



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

*Nova Associação de Digluconato de Clorexidina e
Cloridrato de Lidocaína em Gel Urogenital.
Desenvolvimento farmacotécnico, avaliação da
qualidade e da estabilidade da formulação*

Luiz Francisco Jones Soares da Silva

Rio de Janeiro
2009

LUIZ FRANCISCO JONES SOARES DA
SILVA

*Nova Associação de Digluconato de Clorexidina e
Cloridrato de Lidocaína em Gel Urogenital.
Desenvolvimento farmacotécnico, avaliação da
qualidade e da estabilidade da formulação*

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Valéria Pereira de Sousa
Co-orientador: Prof Dr. Lúcio Mendes Cabral

Rio de Janeiro
2009

LUIZ FRANCISCO JONES SOARES DA SILVA

Nova Associação de Digluconato de Clorexidina e Cloridrato de Lidocaína em Gel Urogenital.

Desenvolvimento farmacotécnico, avaliação da qualidade e da estabilidade da formulação

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

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Co-orientador:

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Elias Estrela
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Luiza Rosária Sousa Dias
Faculdade de Farmácia – UFF

Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior
Faculdade de Farmácia – UFRJ

"Vim, vi e venci".

(Júlio Cesar)

"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las".

(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a minha família que me deu um incomensurável suporte em todos os momentos da minha vida acadêmica, sempre me lembrando que eu estava onde deveria estar pelo meu próprio esforço e não pela caridade de ninguém. Minha querida mãe Elisete que sempre me ajudou levantando cedo, fazendo meu café da manhã, almoço e janta ou mesmo quando ficava ao meu lado enquanto preparava estas refeições reclamando de algum prazo apertado de entrega de trabalhos. Ao meu pai Licio, que sempre perguntava se eu já tinha dinheiro para ir pra faculdade, segurava os gastos pessoais para me ajudar em qualquer momento que precisava. Minha irmã Eliane, que perturbava minha cabeça de todas as maneiras possíveis e imagináveis, mas que sempre me permitia esquecer qualquer dificuldade que eu vivenciara na vida acadêmica, fornecendo uma reciclagem de pensamentos.

Um agradecimento especial a um membro de minha família que não está mais fisicamente presente, mas nunca saiu e nem sairá de meu coração: minha avó Yara. Esta mulher extraordinária sempre tinha uma solução pra tudo, uma frase esclarecedora, uma mão amiga e outra pesada pra bater. Mas sempre estava do meu lado para que eu nunca me esquecesse o significado de amor e perseverança. Sempre te amei e amarei.

Ao meu cachorro Iron, que preenchia meus momentos de dificuldade na realização de algum trabalho, garantindo a perfeita companhia quando eu precisava somente rir ou resmungar, sem ser julgado. Mesmo longe fisicamente de mim, sempre terá um lugar especial em meu coração!

Aos meus amigos Izabella, Maria Natividade, Lea, Taila, Natalia, Daniela, Carol, Suelem, Suellen, Marcos, Rodrigo, Vagner e Roberto que sempre tiveram muita paciência comigo e me proporcionaram oportunidade de diversão em todos os horários possíveis nos lugares mais irados do Rio de Janeiro.

Aos meus caros companheiros do LabCQ e da terapia de humor em grupo Monique, Tailane, Vivian, Yara, Maria Tereza, Adriana, Raquel, Viviane, Yasmin, João, Alice, Juliana, Gisele, Maíra, Gleiciane e Joyce. Vocês foram especiais a cada momento em que eu precisei de seus conhecimentos técnicos e do ombro amigo para enfrentar a dificuldade invisível, mas principalmente por nunca me deixarem desistir da guerra “mestrado” a vencer.

A Eliane por todos os sábios conselhos, cafezinhos e almoços que dividimos durante minha passagem pelo laboratório.

A Maria, por nos receber todos os dias com um sorriso incomparável e torná-los mais leves logo pela manhã. Por ser uma pessoa simples e carinhosa nos momentos que nem sabia que era o que eu mais precisava.

Aos meus caros companheiros do LabTIF Flávia, Michelle Brandão, Michele, Caroline Pupe, André, Raquel, Arídio, Cid e Ana. Cada um contribui com meu trabalho, indo desde segurar uma porta para que eu entrasse até me emprestando seus contatos em outros laboratórios para executar experimentos cruciais para minha dissertação.

À Mestra Maria do Carmo e ao Prof. Antônio Ventura Pinto do NPPN pela inestimável ajuda prestada em todos os momentos em que foram solicitados.

Ao meu co-orientador Professor Lúcio Mendes Cabral, por todo o apoio e sagacidade ao contribuir com o trabalho seja na interpretação da teoria ou na bancada, auxiliando na execução de algum experimento.

Aos Professores Sheila Garcia, Maria Bernadete Riemma e Maurício Trambaiolli por todo o apoio e oportunidades concedidas.

Ao Professor Carlos Alberto Manssour Fraga pela ajuda em algumas partes experimentais do trabalho.

E finalmente à minha orientadora Professora Valeria, por todo o entusiasmo, apoio, motivação e orientação essenciais para a realização de todo esse trabalho. Nunca vou esquecer do quanto eu aprendi com você. Muito Obrigado!

RESUMO

O cloridrato de lidocaína é um anestésico local quando destinado à aplicação tópica. O digluconato de clorexidina é um agente antisséptico e desinfetante de amplo espectro. Desta maneira, uma formulação semissólida com a associação da lidocaína e da clorexidina seria útil como anestésico e antisséptico em procedimentos clínicos nas cavidades urogenitais, especialmente com a inclusão de características mucoadesivas. Entretanto, essa associação apresenta algumas incompatibilidades conhecidas que foram resolvidas com o uso de ciclodextrinas (CD). Um método isocrático por CLAE, utilizando coluna de fase reversa e detecção por UV, foi desenvolvido e validado para a determinação dos fármacos na formulação, na presença de produtos de degradação, e também foi aplicado nos estudos de liberação *in vitro*. Dois solventes, água e etanol, foram testados para verificar a compatibilidade entre os fármacos com o excipiente mucoadesivo. Complexos de inclusão de lidocaína com β -CD e metil- β -CD foram obtidos para solucionar a incompatibilidade. Uma nova associação de lidocaína e clorexidina em formulação semissólida foi desenvolvida e caracterizada em estudos de liberação *in vitro* e das propriedades reológicas. O estudo de estabilidade química dos fármacos na formulação foi determinado em um período de 180 dias. A melhor formulação obtida com a associação do complexo de inclusão lidocaina-metil- β -CD com a clorexidina em um gel aquoso composto por hidroxietilcelulose e PEG-15 cocopoliamina. O método analítico desenvolvido por CLAE foi preciso, exato e linear. Os estudos de liberação *in vitro* apresentaram uma liberação máxima de lidocaina de 83% e de clorexidina de 61%. Os estudos reológicos revelaram que a formulação completa apresentava um comportamento não-Newtoniano, pseudoplástico, não-tixotrópico e um gel não verdadeiro em função de suas propriedades reológicas. O complexo de inclusão lidocaina-metil- β -CD permitiu a associação com clorexidina em um gel aquoso mucoadesivo. O método por CLAE foi aplicado com sucesso na determinação dos fármacos na formulação na presença dos produtos de degradação.

ABSTRACT

Lidocaine hydrochloride when applied topically is a local anesthetic. Chlorhexidine gluconate is a wide range antiseptic and disinfectant agent. So, a semisolid formulation with lidocaine and chlorhexidine in association would be useful as analgesic and antiseptic in medical procedures on urogenital cavities, especially if the mucoadhesive characteristics are present. However, this association has some known incompatibilities described that were solved using cyclodextrins (CD). Water and ethanol, were tested, as solvents, to verify the compatibility between the drugs and among the drugs and the mucoadhesive excipient. Inclusion complexes of lidocaine with β -CD and methyl- β -CD were obtained to solve the incompatibility. An isocratic HPLC method using reverse phase and UV detection was developed and validated to assay the drugs in the formulation, in the presence of degradation products and was also applied in the release studies. The development of the new association of lidocaine and chlorhexidine in a mucoadhesive semisolid formulation were done and characterized by the *in vitro* release studies and rheological properties. Also, the stability study of this association using the developed and validated method to determine these drugs in the formulation and was concluded. The best formulation was lidocaine-methyl- β -CD inclusion complex associated with chlorhexidine in an aqueous gel composed of hydroxyethylcellulose and PEG-15 cocopolyamine. The developed analytical method was precise, accurate and linear. The *in vitro* release studies had a maximum release of 83% for lidocaine and 61% for chlorhexidine. The rheology studies revealed that the formulation presented a non-Newtonian behavior, pseudoplastic, non-tixotropic, and a no real gel rheologic properties. The lidocaine-methyl- β -CD inclusion complex allowed the association of chlorhexidine and lidocaine in the same mucoadhesive aqueous gel formulation. The HPLC method was applied successfully to assay the drugs in the formulation in the presence of the degradation products.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 01: Anatomia do sistema urinário masculino e feminino (BRADSLEY, 2006)	27
FIGURA 02: Anatomia do sistema reprodutor feminino (VALENTA, 2005)	28
FIGURA 03. Estrutura química da clorexidina.	29
FIGURA 04. Alvos da ação de antimicrobianos nas células bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas (DENYER e STWART, 1998).	30
FIGURA 05: Estrutura química da lidocaína	32
FIGURA 06: Estrutura do nociceptor (RANG <i>et al.</i> , 2003)	33
FIGURA 07: Canal de cálcio e seus estados durante a propagação do impulso nervoso (CUMMINS, SHEETS e WAXMAN, 2007)	34
FIGURA 08. Estruturas tautoméricas da biguanida e seu esquema de hidrólise proposto (HA e CHEUNG, 1996).	36
FIGURA 09. Vias hidrolíticas propostas para a clorexidina em solução aquosa. (HA e CHEUNG, 1996)	37
FIGURA 10 : Esquema da degradação da lidocaína sobre altas temperaturas (POWELL, 1978)	38
FIGURA 11: O epitélio vaginal (NEVES e BAHIA, 2006)	43
FIGURA 12: Interação do gel mucoadesivo (A) com muco (B) e com o epitélio vaginal (C) (NEVES e BAHIA, 2006)	43
FIGURA 13: Suporte da amostra: visão interna da área útil (a); visão da parte inferior da área útil (b) e suporte com membrana disposta e presa com anel de borracha (c).	76
FIGURA 14: Esquema representativo da montagem do sistema modificado da célula de difusão de Franz.	76
FIGURA 15: Espectro de ultravioleta da solução a 2,0% (1) e a 0,2% (2) de cloridrato de lidocaína obtido experimentalmente (a) e referência (b), com máximo em 272 nm (MOFFAT <i>et al.</i> , 2004).	81
FIGURA 16: Espectro de infravermelho do cloridrato de lidocaína (matéria-prima) obtido experimentalmente (a) e do padrão de referência (b) (THE INTERNATIONAL PHARMACOPEIA, 2008).	82

FIGURA 17: Espectro de ultravioleta da matéria-prima (a) obtido experimentalmente e referencia (b) de digluconato de clorexidina, com máximos em 232 e 253 nm (MOFFAT <i>et al.</i> , 2004).	85
FIGURA 18: Espectros de infravermelho do digluconato de clorexidina matéria-prima (a) e do padrão (b), obtidos experimentalmente.	86
FIGURA 19: Cromatograma referente à eluição de placebo contaminado com fármacos em fase móvel metanol/água/trietilamina 60:40:0,4 (a), 62:38:0,4 (b), 63:37:0,4 (c) e 65:35:0,4 (d) com pH 3,5 e fluxo de 0,8 ml/min.	89
FIGURA 20: Determinação da pureza para lidocaína (a) e clorexidina (b).	92
FIGURA 21: Especificidade do método demonstrada para a formulação completa (a); do cloridrato de lidocaína (b); do digluconato de clorexidina (c), dos componentes da matriz (d) e varredura da formulação completa (e).	93
FIGURA 22: Cromatograma referente à eluição de placebo contaminado com fármacos e os produtos de degradação <i>p</i> -cloroanilina (a) e 2,6-dimetilanilina (b).	95
FIGURA 23: Cromatogramas referente à (a) eluição de placebo contaminado com fármacos e os produtos de degradação <i>p</i> -cloroanilina e 2,6-dimetilanilina e (b) espectro de varredura.	95
FIGURA 24: Curva padrão média de cloridrato de lidocaína no 1º dia (a) e no 2º dia (b).	97
FIGURA 25: Curva padrão média de digluconato de clorexidina no 1º dia (a) e no 2º dia (b).	98
FIGURA 26: Percentual de etanol em solução <i>versus</i> tempo máximo de ausência de precipitação ou turvação de 0-75% (a) e 0-95% (b).	112
FIGURA 27: Curva de correlação da variação absorbância em função da concentração de β -CD (a) e de metil- β -CD (b) adicionadas ao meio contendo lidocaína.	116
FIGURA 28: Curva padrão em meio aquoso do incluso de cloridrato de lidocaína- β -ciclodextrina (a) e do de incluso de cloridrato de lidocaína-metil- β -ciclodextrina (b).	119
FIGURA 29: Difrátogramas do cloridrato de lidocaína (a), mistura física 1:1 (b), complexo de inclusão de lidocaína-metil- β -ciclodextrina (c) e da metil- β -ciclodextrina (d).	122
FIGURA 30: Regiões específicas do difratograma do cloridrato de lidocaína (figuras 30a e 30f), da mistura física 1:1 (figuras 30b e 30g), do incluso (figuras 30c e 30h) e da metil- β -CD (figuras 30d e 30i) em 16,7 ; 25,15 e 25,8 °2 θ .	123

FIGURA 31: Espectros de FTIR do cloridrato de lidocaína (a), mistura física 1:1 (b), complexo de inclusão de lidocaína-metil- β -ciclodextrina (c) e da metil- β -ciclodextrina (d).	125
FIGURA 32: Regiões específicas a, b, c, d, f, g, h e i dos espectros de FTIR da figura 31 evidenciando, em bandas características do cloridrato de lidocaína, a variação de amplitude para as outras amostras.	126
FIGURA 33: Espectros (a) do complexo de inclusão cloridrato de lidocaína-metil- β -ciclodextrina e (b) do cloridrato de lidocaína ambos no diluente metanol:água (63:37) pH 3,5 do método analítico desenvolvido por CLAE.	128
FIGURA 34: Cromatogramas da solução aquosa dos fármacos (solução A) antes da formação de precipitado (a), do sobrenadante após a formação do precipitado (b) e seus respectivos espectros de varredura (c) e (d).	132
FIGURA 35: Espectro de infravermelho do precipitado (Cl^- + clorexidina).	133
FIGURA 36: Reograma de viscosidade aparente <i>versus</i> taxa de cisalhamento (0,1 a 100 s^{-1}) do gel placebo aquoso (a) e do gel placebo etanólico (b).	139
FIGURA 37: Quantidade de lidocaína (a) e de clorexidina (b) liberadas ($\mu g/cm^2$) em função do tempo (h) da formulação completa.	147
FIGURA 38: Perfis de liberação da lidocaína pelos modelos cinéticos: ordem zero (a); Higuchi (b) e primeira ordem (c), utilizados para obtenção do fluxo (J) e o coeficiente de correlação (r).	151
FIGURA 39: Perfis de liberação da clorexidina pelos modelos cinéticos: ordem zero (a); Higuchi (b) e primeira ordem (c), utilizados para obtenção do fluxo (J) e o coeficiente de correlação (r).	152
FIGURA 40: Reograma de tensão de cisalhamento <i>versus</i> taxa de cisalhamento ascendente de 0,1 a 100 s^{-1} (losango) e descendente de 100 a 0,1 s^{-1} (quadrado) da formulação completa.	154
FIGURA 41: Reograma de viscosidade aparente <i>versus</i> taxa de cisalhamento (0,1 a 100 s^{-1}) da formulação completa.	155
FIGURA 42: Reograma do módulo elástico G' (losango) e módulo viscosidade G'' (quadrado) <i>versus</i> tempo com frequência fixada em 1,0 Hz e com variação do percentual de deformação de 0,1 a 400 % (a) e com variação do percentual de deformação de 0,1 a 20 % (b).	159
FIGURA 43: Reograma do módulo elástico G' (losango) e módulo viscosidade G'' (quadrado) <i>versus</i> frequência de 0,1 a 10,0 Hz, com percentual de deformação fixado em 5%.	161
FIGURA 44: : Reograma da tangente δ (G''/G') <i>versus</i> frequência de 0,1 a 10,0 Hz, com percentual de deformação fixado em 5%.	162
FIGURA 45: Reograma de viscosidade aparente <i>versus</i> tempo com taxa de cisalhamento fixada em 10,0 s^{-1} .	164

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Parâmetros físico-químicos e de algumas ciclodextrinas utilizadas em produtos farmacêuticos (LOFTSSON e DUNCHÊNE, 2007).	41
TABELA 02: Parâmetros cromatográficos e as especificações gerais avaliadas.	55
TABELA 03: Tabela do preparo das soluções para determinação da estequiometria e a determinação da constante de estabilidade do complexo formado, com a fixação da massa de lidocaína em $1,985 \times 10^{-5}$ mg..	63
TABELA 04 : Tabela de representativa dos quantitativos e qualitativos de fármacos e tipos de solventes utilizados no preparo das soluções de estabilidade	68
TABELA 05: Dados da determinação do ponto de fusão do cloridrato de lidocaína.	79
TABELA 06: Dados da determinação da solubilidade do cloridrato de lidocaína.	80
TABELA 07: Dados da determinação do teor do cloridrato de lidocaína.	83
TABELA 08: Dados da determinação da solubilidade do digluconato de clorexidina.	84
TABELA 09: Dados da determinação do teor do digluconato de clorexidina.	87
TABELA 10: Tempos de retenção dos fármacos em função da variação percentual dos componentes da fase móvel.	90
TABELA 11: Parâmetros cromatográficos e as especificações gerais definidos para o método analítico a ser validado	91
TABELA 12: Parâmetros da linearidade do método analítico	99
TABELA 13: Precisão de injeção do cromatógrafo para lidocaína e clorexidina	101
TABELA 14: Repetibilidade e precisão intermediária do método para lidocaína	102
TABELA 15: Repetibilidade e precisão intermediária do método para clorexidina	103
TABELA 16: Exatidão do método para lidocaína	104
TABELA 17: Exatidão do método para clorexidina	105
TABELA 18: Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para lidocaína	106
TABELA 19: Limite de detecção e quantificação do método para clorexidina	107
TABELA 20: Robustez para lidocaína e clorexidina em função da variação do diluente no preparo da amostra	109

TABELA 21: Parâmetros e resultados da avaliação da estabilidade das soluções dos fármacos em meio aquoso (ma) e meio etanólico (me)	130
TABELA 22: Propriedade e teor na formulação dos excipientes selecionados	135
TABELA 23: Caracterização do aspecto dos géis placebo aquoso e etanólico	136
TABELA 24: Valores de pH obtidos a partir dos géis placebo aquoso e etanólico	138
TABELA 25: Viscosidade aparente do gel placebo aquoso e etanólico em taxas de cisalhamento específicas	140
TABELA 26: Valores do índice de consistência (K) e índice de fluxo (n), obtidos a partir da aplicação do modelo da Lei das Potencias (<i>Power Law</i>), para o gel placebo aquoso e etanólico	141
TABELA 27: Determinação do teor dos fármacos na formulação ideal no tempo zero e após seis meses	144
TABELA 28: Quantidades cumulativas de cloridrato de lidocaína e digluconato de clorexidina, liberados para a solução receptora em função do tempo nos estudos de liberação <i>in vitro</i> da formulação ideal	146
TABELA 29: Determinação do fluxo (<i>J</i>) e cinética de liberação da lidocaína e clorexidina da formulação completa	153
TABELA 30: Valores do índice de consistência (K), índice de fluxo (n) e viscosidade aparente, medida no maior ponto de taxa de cisalhamento (cisalhamento contínuo de 0,1 a 100 s ⁻¹), obtidos a partir da aplicação do modelo da Lei das Potencias (<i>Power Law</i>)	158
TABELA 31: Valores do módulo G' (Pa) na região de viscoelasticidade linear de maior ocorrência utilizados na eleição do percentual de deformação para o segundo ensaio em regime de cisalhamento oscilatório	160

LISTA DE ABREVIATURAS

BHA - butilhidroxianisol

BHT - butilhidroxitolueno

CD – Ciclodextrina

CL – Cloridrato de Lidocaína

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cm – Centímetros

DC – Digluconato de Clorexidina

DP - Desvio Padrão

DPR - Desvio Padrão Relativo

FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy

h – hora

ICH – International Chemistry Harmonization

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

min - minuto

mL – mililitros

nm – nanômetros

PEG – Polietilenoglicol

RE - resolução

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SQR – Substância Química de Referência

UV – Ultravioleta

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. INDICAÇÃO CLÍNICA E DISPONIBILIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE CLOREXIDINA E LIDOCAÍNA.....	23
1.2. VIA DE ADMINISTRAÇÃO UROGENITAL.....	25
1.2.1. Uretra	26
1.2.2. A vagina	28
1.3. CLOREXIDINA.....	28
1.4. LIDOCAÍNA.....	32
1.5. ESTABILIDADE E OS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA CLOREXIDINA....	35
1.6. ESTABILIDADE E OS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA LIDOCAÍNA.....	38
1.7. ALTERNATIVAS FARMACOTÉCNICAS PARA ESTABILIZAÇÃO DA CLOREXIDINA ASSOCIADA A LIDOCAÍNA.....	39
1.7.1. Solventes alternativos para a formulação	39
1.7.2. Processo de encapsulamento de fármacos: inclusão em ciclodextrinas	40
1.7.2.1. As ciclodextrinas.....	41
1.8. EXCIPIENTES E FORMULAÇÕES MUCOADESIVOS.....	42
1.8.1. O muco cervical	44
1.8.2. Polímeros mucoadesivos	44
1.8.2.1. Derivados de celulose.....	45
1.8.2.2. PEG-15 cocopoliamina.....	46
1.9. FORMULAÇÕES UROGENITAIS.....	47
2. OBJETIVOS	49
2.1 OBJETIVO GERAL.....	49
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
3. MATERIAL E MÉTODOS	50

3.1. MATERIAL.....	50
3.1.1.Excipientes e fármacos.....	50
3.2. EQUIPAMENTOS.....	51
3.3. MÉTODOS.....	51
3.3.1. Análise dos fármacos.....	51
3.3.1.1. Aspecto.....	51
3.3.1.2. Faixa de ponto de fusão.....	52
3.3.1.3. Solubilidade.....	52
3.3.1.4. Densidade relativa.....	52
3.3.1.5. Espectrofotometria de ultravioleta.....	53
3.3.1.6. Espectrofotometria no infravermelho.....	53
3.3.1.7. Quantificação dos fármacos.....	53
3.3.2. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por CLAE para quantificação do cloridrato de lidocaína e do digluconato de clorexidina nas formulações.....	54
3.3.2.1. Desenvolvimento da metodologia analítica.....	54
3.3.2.1.1. Preparo das amostras.....	56
3.3.2.2. Validação da metodologia analítica.....	56
3.3.2.2.1. Determinação da especificidade.....	57
3.3.2.2.2. Determinação da linearidade.	57
3.3.2.2.3. Determinação da precisão.....	57
3.3.2.2.4. Determinação da exatidão.	58
3.3.2.2.5. Determinação do limite de quantificação (LQ) e de detecção (LD).....	58
3.3.2.2.6. Determinação da robustez.....	59
3.3.3. Desenvolvimento da formulação com os fármacos associados.....	59
3.3.3.1. Determinação da compatibilidade de cloridrato de lidocaína com digluconato de clorexidina em meio aquoso e meio etanólico.....	59

3.3.3.1.1. Preparo da mistura de solventes com diferentes concentrações de etanol.....	60
3.3.3.1.2. Preparo das soluções com os fármacos em diferentes meios.....	60
3.3.3.2. Obtenção e caracterização de inclusos de cloridrato de lidocaína em ciclodextrinas.....	61
3.3.3.2.1. Obtenção de incluso de cloridrato de lidocaína em β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina.....	61
3.3.3.2.2. Caracterização do incluso.....	62
3.3.3.2.2.1. Determinação da constante de estabilidade do incluso em meio aquoso.....	62
3.3.3.2.2.2. Solubilidade do incluso em meio aquoso.....	64
3.3.3.2.2.3. Difractometria de raios X.	64
3.3.3.2.2.4. Espectrofotometria de infravermelho.....	65
3.3.3.2.2.5. Determinação do teor do cloridrato de lidocaína no complexo de inclusão.....	66
3.3.3.3. Determinação da compatibilidade do incluso de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina (1:1) com digluconato de clorexidina em meio aquoso.....	66
3.3.3.3.1. Preparo das soluções de cloridrato de lidocaína incluso e digluconato de clorexidina em meio aquoso.	66
3.3.3.4. Avaliação de estabilidade da associação nas soluções obtidas.....	67
3.3.3.4.1. Preparo das soluções.....	67
3.3.3.4.2. Testes de avaliação da estabilidade.....	68
3.3.3.4.2.1. Teste de presença ou ausência de turvação.....	68
3.3.3.4.2.2. Teste de presença ou ausência de precipitação.....	69
3.3.3.4.2.3. Determinação do teor dos fármacos.....	69
3.3.3.4.3. Frequência dos testes de avaliação da estabilidade.....	69
3.3.3.5. Desenvolvimento das matrizes compatíveis com os fármacos em meio aquoso e meio etanólico.....	69
3.3.3.5.1. Seleção dos excipientes.....	69
3.3.3.5.2. Preparo dos géis placebos.....	70

3.3.3.5.2.1. Preparo do gel placebo aquoso.....	70
3.3.3.5.2.2. Preparo do gel placebo etanólico.....	71
3.3.3.5.3. Caracterização dos géis placebos.....	71
3.3.3.5.3.1. Aspecto.	71
3.3.3.5.3.2. Determinação do pH.....	71
3.3.3.5.3.3. Determinação da viscosidade.....	72
3.3.3.6. Preparo do gel aquoso de cloridrato de lidocaína incluso em metil- β -ciclodextrina e digluconato de clorexidina.....	72
3.3.4. Caracterização da formulação ideal.....	72
3.3.4.1. Determinação do pH.....	73
3.3.4.2. Determinação da estabilidade.....	73
3.3.4.3. Estudos de liberação <i>in vitro</i>	74
3.3.4.3.1. Preparo da membrana sintética de acetato de celulose.....	74
3.3.4.3.2. Escolha e preparo do meio receptor.....	75
3.3.4.3.3. Montagem do sistema modificado da célula de difusão de Franz.....	75
3.3.4.3.4. Determinação da quantidade de fármacos liberados.....	77
3.3.4.3.5. Estudo de cinética e análise do fluxo de liberação <i>in vitro</i>	77
3.3.4.4. Estudo reológico.....	78
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.1. ANÁLISE DOS FÁRMACOS.....	79
4.1.1. Cloridrato de lidocaína.....	79
4.1.1.1. Aspecto.....	79
4.1.1.2. Faixa de ponto de fusão.....	79
4.1.1.3. Solubilidade.....	80
4.1.1.4. Espectrofotometria de ultravioleta.	80
4.1.1.5. Espectrofotometria no infravermelho.	82
4.1.1.6. Quantificação do fármaco.....	83

4.1.2. Digluconato de clorexidina.....	84
4.1.2.1. Aspecto.....	84
4.1.2.2. Densidade relativa.....	84
4.1.2.3. Solubilidade.....	84
4.1.2.4. Espectrofotometria de ultravioleta.....	85
4.1.2.5. Espectrofotometria no infravermelho.....	86
4.1.2.6. Quantificação do fármaco.....	87
4.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALITICA POR CLAE PARA QUANTIFCAÇÃO DO CLORIDRATO DE LIDOCAÍNA E DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NAS FORMULAÇÕES.....	88
4.2.1. Desenvolvimento da metodologia analítica.....	88
4.2.1.1. Determinação das condições ótimas quanto ao percentual dos constituintes da fase móvel e do diluente.....	88
4.2.2. Validação da metodologia analítica.....	92
4.2.2.1. Determinação da especificidade.	92
4.2.2.1.1. Determinação da especificidade para os fármacos na presença da matriz da formulação.....	92
4.2.2.1.2. Determinação da especificidade para os fármacos na presença da matriz da formulação e dos produtos de degradação.....	94
4.2.2.2. Determinação da linearidade.....	96
4.2.2.3. Determinação da precisão.....	99
4.2.2.4. Determinação da exatidão.....	104
4.2.2.5. Determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	105
4.2.2.6. Determinação da robustez.....	108
4.3. DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO COM OS FÁRMACOS ASSOCIADOS.....	110
4.3.1. Determinação da compatibilidade dos fármacos em meio aquoso e meio etanólico.....	110
4.3.2. Obtenção e caracterização de inclusos de cloridrato de lidocaína em ciclodextrinas.....	114

4.3.2.1. Obtenção de incluso de cloridrato de lidocaína em ciclodextrinas – inclusão por empastamento (Kneading).	114
4.3.2.2. Caracterização dos complexos de inclusão.....	115
4.3.2.2.1. Determinação da constante de estabilidade da inclusão de cloridrato de lidocaína em ciclodextrinas.....	115
4.3.2.2.2. Solubilidade em meio aquoso do incluso de cloridrato de lidocaína em β -ciclodextrina e em β -ciclodextrina.....	118
4.3.2.2.3. Caracterização do incluso de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina por difratometria de raios X.....	121
4.3.2.2.4. Caracterização do incluso de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina por espectrometria de infravermelho.	124
4.3.2.2.5. Determinação do teor do cloridrato de lidocaína no complexo de inclusão em metil- β -ciclodextrina.....	127
4.3.3. Determinação da compatibilidade do incluso de cloridrato de lidocaína em metil-β-ciclodextrina (1:1) com digluconato de clorexidina em meio aquoso.	129
4.3.4. Avaliação de estabilidade das soluções em meio aquoso.....	130
4.3.5. Idealização das novas formulações gel da associação lidocaína e clorexidina.....	134
4.3.5.1. Seleção dos excipientes.	134
4.3.5.3. Caracterização dos géis placebos.	135
4.3.5.3.1. Aspecto.....	136
4.3.5.3.2. Determinação do pH.	137
4.3.5.3.3. Determinação da viscosidade.....	138
4.4. CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO IDEAL.....	142
4.4.1. Determinação do pH.....	142
4.4.2. Determinação da estabilidade.....	143
4.4.3. Estudos de liberação <i>in vitro</i>.....	144
4.4.3.1. Avaliação da liberação <i>in vitro</i> dos fármacos.....	144
4.4.3.2 Estudo de cinética e análise do fluxo de liberação <i>in vitro</i>	150

4.4.4. Estudo Reológico.....	154
5. CONCLUSÕES.....	166
6. REFERÊNCIAS.....	167

1. INTRODUÇÃO

1.1. INDICAÇÃO CLÍNICA E DISPONIBILIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE CLOREXIDINA E LIDOCAÍNA

No mercado brasileiro é vasta a disponibilidade de fármacos e formulações orais que contenham agentes antimicrobianos, nas mais diversas apresentações, para atender a necessidade de tratamento ou prevenção de infecções específicas e não específicas. Esta situação permite que o profissional de saúde responsável pela prescrição decida por qual medicamento optar para terapia em questão, visto que, devido à existência de inúmeros agentes etiológicos, a especificidade do tratamento deve ser determinada por um diagnóstico adequado, onde este último é de crucial importância. A via oral é a de primeira escolha para tal terapia, mesmo aquelas caracterizadas como infecções superficiais, devido ser a via de maior adesão do paciente, seja por comodidade na administração, pelo menor tempo que deve ser dedicado à administração do medicamento e, finalmente, pela grande disponibilidade de medicamentos já mencionada (BRASIL, 2008).

Estes medicamentos administrados por via oral expõem o paciente em tratamento a possíveis reações adversas sistêmicas e interações na utilização concomitante de outros medicamentos. Por outro lado, uma via que permitisse a aplicação do medicamento diretamente no sítio de ação se tornaria mais vantajosa. Além disso, o metabolismo hepático é um fator limitante da biodisponibilidade dos fármacos absorvidos pela via gastrintestinal. Formulações capazes de serem utilizadas diretamente no local de ocorrência da infecção são interessantes por solucionar problemas de estabilidade e biodisponibilidade. As infecções urogenitais são exemplos de doenças localizadas e superficiais que podem ser tratadas ou prevenidas, medicamentos de aplicação e ação local (NEVES e BAHIA, 2006).

Nos Estados Unidos da América está disponível um gel mucoadesivo contendo a clorexidina 0,5 % indicado para tratamento de infecções vaginais, o Clomirex®. O espectro de ação da formulação apresentou bons resultados no

tratamento de infecções de origem bacteriológica e fúngica, sem apresentar efeitos adversos restritivos ao uso durante um estudo de tolerância e eficácia que foi realizado com este produto em 60 mulheres (MOLTENI *et al.*, 2004). Esta formulação demonstra a aplicabilidade da clorexidina como agente antimicrobiano de largo espectro, onde a concepção de uma formulação que consiga garantir uma aplicação homogênea e que se mantenha aderida à mucosa por tempo suficiente para permitir a liberação do fármaco no local e na quantidade necessária, atingindo assim a eficácia de sua ação anti-séptica, é o ponto-chave em questão.

Além disso, a automedicação no tratamento de infecções superficiais e oportunistas, sem a consulta de um profissional da saúde capacitado para um diagnóstico mais preciso e adequado, torna necessária e incessante a busca por novos fármacos e formulações que permitam contornar a resistência microbiana aos antibióticos mais utilizados. Esta situação foi evidenciada pelo aumento da ocorrência de infecções fúngicas vaginais, causadas por micro-organismos resistentes devido ao autodiagnóstico e seu conseqüente tratamento errôneo (DUN, 1999).

As infecções superficiais que eventualmente acometem a mucosa vaginal, sejam por procedimento clínico investigativo, por procedimento operatório ou pela prática sexual, podem ser prevenidas pela utilização de formulações contendo anti-sépticos locais. Nos casos específicos de procedimento clínico investigativo, operatório ou mesmo em situações de parto espontâneo tem no uso de uma formulação que contenha um anestésico local a chave para reduzir a dor experimentada pela sensibilização das células do sistema nervoso periférico localizadas abaixo do epitélio vaginal (BRADSLEY, 2006).

A aplicação de um gel contendo lidocaína é uma opção promissora frente à administração de analgésico via parenteral como pode ser visto nos casos que se seguem. A aplicação na vulva de gel de lidocaína a 2% foi associada a um decréscimo da percepção de dor vaginal resultante do pós-parto espontâneo (COLLINS *et al.*, 1994). Outra aplicação deste gel de lidocaína a 2% já foi descrita na redução da dor pós-parto após a intervenção cirúrgica pelo corte do períneo para facilitar o parto, onde os resultados sugerem uma efetiva redução da dor no segundo

dia do pós-parto. Estudos desta utilização são importantes, pois a dor no períneo é uma das complicações maternas de maior ocorrência no período imediato do pós-parto (CORKILL *et al.*, 2001).

A formulação contendo os fármacos clorexidina 0,25% e lidocaína 2% (lignocaína) na forma de gel lubrificante estéril, indicado para o procedimento de cateterismo em homens e mulheres, está disponível no Reino Unido com o nome comercial de Instillagel®. Sua utilização no diagnóstico por cateterismo do estreitamento anormal que pode ocorrer na uretra é importante quando o paciente requer uma lubrificação extra para a passagem do cateter e o efeito anestésico para dar maior conforto ao mesmo durante o procedimento. Um efeito antibiótico adicional desta formulação se deve a presença da clorexidina (DOHERTY, 1999).

Uma associação destes dois fármacos que possua estabilidade física e química adequada em uma formulação de uso tópico que permita a manutenção de condições assépticas, a redução da dor e ação lubrificante na mucosa urogenital e que tenha uma permanência no local de aplicação suficiente para permitir a ação dos fármacos de maneira eficaz, permitindo a redução da dosagem dos fármacos utilizados, é um desafio farmacotécnico a ser vencido através da associação de excipientes adequados.

1.2. VIA DE ADMINISTRAÇÃO UROGENITAL

A maior vantagem da administração de medicamentos pela via urogenital sobre a oral é se evitar a absorção gastrointestinal e o efeito de primeira passagem hepático. Absorção pelo trato gastrointestinal pode ser imprevisível e comprometida por vômito, interação medicamentosa ou diminuição da capacidade de absorção intestinal, embora o lúmen gastrointestinal e o fígado sejam sítios de eliminação para muitos compostos (ROWLAND e TOWZER, 1995). Minimizar o efeito de primeira passagem hepático é particularmente vantajoso para compostos que sofrem um alto grau de metabolismo hepático. Por exemplo, estrogênios naturais são 95% metabolizados pelo fígado quando administrados por via oral. A via urogenital oferece algumas vantagens em relação à via oral, tais como o uso de dosagem

reduzida, menor exposição sistêmica, menor incidência de efeitos colaterais e a capacidade de atingir o mesmo efeito farmacodinâmico (ALEXANDER *et al.*, 2004).

Evitar as flutuações plasmáticas da administração diária de medicamentos pode também diminuir a incidência de efeitos colaterais e aumentar a eficácia. Diminuir a incidência de efeitos colaterais irá aumentar a aceitação de um produto e assim aumentar a adesão do paciente ao tratamento (ALEXANDER *et al.*, 2004).

Durante as últimas três décadas, uma atenção considerável tem sido direcionada ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos fornecendo uma concentração de medicamento para uma terapia de longa duração, utilizando uma dose única (VALENTA, 2005).

Novos sistemas de liberação de fármacos, baseados em sistemas de géis aquosos, já disponíveis no mercado. Muitos sistemas de liberação de fármacos são baseados nos chamados polímeros mucoadesivos. Conseqüentemente, a eficácia terapêutica de medicamentos de ação local pode ser melhorada pelo aumento da disponibilidade destes no tecido alvo (RICHARDSON e TREVOR, 1999; GENC, OGUZLAR e GÜLER, 2000; ELSON *et al.*, 2000; MANDAL, 2000; VALENTA *et al.*, 2001; VALENTA *et al.*, 2002; KAST *et al.*, 2002).

A administração de medicamentos pela via urogenital também permite a realização de terapia seletiva para uma região, isto é, produz pouca ou nenhuma ação sistêmica pela exposição ao medicamento em nível local (ROWLAND e TOWZER, 1995).

1.2.1. Uretra

A uretra masculina mede aproximadamente de 18 a 20 centímetros de comprimento e, assim como no canal feminino, é revestida por epitélio de transição e em uma pequena área por epitélio escamoso nas proximidades do canal uretral externo.

A uretra feminina tem o comprimento aproximado de 4 centímetros e é revestida principalmente por epitélio de transição e por epitélio escamoso na região mais próxima ao canal. A lâmina própria está em contato direto com o epitélio e contém uma rica rede vascular de vasos sanguíneos que é influenciada pelos estrogênios circulantes, o que faz com que esta camada seja elástica. Esta elasticidade é a característica que permite que o cateter atravesse a uretra durante o cateterismo. A Figura 1 apresenta a anatomia da uretra masculina e feminina. A urina é transportada via uretra para fora do corpo e apresenta uma variação de pH de 4,6 a 8,0, tanto no homem quanto na mulher (HARRIS *et al.*, 2005).

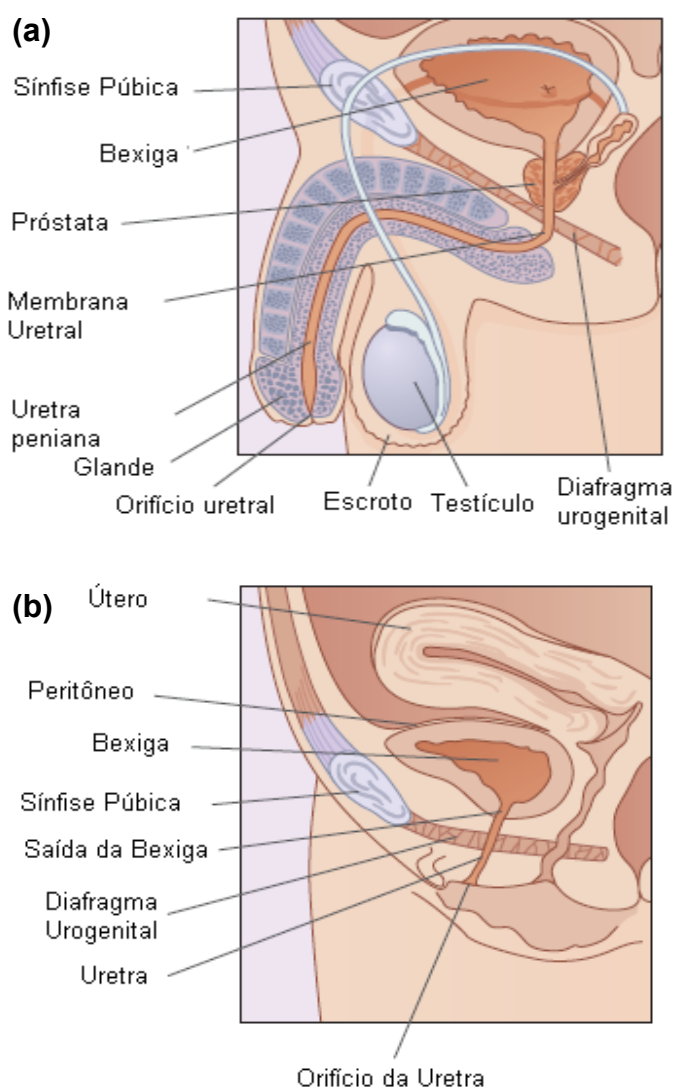


Figura 01: Anatomia do sistema urinário masculino (a) e feminino (b) (BRADSLEY, 2006).

