Espectrofotômetro SP-220 Bioespectro[®] equipado com *software* Win-Spec versão 2.3.1
- Estantes para tubo de ensaio
- Grau de vidro marca Quimex

- Microscópio óptico com luz polarizada Zeiss, modelo Axioplan 2 – acoplado à câmera digital Colorview XS e programa gerenciador de imagens AnalySIS
- Microscópio óptico Olympus, modelo BH-100, com objetiva de 100X, equipado com câmera digital Olympus DP-10 e *software* de captura de imagens FlashPath
- Membrana de acetato de celulose, marca Sigma: 27 mm de diâmetro, tamanho do poro 0,2 µm, 43 mm de espessura
- Micro tubos tipo *ependorf* âmbar
- Papel de filtro quantitativo 12,5 cm de diâmetro com 25 mm de porosidade Vetec[®]
- Parafilm[®] “M” American National Can[®]
- Pipetas automáticas: 20, 200, 1000 e 5000µL, marca Gilson[®]
- Pipetas para semi-sólidos Brand Transferpepttor 1000 µL
- Placa aquecedora marca Corning[®] PC 351
- Potenciômetro Model 2000 VWR Scientific[®]
- Provetas de 50, 100, 250 1000 mL marca Quimex
- Reômetro marca Ares TA Instruments[®], com geometria do tipo cone e placa, equipado com elemento Peltier para controle de temperatura.
- Seringas de 30 mL estéreis
- Seringas tipo luer-lock com extrusor
- Sistema de difusão composto por: béquer de vidro 140 ML, suporte cilíndrico orifício 1,4 mm, garra metálica, montado no próprio laboratório.
- Termômetro
- Tubos de ensaio marca Quimex[®]

- Ultra-som Thorton T14 Stock Sceintific[®]
- Unidade filtrante descartável MILLIPORE poro 0,45 μ Millex[®]

4.1.2 Reagentes e Matérias-primas

- Acetonitrila grau CLAE → Lote: 709273/ Fornecedor: Tedia[®]
- Ácido cítrico grau farmacêutico → Lote: 950920/ Fornecedor: Isofar[®]
- Ácido sórbico → Fornecedor: Farnos[®]
- Ácido sulfúrico PA → Lote: 0501618/ Fornecedor: Vetec[®]
- Cloreto de sódio grau farmacêutico → Lote: A57/ Fornecedor: Farnos[®]
- Lauril sulfato de sódio → Lote: HN6J100505/ Fornecedor: Spectrum[®]
- Emulium Delta → Lote: 09855BR6/ Fornecedor: Brasquim[®]
- Etanol P.A → Lote: 0603264/ Fornecedor: Vetec[®]
- Fosfatidil colina (lecitina 75%) → Lote: 7760951/ Fornecedor: Gerbras[®]
- Fosfato de potássio monobásico grau farmacêutico → Lote: 23017
Fornecedor: Hnrifarma[®]
- Fosfato dissódico dibásico grau farmacêutico → Lote: 23017
Fornecedor: Hnrifarma[®]
- Metanol grau CLAE → Lote: 502018/ Fornecedor: Tedia[®]
- Metanol PA → Lote: 0606981/ Fornecedor: Vetec[®]
- Molibdato de amônio PA → Lote: 0704339/ Fornecedor: Vetec[®]
- Nifedipina matéria-prima (padrão de trabalho) → Lote: NFD/012/00-08
Fornecedor: Deg[®]
- Nifedipina padrão USP → Lote: I1/ Fornecedor: USP

- Metilparabeno (Nipagin) → Lote:03001129/ Fornecedor: Galena[®]
- Propilparabeno (Nipazol) → Lote:FI 1611/ Fornecedor: Purifarma[®]
- Palmitato de isopropila → Lote:185642/ Fornecedor: Famos[®]
- Polaxamer (Pluronic[®] F127) → Lote: 027K0033/ Fornecedor: Sigma[®]
- Polissorbato 80 → Lote: 131683/ Fornecedor: Via Farma[®]
- Sorbato de potássio → Fornecedor: Famos[®]
- Transcutol[®] CG → Lote: 450629012/ Fornecedor: Brasquim[®]
- Vaselina Líquida → Lote: IQA 3753/ Fornecedor: Sarfam[®]

4.1.3 Substância Química de Referência (SQR) e Formulações

- Nifedipina padrão USP → Lote: I1/ Fornecedor: USP

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Composição e Técnica de Preparação das Formulações Desenvolvidas

As formulações estudadas serão descritas neste trabalho como:

- 1- PLO+NFD → base PLO contendo 8% de nifedipina;
- 2- PLO+NFD+TC → base PLO contendo 8% de nifedipina e 10% de transcutol,;
- 3- EMUL → base emulsionada o/a contendo 8% de nifedipina.

4.2.1.1 Formulação PLO+NFD: base PLO contendo 8% de nifedipina

Fase aquosa:

Polaxamer 407		10g
Sorbato de Potássio		0,1g
Água destilada	qsp	50 mL

Fase oleosa:

Palmitato de isopropila		10g
Lecitina de soja		10g
Ácido sórbico		0,2 g

Formulação PLO+NFD:

Nifedipina		8 g
Fase oleosa		2 ml
Fase aquosa	qsp	10mL

4.2.1.1.1. *Técnica de Preparo da Formulação PLO+NFD*

Para o preparo da fase aquosa, os componentes foram pesados separadamente e transferidos para um béquer de vidro de 240 ml contendo 25 ml de água gelada. Foram adicionados mais 75 mL de água gelada, sob lenta homogeneização com auxílio de bastão de vidro. Cobriu-se com filme plástico e deixou-se em repouso de um dia para o outro, sob refrigeração (FONSECA e FERREIRA, 2005).

O preparo da fase oleosa realizou-se pesando os componentes separadamente. Em seguida o ácido sórbico foi adicionado à lecitina e ao palmitato de isopropila em um béque de vidro de 250 ml. Foi feita uma lenta homogeneização com

bastão de vidro. O recipiente foi coberto com filme plástico e deixado em repouso de um dia para o outro. Observou-se a formação de mistura de consistência líquida no dia seguinte. Armazenou-se em frasco vedado, à temperatura ambiente, e acondicionou-se em pote plástico preto para proteção contra a luminosidade (FONSECA e FERREIRA, 2005).

A formulação PLO+NFD foi obtida pesando-se a nifedipina (NFD) em recipiente apropriado utilizando-se balança analítica. A NFD foi triturada em gral de vidro com auxílio de pistilo também de vidro, a fim de reduzir o tamanho das partículas. O volume necessário da fase oleosa foi medido com o auxílio de uma seringa plástica de 30ml e subseqüentemente foi adicionado ao gral contendo a NFD triturada onde foi feita homogeneização por trituração.

O corpo da seringa tipo *luer lock* foi vedado com parafilme na extremidade anterior, como mostra a figura 10, e a fase oleosa contendo NFD foi acondicionada na seringa pela extremidade posterior. Em outra seringa tipo *luer lock* foi medido o volume necessário de fase aquosa, de maneira idêntica ao processo para a fase oleosa.



Figura 10 - Seringas tipo *luer lock* com o corpo vedado com parafilme na extremidade anterior.

Os êmbolos de cada uma das seringas foram encaixados na parte posterior de cada uma respectivamente. As vedações das extremidades anteriores das duas seringas foram retiradas, os êmbolos foram empurrados para eliminar o ar residual e as seringas foram conectadas, uma à outra pela extremidade anterior, utilizando-se o adaptador (extrusor), como mostra a figura 11.



Figura 11 - Seringas conectadas, uma à outra pela extremidade anterior, utilizando-se o adaptador (extrusor).

O conteúdo das seringas foi homogeneizado empurrando-se lentamente um êmbolo por vez (mecanismo de extrusão), como mostra a figura 12. O processo foi executado não menos que cinco vezes, até se obter uma preparação homogênea.



Figura 12 - Mecanismo de extrusão: o conteúdo das seringas foi homogeneizado empurrando-se lentamente um êmbolo por vez.

A preparação foi acondicionada em pote plástico preto para proteção contra a luminosidade, como mostra a figura 13. Todos os processos com a presença da NFD foram realizados ao abrigo da luz.



Figura 13 - Acondicionamento da preparação em pote plástico preto para proteção contra a luminosidade

4.2.1.2 Formulação PLO+NFD+TC: base PLO contendo 8% de nifedipina e 10% de transcutool

Fase aquosa:

Polaxamer 407		10g
Sorbato de Potássio		0,1g
Água destilada	qsp	50 mL

Fase oleosa:

Palmitato de isopropila		10g
Lecitina de soja		10g
Sorbato de potássio		0,2 g

Formulação:

Nifedipina		8 g
Transcutol		10 g
Fase oleosa		2 ml
Fase aquosa	q.s.p.	10mL

4.2.1.2.1 *Técnica de Preparo da Formulação PLO+NFD+TC*

A preparação da fase aquosa e da fase oleosa foi realizada pelo mesmo processo descrito para as fases aquosa e oleosa da formulação PLO+NFD.

Para a obtenção da formulação, a nifedipina (NFD) foi pesada em recipiente apropriado utilizando-se balança analítica e, posteriormente foi triturada em gral de vidro com auxílio de pistilo também de vidro, a fim de reduzir o tamanho das partículas do pó. O Tanscutol foi adicionado e homogeneizado por trituração. O volume necessário da fase oleosa foi medido com o auxílio de uma seringa plástica de 30ml e subseqüentemente foi adicionado ao gral contendo a NFD triturada e o Tanscutol, e novamente foi feita homogeneização por trituração.

O corpo da seringa tipo *luer lock* foi vedado com parafilme na extremidade anterior e a fase oleosa contendo NFD foi acondicionada na seringa pela extremidade posterior. Em outra seringa tipo *luer lock* foi medido o volume necessário de fase aquosa, de maneira idêntica ao processo para a fase oleosa. Os êmbolos de cada uma das seringas foram encaixados na parte posterior de cada uma respectivamente. As vedações das extremidades anteriores das duas seringas foram retiradas, os êmbolos foram empurrados para eliminar o ar residual e as seringas foram conectadas, uma à outra pela extremidade anterior, utilizando-se o adaptador (extrusor). O conteúdo das seringas foi homogeneizado empurrando-se lentamente um êmbolo por vez (mecanismo de extrusão). O processo foi executado não menos que cinco vezes, até se obter uma preparação homogênea.

A preparação foi acondicionada em pote plástico preto para proteção contra a luminosidade.

4.2.1.3 Formulação EMUL: base emulsionada o/a contendo 8% de nifedipina

Fase oleosa:

Emulium Delta (álcool cetílico + estearato de glicerila + estearato de PEG75 + Ceteth20 + Esteareth20)		6 g
Vasilina líquida		2 g
Propilparabeno		0,1 g

Fase aquosa:

Metilparabeno		0.1 g
Água destilada	q.s.p.	100 g

Formulação:

Nifedipina		8 g
EMUL	q.s.p.	100 g

4.2.1.3.1 Técnica de Preparo da Formulação EMUL

Para o preparo da fase aquosa, o metilparabeno foi pesado, adicionado em 60 ml de água destilada e levado para aquecimento em caneco de aço inox (200 ml) até 80°C.

Para o preparo da fase oleosa, o álcool cetílico + estearato de glicerila + estearato de PEG75 + Ceteth20 + Esteareth20 (Emulium Delta), o propilparabeno e a vaselina líquida foram pesados separadamente. Posteriormente foram acondicionados em um outro caneco de aço, previamente tarado, e levados para aquecimento até 75°C.

A fase aquosa (a 80°C) foi vertida sobre a fase oleosa (a 75°C), sob agitação constante e vigorosa. A agitação da preparação foi mantida até a temperatura ambiente. O volume (p/p) foi completado para 100 g com água destilada e a preparação

foi homogeneizada. Acondicionou-se em pote plástico preto para proteção contra a luminosidade.

Para o preparo da formulação EMUL a NFD foi pesada e triturada em gral de porcelana previamente tarado. Adicionou-se a emulsão até completar 100 g e homogeneizou-se. A formulação foi acondicionada em pote plástico preto para proteção contra a luminosidade.

4.2.2 Análise da Matéria-prima Nifedipina

Realizou-se a análise da matéria-prima de nifedipina (NFD) a fim de utilizá-la como padrão secundário. Para isto foram realizados os testes de: perda por dessecação; doseamento pelo método farmacopéico de espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV), preconizado pela Farmacopéia Brasileira IV, comparando-se com padrão farmacopéico USP, cedido pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Farmácia (LabCQ-FF/UFRJ); análise de pureza do pico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com dispositivo de arranjo de foto diodos, obedecendo as condições cromatográficas preconizadas pela Farmacopéia Brasileira (F. Brás IV, 1996).

4.2.2.1 Perda por Dessecação

Foi seguido o procedimento geral descrito na Farmacopéia Brasileira IV (1996). As análises foram feitas em triplicata.

As análises foram realizadas ao abrigo da luz, devido à foto sensibilidade da NFD.

4.2.2.2 Análise Quantitativa (Doseamento) por Espectrofotometria de absorção Ultravioleta (UV)

O doseamento da NFD matéria-prima foi realizado por espectrofotometria de ultravioleta, como descrito na Farmacopéia Brasileira IV, objetivando-se determinar o seu teor, a fim de emprega-la como padrão secundário.

Todas as análises foram realizadas ao abrigo da luz, devido à foto sensibilidade da NFD.

Para a construção da curva analítica, uma solução-padrão de NFD foi preparada, pesando-se exatamente cerca de 25,0 mg do padrão farmacopéico da NFD, que foram transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. Ao balão foram adicionados 40 mL de etanol e o balão foi levado para solubilização em equipamento de ultra-som por cinco minutos; após os quais completou-se o volume no balão para 50,0 mL com etanol e homogeneizou-se o conteúdo.

Foram preparadas três soluções, a partir da solução-padrão: retirando-se alíquotas de 1,0 mL para balão volumétrico de 100,0 mL; 1,0 mL para balão de 50,0 mL e 3,0 mL para balão de 100,0 mL. Os volumes dos três balões foram completos com etanol, obtendo-se soluções de concentrações teóricas iguais a 0,005 mg/mL, 0,010 mg/mL e 0,015 mg/mL, respectivamente.

Para as amostras de NFD matéria-prima foram pesadas exatamente cerca de 50 mg da matéria-prima, que foram lesões cutâneas para balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionou-se 40 mL de etanol ao balão e este foi levado para solubilização em equipamento de ultra-som por cinco minutos; após os quais completou-se o volume no balão para 50 mL com etanol. Uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para balão de 100,0 mL e o volume foi completado com etanol. Foi obtida uma solução-amostra na concentração de 0,01 mg/mL.

Foram feitas cinco pesadas da matéria-prima de NFD em dois dias diferentes.

As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 230 nm.

4.2.2.3 Análise Qualitativa do Pico da NFD Matéria-prima por CLAE com Detector de UV com Arranjo de Foto Diodos (PDA)

A realização desta análise foi feita com base no método proposto pela Farmacopéia Brasileira IV (1996) com a finalidade de se observar a pureza do pico da NFD matéria-prima. A NFD foi identificada cromatograficamente por um sistema CLAE isocrático equipado com coluna C18, pré coluna (C18). A fase móvel foi composta de água:acetonitrila:metanol na proporção 50:25:25. O comprimento de onda de detecção foi fixado em 235 nm, correspondente ao $\lambda_{\text{máx}}$ encontrado por espectrofotometria de varredura na região do UV, o fluxo foi fixado em 1,0 mL / min.

4.2.3. Análise Quantitativa da NFD nas Formulações por Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta visível (UV-visível) com Reação Colorimétrica

A quantificação da NFD nas formulações foi realizada por espectrofotometria de absorção no UV-visível, tomando-se por base o método proposto por Rahman e Azmi (2005), com o objetivo de se determinar o teor de NFD nas formulações em estudo.

O método colorimétrico proposto por Rahman e Azmi (2005), fundamenta-se na oxidação da NFD com molibdato de amônio. O molibdato reduzido assume coloração azul e é mensurado em 830 nm. Este método mostrou-se específico para a NFD, uma vez que os seus produtos de degradação não reagem com os reagentes aplicados na reação (RAHMAN, AZMI 2005).

Para verificar o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), foram realizadas varreduras na região do visível para a NFD em cada matriz das formulações.

4.2.3.1 Preparo das soluções de trabalho

4.2.3.1.1 Solução de Ácido Sulfúrico 4M

Para o preparo da solução de ácido sulfúrico 4M, 98,02 g de ácido sulfúrico concentrado foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 250,0 mL. Foi adicionada água destilada em pequenas porções até completar o volume de 250,0 mL. O procedimento foi conduzido em banho refrigerado devido à energia liberada pela reação exotérmica entre o ácido sulfúrico e a água.

4.2.3.1.2 Solução de Molibdato de Amônio (0,02M em ácido sulfúrico 4M)

Para o preparo desta solução, 6,18g de molibdato de amônio foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 250,0 mL. O volume foi completado até 250,0 mL com a solução de ácido sulfúrico 4M.

4.2.3.1.3 Solução tampão de ácido cítrico (0,1 M com fosfato de sódio 0,2 M de pH = 4,0)

Foram pesados 15,11 g de ácido cítrico e adicionados a 78,70 mL de água destilada em béquer de 100 mL, para a obtenção a solução de ácido cítrico 0,1 M. (MORITA E ASSUMPÇÃO, 1998).

Foram pesados 14,189 g de fosfato de sódio dibásico monohidratado e transferidos para um balão volumétrico de 500,0 mL. O volume foi completado com água destilada para 500 mL. (MORITA E ASSUMPÇÃO, 1998).

As soluções obtidas foram transferidas para um béquer de 1000 mL e o pH foi verificado com potenciômetro.

4.2.3.2 Preparo das amostras das formulações para determinação de teor de NFD

As análises foram realizadas ao abrigo da luz, devido à fotossensibilidade da NFD.

Foram pesados 312,5 mg (o equivalente a 25,0 mg de NFD) de formulação em béquer de vidro. Ao béquer contendo a formulação foram adicionados 40 mL de metanol e levado para homogeneização em ultra-som por 3 minutos. O conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL e o volume foi completado com metanol. Deste balão foi, então, transferida uma alíquota de 0,5 mL para tubo de ensaio contendo 5mL de solução tampão de pH 4,0 e 1,4 mL de solução ácida de molibdato de amônio. O tudo de ensaio foi vedado, agitado e levado para aquecimento em banho-maria a 100°C por 20 minutos, após os quais o tubo foi resfriado a temperatura ambiente. O conteúdo do tubo de ensaio foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com água destilada. A amostra foi filtrada por papel de filtro para tubo de ensaio. A leitura da amostra foi feita em 830 nm.

A análise foi realizada em triplicata, em dois dias seguidos.

4.2.3.3 Preparo do placebo

Foram pesados 312,5 mg da matriz de cada formulação sem a adição da NFD, e seguiu-se exatamente o mesmo procedimento realizado para as amostra contendo NFD.

A análise foi realizada em triplicata, em dois dias seguidos.

4.2.3.4 Preparo do branco

A um tubo de ensaio contendo 5mL de solução tampão de pH 4,0 e 1,4 mL de solução ácida de molibdato de amônio foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL de metanol. O tubo de ensaio foi vedado, agitado e levado para aquecimento em banho-maria a 100°C por 20 minutos, após os quais o tubo foi resfriado a temperatura ambiente. O conteúdo do tubo de ensaio foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com água destilada.

4.2.3.5 Preparo da Curva Analítica

A cada dia de análise, foi realizada uma curva analítica para a boa execução dos procedimentos, além da avaliação da qualidade do sistema.

Em cada dia de análise uma solução estoque de NFD foi preparada pesando-se 50 mg de NFD padrão de trabalho com teor de 99,94%. A massa de NFD foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. Ao balão foram adicionados 80 mL de metanol e o balão foi levado para homogeneização em ultra-som por cinco minutos, após os quais o volume foi completado para 100,0 mL com metanol.

Desta solução-estoque foram retiradas cinco alíquotas, a fim de ser obtida uma curva analítica com cinco pontos. Foram retiradas alíquotas de 100 µL, 300 µL, 500 µL, 700 µL e 900 µL que foram translesões cutâneas para cinco tubos de ensaio contendo 5mL de solução tampão de pH 4,0 e 1,4 mL de solução ácida de molibdato de amônio. Os tubos de ensaio foram vedados, agitados e levados para banho-maria a 100°C por 20 minutos, após os quais os tubos foram resfriados a temperatura ambiente. Os

conteúdos dos tubos foram transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com água destilada. Foram obtidas cinco soluções de concentração teórica 0,005 mg/mL, 0,015 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,035 mg/mL e 0,045 mg/mL, respectivamente.

4.2.3.6 Validação do método espectrofotométrico

A validação tem o objetivo de demonstrar que o método analítico proposto é apropriado para a determinação quantitativa da NFD nas formas farmacêuticas semi-sólidas empregadas neste estudo.

De acordo com a Resolução RE nº 899 de 2003, a validação de métodos quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos envolve critérios como especificidade, linearidade e intervalo de confiança, precisão, limites de detecção e quantificação e, exatidão / recuperação.

4.2.3.6 1 Especificidade

Para a verificação da especificidade do método foram preparados placebos, ou amostras das bases das formulações isentas de NFD, conforme descrito no item 4.2.3.3. Foram preparadas, também, amostras do branco, conforme descrito no item 4.2.3.4 e amostras do padrão conforme descrito no item 4.2.3.5. As amostras foram analisadas por espectrofotometria de varredura com comprimentos de onda entre 200 e 1000 nm.

4.2.3.6 2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela análise de cinco concentrações diferentes de NFD, na faixa de concentração de 0,005 mg/mL a 0,045 mg/mL. Foram preparadas três curvas analíticas, em dois dias diferentes. A linearidade foi determinada pela análise de regressão linear com o auxílio do programa Excel[®] (Microsoft, 2002).

4.2.3.6 3 Exatidão

A estimativa da exatidão foi realizada pelo método de adição do padrão, onde quantidades conhecidas da substância de referência do analito são adicionadas às diluições do placebo, realizando-se a análise quantitativa do analito. (Brasil. Res – RE nº 899, 2003).

Foi preparada uma solução-estoque de concentração igual a 0,4 mg/mL, pesando-se exatamente cerca de 20,0 mg de NFD que foram translesões cutâneas quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. Ao balão foram adicionados 40 mL de metanol e o balão foi levado para homogeneização em ultra-som por 5 minutos, após os quais o volume foi completado com metanol.

Foram preparados nove placebos, ou amostras das bases das formulações isentas de NFD, pesando-se exatamente cerca de 312,5 mg da matriz de cada formulação em béqueres de vidro. Aos béqueres contendo a formulação foram adicionados 40 mL de metanol e estes foram levados para homogeneização em ultra-som por 3 minutos. O conteúdo dos béqueres foram transferidos quantitativamente para balões volumétricos de 50,0 mL. A três balões contendo o placebo foram adicionadas

alíquotas de 2,5 mL, a outros três foram adicionadas alíquotas de 3,13 mL e aos três últimos foram adicionadas alíquotas de 3,75 mL da solução-estoque. Os volumes dos balões foram completados para 50,0 mL. Foram obtidas amostras de concentração igual a 0,02 mg / mL, 0,025 mg / ml e 0,03 mg / ml.

De cada um dos balões foi retirada uma alíquota de 1,0 mL, as quais foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5mL de solução tampão de pH 4,0 e 1,4 mL de solução ácida de molibdato de amônio, cada tubo. Os tubos de ensaio foram vedados, agitados e levados para banho-maria a 100°C por 20 minutos, após os quais os tubos foram resfriados a temperatura ambiente. Os conteúdos dos tubos foram transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com água destilada. As amostras foram filtradas por papel de filtro para tubo de ensaio. A leitura das amostras foi feita em 830 nm.

A figura 14 mostra o esquema de preparação das amostras para o ensaio de exatidão

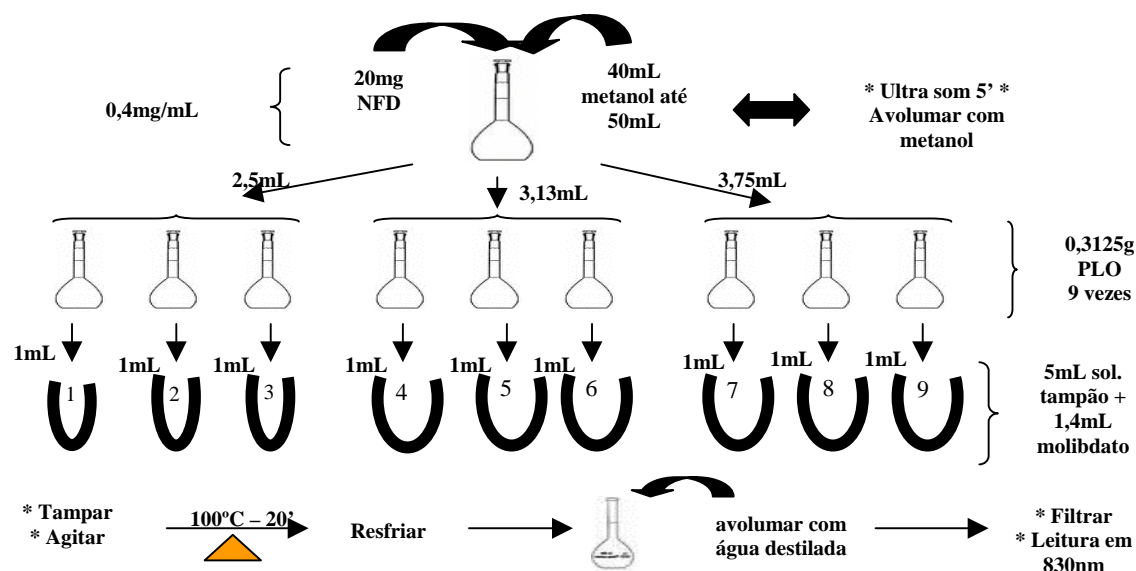


Figura 14: Esquema do preparo das amostras para determinação da exatidão

4.2.3.6 4 Precisão intra e inter dia

É representada pela avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma mostra. Neste trabalho a precisão foi calculada através da avaliação dos parâmetros estatísticos da curva analítica.

4.2.3.6 5 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Estes limites foram calculados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica (Brasil. Resolução – RE nº 899, 2003; RIBANI *et al.*, 2004)

O limite de detecção foi expresso pela equação a seguir:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Onde: *DP* representa a estimativa do desvio padrão do intercepto com o eixo Y e *IC* representa a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica

Critérios similares de LD podem ser aplicados para o limite de quantificação, adotando-se uma relação 10:1, a partir da seguinte equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Os limites foram calculados para todas as formulações estudadas.

4.2.4 Caracterização Geral das Formulações

As formulações preconizadas neste estudo foram caracterizadas quanto aos ensaios para a determinação do pH, viscosidade, reologia e aspecto morfológico por microscopia óptica, a fim de estudar as suas características físicas. As características químicas foram determinadas em função do teor do fármaco e o comportamento biofarmacotécnico, através dos ensaios de liberação e penetração / permeação cutânea.

4.2.4.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado através de potenciômetro Model 2000 VWR Scientific®, previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0 (Merck, reagentes), à temperatura ambiente, sem diluição do produto (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1995; LE HIR, 1997).

4.2.4.2 Determinação da Reologia

A viscosidade foi medida utilizando-se um reômetro Ares da TA Instruments (Figura 15). O controle de temperatura foi realizado utilizando-se um elemento Peltier, a geometria utilizada foi cone e placa e as análises foram realizadas em temperaturas

entre (-)10° e 50° C com taxa de aquecimento de 2° C/min, em frequência de 1Hz e deformação de 1%.



Figura 15 - Reômetro ARES -TA utilizado nas medidas de viscosidade.

4.2.4.3 *Determinação do aspecto morfológico por microscopia óptica*

O aspecto morfológico das formulações foi observado por microscopia óptica simples e por microscopia óptica com luz polarizada. Para as duas técnicas utilizou-se aumento de 100X com imersão. Ambos os equipamentos encontram-se acoplados a câmera digital para a captura de imagens. Nas fotos obtidas por microscopia de luz polarizada foi possível realizar medidas aleatórias dos tamanhos das micelas nas formulações, com auxílio de programa gerenciador de imagen, AnalySIS.

Para a preparação das amostras, uma pequena quantidade da formulação foi aplicada sobre uma lâmina de vidro e sobre a amostra foi aplicada uma lamínula de vidro. A face da lâmina com a superfície contendo amostra e lamínula foi virada para

baixo e o conjunto foi delicadamente pressionado sobre uma superfície rígida, a fim de produzir um filme delgado de amostra. A lâmina foi, então observada ao microscópio. (CARASTRAN, 2007)

4.2.4.4 *Determinação do teor do fármaco nas formulações*

Esta análise foi feita após a validação do método proposto no item 4.2.3 e teve como objetivo verificar a quantidade de NFD efetivamente encontrada nas formulações.

As amostras foram preparadas como descrito no item 4.2.3.2.

4.2.5 **Liberação *in vitro* Através de Membrana Sintética**

4.2.5.1. *Estudo da solubilidade da NFD e escolha da solução receptora*

A solubilidade da NFD foi estudada em diferentes soluções correntemente utilizadas na avaliação dos perfis de liberação e penetração e/ou permeação de preparações semi-sólidas de uso tópico.

A determinação da solubilidade da NFD nas soluções receptoras foi realizada por espectrofotometria de absorção no UV-visível, tomando-se por base o método proposto por Rahman e Azmi (2005).

Foram testadas: solução de água e etanol (1:1) (a), solução de água e etanol (1:1) adicionada de 0,5% lauril sulfato de sódio (b), água adicionada de 0,5% lauril

sulfato de sódio (c), tampão fosfato pH 7,4 adicionado de 0,5% lauril sulfato de sódio (d).

As amostras para a determinação da solubilidade foram preparadas adicionando-se uma quantidade em excesso de NFD a um volume definido de cada uma das soluções. Estas suspensões foram mantidas sob agitação e protegidas da luminosidade durante 24 horas, a temperatura ambiente em torno de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Após este período, as suspensões foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Alíquotas de 1,0 mL para as soluções b e c e de 0,1 mL para as soluções a e b do sobrenadante foram filtradas para tubo de ensaio contendo 5 mL de solução tampão pH 4,0 e 1,4 mL de solução ácida de molibdato de amônio. O tubo de ensaio foi vedado, agitado e levado para aquecimento em banho-maria a 100°C por 20 minutos, após os quais o tubo foi resfriado a temperatura ambiente. O conteúdo do tubo de ensaio foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com água destilada. A amostra foi filtrada por papel de filtro para tubo de ensaio. A leitura da amostra foi feita em 830 nm. O valor da concentração foi calculado empregando-se a equação da reta obtida através de curva de padrão, como apresentado no item 4.2.3.6.2.

4.2.5.2 *Estabelecimento das condições analíticas para a NFD por CLAE*

As condições analíticas para CLAE foram seguidas conforme metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira IV (1996). A quantidade de NFD foi identificada e determinada cromatograficamente por um sistema CLAE isocrático equipado com coluna C18, pré coluna (C18), *loop* de 50 μL , detector ultravioleta e integrador

eletrônico. A fase móvel foi composta de água:acetonitrila:metanol na proporção 50:25:25. O comprimento de onda de detecção foi fixado em 235 nm, correspondente ao $\lambda_{\text{máx}}$ encontrado por espectrofotometria de varredura na região do UV, o fluxo foi fixado em 1,0 mL / min.

As amostras provenientes dos ensaios de liberação e dos ensaios de penetração e/ou permeação cutâneas foram analisadas por CLAE. As amostras de solução receptora coletadas com auxílio de seringa de 30 mL, bem como as amostras extraídas da epiderme e da derme suína, foram filtradas por unidade filtrante descartável com poro de 0,45 μm , recolhidas em *ependorf* âmbar e analisadas por CLAE.

4.2.5.2.1 Parâmetros da validação da metodologia analítica para a NFD nas amostras por CLAE

Conforme exposto no item 4.2.3.6, a validação de uma metodologia de análise tem a finalidade de garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados, através de experimentos. (Brasil, 2003)

A seletividade ou especificidade foi avaliada comparando-se uma matriz isenta de NFD (branco) e uma matriz adicionada com NFD (padrão), a fim de se observar que nenhum interferente tenha sido eluído no tempo de retenção da NFD, de modo que esta tenha permanecido separada dos demais compostos presentes na amostra.

A linearidade foi determinada avaliando-se a curva analítica por meio do coeficiente de determinação (r). O intervalo da curva foi determinado entre a concentração superior e a inferior analisada, atendendo aos requisitos de precisão,

exatidão e linearidade (RIBANI *et al.*, 2004). O intervalo de concentração entre 0,0625 µg/mL e 0,5 µg/mL foi obtido avaliando-se estes parâmetros para os valores utilizados na construção da curva analítica obtida em cada experimento com padrão de trabalho de NFD, cuja pureza foi estabelecida contra padrão farmacopéico USP, conforme descrito no item 4.2.2.2.

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão (s), pelo desvio padrão relativo (DPR) e pela repetitividade das análises.

A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de recuperação da quantidade de NFD extraída, adicionada a um branco da matriz em análise.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, expressos como demonstrado em 4.2.3.6 5.

Para a análise estatística dos dados foi realizada análise de variância (ANOVA – um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do programa Sigma Stat for Windows 1.0 (Jandel Corporation, 1994)

4.2.5.2.2 *Validação da metodologia para extração da NFD dos estratos cutâneos: epiderme e derme suína*

Inicialmente, segmentos de pele de 1 cm² foram imersos em água a 60°C por 60s (BHATIA; GAO; SINGH, 1997) para separação da epiderme da derme com auxílio de bisturi. Os dois estratos cutâneos (epiderme e derme) foram transferidos para tubos de *ependorf* âmbar.

O procedimento foi realizado em 3 níveis de quantidade de NFD em cada um dos estratos cutâneos, em triplicata para cada nível de quantidade e para o branco (segmentos cutâneos mais solventes).

Aos estratos cutâneos de derme e de epiderme resultantes foram adicionadas diferentes quantidades de NFD:

1,66 μ g: 20 μ L de solução de NFD a 83 μ g/mL em fase móvel

3,4 μ g: 20 μ L de solução de NFD a 170 μ g/mL em fase móvel.

5,0 μ g: 20 μ L de solução de NFD a 250 μ g/mL em fase móvel.

Após a evaporação total do solvente procedeu-se a extração do fármaco.

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão, pelo desvio padrão relativo e pela repetitividade das análises.

A média do coeficiente de correlação (r) foi realizada para n=5 para a verificação da linearidade de resposta de CLAE dentro da faixa de concentração entre 0,2 a 5,5 μ g/mL.

4.2.5.2.3 Metodologia para extração da NFD da epiderme e derme suína

Cada um dos estratos cutâneos, epiderme e derme foram transferidos para um tubo de *ependorf* âmbar e adicionados de 1mL de fase móvel, agitados em *vortex* por 30 segundos intercalados três vezes. Este procedimento foi repetido por três vezes. Após a terceira agitação no vórtex, os *ependorfs* foram centrifugados a 6400 rpm por 10 minutos em centrífuga. Os testes foram realizados em triplicata. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado por unidade filtrante descartável com poro de 0,45 μ m e analisadas por CLAE.

Todo o procedimento foi mantido ao abrigo da luz devido a fotossensibilidade da NFD. A figura 16 ilustra as etapas realizadas validação da metodologia para extração da NFD dos estratos cutâneos: epiderme e derme.

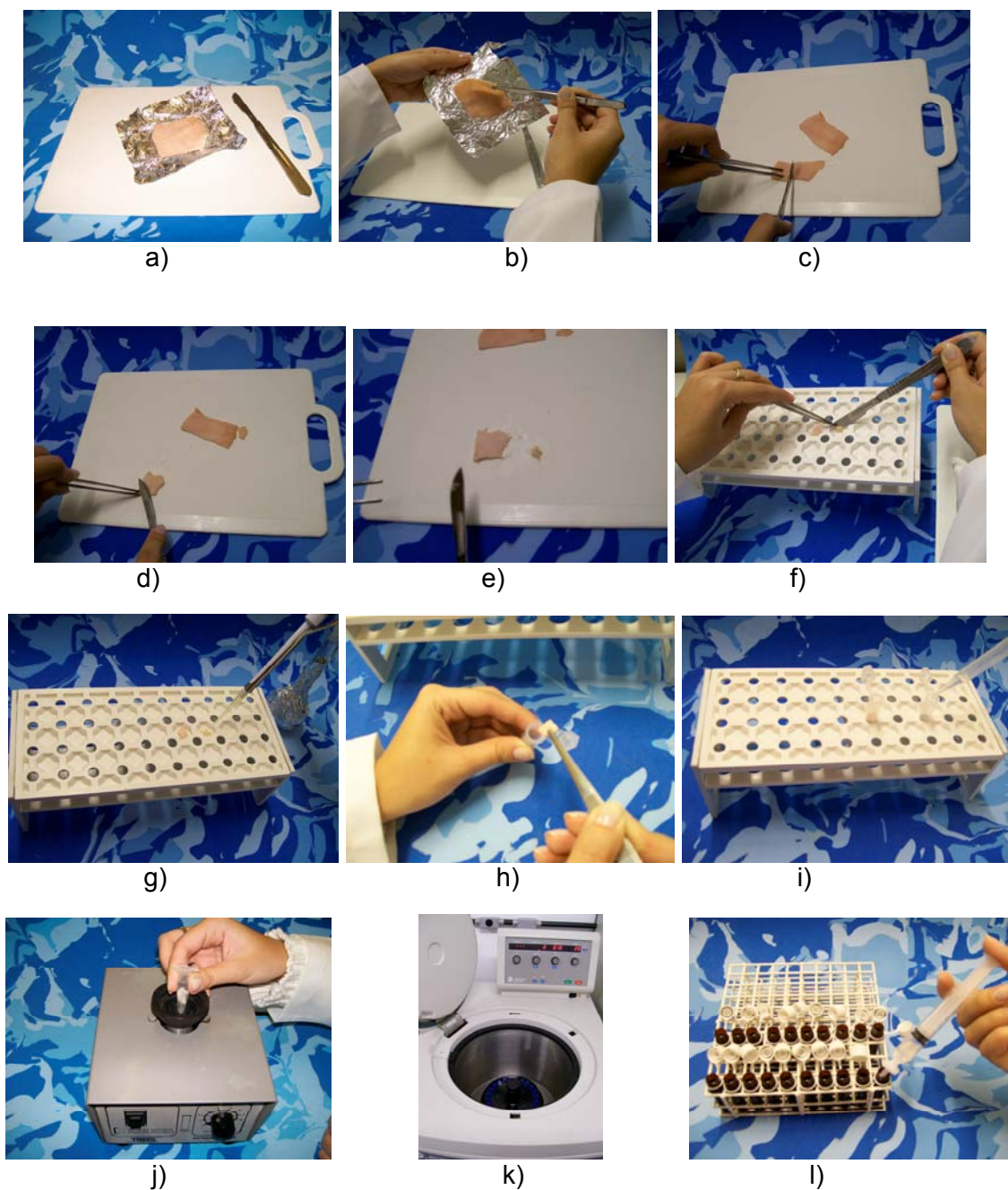


Figura 16: Etapas realizadas validação da metodologia para extração da NFD dos estratos cutâneos: epiderme e derme. Corte dos segmentos de pele (a) (b) e (c); separação dos extratos cutâneos (d) (e) (f); adição de NFD (g); transferência para *eppendorf* (h); adição de fase móvel extratora (i); agitação em vortex (j); centrifugação (k); filtração para *eppendorf* âmbar (l).