1.2.2. A vagina

A anatomia da vagina é apresentada na Figura 2. A sua histologia é demonstrada através de quatro camadas distintas, onde o epitélio escamoso estratificado não-secretor forma a camada superficial. A próxima é a lamina própria ou túnica composta por colágeno e elastina, o qual contém um suprimento rico de canais vasculares e linfáticos. A camada muscular é a terceira, com fibras de músculo liso dispostas nas direções longitudinal e circular. A última camada consiste de tecido conjuntivo areolar e uma extensa rede de vasos sanguíneos. O tecido vaginal não possui células adiposas, glândulas ou folículos capilares. As secreções da parede da vagina são transudatos, produzidos pelo conteúdo da rede vascular que circunda a vagina (ALEXANDER *et al.*, 2004). O pH normal em mulheres saudáveis em idade reprodutiva é de 3,8 a 4,5 (VALENTA, 2005).

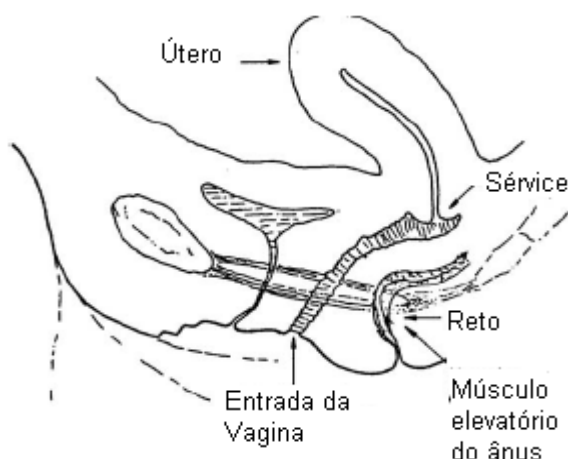


Figura 02: Anatomia do sistema reprodutor feminino (VALENTA, 2005)

1.3. CLOREXIDINA

A clorexidina (Figura 3) é uma bisbiguanida de ação antisséptica e desinfetante. Mais especificamente possui ação bacteriostática e bactericida contra uma vasta gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo mais efetiva contra bactérias Gram-positivas, algumas espécies de *Pseudomonas* e *Proteus*,

onde estas possuem uma baixa susceptibilidade. Entretanto, é ineficaz contra micobactérias (SWEETMAN, 1999).

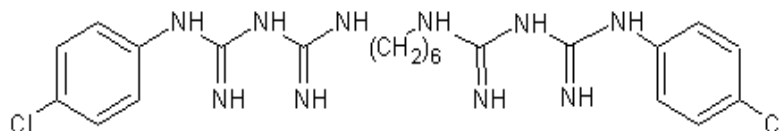


Figura 03. Estrutura química da clorexidina.

Na compreensão do mecanismo de ação de uma substância química antisséptica e desinfetante sobre os micro-organismos deve ser levada em consideração a característica do mecanismo de ação, também chamado de estágio primário, e a consequência do mecanismo de ação, chamado estágio secundário (MARIS, 1995). Alguns dos alvos destas moléculas estão descritos na Figura 4.

As propriedades antimicrobianas da clorexidina são atribuídas a sua estrutura bicatiônica (MOSHREFI, 2002). Devido à carga catiônica, esta interage com a membrana citoplasmática, (lipopolissacarídeos) alterando o potencial de membrana, e causando assim a sua ruptura (KUYAKANOND e QUESNEL, 1992).

A interrupção de etapas ácidas da glicólise, pela sua interação com metabólitos intermediários desta via e a indisponibilização dos mesmos, foi caracterizada no estudo em cepas de *Streptococcus mutans* NCIB 11723 (IWAMI, SCHACHTELE e YAMADA, 1995). A ligação da clorexidina à superfície da membrana externa das bactérias altera a conformação estrutural desta e reduz a sua aderência às superfícies de ancoragem (GRENIER, 1996), prejudicando o processo de colonização. Estes três fatos caracterizam o estágio primário do mecanismo de ação da clorexidina.

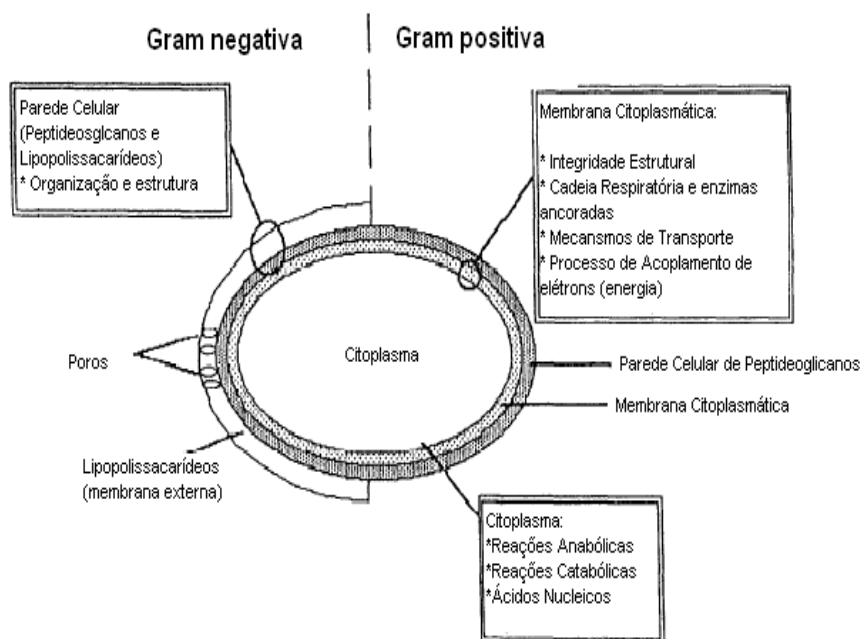


Figura 04. Alvos da ação de antimicrobianos nas células bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas (DENYER e STWART, 1998).

Desta maneira, o estágio secundário dos mecanismos de ação apresentados consistem na perda de conteúdo citoplasmático, na interrupção do processo de obtenção de energia pela via glicolítica e na interrupção do processo de colonização, respectivamente.

A carga catiônica desta molécula também é responsável pela sua incompatibilidade com compostos e tensoativos aniônicos, que provocam a redução de sua atividade em solução ou mesmo a sua precipitação. Agentes suspensores, tais como alginatos e a goma adraganta, e compostos insolúveis, como os sais de cálcio, zinco e magnésio, provocam a precipitação da clorexidina em meio aquoso (SWEETMAN, 1999), torna-se assim questionável a compatibilidade deste bactericida com o cloridrato de lidocaína, caso do Instillagel®.

A clorexidina está disponível comercialmente na forma de acetato, cloridrato e digluconato que diferem entre si em função de sua solubilidade e ponto de fusão, dentre outras características físico-químicas (SWEETMAN, 1999).

O digluconato de clorexidina apresenta as características físico-químicas que permitem a sua solubilização na matriz da formulação pretendida e nos fluídos das cavidades urogenitais. Este está disponível no mercado na forma de uma solução aquosa contendo de 19 a 21% , incolor ou levemente acastanhado e fotossentível. Trata-se de um líquido miscível em água, etanol (1:5) e acetona (1:3). A clorexidina é uma base fraca, possui valor de constante de dissociação (pKa) a 25 °C de 10,8 e seu coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) é 0,1 (MOFFAT *et al.*, 2004).

Sendo um tensoativo catiônico, a sua toxicidade está ligada a interação desta molécula com as superfícies mucosas alterando a estabilidade das membranas fosfolipídicas e a interação iônica com os resíduos de ácido siálico presentes na maioria das células. Algumas reações tóxicas foram descritas, tais como na sua aplicação em altas concentrações sobre a conjuntiva e outros tecidos sensíveis, a partir da ingestão provocando irritação da mucosa gástrica, após a administração intravenosa acidental ocasionando hemólise, na aplicação tópica levando a ocorrência de reações de hipersensibilidade severas (choque anafilático) e da aplicação em aerosol alcoólico provocando asma ocupacional (SWEETMAN, 1999).

As indicações clínicas da clorexidina demonstram que sua utilização é baseada em formulações tópicas, de uso em superfícies externas ou em cavidades, líquidas ou semissólidas e já havendo o desenvolvimento de formulações sólidas de uso oral para o tratamento de infecções bucais (IRWIN, 2003). As formulações líquidas tratam-se de soluções aquosas, variando a concentração e o uso das mesmas: 0,01% (p/v) em conservantes de colírios, 0,02 % (p/v) na irrigação da bexiga ou tratamento de infecções do trato urinários, 0,05 % (p/v) na assepsia e tratamento de desordens cutâneas e a 0,25% (p/v) na desinfecção do canal de parto. No tratamento da placa bacteriana bucal, gengivite e da candidíase oral existem tanto soluções aquosas a 0,1 e 0,2%, quanto gel dental a 1,0%. Em formulações semissólidas, existe a 0,25% associada ao cloridrato de lidocaína no cateterismo e na cistoscopia e em gel bioadesivo a 0,5% utilizado no tratamento de infecções vaginais (SWEETMAN, 1999; MOLTENI *et al.*, 2004)

Atualmente são poucas as formulações disponíveis no mercado brasileiro contendo a clorexidina. O digluconato de clorexidina está disponível em dois

medicamentos de dosagens diferentes de uma solução tópica e um sabonete líquido.

1.4. LIDOCAÍNA

Anestésicos locais são agentes que bloqueiam reversivelmente a geração de impulsos através da fibra nervosa. São utilizados para abolir a sensação de dor em regiões restritas do corpo. Sua ação resulta de sua capacidade de deprimir os impulsos oriundos de nervos aferentes da pele, superfícies de mucosas e músculos ao sistema nervoso central (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1988).

A lidocaína (Figura 5) é uma amina terciária ligada a um anel aromático por uma cadeia intermediária, onde esta última contém um grupamento amida. Esta é classificada na categoria terapêutica como anestésico local tipo amida e antiarrítmico classe Ib. Também conhecida como lignocaína, pode ser utilizada em uma variedade de formulações para anestesia superficial. Géis contendo este fármaco são utilizados para anestesia do trato urinário e a dose utilizada varia em diferentes países (SWEETMAN, 1999).

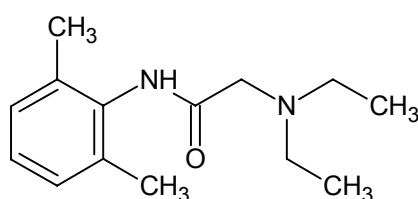


Figura 05: Estrutura química da lidocaína.

A ação da lidocaína como anestésico local ocorre pelo bloqueio da propagação do potencial de ação que promove a transmissão do impulso nos nervos periféricos (nociceptores), conforme a Figura 6.

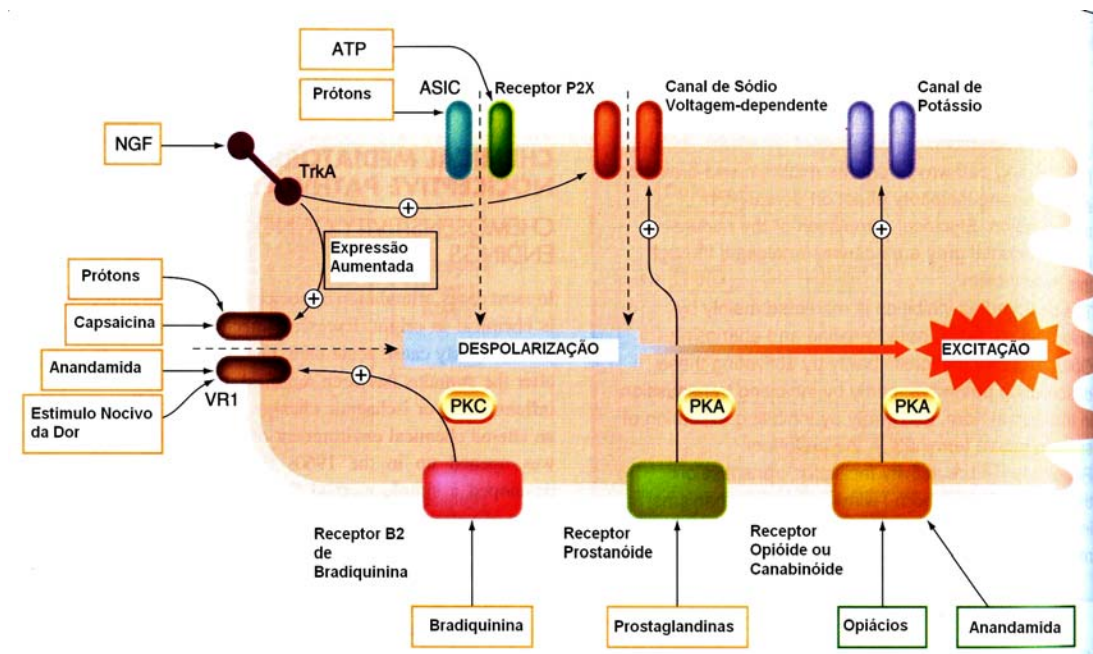


Figura 06: Estrutura do nociceptor (RANG *et al.*, 2003).

Este bloqueio se dá pela ligação deste fármaco aos canais de Na^+ (sódio) quando estão abertos e inativos, o que ocorre na despolarização da membrana das células do sistema nervoso (YANAGIDATE e STRICHARTZ, 2007).

Estes canais de Na^+ são proteínas transmembranares responsáveis pela fase de excitação do potencial de ação nas membranas, conforme a Figura 7 (NAU e WANG, 2004). A análise da influência deste anestésico local na estrutura e na função dos canais de Na^+ demonstrou que em determinadas concentrações este fármaco na forma não iônica inibe o transporte iônico e desestabiliza a estrutura do canal, efeito este não apresentado por sua forma catiônica na mesma situação (STEPHEN e PHILIP, 1982).

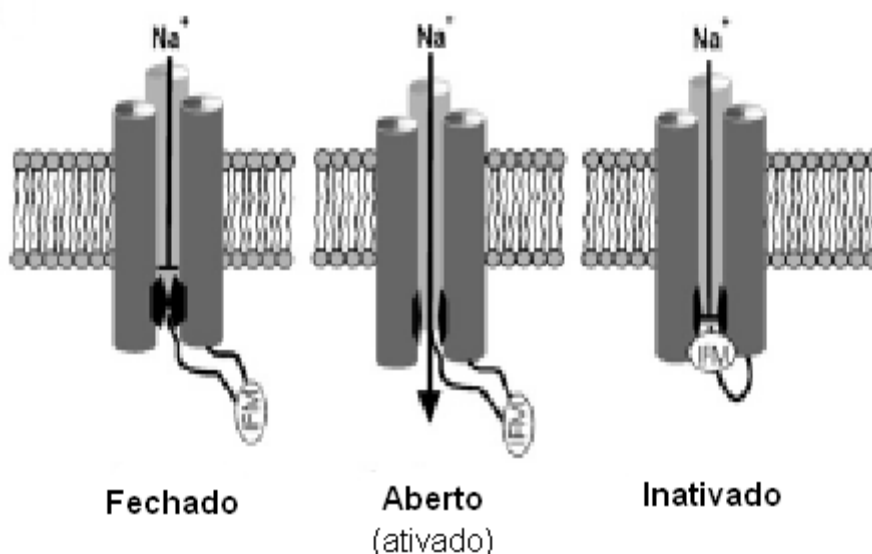


Figura 07: Canal de sódio e seus estados durante a propagação do impulso nervoso (CUMMINS, SHEETS e WAXMAN, 2007).

A lidocaína é o mais estável dos anestésicos locais conhecidos, mostrando-se extremamente resistente à hidrólise (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1988).

O cloridrato de lidocaína é o único sal derivado deste fármaco disponível (SWEETMAN, 1999) e apresenta as características físico-químicas compatíveis com a ação pretendida, devido a sua solubilidade nos fluidos corpóreos e sua capacidade de penetrar em mucosas para atingir o seu local específico de ação no nociceptor. Este sal trata-se de um pó cristalino branco que apresenta faixa de fusão entre 77 e 78 °C, solúvel em água (1:0,7), etanol (1:1,5), pouco solúvel em clorofórmio (1:40) e praticamente insolúvel em éter. Esta base fraca possui valor de constante de dissociação (pKa) a 25 °C de 7,9 e seu coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) é 2,4 (MOFFAT *et al.*, 2004).

A lidocaína apresenta incompatibilidade quando presente em soluções aquosas contendo anfotericina, sulfadiazina sódica, cefalozina sódica, e fenitoína sódica e clorexidina, culminando na redução de sua atividade. O armazenamento da solução aquosa deste fármaco em recipientes compostos por cloreto de polivinila a temperatura ambiente demonstraram a capacidade deste polímero em absorvê-lo, provocando a redução da atividade do mesmo (SWEETMAN, 1999).

A toxicidade da lidocaína foi verificada na administração de soluções aquosas injetáveis em concentrações superiores a 6 mg/L e efeitos fatais em concentrações superiores a 14 mg/L. Suspeitas de reações psicóticas da administração deste fármaco no tratamento de distúrbios cardíacos devido ao fato de ser classificado também como um antiarrítmico e a ocorrência de eritema decorrente da infiltração dentária quando da aplicação tópica labial já foram verificadas (SWEETMAN, 1999).

As indicações clínicas de lidocaína demonstram que a sua concentração percentual de utilização em formulações varia de 0,5 a 2,0% em formulações líquidas ou semissólidas associada ou não a outros fármacos (SWEETMAN, 1999). Por outro lado, outra referência apresenta o uso da lidocaína ou seu sal derivado em concentrações que variam numa faixa mais ampla, de 0,32 a 10%, sendo que as formulações injetáveis estão disponíveis em uma concentração de até 2% e nas tópicas de até 10% (BRASIL, 2009). Estas formulações têm como objetivo a anestesia por via intravenosa ou tópica local. A sua utilização sobre algumas mucosas, tais como a da pele, boca, garganta, trato gastrintestinal e da bexiga, mostra a sua capacidade anestésica sobre este tipo de tecido. Uma formulação de uso similar ao Instillagel[®], um gel a 2% tem sido utilizado no cateterismo e na cistoscopia, ambos os procedimentos executados no trato urinário, e na redução da dor vulvar após parto natural (COLLINS *et al.*, 1994).

Estão disponíveis no mercado brasileiro algumas formulações contendo a lidocaína (base livre) e o cloridrato de lidocaína tanto como único fármaco quanto em associações com outros fármacos. Está presente nas mais diversas formas farmacêuticas, tais como creme dermatológico, solução tópica, disco adesivo, solução injetável, gel, entre outros. Não está disponível nenhuma formulação similar em composição a que está sendo proposta neste trabalho.

1.5. ESTABILIDADE E OS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA CLOREXIDINA

A clorexidina é uma molécula susceptível a hidrólise e gera produtos de degradação já conhecidos e determinados por vários métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os produtos de degradação por hidrólise são a *p*-

cloroanilina e a *p*-clorofenilbiguanidina, além da fenilbiguanida como o produto de degradação fotolítica (HA e CHEUNG, 1996).

O grupamento biguanido é o sítio sensível à hidrólise na molécula de clorexidina. Elpern (1968) propôs que a biguanida, em solução ácida, era hidrolisada a guaniluréia e uma amina, conforme apresentado na Figura 8. Essa hidrólise provavelmente envolve a hidratação e a subsequente clivagem da ligação dupla C(2)=N(3) na estrutura B para formar guanidina e uréia (SIDGWICK, 1966).

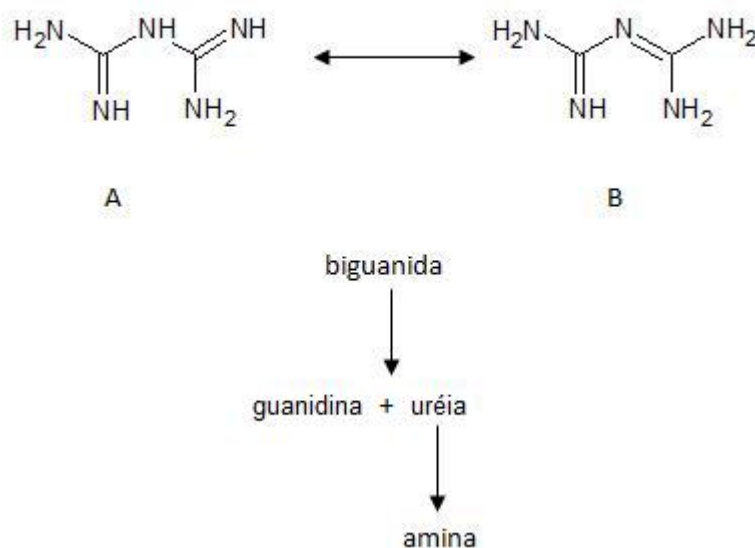


Figura 08. Estruturas tautoméricas da biguanida e seu esquema de hidrólise proposto (HA e CHEUNG, 1996).

Conforme a figura 9, a hidrólise da clorexidina se dá preferencialmente pelas vias B e C, gerando um total de 12 produtos de hidrólise (II – XIII) (HA e CHEU, 1996).

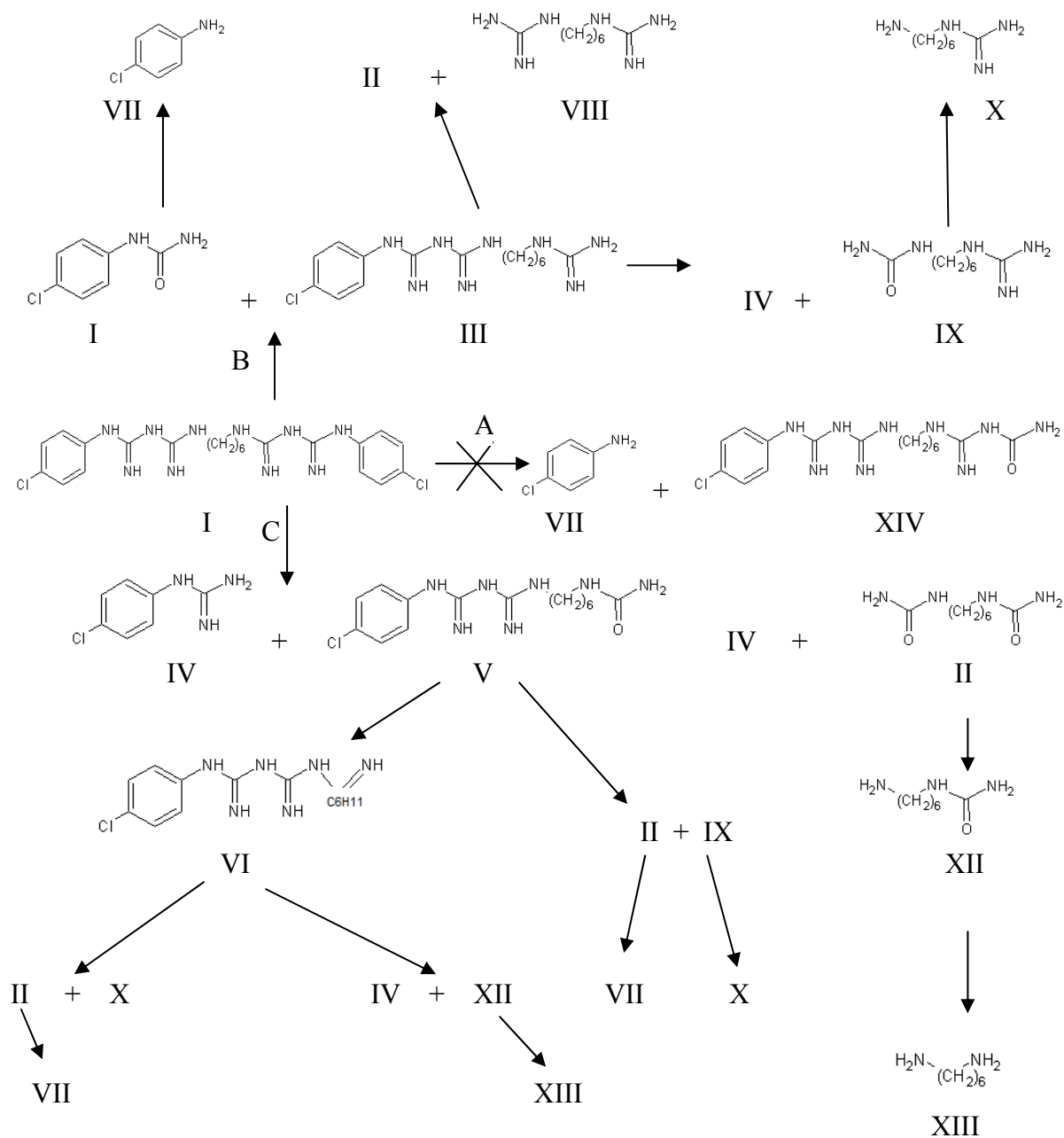


Figura 09. Vias hidrolíticas propostas para a clorexidina em solução aquosa. (HA e CHEUNG, 1996).

Soluções aquosas diluídas são estáveis à temperatura ambiente. O cromatograma de uma solução preparada há um ano atrás apresenta o mesmo perfil cromatográfico de uma solução recém preparada (HA e CHEUNG, 1996).

O produto de degradação utilizado na determinação da estabilidade da clorexidina em formulações é a p-cloroanilina (XU e WONG, 1999; BASRANI *et al.*, 2007; BRITH. PHARM., 2008; RASIMICK *et al.*, 2008)

1.6. ESTABILIDADE E OS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA LIDOCAÍNA

Estudos analisando a estabilidade da lidocaína em soluções parenterais demonstram a sua estabilidade em solução aquosa e a sua alta resistência à hidrólise em temperatura ambiente, mesmo em meio fortemente ácido ou básico. Entretanto, sob altas temperaturas a lidocaína sofre degradação lenta para formar inicialmente 2,6-dimetilanilina e ácido N,N-dietilaminoacético (BULLOCK e GRUNDY, 1955). Na Figura 10 está apresentada a reação de degradação proposta da lidocaína.

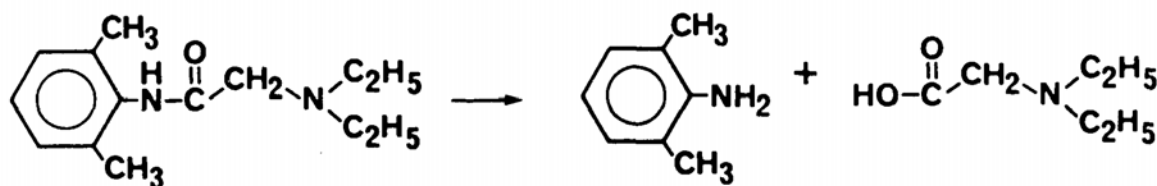


Figura 10: Esquema da degradação da lidocaína sobre altas temperaturas (POWELL, 1987).

Vários experimentos demonstraram que a reação de degradação segue uma cinética de primeira ordem e a dependência do pH na degradação da lidocaína segue um padrão específico. Estes experimentos demonstraram que a 80 ou 100 °C os valores da constante de degradação, calculada através da equação de primeira ordem proposta, são os menores entre os valores de pH de 2,3 a 5,8. A estabilidade máxima para lidocaína à temperatura de 25 °C foi observada quando a solução estava com valor de pH na faixa de 3 a 6. Sob a temperatura de 145 °C, a estabilidade da lidocaína demonstrou-se independente do pH, quando variado de 2 a

12, e apresentou uma estabilidade de prateleira de aproximadamente 12h (POWELL, 1987).

A adição de propilenoglicol à solução aquosa de cloridrato de lidocaína gerou um leve aumento sobre a degradação deste fármaco. Quanto à presença de íons metálicos na solução, Fe e Cu foram aqueles com os quais se observou o maior aumento da taxa de degradação da lidocaína (POWELL, 1987).

A maior estabilidade da lidocaína em solução aquosa ocorreu na faixa de pH de 3 a 6, nas várias temperaturas as quais estas soluções foram submetidas. Esse fato é um indicativo da viabilidade da utilização do fármaco em uma formulação ólida mucoadesiva a ser administrada no pH fisiológico urogenital.

O produto de degradação utilizado na determinação da estabilidade da lidocaína em formulações é a 2,6-dimetilanilina (POWELL, 1987; F. BRAS. IV, 1988; XU e WONG, 1999; BRITH. PHARM., 2008)

1.7. ALTERNATIVAS FARMACOTÉCNICAS PARA ESTABILIZAÇÃO DA CLOREXIDINA ASSOCIADA A LIDOCAÍNA

A busca por alternativas farmacotécnicas que permitam a associação de fármacos de atividades complementares na terapêutica ou prevenção de doenças e que apresentam incompatibilidade nos sistemas de veiculação mais comumente utilizados é de suma importância na evolução da tecnologia farmacêutica.

Diferentes alternativas podem ser propostas para este fim, dentre elas podemos citar:

1.7.1. Solventes alternativos para a formulação

A ocorrência de incompatibilidade em meio aquoso torna esta busca mais difícil quando se pretende a obtenção de forma farmacêutica semissólida ou líquida, principalmente devido ao fato de que a veiculação de fármacos nesse solvente torna

maior a sua aplicabilidade pela baixa interferência deste nos sistemas fisiológicos e pela biodisponibilidade da maioria dos fármacos serem amplamente estudada e considerada satisfatória a partir de sistemas que contenham a água como único ou solvente principal (SWEETMAN, 1999; MOFFAT *et al.*, 2004).

A avaliação dos solventes ou sistemas de solventes em que ambos os fármacos apresentam solubilidades adequadas nas concentrações que se pretende utilizar na formulação a ser proposta é a primeira alternativa estudada. Dos solventes descritos por MOFFAT e colaboradores (2004) em que diferentes fármacos são solúveis, o etanol se destaca como sendo o mais viável, pois possui capacidade de solvatação satisfatória para ambos os fármacos, pela sua miscibilidade com a água e pela sua capacidade de permitir a obtenção de gel quando utilizado como solvente dispersante com alguns polímeros, o que facilita seu emprego para preparação de formulações semissólidas.

1.7.2. Processo de encapsulamento de fármacos: inclusão em ciclodextrinas

Uma segunda alternativa estaria na complexação por inclusão de um dos fármacos através da utilização de moléculas hospedeiras que impeçam a interação direta entre estes fármacos e assim evitem o fenômeno de incompatibilidade. Uma classe de moléculas extensamente estudadas para este propósito é a das ciclodextrinas.

O desafio desta segunda alternativa farmacotécnica está na obtenção de um complexo de inclusão estável para garantir a não precipitação do outro fármaco ou sua degradação, mas que ainda permita a liberação de forma satisfatória do fármaco incluído para que a ação farmacológica se torne efetiva e, por último, que este complexo tenha solubilidade adequada no sistema que este será veiculado.

1.7.2.1. As ciclodextrinas

As ciclodextrinas são obtidas a partir da atuação enzimática de ciclodextrinas glicosiltransferases sobre o amido, onde os polissacarídeos provenientes deste servem como precursores de oligossacarídeos cíclicos. Apesar de limitada, existe uma variedade de oligossacarídeos cíclicos com cavidades de tamanhos diferentes. As ciclodextrinas mais importantes de ocorrência natural são a α -CD, β -CD e a γ -CD, que correspondem a anéis de 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, e algumas de suas características estão apresentadas na Tabela 1. Estudos realizados através de técnicas de cristalografia de raios-X, no estado sólido, e de RMN, em solução, permitiram a elucidação das características estruturais das mesmas, onde se observava forma assemelhada a um cone e com uma cavidade de 7,9 Å de profundidade. O diâmetro superior e inferior destas moléculas varia de forma crescente: α -CD < β -CD < γ -CD (CHALLA *et al.*, 2005).

Tabela 01: Parâmetros físico-químicos de algumas ciclodextrinas utilizadas em produtos farmacêuticos (VALLE, 2003; LOFTSSON e DUNCHÊNE, 2007)

Ciclodextrinas (CD)	Peso Molecular (PM)	Volume da Cavidade (Å ³)	Solubilidade em água (mg/mL)
α -CD	972	174	145
β -CD	1135	262	18,5
Metil- β -CD	1312	262	> 500
γ -CD	1297	427	232

Moléculas hidrofóbicas e com baixa solubilidade em meio aquoso são grandes candidatos à inclusão em ciclodextrinas devido à possibilidade do ganho de solubilidade e hidrofobicidade por parte destes complexos de inclusão. Outras soluções são alcançadas através da inclusão de fármacos em moléculas de

ciclodextrinas, tais como a prevenção de interações entre fármaco-fármaco ou fármaco-excipientes e a liberação controlada do fármaco (BREWSTER e LOFTSSON, 2007)

1.8. EXCIPIENTES E FORMULAÇÕES MUCOADESIVOS

O epitélio vaginal é normalmente considerado uma mucosa, conforme estrutura apresentada na figura 11, entretanto ele não possui células globulares e canais para a liberação direta de mucina. Algumas secreções provenientes do trato superior podem atingir a vagina por meio do fluído uterino ou pelo fluído folicular na ovulação. Em organismos superiores, o muco é um produto altamente viscoso que forma uma cobertura protetora sobre a superfície de órgãos ocos que têm contato direto com o ambiente externo. O alvo para a interação de excipientes mucoadesivos é o muco, conforme figura 12, o que se considera de extrema relevância para formulações intravaginais. O muco é uma mistura de glicoproteínas (mucinas), água, eletrólitos, células epiteliais, enzimas, bactérias, produtos do metabolismo bacteriano e materiais dependendo da fonte e da localização do muco (JUNGINGER, 1990). Baseados na estrutura da mucina, muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a interação de um polímero mucoadesivo e a superfície biológica (CH'NG *et al.*, 1985; LEHR, 1995). A então chamada mucoadesão é uma outra versão da bioadesão, porque o alvo ainda é o tecido basal, neste caso a vagina.

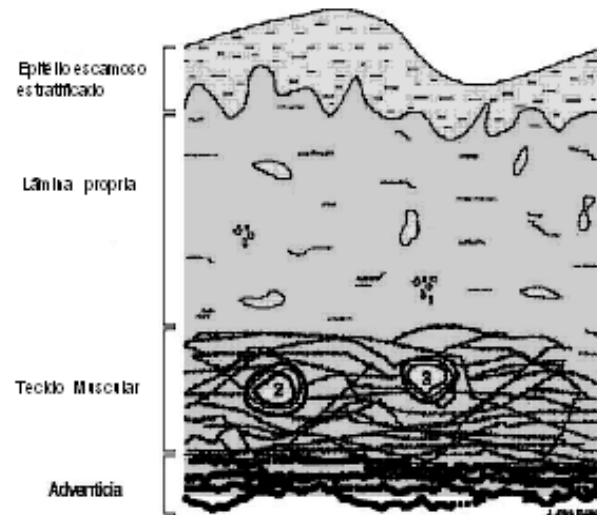


FIGURA 11: O epitélio vaginal (NEVES e BAHIA, 2006)

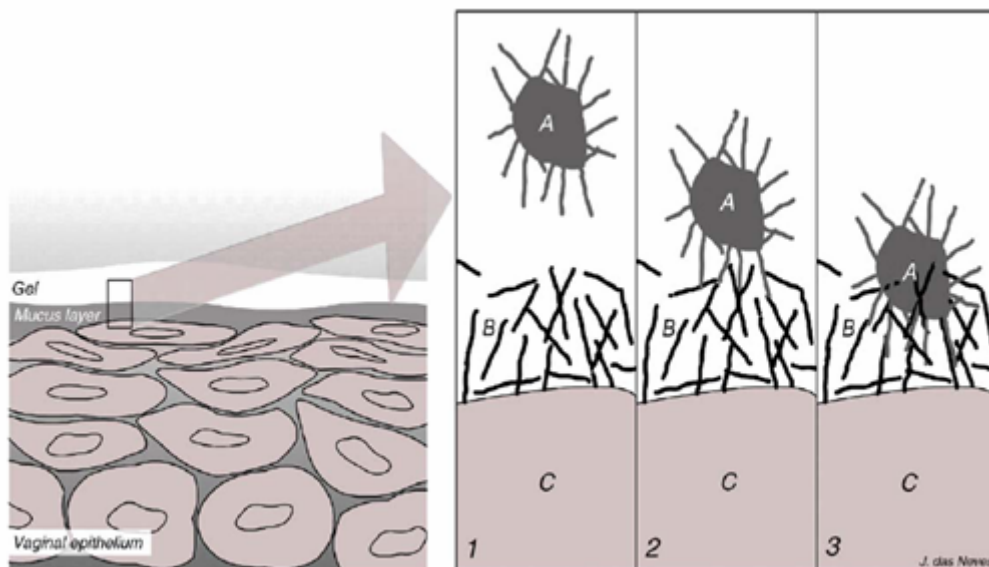


FIGURA 12: Interação do gel mucoadesivo (A) com muco (B) e com o epitélio vaginal (C) (NEVES e BAHIA, 2006).

A secreção vaginal é uma mistura de vários componentes, incluindo transudatos que chegam pelo epitélio, muco cervical, células esfoliadas do epitélio, secreção das glândulas de Bartholin, leucócitos, fluido endometrial e tubal. Um bom indicador do poder de mucoadesão é a determinação da força interação de uma formulação mucoadesiva com o epitélico recoberto por muco, como o de uma vagina extraída de vaca (VALENTA, 2005).

1.8.1. O muco cervical

O muco cervical contém sais inorgânicos e orgânicos, mucinas, proteínas, carboidratos, uréia e ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) (VALENTA, 2005).

A adição de polímeros sintéticos com características iônicas ao muco cervical causa mudanças significativas na estrutura do mesmo quando visualizado por varredura de microscopia eletrônica (WILLITS e SALTZMAN, 2001). Esta interação ocorre pela mucina ser negativamente carregada devido à presença de resíduos de ácido siálico nos carboidratos da macromolécula.

A capacidade de modificar a estrutura do muco pela adição de polímeros sintéticos biocompatíveis pode fornecer novas medidas de prevenção para infecções por patógenos via mucosa e também por novas opções de tratamento de doenças que afetam a própria camada de muco (VALENTA, 2005).

A vagina tem sido alvo para administração de uma variedade de medicamentos, e vários sistemas de administração têm sido utilizados com esse propósito. A presença de muco recobrando a cérvix nas mulheres fornece uma via alternativa para administração de medicamentos. Uma aplicação óbvia é a administração de medicamentos que destroem espermatozoides ou patógenos, tais como vírus e bactérias ou servem na recuperação de disfunções fisiológicas. Katz (1993) relata problemas críticos na compreensão dos mecanismos pelos quais um fármaco penetra e permeia através do muco cervical. Esse problema somente é compreendido parcialmente nos dias de hoje e ressalta conceitos biofísicos que foram apresentadas e irão ajudar em estudos futuros.

1.8.2. Polímeros mucoadesivos

Muitos polímeros bioadesivos têm sido utilizados para aplicação em diferentes mucosas tais como a cavidade bucal, estomacal e intestinal (AHUJA, KHAR e ALI, 1997). Uma lista de polímeros mucoadesivos, com a respectiva força mucoadesiva de cada um foi desenvolvida através da aplicação de ensaios necessários *in vitro*

(SMART *et al.*, 1984). O sistema de teste *in vitro* consistia de um muco homogêneo, o qual foi obtido por raspagem do intestino de cobaia. Foi medida a força requerida para remover o polímero teste que ficou em contato com o muco aderido a uma placa de vidro. Em geral, os polímeros tinham um alto peso molecular e grupamentos funcionais hidrofílicos. Muitos desses grupos de polímeros têm sido testados para uso em sistemas de administração vaginal.

De uma maneira geral, os polímeros podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de carga em condições de hidratação, podendo ser classificados como catiônicos, aniônicos e neutros. A carga adquirida por estes polímeros em solução permite a interação iônica destes com as superfícies celulares (bioadesão) ou mesmo com o muco (mucoadesão) que as recobrem. Os polímeros neutros são considerados mucoadesivos menos eficientes devido a não realização de interações iônicas, mas que ainda são capazes de interagir de outras formas com os substratos biológicos (VALENTA, 2005; SUDHAKAR, KUOTSU e BANDYOPADHYAY, 2006).

A hidratação é um fator muito importante no processo de mucoadesão e é uma das interações conhecidas como participantes deste processo. As interações de Van Der Waal's, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações estéricas, ligações dissulfeto e ligações covalentes são outras interações conhecidas e estudadas na elucidação dos mecanismos envolvidos na mucoadesão (SUDHAKAR, KUOTSU e BANDYOPADHYAY, 2006).

1.8.2.1. Derivados de celulose

Em muitos estudos, os derivados de celulose são comparados aos poliácridatos e são considerados como quase equivalentes a estes. Dentre aqueles polímeros que aparecem listados, pertencentes ao grupo dos derivados de celulose que possuem propriedades mucoadesivas, a carboximetilcelulose sódica é considerada como apresentando excelentes propriedades mucoadesivas (SMART, KELLAWAY e WORTHINGTON, 1984).

Esses polímeros mantêm o sistema de liberação de fármacos no trato vaginal por um tempo prolongado sem qualquer efeito tóxico ou modificação fisiológica importante, prolongando a permanência do medicamento na mucosa vaginal. Eles têm sido utilizados na formulação de contraceptivos espermicidas, comprimidos vaginais de aciclovir, em comprimidos vaginais de prostaglandina E2 e tampão vaginal contendo amoxicilina, entre outros (VALENTA, 2005).

Os mucoadesivos derivados de celulose mais comumente citados são a metilcelulose, carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose (Natrosol[®]), hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose (VALENTA, 2005).

1.8.2.2. PEG-15 cocopoliamina

Assim como os polímeros catiônicos são considerados agentes mucoadesivos em formulações farmacêuticas devido à interação de sua carga gerada pela hidratação com aquelas presentes nas células dos tecidos ou mesmo com os fluidos que os recobre, as resinas pseudo-catiônicas também são conhecidos por essa capacidade de interação.

Semelhante ao quitosano, o PEG-15 cocopoliamina (comercialmente conhecido como Polyquart H 81) possui caráter catiônico e é utilizado em formulações cosméticas como a gente antiestático e emulsificante. Apesar de não ser encontrado em formulações farmacêuticas, o PEG-15 não apresenta restrições à sua utilização para tal destinação ou qualquer referência bibliográfica que demonstre toxicidade em algum grau que restrinja seu uso como excipiente em formulação destinada à terapia medicamentosa, principalmente, pelo fato da aplicação desta resina em uma formulação de uso tópico e deste ser classificado com adjuvante farmacotécnico na Farmacopéia Brasileira (1988).

1.9. FORMULAÇÕES UROGENITAIS

Os sistemas de gel são redes poliméricas que absorvem grandes quantidades do solvente se mantendo insolúveis neste meio líquido específico devido a ligações cruzadas químicas ou interações físicas de cadeias individuais do polímero. De acordo com o polímero utilizado, serão diferentes os tipos de solventes capazes de levar a obtenção de gel e também a quantidade que cada tipo de polímero será capaz de reter (LIN e METTERS, 2006).

Um importante grupo dos géis de utilização farmacêutica são os géis hidrofílicos ou hidrogéis, normalmente preparados com polímeros hidrofílicos, os quais gelificam sob certas condições e concentrações (CHALUPOVÁ, MASTEIKOVÁ e SAVICKAS, 2005).

A hidrofilição característica dos hidrogéis é proveniente e proporcional à capacidade do referido polímero formador deste adsorver água em sua estrutura.

Especificamente os hidrogéis apresentam propriedades físico-químicas únicas que os tornam vantajosos em aplicações biomédicas, incluindo sistemas de liberação de fármacos (LIN e METTERS, 2006).

A formação de hidrogel normalmente ocorre em temperatura ambiente e raramente é necessário o uso de solventes orgânicos. A temperatura em que ocorre a formação do gel é relevante, pois deve se levar em consideração o seu local de aplicação e sua respectiva temperatura para que estudos de caracterização da formulação sejam conduzidos coerentemente (LIN e METTERS, 2006).

Os hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros naturais, semi-sintéticos e sintéticos.

As vantagens da utilização de polímeros naturais estão basicamente na sua biocompatibilidade inerente e biodegradabilidade. Entretanto, as propriedades mecânicas suficientes e a presença de patógenos ou substâncias capazes de

acionar os mecanismos inflamatórios ou de resposta imunológica são algumas de suas desvantagens (LIN e METTERS, 2006).

Os derivados de celulose são polímeros de origem semissintética largamente utilizados na tecnologia farmacêutica. Os polímeros sintéticos fornecem estruturas bem definidas, podendo ser modificados para apresentarem degradabilidade e funcionabilidade toleráveis. Outras vantagens estariam na sua segurança, fácil disponibilidade e apresentarem um custo de aquisição relativamente baixo (BAJEROVÁ *et al.*, 2008).

Devido ao fato dos géis serem semissólidos, certas vantagens são encontradas. Este tipo de formulação pode ser aplicada em uma região restrita, possui elasticidade e viscosidade, que são fatores que influenciam diretamente na sua capacidade lubrificante e a capacidade de formar uma matriz que permite a retenção de grandes quantidades de solvente em seu interior, podendo assim ser capaz de liberar os fármacos de forma controlada e/ou prolongada (PEPPAS *et al.*, 2000; CHALUPOVÁ, MASTEIKOVÁ e SAVICKAS, 2005).

O estudo reológico permite avaliar se a formulação semissólida a base de gel aquoso ou hidroalcoólico apresentam as características de viscosidade, espalhabilidade e aplicações adequadas para administração urogenital.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma associação de clorexidina e lidocaína sob a forma farmacêutica gel para uso urogenital que atenda os pré-requisitos de segurança e eficácia, enfocando a estabilidade físico-química.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica capaz de avaliar o teor dos fármacos veiculados no produto acabado, assim como, os possíveis produtos de degradação obtidos nos estudos de estabilidade a ser realizado de maneira a atender a legislação vigente;
- Determinação da estabilidade dos fármacos em etanol comparados aos respectivos resultados em água;
- Inclusão do cloridrato de lidocaína em β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina para obtenção do sistema que garanta maior estabilidade entre os fármacos e com a formulação proposta;
- Caracterização dos inclusos obtidos através de métodos analíticos adequados;
- Desenvolvimento farmacotécnico desta associação no gel ideal contendo agente mucoadesivo;
- Caracterização físico-química das formulações quanto ao aspecto, pH, perfil de liberação dos fármacos das formulações, estudo da reologia e estabilidade química.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Excipientes e fármacos

- Água Purificada;
- Etanol 95% (DEG);
- Solução de digluconato de clorexidina 20 % - matéria-prima/padrão de trabalho (DEG) e padrão (SIGMA);
- BHT (DEG);
- BHA (DEG);
- Cloridrato de lidocaína - matéria-prima/padrão de trabalho (NORTEC QUIMICA);
- Nipagim (DEG);
- PEG 6000 (DEG);
- PEG-15 Cocopoliamina (DEG);
- Natrosol (DEG);
- β -ciclodextrina (WAKER);
- metil- β -ciclodextrina (WAKER)

3.2. EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Gehaka modelo BG 200;
- Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Shimadzu modelo LC – 10AT;
- Difratorômetro de Raios-X Rigaku modelo Miniflex;
- Dissolutor VARIAN Vankel VK 7010;
- Espectrofotômetro de UV-Visível SHIMADZU UV-2401 PC;
- Espectrofotômetro de infravermelho ABB FTLA 2000-1000;
- Ponto de fusão BUCHI B-540;
- Placa aquecedora com agitação CORNING PC 230;
- Potenciômetro DIGIMED – DM21;
- Reômetro Advanced 2000 (TA Instruments);
- Ultrassom UNIQUE modelo USC 1400;

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Análise dos fármacos

3.3.1.1. Aspecto

O aspecto físico dos fármacos deve corresponder ao descrito nos compêndios oficiais. O cloridrato de lidocaína é um pó cristalino branco, enquanto o digluconato de clorexidina trata-se de um líquido quase incolor até amarelo-acastanhado fotossensível (MOFFAT *et al.*, 2004; USP, 2008).

3.3.1.2. Faixa de ponto de fusão

A determinação da faixa de ponto de fusão de amostras de cloridrato de lidocaína, em triplicata, foi realizada utilizando o método capilar (Farmacopéia Brasileira, 1988). A faixa de fusão deve estar compreendida entre 74 e 79° C (USP, 2008).

3.3.1.3. Solubilidade

O cloridrato de lidocaína apresenta solubilidade em água (1:0,7), em etanol (1:1,5) e em clorofórmio (1:40) (MOFFAT *et al.*, 2004).

O digluconato de clorexidina é miscível com água, solúvel em etanol (1:5) e em acetona (1:3) (MOFFAT *et al.*, 2004).

3.3.1.4. Densidade relativa

A densidade relativa do digluconato de clorexidina deve estar compreendida entre 1,06 e 1,07 g/mL (BRITISH PHARMACOPEIA, 2008).

3.3.1.5. Espectrofotometria de ultravioleta

Foram preparadas soluções aquosas a 2,0 e 0,2% (p/v) de cloridrato de lidocaína e uma solução aquosa 0,25% (p/v) de digluconato de clorexidina, as quais foram levadas ao espectrofotômetro de ultravioleta, realizando-se varredura do espectro entre 200 e 400 nm. O espectro de absorção apresentando pelas amostras foi comparado com o espectro de referência da literatura (MOFFAT *et al.*, 2004).

3.3.1.6. Espectrofotometria no infravermelho

Foram preparadas pastilhas de KBr contendo 3% (p/p) de cloridrato de lidocaína e de liofilizado de digluconato de clorexidina, as quais foram levadas ao espectrofotômetro de infravermelho, realizando-se varredura do espectro entre 400 e 4000 cm^{-1} . As bandas observadas foram comparadas com o espectro de referência (THE INTERNATIONAL PHARMACOPEIA., 2008), no caso da lidocaína e com o espectro obtido utilizando padrão de trabalho (p.50), no caso da clorexidina.

3.3.1.7. Quantificação dos fármacos

Para determinação do teor do cloridrato de lidocaína na matéria-prima procedeu-se titulação em meio não-aquoso, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (1998), com a realização das adequações necessárias. Foi pesado, exatamente, cerca de 0,1 g da amostra em frasco adequado, e foi adicionado 40 mL de ácido acético glacial e 10 mL da solução de acetato de mercúrio TS. Foi realizada a titulação com ácido perclórico 0,1 M SV e a determinação potenciométrica do ponto final. Cada 1 mL de ácido perclórico 0,1 M equivale a 28,88 mg de $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Para determinação do teor do digluconato de clorexidina na matéria-prima procedeu-se titulação em meio não-aquoso conforme descrito na British Pharmacopeia (2008). Foi determinada inicialmente a densidade da solução de digluconato de clorexidina 20% (p/v) para que o teor deste fármaco, determinado na massa da solução pesada para titulação, pudesse ser convertida para g/mL (p/v).

Foi pesado, exatamente, cerca de 1,0 g da amostra no frasco do titulador, e foram adicionados 50 mL de ácido acético glacial. Foi realizada a titulação com ácido perclórico 0,1 M SV e a determinação potenciométrica do ponto final. Cada 1 mL de ácido perclórico 0,1 M equivale a 22,44 mg de $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{14}$.

3.3.2. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por CLAE para quantificação do cloridrato de lidocaína e do digluconato de clorexidina nas formulações

3.3.2.1. Desenvolvimento da metodologia analítica

O desenvolvimento de um método analítico envolve a definição das características e requerimentos que um método deve satisfazer e a definição dos parâmetros de adequabilidade que garantem a boa performance do sistema durante as análises (USP, 2008).

Para o desenvolvimento da metodologia analítica aplicada neste trabalho primeiramente foram avaliadas as metodologias descritas nas farmacopéias mundiais (Brasileira, Norte Americana e Britânica), em suas últimas edições, em compêndios oficiais e artigos científicos indexados. Como não há método descrito para a avaliação simultânea destes dois fármacos em associação, a análise destas metodologias visou verificar a possível convergência destes em um único método capaz de analisar os dois fármacos em questão na presença da matriz do produto acabado e dos produtos de degradação que possam ser gerados.

A Farmacopéia Britânica (2008) descreve uma monografia para uma formulação semissólida da associação do cloridrato de lidocaína e digluconato de clorexidina, mas através de metodologias analíticas diferentes para cada fármaco.

A cromatografia líquida de alta eficiência tem permitido a quantificação de um fármaco em uma formulação ou a determinação do teor deste em uma matéria-prima por ser uma metodologia bastante versátil, prática e podendo ser totalmente automatizada. Através desta técnica analítica pode-se realizar a separação de vários compostos presentes em diversos tipos de amostras em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos foi o método escolhido, visto a sua vasta aplicabilidade demonstrada em

experimentos anteriores na quantificação e detecção de clorexidina e lidocaína individualmente ou em formulações semissólidas (POWELL, 1978; ZHANG *et al.*, 1995; ZIVANOVIC *et al.*, 1996; HA e CHEUNG, 1996; XU e YOUNG, 1999; IRWIN, MCCULLOUGH e JONES , 2003; WIBERG, HAGMAN e JACOBSSON, 2003; FIJALEK *et al.*, 2005; HAVLIKOVA *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE foi realizado através do ajuste das condições cromatográficas como tipo de coluna cromatográfica, tipo de eluição, componente da fase móvel, fluxo de corrida, tempo de corrida, comprimento de onda ajustado, volume de injeção e diluentes utilizados para obtenção da melhor separação dos componentes da formulação proposta.

As condições cromatográficas iniciais foram baseadas em um trabalho publicado sobre a determinação simultânea de lidocaína, clorexidina e triancinolona em uma suspensão, utilizando CLAE de fase reversa (XU e WONG, 1999). A partir desta condição a concentração dos componentes da fase móvel e diluente foi variada, com a fixação do comprimento de onda para detecção e quantificação dos fármacos, com o objetivo de verificar as melhores condições cromatográficas de menor tempo de retenção e melhor resolução para os picos, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 02: Parâmetros cromatográficos e as especificações gerais avaliadas.

Parâmetros Cromatográficos	Especificações
Fase Móvel	Metanol (60 a 65%) + Água Purificada (40 a 35%) + Trietilamina (0,4%) pH 3,5
Comprimento de Onda (λ)	240 nm
Diluyente	Metanol (60 a 65%) + Água Purificada (40 a 35%) pH 3,5

3.3.2.1.1. Preparo das amostras

Foi padronizado que a quantidade dos fármacos que seria utilizada como referência para o desenvolvimento do método seria aquela contida em 1,0 g de formulação completa. Sabendo-se que o cloridrato de lidocaína está presente na concentração de 2,0% e o digluconato de clorexidina na concentração de 0,25%, em 1.0 g de formulação, teríamos 20 mg e 2,5 mg dos fármacos, respectivamente.

Estas quantidades dos fármacos ou suas formulações foram solubilizados ou extraídos, em balão volumétrico de 50 mL, com aproximadamente 25 mL de diluente adequado, para que obtivéssemos as concentrações finais de 400 µg/mL de cloridrato de lidocaína e 50 µg/mL de digluconato de clorexidina, e levadas ao ultrassom por 5 min. Após a solubilização dos fármacos, o volume final foi completado com o diluente (Tabela 2) e a mistura homogeneizada.

3.3.2.2. Validação da metodologia analítica

O objetivo da validação é garantir, através da execução de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Para validação analítica, foi seguido o Guia para validação de metodologia analítica segundo a RE nº 899 e ICH (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A validação de uma metodologia analítica única por CLAE para quantificação de ambos os fármacos em uma formulação semissólida permite a obtenção de uma ferramenta útil na caracterização das mesmas, principalmente sendo capaz de quantificá-los na presença de seus produtos de degradação descritos nas farmacopéias oficiais.

Os parâmetros analíticos considerados para a validação da metodologia analítica destinada a quantificação do fármaco em matéria-prima ou em produto acabado utilizados neste trabalho são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e de detecção e robustez (BRASIL, 2003).

3.3.2.2.1. Determinação da especificidade

Foi determinada pela comparação dos cromatogramas obtidos analisando padrão de trabalho de cloridrato de lidocaína, padrão de trabalho do digluconato de clorexidina, placebo da formulação e placebo contaminado com ambos os padrões de trabalho dos fármacos.

3.3.2.2.2. Determinação da linearidade

Foi determinada pela análise de cinco concentrações diferentes compreendendo 50%, 75%, 100%, 125% e 150% da concentração de trabalho para cada fármaco, que correspondem a 200 e 25 µg/mL, 300 e 37,5 µg/mL, 400 e 50 µg/mL, 500 e 62,5 µg/mL e 600 e 75 µg/mL de lidocaína e clorexidina, respectivamente.

3.3.2.2.3. Determinação da precisão

A precisão do método foi considerada em dois níveis: repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia).

Para verificação da repetibilidade foram feitas três determinações da amostra em cada um dos três níveis de concentração, 80, 100 e 120%. A partir de cada conjunto de dados foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) de cada nível. O DPR não deverá ser superior a 5% para que o método seja considerado repetitivo segundo RE nº 899.

Para determinação da precisão intermediária foram realizadas seis determinações da amostra em cada um dos três níveis de concentração, 80, 100 e 120%, em dois dias diferentes, com intervalo de 15 dias. As análises foram realizadas no mesmo laboratório, no mesmo equipamento, mas com analistas diferentes.

Para determinação da precisão de injeção foram feitas três determinações com uma mesma amostra na concentração de 80, 100 e 120% e o desvio padrão relativo calculado, este não deverá ser superior a 2%.

3.3.2.2.4. Determinação da exatidão

A exatidão foi determinada a partir da adição de quantidade conhecida de cloridrato de lidocaína e digluconato de clorexidina a partir dos respectivos padrões a uma mistura dos componentes do medicamento. A análise foi feita em triplicata para os níveis de 80, 100 e 120%.

É aceito como exato quando a recuperação determinada está compreendida entre 98 e 102% da quantidade de fármaco adicionado (ICH, 2005).

3.3.2.2.5. Determinação do limite de quantificação (LQ) e de detecção (LD)

A estimativa do limite de quantificação, no caso de métodos instrumentais tais como CLAE, pode ser feita com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base, enquanto a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. As equações utilizadas para determinação destes valores são apresentadas a seguir:

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

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

Onde,

DPa = é do desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

IC = é a inclinação da curva de calibração

Para este cálculo foram utilizadas 3 curvas padrão obtidas para cada fármaco em dias diferentes.

3.3.2.2.6. Determinação da robustez

A robustez do método analítico foi determinada pela medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

Foi escolhido o preparo das amostras, dentre os fatores conhecidos como capazes de resultar em variação na resposta do método, especificamente o tipo de solução diluente.

Soluções em triplicata contendo 100% da concentração dos fármacos foram preparadas com dois tipos de diluente e submetidas a análise pelo método desenvolvido.

Foram utilizadas como soluções diluentes a mistura 63:37 de metanol e água com ajuste do pH para 3,5 e solução 50:50 com os mesmos solventes sem ajuste do pH.

O DPR calculado não deverá ser superior a 5% para que o método seja considerado robusto.

3.3.3. Desenvolvimento da formulação com os fármacos associados

3.3.3.1. Determinação da compatibilidade de cloridrato de lidocaína com digluconato de clorexidina em meio aquoso e meio etanólico

A obtenção de uma formulação onde a associação do digluconato de clorexidina e do cloridrato de lidocaína seja viável, isto é, mantendo ambos os fármacos solubilizados na matriz da formulação proposta, se torna um desafio a ser superado.

A determinação da compatibilidade se baseia no notório evento de precipitação que ocorre entre o digluconato de clorexidina e espécies aniônicas (SWEETMAN, 1999), de acordo com a concentração destas e com o solvente utilizado.

Nenhum artigo ou compêndio até então publicado mencionava alternativas farmacotécnicas para ganho de estabilidade e compatibilidade do cloridrato de lidocaína ou do digluconato de clorexidina com outros fármacos ou excipientes.

Por outro lado, estudos publicados referentes a compatibilidade do digluconato de clorexidina com outros fármacos e adjuvantes farmacotécnicos demonstraram que a evidenciação da precipitação se trata de uma técnica útil, rápida e barata em pré-estudos de desenvolvimento de formulações farmacêuticas (BASRANI *et al.*, 2007; RASIMICK *et al.*, 2008).

3.3.3.1.1. Preparo da mistura de solventes com diferentes concentrações de etanol

Foram preparadas soluções aquosas contendo etanol nas concentrações de 10, 30, 50, 70 e 95%. Estas soluções foram utilizadas como solventes para avaliar qual concentração que forneceria o ambiente adequado para a melhor compatibilidade entre os fármacos, isto é, a não ocorrência de turvação ou precipitação.

3.3.3.1.2. Preparo das soluções com os fármacos em diferentes meios

A determinação da compatibilidade de cloridrato de lidocaína com digluconato de clorexidina em cada solvente ou sistema de solventes foi realizada através do

preparo de uma solução com volume final de 10,0 mL (balão volumétrico) contendo quantidade necessária para se atingir uma concentração de 2,0 % de cloridrato de lidocaína e de 0,25 % de digluconato de clorexidina.

Para cada meio testado, a massa pesada de cloridrato de lidocaína foi completamente solubilizada no meio e, posteriormente, adicionou-se o volume correspondente de solução de digluconato de clorexidina, previamente diluída no mesmo meio em estudo.

Estas soluções foram transferidas para béqueres de 10 mL e mantidas sob agitação em placa agitadora. As soluções foram avaliadas quanto ao aparecimento de turvação ou precipitado branco característico nos tempos de 0, 5, 30 e 60 min e 24 h.

3.3.3.2. Obtenção e caracterização de inclusos de cloridrato de lidocaína em ciclodextrinas

3.3.3.2.1. Obtenção de incluso de cloridrato de lidocaína em β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina

Os inclusos foram obtidos pelo procedimento de empastamento (Kneading). Foi adicionado cloridrato de lidocaína e da ciclodextrina na razão de 1:1, do peso molecular correspondente, em um almofariz. Com auxílio do pistilo, os pós foram misturados por 5 min. Foi adicionada à mistura de pós uma quantidade mínima da mistura de água purificada e etanol na proporção de 1:1 (v/v) até a obtenção de uma pasta. A pasta foi mantida em dessecador sob vácuo até completa secagem, com formação de um sólido proveniente da evaporação do solvente. Este sólido foi triturado com pistilo, tamizado em tamiz de malha 100 e estocado em dessecador (TATAI *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2007).

3.3.3.2.2. Caracterização do incluso

3.3.3.2.2.1. Determinação da constante de estabilidade do incluso em meio aquoso

A caracterização de complexos de inclusão em solução pela determinação do diagrama de solubilidade de fases está baseada na medição do efeito da complexação na solubilidade do substrato, permitindo fazer inferências sobre a estequiometria de inclusão e estimar uma constante relacionada com o grau de estabilidade do complexo formado. Esta teoria é a mais utilizada para este fim (CHALLA *et al.*, 2005, BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

Esta teoria já foi aplicada com sucesso no estudo do ganho de solubilidade de fármacos pouco solúveis em água (TATAI *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2007, RAWAT e JAIN, 2004). Mas devido ao fato deste trabalho se tratar da inclusão de uma molécula solúvel em água, a aplicação do princípio desta teoria foi realizado com o intuito de permitir inferências sobre a estequiometria e a determinação da constante de estabilidade do complexo formado.

As amostras foram preparadas com adição de cloridrato de lidocaína e concentrações crescentes da ciclodextrina em estudo (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mM) em balões volumétricos de 100 mL, conforme a Tabela 3. As soluções preparadas foram homogeneizadas em ultrassom por 5 min, filtradas em filtro de 0,45 µm e a concentração de cloridrato de lidocaína complexada foi determinada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 240 nm (RAWAT e JAIN, 2004).

Tabela 03: Tabela do preparo das soluções para determinação da estequiometria e a determinação da constante de estabilidade do complexo formado, com a fixação da massa de lidocaína em $1,985 \times 10^{-5}$ mg

Concentração de CD (mM)	Ciclodextrinas	
	β -CD	Metil- β -CD
	(mg)	(mg)
0	-	-
2	227	262
4	454	525
6	681	787
8	908	1050
10	1135	1312

A inferência sobre a estequiometria de inclusão do fármaco em ciclodextrina pode ser feita pela construção do gráfico de absorvância *versus* concentração molar da ciclodextrina adicionada, onde podemos obter através da regressão linear da curva o coeficiente de correlação (r). Quanto maior for a linearidade deste coeficiente, isto é, quanto mais próximo este valor for de 1, maior a probabilidade desta inclusão obedecer a estequiometria de 1:1.

A constante de estabilidade (K) dos complexos de cloridrato de lidocaína-ciclodextrina foi calculada conforme estudo anterior apresentado para moléculas solúveis em água (ASHNAGAR *et al.*, 2007). Para tal, foram utilizadas as equações 1, 2 e 3:

$$\text{Equação 1: } K = \frac{A_{\text{complexo real}}}{A_{\text{fármaco livre}} \times C_{\text{ciclodextrina livre}}}$$

$$\text{Equação 2: } A_{\text{complexo real}} = A_{\text{complexo lida}} - A_{\text{fármaco livre}}$$

$$\text{Equação 3: } C_{\text{ciclodextrina livre}} = C_{\text{ciclodextrina adicionada}} - C_{\text{ciclodextrina complexada}}$$

Onde, A é absorção no ultravioleta e C a concentração da amostra.

3.3.3.2.2.2. Solubilidade do incluso em meio aquoso

A determinação da solubilidade do complexo de inclusão em meio aquoso foi realizada pela adição de um excesso do incluso a 15 mL de água purificada e esta foi colocada sob agitação por 12 h. A solução é então centrifugada a 6000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi filtrado com filtro de 0,45 µm.

Uma alíquota de 1 mL deste sobrenadante foi recolhida e diluída em balão volumétrico de maneira a obtermos uma concentração aproximada de 40 mg de incluso em 100 mL de água purificada. Esta solução de concentração final desconhecida teve a absorção determinada em espectrofotômetro de ultravioleta com comprimento de onda ajustado em 240 nm.

Uma curva padrão foi construída com soluções do incluso nas concentrações de 20, 30, 40, 50 e 60 mg em 100 mL de água purificada para quantificação da amostra.

3.3.3.2.2.3. Difractometria de raios X

Amostras de cloridrato de lidocaína, ciclodextrina, mistura física de cloridrato de lidocaína e ciclodextrina e complexo de inclusão de cloridrato de lidocaína e ciclodextrina foram pulverizadas, com auxílio de gral e pistilo, e tamizadas em tamiz de malha 100, separadamente.

Foram aplicadas quantidades suficientes de amostra sobre a placa de vidro, as quais foram levadas ao difratômetro de raios X, realizando-se varredura de 0 e 60 na posição do ângulo de 2θ .

Os picos presentes no difratograma do complexo de inclusão foram observados e comparados de maneira que o desaparecimento ou redução de bandas características do cloridrato de lidocaína ou o aparecimento de bandas características da ciclodextrina utilizada seriam considerados indícios da formação de complexo de inclusão. A comparação entre os picos presentes nos difratogramas da mistura física e do complexo de inclusão permitiria excluir o efeito de diluição da massa de uma substância na outra.

3.3.3.2.2.4. Espectrofotometria de infravermelho

Amostras de cloridrato de lidocaína, ciclodextrina, mistura física de cloridrato de lidocaína e ciclodextrina e complexo de inclusão de cloridrato de lidocaína e ciclodextrina foram pulverizadas, com auxílio de gral e pistilo, e tamizadas em tamiz de malha 100, separadamente.

Foram preparadas pastilhas de KBr contendo 3% (p/p) de amostra, as quais foram levadas ao espectrofotômetro de infravermelho, realizando-se a varredura do espectro entre 400 e 4000 cm^{-1} .

As bandas presentes no espectro de cada complexo inclusão foram observadas e comparadas de maneira que o desaparecimento ou redução de bandas características do cloridrato de lidocaína ou o aparecimento de bandas características da ciclodextrina utilizada seriam considerados indícios da formação de complexo de inclusão. A comparação entre as bandas presentes nos espectros da mistura física e do complexo de inclusão em β -CD e metil- β -CD permitiria excluir o efeito de diluição da massa de uma substância na outra.

3.3.3.2.2.5. Determinação do teor do cloridrato de lidocaína no complexo de inclusão.

A determinação do teor do cloridrato de lidocaína no complexo de inclusão foi realizada através do preparo de uma solução do mesmo com diluente destinado ao preparo das amostras para análise pelo método desenvolvido por CLAE. A determinação de quantidade do fármaco incluído se dá pela comparação da área do pico da amostra com uma solução padrão de cloridrato de lidocaína na mesma concentração.

3.3.3.3. Determinação da compatibilidade do incluído de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina (1:1) com digluconato de clorexidina em meio aquoso

3.3.3.3.1. Preparo das soluções de cloridrato de lidocaína incluído e digluconato de clorexidina em meio aquoso

A determinação da compatibilidade de cloridrato de lidocaína incluído em ciclodextrina com digluconato de clorexidina em meio aquoso foi realizada através do preparo de uma solução de volume final de 10,0 mL em balão volumétrico, contendo quantidade necessária para se atingir uma concentração de 2,0% de cloridrato de lidocaína e de 0,25% de digluconato de clorexidina. Uma outra solução similar, substituindo o cloridrato de lidocaína incluído por cloridrato de lidocaína livre, foi preparada para servir de controle positivo da incompatibilidade.

Para cada teste, a massa pesada de cloridrato de lidocaína ou do incluído foi completamente solubilizada no meio e posteriormente adicionou-se o volume correspondente de solução de digluconato de clorexidina, previamente diluída no mesmo meio em estudo. A solução preparada com o cloridrato de lidocaína não incluído forneceu o controle positivo da formação de precipitado.

Estas soluções foram transferidas para béqueres de 10 mL e mantidas sob agitação em placa agitadora, avaliadas quanto ao aparecimento de turvação ou precipitado branco característico nos tempos de 0, 5, 30 e 60 min e 24 h.

3.3.3.4. Avaliação de estabilidade da associação nas soluções obtidas

A partir da racionalização de alternativas farmacotécnicas viáveis para solucionar a incompatibilidade detectada entre o cloridrato de lidocaína e o digluconato de clorexidina em meio aquoso, o passo seguinte seria a avaliação da funcionalidade destas alternativas e o quanto de estabilidade foi alcançada em um determinado período de tempo.

Desta maneira, o preparo de uma solução aquosa dos fármacos, como controle positivo da incompatibilidade, de uma solução etanólica dos fármacos e de uma solução aquosa do cloridrato de lidocaína incluso em ciclodextrina e digluconato de clorexidina, nas concentrações estabelecidas para atingir-se a atividade farmacológica planejada para a formulação, permitiria o acompanhamento da compatibilidade físico-química alcançada ao longo do período avaliado com tais alternativas farmacotécnicas.

A avaliação da estabilidade foi baseada no descrito na Resolução n° 1 (BRASIL, 2005). Como o produto se trata de uma forma farmacêutica semissólida, armazenada em temperatura de 15 – 30° C em embalagem semipermeável (condição mais crítica), as condições de temperatura e umidade da avaliação da estabilidade são $30 \pm 2^\circ \text{C}$ / $75 \pm 5\%$ de umidade e as soluções preparadas deverão ser mantidas em frascos âmbar fechados.

3.3.3.4.1. Preparo das soluções

Cada solução contendo os fármacos, inclusos e não inclusos, em diferentes solventes foram preparadas em balões de 50,0 mL e transferidas imediatamente para frascos de vidro âmbar com tampas de rosca.

As três soluções foram preparadas conforme descrito na tabela 4.

Tabela 04: Tabela representativa dos quantitativos e qualitativos de cloridrato de lidocaína (CL), digluconato de clorexidina (DC) e de solventes utilizados no preparo das soluções de estabilidade

Solução de Estabilidade	CL (g)	Incluso de CL em metil- β -CD (g)	DC (g)	Solvente
1	1,00	-	0,125	Água Purificada
2	1,00	-	0,125	Etanol 95%
3	-	5,542 ^a	0,125	Água Purificada

^a Massa de incluso correspondente a 1,00 g de CL .

3.3.3.4.2. Testes de avaliação da estabilidade

Os testes realizados nas soluções foram a avaliação da presença ou ausência de turvação, presença ou ausência de precipitado e determinação do teor dos fármacos. As soluções contidas em cada frasco eram homogeneizadas antes da realização dos testes.

3.3.3.4.2.1. Teste de presença ou ausência de turvação

Uma alíquota de 5 mL da solução de estabilidade homogeneizada foi transferida para um tubo de ensaio de 15 mL e observada contra uma fonte luminosa adequada.

3.3.3.4.2.2. Teste de presença ou ausência de precipitação

Uma alíquota de 5 mL da solução de estabilidade homogeneizada foi transferida para um tubo de falcon de 15 mL, centrifugada a 6000 rpm e observada contra uma fonte luminosa adequada.

3.3.3.4.2.3. Determinação do teor dos fármacos

Uma alíquota de 1,0 mL das soluções de estabilidade homogeneizadas (Tabela 4) foi filtrada em filtro 0,45 µm e transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL e avolumado com 50 mL de diluente destinado a análise pelo método validado por CLAE para quantificação destes fármacos associados (Tabela 2).

A amostra diluída foi filtrada e transferida adequadamente para frasco e submetidas à análise por CLAE nas condições pré-estabelecidas e validadas para quantificação dos fármacos.

3.3.3.4.3. Frequência dos testes de avaliação da estabilidade

A frequência dos testes de avaliação da estabilidade deve permitir a constatação do aumento de estabilidade em função do tempo, sabendo-se que esta incompatibilidade é visivelmente evidenciada após alguns minutos da adição dos fármacos em meio aquoso. Desta forma, definiu-se a realização dos ensaios nos tempos zero e 10 dias.

3.3.3.5. Desenvolvimento das matrizes compatíveis com os fármacos em meio aquoso e meio etanólico.

3.3.3.5.1. Seleção dos excipientes

A seleção dos excipientes para composição das matrizes para veiculação dos fármacos em meio aquoso e meio etanólico partiu do princípio de quanto maior fosse a similaridade das matrizes, melhor poderíamos comparar as formulações finais que por ventura fossem obtidas nos dois solventes.

Desta maneira, excipientes que exercessem sua função de adjuvante farmacotécnico em ambos solventes, sem causar alteração da compatibilidade dos fármacos com o solvente, de maneira a diminuir sua disponibilidade, seriam aqueles de primeira escolha. Os excipientes foram selecionados de acordo com as informações compendiais pesquisadas e mediante a verificação se estes possuíam alguma incompatibilidade de uso nos tipos de formulações contendo um ou ambos os fármacos em questão.

Estas soluções foram mantidas sob agitação magnética e avaliadas quanto ao aparecimento de turvação ou precipitado branco característico nos tempos de 0, 5, 30, 60 min e 24 h.

3.3.3.5.2. Preparo dos géis placebos

3.3.3.5.2.1. Preparo do gel placebo aquoso

Foi adicionado em um béquer o metilparabeno, o BHA, aproximadamente 40 % do volume de água total destinado ao preparo do placebo, mantendo a agitação até completa dissolução dos sólidos. Posteriormente, foi adicionado o PEG 6000 neste béquer, mantendo a agitação até completa dissolução. Em seguida, foi adicionado o PEG-15 cocopoliamina (mucoadesivo pseudo-catiônico). Após a homogeneização, foram adicionados a hidroxietilcelulose (mucoadesivo neutro e gelificante) e o restante do volume de água destinado ao preparo do placebo.

Foi mantida a agitação do sistema até a gelificação do polímero e a obtenção do gel límpido e levemente amarelado, devido à presença do natrosol e do PEG-15 cocopoliamina.

3.3.3.5.2.2. Preparo do gel placebo etanólico

O preparo do gel placebo etanólico foi realizado de forma semelhante ao do gel placebo aquoso, com a substituição do BHA e da água purificada por BHT e etanol 95%, respectivamente.

3.3.3.5.3. Caracterização dos géis placebos

A caracterização dos géis placebos pela observação do aspecto do semissólidos obtidos, da determinação do pH e da viscosidade permitiu verificar se estes géis apresentavam quaisquer restrições quanto a estes parâmetros que impedisse a incorporação dos fármacos nestas matrizes e a sua utilização nas cavidades urogenitais como agentes lubrificantes.

3.3.3.5.3.1. Aspecto

A observação da cor, odor e turvação das amostras preparadas e mantidas em frascos de vidro âmbar e das alterações visíveis do aspecto dos géis quando aplicados às superfícies idênticas foi utilizado para a caracterização quanto ao aspecto dos géis placebo. Todas as observações foram realizadas à temperatura ambiente.

3.3.3.5.3.2. Determinação do pH

O pH dos placebos obtidos foi determinado a partir da leitura direta utilizando potenciômetro com eletrodo tipo escoamento com junção dupla DME-CV4, específico para esta determinação em semissólidos.

3.3.3.5.3.3. Determinação da viscosidade

A determinação da viscosidade permite correlacionar o padrão de gelificação do agente específico em cada um dos solventes com a capacidade lubrificante do gel após aplicação.

Foi utilizado um reômetro Advanced (TA Instruments), modelo 2000, que se trata de um viscosímetro de rotação tipo cone e placa, com cone de 60 mm e ângulo de 2° para determinação das propriedades reológicas. A amostra de 3,0 g foi colocada na placa com aquecimento de 37 °C e o cone rotatório começa a girar com velocidades crescente e decrescente ajustáveis.

Para as medidas em cisalhamento contínuo, a desorganização do sistema foi promovida pelo giro do sistema de cone a uma taxa de cisalhamento crescente ($0,1 - 100 \text{ s}^{-1}$) e depois segue a uma taxa de cisalhamento decrescente ($100 - 0,1 \text{ s}^{-1}$), reorganizando o sistema. Estas medições permitiram a determinação da viscosidade aparente ao longo das variações da taxa de cisalhamento.

3.3.3.6. Preparo do gel aquoso de cloridrato de lidocaína incluso em metil- β -ciclodextrina e digluconato de clorexidina

Após a solubilização do metilparabeno, BHA em aproximadamente 40 % do volume de água foi adicionada à solução aquosa de digluconato de clorexidina sob agitação para garantir a homogeneização. Em seguida, foi adicionada a massa de incluso de cloridrato de lidocaína, mantendo a agitação até completa dissolução.

A adição do PEG 6000, PEG-15 cocopoliamina e de hidroxietilcelulose seguiu o mesmo procedimento descrito para o preparo do gel placebo aquoso.

3.3.4. Caracterização da formulação ideal

A formulação ideal é aquela obtida a partir das melhores condições de estabilização da associação dos fármacos em função das características do incluso

de lidocaína, excipientes, solvente, e do gel placebo mais adequados para sua composição.

A caracterização da formulação ideal permitiu avaliar o grau de adequação das soluções propostas para viabilizar a associação dos fármacos em questão através de resultados mensurados com metodologias analíticas devidamente aplicadas para determinação do pH, estabilidade, o perfil de liberação destes fármacos e o estudo reológico desta formulação.

3.3.4.1. Determinação do pH

A determinação do pH da formulação ideal, sem prévio ajuste, visou determinar se este parâmetro estava de acordo com a faixa de pH de maior estabilidade dos fármacos e a faixa de pH fisiológico das cavidades urogenitais onde se pretende aplicar a formulação.

O pH da formulação ideal foi determinado a partir da leitura direta em potenciômetro com eletrodo tipo escoamento com junção dupla DME-CV4, específico para esta determinação em semissólidos.

3.3.4.2. Determinação da estabilidade

A determinação da estabilidade da formulação ideal foi realizada pela determinação do teor dos fármacos em tempo zero e seis meses.

Uma massa de 1,0 g da formulação foi pesada quantitativamente e transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL e avolumado com diluente destinado (Tabela 2) a análise pelo método validado por CLAE para quantificação destes fármacos associados.

A amostra foi analisada pelo método analítico desenvolvido e validado por CLAE para quantificação dos fármacos na formulação.

3.3.4.3. Estudos de liberação *in vitro*

Os estudos da liberação *in vitro* permitiram avaliar a liberação do fármaco a partir da formulação ideal. Tratando-se de formulações semissólidas, o modelo da célula vertical de Franz com membrana sintética tem sido extensamente utilizado. Esta membrana sintética cria uma barreira física capaz de permitir que somente o fármaco migre, por uma diferença de concentração, para uma solução que ofereça condições favoráveis de solubilidade e demais necessárias para estabelecer a condição *sink* para o ensaio (ALTON, 2005).

Até o momento, nenhum aparato, procedimento ou requerimento para testes de liberação *in vitro* de formulações semissólidas estão descritos em farmacopéias aceitas oficialmente. No entanto, as diretrizes do FDA descrevem procedimentos e requerimentos para estudos de liberação *in vitro* utilizando células de difusão vertical de Franz.

Foi utilizado para avaliação da liberação dos fármacos no sistema semissólido considerado ideal neste trabalho um aparato modificado a partir do conceito da célula de Franz. O uso do referido aparato se baseia na já reconhecida eficácia apresentada pela célula de Franz para esta finalidade (A-SASUTJARIT, SIRIVAT e VAYUMHASUWAN, 2005; ESPOSITO *et al.*, 2005; KIKWAI *et al.*, 2005; HOLLER e VALENTA, 2006; AKOMEAH, MARTIN e BROWN, 2006; DI MAMBRO e FONSECA, 2006; SARIGULLU OZGUNEY *et al.*, 2006; CROSS *et al.*, 2007; GARNIER *et al.*, 2007; USP 31, 2008).