4.2.5.2.4 Estudo de Liberação *in vitro*

Foi empregado um sistema de difusão vertical composto por um compartimento doador e um compartimento receptor, como mostra a figura 17. Entre os compartimentos foi acoplada uma membrana. Para os ensaios de liberação utilizou-se membrana sintética de acetato de celulose e para os ensaios de penetração e/ou permeação utilizou-se membrana natural de pele suína. A área de difusão foi de 1,54 cm² e o volume utilizado do compartimento receptor foi de 40 mL.

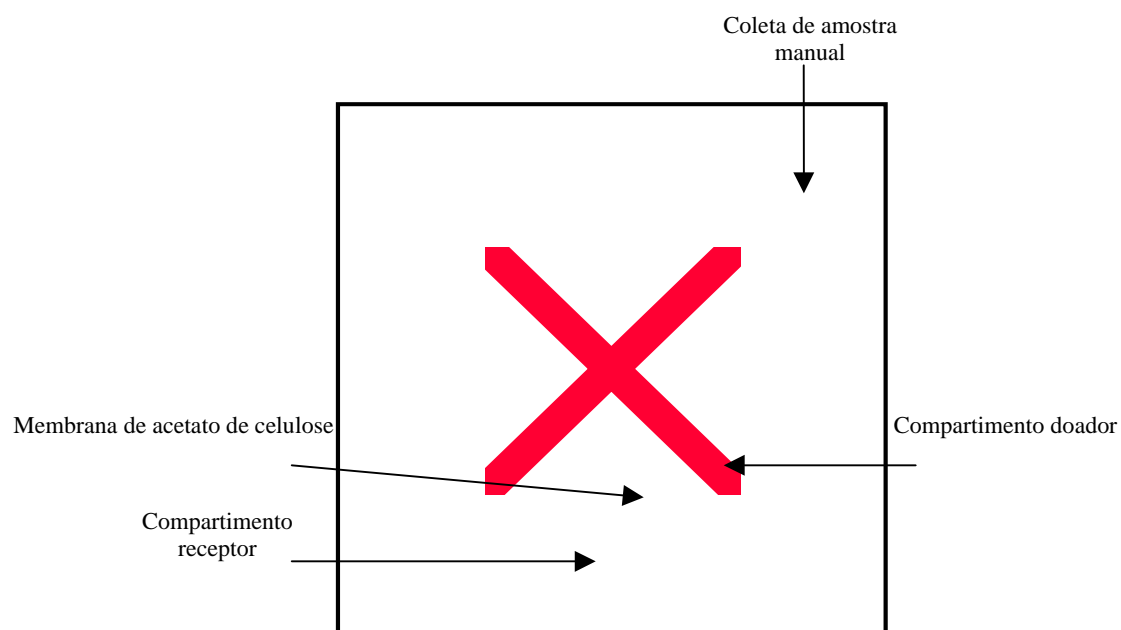


Figura 17 -: Sistema de difusão vertical montado com membrana artificial de acetato de celulose

4.2.5.2.5 *Ensaio de liberação in vitro da NFD das formulações semi-sólidas*

A solução receptora empregada foi tampão fosfato pH 7,4 adicionado de 0,5% lauril sulfato de sódio. Este meio foi selecionado de acordo com a solubilidade da NFD, estabelecida no item 4.2.5.1, a fim de ser estabelecido um fluxo da NFD no sistema, sem, no entanto, promover a saturação do meio receptor. Procedeu-se à hidratação das membranas de acetato de celulose com poro de 0,2 μm em água destilada a 100°C durante cinco minutos, por três vezes.

As membranas de acetato de celulose hidratadas foram montadas no sistema de difusão, de modo a separar o compartimento doador do compartimento receptor. Os compartimentos receptores foram mantidos sob agitação constante na velocidade de 900 rpm, por meio de uma barra magnética. Teve-se o cuidado de monitorar a presença de bolhas de ar abaixo da membrana. A fim de se estabelecer o equilíbrio entre a membrana e a solução receptora, o sistema foi mantido por 30 minutos antes da aplicação da amostra no compartimento doador.

Passados os 30 minutos guardados para o equilíbrio do sistema, foram aplicados 500 μg de amostra no compartimento doador, com o auxílio de uma pipeta para semi-sólidos (figura 18).



Figura 18 - Aplicação da amostra de formulação no compartimento doador do sistema de difusão.

Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, alíquotas de 3 mL foram retiradas para análise, havendo reposição do volume com a solução receptora. A presença de NFD na solução receptora foi determinada a cada 30 minutos por 3 horas, e uma coleta foi realizada após 24 horas de experimento. As amostras resultantes do ensaio de liberação foram analisadas por CLAE, conforme descrito no item 4.2.5.1.

Foi possível expressar o transporte através do fluxo de equilíbrio, o qual foi definido como a quantidade de NFD liberada por unidade de área por tempo. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) de seis experimentos. Para a análise estatística dos dados foi realizada análise de variância (ANOVA – um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do programa Sigma Stat for Windows 1.0 (Jandel Corporation, 1994).

4.2.6 Ensaio de penetração e/ou permeação da NFD das formulações semi-sólidas através de membrana natural de pele suína

Os estudos de penetração ou retenção cutânea e de permeação percutânea da NFD foram realizados no sistema de difusão vertical exposto no item 4.2.5.

4.2.6.1 Preparo da pele suína

As peles utilizadas neste trabalho foram obtidas de orelhas de suínos sadios abatidos com aproximadamente quatro meses de idade, provenientes do abatedouro de suinocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Após o abate dos animais, as orelhas foram retiradas e transportadas, sob refrigeração, para o laboratório em um tempo não superior a 2 horas. As orelhas foram lavadas com água corrente para remoção de manchas de sangue. A pele da parte posterior da orelha foi excisada com auxílio de bisturi e pinça e, com auxílio de tesoura e pinça, excesso de tecido adiposo e vasos sanguíneos foram retirados da parte inferior da pele. Os pelos superficiais foram cuidadosamente cortados com auxílio de uma tesoura. A seguir, pedaços de pele circulares de aproximadamente 11,0 cm² foram acondicionados em filme de cloreto de polivinila (PVC) com remoção de ar e devidamente etiquetados e armazenados a -20°C por no máximo quatro semanas antes do uso.

4.2.6.2 Montagem do sistema de difusão

A pele suína total excisada foi colocada horizontalmente com o EC voltado para dentro do compartimento doador e fixada com auxílio de um elástico, de modo que a face interna da pele permaneceu livre para o contato com a solução receptora. O compartimento receptor foi preenchido com 40 mL da solução receptora (tampão fosfato pH 7,4 adicionado de 0,5% de lauril sulfato de sódio). Ao longo do experimento, a solução receptora permaneceu sob agitação contínua com auxílio de uma barra magnética, a fim de conservar a homogeneidade. O sistema de difusão foi mantido a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ com auxílio de um banho de água termostatizado.

Os sistemas de difusão permaneceram funcionando por um período de 1 hora com os segmentos de pele em contato com a solução receptora, com a finalidade de se estabelecer um equilíbrio no ambiente.

Os experimentos foram conduzidos com uma amostra de aproximadamente 500 µg aplicadas por dentro do compartimento doador, sobre o EC, com auxílio de uma pipeta automática para semi-sólidos. Uma célula era sempre utilizada como branco, isto é, sem o produto. A cada 2 horas uma alíquota de 3 mL de solução receptora foi coletada, por um período de 8 horas. Uma coleta foi feita após 24 horas e o sistema foi desmontado. A cada alíquota retirada o volume foi completado com nova solução receptora. As amostras da solução receptora foram coletadas com auxílio de seringa de 30 mL, filtradas por unidade filtrante descartável com poro de 0,45 µm, recolhidas em microtubos âmbar e analisadas por CLAE.

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) de cinco experimentos. Para a análise estatística dos dados foi realizada análise de variância (ANOVA – um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do programa Sigma Stat for Windows 1.0 (Jandel Corporation, 1994).

Ao final das 24 horas de experimento, o sistema foi desmontado, o segmento de pele foi retirado, a formulação foi removida com auxílio de algodão e limpo com algodão umedecido em água por três vezes e, por fim, foi seco com algodão. A epiderme foi separada da derme com auxílio de bisturi, os estratos cutâneos foram submetidos ao processo de extração da NFD, como descrito no item 4.2.5.2.3.

4.2.6.3 *Caracterização Histológica dos Estratos Cutâneos*

A análise histológica foi realizada com o objetivo de avaliar o procedimento de separação dos estratos cutâneos, i.e., a separação da epiderme da derme com auxílio de bisturi.

Para esta análise utilizou-se 2 segmentos de pele, com dimensões aproximadas de 5 cm x 2 cm. Um segmento de pele foi imerso em água a 60°C por 30 segundos e o outro mantido fora da água com auxílio de uma pinça. A seguir, a epiderme da metade do segmento submetido ao aquecimento foi removida com auxílio de um bisturi.

Com o objetivo de verificar se o procedimento de separação dos segmentos cutâneos realmente produziu a separação da epiderme da derme, realizou-se o estudo histológico à microscopia de luz de um segmento submetido ao processo preconizado de separação.

4.2.6.4 Método em Microscopia de Luz

Segmentos cutâneos, epiderme e derme, separados com auxílio de bisturi foram e processados seguindo-se a técnica histológica para inclusão em parafina. O material foi fixado em formol neutro tamponado (por 1 semana) e/ou líquido de Bouin (por 18 horas). Após o período de fixação para cada fixador, os fragmentos foram lavados e mantidos em álcool 70%. A seguir, os fragmentos foram desidratados utilizando-se concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100% - um banho de 20 min. em cada álcool). Após a desidratação, o material foi clarificado em dois banhos sucessivos de xilol (15 minutos cada), posteriormente impregnado, utilizando-se dois banhos de parafina (15 minutos cada) em seguida o fragmento foi emblocado em parafina.

Cortes histológicos de 5 μm de espessura foram obtidos com o auxílio de um micrótomo "American Optical" modelo Spencer 45, sendo coletados em lâminas histológicas e guardados em estufa a 37°C durante 24 h para secagem.

A análise morfológica foi realizada, utilizando-se a coloração pela hematoxilina-eosina (Lillie e Fullmer, 1976): os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol, hidratados em uma série de concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%) e lavados em água destilada. Procedeu-se à coloração pela hematoxilina de Harris, por 10 segundos, que foi seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos. Posteriormente, os cortes foram submetidos à coloração pela eosina, durante 15 segundos. Após rápida lavagem em água destilada, os cortes foram desidratados em álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%), clarificados em três banhos de

xilol e montados com lamínulas, usando-se entelan (Entellan® new, Merck). Neste método, as estruturas basófilas, como o núcleo, coram-se em azul e as estruturas acidófilas, como citoplasma, coram-se em róseo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da Matéria-prima Nifedipina (NFD)

A Tabela 2 apresenta os resultados dos testes de perda por dessecação e ponto de fusão da NFD de acordo com a F. Brás IV (1996).

Tabela 2: Resultados dos testes de perda por dessecação e ponto de fusão da NFD de acordo com a F. Brás IV (1996).

Testes Realizados	Resultados	Especificação
Perda por Dessecação	$0,67 \times 10^{-3} \%$	máximo 0,5%
Ponto de Fusão	171,3 – 171,9 °C	Entre 171 – 175 °C

Os resultados encontrados estão de acordo com a especificação.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da análise quantitativa (doseamento) da matéria prima por espectrofotometria de absorção de acordo com a F. Brás IV (1996).

Tabela 3: Análise quantitativa (doseamento) da matéria prima por espectrofotometria de absorção de acordo com a F. Brás IV (1996).

Dia	%	Média ± dp	DPR %
1° n = 5	101,03	101,16 ± 0,486	0,48
	101,46		
	100,37		
	101,56		
	101,39		
2° n = 5	98,58	98,72 ± 0,537	0,54
	98,95		
	97,85		
	99,14		
	99,10		
Geral n = 10		99,94 ± 1,373	1,37

A matéria-prima foi aprovada pelos testes aos quais foi submetida.

A Figura 19 mostra o espectro de absorvância obtido durante o doseamento da NFD pelo método de espectrofotometria de absorção ultravioleta (UV).

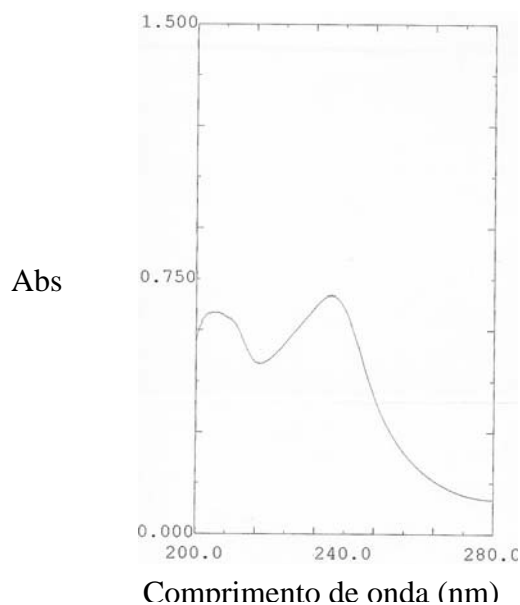


Figura 19: Espectro de absorvância obtido durante o doseamento da NFD pelo método de espectrofotometria de absorção ultravioleta (UV).

A Figura 20 mostra a resolução do cromatograma da matéria prima NFD em análise, nas condições definidas pela USP 30 (2007): fase móvel H₂O:AcN:MeOH (50:25:25), fluxo 1 mL/min, coluna C₁₈ (15 cm) e concentração da amostra 100 µg/mL

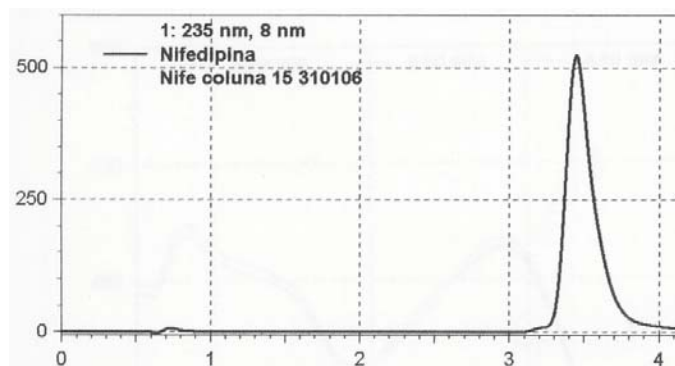


Figura 20: Resolução do cromatograma da matéria prima NFD empregando as seguintes condições : fase móvel H₂O:AcN:MeOH (50:25:25), fluxo 1 mL/min, coluna C₁₈ (15 cm) e concentração da amostra 100 µg/mL.

A Figura 21 mostra o espectro de absorção no UV – Visível (UV-Vis) realizado em cromatógrafo provido de detector com arranjo de foto diodos (UV-PDA), a fim de selecionar o comprimento de onda de 230 nm, e verificar a pureza do sinal, sem a existência de interferentes, modificando de intensidade nos tempos entre 3,20 e 3,70 minutos.

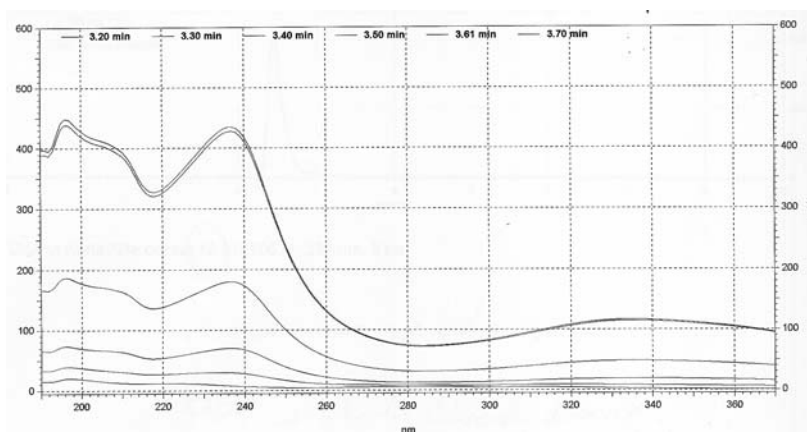


Figura 21: Análise do cromatograma da NFD por arranjo de foto diodos, mostrando a pureza do sinal, modificando de intensidade nos tempos entre 3,20 e 3,70 minutos.

Tendo em vista os resultados satisfatórios na análise da matéria prima de NFD, esta foi aplicada como padrão de trabalho neste estudo, com pureza determinada de 99,94%.

5.2 Caracterização das Formulações

5.2.1 Validação do Método para a Análise Quantitativa da NFD nas Formulações por Espectrofotometria de Absorção no UV-Vis – Reação Colorimétrica

5.2.1.1 Especificidade

A Figura 22 mostra os espectros obtidos com o solvente (a), com os excipientes das formulações (b), com a NFD padrão de trabalho em solvente (c), e com as formulações contendo NFD (d).