3.3.4.3.1. Preparo da membrana sintética de acetato de celulose

Segmentos de aproximadamente 5 cm² de membrana de acetato de celulose (membrana de diálise) foram cortados. A membrana teve suas laterais cortadas, foi aberta em água corrente e fervida em água destilada por cerca de 5 min, repetindo-se o procedimento por três vezes com novo volume de água destilada, de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.4.3.2. Escolha e preparo do meio receptor

A escolha do meio receptor precisou atender as limitações de estabilidade química do digluconato de clorexidina e da solubilidade do incluso de cloridrato de lidocaína em soluções aquosas contendo íons dissolvidos.

Além disso, a água purificada já foi utilizada como meio receptor em estudos anteriores de liberação *in vitro* de digluconato de clorexidina em formulações semissólidas (SENEL, 2000b) e a determinação da solubilidade do incluso de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina permitiram o uso desta como meio receptor garantindo a condição *sink* ao experimento.

O preparo do meio receptor foi realizado através da filtração da água purificada em membrana de acetato de celulose 0,45 μm e desgaseificada em ultrassom.

As alíquotas retiradas em tempos específicos durante o estudo de liberação *in vitro* foram posteriormente diluídas com metanol de maneira a reproduzirem condições analíticas adequadas para quantificação dos fármacos pelo método analítico por CLAE validado neste trabalho.

3.3.4.3.3. Montagem do sistema modificado da célula de difusão de Franz

As células de difusão foram montadas conforme a Figura 13. Béqueres de 250 mL foram utilizados como compartimento receptor e preenchidos com 20,0 mL de água purificada, ou seja, a solução receptora filtrada e desgaseificada por ultrassom. A membrana foi disposta no suporte da amostra, evitando a formação de bolhas, e presa por um anel de borracha. O compartimento doador apresenta uma área útil de aproximadamente 1,13 cm^2 , onde a parte inferior do suporte da amostra permite o contato direto da amostra com a membrana sintética.



Figura 13: Suporte da amostra: visão interna da área útil (a); visão da parte inferior da área útil (b) e suporte com membrana disposta e presa com anel de borracha (c).

Através da parte interna do compartimento doador, já com a membrana sintética presa, foi adicionada a massa de 200 mg da formulação em estudo.

O ensaio foi realizado com a montagem de seis sistemas de liberação ($n=6$) com a temperatura de $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ mantida durante todo o experimento, conforme apresentado na figura 14.

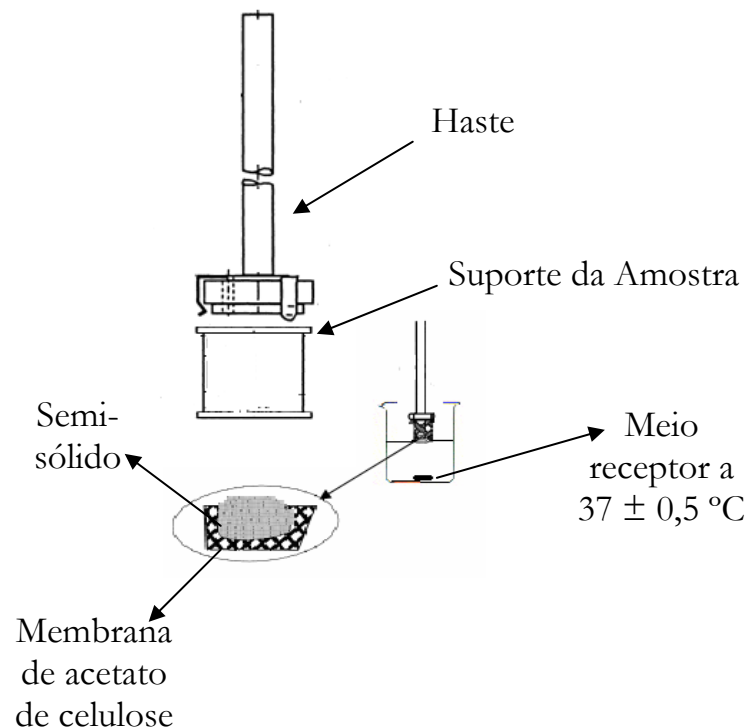


Figura 14: Esquema representativo da montagem do sistema modificado da célula de difusão de Franz.

3.3.4.3.4. Determinação da quantidade de fármacos liberados

A retirada da alíquota do meio receptor de cada um dos compartimentos durante o experimento foi realizada com a reposição de igual volume de meio receptor novo.

As alíquotas foram retiradas nos tempos de 5, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 min. A quantidade do fármaco acumulada no meio receptor em cada tempo foi calculada pela multiplicação da massa determinada na alíquota retirada pelo volume total de meio receptor utilizado e a esta quantidade somada a massa quantificada no volume retirado no tempo anterior.

3.3.4.3.5. Estudo de cinética e análise do fluxo de liberação *in vitro*

A determinação da cinética de liberação foi feita através da análise de regressão linear do gráfico de dispersão xy, aplicando três modelos:

- Ordem zero: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h);
- Higuchi: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* raiz do tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h).

A partir da análise do coeficiente linear (r) obtido para cada um dos modelos, determinou-se a cinética de liberação. O modelo que apresentou maior valor de r foi o escolhido. O valor do fluxo de liberação (J) corresponde à inclinação (a) da porção linear da curva de liberação para cada formulação. O fluxo foi calculado para cada cuba (n= 6) e o valor foi expresso pela média \pm o desvio padrão.

3.3.4.4. Estudo reológico

O conhecimento do comportamento reológico dos produtos é essencial para várias aplicações, entre as quais podemos citar projetos e avaliação de processos, controle de qualidade, determinação do tipo de acondicionamento do produto, cuidados ao transportá-lo e eficácia na aplicação (CHANG, 2002; HOLLER e VALENTA, 2006).

O estudo reológico da formulação ideal foi realizado para a obtenção dos parâmetros físicos de índice de fluxo, índice de consistência, viscosidade aparente e tixotropia. Os três primeiros parâmetros foram fornecidos diretamente do aparelho.

Foi utilizado um reômetro Advanced (TA Instruments), modelo 2000, que se trata de um viscosímetro de rotação tipo cone e placa, com cone de 60 mm e ângulo de 2° para determinação das propriedades reológicas. A amostra de 3,0 g foi colocada na placa com aquecimento de 37° C e o cone rotatório girou sobre velocidades crescente e decrescente ajustáveis.

Para as medidas em cisalhamento contínuo e determinação das tensões de cisalhamento, a desorganização do sistema foi promovida pelo giro do sistema de cone a uma taxa de cisalhamento crescente ($0,1 - 100 \text{ s}^{-1}$) e depois segue a uma taxa de cisalhamento decrescente ($100 - 0,1 \text{ s}^{-1}$), reorganizando o sistema.

Para as medidas em cisalhamento oscilatório e determinação dos módulos G' (elástico ou de armazenamento) e G'' (viscoso ou de perda), os testes foram realizados em duas condições. A primeira, estabeleceu a fixação da frequência em 1,0 Hertz e variação do percentual de deformação de 0,1 a 400% e a segunda condição estabeleceu a variação da frequência de 0,1 a 10 Hertz e percentual de deformação em 5%.

Para a determinação da tixotropia através da variação da viscosidade, os testes foram realizados com a fixação da taxa de cisalhamento em $10,0 \text{ s}^{-1}$ e percentual de deformação em 5%.

Todas as análises foram realizadas em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DOS FÁRMACOS

4.1.1. Cloridrato de lidocaína

4.1.1.1. Aspecto

Na caracterização do aspecto do fármaco, foi encontrado um pó cristalino branco a temperatura ambiente, aproximadamente 25° C, estando de acordo com o aspecto descrito na referência utilizada.

4.1.1.2. Faixa de ponto de fusão

A Tabela 05 apresenta os resultados obtidos na determinação da faixa de ponto de fusão do cloridrato de lidocaína.

Tabela 05: Dados da determinação do ponto de fusão do cloridrato de lidocaína

Amostras	Ponto de Fusão (°C)	Média (°C)	Conformidade com a Referência
1	76,3		
2	76,5	76,5	Conforme
3	76,6		

O valor médio de ponto de fusão obtido para a amostra da matéria-prima da clorexidina está compreendido dentro da faixa descrita no compêndio utilizado com referência (USP, 2008).

4.1.1.3. Solubilidade

A Tabela 06 apresenta os resultados obtidos na determinação da solubilidade do cloridrato de lidocaína.

Tabela 06: Dados da determinação da solubilidade do cloridrato de lidocaína.

Amostra	Massa (g)	Solvente (g)	Solubilidade
1	1,0	0,7 (água purificada)	Solúvel
2	1,0	1,5 (etanol 95%)	Solúvel
3	1,0	40 (clorofórmio PA)	Solúvel

As solubilidades em água e etanol são suficientes para o desenvolvimento de uma formulação utilizando estes e que permite que a lidocaína seja utilizada na concentração de 2,0%.

4.1.1.4. Espectrofotometria de ultravioleta

A Figura 15 apresenta, respectivamente, o espectro de varredura no ultravioleta da amostra de matéria-prima e da referência (MOFFAT *et al.*, 2004) do cloridrato de lidocaína.

Nas menores concentrações do fármaco em solução nas Figuras 15^a e 15^b, o perfil da absorção foi similar e nas soluções mais concentradas, apesar do perfil de absorção obtido experimentalmente ser somente 20 vezes enquanto o de referência

foi de 50 vezes maior, o pico máximo característico do fármaco e descrito na literatura ficou evidenciado.

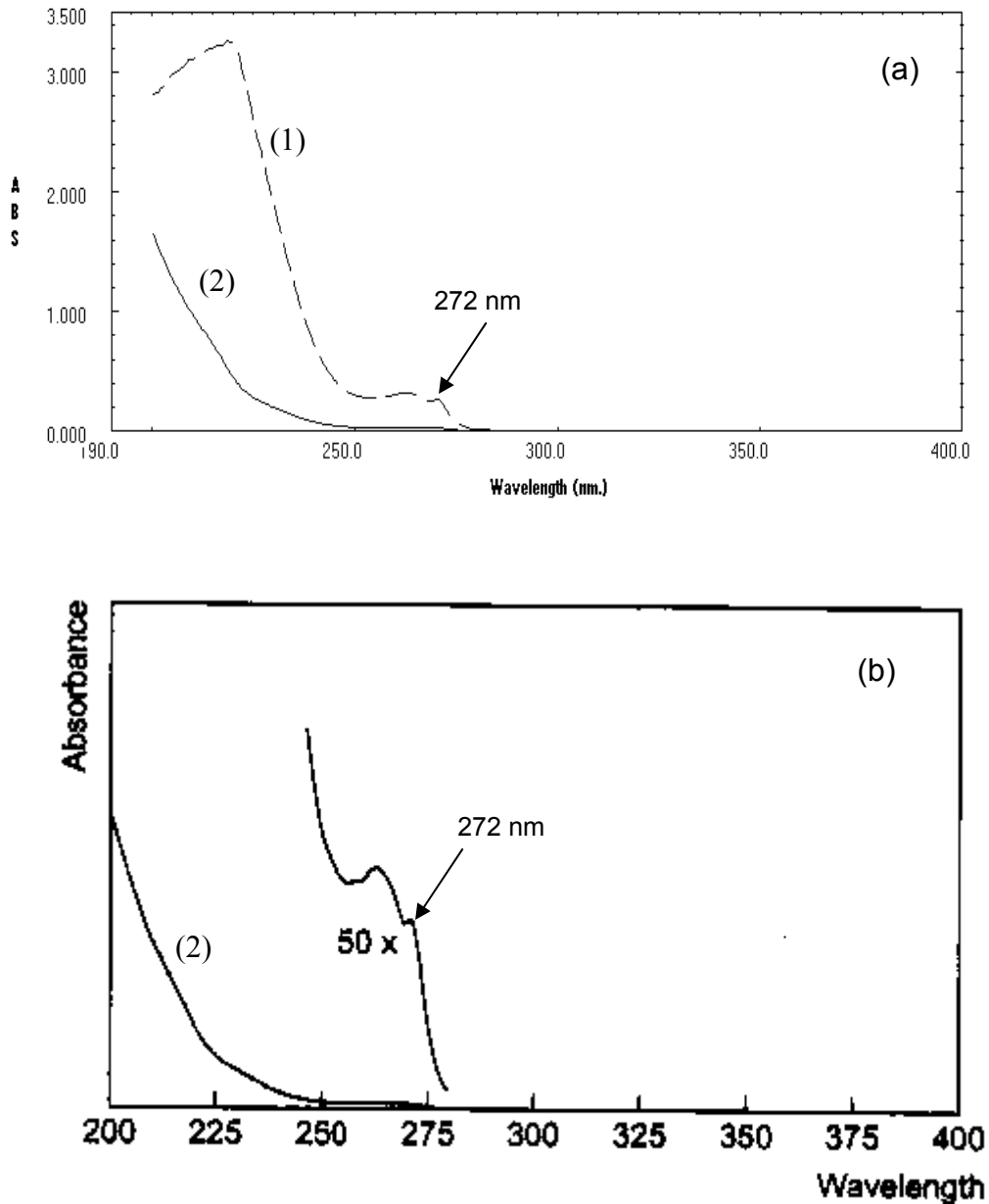


Figura 15: Espectro de ultravioleta da solução a 2,0% (1) e a 0,2% (2) de cloridrato de lidocaína obtido experimentalmente (a) e referência (b), com máximo em 272 nm (MOFFAT *et al.*, 2004).

4.1.1.5. Espectrofotometria no infravermelho

A Figura 16 apresenta, respectivamente, o espectro de varredura no infravermelho da amostra e da referência (compendial) do cloridrato de lidocaína.

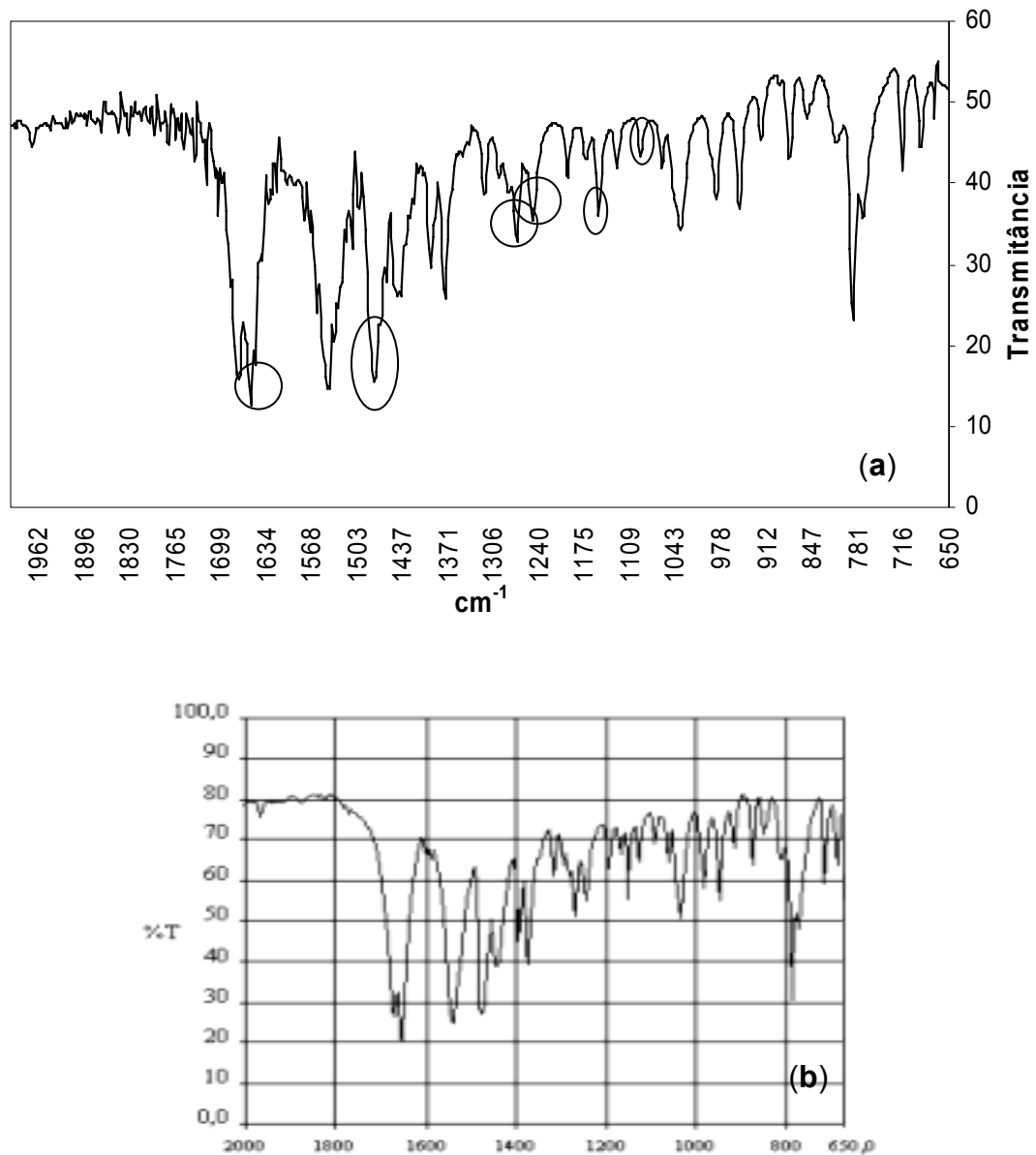


Figura 16: Espectro de infravermelho do cloridrato de lidocaína (matéria-prima) obtido experimentalmente (a) e do padrão de referência (b) (THE INTERNATIONAL PHARMACOPEIA, 2008).

No espectro estão presentes as bandas principais da lidocaína, conforme destacado pelos círculos, onde a banda forte em 1662 cm^{-1} refere-se à amida monossobstituída, a banda forte em 1495 cm^{-1} refere-se ao hidrocloreto, as bandas médias em 1290 e 1204 cm^{-1} referem-se à amina terciária e a banda média em 1086 cm^{-1} e em 726 cm^{-1} referem-se ao anel aromático.

4.1.1.6. Quantificação do fármaco

A Tabela 07 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor do cloridrato de lidocaína na matéria prima.

Tabela 07: Dados da determinação do teor do cloridrato de lidocaína (n=5)

Massa (g)	Vol. Titulado (mL)	Vol. Branco (mL)	Vol. Real (mL)	Teor (%)
0,1009	6,3889		6,3267	97,79
0,1009	6,4330		6,3708	98,85
0,1004	6,3970	0,0621	6,3348	98,40
0,1011	6,4433		6,3811	98,43
0,1001	6,3373		6,2751	97,78
			Média	98,25
			DPR (%)	0,66

O teor obtido para a matéria-prima está compreendido na faixa de 97,5 a 102,5% de cloridrato de lidocaína, conforme especificação farmacopeica (USP 31, 2008), podendo ser utilizada no desenvolvimento da formulação objetivada neste trabalho e a sua utilização como padrão de trabalho no desenvolvimento e validação da metodologia analítica para o mesmo.

4.1.2. Digluconato de clorexidina

4.1.2.1. Aspecto

Na caracterização do aspecto do fármaco, foi encontrado um líquido amarelo-acastanhado, estando de acordo com o aspecto descrito na referência utilizada.

4.1.2.2. Densidade relativa

A densidade relativa foi determinada com o valor de 1,063 g/mL, estando de acordo com a densidade descrita na referência utilizada.

4.1.2.3. Solubilidade

A tabela 08 apresenta os resultados obtidos na determinação da solubilidade do digluconato de clorexidina.

Tabela 08: Dados da determinação da solubilidade do digluconato de clorexidina

Amostra	Massa (g)	Solvente (g)	Solubilidade
1	1,0	5 (etanol 95%)	Solúvel
2	1,0	3 (acetona PA)	Solúvel

A miscibilidade com água é óbvia pelo fato da matéria-prima se tratar de uma solução aquosa deste fármaco a 20% e garante a sua utilização em uma formulação contendo água como solvente. A solubilidade em etanol é suficiente para o desenvolvimento de uma formulação utilizando este solvente e que permite que este seja utilizado na concentração de 0,25%.

4.1.2.4. Espectrofotometria de ultravioleta

A Figura 17 apresenta, respectivamente, o espectro de varredura no ultravioleta da amostra e da referência (MOFFAT *et al.*, 2004) do digluconato de clorexidina.

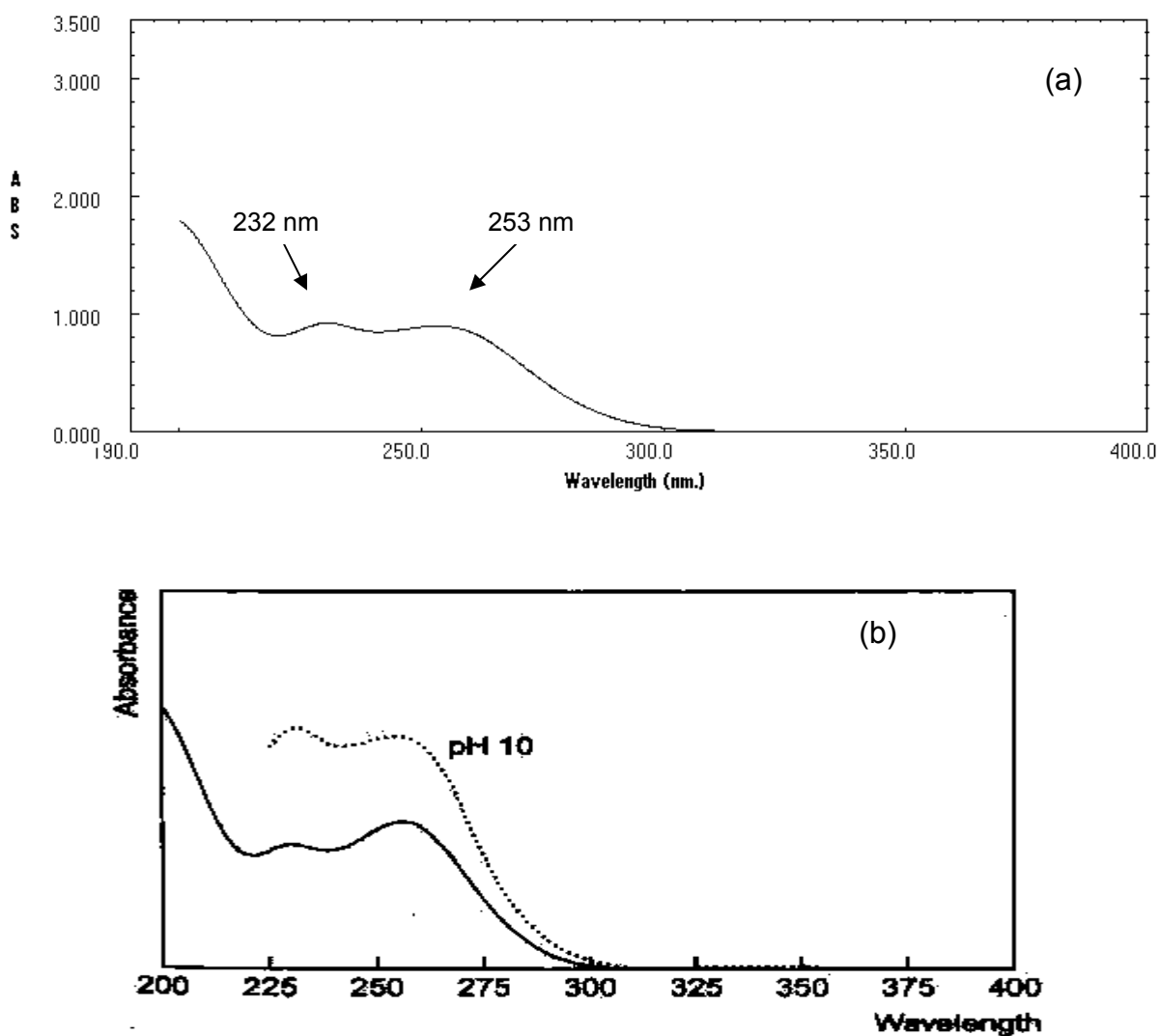


Figura 17: Espectro de ultravioleta da matéria-prima (a) obtido experimentalmente e referencia (b) de digluconato de clorexidina, com máximos em 232 e 253 nm (MOFFAT *et al.*, 2004).

A varredura em espectrofotometria de ultravioleta do digluconato de clorexidina (matéria-prima), conforme a figura 17a, apresentou os picos máximos característicos do fármaco e descritos na literatura e apresentados na figura 17b.

4.1.2.5. Espectrofotometria no infravermelho

A Figura 18 apresenta, respectivamente, o espectro de varredura no infravermelho da amostra (a) e do padrão de trabalho (b) do digluconato de clorexidina.

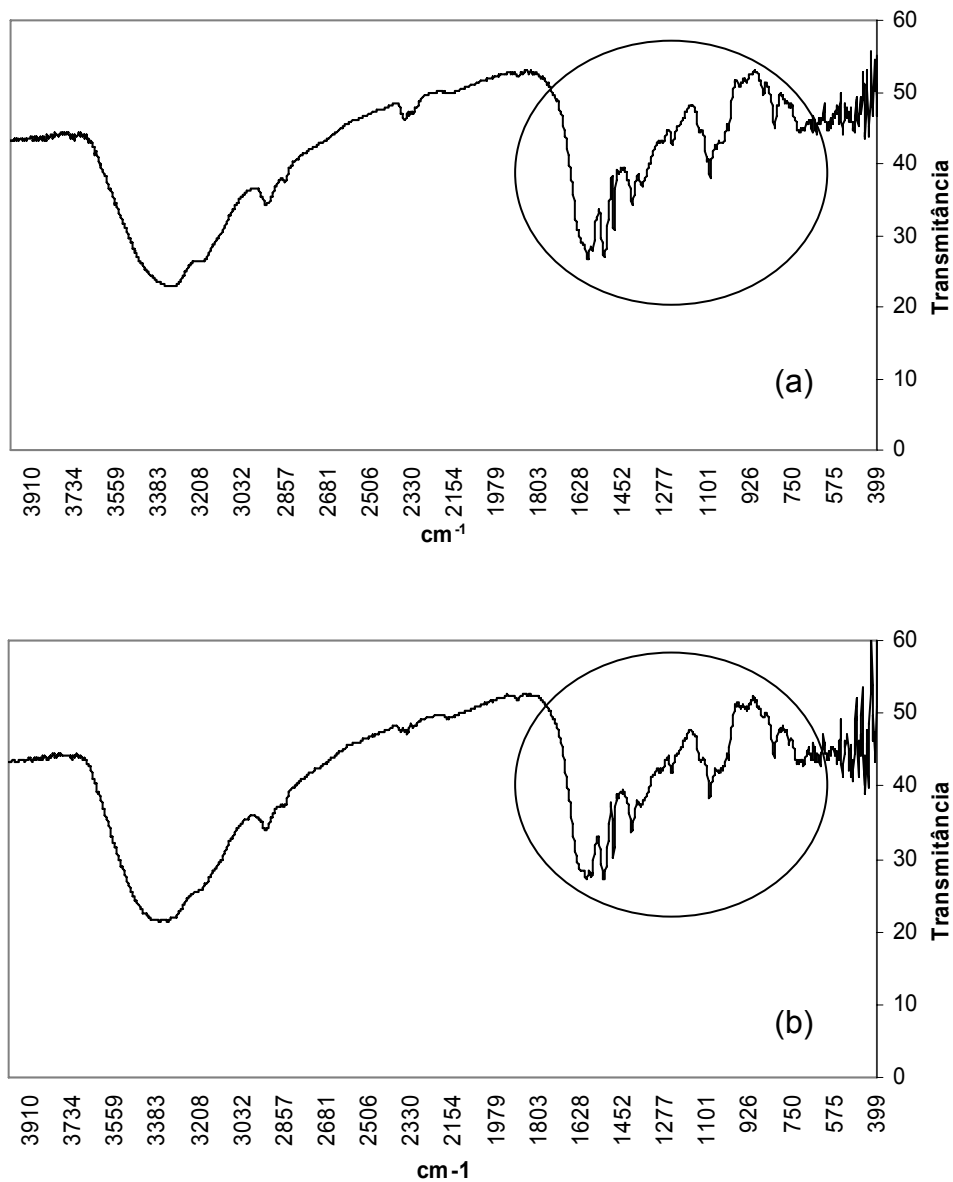


Figura 18: Espectros de infravermelho do digluconato de clorexidina matéria-prima (a) e do padrão (b), obtidos experimentalmente.

No espectro estão presentes as bandas principais da clorexidina, conforme destacado na Figura 18, onde as bandas fortes em 1628, 1575 e 1527 cm^{-1} referem-se ao grupamento imina, a banda média em 1235 cm^{-1} referem-se à amina secundária ligada ao anel aromático e as bandas fracas em 1080 e 820 cm^{-1} referem-se aos anéis aromáticos (MOFFAT *et al.*, 2004).

4.1.2.6. Quantificação do fármaco

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor da solução do digluconato de clorexidina a 20% na matéria-prima.

Tabela 09: Dados da determinação do teor do digluconato de clorexidina (n=5)

Massa (g)	Vol. Titulado (mL)	Vol. Branco (mL)	Vol. Real (mL)	Teor (%)
1,0006	8,823		8,737	20,83
1,0002	8,883		8,797	20,98
1,0003	8,927	0,0863	8,841	21,08
1,0004	8,855		8,769	20,91
1,0001	8,942		8,856	21,12
			Média	20,98
			DPR (%)	0,46

O teor obtido para a matéria-prima está compreendido na faixa de 19 a 21% de digluconato de clorexidina na solução, conforme especificação farmacopeica (Brith. Pharm., 2008), garantido assim a sua utilização no desenvolvimento da formulação objetivada neste trabalho e a sua utilização como padrão de trabalho no desenvolvimento e validação da metodologia analítica para o mesmo.

4.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DO CLORIDRATO DE LIDOCAÍNA E DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NAS FORMULAÇÕES

4.2.1. Desenvolvimento da metodologia analítica

4.2.1.1. Determinação das condições ótimas quanto ao percentual dos constituintes da fase móvel e do diluente

Os cromatogramas na Figura 19 apresentam os diferentes tempos de retenção e amplitude obtidos para os componentes presentes na amostra contendo o placebo contaminado com os fármacos para cada fase móvel testada, onde se utilizou solução diluente similar sem trietilamina. A tabela 10 apresenta os tempos de retenção dos fármacos em função da composição da fase móvel utilizada.

A variação da concentração de metanol na fase móvel alterou significativamente o tempo de retenção da clorexidina, mas não sobre o tempo de retenção da lidocaína que não apresentou alteração significativa. A variação de 60 a 65% de metanol da fase móvel promoveu a redução do tempo de retenção da clorexidina de 14,5 para 6,4 minutos, conforme a Tabela 10. Esta variação do tempo de retenção da clorexidina decorre do fato de a redução da concentração de metanol na fase móvel reduz a capacidade deste estabelecer interações de caráter hidrofóbico com esta fase, ocorrendo, assim, o aumento pronunciável do tempo de retenção deste fármaco que encontra na fase estacionária um microambiente mais favorável ao estabelecimento deste tipo de interação.

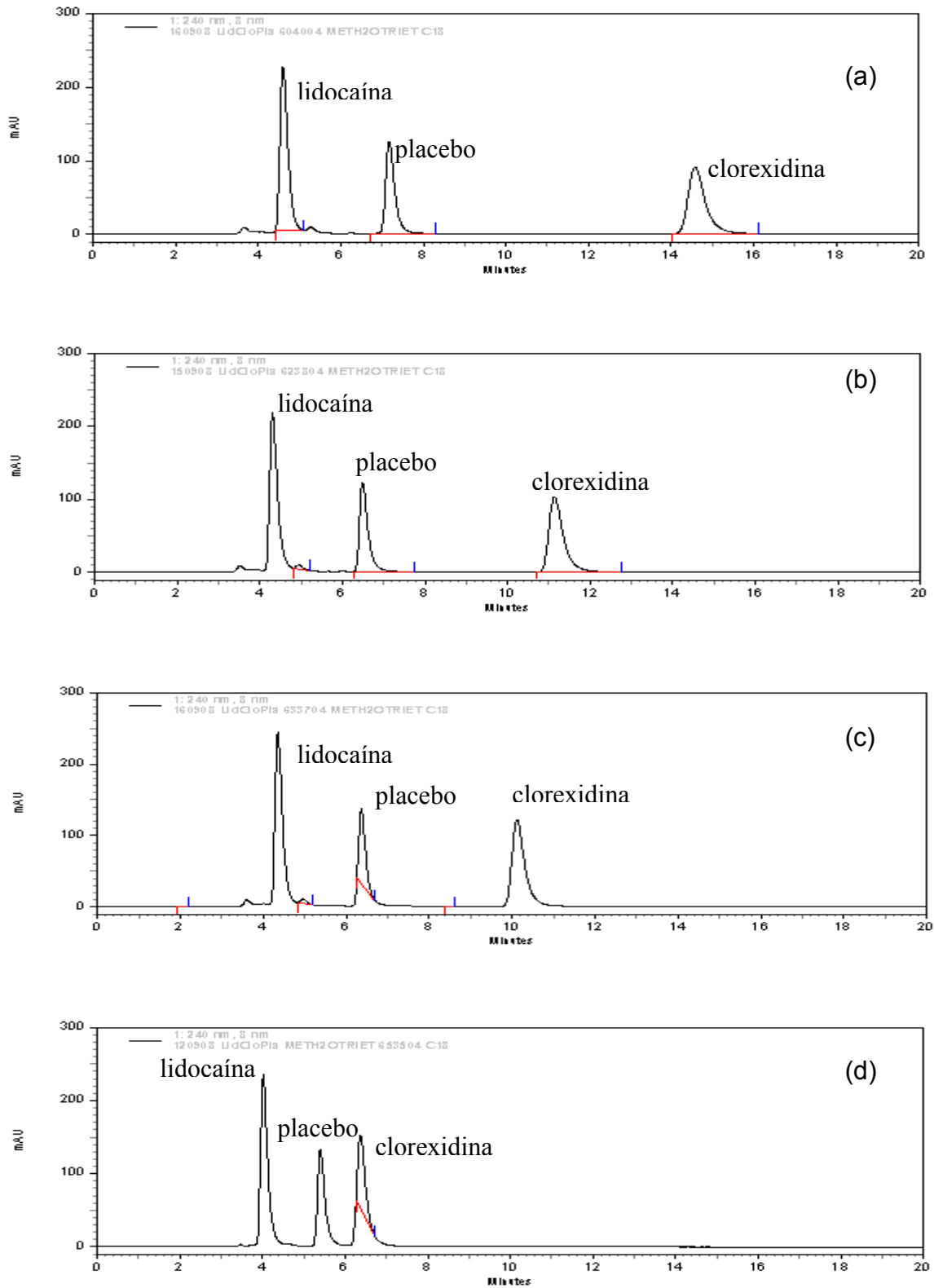


Figura 19: Cromatograma referente à eluição de placebo contaminado com fármacos em fase móvel metanol/água/trietilamina 60:40:0,4 (a), 62:38:0,4 (b), 63:37:0,4 (c) e 65:35:0,4 (d) com pH 3,5 e fluxo de 0,8 ml/min.

Tabela 10: Tempos de retenção dos fármacos em função da variação percentual dos componentes da fase móvel

Fase Móvel Metanol:Água Purificada:Trietilamina	Tempo de Retenção Lidocaína (min)	Tempo de Retenção Clorexidina (min)
65:35:0,4	4,0	6,4
63:37:0,4	4,4	10,1
62:38:0,4	4,4	11,2
60:40:0,4	4,6	14,5

A adição de trietilamina na concentração estabelecida à fase móvel permitiu a obtenção de picos cromatográficos de maior simetria para ambos os fármacos, devido a já relatada capacidade desta substância em recobrir os grupamentos silanóis livre presentes na coluna C18. Este recobrimento minimizou interações mediadas por estes grupamentos livres da coluna com os fármacos e que normalmente visualizadas pelo surgimento de arrastes ou caldas nos picos. Esta adição não promoveu a alteração na separação e no tempo de retenção dos fármacos.

A variação do pH da fase móvel de 3,0 a 4,0 não gerou alterações significativas no tempo de retenção dos fármacos, mas afetou a qualidade do pico de clorexidina à medida que o caráter básico deste aumentava acima da faixa mencionada.

A variação da concentração de metanol na fase móvel não promoveu alteração dos parâmetros de qualificação do método cromatográfico para a lidocaína. A redução da concentração de metanol na fase móvel de 63 para 60 partes de metanol gerava, favoravelmente, o aumento da resolução (28,42) para clorexidina, mas, desfavoravelmente, reduzia o número de pratos teóricos (6247) e aumentava a assimetria (1,50) e o tempo de retenção (14,5).

Este comportamento dos parâmetros de qualificação do método cromatográfico para a lidocaína e clorexidina foi similar ao descrito anteriormente e

que determinou estes dois fármacos em formulação mais complexa (XU e WONG, 1999).

A composição da fase móvel escolhida para execução do método de quantificação dos fármacos na presença dos componentes da matriz foi a de 63 partes de metanol, 37 partes de água e 0,4 partes de trietilamina com pH final de 3,5. A assimetria determinada para o método cromatográfico com essa fase móvel para lidocaína foi de 1,66 e para clorexidina foi de 1,47, ambos os valores inferiores a 2. O número de pratos teóricos para lidocaína foi de 3691 e para clorexidina de 6707, ambos os valores superiores a 2000 (US FDA, 1994).

Os demais parâmetros cromatográficos definidos para o método analítico são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Parâmetros cromatográficos e as especificações gerais definidos para o método analítico a ser validado

Parâmetros Cromatográficos	Especificações
Coluna Cromatográfica	CLC – ODS 18 Shimi-pack 25 x 4,6 mm (tamanho da partícula de 0,5 µm)
Eluição	Isocrática
Fase Móvel	Metanol 63%+ Água Purificada 37% + Trietilamina 0,4% pH 3,5
Fluxo de Corrida	0,8 mL/minuto
Tempo de Corrida	15 minutos
Comprimento de Onda (λ)	240 nm
Volume de Injeção	20 µl
Diluyente	Metanol 63% + Água Purificada 37% pH 3,5
Temperatura	Temperatura ambiente

4.2.2. Validação da metodologia analítica

4.2.2.1. Determinação da especificidade

4.2.2.1.1. Determinação da especificidade para os fármacos na presença da matriz da formulação

A Figura 20 demonstra a pureza dos fármacos lidocaína (Figura 20a) e clorexidina (Figura 20b) para o método. Os cromatogramas apresentados na Figura 21 demonstram a especificidade do método para os fármacos na presença dos componentes da matriz da formulação.

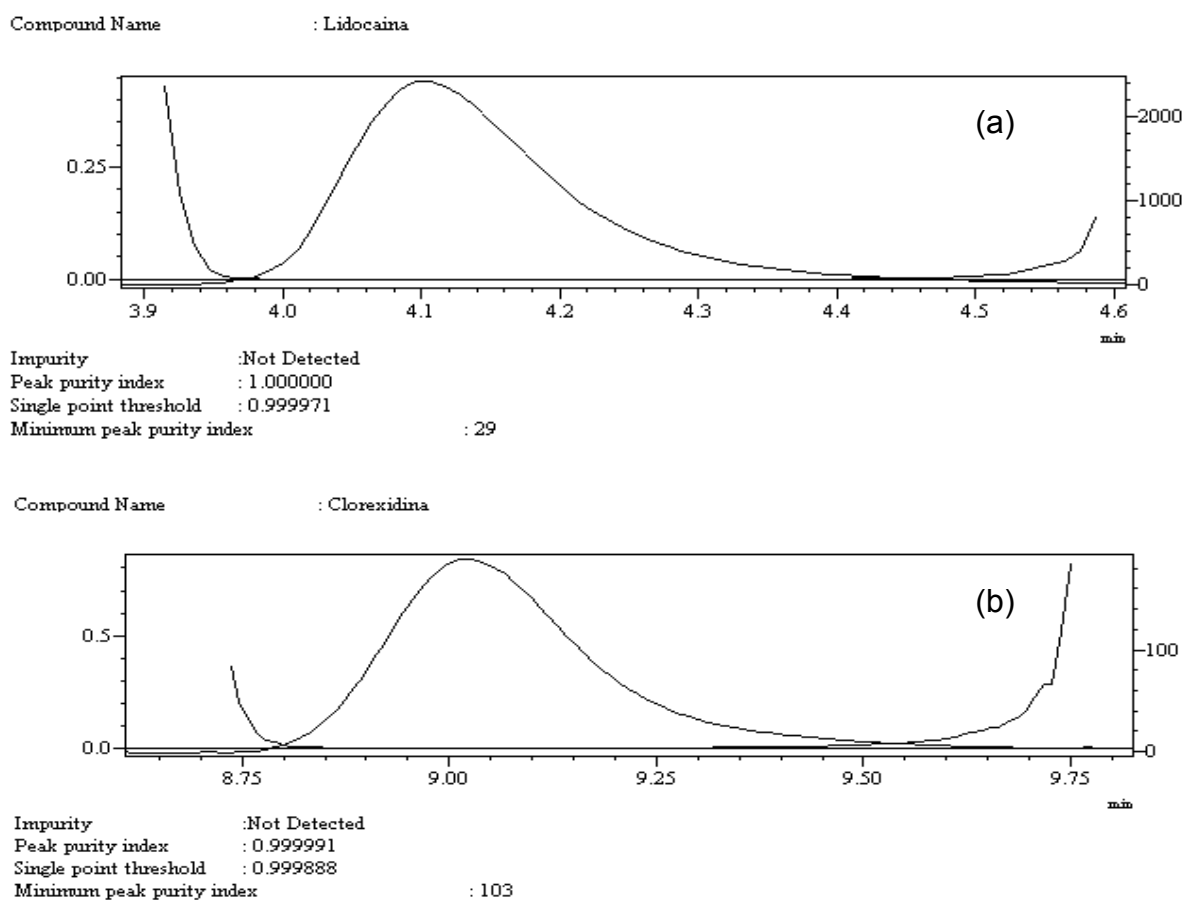


Figura 20: Determinação da pureza para lidocaína (a) e clorexidina (b).