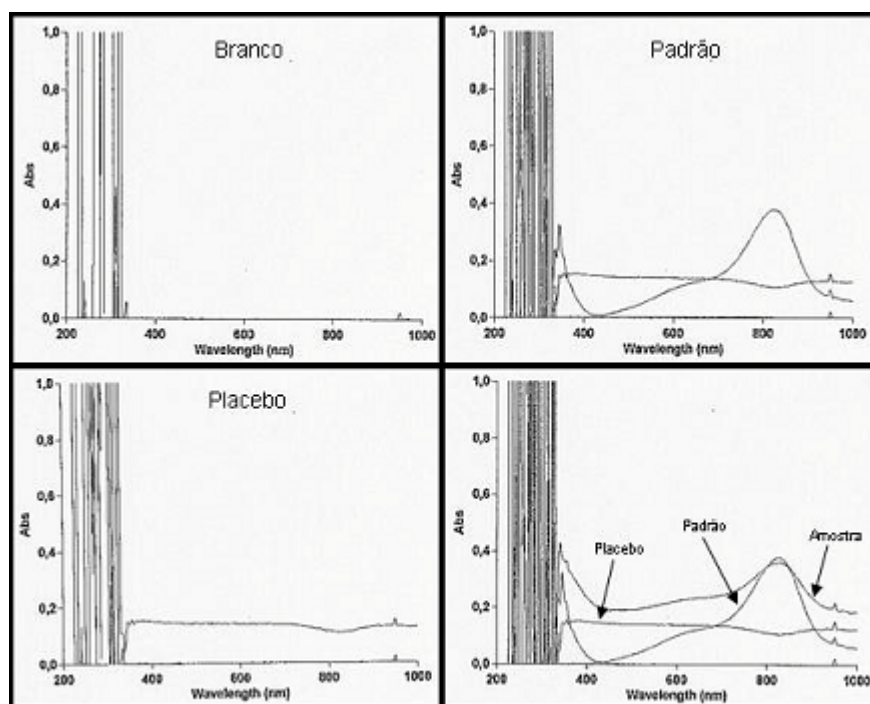


Figura 22 - Espectros de varredura no UV-vis de 200 a 1000 nm das amostras: Branco (solvente), Padrão (NFD+solvente), Placebo (excipientes) e Amostra (formulação contendo NFD)

Pela análise dos espectros foi possível observar que não existe absorção de interferentes em 830 nm na mesma intensidade da absorção da NFD, por este motivo o método foi considerado específico.

5.2.1.2 Linearidade

A Tabela 4 apresenta os valores obtidos para as cinco concentrações de NFD, preparadas em duplicata em cada dia de análise, com seus desvios-padrão (DP) e desvios-padrão relativos (DPR). Estão contidos na tabela os resultados da análise da regressão linear e os parâmetros da curva analítica: intercepto, inclinação, coeficiente de determinação e coeficiente de correlação.

Tabela 4: Análise estatística da regressão linear das curvas padrão obtida por espectrofotometria

Concentração (mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média ^a	DP ^a	DPR% ^a
0,005	0,110	0,113	0,109	0,111	0,002	1,4
	0,112	0,110	0,112			
0,015	0,320	0,336	0,321	0,32	0,001	0,38
	0,319	0,321	0,321			
0,025	0,502	0,319	0,318	0,470	0,008	1,67
	0,498	0,501	0,502			
0,035	0,732	0,720	0,694	0,71	0,013	1,81
	0,716	0,693	0,714			
0,045	0,913	0,904	0,906	0,91	0,017	1,89
	0,892	0,871	0,918			
Intercepto	24,42	25,10	20,33			
Inclinação	0,0574	0,0339	0,0213			
valor P - intercepto	0,2010	0,1422	0,0500			
Coef de determinação (r ²)	0,9994	0,9996	0,9994			
Coef de correlação (r)	0,9995	0,9994	0,9995			

^an=6

A Figura 23 mostra as soluções obtidas para a curva analítica realizada pelo método de UV-vis para o doseamento da NFD



Figura 23: Soluções obtidas para a curva analítica realizada pelo método de UV-vis para o doseamento da NFD.

De acordo com a RE 899/2003 (ANVISA, 2003) a linearidade é definida como a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo na amostra estudada, dentro de um intervalo especificado. A norma recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de cinco concentrações diferentes, e que o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99.

Como apresentado na Tabela 4, observa-se adequação dos coeficientes de correlação, o que demonstra boa linearidade para o método para a faixa de concentração entre 0,005 e 0,045 mg/mL de NFD.

Pela análise da regressão linear foi possível observar que o intercepto mostrou-se estatisticamente não diferente de zero, para os três ensaios, com significância de 5% (valor de P do intercepto maior do que 0,05).

A linearidade foi comprovada pelo valor não significativo da análise estatística do intercepto e o coeficiente de correlação superior a 0,999 mostrou baixa dispersão dos dados.

4.2.1.3 *Precisão*

A precisão de um método é definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas e pode ser expressa como o desvio padrão ou como o desvio padrão relativo, de acordo com a RE 899/2003 (ANVISA, 2003). Foi possível observar, através da avaliação dos 5 níveis da curva analítica, que os valores de DPR obtidos foram satisfatórios (< 5%), demonstrando que o método é preciso.

O limite de detecção (LD), definido como a menor quantidade do analito presente na amostra capaz de ser detectado, mas não necessariamente quantificado e o limite de quantificação (LQ), definido como a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão (ANVISA, 2003), foram calculados como descrito no item 4.2.3.6.5. O valor obtido para LD foi igual a 0,0018 mg/mL e para LQ o valor obtido foi igual a 0,0049 mg/mL.

5.2.1.4 *Exatidão*

A determinação da exatidão foi realizada como descrito em 4.2.3.6.3, pelo método de adição padrão. As Tabelas 5, 6 e 7 apresentam os valores obtidos para os ensaios.

Tabela 5: Resultados do teste de exatidão para PLO base+ TC

PLO base+TC				
Quantidade recuperada de NFD				
Quantidade adicionada de NFD (mg)	Massa (mg)	Recuperação %	Recuperação %	DPR % ^a
0,020	0,01967	98,33	98,51	0,66
	0,01985	99,23		
	0,01959	97,97		
0,025	0,02481	99,24	98,96	0,29
	0,02474	98,96		
	0,02467	98,67		
0,03	0,02992	99,74	99,09	0,82
	0,02981	99,38		
	0,02945	98,18		

^an=6

Tabela 6: Resultados do teste de exatidão para PLO base

PLO base				
Quantidade recuperada de NFD				
Quantidade adicionada de NFD (mg)	Massa (mg)	Recuperação %	Recuperação %	DPR % ^a
0,020	0,01963	98,15	89,37	0,76
	0,01985	99,23		
	0,01956	97,79		
0,025	0,02478	99,10	98,76	0,36
	0,02470	98,81		
	0,02460	98,38		
0,03	0,02992	99,74	99,00	0,87
	0,02978	99,26		
	0,02942	98,06		

^an=6

Tabela 7: Resultados do teste de exatidão para EMUL base

EMUL base				
Quantidade recuperada de NFD				
Quantidade adicionada de NFD (mg)	Massa (mg)	Recuperação %	Recuperação %	DPR % ^a
0,020	0,01970	98,51	98,68	0,65
	0,01988	99,41		
	0,01963	98,15		
0,025	0,02485	99,39	99,10	0,29
	0,02478	99,10		
	0,02470	98,81		
0,03	0,02996	99,86	99,21	0,81
	0,02985	99,50		
	0,02949	98,30		

^an=6

A exatidão é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro pela RE 899/2003 (ANVISA, 2003). De acordo com os resultados observados nas tabelas 5, 6 e 7, a metodologia apresentou exatidão para todas as formulações, uma vez que em todos os casos a recuperação encontra-se dentro da faixa preconizada de 98% a 102% (BRITO *et.al.*2003)

4.2.1.5 Determinação do Teor de NFD nas Formulações

A Tabela 8 mostra os resultados das análises de teor de NFD nas três formulações em estudo, armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por até 9 meses.

Tabela 8: Resultados das análises de teor de NFD nas três formulações em estudo, armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Tempo (meses)	Formulações		
	Teor médio % ^a ± DPR % ^a		
	PLO+NFD	PLO+NFD+ TC	EMUL
0	99,81 ± 0,72	100,18 ± 0,49	99,63 ± 0,58
9	98,72 ± ,67	98,59 ± 0,83	98,41 ± ,92
Valor P	0,0036	0,0051	0,0039
IC	92,20 a 106,31	89,28 a 109,49	91,27 a 106,77

^an=3

IC = Intervalo de confiança de 95%

A análise dos resultados apresentados na Tabela 8 permite observar que houve decréscimo significativo do teor de NFD nas três formulações ao longo dos 9 meses transcorridos, entretanto em todos os casos o decréscimo representa menos de 2% em relação ao teor inicial.

5.2.2 Determinação do pH

A Tabela 9 apresenta os valores de pH para as formulações em estudo.

Tabela 9: Valores de pH apresentados pelas formulações em estudo

Formulação	pH
PLO base	5,0
PLO+NFD	5,5
PLO+NFD+ TC	5,5
EMUL base	4,0
EMUL	4,5

Observou-se que as formulações em presença de NFD apresentaram um valor de pH discretamente menos ácido do que as bases na ausência do fármaco, isto provavelmente se deve às características da NFD.

5.2.3 Determinação da Reologia

Embora a forma de representação da viscosidade mais apropriada de um material pseudoplástico seja o gráfico completo da curva de consistência, é possível se calcular a viscosidade aparente a partir da inclinação da tangente à curva, em um ponto específico (SINKO,2008). A tabela 10 mostra os valores da viscosidade aparente, a uma taxa de cisalhamento de 500 (s^{-1}):

Tabela 10 - Valores da viscosidade aparente a uma taxa de cisalhamento de 500 (s^{-1}), para as formulações em estudo:

Formulação	Viscosidade aparente (Pas)
	500 (s^{-1})
PLO base	0,068
PLO+NFD	0,090
PLO+NFD+ TC	0,038
EMUL	0,280

Apenas nas formulações contendo PLO existe a presença do polímero de polaxamer, o que pode explicar a menor viscosidade aparente dessas formulações a uma taxa de cisalhamento de 500 (s^{-1}), em comparação com a formulação EMUL.

Para os sistemas que contém polímeros com moléculas longas e lineares observa-se um alinhamento dessas moléculas no sentido longitudinal na direção do fluxo, com o aumento da tensão de cisalhamento. Essa orientação reduz a resistência interna no material, permitindo uma maior velocidade de cisalhamento para cada tensão de cisalhamento sucessiva. Adicionalmente, pode haver a liberação de parte do solvente associado às moléculas de polímero, o que contribui para um abaixamento efetivo da concentração e do tamanho das moléculas dispersas, o que, igualmente conduzirá a um abaixamento da viscosidade aparente (SINKO,2008).

As viscosidades das amostras PLObase, PLO+NFD e EMUL não apresentaram diferenças estatisticamente representativas entre si, com $P > 0,05$ (para $\alpha = 5\%$), enquanto que PLO+NFD+ TC apresentou um valor de viscosidade estatisticamente diferente de PLObase e EMUL, com $P < 0,005$ (para $\alpha = 5\%$). Em relação à PLO+NFD, PLO+NFD+ TC apresentou viscosidade sensivelmente diferente (menor), com $P < 0,001$, (para $\alpha = 5\%$).

De acordo com Bárthélemy e cols.(1995) o TC apresenta miscibilidade com solventes polares e apolares, e é um potente agente solubilizador para vários fármacos.

Mura e cols. (2000) observaram que o TC aumentou a solubilidade do clonazepan em uma matriz de gel de carbopol em cerca de 100 vezes.

Os resultados encontrados sugerem que a presença do TC alterou a viscosidade do PLO na presença de NFD, provavelmente, por ter promovido a solubilidade do fármaco na matriz do PLO.

A figura 24 mostra os gráficos da recuperação isotérmica da consistência após a determinação da viscosidade para as amostras em estudo:

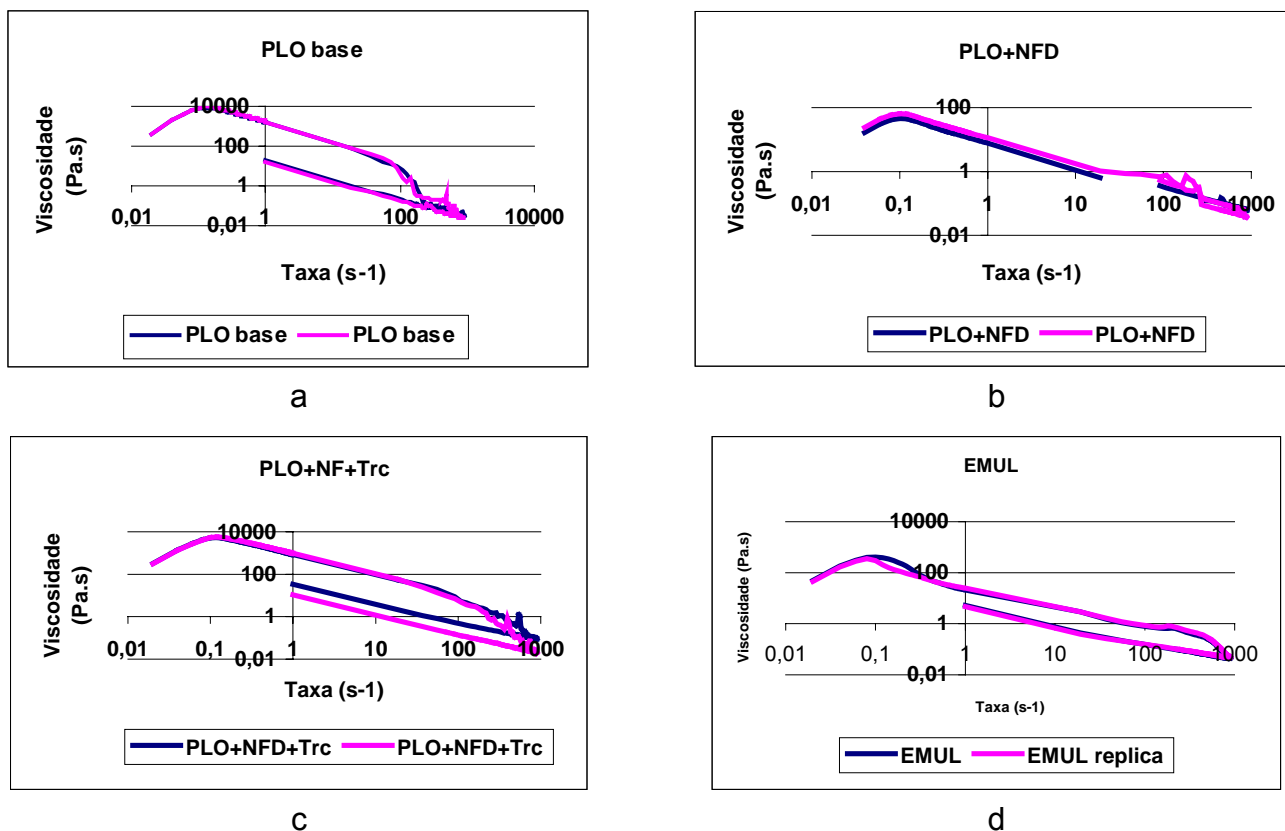


Figura 24 - Gráficos da recuperação isotérmica da consistência após a determinação da curva de consistência para as amostras em estudo (com réplicas dos ensaios): (a) PLO base, (b) PLO+NFD, (c) PLO+NFD+ TC e (d) EMUL.

A análise estatística dos dados mostra que existe diferença estatisticamente representativa da tixotropia apenas entre o comportamento das formulações PLO+NFD e PLO+NFD+ TC, com $P < 0,001$ (para $\alpha = 5\%$).

Os gráficos apresentados na Figura 24 permitem verificar que, quanto ao fluxo, todas as amostras apresentam um comportamento pseudoplástico, característico de sistemas contendo polímeros em dispersão e sistemas emulsionados semi-sólidos (BENTLEY *et.al.*, 1999; SINKO, 2008), uma vez que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, em todas as amostras.

A recuperação isotérmica e relativamente lenta da consistência perdida pelo cisalhamento em um material deixado em repouso é conhecida como Tixotropia (SINKO,2008).

Os gráficos apresentados na figura 24 mostram que as curvas ascendentes da viscosidade estão deslocadas abaixo das curvas descendentes, indicando que o material possui uma consistência menor para qualquer taxa de cisalhamento sobre a curva ascendente, em relação à curva descendente. Isso denota uma quebra da estrutura que não se restaura de imediato após a remoção ou diminuição da tensão de cisalhamento.

Os sistemas que apresentam tixotropia, geralmente contém partículas assimétricas que originam retículos tridimensionais frouxos que permeiam a amostra, devido à presença de numerosos pontos de contato. Essa estrutura confere um certo grau de rigidez ao sistema, quando este está em repouso, o que o torna parecido com um gel. Ao se aplicar um cisalhamento e iniciando-se o fluxo, a estrutura se desintegra à medida que os pontos de contato são desfeitos e as partículas se alinham, umas em relação às outras. Isto faz com que o sistema sofra uma mudança de gel para sol. A estrutura inicia sua reestruturação ao cessar a tensão de cisalhamento, entretanto, este é um processo progressivo de restauração da consistência, à medida que as partículas assimétricas entram em contato, umas com as outras, por efeito do movimento browniano aleatório (SINKO,2008).

O comportamento da amostra PLO+NFD pode ser classificado como pouco tixotrópico. Isto talvez possa ser explicado pela presença de muitos cristais sólidos de NFD suspensos na matriz semi-sólida, oferecendo resistência ao fluxo, uma vez que não temos a presença do promotor de solubilidade (Transcutol) nesta formulação. Esta

hipótese está em consonância com o dado de viscosidade aparente desta formulação a um cisalhamento de 500 (S^{-1}), que é maior em relação às outras formulações que envolvem o PLO. Observa-se que a presença do Transcutol na formulação restabeleceu a tixotropia.

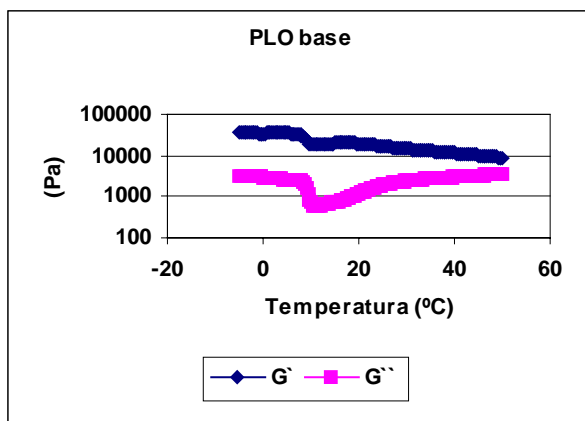
As formulações semi-sólidas apresentam-se como não newtonianas quanto ao fluxo e apresentam, simultaneamente, as propriedades de viscosidade de um líquido e da elasticidade de um sólido. A esta característica denomina-se viscoelasticidade. A análise de materiais viscoelásticos é desenhada para preservar a estrutura, a fim de que as medições possam proporcionar informações sobre as forças intermoleculares e intraparticulares existentes no material (SINKO,2008).

A fase interna das formulações de PLO (gel de polaxamer) apresenta-se como um gel muito viscoso à temperatura ambiente, mas torna-se líquida à temperatura de refrigerador (5 °C), apresentando gelificação termorreversível e pode ser aquecido e resfriado muitas vezes sem alterar suas propriedades (SCHMOLKA, 1972).

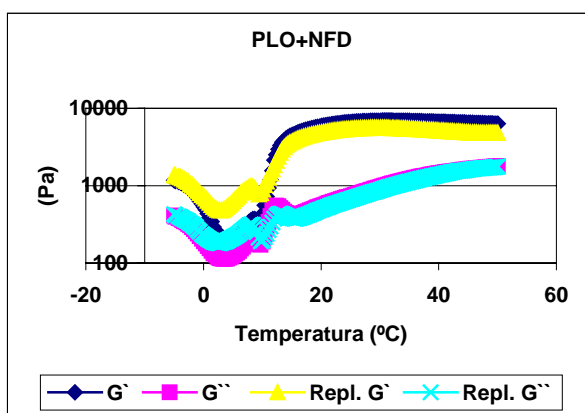
As formulações a base PLO envolvidas neste estudo contém um gel de polaxamer 407 constituindo a fase interna da microemulsão. Os géis de polaxamer 407 são materiais viscoelásticos, que apresentam um módulo elástico (G') característico de um sólido, e um módulo viscoso (G'') característico de um líquido. Além de viscoelásticos, os géis de polaxamer 407 são pseudoplásticos, o que significa que sofrem deformação com o cisalhamento e a sua viscosidade diminui (FREITAS, 2006).