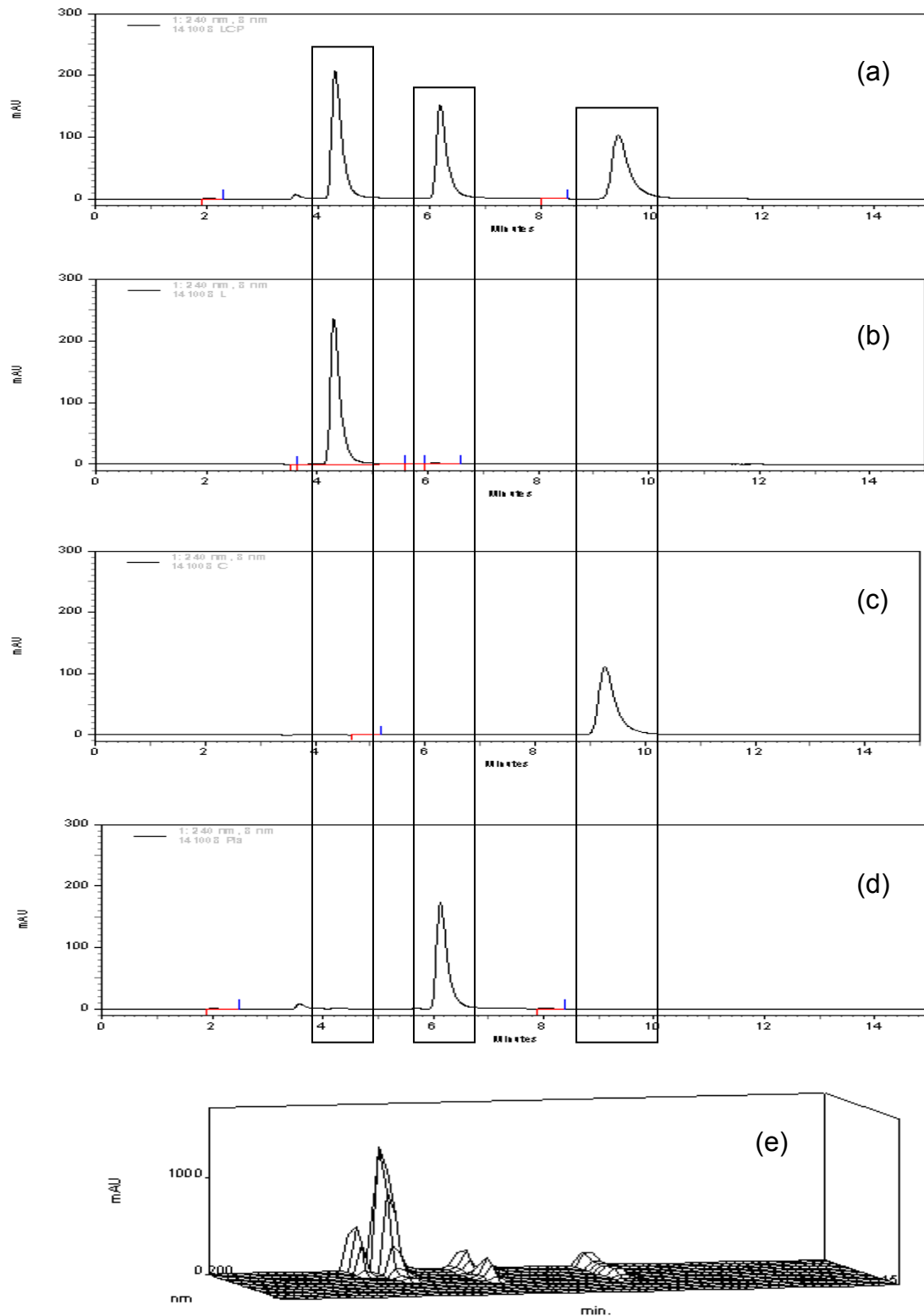


Figura 21: Especificidade do método demonstrada para a formulação completa (a); do cloridrato de lidocaína (b); do digluconato de clorexidina (c), dos componentes da matriz (d) e varredura da formulação completa (e).

Na determinação da especificidade do método para os fármacos na presença dos componentes da matriz da formulação, os cromatogramas individuais obtidos com cada fármaco e com a amostra da matriz da formulação revelaram a não ocorrência de sobreposição de quaisquer picos, nem mesmo observando pela varredura espectroscópica da amostra contendo todos os componentes da formulação. Fica assim estabelecida a especificidade do método para os fármacos na presença dos componentes da matriz da formulação.

4.2.2.1.2. Determinação da especificidade para os fármacos na presença da matriz da formulação e dos produtos de degradação

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 22 e 23 demonstram a especificidade do método para os fármacos na presença dos componentes da matriz da formulação e dos produtos de degradação.

A especificidade de um método mostra a capacidade que este possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (também chamados de interferentes), produzindo assim respostas distintas para cada componente da amostra. A sua comprovação pode ser realizada pela comparação analítica entre uma matriz isenta da substância de interesse (placebo), uma matriz adicionada de substâncias padrão e uma matriz adicionada de substâncias padrão e dos produtos de degradação, sendo que nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção da substância em estudo, isto é, o pico cromatográfico de resposta deve ser exclusivamente do composto em estudo.

Na determinação da especificidade do método para a lidocaína e clorexidina na presença dos componentes da matriz da formulação e dos principais produtos de degradação (USP, 2008), os cromatogramas revelaram a não ocorrência de sobreposição de picos dos fármacos com os respectivos produtos de degradação e nem com os componentes da matriz, nem mesmo pela observação da varredura espectroscópica, mas demonstrou a sobreposição dos picos dos produtos de degradação entre si.

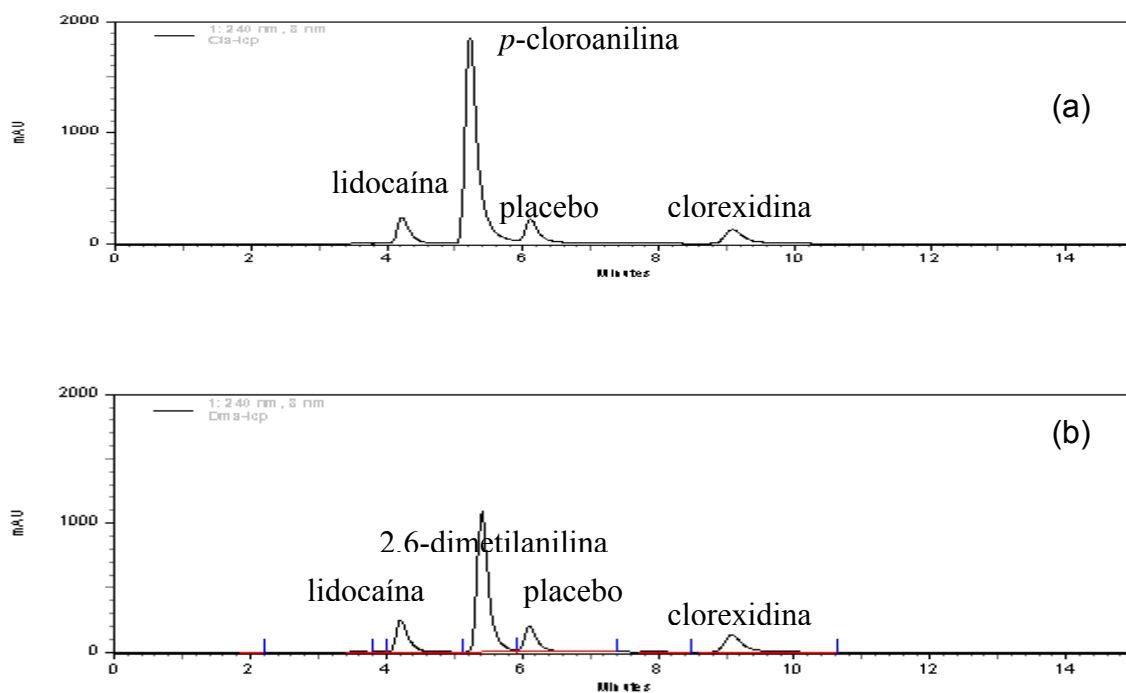


Figura 22: Cromatograma referente à eluição de placebo contaminado com fármacos e os produtos de degradação *p*-cloroanilina (a) e 2,6-dimetilanilina (b).

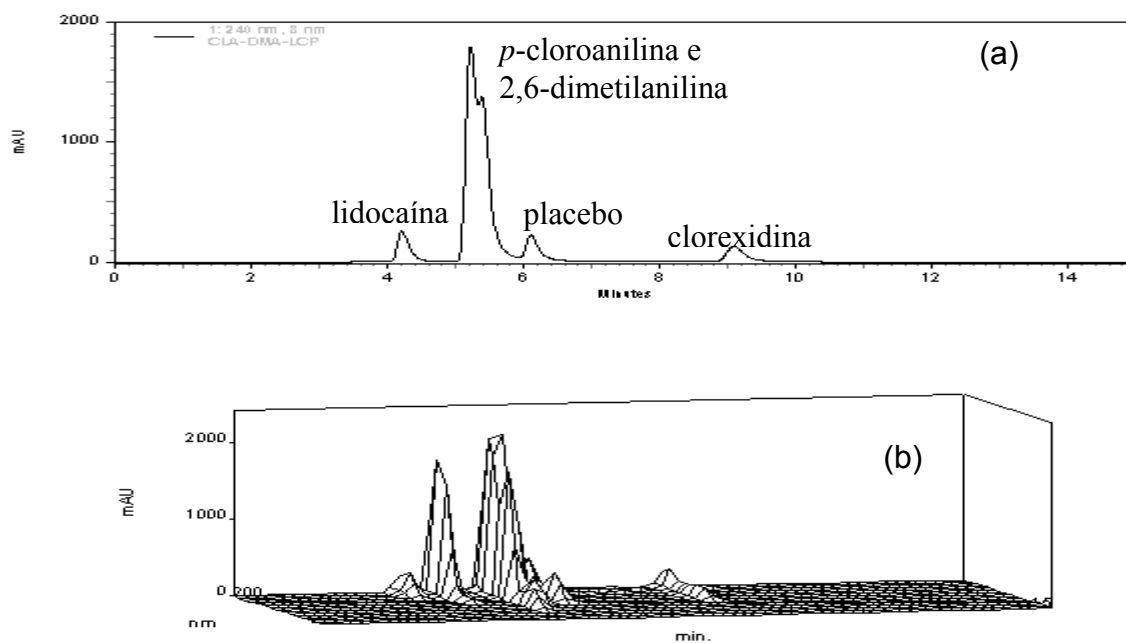


Figura 23: Cromatogramas referente à (a) eluição de placebo contaminado com fármacos e os produtos de degradação *p*-cloroanilina e 2,6-dimetilanilina e (b) espectro de varredura.

Estes resultados suportam a utilização do método de extração e acondicionamento das amostras como adequado, isto é, estas etapas geram amostras capazes de terem os fármacos separados e detectados na presença dos componentes da matriz da formulação e dos produtos de degradação nas condições cromatográficas definidas para o método por CLAE.

Desta maneira, ficou estabelecida a especificidade do método para os fármacos na presença dos componentes da matriz da formulação e na presença e dos principais produtos de degradação farmacopéicos, mesmo que este não tenha permitido a quantificação destes produtos de degradação individualmente.

4.2.2.2. Determinação da linearidade

As curvas padrão médias estão demonstradas nas Figuras 24 e 25. A Tabela 12 apresenta os valores para o coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e o coeficiente de correlação (r) para as curvas padrão medias dos fármacos.

A linearidade é definida como a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse. Essa relação de proporcionalidade é expressa pela regressão linear da curva analítica que permite a obtenção de parâmetros estatísticos, como coeficiente de correlação linear (r), que são avaliados a fim de assegurar sua qualidade.

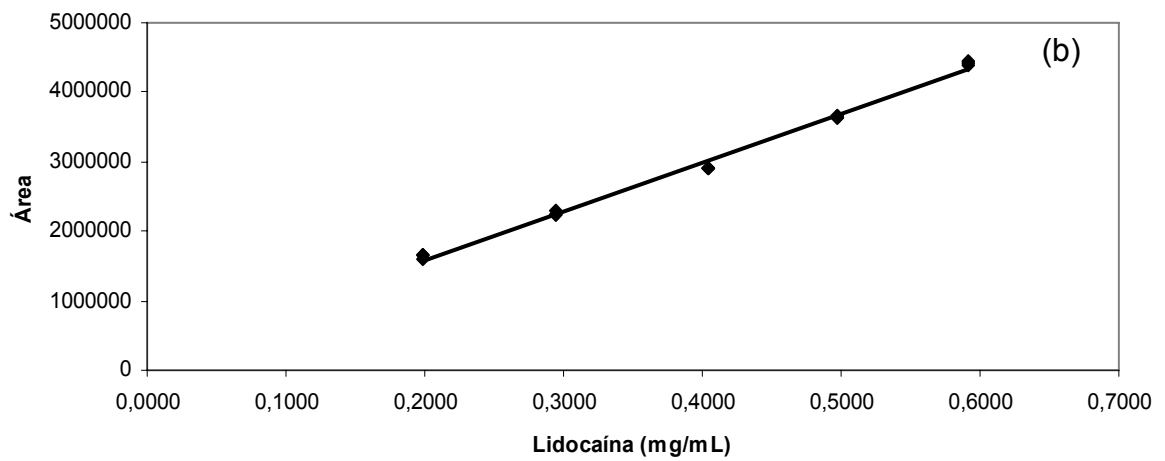
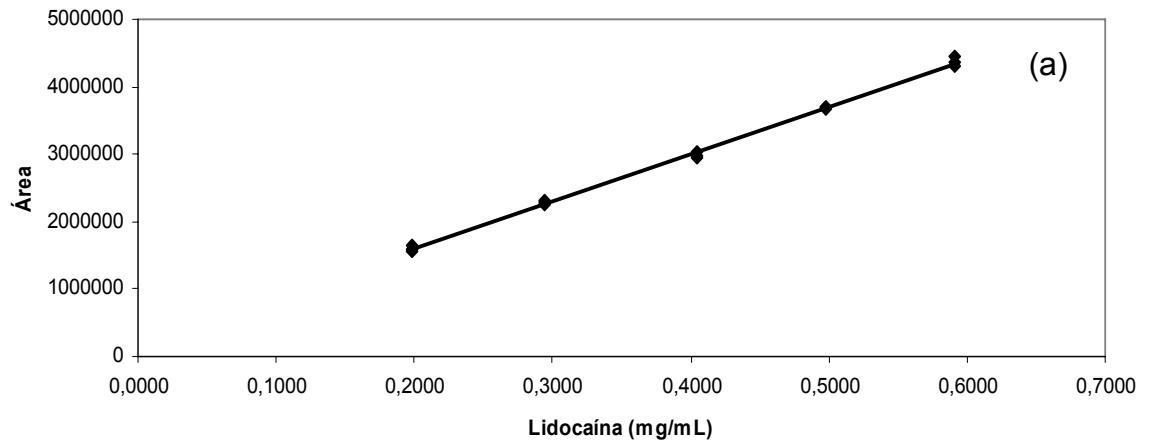


Figura 24: Curva padrão média de cloridrato de lidocaína no 1º dia (a) e no 2º dia (b)

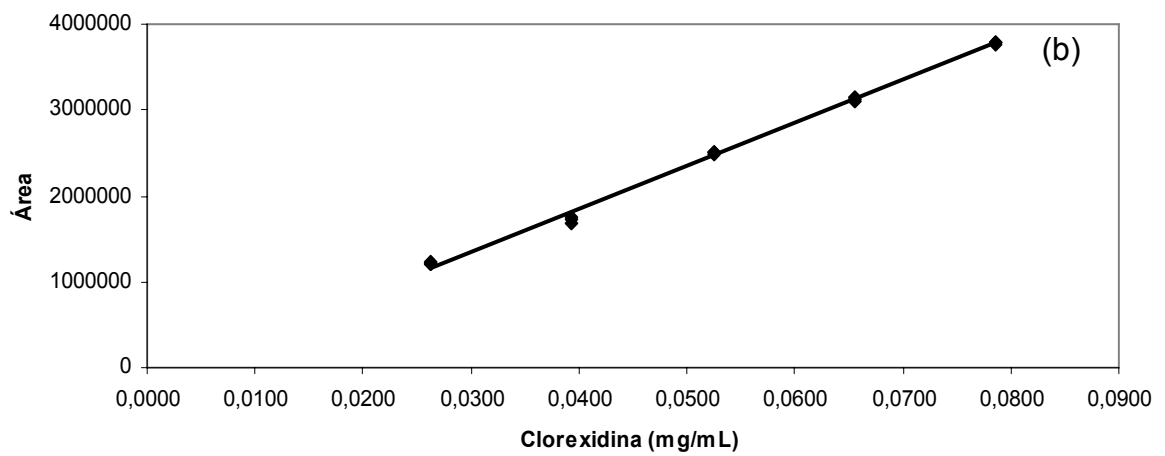
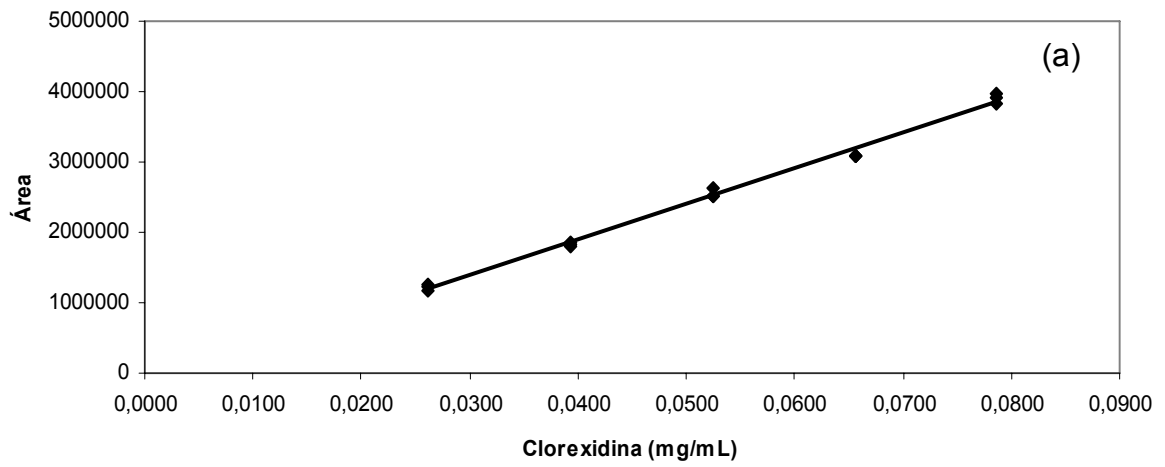


Figura 25: Curva padrão média de digluconato de clorexidina no 1º dia (a) e no 2º dia (b)

Tabela 12: Parâmetros da linearidade do método analítico

Parâmetros avaliados	Lidocaína	Clorexidina
Inclinação (b)	7015394 ± 17427,4	54433871 ± 617649,2
Intercepto (a)	191754,5 ± 1727,5	-285845 ± 4358,6
<i>r</i>	0,99925 ± 0,00007	0,9975 ± 0,0004

Média ± DP; n=2.

Estes resultados deram suporte para utilização do fator de diluição aplicado a amostra da formulação contendo os fármacos de maneira que a solução final obtida contenha os fármacos em concentração capaz de ser medida com sensibilidade e linearidade para permitir a quantificação destes pelo método.

A linearidade foi comprovada face aos valores de inclinação significativos e valores de coeficiente de correlação linear superiores a 0,99, para ambos os fármacos, de acordo com a RE 899 (BRASIL, 2003) que assume como critério mínimo de aceitação para comprovação de linearidade valores maiores que 0,99 de coeficiente de correlação linear.

4.2.2.3. Determinação da precisão

A precisão do método é representada pela dispersão dos resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra e pode ser considerada em três níveis distintos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade é o nível da precisão de um método que representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as

mesmas condições de medição, quais sejam: mesmo analista, instrumento, local, procedimento e repetições efetuadas em curto intervalo de tempo.

O efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores é medido pela chamada precisão intermediária.

A repetibilidade e a precisão intermediária são expressas por meio da estimativa do desvio padrão relativo (DPR).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuada em diferentes laboratórios, portanto sob condições variadas, tais como diferentes operadores, local, equipamentos, entre outros.

A precisão de injeção do cromatógrafo em operação nas condições analíticas estabelecidas para o método de quantificação dos fármacos pode revelar a conformidade dos ajustes realizados durante as manutenções periódicas e qualificação do aparelho.

A Tabela 13 apresenta os valores de desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) para a determinação da precisão de injeção para lidocaína e clorexidina.

A determinação da precisão de injeção do cromatógrafo para lidocaína e para clorexidina foi realizada pela avaliação do desvio padrão relativo que apresentou valores inferiores a 2% (Tabela 13), conforme especificado na legislação utilizada como referência (USP 31, 2008).

Tabela 13: Precisão de injeção do cromatógrafo para lidocaína e clorexidina

Concentração (%)	Lidocaína		Clorexidina	
	Média ± DP	DPR (%)	Média ± DP	DPR (%)
80	2782233,00 ± 53132,63	1,91	2018904,33 ± 37835,59	1,87
100	2925773,67 ± 7423,25	0,25	2508363,33 ± 4696,21	0,19
120	3633650,33 ± 22470,12	0,62	3017698,67 ± 18446,73	0,61

n=3

As Tabelas 14 e 15 apresentam os valores de desvio padrão relativo (DPR) para a determinação da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia) para lidocaína e clorexidina, respectivamente.

Tabela 14: Repetibilidade e precisão intermediária do método para lidocaína.

Concentração (%)	Dia	Área sob o pico	DP	Precisão intradia DPR (%)	Precisão interdia DPR (%)
80	1	2761547	26219,631	0,94	1,61
		2813985			
		2787451			
	2	2683619	36740,566	1,35	
		2744241			
		2749893			
100	1	3102148	13776,078	0,45	1,39
		3085497			
		3074812			
	2	3108475	46335,929	1,47	
		3195874			
		3125489			
120	1	3708974	45016,335	1,22	1,11
		3694751			
		3624871			
	2	3648719	43555,115	1,19	
		3619875			
		3705481			

Tabela 15: Repetibilidade e precisão intermediária do método para clorexidina

Concentração (%)	Dia	Área sob o pico	DP	Precisão intradia DPR (%)	Precisão interdia DPR (%)
80	1	2049852	33747,13	1,65	1,76
		2079847			
		2012487			
	2	1974800	27202,432	1,36	
		2015078			
		2026612			
100	1	2493331	12754,312	0,51	0,35
		2518528			
		2502487			
	2	2496134	4753,842	0,19	
		2501924			
		2505560			
120	1	2981971	13965,845	0,47	1,22
		2993257			
		2965487			
	2	2895748	25612,520	0,88	
		2930154			
		2945817			

A determinação da repetibilidade (precisão intradia) e da precisão intermediária (precisão interdia) do método para lidocaína e clorexidina foram realizadas pela avaliação dos desvios padrão relativos para cada situação que apresentaram valores inferiores a 5%, conforme especificado na legislação utilizada como referência (BRASIL, 2003).

4.2.2.4. Determinação da exatidão

A determinação da exatidão na validação de um método permite estabelecer a existência de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

Para execução de tal determinação, o uso de substâncias químicas de referência (SQR), comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão são os processos mais utilizados. Neste trabalho foi utilizado o método de recuperação, onde quantidades conhecidas dos fármacos foram adicionadas em diferentes níveis aos componentes da matriz (placebo). A recuperação é avaliada por meio da proporção da quantidade dos fármacos que foi extraída e quantificada em relação à quantidade adicionada.

As Tabelas 16 e 17 apresentam os valores percentuais de recuperação e de desvio padrão relativo (DPR) para a determinação da exatidão do método para lidocaína e clorexidina, respectivamente, onde cada concentração foi determinada em triplicata.

Tabela 16: Exatidão do método para lidocaína

Concentração (%)	Quantidade adicionada (mg/mL)	Quantidade recuperada (mg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
80	363	364,0	100,4	1,21
100	407	405,1	99,6	0,69
120	481	482,0	100,1	0,31

DPR = Desvio Padrão Relativo

Tabela 17: Exatidão do método para clorexidina

Concentração (%)	Quantidade adicionada (mg/mL)	Quantidade recuperada (mg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
80	42,0	42,2	100,7	1,53
100	52,5	52,5	100,1	1,21
120	62,9	61,7	98,1	0,08

DPR = Desvio Padrão Relativo

O método foi considerado exato para lidocaína e clorexidina, pois os valores de recuperação encontrados para ambos os fármacos ficaram entre 98,1 e 100,7, valores compreendidos entre 98 e 102%, conforme especificado no compêndio utilizado como referência (ICH, 2005).

4.2.2.5. Determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) do método representa a menor concentração dos fármacos que o método analítico é capaz de detectar, mas não necessariamente quantificar. A determinação deste limite permite correlacionar a concentração das substâncias medidas com o sinal obtido e que estas estão presentes em concentrações maiores do que zero com 95% ou 99% de confiança.

O limite de quantificação (LQ) do método representa a menor concentração dos fármacos que o método analítico é capaz de quantificar com precisão e exatidão.

As Tabelas 18 e 19 apresentam o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método para a lidocaína e clorexidina, respectivamente. A faixa de variação do percentual de cada fármaco foi de 50 até 150%, isto é, variação da concentração de 200 a 600 µg/mL para lidocaína e de 25 a 75 µg/mL para clorexidina.

Tabela 18: Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para lidocaína

<i>Variáveis da equação da reta ($y=bx+a$)</i>	<i>Valores das variáveis</i>	<i>Média da Inclinação (b)</i>	<i>DP do Intercepto (a)</i>	<i>LD ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>LQ ($\mu\text{g/mL}$)</i>
Inclinação (b)	6950250	7027717	6303	2,7	9,0
	7086095				
	7046807				
Intercepto (a)	197387				
	195786				
	185756				

DP = desvio padrão

Tabela 19: Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para clorexidina

<i>Variáveis da equação da reta (y=bx+a)</i>	<i>Valores das variáveis</i>	<i>Média da Inclinação (b)</i>	<i>DP do Intercepto (a)</i>	<i>LD (µg/mL)</i>	<i>LQ (µg/mL)</i>
	54339195				
Inclinação (b)	54945977				
	55326673				
		54870615	11681	0,6	2,1
	-292317				
Intercepto (a)	-286232				
	-269740				

DP = desvio padrão

O estabelecimento dos valores de limites de detecção e de quantificação para os fármacos por um método analítico é importante quando existe a intenção de utilizá-los na quantificação de quantidades dos fármacos em quantidades menores que a faixa de linearidade estudada. Estes valores direcionam o delineamento racional de estudos posteriores com a formulação completa que tenham a pretensão determinar as interações dos fármacos com a estrutura da matriz da formulação ou destes fármacos em outros microambientes. Os estudos de liberação, permeação e retenção *in vitro* podem ser citados como exemplos de estudos que aplicam métodos analíticos validados que devem possuir limites de detecção e de quantificação definidos, pois estes estudos utilizam membranas sintéticas ou naturais (para os dois últimos citados) para mimetizar condições *in vivo* onde a concentração presente do fármaco, em diferentes microambientes, varia dentro de uma amplitude desconhecida.

4.2.2.6. Determinação da robustez

A robustez de um método analítico revela o quão sensível este se apresenta frente a pequenas variações que possam ocorrer quando este está sendo executado. O método analítico apresenta etapas cruciais do procedimento para que a sua finalidade seja alcançada e a influencia de pequenas variações neste procedimento analítico vão depender das características físico-químicas do fármaco.

A introdução de pequenas variações planejadas para verificação da robustez do método analítico ainda pode revelar a sua aplicabilidade em outros estudos da formulação que contenha os fármacos de interesse.

Com intuito de verificar a robustez do método, a etapa de preparo da amostra foi selecionada como a variação planejada e chamada de preparo da amostra modificado. Este preparo da amostra modificado consistiu no preparo da solução analítica dos fármacos utilizando a mistura água:metanol 50:50 sem correção de pH como diluente, permitindo a verificação da influencia do meio de solubilização da amostra na sensibilidade do método analítico.

As referências consultadas para determinação de um meio receptor para a realização do estudo de liberação dos fármacos a partir da formulação revelaram que a água seria o solvente capaz de solubilizar os fármacos adequadamente (SENEL, 2000b; RICCI *et al.*, 2005). A adição de volume igual de metanol a alíquota do meio receptor (aquoso) retirado para quantificação dos fármacos liberados, sem a correção do pH, apresentou as mesmas condições verificadas com o preparo da amostra modificado nesta verificação da robustez.

A Tabela 20 apresenta os valores de desvios padrão relativos de precisão dos resultados de quantificação obtidos a partir de amostras com o mesmo diluente (intradiluyente) e com diluentes diferentes (interdiluyentes).

Tabela 20: Robustez para lidocaína e clorexidina em função da variação do diluente no preparo da amostra

Fármaco (100%)	Diluente MetOH:H₂O	Área sob o pico	DP	Precisão intradiluyente DPR (%)	Precisão interdiluyente DPR (%)
Lidocaína	63:37 pH 3,5	3017194	6536,793	0,22	2,31
		3028495			
		3028537			
	50:50	2901182	1273,532	0,44	
		2898740			
		2900588			
Clorexidina	63:37 pH 3,5	2487516	5418,751	0,22	0,90
		2498331			
		2493528			
	50:50	2462807	7923,644	0,32	
		2451332			
		2447604			

A proporção dos solventes constituintes do diluente é um fator que pode alterar a solvatação dos analitos presentes na amostra e estas alterações no meio de solvatação podem alterar perfil de absorção de métodos espectroscópicos por ultravioleta (SKOOG *et al*, 2002). Além disso, o pH do diluente também se encontrava alterado e a influência deste no perfil de absorção ultravioleta de fármacos pode ocorrer (MOFFAT *et al*, 2004).

A solução diluente composta pelos solventes metanol e água purificada na proporção 50:50 e apresentava pH 7,35, tendo a proporção dos solventes constituintes do diluente e o pH alterados e assim capazes de causar variações na sensibilidade do método analítico.

Os resultados dos experimentos utilizando os dois solventes demonstraram que o tempo de eluição e o perfil espectroscópico no ultravioleta dos fármacos no método analítico não sofreram alterações significativas.

Os valores de desvio padrão relativo das amostras utilizando diferentes diluentes se mantiveram inferiores a 5% para a lidocaína e para a clorexidina, não sendo diferentes significativamente. Ficou demonstrado que a utilização destes diferentes diluentes não alterou a capacidade de solubilização e condicionamento dos fármacos a partir da formulação completa para determinação pelo método analítico.

4.3. DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO COM OS FÁRMACOS ASSOCIADOS

4.3.1. Determinação da compatibilidade dos fármacos em meio aquoso e meio etanólico

Inicialmente foi realizada a mistura do digluconato de clorexidina com o cloridrato de lidocaína em meio aquoso, de acordo com a especificação de concentração para cada fármaco e do meio, utilizadas para preparo do Instillagel®. Porém, foi verificada uma incompatibilidade entre os fármacos neste meio.

Apesar desta associação ser descrita tanto no Formulário Nacional Britânico (2008) quanto na Farmacopéia Britânica (2008) como sendo um gel aquoso contendo sais solúveis nesta matriz, ocorreu a incompatibilidade do digluconato de clorexidina com o cloridrato de lidocaína em solução aquosa nas concentrações determinadas para a formulação proposta, sem precedentes na literatura.

A incompatibilidade do digluconato de clorexidina com outros sais utilizados em formulações farmacêuticas está descrita na literatura, tais como carbonatos, bicarbonatos, boratos, cloretos e outros (SWEETMAN, 1999).

Alguns artigos apresentaram estudos referentes à incompatibilidade deste fármaco com EDTA e com hipoclorito de sódio que em ambos os casos levavam a formação de precipitados, sendo que o primeiro caso leva a formação de quantidades não significativas de *p*-cloronilina e o segundo a formação de quantidades significativas deste produto de degradação (BASRANI *et al.*, 2007; RASIMICK *et al.*, 2008).

A mistura do cloridrato de lidocaína (2,0%) com o digluconato de clorexidina (0,25%) em meio aquoso levou a formação de um precipitado branco após alguns minutos.

Apesar do digluconato de clorexidina e do cloridrato de lidocaína serem sais solúveis em meio aquoso nas quantidades estipuladas para preparo da formulação, a precipitação decorrente da mistura destes sais pode ser explicada por características específicas destas moléculas: ambos os fármacos são sais orgânicos compostos por eletrólitos fracos, isto é bases fracas, e o digluconato de clorexidina é um sal polivalente, que é em geral menos solúvel que um sal monovalente (NEWTON, 2009).

A formulação comercial Instillagel® associa estes dois fármacos em um gel aquoso e não existe qualquer informação disponível sobre a ocorrência de formação de precipitado. Abdelmageed e colaboradores (2008) realizaram a avaliação da estabilidade da associação do Instillagel com sulfato de morfina para uso clínico utilizando método cromatográfico por CLAE e detecção por ultravioleta e seus resultados não demonstraram a ocorrência de produtos de degradação destes fármacos ou a formação de precipitado nas amostras armazenadas a 25°C.

Na figura 26 foi apresentada uma significativa diferença de estabilidade da mistura dos fármacos com o aumento da concentração de etanol na solução, principalmente em etanol 95%. Esta última solução foi avaliada por 72 horas e não apresentou turvação ou precipitação até o término deste período.

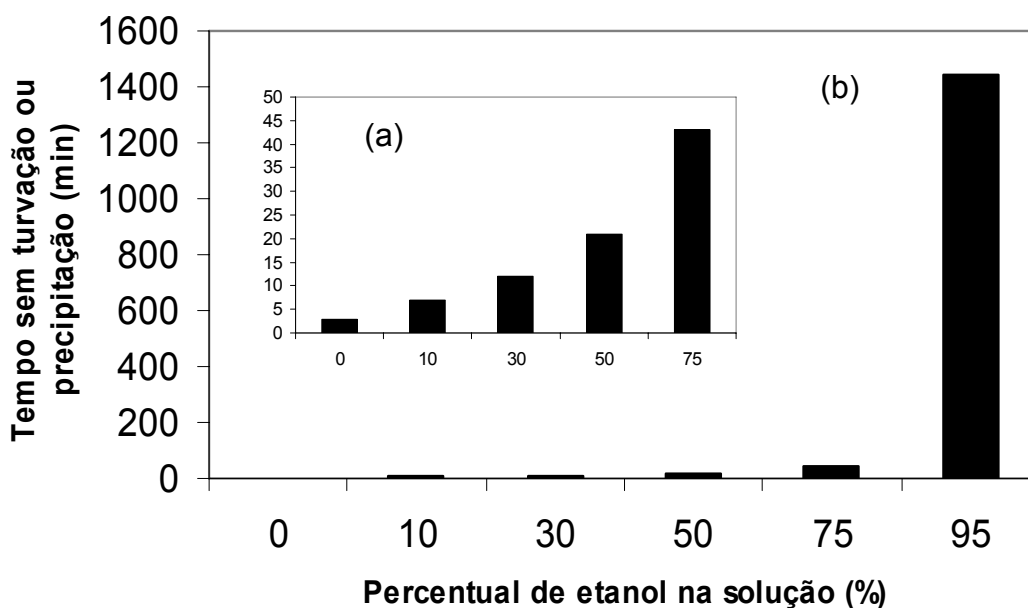


FIGURA 26: Percentual de etanol em solução *versus* tempo máximo de ausência de precipitação ou turvação de 0-75% (a) e 0-95% (b).

A água e o etanol são largamente utilizados como solventes em formulações farmacêuticas. Estes dois solventes são capazes de solubilizar satisfatoriamente ambos os fármacos em questão separadamente, mas os microambientes criados por cada um deles são notoriamente diferentes. Esta diferença foi evidenciada pela rápida precipitação em meio aquoso quando os fármacos são associados nas concentrações estabelecidas neste trabalho, mas que não ocorreu neste mesmo tempo em meio etanólico.

A diferença de polaridade entre estes dois solventes é a característica que permite explicar a capacidade de se contornar tal incompatibilidade. O etanol possui uma constante dielétrica (24,30) menor que a da água (78,40), gerando assim um microambiente menos capaz de solvatar os íons no meio, promovendo um deslocamento do equilíbrio para a formação de um par iônico pouco solvatado destes sais (LIDE, 2001). Por outro lado, em meio aquoso prevalece à dissociação

iônica dos sais por requerer menos energia que a solvatação da molécula como um todo, favorecendo esta incompatibilidade.

O fato do solvente alternativo (etanol) permitir uma estabilização temporária, mas superior ao obtido com o solvente inicial (água), indica que o precipitado seja um sal iônico de baixa solubilidade em meio aquoso. Ainda que seja temporária, esta estabilização forneceu a primeira alternativa para a continuidade do desenvolvimento farmacotécnico da formulação gel mucoadesiva proposta, mas requereu uma avaliação mais criteriosa para a determinação da viabilidade desta alternativa.

Como segunda alternativa para o desenvolvimento farmacotécnico da formulação gel mucoadesiva proposta, a inclusão de um dos fármacos em ciclodextrinas pode ser capaz de solucionar a incompatibilidade apresentada na associação destes em meio aquoso, levando-se em consideração as inúmeras alterações de características físico-químicas decorrentes do processo de inclusão de moléculas em ciclodextrinas (CHALLA *et al.*, 2005; LOFTSSON e DUNCHÊNE, 2007).

Algumas características do cloridrato de lidocaína foram levadas em consideração e justificaram a sua escolha como fármaco a ser incluso no lugar do digluconato de clorexidina. O cloridrato de lidocaína é o menos solúvel dos dois fármacos em meio aquoso (MOFFAT *et al.*, 2004) e o aumento da solubilidade do fármaco incluso é um dos indícios de inclusão em ciclodextrinas mais recorrente na literatura (LOFTSSON e DUNCHÊNE, 2007). A molécula de lidocaína ter tamanho menor que a de clorexidina, aumentando as chances da inclusão da molécula, como um todo no interior da cavidade da ciclodextrina e protegendo os sítios desta envolvidos na incompatibilidade. O cloridrato de lidocaína é um sólido e isto facilita a obtenção da mistura física de maneira simplificada, esta última importante na caracterização da inclusão por diversos métodos analíticos. Isto se dá pelo fato dos métodos de preparo do incluso de um fármaco em ciclodextrina mais simples e de rendimento elevado ocorrerem em fase líquida e a mistura física do fármaco em solução, caso do digluconato de clorexidina, com a ciclodextrina pode levar a ocorrência de inclusão indesejada. Por último, o cloridrato de lidocaína possui um

coeficiente de partição (octanol/água) maior que o do digluconato de clorexidina. A inclusão da lidocaína permitiria controlar a sua permeação e absorção sistêmica.

4.3.2. Obtenção e caracterização de inclusos de cloridrato de lidocaína em ciclodextrinas

4.3.2.1. Obtenção de incluso de cloridrato de lidocaína em ciclodextrinas – inclusão por empastamento (Kneading)

A inclusão do cloridrato de lidocaína em β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina foram realizadas pelo método de empastamento.

O estudo da complexação de lidocaína base com β -ciclodextrina realizado por Tatai e colaboradores (2007) apresentou indícios consistentes da formação de complexos de inclusão na proporção de 1:1 (molécula hóspede:ciclodextrina) utilizando o método de empastamento e do aumento de solubilidade do incluso em meio aquoso quando comparada à forma neutra da lidocaína. Levando em conta estes resultados obtidos por Tatai e colaboradores (2007) e a existência de poucos trabalhos que apresentem o comportamento de fármacos solúveis em água submetidos ao processo de inclusão, tais como o cloridrato de lidocaína, a β -ciclodextrina e a metil- β -ciclodextrina foram escolhidas por serem as ciclodextrinas disponíveis com solubilidade em meio aquoso imediatamente inferior e superior, respectivamente, ao cloridrato de lidocaína e com o volume de cavidade interna adequada para hospedar a lidocaína.

O procedimento de inclusão de cloridrato de lidocaína em β -ciclodextrina e em metil- β -ciclodextrina levou a obtenção de um sólido levemente amarelado que, após a evaporação do solvente, foi triturado, recuperado e pesado. O rendimento deste procedimento foi de 92,78% e de 94,51%, respectivamente.