Os experimentos realizados neste estudo envolveram o comportamento do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') das formulações em função da temperatura, a uma taxa de cisalhamento constante, para a determinação da temperatura de transição sol-gel (EDSMAN *et. al.*, 1998, RICCI *et.al.*, 2002).

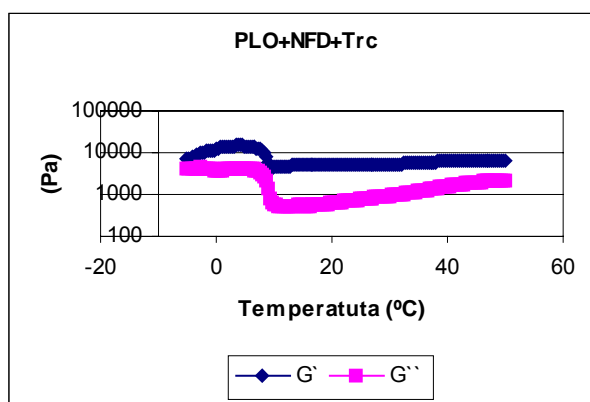
A figura 25 mostra os gráficos obtidos no estudo da temperatura de transição sol-gel das amostras de PLO base (a), PLO+NFD (b) e PLO+NFD+ TC (c):



a



b



c

Figura 25 - Gráficos obtidos no estudo da temperatura de transição sol-gel das amostras (com réplicas dos ensaios) de PLO base (a), PLO+NFD (b) e PLO+NFD+ TC (c), medindo-se a viscosidade em função da temperatura a uma taxa de cisalhamento constante.

Observa-se que as três formulações apresentam comportamento viscoelástico, pois apresentam componentes elásticos (G') e componentes viscosos (G'') diferentes entre si, e diferentes de zero.

Os gráficos na figura 25 mostram como as características reológicas das formulações mudam com o aumento da temperatura.

Pode-se notar que em todas as formulações testadas neste ensaio existe o fenômeno de transformação sol-gel, pelas variações sofridas por G' e G'' . Isso mostra que houve alteração da estrutura nas formulações pela presença da NFD e também pela adição do transcutool.

Com o aumento da temperatura é possível observar, a certo ponto, uma diminuição considerável de G' e G'' , provavelmente devido à fase interna das formulações apresentarem-se no estado de líquido viscoso. Em seguida é possível observar um ponto a partir do qual G' e G'' aumentam. Este ponto deve ser considerado como o ponto de gelificação da fase interna da formulação. Os valores crescentes de G' e G'' a partir daí podem representar a estabilização do módulo elástico e do módulo viscoso acima da temperatura de transição sol-gel, respectivamente.

Na Tabela 11 encontram-se os valores de G' e G'' comparados entre as formulações PLO base (sem fármaco e sem transcutool) e PLO+NDF+Trc.

Tabela 11 - Valores de G' e G'' comparados entre as formulações PLO base (sem fármaco e sem transcutool) e PLO+NDF+Trc.

	Temp Trans (T °C)	
	G'	G''
PLO base	10,05	11,05
PLO+NDF+Trc	9,72	12,72

Os dados apresentados na tabela 11 permitem observar que houve alteração da temperatura de transição sol-gel entre as formulações PLObase e PLO+NFD+Trc. Isto significa que a presença da NFD e do Transcutol resultou em alteração das características reológicas e da estrutura das formulações de PLO, provavelmente por alterar as propriedades da fase interna (gel de polaxamer), corroborando os resultados dos estudos realizados por Veyries cols. (1999) e Bentley e cols. (1999).

A Tabela 12 mostra a faixa de temperatura que compreende a transformação sol-gel, bem como o valor médio, na formulação PLO+NFD:

Tabela 12 - Faixa de temperatura que compreende a transformação sol-gel, bem como o valor médio, na formulação PLO+NFD

	Intervalo Temp Transição (T °C)	
	G'	G''
PLO+NFD	4,055 9,38	3,70 15,38
T °C Trans Média	6,72	9,54

Observou-se que a presença da NFD na ausência do transcutol resultou em alteração da estrutura das formulações de PLO de maneira ainda mais acentuada, provavelmente por alterar as propriedades da fase interna (gel de polaxamer), novamente em consonância com os resultados dos estudos realizados por Veyries cols. (1999) e Bentley e cols. (1999).

De acordo com Fong-Spaven e Hollenbeck (1986), as descontinuidades observadas na faixa de temperatura de transição apresentadas pela formulação PLO+NFD podem ser atribuídas a possíveis deslocamentos dentro das estruturas de cristal líquido. O comportamento diferenciado desta formulação em relação às outras pode ser devido à presença de numerosos cristais de NFD suspensos na formulação,

provocando resistência ao fluxo e acentuando os deslocamentos na estrutura de cristal líquido. No PLO base a NFD está ausente e no PLO+NFD+Trc temos um promotor de solubilidade da NFD, o que provavelmente reduziu a resistência e a interferência dos cristais do fármaco.

A presença da NDF em ausência de transcutol provocou alteração significativa no módulo elástico G' (característico de sólidos), que apresentou valores baixos a baixas temperaturas, mas aumentou drasticamente com o aumento da temperatura, como resultado do processo de formação do gel. Ao final da transição sol-gel, G' tornou-se independente da temperatura. A propriedade de viscoelasticidade também foi preservada.

Uma explicação para este comportamento pode estar no fato de que alguns polaxâmeros apresentam uma transição sol-gel à medida que a temperatura se eleva, tornando-se não newtonianos no seu caráter reológico (SINKO,2008). Isso ocorre porque a solubilidade dos polaxameros em água diminui com o aumento da temperatura, e a hidratação do polímero é reduzida pela quebra das ligações de hidrogênio a temperaturas elevadas. A dessolvatação resultante, somada ao entrelaçado das cadeias poliméricas, é provavelmente o responsável pela gelificação dos polaxameros (CABANA *et.al.*,1997; MOORE *et.al.* 2000; FREITAS *et.al.*,2006).

O gel de polaxamer que constitui a fase interna das formulações de PLO apresenta características reológicas incomuns como a gelificação termorreversível, e temperatura de transição sol-gel (FREITAS, 2006), que influenciam nas características finais das formulações de PLO.

A presença de aditivos como fármacos (VEYRIES *et. al.*,1999) e promotores químicos da penetração cutânea (BENTLEY *et. al.*, 1999), como o transcutol

(empregado neste estudo como co-solvente para a NFD no PLO) podem mudar algumas características reológicas dos géis de polaxamer e, por conseguinte, das formulações de PLO.

A análise estatística dos dados mostra que as três formulações apresentam comportamentos de transição sol-gel em função da temperatura distintos entre si, com $p < 0,001$ (para $\alpha = 5\%$).

5.2.4 Estudo do Aspecto Morfológico por Microscopia Óptica (MO)

A microscopia óptica (MO) tem sido utilizada como método preliminar de observação da microestrutura (MAITI, 2003, KOO, KIM, CHUNG, 2003, CARASTRAN, 2007). Embora a resolução do equipamento seja em torno de $1 \mu\text{m}$, este método é útil pra se observar a existência de partículas grandes de cristais, bem como a dispersão das partículas. Uma análise visual das microestruturas das amostras pôde ser feita através de microscopia óptica. A figura 26 mostra as microestruturas observadas por MO de imersão simples e a figura 27 mostra as microestruturas observadas por MO de imersão com luz polarizada:



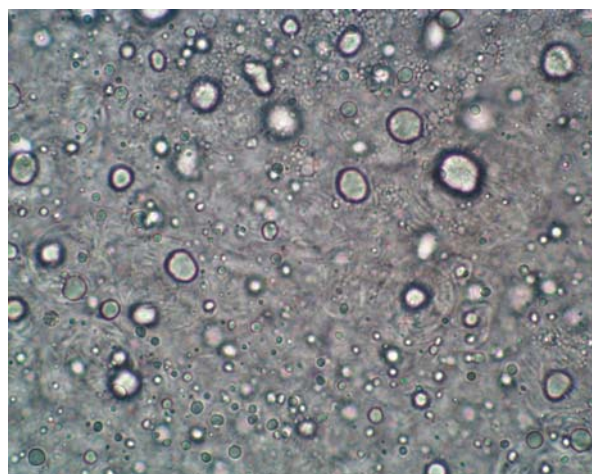
a) PLO base –MO simples aumento de 100X



b) PLO+NFD – MO simples aumento de 100X



c) PLO+NFD+ TC – MO simples aumento de 100X



d) EMUL– MO simples aumento de 100X

Figura 26 - Mostra as microestruturas das formulações observadas por MO simples no aumento de 100X. PLO base (a), PLO+NFD (b), PLO+NFD+ TC (c) e EMUL (d).

É possível observar que existe uma similaridade na morfologia entre as formulações à base de PLO (uma base microemulsionada), diferindo sensivelmente da formulação EMUL (não microemulsionada).

É possível, ainda, evidenciar a presença de cristais de NFD nas formulações PLO+NFD e PLO+NFD+ TC, mostrando que em ambos os casos existem cristais do fármaco suspensos na formulação. Embora o transcutool tenha sido aplicado com a função de melhorar a solubilidade da NFD na formulação, isto não aconteceu

completamente, pois ainda permaneceram cristais do fármaco suspensos na base galênica. Uma possível evidência de que o transcutool tenha aumentado a solubilidade da NFD até certo ponto, é observada pela menor viscosidade aparente a 500 (s^{-1}) da formulação PLO+NFD+ TC (0,038 Pa.s.) em relação à da formulação PLO+NFD (0,090 Pa.s). Isto pode estar relacionado a uma maior resistência ao cisalhamento na formulação PLO+NFD pela presença de maior número de cristais do fármaco em suspensão.

De acordo com Sinko (2008) é possível utilizar um microscópio convencional para medir o tamanho de partícula na faixa de 0,2 até 100 μm , aproximadamente. Com o auxílio de um programa gerenciador de imagens acoplado ao microscópio óptico de luz polarizada, foi possível realizar medidas aleatórias dos tamanhos das micelas nas formulações. A figura 27 mostra as fotomicrografias das formulações contendo as medidas aleatórias.

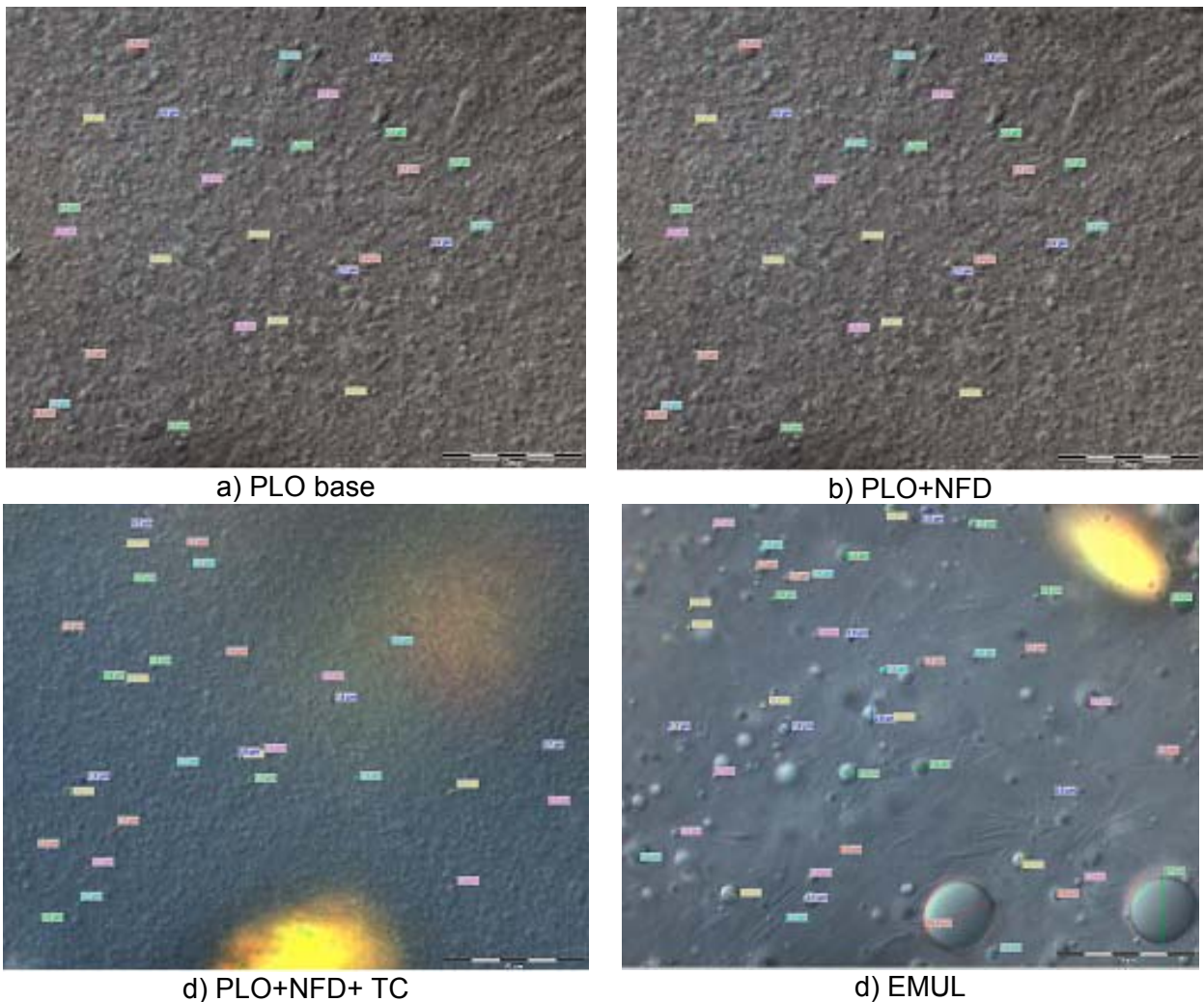


Figura 27 - Fotomicrografias das formulações observadas por MO de imersão com luz polarizada no aumento de 100X. PLO base (a), PLO+NFD (b), PLO+NFD+ TC (c) e EMUL (d).contendo as medidas aleatórias: relativa homogeneidade no tamanho das micelas nas formulações contendo PLO, na ordem de 0,8 μm . Na formulação EMUL foi possível observar uma maior heterogeneidade e um tamanho médio maior das micelas, na ordem de 2,4 μm , onde as maiores chegaram a 10,4 μm , neste campo de observação.

Embora as medidas tenham sido realizadas aleatoriamente, foi possível observar nas formulações envolvendo PLO, uma relativa homogeneidade no tamanho das micelas na ordem de 0,8 μm . Na formulação EMUL foi possível observar uma maior heterogeneidade e um tamanho médio maior das micelas, na ordem de 2,4 μm , onde as maiores chegaram a 10,4 μm , neste campo de observação. Estes dados permitem

verificar que a metodologia de extrusão utilizando seringas possibilitou o microemulsão uniforme das formulações de PLO. Estes resultados são compatíveis com os de Bentley e cols. (1999), que aplicaram a microscopia óptica para evidenciar a formação de estruturas micelares no gel de polaxamer pela adição de lecitina. Os autores observaram que a adição de lecitina ao sistema permitiu a formação de micelas menores e mais uniformes.

5.2.5 Liberação *in vitro* Através de Membrana Sintética

As formulações de uso tópico consistem em sistemas complexos, de modo que a liberação do fármaco a partir de um veículo tem sido bastante investigado. (FREITAS, 2005)

A liberação *in vitro* de fármacos presentes em formulações de uso tópico pode ser determinada aplicando-se uma metodologia que preconiza um modelo bicompartimental, conhecido como célula de difusão vertical, e membrana sintética (HAIGH; SMITH, 1994), por não oferecerem resistência à passagem do fármaco do compartimento doador para o compartimento receptor. Assim, permite a quantificação do fármaco em função da partição entre veículo e a solução receptora. Neste trabalho optou-se por uma membrana de acetato de celulose.

5.2.5.1 Estudo da Solubilidade da NFD para a Escolha da Solução Receptora para os Ensaio de Liberação e Permeação / Penetração Cutânea

Quando fármacos com baixa solubilidade em água são aplicados na produção de medicamentos de uso tópico pode ser necessária a aplicação de soluções receptoras contendo surfactantes ou solventes orgânicos para garantir a solubilidade adequada do fármaco, a fim de manter a condição *sink* nos estudos da avaliação da liberação *in vitro* (BEMVINDO, 2006).

Segundo o CDER / U.S. FDA (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1997) o meio receptor pode consistir de tampão aquoso, meio hidroalcoólico ou qualquer outro tipo, com a justificativa apropriada. De acordo com FIP / AAPS (SIEWERT *et.al.* 2003), dependendo da solubilidade do fármaco, o meio receptor pode necessitar conter surfactantes.

A Tabela 13 mostra os valores obtidos para a solubilidade da NFD nas soluções testadas:

Tabela 13: Valores obtidos para a solubilidade da NFD nas soluções testadas:

Solução	Solubilidade determinada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
(a) solução de água e etanol (1:1)	181,62
(b) solução de água e etanol (1:1) adicionada de 0,5% lauril sulfato de sódio	174,45
(c) água adicionada de 0,5% lauril sulfato de sódio	33,04
(d) tampão fosfato pH 7,4 adicionado de 0,5% lauril sulfato de sódio	36,30

Embora a NFD tenha apresentado valores de solubilidade muito bons nas soluções hidroalcoólicas, optou-se pela solução contendo tampão pH 7,4 com lauril sulfato de sódio por ser mais apropriada para os testes de permeação / penetração empregando membrana natural de pele suína.

Ali e cols (1989) verificaram uma solubilidade de 5,6 µg/mL para a NFD em solução tampão aquosa de pH = 7,4. A solubilidade de 36,3 µg/mL, apresentada pela solução selecionada, representa um valor mais de 6 vezes maior, provavelmente pela adição do surfactante.

Para a manutenção da condição *sink*, a concentração no meio receptor não deve exceder 12,1 µg/mL (o que representa 1/3 de 36,3 µg/mL). Considerando-se que a maior quantidade encontrada na solução receptora foi da ordem de 0,733 µg/mL, admite-se que a condição *sink* foi obedecida, não ocasionando aumento apreciável da concentração de modo a ocasionar redução do fluxo de difusão da NFD do compartimento doador ao receptor.

5.2.5.2 Condições Analíticas para a Análise da NFD nas Amostras por CLAE

A definição das condições analíticas teve por objetivo adotar o método adequado às propostas do presente trabalho, para a quantificação da NFD nas matrizes de trabalho. O processo de validação não foi exaustivo, por não estar contemplado como objeto do projeto.

As condições analíticas aplicadas seguiram condições definidas pela USP 30 (2007): fase móvel H₂O:AcN:MeOH (50:25:25), fluxo 1 mL/min, volume de injeção de 25 µL, detector de UV em 235 nm. Utilizou-se coluna C₁₈ (25 cm).