A obtenção dos complexos de inclusão do cloridrato de lidocaína em β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina apresentaram rendimentos elevados e confirmaram a sua simplicidade de aplicação em escala laboratorial.

4.3.2.2. Caracterização dos complexos de inclusão

4.3.2.2.1. Determinação da constante de estabilidade da inclusão de cloridrato de lidocaína em ciclodextrinas

A Figura 27 apresenta a curva de correlação da absorbância da solução de lidocaína em função da adição de quantidades crescentes de β -CD e em função da adição de quantidades crescentes de metil- β -CD a uma solução aquosa de cloridrato de lidocaína, de absorbância praticamente nula ($< 0,001$), separadamente.

A análise das curvas de absorção demonstra uma menor variação das absorções lidas em função do aumento da concentração de metil- β -ciclodextrina comparado ao correspondente com a β -ciclodextrina. A situação reflete diretamente nos valores de constante de estabilidade que foram obtidos para a inclusão de lidocaína em cada uma das ciclodextrinas utilizadas.

A correlação entre a variação da absorbância lida na solução em função da concentração de β -CD adicionada ao cloridrato de lidocaína solubilizado no meio foi linear com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9996. A constante de estabilidade (K) do complexo de cloridrato de lidocaína- β -ciclodextrina foi calculada em $34954,09 \pm 995,4 \text{ M}^{-1}$. Para a solução utilizando a metil- β -CD, esta mesma correlação também foi linear com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9955. A constante de estabilidade (K) do complexo de cloridrato de lidocaína-metil- β -ciclodextrina foi calculada em $5565,28 \pm 819,9 \text{ M}^{-1}$.

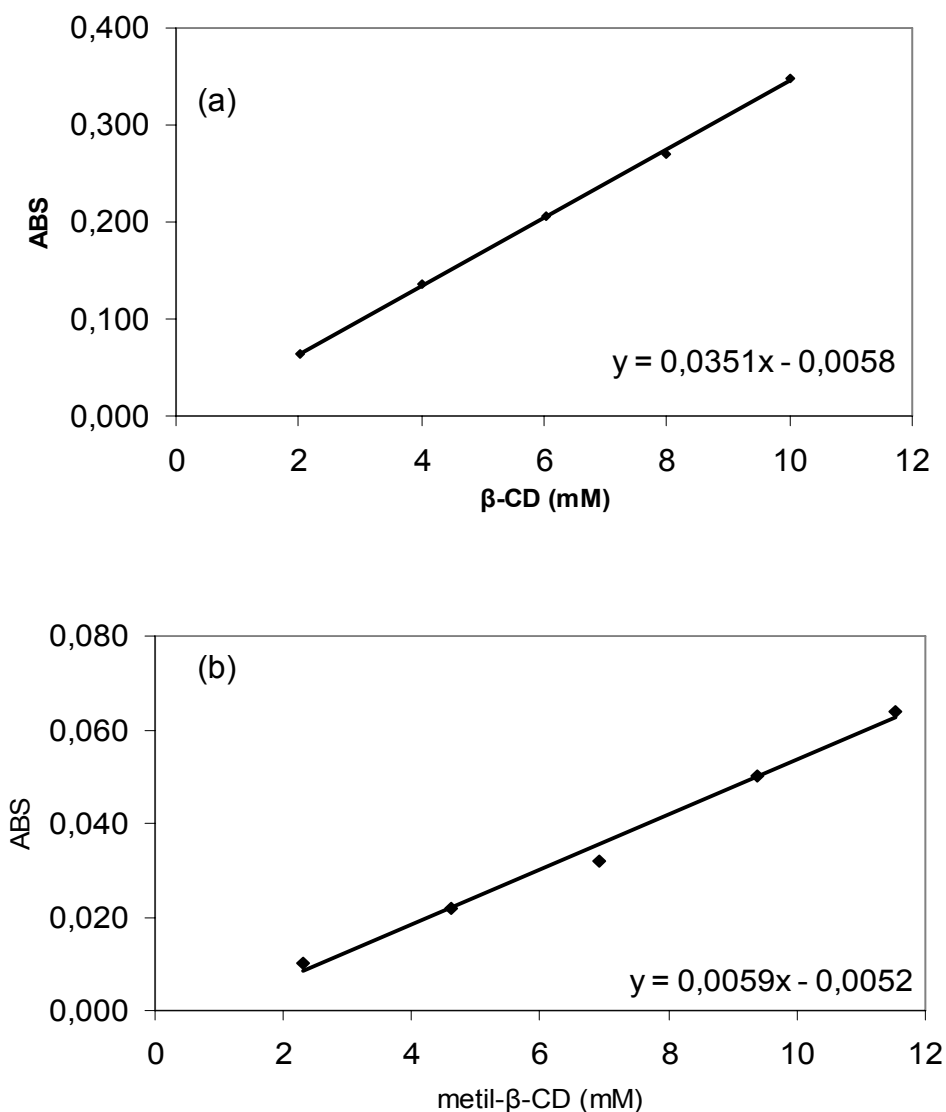


Figura 27: Curva de correlação da variação absorvância em função da concentração de β -CD (a) e de metil- β -CD (b) adicionadas ao meio contendo lidocaína.

A obtenção de curvas absorvância *versus* concentração de β -CD e metil- β -CD com coeficientes de correlação superiores a 0,99 são indícios que reforçam a complexação do fármaco com estas ciclodextrinas na proporção de 1:1.

A capacidade das interações intermoleculares, estabelecidas entre o cloridrato de lidocaína e as ciclodextrina, provocarem diferentes absorções da radiação ultravioleta, comparadas com a da molécula hóspede isolada, foi

demonstrada neste experimento. O microambiente mais apolar no interior da cavidade das ciclodextrinas (LOFTSSON e DUNCHÊNE, 2007) carrega para o seu interior uma quantidade diferente do solvente caracteristicamente mais polar. Estes dois fatores geram condições específicas para as interações intermoleculares da lidocaína com o microambiente, propiciando, assim, diferentes absorções por parte das ligações químicas da molécula de lidocaína quando exposta a radiação ultravioleta.

A lei de Beer pode fornecer explicação para esse comportamento da absorção ultravioleta, medida nas soluções contendo o cloridrato de lidocaína, após a adição das ciclodextrinas. A existência de uma distância mínima entre as moléculas em solução, responsáveis pela absorção da radiação, é necessária a ponto de que cada molécula não afete a distribuição de carga da molécula vizinha. Nestas condições, a relação entre absorção e concentração do absorvente tende a permitir uma correlação linear. Por outro lado, concentrações muito baixas da molécula absorvente não permitem o estabelecimento de uma correlação linear entre a absorção e a concentração do absorvente.

Algumas espécies químicas são capazes de alterar a capacidade de absorção de um analito, alteração esta em função do aumento da concentração destas espécies em particular, permitindo um ganho de linearidade nesta correlação (SKOOG *et al*, 2006). As ciclodextrinas permitiram um ganho de linearidade (Figura 27), pois o experimento conduzido utilizou uma solução de concentração baixa de cloridrato de lidocaína em que a absorção no comprimento de onda de 240 nm era inferior à resolução do aparelho (entre 0 e 0,001). Desta maneira, podemos supor que as ciclodextrinas podem ter causado alterações da concentração da lidocaína em solução favorecendo o aumento da absorção de radiação ultravioleta.

Esta maior absorção da radiação por parte do complexo de inclusão formado pela β -ciclodextrina se reflete na constante de estabilidade de formação ($34954,09 \pm 995,4 \text{ M}^{-1}$) do mesmo, que foi maior que a obtida na inclusão com a metil- β -ciclodextrina ($5565,28 \pm 819,9 \text{ M}^{-1}$). Quanto maior o valor da constante de estabilidade para o complexo formado, menor seria ser a quantidade que se espera encontrar do fármaco em sua forma livre. Por outro lado, o fármaco deve estar na

forma livre para atingir o seu local de ação. A faixa de variação considerada adequada para constante de estabilidade de complexos de inclusão utilizando ciclodextrinas varia de 100 a 1000 M⁻¹ (MUKNE e NAGARSENKER, 2004), mas esta faixa é frequentemente utilizada para fármacos pouco solúveis em água e de caráter lipofílico. Desta maneira, os resultados para a estabilidade dos complexos obtidos neste trabalho não puderam ser interpretados adequadamente, havendo a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas analíticas e faixas de adequadas para constante de estabilidade de complexos de inclusão para fármacos solúveis em água e de caráter hidrofílicos.

4.3.2.2.2. Solubilidade em meio aquoso do incluso de cloridrato de lidocaína em β -ciclodextrina e em metil- β -ciclodextrina

A verificação da solubilidade do incluso em meio aquoso foi bem sucedida, mas em meio etanólico (etanol 95%) ambos os inclusos apresentaram solubilidades inferiores a 0,2 mg/mL, impedindo a sua utilização no preparo da formulação neste solvente de forma que a lidocaína esteja na concentração proposta.

A Figura 28 apresenta a curva padrão em meio aquoso do incluso de cloridrato de lidocaína- β -ciclodextrina e a do incluso de cloridrato de lidocaína-metil- β -ciclodextrina, cuja absorbância foi lida no comprimento de onda de 240 nm.

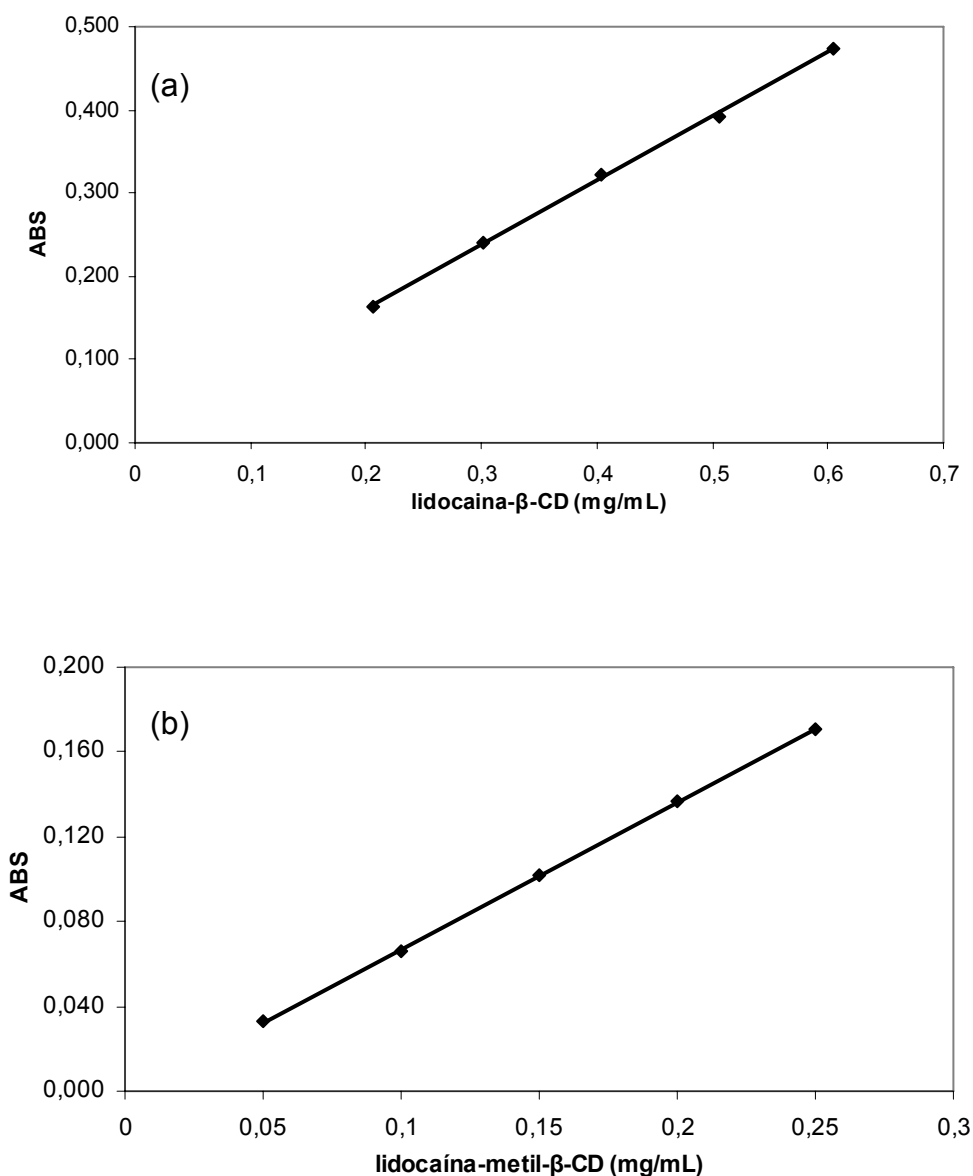


Figura 28: Curva padrão em meio aquoso do incluso de cloridrato de lidocaína-β-ciclodextrina (a) e do de incluso de cloridrato de lidocaína-metil-β-ciclodextrina (b).

As curvas padrão plotadas (Figura 28a e 28b) foram submetidas à regressão linear para obtenção das respectivas equações da reta ($y = 0,77x + 0,0049$, $r = 0,9996$ e $y = 0,694x + 0,0023$, $r = 0,9999$) capazes de correlacionar à absorbância lida com a concentração do incluso na solução, permitindo assim determinar a concentração presente no sobrenadante da solução supersaturada. A solubilidade em meio aquoso do incluso de cloridrato de lidocaína-β-ciclodextrina foi de 24,95

mg/mL e de cloridrato de lidocaína-metil- β -ciclodextrina foi de 131,56 mg/mL à temperatura ambiente.

A solubilidade em meio aquoso dos complexos de inclusão são diferentes daquelas apresentadas pelo cloridrato de lidocaína (166,44 mg/mL), pela β -ciclodextrina (18,5 mg/mL) e pela metil- β -ciclodextrina (> 500 mg/mL). A alteração da solubilidade é uma das evidências características do fenômeno de formação de complexos de inclusão, onde o aumento da mesma é o objetivo mais freqüente da inclusão de moléculas em ciclodextrinas.

Existe um consenso em vários trabalhos publicados com relação à alteração da solubilidade de moléculas quando inclusas em ciclodextrinas, onde se descreve o aumento da solubilidade de moléculas inclusas em meio aquoso (CHALLA *et al.*, 2005; BREWSTER e LOFTOSSON, 2007; TATAI *et al.*, 2007; CAL e CENTKOWSKA, 2008). Mas estes trabalhos se referem às moléculas orgânicas de baixa solubilidade em meio aquoso, como é o caso da lidocaína base, com solubilidade de 0,118 mg/mL, que ao ser incluída em β -ciclodextrina (solubilidade de 18,5 mg/mL) utilizando a técnica de empastamento, gera um inculso com solubilidade de 0,183 mg/mL (TATAI *et al.*, 2007). Analisando este exemplo, se observa uma molécula que incluída apresenta uma solubilidade maior que a sua forma livre, mas bem inferior a da ciclodextrina pura.

Os resultados apresentam duas situações. Na primeira situação, o cloridrato de lidocaína, com solubilidade de 166,4 mg/mL, que ao ser incluída em β -ciclodextrina de solubilidade de 18,5 mg/mL utilizando a técnica de empastamento, gera um inculso com solubilidade de 24,95 mg/mL. Na segunda situação, o cloridrato de lidocaína, com solubilidade de 166,4 mg/mL, que ao ser incluída em metil- β -ciclodextrina (solubilidade > 500 mg/mL) utilizando a mesma técnica, gera um inculso com solubilidade de 131,56 mg/mL. Nestes casos, o aumento de solubilidade ocorre do complexo de inclusão do sal de lidocaína com β -ciclodextrina para o com metil- β -ciclodextrina, sendo que o primeiro com solubilidade superior a ciclodextrina utilizada e o segundo com solubilidade inferior, mas ambos complexos de solubilidade inferior a do fármaco. Outras técnicas analíticas podem ser empregadas

para elucidar que eventos a nível molecular são responsáveis por tais comportamentos diferentes.

A solubilidade do complexo de inclusão utilizando metil- β -ciclodextrina se apresentou maior que a do do complexo de inclusão utilizando β -ciclodextrina devido ao fato da molécula de metil- β -ciclodextrina possuir alguns de seus grupamentos hidroxila metilados, o que impede a ocorrência de interações de hidrogênio intramoleculares freqüentes na molécula de β -ciclodextrina (CHALLA *et al.*, 2005).

No presente trabalho, a solubilidade obtida para os inclusos, mesmo sendo inferior aos valores correspondentes de solubilidade das moléculas de partida, demonstrou a alteração de uma característica intrínseca da molécula hóspede e assim outro indício do processo de inclusão da lidocaína nas ciclodextrinas utilizadas.

A solubilidade verificada para inclusos obtidos foi o fator limitante para a continuidade da caracterização dos mesmos. O incluso de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina teve sua caracterização prosseguida por apresentar solubilidade de 131,56 mg/mL. Esta solubilidade foi superior a mínima necessária de 110,84 mg/mL, tornando capaz o alcance do percentual de 2,0% para lidocaína na formulação.

4.3.2.2.3. Caracterização do incluso de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina por difratometria de raios X

A Figura 29 apresenta o difratograma do cloridrato de lidocaína, da mistura física 1:1, do complexo de inclusão de lidocaína-metil- β -ciclodextrina e da metil- β -ciclodextrina obtidos nos ensaios com o aparelho de raios X e a figura 30 regiões específicas destes difratogramas destacadas.

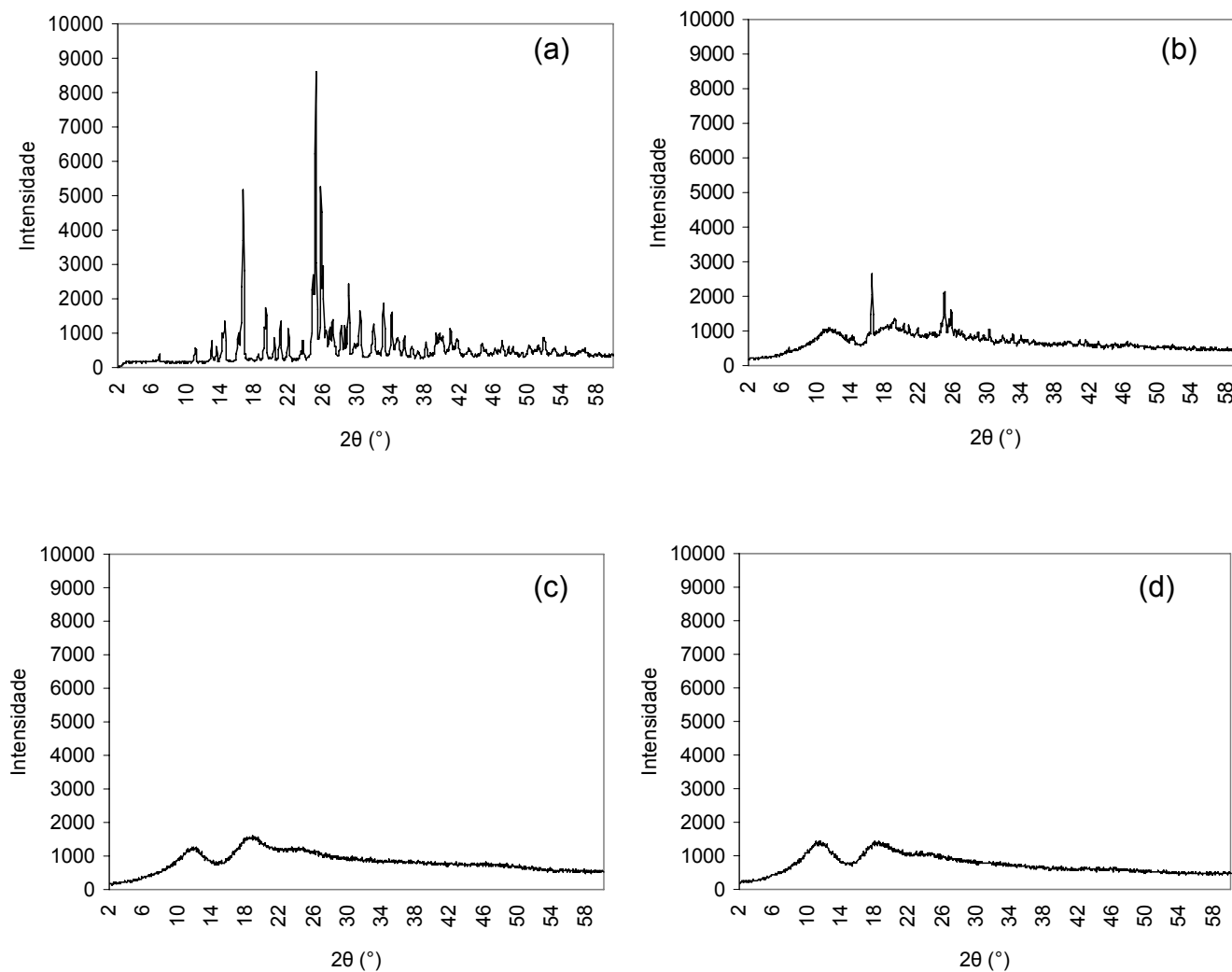


Figura 29: Difratoogramas do cloridrato de lidocaína (a), mistura física 1:1 (b), complexo de inclusão de lidocaína-metil- β -ciclodextrina (c) e da metil- β -ciclodextrina (d).

A difração de raios X revela o estado físico de uma substância a temperatura ambiente e o seu grau de cristalinidade. Esta cristalinidade é perdida em função da ocorrência de interações intermoleculares e esta perda pode ser verificada na redução ou desaparecimento de sinais de intensidade característica.

Os detalhes das regiões destacadas dos difratogramas de raio X (Figura 30) demonstram mais uma evidência de que a inclusão do fármaco na metil- β -ciclodextrina. Esta evidência está na perda de cristalinidade do fármaco, caracterizada pelos altos sinais destacados em 16,7 (Figura 30a), 25,15 e 25,8 ° 2θ (Figuras 30f) em comparação aos sinais obtidos nos mesmo ° 2θ com o incluso

(Figuras 30c e 30h), tornando o perfil do difratograma e a intensidade dos sinais do incluso mais semelhante ao da metil- β -ciclodextrina (Figuras 30d e 30i), descartando a possibilidade de um efeito de diluição do fármaco na ciclodextrina (Figuras 30b e 30g).

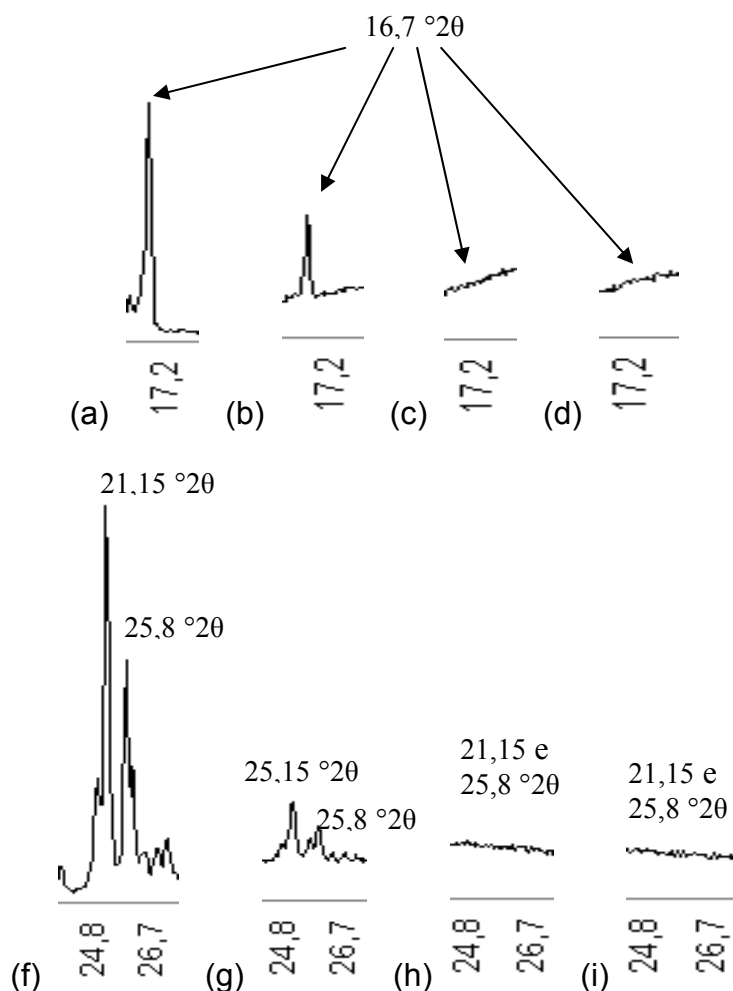


Figura 30: Regiões específicas do difratograma do cloridrato de lidocaína (figuras 30a e 30f), da mistura física 1:1 (figuras 30b e 30g), do incluso (figuras 30c e 30h) e da metil- β -CD (figuras 30d e 30i) em 16,7 ; 25,15 e 25,8 °2θ.

O perfil de difração apresentado pelo complexo de inclusão não era decorrente do simples efeito de diluição do fármaco na ciclodextrina na razão de 1:1 (288 mg de cloridrato de lidocaína para 1312 mg de metil- β -ciclodextrina). Este efeito de diluição pode ser visto nas figuras 30b e 30g, devido à presença de sinais valor de °2θ característicos do fármaco, mas em intensidade menor.

Esta técnica analítica permitiu a evidenciação da formação de um novo sólido de aspecto amorfo, ao contrário de uma expressiva redução de tamanho de partículas com baixa cristalinidade, como produto do processo de empastamento do cloridrato de lidocaína com a metil- β -ciclodextrina em solução etanol-água 1:1.

4.3.2.2.4. Caracterização do incluso de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina por espectrometria de infravermelho

A Figura 31 apresenta o espectro do cloridrato de lidocaína, da mistura física 1:1, do complexo de inclusão de lidocaína-metil- β -ciclodextrina e da metil- β -ciclodextrina e a Figura 32 apresenta regiões específicas destes espectros obtidos nos ensaios de espectrometria de infravermelho.

A espectrometria na região do infravermelho permite caracterizar e identificar uma substância em função do surgimento de bandas geradas pelo estiramento ou pela deformação angular das ligações entre átomos dos grupamentos funcionais. As bandas surgem em função de sua abundância ou intensidade característica de absorção por tais grupamentos da radiação infravermelha.

Os detalhes dos espectros de absorção no infravermelho (Figura 32) demonstram mais uma evidência da inclusão do fármaco na metil- β -ciclodextrina. Esta evidência está no desaparecimento de bandas características do cloridrato de lidocaína ou redução significativa da intensidade destas em comparação as bandas obtidas nas mesmas regiões com o incluso, tornando o perfil do espectro e a intensidade das bandas dos grupamentos funcionais do incluso mais semelhante ao da metil- β -ciclodextrina.

Como detalhado na Figura 32, as bandas de intensidade média, características de grupamentos amida monosubstituída, em torno de 3300 cm^{-1} da lidocaína (Figura 32a) desapareceram e ocorre o surgimento da banda característica de hidroxila de álcool primário da ciclodextrina nesta região (Figura 32c). A banda de intensidade fraca e larga de hidrocloreto de amina na região de 2500 cm^{-1} (Figura 32a) desaparece no espectro correspondente ao incluso (Figura 32c). As bandas de

amina de intensidade forte em 1650 cm^{-1} e intensidade média em 1550 cm^{-1} da lidocaína (Figura 32f) desaparecem e ocorre o surgimento das bandas características de álcool primário da ciclodextrina na região de 1100 cm^{-1} (Figura 32h). Por último, a banda correspondente ao anel aromático vicinal trissubstituído na região de 780 cm^{-1} de intensidade forte (Figura 32f) que desaparece no espectro do incluído (Figura 32c).

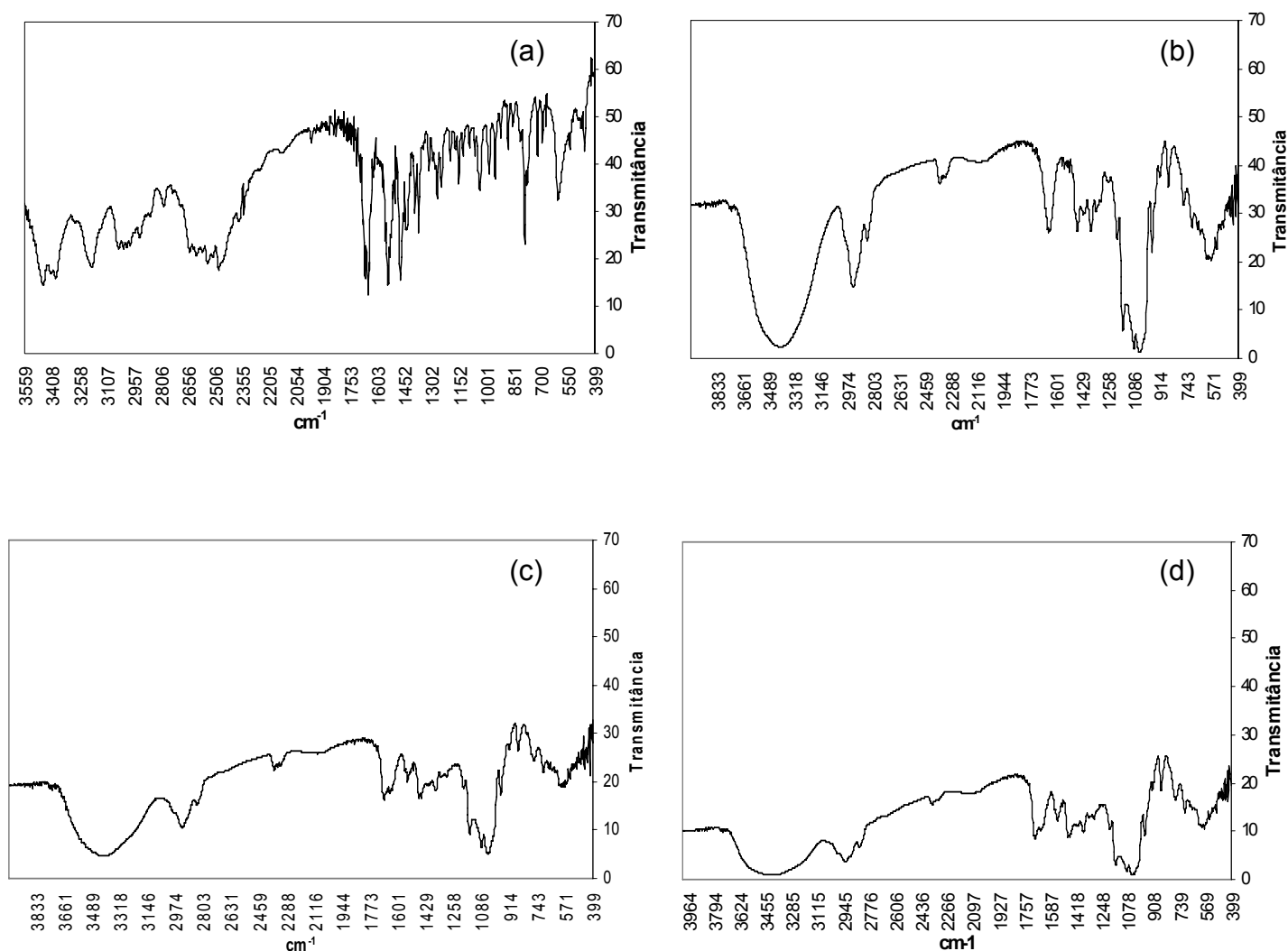


Figura 31: Espectros de FTIR do cloridrato de lidocaína (a), mistura física 1:1 (b), complexo de inclusão de lidocaína-metil- β -ciclodextrina (c) e da metil- β -ciclodextrina (d).

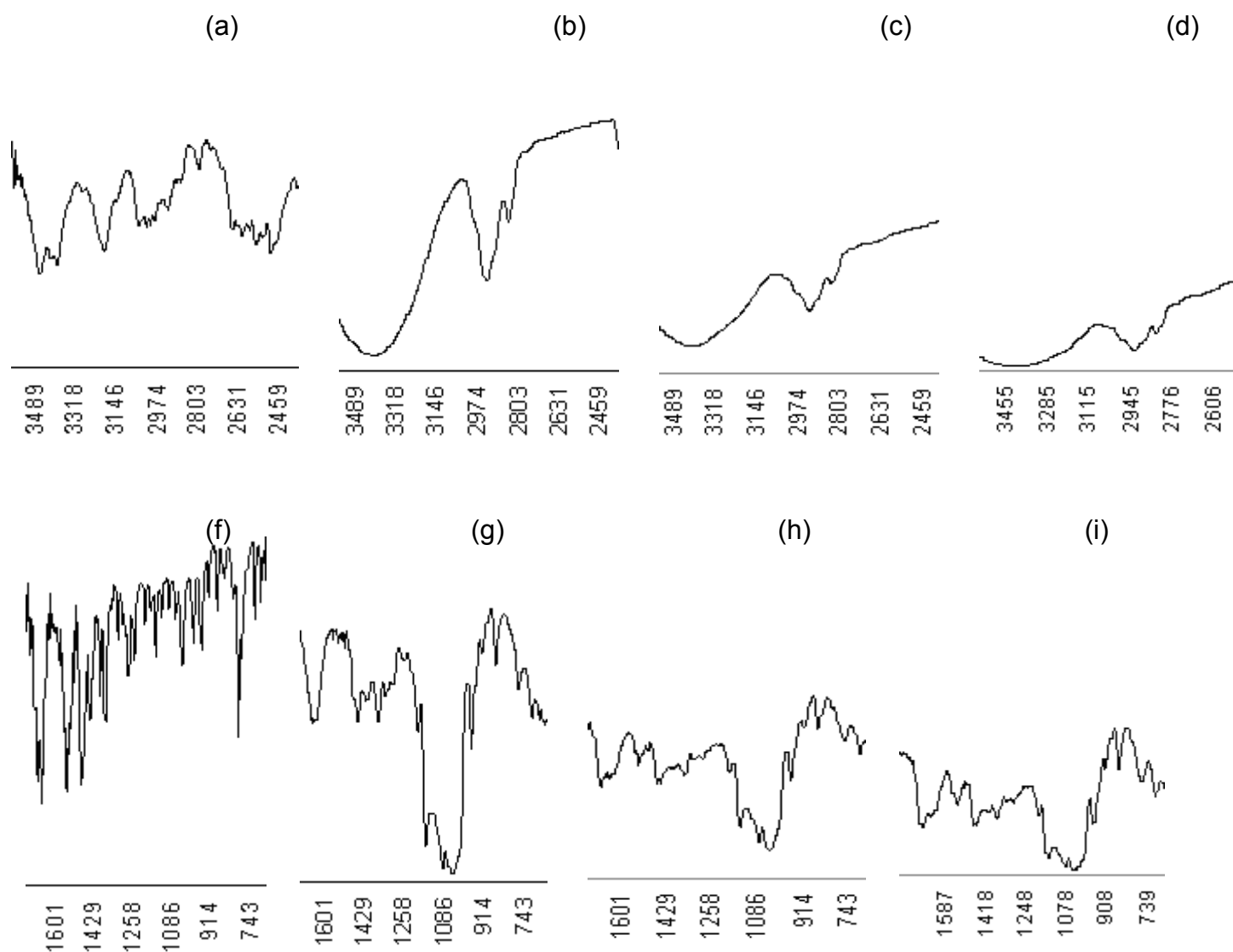


Figura 32: Regiões específicas a, b, c, d, f, g, h e i dos espectros de FTIR (Figura 31) evidenciando, em bandas características do cloridrato de lidocaína, a variação de amplitude.

O desaparecimento das bandas relativas ao anel aromático do cloridrato de lidocaína no espectro do incluso de lidocaína-metil- β -ciclodextrina poderia ser um indício da ocorrência da inclusão do fármaco no interior da cavidade da ciclodextrina. Mas o desaparecimento destas bandas no espectro relativo à mistura física do fármaco e da metil- β -ciclodextrina descartam esse evento como indício da inclusão.

As bandas relativas ao anel aromático da lidocaína merecem destaque, pois esta parte da molécula do fármaco é a mais lipofílica e é descrita na literatura como aquela alocada no interior da cavidade da ciclodextrina, levando ao desaparecimento destas bandas do espectro do complexo de inclusão (MUKNE e NAGARSENKER, 2004; CHALLA *et al.*, 2005; BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

4.3.2.2.5. Determinação do teor do cloridrato de lidocaína no complexo de inclusão em metil- β -ciclodextrina

O complexo de inclusão apresentou um teor de 100,16% de cloridrato de lidocaína.

O método analítico por CLAE desenvolvido para quantificação de cloridrato de lidocaína e digluconato de clorexidina na formulação foi utilizado satisfatoriamente na quantificação deste primeiro fármaco incluso em metil- β -ciclodextrina. A solubilização do incluso lidocaína-metil- β -ciclodextrina (quantidade relativa a 2,0% de lidocaína) no diluente apresentava o mesmo espectro de varredura de absorção na faixa do ultravioleta que uma amostra preparada com a mesma concentração do fármaco livre, conforme apresentado os espectros na figura 33, além dos picos cromatográficos apresentarem o mesmo tempo de retenção de 4,2 minutos.

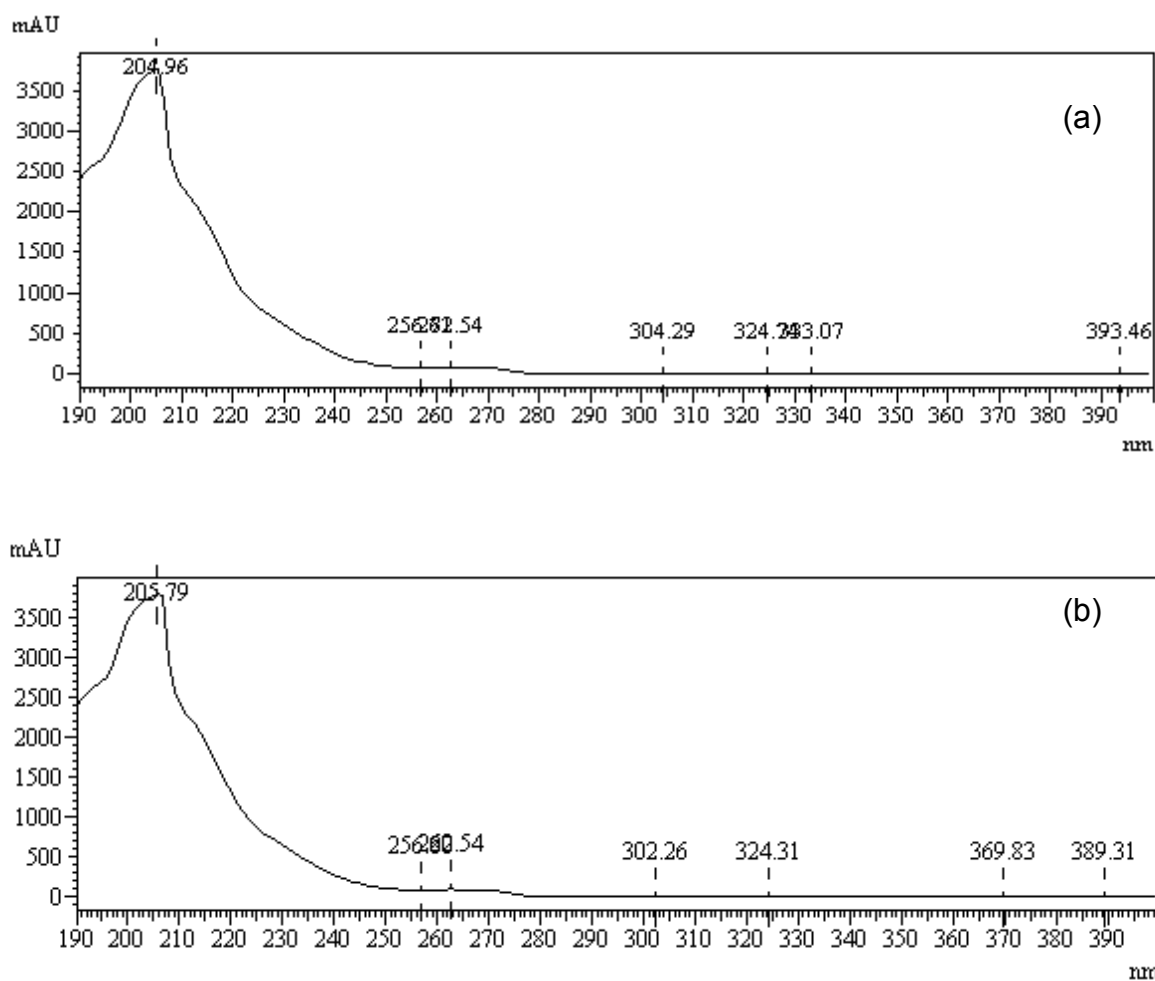


FIGURA 33: Espectros (a) do complexo de inclusão cloridrato de lidocaína–metil- β -ciclodextrina e (b) do cloridrato de lidocaína ambos no diluente metanol:água (63:37) pH 3,5 do método analítico desenvolvido por CLAE.