A Figura 28 apresenta a eluição de soluções padrão de NFD em três concentrações diferentes, preparadas como descrito em 4.2.5.2.3, onde se pode observar uma boa simetria dos sinais de NFD.

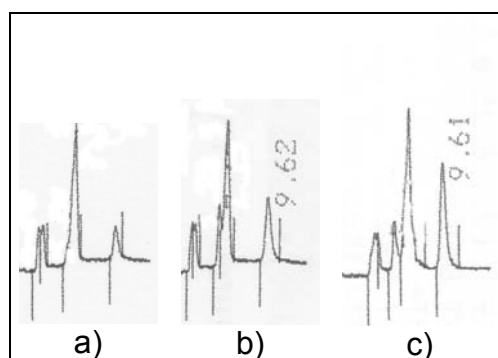


Figura 28: Eluição de soluções padrão de NFD em três concentrações: a) 0,063 µg/mL, b) 0,15 µg/mL, c) 0,5 µg/mL. O tempo de retenção foi de 9,6 minutos.

5.2.5.2.1 Curva Analítica

A Tabela 14 apresenta os resultados das respostas obtidas para as cinco concentrações de NFD, preparadas em triplicata, em cada dia de análise e seus desvios padrão (DP) e desvios padrão relativos (DPR). Realizou-se análise de regressão linear dos parâmetros da curva padrão: intercepto, inclinação, coeficiente de determinação e correlação, também apresentados na tabela.

Tabela 14 - Apresenta os resultados das respostas obtidas para as cinco concentrações de NFD, preparadas em triplicata, em cada dia de análise, seus desvios padrão (DP), desvios padrão relativos (DPR) e parâmetros da curva.

Conc(µg/mL)	Área			Média ^a	DP ^a	DPR % ^a
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3			
0,063	6485	6603	6498	6601	106	1,6
	6676	6549	6702			
	6501	6793	6601			
0,150	18796	18694	18504	18596	283	1,5
	18683	19021	18659			
	18549	18475	17985			
0,250	33789	34103	33798	33999	337	1,0
	34790	33996	34076			
	33587	33897	33958			
0,350	47305	47601	46969	47509	543	1,1
	48487	48024	47396			
	46978	47902	46923			
0,500	67579	67804	66987	67686	368	0,5
	68024	67767	67209			
	67793	68075	67932			
Intercepto	140567	140718	139553			
Inclinação	1964	1918,2	1952,9			
Valor P - intercepto	0,0003	0,0026	0,0023			
Coef. Determinação(r ²)	0,9994	0,9994	0,9993			
Coef. Correlação(r)	0,9998	0,9997	0,9996			

^an= 9

De acordo com a ANVISA (2003), a linearidade é dita como a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos em um ensaio são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A legislação em vigor recomenda a determinação da linearidade pela análise de cinco concentrações diferentes, no mínimo, e que o coeficiente de correlação (r) mínimo aceitável deve ser de 0,99.

Os coeficientes de correlação apresentados na tabela 12 mostraram-se adequados, demonstrando que o método apresenta linearidade para faixa de concentração de trabalho. Foi possível comprovar a linearidade, apesar da análise

estatística do intercepto ter resultado em valor significativo, uma vez que este representa menos de 0,7% da concentração de trabalho.

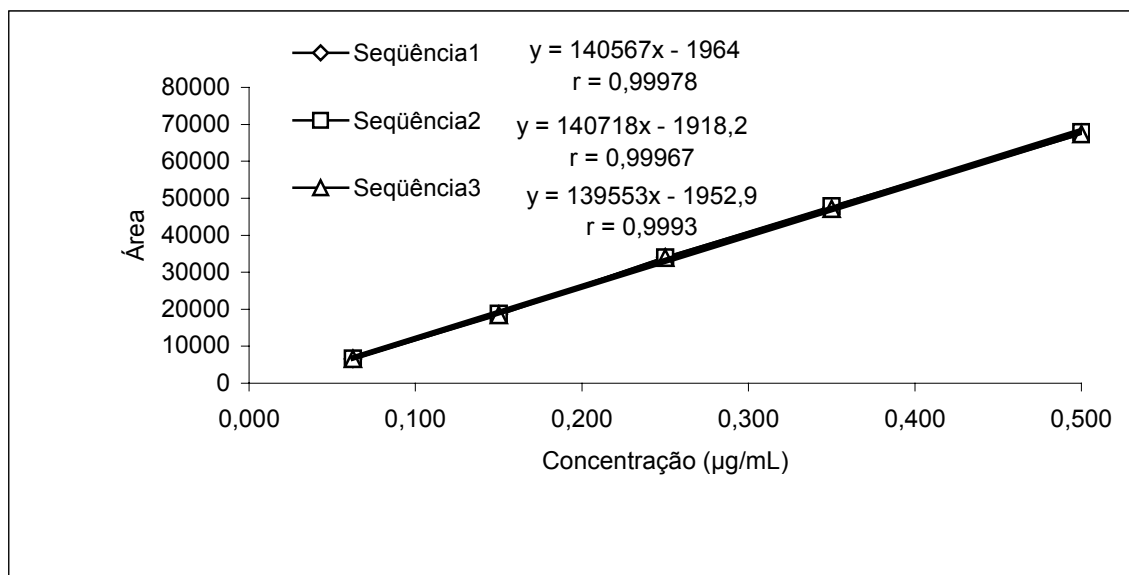


Figura 29: Representação gráfica das curvas padrão, obtidas por CLAE, em três experimentos diferentes.

A precisão foi avaliada pela proximidade dos resultados obtidos nos experimentos repetidos, expressa pelos desvios padrão e desvios padrão relativos (ANVISA, 2003). Observou-se que todos os valores de DPR obtidos foram satisfatórios (< 5%) para os cinco níveis de concentração da curva padrão (Figura 29).

5.2.5.3 Resultados dos Ensaio de Liberação *in vitro* Através de Membrana Sintética de Acetato de Celulose

Na determinação da liberação *in vitro* da NFD, uma amostra de aproximadamente 0,5 g de cada formulação (PLO+NFD, PLO+NFD+ TC e EMUL) foi

aplicada no compartimento doador e por conseguinte, a difusão ocorreu sob condição de quantidade infinita de fármaco. Após um pequeno *lag time* inicial, observou-se um perfil sempre linear com tempo, permitindo o cálculo do fluxo no estado estacionário (Jss) (Tabela 15). Os fluxos foram calculados para cada célula, por regressão linear, a partir do tempo 60 minutos, considerando-se que a partir deste ponto o equilíbrio já estaria alcançado.

Tabela 15: Fluxo no estado estacionário (Jss) para cada uma das formulações estudadas

Formulação	Fluxo (Jss) durante 3 h ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)*
PLO+NDF	6,26 \pm 0,288
PLO+NFD+ TC	4,03 \pm 0,081
EMUL	6,39 \pm 0,254

* Corresponde a média \pm E.P.M. de seis unidades de ensaio.

Os resultados plotados na figura 30 representam a média \pm e.p.m de seis unidades de ensaio. Os dados mostram que PLO+NFD+ TC apresentou fluxo menor em relação às outras duas formulações, embora a diferença entre o fluxo das três formulações não tenha mostrado diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0683$ para $\alpha = 5\%$). A presença do transcutool alterou discretamente a atividade termodinâmica da NFD na base PLO.

O transcutool apresenta miscibilidade com solventes polares e apolares e ótimas propriedades como solubilizante para um grande número de fármacos (BARTHÉLÉMY *et.al.*1995; MURA *et.al.*2000). Entretanto, por ser um líquido higroscópico (RISCHEL *et.al.*,1991), pode provocar mudanças na composição do compartimento doador e

assim influenciar a solubilidade e a atividade termodinâmica do fármaco (DE CARVALHO, 1995).

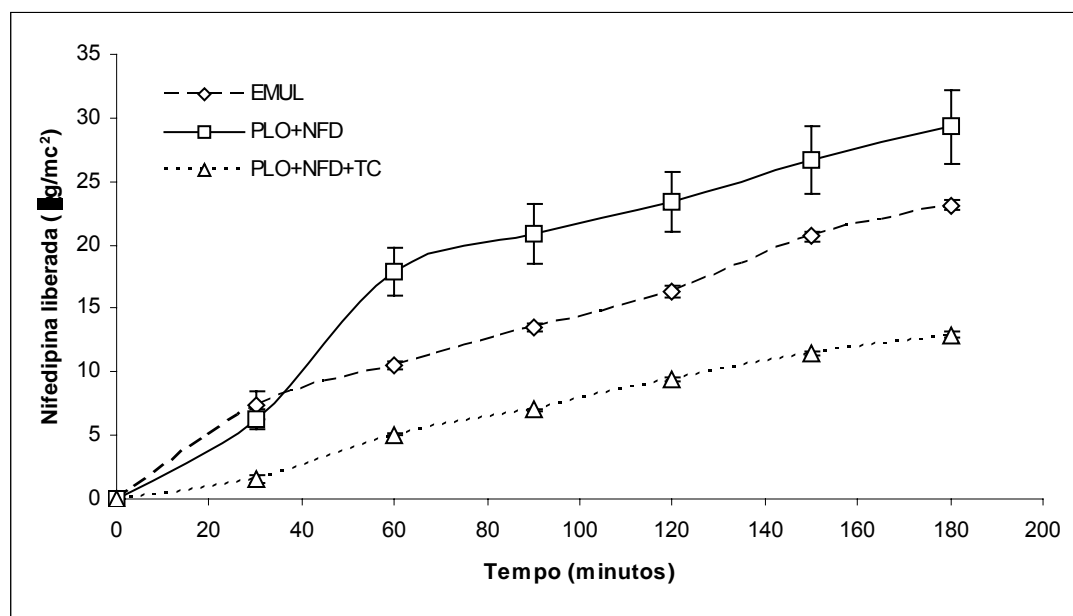


Figura 30 - Quantidade de NFD liberada por área. Erro de barras indica erro padrão da média (E.P.M.).

De acordo com Davis e Khanderia (1972), a atividade termodinâmica e a viscosidade têm um efeito dominante sobre a liberação da substância ativa do veículo.

O transporte de massa de um fármaco através da membrana é diretamente dependente da atividade termodinâmica do permeante no veículo. Para composições de veículo onde o fármaco está completamente solubilizado e bem abaixo da saturação, o permeante tende a ter alta afinidade pelo veículo e não particiona em direção à membrana. Entretanto, se a composição do veículo é alterada para aumentar a solubilidade do permeante, o fluxo diminui linearmente (FLYNN e SMITH, 1972 *apud* LALOR *et. al.* 1994). Aumentando-se a solubilidade da NFD na base PLO pela adição do transcutool, reduz-se seu coeficiente de partição, K_p , em relação ao compartimento

receptor. (FLORENCE e ATTWOOD, 2003). Isto pode explicar o comportamento da formulação PLO+NFD+ TC sobre a liberação da NFD. Este comportamento é compatível com estudos realizados por outros autores.

Um estudo realizado por Turakka e Ala-Fossi (1987) mostrou que a velocidade de liberação de hidrocortizona e acetato de hidrocortizona diminuiu a medida em que houve um aumento da solubilidade dos fármacos na matriz da formulação. Freitas (2006) observou que a adição de propilenoglicol às formulações estudadas alterou a atividade termodinâmica do CTZ provocando uma menor liberação do fármaco.

Observou-se que PLO+NFD+ TC apresentou a menor viscosidade relativa a um cisalhamento de 500 s^{-1} . A adição de TC restabeleceu a tixotropia, muito diminuída pela adição da NFD ao PLO. Este fatos, provavelmente, estão relacionados à alteração da solubilidade da NFD na base PLO. Para as formulações de uso tópico é desejável que a viscosidade diminua com o cisalhamento a fim de facilitar a espalhabilidade sobre a pele. Por outro lado, a tixotropia também é desejável para que a formulação não escorra da pele.

5.2.6 Permeação / Penetração Através de Membrana Natural de Pele Suína

O uso da pele de orelha suína em pesquisas de produtos dermatológicos para uso humano é extensivamente discutida para testes com sistemas transdérmicos, ou de permeabilidade cutânea. Neste contexto as camadas da pele de maior importância são a epiderme e a derme (BHATTI, SCOTT, DYER,. 1989, MEYER , ZSCHEMISCH, 2002).

5.2.6.1 Observação Histológica dos Segmentos Cutâneos de Pele Suína – Separação da Epiderme e Derme

A análise histológica confirmou que o processo proposto foi eficiente na separação da derme e epiderme. É possível observar, na extremidade superior direita da Figura 31, a presença da epiderme formada por suas camadas características, incluindo o extrato córneo. Na extremidade superior esquerda nota-se a derme, constituída por tecido conjuntivo, exposta após a remoção completa da epiderme.

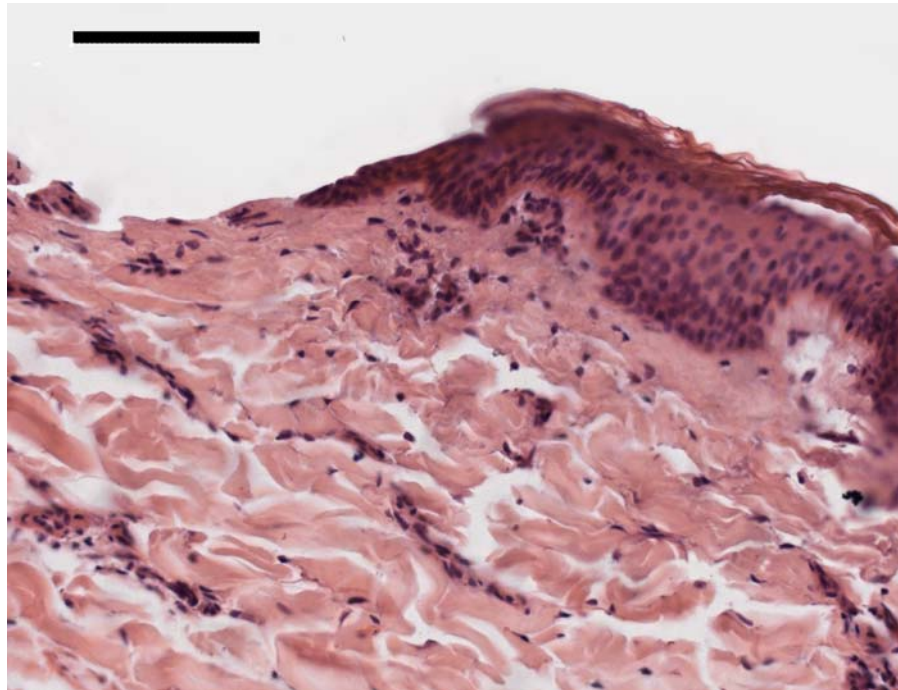


Figura 31: Fotomicrografia em microscopia de luz da amostra pele suína submetida ao processo de separação de epiderme e derme. Coloração: hematoxilina-eosina; Barra = 20µm.

5.2.6.2 Validação da Metodologia para a Extração da NFD de Epiderme e Derme Suína

5.2.6.2.1 Caracterização da Seletividade, da Recuperação e Precisão da Extração da NFD da Epiderme e Derme Suína.

A avaliação da recuperação de NFD adicionada aos segmentos cutâneos de epiderme e derme suínas foi feita por meio da comparação das respostas obtidas nas amostras e nas *spiked solutions* correspondentes a cada nível de massa de NFD total adicionada.

Os resultados obtidos na validação para o procedimento de extração da NFD dos segmentos cutâneos de epiderme e derme suína estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Recuperação média de NFD dos tecidos para três níveis do fármaco e seus DPR.

Quantidade adicionada de NFD (μg)	Recuperação \pm DPR ^a			
	Epiderme (μg)	Epiderme %	Derme (μg)	Derme %
5,04	4,87 \pm 1,37	96,70 \pm 1,38	4,88 \pm 2,28	96,89 \pm 2,28
3,40	3,28 \pm 1,79	96,23 \pm 1,79	3,27 \pm 1,17	96,12 \pm 1,17
1,66	1,60 \pm 1,42	96,68 \pm 1,42	1,63 \pm 3,29	97,98 \pm 3,29

^a n = 3

Os resultados foram satisfatórios no que se refere às curvas padrão preparadas no período.

A média do coeficiente de correlação (r) encontrado foi de $0,9991 \pm 0,02$ para n = 3, indicando que a resposta de CLAE foi linear para as condições de análise dentro da faixa de concentração entre 0,34 e 5,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O LD para a análise neste período foi de 0,1134 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o LQ foi de 0,3436 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Os desvios padrão entre os experimentos realizados para cada nível também foram considerados aceitáveis para o método bioanalítico (<15%, SHAH *et. al.*, 1992; ANVISA, 2003), o que caracteriza precisão adequada para os objetivos deste trabalho.

A figura 32 mostra as curvas analíticas obtidas para este experimento

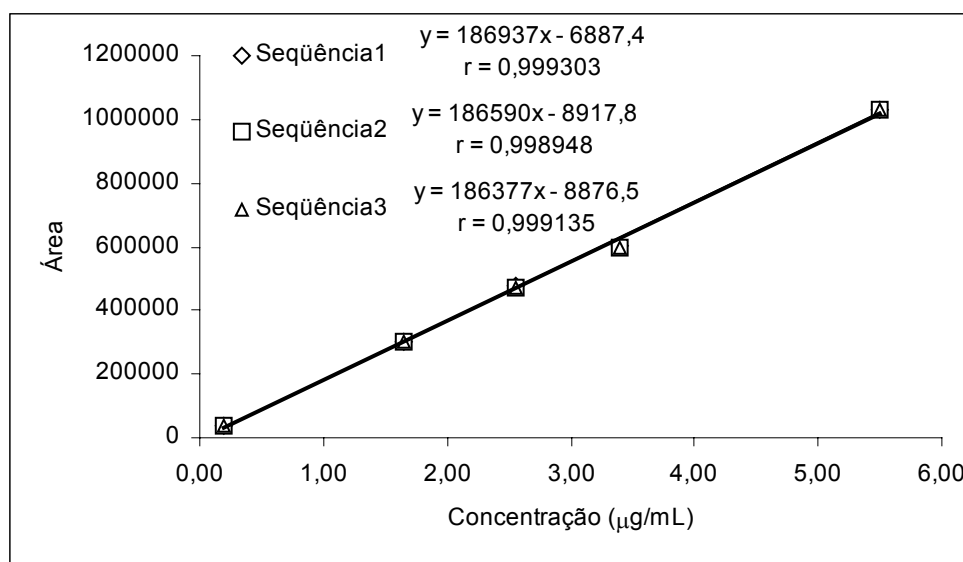


Figura 32: Curvas analíticas de NFD 0,34 a 5,04 µg/mL

Na figura 33 estão apresentados os cromatogramas obtidos para a solução extratora da epiderme e da derme na ausência de NFD e para as soluções extratoras na presença de NFD. Pode-se observar, na figura 34, que existe boa resolução entre o sinal da NFD e dos interferentes.

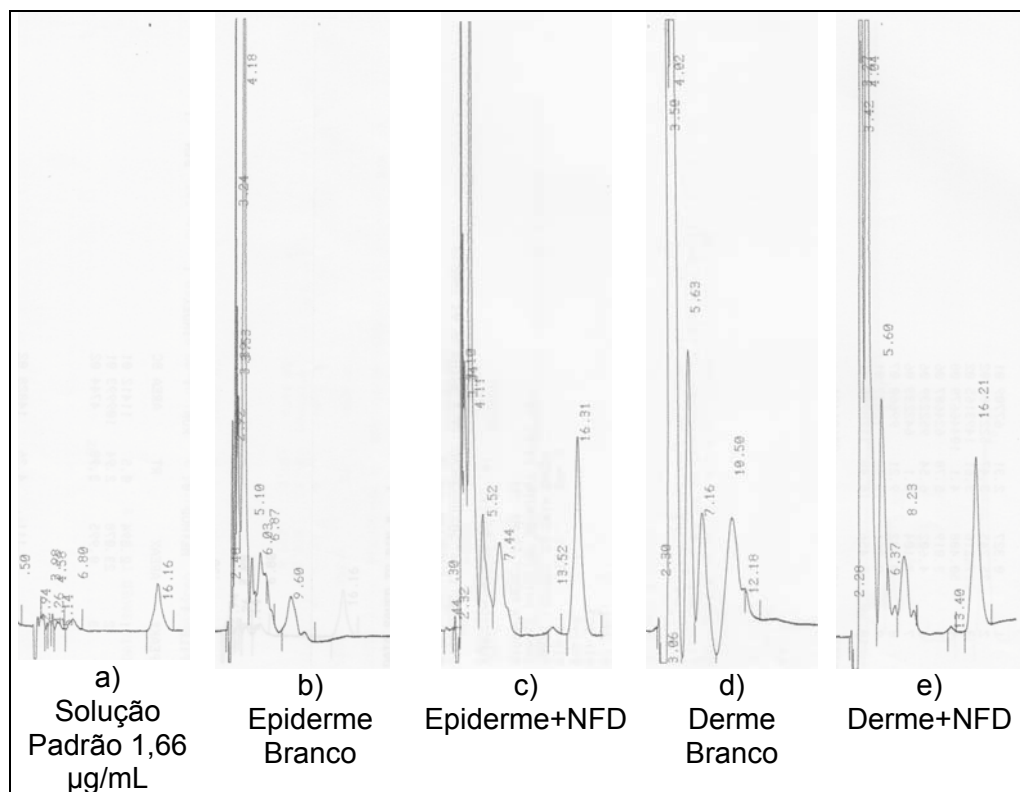


Figura 33 - Cromatogramas obtidos no experimento de extração da NFD da pele suína empregando solvente água:acetonitrila:metanol (50:25:25), para a avaliação da especificidade do método. A) solução padrão de NFD, b) branco da epiderme, c) epiderme na presença de NFD, d) branco da derme, e) derme na presença de NFD. Tempo de retenção da NFD = 16 min.

Pela análise dos resultados apresentados, o método de extração proposto para a extração da NFD das camadas de pele suína mostrou-se seletivo, preciso e exato, assim, adequado para o emprego nos estudos de penetração cutânea neste trabalho.

5.2.6.3 Resultados da Penetração / Permeação in vitro das Formulações contendo NFD

Ao final dos experimentos de permeação, a presença de NFD nos extratos cutâneos foi determinada após separação dos mesmos, de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.5.2.3

As massas absolutas de NFD extraídas da epiderme e derme suína após 24 horas de experimento em que a formulação permaneceu em contato com a pele, em uma área de 1,54 cm² estão apresentadas na tabela 17.

Tabela 17: Massas de NFD obtidas da derme e da epiderme suína em uma área de 1,54 cm², após 24 horas de contato com a formulação.

24 horas

n	Quantidade de NFD Epiderme (µg)			Quantidade de NFD Derme (µg)		
	PLO+NFD	PLO+NFD+ TC	EMUL	PLO+NFD	PLO+NFD+ TC	EMUL
1	420,37	101,47	214,20	158,38	57,89	117,67
2	412,97	94,67	224,31	168,32	54,58	115,34
3	429,54	94,42	220,45	164,36	64,65	122,31
4	405,19	94,80	214,04	167,07	59,69	120,93
5	429,76	88,38	223,65	159,89	58,52	114,12
6	418,16	98,69	224,52	166,83	56,64	115,77
Média	419,33	95,41	220,20	164,14	58,66	117,69
DP	9,5	4,4	4,9	4,1	3,4	3,3

A figura 34 mostra a representação gráfica dos resultados apresentados na tabela 17.

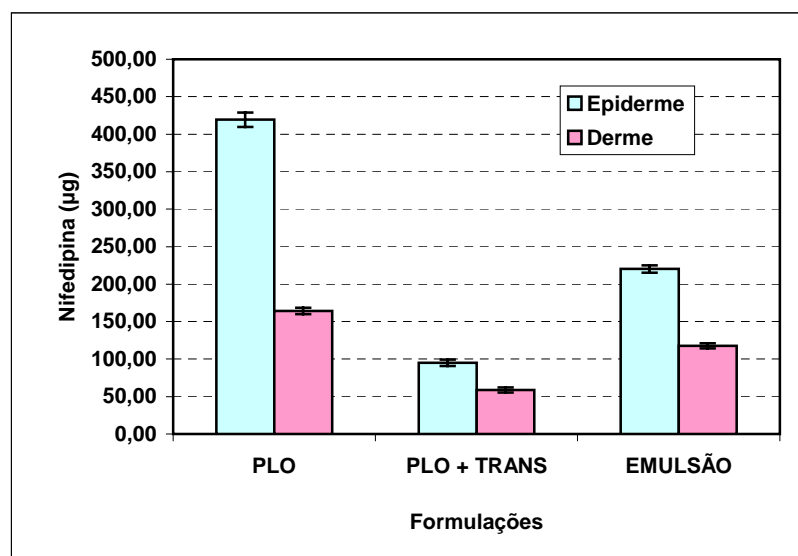


Figura 34 - Massas absolutas de NFD extraídas da epiderme e derme após 24 horas de contato das formulações com a pele, em uma área de 1,54 cm².

Uma análise da figura 34 permite concluir que, para as três formulações, a quantidade de NFD detectada foi maior na epiderme do que na derme, mostrando assim, que a quantidade de NFD diminuiu com a profundidade.

A diferença na quantidade de NFD retida na epiderme e derme entre as três formulações mostraram-se estatisticamente diferentes ($p < 0,001$ para $\alpha = 5\%$). Bem como a diferença da quantidade de NFD retida nos diferentes estratos cutâneos para uma mesma formulação também se mostraram estatisticamente distintas em todos os casos ($p < 0,001$ para $\alpha = 5\%$).

Ayub (2002), Freitas (2005) e Bemvindo (2006), em seus estudos, também verificaram quantidade decrescente de fármaco nos extratos cutâneos.

Um estudo realizado por Wodjac (1997) avaliou o efeito da lecitina de ovo como surfactante na biodisponibilidade da NFD administrada intragastricamente em ratos. Os resultados do estudo mostraram que houve um aumento da biodisponibilidade do fármaco em presença da lecitina.

Bonina e Montenegro (1994), estudaram o efeito de alguns promotores de penetração cutânea, incluindo o transcutool e a lecitina de soja, na absorção da heparina sódica através de pele humana. Neste estudo observou-se que todos os promotores, inclusive a lecitina de soja foram capazes de promover a penetração da heparina, com exceção do transcutool. Medindo o fluxo da heparina a partir das formulações contendo os promotores mostrou-se que a lecitina de soja foi capaz de promover a penetração da heparina, enquanto o transcutool não foi capaz. Segundo os autores os resultados indicam que a lecitina pode atuar aumentando o coeficiente de difusão da heparina.

Estes estudos podem explicar a maior quantidade de NFD encontrada nos estratos cutâneos expostos à formulação PLO+NFD, onde a lecitina alterou o coeficiente de difusão da NFD, aumentando a sua concentração nos estratos cutâneos.

Por outro lado, de acordo com Ganem-Quintanar e cols. (1997) o transcutol passa através da pele alcançando o compartimento receptor a uma taxa constante, limitado pelo extrato córneo. Em consequência da higroscopicidade do transcutol, um fluxo oposto de água é estabelecido do compartimento receptor para o doador, que atrai água da pele. Como resultado dos fluxos opostos, a taxa de permeação é afetada, modificando o particionamento do fármaco e a sua atividade termodinâmica no compartimento doador. Isto pode explicar a quantidade de NFD encontrada nos estratos cutâneos expostos à PLO+NFD+ TC.

Na avaliação da possível permeação cutânea de NFD, observou-se que após 24 horas de experimento foi possível detectar a presença do fármaco no meio receptor apenas para as formulações PLO+NFD e EMUL. As quantidades de NFD detectadas são apresentadas na tabela 18

Tabela 18: Quantidade de NFD ($\mu\text{g/mL}$) encontrada no meio receptor após 24h de ensaio.

Formulação	NFD ($\mu\text{g/mL}$)*
PLO+NFD	19,04 \pm 2,27
PLO + TC	--
EMUL	3,09 \pm 2,77

^an = 6 \pm DP

*Quantidade de NFD ($\mu\text{g/mL}$) no meio receptor após 24h de ensaio.

Sabendo-se que a solubilidade da NFD na solução receptora é 36,3 $\mu\text{g/mL}$, conclui-se que a condição *sink* foi respeitada considerando-se as concentrações de NFD obtidas ao final das 24 horas.

O maior valor encontrado foi de 19,04 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em um volume de 40 mL de solução receptora, o que representa uma concentração de 0,476 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostrando que a condição *sink* (12,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi respeitada.

Godwim, Kim e Felton (2002) estudaram a influencia da concentração de transcutol em formulações anti-solares na permeação e retenção cutânea de filtros solares. De acordo com os autores a inclusão do transcutol nas formulações aumentou a retenção cutânea sem, no entanto promover a permeação. Este fato, somado ao fenômeno de modificação do particionamento do fármaco e a sua atividade termodinâmica no compartimento doador descrito por Ganem-Quintanar e cols. (1997) pode explicar a ausência de permeação da NFD, mesmo após 24h.

A opção pela terapia com NFD por via tópica pressupõe que a ação do fármaco se desenvolva nas camadas superiores da pele e não se deseja a penetração profunda, capaz de atingir a circulação sistêmica. Por este motivo o estudo de permeação cutânea é capaz de fornecer dados importantes.

A quantidade de NFD quantificada na solução receptora após 24 horas indica que o fármaco apresentou dificuldade em alcançar a solução receptora. Uma hipótese para explicar estas quantidades, pode estar relacionada às propriedades moleculares da NFD, como a baixa capacidade de partição do fármaco para a solução receptora aquosa.

Além disso, uma vez que a derme possui características hidrofílicas maiores do que a epiderme, ela também pode representar uma barreira à passagem de substâncias, sobretudo àquelas que possuem alto coeficiente de partição e baixa solubilidade em água (KOU *et.al.*, 1993). Desta maneira, substâncias muito lipofílicas

têm uma tendência ao acúmulo no estrato córneo e na epiderme, seja pela afinidade com esses tecidos ou pela dificuldade em atravessar a derme.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

Foi possível desenvolver formulações contendo NFD em base PLO pelo método de extrusão.

O método utilizado para a análise da NFD de trabalho mostrou-se satisfatório, seu teor foi determinado em 99,94% e a matéria-prima foi aplicada como padrão secundário.

O método analítico proposto para a determinação do teor de NFD nas formulações por UV-vis demonstrou linearidade, sensibilidade e precisão adequadas.

O meio acceptor escolhido para os ensaios de liberação e permeação / penetração permitiu que a condição *sink* fosse obedecida, assim mostrando-se adequado para a aplicação nos experimentos desenvolvidos neste estudo.

O estudo de caracterização histológica dos fragmentos de pele suína permitiu confirmar que o processo proposto para a separação da epiderme e derme foi eficiente e garante correta separação dos estratos cutâneos nos experimentos de permeação / penetração cutânea.

O método analítico aplicado para a determinação da NFD por CLAE nas amostras provenientes dos ensaios de liberação e permeação / penetração demonstrou linearidade, sensibilidade e precisão adequadas aos objetivos deste estudo.

A avaliação das propriedades físico-químicas das formulações permitiu observar que:

- A presença da NFD alterou discretamente o pH das formulações;

- Todas as formulações apresentaram decréscimo na viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento apresentando um comportamento pseudoplástico quanto ao fluxo, característico de sistemas contendo polímeros em dispersão e sistemas emulsionados semi-sólidos;
- As viscosidades das amostras PLObase, PLO+NFD e EMUL não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, com $P > 0,05$ (para $\alpha = 5\%$), enquanto que PLO+NFD+TC apresentou um valor de viscosidade estatisticamente diferente de PLObase e EMUL, com $P < 0,005$ (para $\alpha = 5\%$). Em relação à PLO+NFD, PLO+NFD+TC apresentou diminuição sensível da viscosidade, com $P < 0,001$ (para $\alpha = 5\%$). Revelando que a presença do transcutool proporcionou alteração da viscosidade.
- Todas as formulações apresentaram tixotropia. PLO+NFD mostrou-se pouco tixotrópica devido à presença de cristais insolúveis de NFD, entretanto, a adição de transcutool restabeleceu o comportamento tixotrópico.
- PLObase, PLO+NFD e PLO+NFD+ TC apresentam comportamento viscoelástico, com componentes elásticos (G') maiores que os componentes viscosos (G'').
- A análise por microscopia óptica permitiu evidenciar que o processo de extrusão produziu formulações de PLO microemulsionadas, em contraste com a formulação EMUL (não microemulsionada).

Os estudos de liberação *in vitro* em sistema de difusão vertical equipado com membrana sintética permitiram identificar o perfil de liberação da NFD a partir das formulações em estudo.

Nos ensaios de liberação a formulação PLO+NFD+ TC apresentou fluxo de NFD menor em relação às outras duas formulações, embora a diferença entre o fluxo das três formulações não tenha demonstrado diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0683$ para $\alpha = 5\%$). A presença do transcutol alterou discretamente a atividade termodinâmica da NFD na base PLO.

Os estudos empregando células de difusão vertical com membrana natural de pele suína mostraram que para as três formulações, a quantidade de NFD detectada foi maior na epiderme do que na derme, evidenciando assim, que a quantidade de NFD diminuiu com a profundidade no tecido estudado.

Observou-se que lecitina alterou o coeficiente de difusão da NFD, aumentando a sua concentração nos estratos cutâneos.

Os resultados indicam que o transcutol afetou a permeação, provavelmente modificando o particionamento do fármaco e a sua atividade termodinâmica no compartimento doador.

Na avaliação da possível permeação cutânea da NFD, observou-se que após 24 horas de experimento foi possível quantificar a presença do fármaco no meio receptor, apenas nas formulações PLO+NFD e EMUL. A opção pela terapia com NFD por via tópica pressupõe que a ação do fármaco se desenvolva nas camadas superiores da pele e não se deseja a penetração profunda, capaz de atingir a circulação sistêmica.

Provavelmente, dentre as formulações estudadas, a que se mostrou mais apropriada para o tratamento tópico de lesões cutâneas de difícil cicatrização por deficiência de revascularização foi PLO contendo 8% de nifedipina e 10% de transcutol, pois:

- É constituída de excipientes que possuem alta compatibilidade com a pele;

- Os excipientes possuem característica de promover a retenção do ativo nos segmentos cutâneos, epiderme e derme;
- Apresentou a menor viscosidade relativa quando submetida ao cisalhamento, o que está relacionado com uma melhor espalhabilidade.
- Embora tenha apresentado um fluxo de liberação menor que o das outras formulações estudadas, esta diferença não foi considerada representativa.
- A adição de TC restabeleceu a tixotropia, muito diminuída pela adição da NFD ao PLO.

Para as formulações de uso tópico é desejável que a viscosidade diminua com o cisalhamento a fim de facilitar a espalhabilidade sobre a pele. Por outro lado, a tixotropia também é desejável para que a formulação não escorra da pele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS E., *et.al*, Healing effect of topical nifedipine on skin wounds of diabetic rats.. DARU Volume 11, No 1, 2003.

AGACHE, Physiologie de la peau et exploitations fonctionnelles cutanées, Editions Médicales Internationales 2000.

ALBERY, W.J., HADGRAFT, J. Percutaneous absorption: in vivo experiments. J. Pharm. Pharmacol. 31, 140 –147. 1979.

ANSEL H.C.; POPOVICH N.G.; ALLEN L.V.J.R. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8 ed. São Paulo: Artmed, 2007. 775p.

ANTROPOLI C., *et.al.* Nifedipine for local use in conservative treatment of anal fissures: preliminary results of a multicenter study. Dis. Colon Rectum, 42, 1011-15.1999.

ASH M, ASH I. Handbook of Pharmaceutical Additives. Brookfield, VT, Gower Publishing, 1995. 484 p.

AYUB, A.C. Desenvolvimento de Emulsões O/A contendo fluconazol para o tratamento tópico de micoses superficiais: avaliação da penetração cutânea e absorção percutânea. 2006. 87f Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

AUTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. São Paulo: Artmed, 2005. 677p.

BABU V.R.*et.al.*, Preparation of sodium alginate-methylcellulose blend microspheres for controlled release of nifedipine. Carbohydrate Polymers, India, v.69, p. 241-250, 2007.

BARRY, B.W., rheology of pharmaceutical and cosmetic semisolids. *Apud* BENTLEY, M.V.L.B. *et.al.* Influence of lecithin on some physical chemical properties of poçaxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies. International Journal of Pharmaceutics. Brazil, v.193, p. 49-55. 1999.

BARRY, B.W. Novel mechanism and devices to enable successful transdermal drug delivery. Eur.J.Pharm. Sci., Amsterdam, v.14,p.101-114,2001.

BARRY, B.W. Breaching the skin's barrier to drugs. Nat. Biotechnol. V.22, n.2, p. 165-167. 2004.

BARTÉLÉMY, *et.al.*, Transcutol - Product Profile. Product Information. Gattefossé, p. 1-10, 1995.

BEMVINDO, C.S. Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais. 2006. 110 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

BENTLEY, M.V.L.B. *et.al.* Influence of lecithin on some physical chemical properties of poçaxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies. International Journal of Pharmaceutics. Brazil, v.193, p. 49-55. 1999.

BERTI JJ, LIPSKYS JJ. Transcutaneous drug delivery: a practical review. Mayo Clin Proc. 1995;70:581Y586.

BHATIA, K.S.; GAO, S.; SINGH, J. Effect of penetration enhancers and iontophoresis in the FT-IR spectroscopy and LHRH permeability through porcine skin. J. Control. Rel. Amsterdam, v.47, p.81-89, 1997.

BHATTI, A.S.; SCOTT, R.C.; DYER, A. *In-vitro* percutaneous absorption: pig epidermal membrane as a model for human skin. J. Pharm. Pharmacol. v.40(supl.), p. 45, 1989.

BLANCO, M.D.; *et.al.* Transdermal application of bupivacaine-loaded poly (acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels. Int. J. Pharm., Amsterdam, v.255, p.99-107, 2003.

BOLTRI, L; *et. al.* *In vitro* transdermal permeation of nifedipine from thickened microemulsions. J. Pharm. Belg., v.49, n.4, p.315-320, 1994.

BONINA, F.P.; MONTENEGRO, L., Effects of some non-toxic penetration enhancers on in vitro heparin skin permeation from gel vehicles. International journal of pharmaceutics, v.111, n.2, p.191-196, 1994.