A capacidade do método analítico por CLAE com detecção por ultravioleta de quantificar a lidocaína incluída já era esperada, porque a simples detecção por espectrometria de ultravioleta utilizada por Tatai e colaboradores (2007) se apresentou capaz de realizar esta quantificação em estudos descritos anteriormente.

4.3.3. Determinação da compatibilidade do incluso de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina (1:1) com digluconato de clorexidina em meio aquoso

A solução aquosa do incluso de cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina na presença de digluconato de clorexidina não apresentou turvação ou precipitação nos tempos de inspeção pré-estabelecidos ao longo de 24 horas.

O controle positivo, composto pela solução aquosa do cloridrato de lidocaína na presença de digluconato de clorexidina, apresentou a turvação e precipitação características em aproximadamente 3 minutos.

A capacidade de alteração de características físico-químicas de moléculas inclusas já foi apresentada por inúmeras publicações. O aumento da solubilidade em meio aquoso de fármacos pouco solúveis é a característica de maior simplicidade de execução e é considerado um indício da formação do complexo de inclusão. Por outro lado, a não ocorrência da precipitação, anteriormente evidenciada pela associação de dois fármacos (sais) solúveis em meio aquoso, pela substituição de um deles por sua forma inclusa em ciclodextrina garante outro indicador da formação do complexo de inclusão de simples execução. Blanco-Fuente e colaboradores (2002) demonstraram o uso de complexação de cloridrato de propranolol em β -ciclodextrina com intuito de prevenir a formação de um complexo insolúvel deste fármaco de caráter catiônico como carbopol de caráter aniônico utilizado como polímero de gelificação.

Neste experimento, mais evidências da inclusão do fármaco em ciclodextrina foram obtidas. A relevância deste experimento está na obtenção da segunda alternativa para possibilitar a associação de lidocaína com a clorexidina em meio aquoso, e assim dar continuidade ao desenvolvimento farmacotécnico da formulação gel mucoadesiva proposta, mas também requer uma avaliação mais criteriosa para a determinação de quão viável seria esta alternativa.

4.3.4. Avaliação de estabilidade das soluções em meio aquoso

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos na avaliação da estabilidade da associação de cloridrato de lidocaína e digluconato de clorexidina nas diferentes condições estabelecidas logo após o preparo destas soluções e 10 dias depois.

Tabela 21: Parâmetros e resultados da avaliação da estabilidade das soluções dos fármacos em meio aquoso (ma) e meio etanólico (me)

Parâmetro	Tempo 0 dias			Tempo 10 dias		
	Fármacos livres (ma)	Fármacos livres (me)	Clorexidina +lidocaína-incluso (ma)	Fármacos livres (ma)	Fármacos livres (me)	Clorexidina +lidocaína-incluso (ma)
Turvação	Presente*	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
Precipitação	Presente*	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Ausente
Teor de clorexidina ± DP (g / 100 mL)	0,015 ± 0,0007	0,241 ± 0,003	0,258 ± 0,001	< LD	0,104 ± 0,002	0,259 ± 0,003
Teor de lidocaína ± DP (g / 100 mL)	1,933 ± 0,005	1,856 ± 0,003	1,944 ± 0,01	1,937 ± 0,01	1,873 ± 0,01	1,970 ± 0,02

* Turvação e precipitação ocorreram na solução em aproximadamente 5 min.

DP = Desvio Padrão; LD = Limite de Detecção

Os parâmetros utilizados para determinação da estabilidade da associação nas diferentes condições estabelecidas revelaram um ganho de estabilidade quando utilizou-se o sistema que continha a lidocaína inclusa associada à clorexidina em meio aquoso em relação ao sistema obtido pela associação da lidocaína livre em meio etanólico.

A expectativa em torno deste ensaio de estabilidade estava em se alcançar pelo menos uma alternativa para viabilizar a associação dos fármacos sem a ocorrência de precipitação e redução do teor de nenhum destes. A mudança do solvente forneceu uma solução para o problema da incompatibilidade limitada. Apesar não ter ocorrido precipitação ou turvação ao final de três dias de ensaio de estabilidade, a utilização de etanol demonstrou ser somente capaz de retardar a formação de precipitado. Isto ocorreu porque houve uma alteração temporária na solvatação dos íons presentes no meio, mas a precipitação foi constatada ao término do ensaio. Já a inclusão disponibiliza um microambiente para hospedar o cloridrato de lidocaína como um todo que, em função da constante de estabilidade deste incluso, liberaria o sal para o solvente, que por sua vez estaria disponível para ser solvatado e poder levar a formação de precipitado pela interação com outros íons.

A solução preparada com a associação dos fármacos em meio etanólico apresentou um decréscimo da concentração de clorexidina em solução um pouco inferior à metade da determinada inicialmente, enquanto a concentração de lidocaína não variou significativamente (DPR de 0,60%). O surgimento de precipitado foi detectado e, devido à redução do teor de clorexidina e a manutenção do teor de lidocaína, revelou indícios de que o precipitado provém da clorexidina, em uma forma mais solúvel em meio etanólico do que em meio aquoso, sem a presença de lidocaína.

A Figura 34 apresenta a análise de uma amostra de solução aquosa da clorexidina com a lidocaína antes e depois da formação do precipitado desconhecido, utilizando o método analítico desenvolvido por CLAE neste trabalho (solução A da Tabela 21).

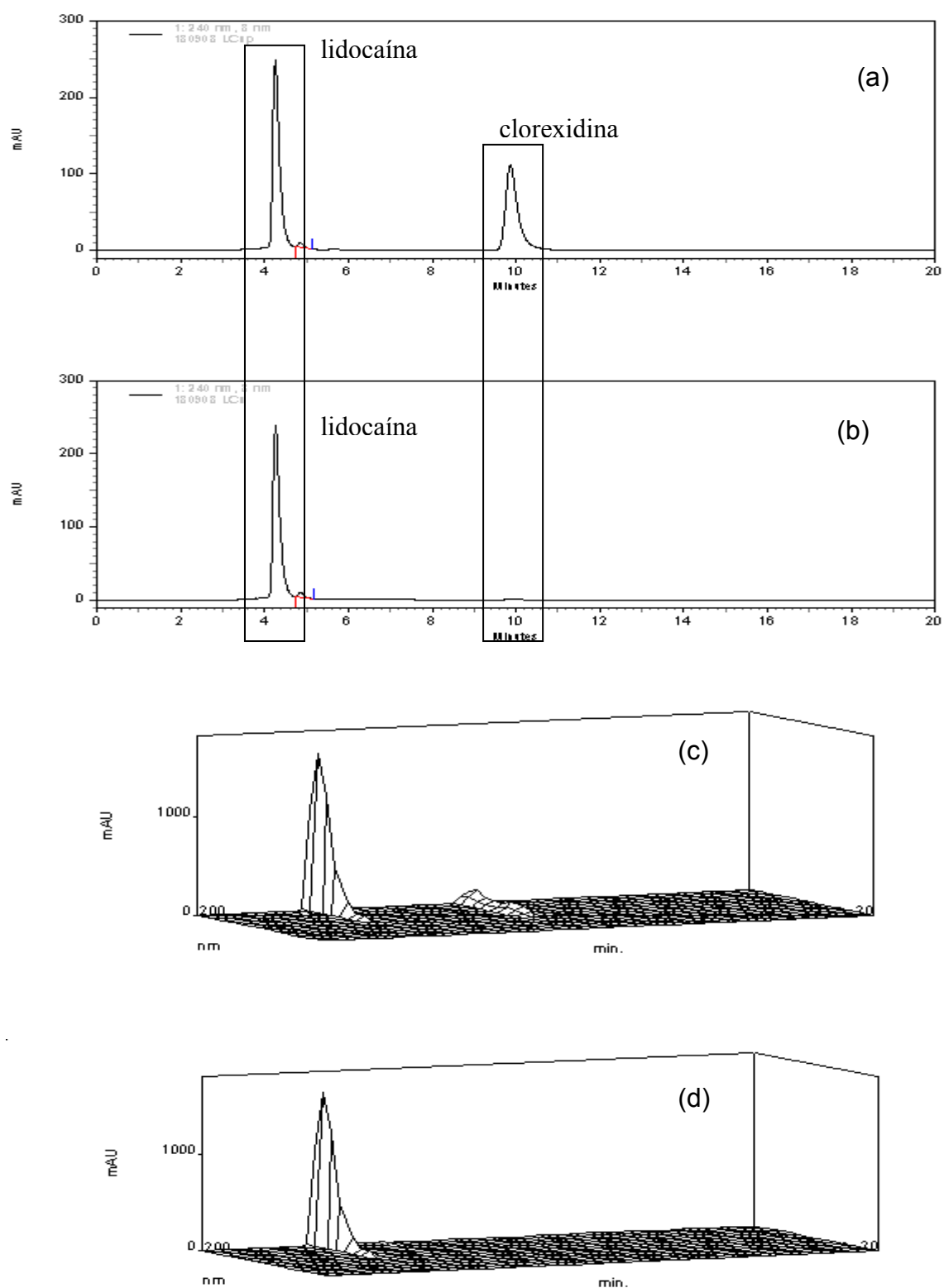


Figura 34: Cromatogramas da solução aquosa dos fármacos (solução A) antes da formação de precipitado (a), do sobrenadante após a formação do precipitado (b) e seus respectivos espectros de varredura (c) e (d).

As Figuras 34a e 34c são referentes ao cromatograma em 240 nm e o cromatograma em varredura, respectivamente, provenientes da análise da solução A imediatamente após o seu preparo. As Figuras 34b e 34d são referentes ao cromatograma em 240 nm e o cromatograma em varredura, respectivamente, provenientes da análise do sobrenadante da suspensão formada pelo sugirmento do precipitado na solução mencionada anteriormente após 5 minutos. Notou-se que a concentração de lidocaína não sofreu alteração significativa, diferente da redução drástica na concentração da clorexidina no sobrenadante a uma concentração inferior ao limite de detecção do método analítico.

As informações obtidas através do estudo realizado com a mistura dos fármacos em meio aquoso mencionadas acima, fornecem indícios de que o precipitado branco proveniente desta mistura, seja uma outra forma salina da clorexidina, menos solúvel em meio aquoso que o digluconato de clorexidina. O precipitado foi identificado como cloridrato de clorexidina, pois apresentou ponto de fusão de 259,7°C com decomposição próximo a faixa de fusão do cloridrato de clorexidina (260 e 262°C com decomposição). Além disso, resultado positivo para o teste qualitativo de íons cloreto e perfil espectrométrico no infravermelho apresentando as bandas características em 1628, 1575, 1527, 1235, 1080 e 820 cm^{-1} (MOFFAT *et al.*, 2004; USP, 2008), conforme destacado pelos círculos na Figura 35, corroborou para a identificação.



Figura 35: Espectro de infravermelho do precipitado (Cl^- + clorexidina).

Assim, estes resultados também permitiram descartar a possibilidade deste precipitado ser um produto de degradação da clorexidina de características e de toxicidade desconhecidas, que seria um fator limitante para o desenvolvimento da formulação destes fármacos associados.

4.3.5. Idealização das novas formulações gel da associação lidocaína e clorexidina

4.3.5.1. Seleção dos excipientes

Os excipientes utilizados para este estudo foram selecionados baseando-se nas suas propriedades descritas em compêndios especializados quanto a sua solubilidade nos meios em estudo, propriedades físico-químicas e quanto a possíveis incompatibilidades com os fármacos utilizados neste trabalho (SWEETMAN, 1999; MOFFAT *et al.*, 2004; ALTON, 2005).

Além das informações compendiais, a incompatibilidade do digluconato de clorexidina com ânions e aquela evidenciada com ânions cloreto neste trabalho, tornou-se importante a verificação do limite de ânions presentes nos excipientes pesquisados e a exclusão dos sais como opções para a composição dos placebos.

Os excipientes descritos na Tabela 22 foram avaliados individualmente quanto a sua compatibilidade com os fármacos em solução aquosa e solução etanólica nos percentuais definidos. Estes se apresentaram solúveis ou miscíveis nos dois meios testados e não houve turvação ou precipitação nas soluções teste nos tempos determinados para verificação da compatibilidade.

Tabela 22: Propriedade e teor na formulação dos excipientes selecionados

Excipiente	Função Farmacotécnica/ Teor na Formulação (%)	Características
BHA	Anti-oxidante/ 0,05	Solúvel em meio aquoso / compatível com os fármacos.
BHT	Anti-oxidante/ 0,05	Solúvel em meio etanólico / compatível com os fármacos.
Metilparabeno	Conservante/ 0,1	Solúvel em meio aquoso e etanólico / compatível com os fármacos.
PEG 6000	Espessante/ 2,0	Solúvel em meio aquoso e etanólico / compatível com os fármacos.
PEG-15 cocopoliamina	Mucoadesivo/ 2,0	Solúvel em meio aquoso e etanólico / compatível com os fármacos.
Hidroxietilcelulose	Gelificante/ 4,0	Formação de gel em meio aquoso e etanólico / compatível com os fármacos.

4.3.5.3. Caracterização dos géis placebos

O preparo do gel aquoso não apresentou dificuldades, formando um gel com baixa interpolação de ar e de rendimento elevado (> 95%). O preparo do gel etanólico também levou a formação de um gel com baixa interpolação de ar, porém precisou do acompanhamento do peso da totalidade dos excipientes adicionados constantemente durante o período de agitação, necessária para gelificação do polímero, devido à perda de etanol por evaporação ter sido aumentada pela

agitação. A adição de etanol 95% foi realizada de maneira a garantir um rendimento aceitável para preparo do gel.

4.3.5.3.1. Aspecto

A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos da avaliação do aspecto dos géis placebo aquoso e etanólico preparados conforme especificado nos itens 3.3.3.5.2.1 e 3.3.3.5.2.2, respectivamente.

Tabela 23: Caracterização do aspecto dos géis placebo aquoso e etanólico.

Aspecto	Gel placebo aquoso	Gel placebo etanólico
Cor	Levemente amarelado	Levemente amarelado
Odor	Característico	Característico, intensificado pela presença do álcool
Turvação	Ausente	Presente (levemente)

Durante a realização dos ensaios de reologia, foi notada uma diferença entre o aspecto inicial e final dos géis aquoso e etanólico quando submetidos ao cisalhamento contínuo ou oscilatório. Nestes experimentos, a amostra de gel foi colocada no centro da placa lisa e seca de aço inox aquecida à temperatura de 37° C. O cone era baixado em direção a placa de maneira a comprimir levemente o gel até o ponto que este pudesse ser visualizado nas bordas do mesmo. Os experimentos duraram no máximo 8 min.

Ao término do experimento utilizando o gel placebo aquoso, este era removido da placa sem alterações de aspecto constatáveis ao olho nu.

Por outro lado, ao término do experimento utilizando o gel placebo etanólico, este se encontrava nas regiões de contato com o cone com pequenos grumos brancos e nas regiões de contato direto com a placa, aparentemente ocorreu evaporação do solvente e o gel havia se tornado um filme. A formação de grumos ou de filme, pela evaporação do solvente revelou a fragilidade da concepção da formulação utilizando o etanol, pois a formação destes pontos de concentração de excipientes levaria a possível retenção dos fármacos ou a concentração dos fármacos nas regiões de maior superfície de contato. Além disso, a característica lubrificante da formulação se perderia, o atrito aumentaria a evaporação do solvente da formulação aumentando a formação deste filme e a iminente diminuição da viscosidade.

Este fato ocorreu devido ao menor ponto de ebulição do etanol em comparação com a água e revelou a limitação do uso deste na composição da formulação farmacêutica lubrificante.

O Formulário Nacional (BRASIL, 2005b) apresenta a monografia da formulação do álcool gel, que possui 70% de álcool etílico e se trata da formulação semissólida disponível no Brasil com a maior concentração deste álcool. Esta formulação é indicada para assepsia de superfícies e materiais. Alguns géis alcoólicos comerciais são preparados com etanol, tais como o de eritromicina 2,0%, utilizado no tratamento da acne vulgar; o de tretinoína 0,01, 0,025 e 0,05%, utilizado para tratamento de linhas de expressão, manchas e aspereza da pele facial; e o de isotretinoína 0,05% e eritromicina 2,0%, também utilizado no tratamento da acne vulgar com ou sem inflamação. O percentual de álcool etílico nestas formulações não está disponível, mas todas estas formulações são de uso sobre a pele e não há nenhuma disponível para uso na mucosa ou indicada como agente lubrificante (BRASIL, 2009).

4.3.5.3.2. Determinação do pH

A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos da determinação do pH dos géis placebo aquoso e etanólico.

Tabela 24: Valores de pH obtidos a partir dos géis placebo aquoso e etanólico

Gel placebo	pH
Aquoso	5,00
Etanólico	6,14

A determinação do pH revelou um maior caráter ácido pelo placebo aquoso em relação ao etanólico. Levando-se em consideração as faixas de pH da vagina e da uretra (HARRIS *et al.*, 2005; VALENTA, 2005) e o pH das formulações farmacopéicas de aplicação similar (USP, 2008; BRITISH PHARMACOPEIA, 2008), o placebo teoricamente deveria possuir um pH variando na faixa de 4,0 a 6,0, tendo um pH ótimo em 5,0.

Considerando o pH ótimo de 5,0 , o placebo aquoso seria aquele que não exigiria a adição de solução acidulante ou alcalinizante para correção do pH, mesmo levando em consideração efeito sobre o pH que seria exercido pela adição dos fármacos nos dois meios e a estabilidade da clorexidina. A utilização de nenhuma ou da menor quantidade de solução para correção do pH da formulação é de grande importância na manutenção da estabilidade dos fármacos, principalmente do digluconato de clorexidina que demonstrou capacidade de precipitar com diferentes ânions em solução.

4.3.5.3.3. Determinação da viscosidade

A Figura 36 apresenta os reogramas indicando a variação da viscosidade aparente nos ensaios de cisalhamento contínuo dos géis placebo aquoso e etanólico.

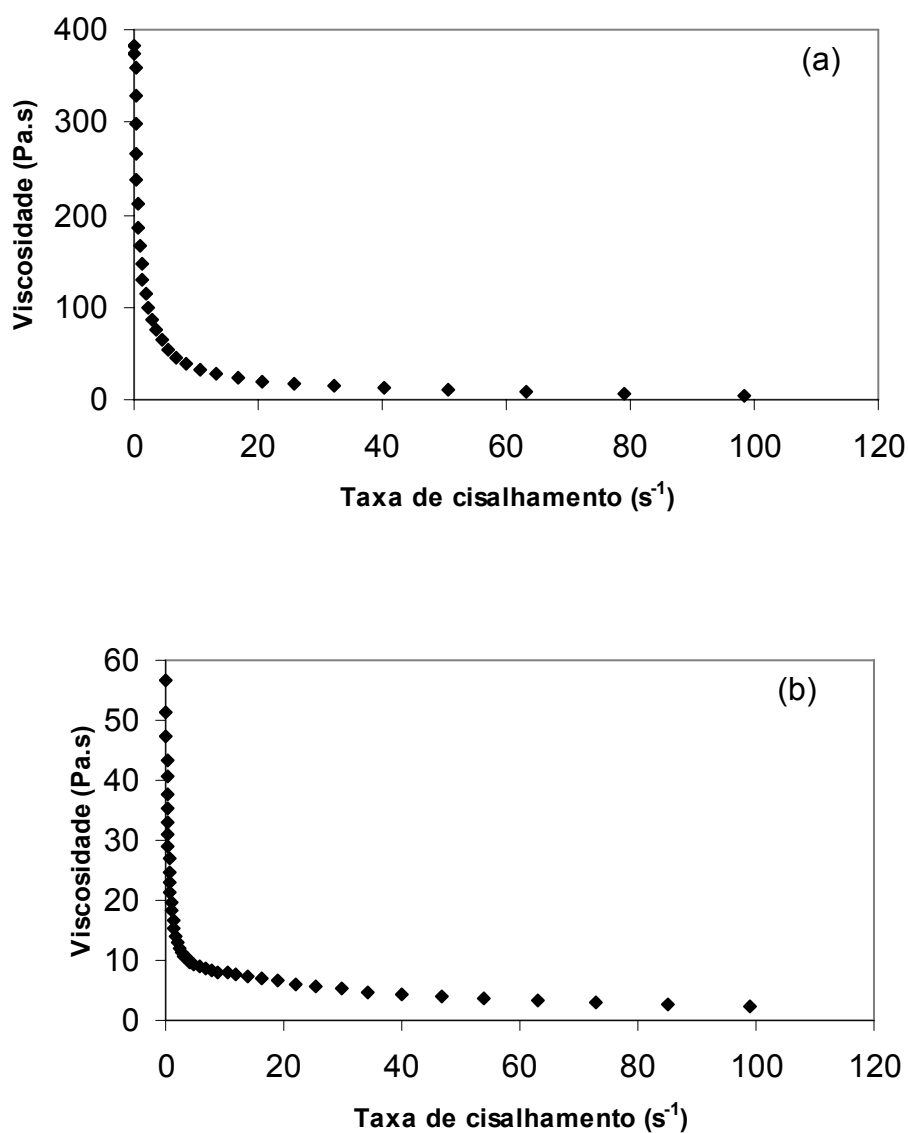


Figura 36: Reograma de viscosidade aparente *versus* taxa de cisalhamento (0,1 a 100 s⁻¹) do gel placebo aquoso (a) e do gel placebo etanólico (b).

Os resultados de viscosidade aparente obtidos das análises reológicas do placebo aquoso e do etanólico a 37° C mostraram um perfil de redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. A comparação das viscosidades aparentes medidas na taxa de cisalhamento de 0,1 s⁻¹, a diferença do

valor deste parâmetro apresentada pela formulação etanólica foi aproximadamente cinco vezes menor que a correspondente do placebo aquoso, conforme a Tabela 25. Esta diferença de valores de viscosidade aparente entre os géis placebos se manteve ao longo da variação da taxa de cisalhamento aplicada no ensaio.

A fricção é a força de resistência ao deslizamento de uma superfície sólida sobre a outra e é causada por forças de atração entre estas superfícies em contato, que possuem irregularidades, mesmo em níveis microscópicos. O termo lubrificante vem do latim “lubricare” que significa “faz deslizar”. A proposta de um lubrificante é reduzir a fricção e este objetivo é atingido pela formação de uma camada de lubrificante entre as duas superfícies envolvidas no deslizamento (AUGSBURGER e HOAG, 2008).

A viscosidade é a propriedade reológica específica a ser observada na caracterização de uma formulação utilizada como lubrificante (BRIANT *et al.*, 1989).

Tabela 25: Viscosidade aparente do gel placebo aquoso e etanólico em taxas de cisalhamento específicas

Taxa de Cisalhamento (s ⁻¹)	Viscosidade aparente (Pa.s)	
	Gel placebo aquoso	Gel placebo etanólico
0,1 ^a	375	56,63
1,0 ^a	147,2	18,2
10 ^a	33,38	8,086
100 ^b	5,399	2,312

^a Referente ao primeiro superior mais próximo deste valor.

^b Referente ao primeiro inferior mais próximo deste valor.

Ambos os placebos apresentaram um índice de fluxo menor que 1, conforme apresentado na Tabela 26, demonstrando, assim, uma substancial característica de fluidos não Newtonianos pseudoplásticos (ALMEIDA e BAHIA, 2003).

Tabela 26: Valores do índice de consistência (K) e índice de fluxo (n), obtidos a partir da aplicação do modelo da Lei das Potencias (*Power Law*), para o gel placebo aquoso e etanólico

Gel Placebo	K	n
Aquoso	143,15	0,3501
Etanólico	19,94	0,5683

Além disso, deve ser considerada a consistência que a formulação apresenta devido ao fato que esta se destina à aplicação em cavidades naturalmente recoberta por fluidos biológicos. Esta consistência é diretamente proporcional à estrutura tridimensional gerada pela gelificação característica do polímero em um solvente específico. Quanto maior for à consistência que uma formulação puder apresentar, conservando a sua espalhabilidade, maior o efeito de retenção da formulação no local de aplicação por estar menos susceptível a remoção e diluição pelos fluidos biológicos (OWEN *et al.*, 1999). O índice de consistência dos placebos foi determinado no mesmo ensaio e o placebo aquoso obteve o maior valor, que é aproximadamente sete vezes maior que o obtido para o placebo etanólico, como apresentado na tabela 26.

Os solventes foram considerados determinantes principais das características reológicas dos géis placebos em função da sua participação direta no processo de gelificação. A água foi um solvente mais adequado que o etanol em função dos valores de viscosidade, índice de consistência e do índice de fluxo obtidos para os géis placebos testados. O placebo aquoso foi escolhido como a matriz ideal para a

incorporação dos fármacos e por ser capaz de atender ao propósito para qual a formulação foi desenvolvida.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO IDEAL

A formulação ideal caracterizada corresponde ao gel aquoso da associação do incluso cloridrato de lidocaína em metil- β -ciclodextrina e digluconato de clorexidina com os excipientes selecionados. Este gel apresentou rendimento de 95,3%, coloração levemente amarelado, odor característico e ausência de turvação.

4.4.1. Determinação do pH

O pH da formulação ideal obtida foi 5,08. Este valor de pH demonstra que a adição dos fármacos não gerou uma alteração pronunciada deste parâmetro em comparação com o valor de pH 5,0 obtido na determinação utilizando o gel placebo aquoso.

A determinação da magnitude da alteração do pH em função da adição dos fármacos ao gel placebo é importante na eleição do agente acidulante ou alcalinizante e da quantidade que este deve ser adicionado, considerando a incompatibilidade da clorexidina com alguns ânions em meio aquoso. Esta correção de pH deve atender a necessidade de adequar a formulação às condições de uso clínico, sendo assim podemos analisá-la segundo alguns critérios relevantes.

O pH da formulação deve se enquadrar dentro da faixa fisiologicamente aceitável para o local de aplicação. Apesar do pH vaginal (3,5 a 4,5) ser aquele que mais restringiria a faixa de adequação, a utilização de formulações comerciais com pH de 6 a 7, tal como o gel de cloridrato de lidocaína (USP, 2008; SWEETMAN, 1999), não apresentaram restrições ao uso clínico.

O pKa dos fármacos presentes determina os diferentes graus de ionização dos mesmos em função da variação do pH, influenciando assim a sua capacidade

de difusão nas membranas. Para lidocaína, a ionização adequada representa a capacidade de difusão nas membranas e a garantia da ação farmacológica nos nociceptores (COLUMB, 2004). No caso da clorexidina, a sua ionização reduz a sua difusão na membrana mucosa, garantindo a sua maior disponibilidade na luz da cavidade e ação antimicrobiana local (MOFFAT *et al.*, 2004). A lidocaína apresenta pKa de 7,9 e a clorexidina de 10,8 (SWEETMAN, 1999).

A faixa de pH de maior estabilidade dos fármacos garante a não degradação química da molécula e a redução do surgimento de possíveis produtos tóxicos. A estabilidade máxima para lidocaína à temperatura de 25 °C foi observada quando a solução estava com valor de pH na faixa de 3 a 6 (POWELL, 1987) e a clorexidina em pH levemente ácido (SWEETMAN, 1999).

O valor de pH da formulação final foi considerado satisfatório nestes três critérios, porque garantiu uma condição aceitável para o local de aplicação, a ionização dos fármacos por estar compreendido abaixo dos valores de pKa e condições de estabilidade adequada.

4.4.2. Determinação da estabilidade

A Tabela 27 apresenta os resultados da determinação do teor de cloridrato de lidocaína e digluconato de clorexidina na formulação ideal no tempo zero e após seis meses em temperatura ambiente.

Tabela 27: Determinação do teor dos fármacos na formulação ideal no tempo zero e após seis meses

Tempo (meses)	Teor de Lidocaína (X% ± DP)	Teor de Clorexidina (X% ± DP)
0	98,8 ± 0,04	99,6 ± 0,002
6	98,6 ± 0,04	99,3 ± 0,001

X% ± DP (percentual médio ± desvio padrão), n=2

A formulação completa preparada foi submetida à análise pelo método desenvolvido e validado, revelando os teores dos fármacos dentro na faixa de aceitação de 98 a 102% no tempo 0 e seis meses depois (BARROS e HIRATA, 2004).

Estes resultados obtidos para os teores dos fármacos no período de 6 meses tornaram promissora a formulação ideal proposta. O desvio padrão baixo entre os resultados do tempo 0 e seis meses depois para cada fármaco torna esta variação não significativa.

4.4.3. Estudos de liberação *in vitro*

4.4.3.1. Avaliação da liberação *in vitro* dos fármacos

A realização dos estudos de liberação *in vitro* depende da capacidade do sistema utilizado de mimetizar a condição fisiológica, isto é, a manutenção da temperatura a 37 °C, de utilizar um meio biorelevante e obedecer à condição *sink* (VALENTA, 2005). Quanto à condição do pH, considerando que a formulação destina-se a uso urogenital, o valor de 5,0 foi adotado como condição fisiológica.

Para que o sistema atinja a condição *sink* adequadamente, é importante a avaliação da solução receptora a ser utilizada. A solubilidade do fármaco deve ser maior ou igual a dez vezes a concentração máxima do fármaco alcançada no meio receptor, ou seja, no caso de 100% de liberação.

Além das referências que suportam a escolha da água purificada como meio receptor de solubilidade adequada (RICCI *et al.*, 2005; SENEL, 2000b, HUANG, 2000), as demais referências que suportam a concepção da formulação em meio aquoso permitem a realização deste estudo com este solvente, tais como a solução comercial de digluconato de clorexidina a 20% (p/v), que significa apresentar uma solubilidade mínima de 200 mg/mL, e a solubilidade do cloridrato de lidocaína 166,4 mg/mL em meio aquoso. Estes valores de solubilidade dos fármacos apresentados e utilizados como referência são superiores aos valores necessários para manutenção das condições *sink* considerando a quantidade de amostra e o volume do meio receptor utilizados, isto é, igual ou superior 200 µg/mL para o cloridrato de lidocaína e 25 µg/mL para o digluconato de clorexidina. Padronizou-se a utilização de 20 mL como volume de meio receptor de forma a se aumentar a concentração dos fármacos liberados, mantendo a condição *sink*.

A isotonicidade do meio receptor atingida através da utilização de uma solução receptora composta por solução aquosa de tampões salinos é uma das características importantes na mimetização da condição fisiológica para realização dos estudos de liberação. Além da adequação do pH às condições específicas que podem ser favoráveis ou não a ionização dos fármacos, a força iônica promovida pela presença de íons do tampão garante a reprodução de uma força motriz que pode ser favorável ou não a liberação dos fármacos da formulação em direção à solução receptora.

A possibilidade de utilização de uma solução tampão pH 5,0 como meio receptor foi excluída, pois foi observado, nos testes preliminares de determinação de solubilidade dos fármacos nos meios receptores, a precipitação da clorexidina. Ainda que sem a utilização de sistema tampão, a água purificada utilizada como meio receptor apresentava pH 5,35 e foi considerado valor adequado frente à faixa de pH aceito para a formulação.

Os resultados dos estudos de liberação *in vitro* de cloridrato de lidocaína e digluconato de clorexidina, a partir da formulação completa utilizando água purificada como meio receptor, estão demonstrados na Tabela 28.

Tabela 28: Quantidades cumulativas de cloridrato de lidocaína e digluconato de clorexidina, liberados para a solução receptora em função do tempo nos estudos de liberação *in vitro* da formulação ideal

Tempo (min)	Quantidades cumulativas liberadas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP	
	Lidocaína	Clorexidina
5	35,7 \pm 6,5	0,24 \pm 0,13
20	81,2 \pm 6,2	2,31 \pm 0,20
40	111,9 \pm 5,9	5,22 \pm 0,27
60	123,8 \pm 6,3	6,11 \pm 0,38
90	137,3 \pm 5,9	7,29 \pm 0,36
120	144,7 \pm 5,9	8,99 \pm 0,44
180	157, \pm 4,8	11,31 \pm 0,29
240	164,8 \pm 5,0	13,28 \pm 0,45
300	168,4 \pm 4,1	14,54 \pm 0,28
360	165,5 \pm 4,4	15,33 \pm 0,36

Devido ao fato da membrana de acetato de celulose utilizada no estudo não representar uma barreira e da exclusão da força motriz promovida pela adição de íons provenientes do uso de uma solução tampão como solução receptora, a difusão dos fármacos em direção a solução receptora refletiu unicamente a capacidade de saída destes da matriz da formulação. Esta capacidade de saída dos fármacos da formulação ocorre segundo a influência das interações químicas dos fármacos com

a matriz complexa formadora do gel. Considerando o fato de que os excipientes da formulação foram selecionados em função das suas características não iônicas e solubilidades em meio aquoso, as interações químicas existentes entre os fármacos e a matriz da formulação envolveriam, basicamente, interações de Van der Waals, forças eletrostáticas, forças estéricas, interações hidrofóbicas, entre outras.

A Figura 37 apresenta os gráficos dos perfis de liberação da lidocaína e da clorexidina na solução receptora com as quantidades liberadas em função do tempo de experimento.

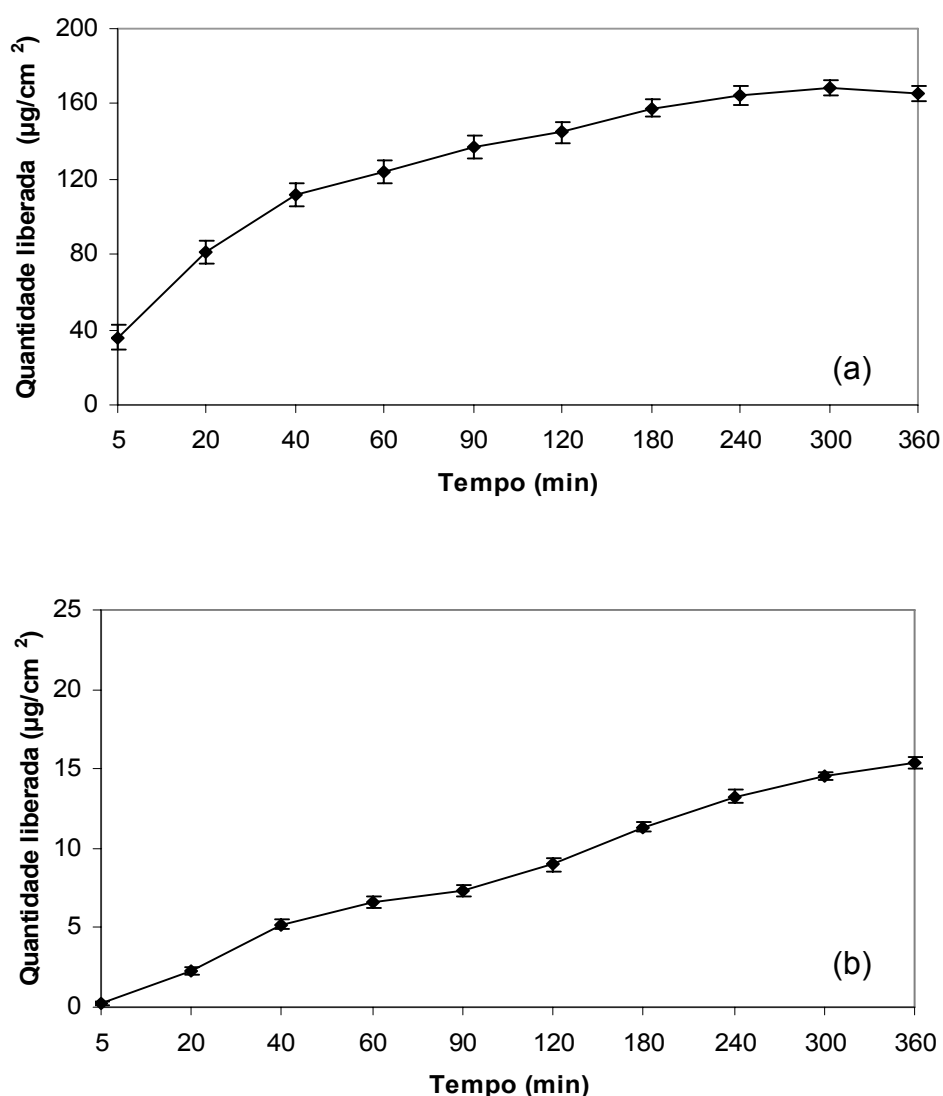


Figura 37: Quantidade de lidocaína (a) e de clorexidina (b) liberadas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) da formulação completa.

Em cinco horas de experimento, a lidocaína alcançou a sua liberação máxima representada por $165,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, isto é, aproximadamente 82,8 % da quantidade deste fármaco contida na amostra da formulação introduzida no compartimento doador submetido ao ensaio. Por outro lado, a clorexidina ao final do experimento, após seis horas, alcançou a sua liberação máxima representada por $15,33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, isto é, aproximadamente 61,3 % da quantidade deste fármaco contida na amostra.

A concentração oito vezes superior da lidocaína em relação à clorexidina na formulação é um dos fatores que podem justificar esta diferença de quantidade liberada no meio receptor.

Como mencionado anteriormente, a clorexidina possui uma solubilidade muito superior a da lidocaína (MOFFAT *et al.*, 2004) de maneira que esta característica não justifica a sua menor liberação em função do tempo, mas a condição desta última formar um gradiente de concentração entre a formulação e o meio receptor superior aquele formado pela clorexidina pode ter influenciado a liberação deste fármaco em função do tempo. Por outro lado, se considerarmos o tamanho das duas moléculas, a clorexidina apresentaria uma menor mobilidade dentro da rede polimérica do gel, isto é, a sua liberação estava em função da dissolução do gel.

A capacidade superior de interações hidrofóbicas da molécula de clorexidina em relação à de lidocaína já foi verificado durante o desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE utilizada neste trabalho. Com ambos os fármacos condicionados em pH abaixo de seu pKa, isto significou uma maior presença de formas ionizadas devido ao fato das duas apresentarem um caráter básico. Entretanto o tempo de retenção da clorexidina na coluna de octadecilsílica (C18) foi superior ao da lidocaína revelando uma maior capacidade desta em estabelecer interações hidrofóbicas quando em condições de pH ácido (XU e WONG, 1999). Esta mesma condição pode ter ocorrido com estes dois fármacos no pH da formulação ideal, provocando uma maior interação da clorexidina em relação à lidocaína com a matriz da formulação, retardando a sua liberação.

Senel e colaboradores (1999) demonstraram que uma liberação de clorexidina a partir de um gel de quitosano variava em função da concentração deste

farmaco na formulação e do polímero. No gel contendo 1% de quitosano, a liberação da clorexidina diminuiu de aproximadamente 88 para 77% quando a concentração de clorexidina aumentou de 0,1 para 0,2%. Entretanto, no gel contendo 2% de quitosano, a liberação da clorexidina diminuiu de aproximadamente 93 para 92% quando a concentração de clorexidina aumentou de 0,1 para 0,2%. Estas quantidades máximas de clorexidina liberada ocorrem após uma hora e meia. Estatisticamente, eles apresentaram que estes resultados revelaram que o aumento do quitosano de 1 para 2% resultava no aumento da liberação de clorexidina, mas o aumento da concentração da clorexidina de 0,1 para 0,2% não gerou o aumento da liberação destes nos géis com 1 e 2% de quitosano. Este resultado pode ser explicado pela força eletrostática de repulsão para fora da matriz que a carga positiva do quitosano (cátion) exerce sobre a molécula de clorexidina (cátion).

O gel formulado neste trabalho possui PEG-15 cocopoliamina a 4% que, apesar de se tratar de um polímero pseudocatiônico, não demonstrou capacidade similar de garantir uma liberação alta da clorexidina conforme os resultados apresentados por Senel e colaboradores (1999). A presença do natrosol a 4% nesta formulação também não exerceu ação promotora sobre a liberação de clorexidina devido a sua carga neutra.

Ricci e colaboradores (2005) demonstraram uma liberação de aproximadamente 80% de lidocaína a partir de um gel com 20% de poloxamer 407 e este gel sendo aquele que contém o percentual de polímero onde se observou o máximo de liberação deste fármaco. O gel formulado neste trabalho demonstrou uma liberação de aproximadamente 83% de lidocaína a partir de um gel com 4% de natrosol.

Os resultados obtidos neste estudo de liberação *in vitro* são promissores e demonstram que os fármacos são capazes de sair da formulação, mas podem ser diferentes daqueles obtidos em estudos de permeação através de mucosa *in vitro*.

4.4.3.2 Estudo de cinética e análise do fluxo de liberação *in vitro*

A determinação do modelo de cinética de liberação que os fármacos obedecem na formulação desenvolvida permite a obtenção de informações sobre a dependência do processo de liberação destes fármacos em função das características da formulação (COSTA e LOBO, 2001).

A partir do perfil de liberação pode-se determinar a cinética obedecida pela formulação. Para isso, foi escolhida a porção mais linear de cada perfil. Aplicados os três modelos cinéticos (item 3.3.4.3.5) para determinação da equação da reta de regressão linear ($y = ax + b$), o modelo que apresentou maior valor de correlação linear r (mais próximo de 1) foi escolhido como modelo cinético do estudo. O valor de fluxo (J) corresponde ao valor de inclinação (a) da equação da reta de regressão linear (tabela 29).

As Figuras 38 e 39 apresentam os gráficos obtidos, as equações da reta de regressão linear e os coeficientes de correlação correspondentes à aplicação de cada um dos modelos cinéticos aos perfis de liberação da lidocaína e da clorexidina, respectivamente.