BRANDT L., *et.al.* Effects of topical application of a calcium antagonist (Nifedipine) on feline cortical pial microvasculature under normal conditions and in focal ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab, 3, 44-5. 1983.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 899, 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun.2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 06, jun. 2008.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Revista Ecotoxicológica e Meio Ambiente, v.13,p. 129-146, 2003.

CABANA, A, *et.al.*, Study of the gelation process of polyethylene oxide-polyethylene oxide-copolymer (Poloxamer 407) aqueous solution.J. Colloid Interface Sci. v.190, p. 307-12, 1997.

CAPITANI D, *et.al.*. Multinuclear NMR investigation of phosphatidylcholine organogels. J Phys Chem.;100:15211Y15217.1996.

CARASTRAN, D.J., Obtenção e caracterização reológica de nanocompósitos de polímeros estirênicos. 2007. Tese de Doutorado – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2007.

CEVC, G. *et.al.*, The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. Advanced Drug Delivery Reviews, v.18, p. 349-378, 1996.

CEVC, G.; VIERL, U. Spatial distribution of cutaneous microvasculature and local drug clearance after drug application on the skin. Journl of Controlled Release, v.118, p. 18-26, 2007.

CHEN D, MAA Y, HAYNES J. Needle-free epidermal powder immunization. Expert Rev Vaccines;v.1, p. 265–76, 2002.

COLLETT JH, POPLI H, KIBBE AH, ed. Poloxamer. In: Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3rd ed. London, UK: Pharmaceutical Press,;386-388. 2000.

CRANDALL WT, inventor. Topical moisturizing composition and method. US Patent 6 316 428. November 13, 2001.

CSÓKA, I. *et.al.*, In vitro and in vivo percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies, Int. J. Pharm., Amsterdam, v.29, p.11-19, 2005.

DAVIS, S.S.; KHANDERIA, M.S. Viscoelastic properties of pharmaceutical semisolids: characterization of the plastibases for bioavailability studies. J. Pharm. Pharmacol. V.24, p. 176-180, 1972.

DE CARVALHO, M., Modelisation de l'absorption percutanée ex vivo de l'estradiol. Tese de doutorado, Universidade Claud Bernard, Lyon, França, 1995.

DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS: DEF 2007/2008, 36.ed. Rio de Janeiro: Publicações científicas, 2007.

DIEZ, I. *et.al.* A comparative *in vitro* study of transdermal absorption of a series of calcium channel antagonists. J. Pharm. Sci. V.80, n.10, p. 931-934, 1991.

DUBEY, V. *et.al.* Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. J. Contr. Rel. (2007), doi: 10.1016 / j.jconrel.2007.08.005

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETERSON, R. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use. Eur. J. Pharm. Sci., 1998; 6:105-12.

ELIAS, P.M., Epidermal lipids, barrier function and desquamation, J. Investig. Dermatol. V. 80, p. 44-49, 1983.

FLYNN, G.L.; SMITH, R.W.J. (1972). Pharm. Sci., 61, 61-66 *apud*: LALOR, C.B. *et.al.* Formulation factors affecting release of drug from topical formulations. 1. effect of emulsion type upon in vitro delivery of ethyl p-aminobenzoate. J. Pharm. Sci., Washington, v.83, n.1, p.1525-1528, 1994.

FLORENCE A.T.; ATTWOOD D. Princípios Físico-Químicos em Farmácia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 534-542, 2003.

FONG-SPAVEN, F.; HOLLENBECK, R.G. Drug Dev. Ind. Farm. .12, 289, 1986.

FONSECA, S.C.; FERREIRA, A.O. Novidades Magistrais: Compêndio de Atualização em matérias-primas, 1º ed. , São Paulo, 156p., 2005.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1996, p.53-53-3.

FREITAS, M.N. et. al. Rheological characterization of polaxamer 407 nimesulide gels. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.27, n.1, p. 113 – 118, 2006.

FREITAS, Z.M.F. Avaliação Biofarmacotécnica de Formulações Dermatológicas Semi-Sólidas de Cetoconazol. 2005. 154 f. Tese de Doutorado em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2005.

FUCHS E, RAGHAVAN S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. Nat Rev Genet; v. 3, p.199–209, 2002.

GALLAGHER, S.J., TROTTER, L., HEARD, C.M. Ketoprofen: release from, permeation across and rheology of simple gel formulation that simulate increasing dryness. International Journal of Pharmaceutics v.268, p.37-45, 2003.

GANEM-QUINTANAR, A. *et.al.* Evaluation of the transepidermal permeation of diethylene glycol monoethyl ether and skin water loss. International Journal of Pharmaceutics. v.147, p. 165-171, 1997.

GENNARO, A. R. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 2208p.

GODWIN D. A.; KIM N.; FELTON, L. A., Influence of Transcutolw CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. v. 53, p. 23–27, 2002.

GUIDANCE FOR INDUSTRY: Nonsterile semisolid dosage forms. Scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. Rockville: Food and Drug Administration, 1997, (CDER).

GUY, R.H.; HADGRAFT, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. International Journal of Pharmaceutics, v.60, p. R1-R3, 1990.

GWAK, H.S.; CHUN, I.K. Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin. Int. J. Pharm., v.236., p. 57-64, 2002

HADCGRAFT J. Skin, the final frontier. Int.J.Pharm., Amsterdam, v.224,p.1-18, 2001

HADCGRAFT J; LANE, E.M. Skin permeation: The years of enlightenment. International Journal of Pharmaceutics, v.305, p.2-12, 2005.

HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. Eur. J. Pharm. Sci. Amsterdam, v.2,p. 311-330, 1994.

HANAHAN DJ. In: A Guide to Phospholipid Chemistry. New York, NY: Oxford University Press, 1997.

HELMKE, C.D. Wound Healing – part 1. International Journal of Pharmaceutical Compounding. V.8, n.4,p.269 – 274, 2004.

HIGUCHI, W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 51, n. 8, p. 802 – 804, 1962.

HO, H.; GHEN, C.; SHEU, M. Influence of pluronic F-68 on dissolution and bioavailability characteristics of multiple-layer pellets of nifedipine for controlled release delivery. J. Of Contr. Rel. v.68, p. 433-440, 2000.

HUANG, J.; *et. al.* Nifedipine solid dispersion in microparticles of ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend for controlled drug delivery. Effect of drug loading on release kinetics. International Journal of Pharmaceutics. V. 309, p. 44-54, 2006.

ISRAEL, A. Topical gel for the treatment of a refractory leg ulcer; case report. International Journal of Pharmaceutical Compounding. V.7, n.3, p.176 – 178, 2003.

KALIA, Y.; PIROT, F.; GUY, R. Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo, Biophys. J. v. 71, p. 2692–2700, 1996.

KALIA, Y.N. *et.al.* Assessment of topical bioavailability in vivo: the importance of stratum corneum thickness. Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol., Basel, v.14, n.1, p. 82-86, 2001.

KANG, L. Formulation development of transdermal dosage forms: Quantitative structure-activity relationship model for predicting activities of terpenes that enhance penetration through human skin. J. Contr. Rel., v.120, p. 211-219, 2007.

KIERSTAN, K.T.E. *et.al.* UV-spectrophotometry study of membrane transport process with a novel diffusion cell. Int. J. Pharm., Amsterdam, v.229, p.87-94, 2001.

KENDAL, M. A. F.; CHONG, Y.; COCK, A. The mechanical properties of the skin epidermis in relation to targeted gene and drug delivery. Biomaterials. V. 28, p. 4968 – 4977, 2007.

KINCAID, M.R., Options in wound care. International Journal of Pharmaceutical Compounding. V.6, n.2, p.92 – 95, 2002.

KNORST, M.T.; NEUBERT, R.; WOHLRAB, W. Release of urea from semisolid formulations using a multilayer membrane system. Drug Dev. Ind. Pharm., New York, v.23, n.3, p.253-257, 1997.

KOO, C.M.; KIM, S.O; CHUNG, J. Study on morphology evolution, orientational behavior, and anisotropic phase formation of highly filled polymer-layered silicate nanocomposites. Macromolecules, v.36, p. 2748-2757, 2003.

KOU, J.H. *et. al.* Effect of receiver fluid pH on *in vitro* skin flux of weakly ionizable drugs. Pharmaceutical Research, v.10, n.7, p. 986-990, 1993.

KRETSOS, K. *et.al.* Partitioning, diffusivity and clearance of skin permeants in mammalian dermis. Int.J.Pharm., v.346, p. 64-79, 2008.

KUMAR, R; KATARE, O.P. Lecitin Organogels as a Potential Phospholipid-Structured System for Topical Drug Delivery: A Review. AAPS Pharm. Sci.Tech., Chandigarh, v.6, n. 2, p.298 – 310, 2005.

LE HIR, A. Noções de farmácia galênica. 6.ed. São Paulo: Andrei, 1997, p. 176-185.

LI, H.; *et. al.*. In vivo dedifferentiation of human epidermal cells. Cell Biology International. V.31, p. 1436 –1441, 2007.

LILLIE, R.D.; FULLMER, H.M. Histopathologic Technique and Practical Histochemistry. 4th ed. New York: Mac Graw-Hill Book Co., p. 208-701, 1976.

LIU, H. *et.al.* Effect of vehicles and enhancers on the topical delivery of cyclosporin A. Int.J.Pharm., v.311, p. 182-186, 2006.

LOPES, P.; KANEKO, T.M. Membranas no estudo de permeação cutânea. Cosmet. Toiletries (Ed. Português), São Paulo, v.12, p.62-66, 2000.

MAITI, P. Influence of miscibility on viscoelasticity, structure, and intercalation of oligopoly (caprolactone)/layered silicate nanocomposites. Langmuir, v.19, p. 5502 – 5510, 2003.

MARKS, R. The stratum corneum barrier: the final frontier, J. Nutr. v. 134 820, p. 2017S–2021S, 2004.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; *et.al.*. Development of topical functionalized formulations added with própolis extract: stability, cutaneous absorption and in vivo studies. International Journal of Pharmaceutics. V. 342, p. 40 – 48, 2007.

McDAID, D.M.; DEASY, P.B. An investigation into the transdermal delivery of nifedipine. Pharm. Acta Helv., v.71, p.253-258, 1996.

MEDI, B.M.; SINGH, J. Eletronicly facilitated transdermal delivery of human parathyroid hormone (1-34).Int. J. Pharm., Asterdam, v. 263, p. 25-33, 2003.

MOORE, T. *et.al.* Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic-F127 gel dissolution: drug release in stirred system. J. Control. Rel. V.67, p.191-202, 2000.

MOFFA, C.A; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. Clarke's Analysis of Drug and Poisons, in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material, Third edition. v.2, p. 1337 – 1338, 2004.

MORIMOTO, Y. *et.al.* Basics studies on control del transdermal delivery of nicardipine hydrochloride using ethylene-vinyl acetate and ethylene-vinyl alcohol copolymer membranes. Chem. Pharm. Bull. v.36, p. 2633-2644, 1988.

MORITA, T. e ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: padronização, preparação e purificação. 2 ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, p. 629, 1998.

MOORE J. Final report on the safety assessment of octyl palmitate, cetyl palmitate and isopropyl palmitate. J. Am. Coll. Toxicol. V.1, p.13 - 35, 1982.

MURA, P. *et.al.* Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophobic gel formulations. Eur. J. Pharm. Sci. v.8, p. 365-372, 2000.

NEMES Z.; STEINERT PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. Exp Mol Med. v.31, p.5–19, 1999.

PARSAEE S, SARBOLOUKI MN, PARNIANPOUR M. In vitro release of diclofenac diethylammonium from lipid-based formulations. Int J Pharm. V. 241, p.185 -190, 2002.

PAOLETTI, J. Head-to-Toe Solutions: A Quick Review Current Therapies. Int. J.Pharm. Compounding, v.8, n.5 sep/oct, p.345-352, 2004.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. Tecnologia farmacêutica. 5.ed.Lisboa:Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v.1,-p.597-662.

RAHMAN N., AHMAD Y., AZMI S. N. H. Kinetic spectrophotometric method for the determination of ramipril in pharmaceutical formulations. AAPS PharmSciTech. Índia, v. 6, n. 3, p. E543-E551, 2005.

REGE, P.R.; VILIVALAM, V.D.; COLLINS, C.C. Development in release testing of topical dosage forms: use of the enhancer cellTM automated sampling. J. Pharm. Biomed. Analysis, Amsterdam, v.17, p. 1225-1233, 1998.

RIBANI, M.; *et.al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v.27, n.5, p.771 – 780, 2004.

RICCI, E.J. *et.al.*, Rheological characterization of Polaxamer 407 lidocaine gels. European Journal of Pharmaceutical Science. v. 17, p. 161-167, 2002.

RITSCHER, *et. al.*; Development of an intracutaneous depot for drugs. Binding, drug accumulation and retention studies, and mechanism of depot, Skin Pharmacol. v. 4, p. 235 –245, 1991.

RANG, H. P., DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 5^a Edição. São Paulo: Elsevier Editora. p. 334-335, 2003.

REFAI, H.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. The influence of dilution of topical semisolid preparations on hydrocortizone preparation through excised human astratum corneum. Eur. J. Pharm. Biopharm. Sci., London, v.54, p. 143-150, 2002.

REIHSNER, R.; BALOGH, B.; MENZEL, E.J. Two-dimensional elastic properties of human skin in terms of an incremental model at the *in vivo* configuration, Med. Eng. Phys. v.17, p. 304–313, 1995.

REIHSNER, R.; MENZEL, E.J. Two-dimensional stress-relaxation behavior of human skin as influenced by non-enzymatic glycation and the inhibitory agent aminoguanidine, J. Biomech. v. 31, p. 985–993, 1998.

SAIJA, A. *et.al.* Influence of different penetration on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. Int. J. Pharm. v.175, p. 85–94., 1998.

SCARTAZZINI R, LUISI PL. Organogels from lecithins. J Phys Chem. 1988;92:829-833.

SCHMOLKA, I. Artificial skin, preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of the burns. J. Biomed. Mater Res.; 6:571-82,1972.

SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or emipermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. Int. J. Pharm., Amsterdam, v.215, p.51-56, 2001.

SCHNEIDER M. Industrial production of phospholipids-lecithin processing. Lipid Technology.;v.9, p. 109-116, 1997.

SCHURTENBERGER P, et.al.. Structural and dynamic properties of polymer-like reverse micelles. J Phys Chem., v.94, p. 3695-3701, 1990.

SEKI, T. Percutaneous absorption enhancer applied to membrane permeation-controlled transdermal delivery oh nicardipine hydrochloride. Drug Des. Delivery. v.4, p. 69-75, 1988.

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. J. Pharm.Sci., Washington, v.91, n.11, p.2376-2381, 2002.

SHAH, V.P. *et al.* In vitro release of hydrocortisone from topica preparatios and automated producture. Pharmaceutical Research, v.8, n.1, p. 55-59, 1991.

SHAH, V.P. *et al.* Analytical methods validation: Bioavailablity, bioequivalence and pharmacokinetic studies. International Journal of Pharmaceutics, v.82, p. 1-7, 1982.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.S.; WILLIAMS, R.L. Evaluation of the tests system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drugs products. Pharm. Dev.Technol., Philadelphia, v.4, n.3, p.377-385, 1999.

SHCHIPUNOV YA. Lecithin organogel: a micellar system with unique properties. Colloids Surf A Physicochemical and Engineering Aspects.;183-185:541-554, 2001.

SHCHIPUNOV YA, HOFFMANN H. Lecithin organogels with polar additives: rheological studies. Colloid J.v.60, p. 794-799, 1998.

SHCHIPUNOV YA, SHUMILINA EV. Lecithin bridging by hydrogen bonds in the organogel. In: Materials Science & Engineering C 3.;43-50, 1995.

SHCHIPUNOV YA, SHUMILINA EV. Lecithin organogels: role of polar solvent and nature of intermolecular interactions. Colloid J.v.58, p.117-125, 1996.

SHUMILINA EV, KHROMOVA Y, SHCHIPUNOV YA. *Lecithin organogels: the effect of phosphatidylethanolamine additives*. Colloid J. 1997;59:514-518.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C.K.; SHAH, V.P. FIP/AAPS: Guidelines to Dissolution / in vitro Release Testing of Novel / Special Dosage Forms. AAPS PharmSciTech. V.4 (1), article 7, 2003.

SILVA, C.L. *et al.* Stratum corneum hydration: Phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes. Biochimica et Biophysica Acta, 2007

SINKO, J.P., Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas. São Paulo: Editora Artmed, 2008, 809 p.

SINGH, S.; SINGH, J. Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. Med. Res. Rev., New York, v.13, n.5, p.569-621, 1993.

SORKIN, E.M.; CLISSOLD, S.P.; BROGDEN, R.N. Nifedipine. A review of this pharmacodynamic and pharmacokinetics properties and therapeutic efficacy, in ischaemic heart disease, hypertension and related cardiovascular disorders. Drugs, v.30, p. 182-274, 1985.

SQUILLANTE, E. *et al.* Optimization of in vitro nifedipine penetration enhancement through hairless mouse skin. Int. J. Pharm. V.169, p.143-154, 1998.

SUBER, C. *et al.* Optimization of topical therapy: partitioning of drug into stratum corneum. Pharm. Res., New York, v.7, n.12, p. 1320-1324, 1990.

TORSIELLO, M.J.; KOPACKI, M.H. Transdermal Nifedipine for wound healing: case reports. Int. J. Pharm. Compounding, v.4, n.5, p.356-358, 2000

TURAKKA, L.; ALA-FOSSI, N. Influence of propylene glycol on the release of hydrocortisone and its acetate ester from carbopol hydrogel. Acta Pharm. Fennica, v.96, p.15-21, 1987.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Nifedipine, 30. ed. Rockville: U.S.P Convention, n.f.25, v.3, p.2752-2753, 2007.

VEYRIES, M.L. *et. al.* Controlled release of vancomycin from polaxamer 407 gels. Int. J. Pharm. 1999; 192:183-93.

WAGNER H., *et.al.* Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. J. Of Cont. Release., Lebach, v.75, p.283-295, 2001.

WALDE P, GIULIANI AM, BOICELLI CA, LUISI PL. Phospholipid-based reverse micelles. Chem Phys Lipids. 1990;53:265-288.

WEIN-BERGER, K.; NEELISSEN, J.A.M.; BERGENSTAHL, B. The effect of rheological behavior of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. Eur. J. Pharm Sci., Amsterdam, v.13, p.309-318, 2001.

WILLIAMS, F.M. In vitro studies – how good are they at replacing in vivo studies for measurement of skin absorption. Environmental Toxicology and Pharmacology. V.21, p. 199-203, 2006.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. J Control. Rel., Amsterdam, v.81, p. 225-233, 2002.

WYNN, T. Wound care of a diabetic foot ulcer. International Journal of Pharmaceutical Compounding. V.8, n.4, 2004.

WENDEL A. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. New York, NY: John Wiley & Sons; 192-193, 1995.

Wu, J.Z., *et.al.* Modeling of time-dependent force response of fingertip to dynamic loading, J. Biomech. v.36, p. 383–392, 2003.

ZATZ, J.L. Drug release from semisolids: effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. Pharmaceutical Research, v12, n.5, p. 787 – 789, 1995.