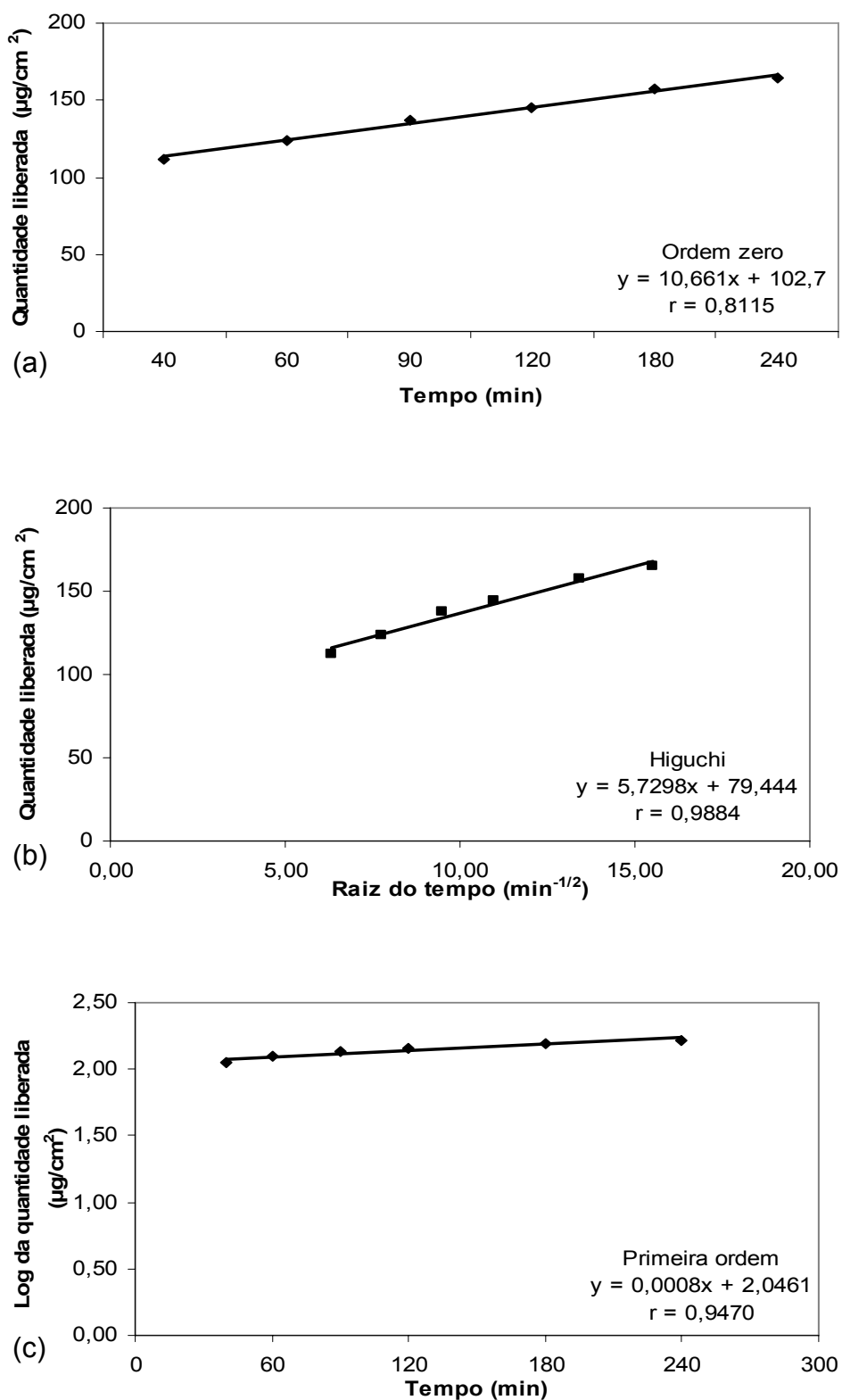


Figura 38: Perfis de liberação da lidocaína pelos modelos cinéticos: ordem zero (a); Higuchi (b) e primeira ordem (c), utilizados para obtenção do fluxo (J) e o coeficiente de correlação (r).

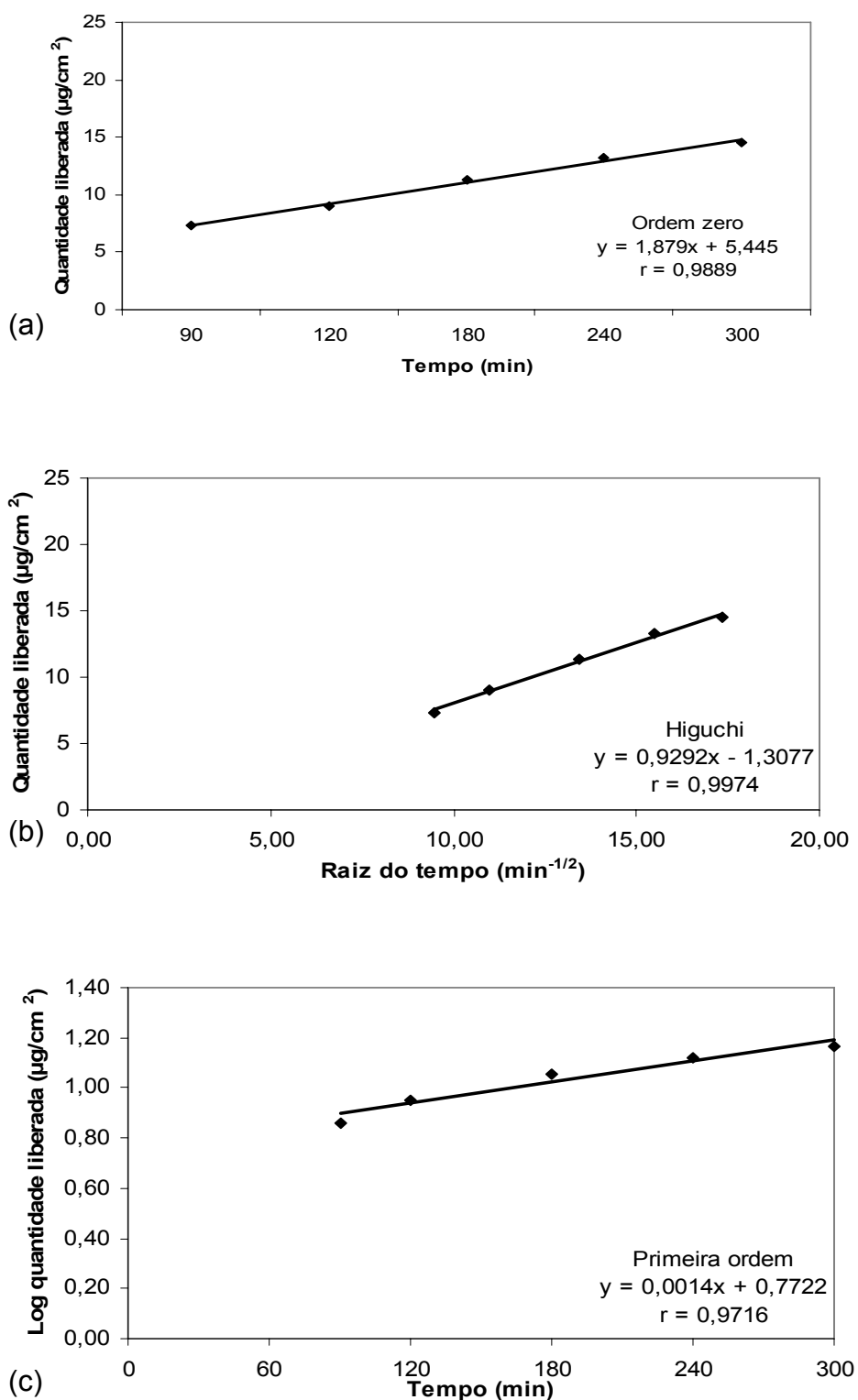


Figura 39: Perfis de liberação da cloxacilina pelos modelos cinéticos: ordem zero (a); Higuchi (b) e primeira ordem (c), utilizados para obtenção do fluxo (J) e o coeficiente de correlação (r).

Tabela 29: Determinação do fluxo (J) e cinética de liberação da lidocaína e clorexidina da formulação completa

Fármacos	Fluxo (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$) \pm DP	Correlação linear (r)	Modelo cinético
Lidocaína	6,196 \pm 0,49	0,9884	Higuchi
Clorexidina	1,0 \pm 0,06	0,9974	Higuchi

A determinação do fluxo de liberação dos fármacos demonstrou que a lidocaína era liberada no meio receptor em uma quantidade seis vezes maior que a clorexidina por minuto.

A liberação dos fármacos presentes na formulação seguiu o modelo cinético de Higuchi, porque os valores do coeficiente de correlação neste modelo foram os maiores obtidos dentre aqueles decorrentes da aplicação dos três modelos cinéticos. Segundo este modelo, foi verificado que a concentração dos fármacos liberados aumentava com a raiz quadrada do tempo. Ficou estabelecido, então, que o processo de liberação dos fármacos depende das características da formulação.

Nas formulações semissólidas do tipo gel, a viscosidade é considerada a característica da formulação que influencia diretamente na capacidade de liberação dos fármacos da formulação. Os ensaios de liberação para este tipo de formulações permitiram estabelecer esta correlação, onde se verificou que quanto maior for a viscosidade de uma formulação, maior é o tempo de liberação desta formulação e menor é o coeficiente de difusão dos fármacos.

Senel e colaboradores (1999) não mencionaram o modelo de cinética de liberação seguido pela clorexidina no gel de quitosano desenvolvido em seu trabalho. Por outro lado, Ricci e colaboradores (2005) demonstraram que a liberação da lidocaína a partir de seu gel de poloxamer 407 a 20% seguia o modelo de cinética de Higuchi (COSTA e LOBO, 2001).

Com base nestes conceitos e objetivando alcançar uma formulação de liberação controlada mais adequada, o uso da matriz que permita a obtenção de uma formulação final com uma maior viscosidade seria a melhor escolha. Esta condição permitiu maior suporte à escolha da matriz utilizando o solvente aquoso que apresentou viscosidade superior a matriz contendo o solvente etanólico.

4.4.4. Estudo Reológico

A avaliação das propriedades reológicas das formas de administração do tipo gel foram importantes para predição de suas características quando da aplicação *in vivo*. As propriedades de fluxo de formulações semissólidas de uso vaginal podem ser utilizadas para se ter o conhecimento prévio de sua capacidade de espalhamento e recobrimento destas sobre o epitélio vaginal (CHANG, 2002).

A partir dos resultados obtidos na análise das amostras em diferentes condições de cisalhamento, as propriedades reológicas da formulação foram determinadas.

As Figuras de 40 a 45 representam os reogramas obtidos no estudo reológico da formulação ideal.

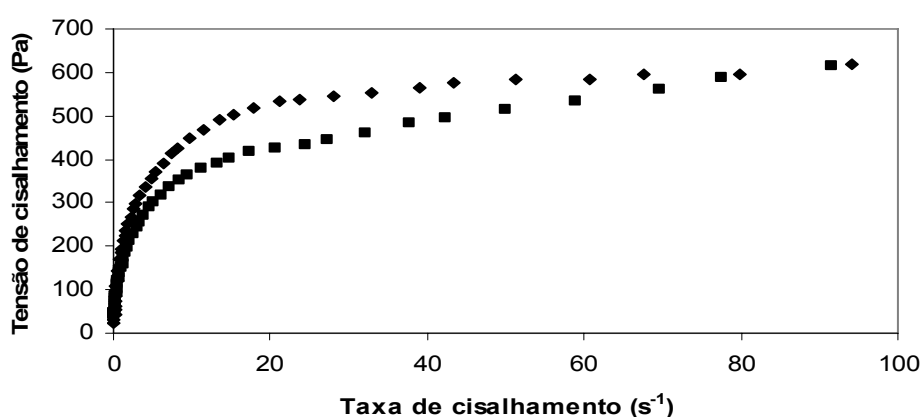


Figura 40: Reograma de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento ascendente de 0,1 a 100 s⁻¹ (losango) e descendente de 100 a 0,1 s⁻¹ (quadrado) da formulação completa.

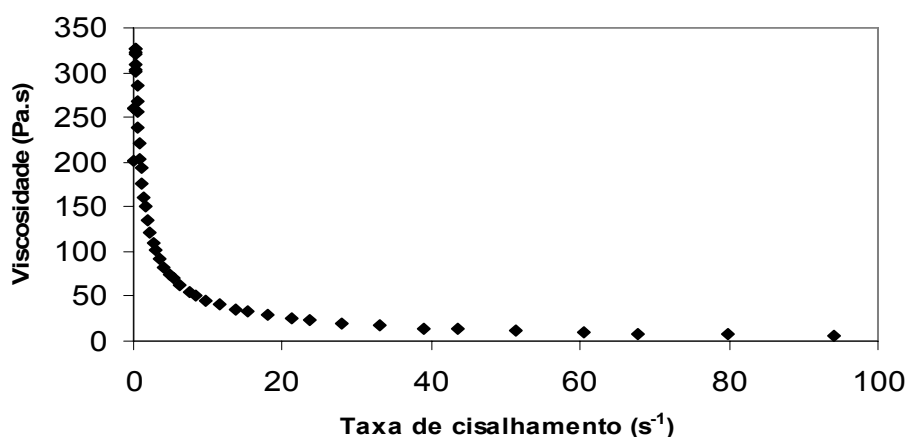


FIGURA 41: Reograma de viscosidade aparente *versus* taxa de cisalhamento (0,1 a 100 s⁻¹) da formulação completa.

Os reogramas apresentados nas Figuras 40 e 41 permitiram a classificação da formulação como sendo um fluido não-Newtoniano pseudoplástico. O perfil dos reogramas apresentado demonstrou um aumento da tensão de cisalhamento em função do aumento da taxa de cisalhamento apresentada (0,1 a 100 s⁻¹) e uma redução da tensão mediante a redução desta taxa (100 a 0,1 s⁻¹) não linearmente, além do perfil de decrescimento da viscosidade aparente da formulação em função do aumento da taxa de cisalhamento.

A classificação da formulação como um fluido não-Newtoniano determinou que as interações entre os componentes desta afetam a velocidade de deformação causada por forças externas, resultado na não proporcionalidade entre a taxa ($\dot{\gamma}$) e a tensão de cisalhamento (τ), conforme apresentado na figura 40 (GALLEGOS e FRANCO, 2000).

Os fluidos não-Newtonianos podem ser independentes ou dependentes do tempo. Para aqueles denominados independentes do tempo, a viscosidade não é uma constante à temperatura e composição fixas, sendo então denominada viscosidade aparente (η_{ap}), a qual depende da relação entre a tensão e a taxa de cisalhamento, conforme apresentado na figura 41 (ALMEIDA e BAHIA, 2003).

Os fluidos não-Newtonianos denominados independentes do tempo que apresentam uma queda drástica na viscosidade aparente quando é aumentada a taxa de deformação são denominados pseudoplástico. O reograma resultante da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento não se trata de uma linha reta, mas sim de uma curva convexa devido à velocidade de deformação aumentar em proporções maiores que a tensão tangencial. Durante o ensaio em cisalhamento contínuo, estes fluidos se diluem com o aumento da taxa de cisalhamento. Esta situação pode ser verificada na Figura 41 (ALMEIDA e BAHIA, 2003).

Este efeito de diluição se dá pela redução da viscosidade aparente. A redução da viscosidade aparente do fluido é consequência do aumento da ordenação das moléculas na direção da força aplicada, força esta gerada quando é submetido a uma tensão de cisalhamento, diferente do estado desordenado apresentando pelas moléculas deste fluido quando está em repouso (BRIANT *et al*, 1989).

No estudo de Owen e colaboradores (2000), alguns géis contraceptivos vaginais comerciais foram submetidos a estudos reológicos e todos se caracterizaram como fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos, devido à redução da viscosidade aparente frente ao aumento da taxa de cisalhamento.

Não somente com base nos perfis dos reogramas de variação da tensão em função da taxa de cisalhamento pode ser realizada a descrição do comportamento reológico de um fluido não-Newtoniano. A utilização de modelos empíricos capazes de relacionar os dados de tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento é uma outra ferramenta disponível para agregar mais indícios que comprovem a descrição realizada do fluido com base na análise do perfil dos reogramas (GALLEGOS e FRANCO, 2000).

Os modelos freqüentemente utilizados para descrever o comportamento não-Newtoniano são: Ostwald-de-Waele (Lei de Potências), Herschel-Bulkley, Bingham, Casson e Mizrahi-Berk. Estes modelos reológicos utilizam equações constitutivas que permitem interpretar a variação da tensão de cisalhamento de um fluido mediante a variação da taxa de cisalhamento e calcular constantes que permitem,

através de sua magnitude, a correção com propriedades reológicas (CHANG *et al.*, 2002).

Dentre os modelos reológicos apresentados e que descrevem o comportamento não-Newtoniano de fluidos, o modelo de Ostwald-de-Waelle, também conhecido como modelo da Lei de Potências, é aquele mais aplicado para descrever o comportamento de fluidos pseudoplásticos (OWEN *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2002). Este modelo estabelece que a tensão de cisalhamento (τ) varia com a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) em função de duas constantes: o índice de consistência (K) e o índice de fluxo ou de comportamento de fluido (n). A equação apresentada abaixo demonstra esta relação:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

Desta maneira, o índice de consistência (K) e o índice de fluxo ou de comportamento de fluido (n) são parâmetros do modelo de Ostwald-de-Waelle utilizados na caracterização de fluidos, isto é, como ferramentas comparativas e classificatórias. O índice de fluxo ou comportamento dos fluidos (n) define os fluidos como sendo pseudoplásticos ou dilatantes. Quando n assume valores entre um e zero é classificado como pseudoplástico, mas quando n é maior que um é denominado dilatante. O valor de o índice de consistência (K) indica o grau de resistência do fluido durante o escoamento (ALMEIDA e BAHIA, 2003).

Conforme a Tabela 30, o índice de fluxo (n) de 0,4084 obtido para a formulação completa classifica esta como pseudoplástica, classificação esperada para a formulação devido ao valor de 0,3501 encontrado na avaliação do gel placebo aquoso. O índice de consistência obtido foi 151,39 e se manteve próximo ao valor de 143,15 obtido para o gel placebo aquoso. Estes valores de índice de fluxo e índice de consistência estão coerentes com aqueles encontrados para alguns géis contraceptivos comerciais (OWEN *et al.*, 2000).

Tabela 30: Valores do índice de consistência (K), índice de fluxo (n) e viscosidade aparente, medida no maior ponto de taxa de cisalhamento (cisalhamento contínuo de 0,1 a 100 s^{-1}), obtidos a partir da aplicação do modelo da Lei das Potencias (*Power Law*)

K	n	Viscosidade aparente
151,39	0,4084	6,571

Nos ensaios em regime de cisalhamento oscilatório, o primeiro ensaio visa à verificação do comportamento do módulo elástico (G') e módulo viscosidade (G''), onde a frequência foi fixada, permitindo o acompanhamento da variação do percentual de deformação e a determinação da região de viscoelasticidade linear. A região de viscoelasticidade linear é caracterizada pela constância do valor dos módulos obtidos frente à variação da taxa de deformação.

Os reogramas da Figura 42 apresentam a variação da deformação de 0,1 a 400% com a frequência fixada em 1,0 Hertz no primeiro ensaio em regime de cisalhamento oscilatório.

Nesta região de linearidade, se encontra um percentual elegível de deformação para a realização de outro ensaio em regime de cisalhamento oscilatório onde se verifica o comportamento e a contribuição dos módulos mediante a variação da frequência (BONACUCINA *et al.*, 2004). A taxa de deformação eleita, conforme a tabela 31, foi aquela que o valor inteiro do módulo elástico ou viscoso (Pa) tenha ocorrido com maior frequência e apresentou um desvio padrão relativo inferior a 2%, isto é, uma variação não significativa.

Na segunda determinação em regime de cisalhamento oscilatório permite que o fluido seja classificado ou não como um gel, segundo as suas propriedades reológicas.

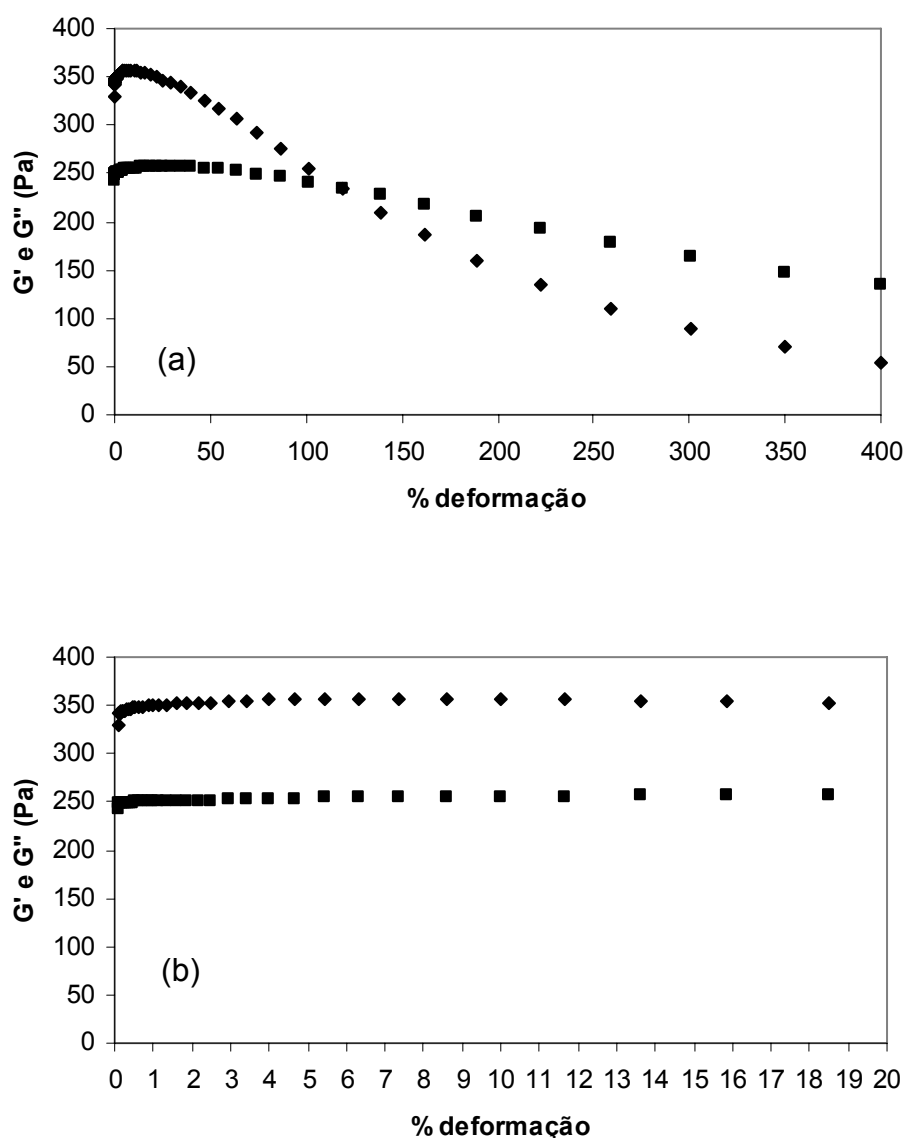


Figura 42: Reograma do m3dulo el3stico G' (losango) e m3dulo viscosidade G'' (quadrado) *versus* tempo com freq3ncia fixada em 1,0 Hz e com varia33o do percentual de deforma33o de 0,1 a 400 % (a) e com varia33o do percentual de deforma33o de 0,1 a 20 % (b).

O gel verdadeiro, segundo suas propriedades reol3gicas, 3 aquele que apresenta o m3dulo el3stico com valores praticamente constantes e significativamente superiores ao obtidos para o m3dulo viscoso, que tamb3m deve apresentar valores praticamente constantes, em um ensaio sob regime de

cisalhamento oscilatório com a frequência variando em uma faixa pré-estabelecida (BURCHARD e ROSS-MURPHY *apud* BONACUCINA *et al.*, 2004). Isto significa que os módulos G' e G'' em um gel verdadeiro são independentes da frequência e a tangente δ (G''/G'), também denominada ângulo de fase, apresenta um valor pequeno, enquanto em soluções viscosas os módulos G' e G'' são dependentes da frequência e a tangente δ (G''/G') apresenta um valor variável. A tangente δ representa taxa do módulo G'' (viscoso ou de perda) em função do módulo de G' (elástico ou de acondicionamento) e permite a obtenção de informações sobre a estrutura do sistema polimérico envolvido. Quando o valor da tangente δ (G''/G') se aproxima de zero, há a predominância da característica elástica do sistema, enquanto este valor excede a unidade, o sistema polimérico é considerado viscoso.

Tabela 31: Valores do módulo G' (Pa) na região de viscoelasticidade linear de maior ocorrência utilizados na eleição do percentual de deformação para o segundo ensaio em regime de cisalhamento oscilatório

<i>Percentual de Deformação (%)</i>	<i>G' (Pa)</i>	<i>Média</i>	<i>DPR (%)</i>
4,65	356,1		
5,42	356,3		
6,29	356,9	356,3	0,09
8,58	356,5		
10,01	356,2		
11,66	356		

O reograma apresentado na Figura 43 demonstra o comportamento de dependência do módulo elástico (G') e módulo viscosidade (G'') em relação à frequência, variando de 0,1 a 10,0 Hertz e com percentual de deformação fixado em 5%, caracterizado a formulação como gel não verdadeiro.

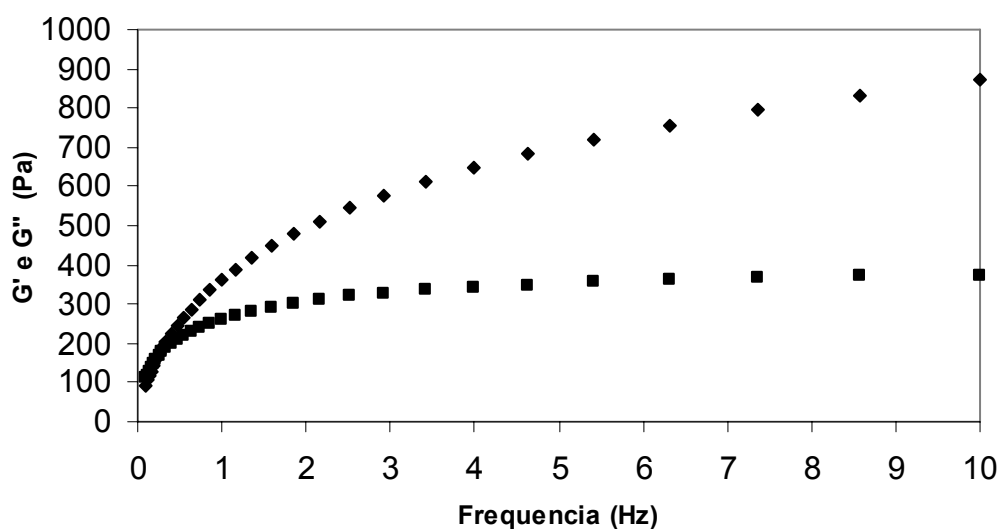


Figura 43: Reograma do módulo elástico G' (losango) e módulo viscosidade G'' (quadrado) versus frequência de 0,1 a 10,0 Hz, com percentual de deformação fixado em 5%.

No reograma da Figura 44, a tangente δ (G''/G') apresentou valores variáveis no regime de execução do ensaio, fato que também caracteriza estrutura de gel não verdadeiro. A caracterização como gel não verdadeiro está no fato de que os valores obtidos para esta tangente foram significativamente diferentes, apresentando um desvio padrão relativo de 30%. Esta variação da tangente δ (G''/G') permitiu a obtenção de duas regiões distintas do reograma: uma pequena região onde há a predominância da característica viscosa (tangente $\delta > 1$), quando o sistema polimérico é submetido a frequências menores que 0,2 Hz, e a região mais extensa com predominância da característica elástica (tangente $\delta < 1$), quando o sistema polimérico é submetido a frequências maiores que 0,2 Hz.

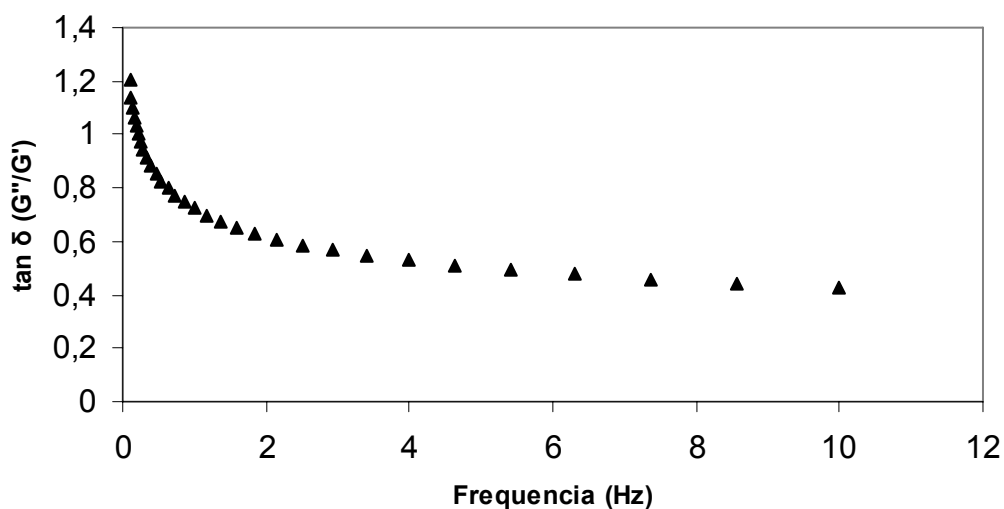


Figura 44: Reograma da tangente δ (G''/G') versus frequência de 0,1 a 10,0 Hz, com percentual de deformação fixado em 5%.

O tixotropismo é uma propriedade reológica presente em alguns sistemas poliméricos e pode representar uma vantagem quando estes sistemas são desenvolvidos para aplicação farmacêutica. Compreende-se que formulações farmacêuticas objetivam a liberação de fármacos em um local de aplicação de maneira que estes possam atingir seus locais de ação específica (RANG *et al.*, 2003). Em formulações semissólidas, a liberação dos fármacos depende da capacidade de difusão destes através da matriz em que estes estão embebidos. A tixotropia demonstra a existência de uma menor velocidade de reorganização do sistema polimérico que compõe a matriz semissólida onde estão presentes os fármacos após ter sido aplicada uma força, tal qual aquela aplicada para o espalhamento de uma formulação sobre a superfície desejada. Esta menor velocidade de reorganização do sistema propicia uma maior difusão dos fármacos para fora da matriz polimérica, desta maneira aumentando a capacidade dos fármacos saírem da formulação (LEE *et al.*, 2009).

Em termos reológicos, este fenômeno é caracterizado quando um sistema, submetido a uma tensão de cisalhamento, com taxa de cisalhamento constante,

sofre uma redução gradativa da sua viscosidade ao longo do tempo em que esta tensão é aplicada (LEE *et al.*, 2009). Com o desenvolvimento de equipamentos capazes de oferecer mais recursos para o estudo reológico de sistemas, tais como os reômetros, a tixotropia pode ser determinada em ensaio de configuração específica que melhora a correlação dos resultados obtidos com a teoria.

Alternativamente, os ensaios de cisalhamento contínuo permitem a verificação da tixotropia de um sistema através do surgimento de uma área presente entre a curva de tensão de cisalhamento quando submetida à taxa de cisalhamento crescente em função da curva de tensão de cisalhamento quando submetida à taxa de cisalhamento decrescente. Esta área é denominada histerese e surge em função dos diferentes valores de tensão de cisalhamento medidos no mesmo valor de taxa de cisalhamento, mas obtidos quando as moléculas do sistema polimérico da matriz partem de diferentes padrões de organização.

Como foi observado na Figura 40, ocorreu o surgimento de uma área entre as curvas ascendente e descendente pela variação dos valores de tensão de cisalhamento medidos em alguns pontos de taxa de cisalhamento específicos, mas esta área não pode ser classificada como histerese devido ao fato de ter ocorrido a sobreposição dos valores de tensão de cisalhamento em taxas de cisalhamento mais baixas. Esta sobreposição demonstrou que a diferença dos valores de tensão de cisalhamento obtidos no regime de aumento da taxa de cisalhamento e no de redução não foram suficientes para caracterizar um perfil reográfico tixotrópico. Desta maneira, o resultado deste ensaio forneceu indícios que a formulação não é tixotrópica (ALMEIDA e BAHIA, 2003).

Devido à extensa capacidade de configurações que o reômetro utilizado suportava, outro ensaio reológico mais específico foi realizado para gerar mais informações que permitissem dar suporte às observações obtidas no reograma de tensão versus taxa de cisalhamento que foi apresentado anteriormente na Figura 50.

O reograma da Figura 45 descreveu o comportamento da viscosidade aparente da formulação ao longo do tempo quando a taxa de cisalhamento foi fixada em $10,0 \text{ s}^{-1}$. A queda significativa da viscosidade até os trinta segundos iniciais, com

um desvio padrão relativo de 4,52%, e o perfil constante desta a partir dos trinta segundos de ensaio, com desvio padrão relativo de 1,18%, forneceram mais indícios para caracterizar a formulação como não-tixotrópica.

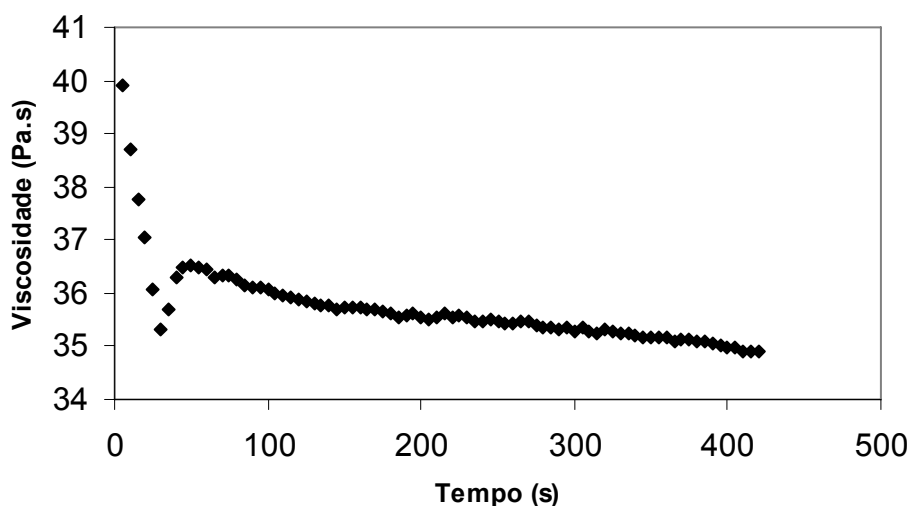


Figura 45: Reograma de viscosidade aparente versus tempo com taxa de cisalhamento fixada em $10,0 \text{ s}^{-1}$.

O estudo da reologia da formulação revelou que esta se trata de um fluido não-Newtoniano, pseudoplástico, um gel não verdadeiro e não tixotrópico. Em estudos reológicos anteriores (OWEN *et al.*, 1999), formulações de uso urogenital comerciais foram classificadas como fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos, assim como a formulação obtida neste trabalho.

Quanto ao fato de não se tratar de um gel verdadeiro, em termos reológicos, e não tixotrópico significou que a formulação obtida foi uma solução viscosa do polímero em meio aquoso e que esta não apresentaria um fluxo de liberação dos fármacos da formulação maior durante a redução da taxa de cisalhamento após a aplicação de uma força, devido a menor velocidade de reorganização do sistema da matriz polimérica após a interrupção da aplicação desta força.

Em outras palavras, significa que se tratando de uma solução viscosa, a aplicação de uma força geradora de atrito sobre uma mucosa recoberta por esta formulação não teria uma menor resposta lubrificante na reincidência quase que imediata desta força, que seria obtida com um gel verdadeiro e tixotrópico, devido a este último apresentar uma menor velocidade de reorganização do sistema.

5. CONCLUSÕES

- A validação da metodologia analítica desenvolvida comprovou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e sensibilidade demonstrando ser adequada para a utilização na quantificação da associação do cloridrato de lidocaína e do digluconato de clorexidina na formulação e nos estudos de liberação *in vitro*;
- A associação do cloridrato de lidocaína com o digluconato de clorexidina apresenta uma incompatibilidade em meio aquoso que leva a formação de um precipitado (produto de incompatibilidade) que reduz o teor de clorexidina disponível em solução. A substituição da água por etanol 95% aumenta o tempo de estabilidade da associação dos fármacos em solução;
- A aplicação de métodos espectroscópicos e difratométricos forneceram indícios da ocorrência de inclusão de lidocaína em metil- β -ciclodextrina por malaxagem em escala laboratorial. O método cromatográfico desenvolvido permitiu a evidenciação da conservação da estrutura química da molécula de lidocaína a partir da sua extração do complexo de inclusão obtido;
- O incluso de lidocaína em metil- β -ciclodextrina permitiu a associação com a clorexidina em meio aquoso e possibilitou a obtenção de um gel contendo dois agentes mucoadesivos, hidroxietilcelulose e o PEG-15 cocopoliamina, e capaz de ser aplicado nas condições fisiológicas das cavidades urogenitais;
- Os estudos de liberação dos fármacos *in vitro* permitiram a caracterização da formulação como sendo de liberação controlada e a cinética de liberação destes fármacos segue o modelo de Higuchi. A formulação é promissora, mas os estudos de permeação com mucosa *in vitro* são necessários para melhor caracterizar a formulação;
- O estudo reológico permitiu caracterizar a formulação como sendo um gel não verdadeiro, segundo as propriedades reológicas apresentadas, um fluido não-Newtoniano, pseudoplástico e não tixotrópico. Estes resultados sustentam a afirmação deste gel ser um bom candidato a agente lubrificante de aplicação útil nas cavidades urogenitais.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELMAGEEG, R.; LABYAD, N.; WATSON, D. G.; PORNAMDARI, M.; CABLE, C. G.; STANLEY, E. Evaluation of the stability of morphine sulfate in combination with Instillagel®. *J. Clin. Pharm. Therap.* 33: 263-271, 2008.
- AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, J. Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23: 489-515, 1997.
- AKOMEAH, F. K.; MARTIN, G. P.; BROWN, M. B. Variability in human skin permeability in vitro: Comparing penetrants with different physicochemical properties. *J Pharm Sci.*, 2006.
- ALEXANDER, N. J.; BAKER, E. ; KAPTEIN, M.; KARCK, U.; MILLER, L.; ZAMPAGLIONE, E. Why consider vaginal drug administration? *Fert. Ster.* 82 (1): 1-12, 2004.
- ALGER, M. S. M. Polymer Science Dictionary. New York: Elsevier Applied Science, 1989.
- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. *Cosmet. Toiletries*, 15 (3): 96-100, 2003.
- ALTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. *Editora Artmed*, 2ª. Edição, Porto Alegre, RS , 2005.
- A-SASUTJARIT, R.; SIRIVAT, A.; VAYUMHASUWAN, P. Viscoelastic properties of Carbopol 940 gels and their relationships to piroxicam diffusion coefficients in gel bases. *Pharm Res.* 22 (12): 2134-2140, 2005.
- ASHNAGAR, A.; NASERI, N. G.; KHANAKI, B. Study of the β -cyclodextrin imipramine hydrochloride inclusion complex and determination of its stability constant (K) by UV-visible spectroscopy. *E-Journal of Chemistry.* 4 (4): 550-558, 2007.
- AUGSBURGER, L. L.; HOAG, S. W. Pharmaceutical dosage forms: tablets. 3° Edition. *Informa Health Care*, 2008.
- BAJEROVÁ, M.; GAJDZIOK, J.; DVORÁCKOVÁ, K.; MASTEIKOVÁ, R.; KOLLÁR, P. Semisynthetic cellulose derivatives as the base of hydrophilic gel systems. *Ceska Slov. Farm.* 57 (2): 63-69, 2008.
- BARROS, C. B.; HIRATA, Y. S. Princípios e práticas de validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro: Schaffer empreendimentos S/C, 2004.
- BASRANI, B. R.; MANEK, S.; SODHI, R. N. S.; FILLERY, E.; MANZUR, A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Basic Res. Tech.* 33 (8): 966-969, 2007.

BENTLEY, M. V.; LOPEZ, R. F. Apostila. Curso de permeação cutânea *in vitro* II. Ribeirão Preto, 2002.

BLANCO-FUENTE, H.; ANGUIANO-IGEZ, S.; OTERO-ESPINAL, F. J.; BLANCO-MENDEZ, J. In-vitro bioadhesion of carbopol hydrogels. *Inter. Jour. Pharm.* 142: 169-174, 1996.

BLANCO-FUENTE, H.; ESTEBAN-FERNANDEZ, B.; BLANCO-MENDEZ, J.; OTERO-ESPINAL, F. J. Use of β -cyclodextrin to prevent modifications of the properties of carbopol hydrogels due to carbopol-drug interactions. *Chem. Pharm. Bull.* 50 (1): 40-46, 2002.

BLANCO, J. E.; VILA-JATO, J. E. L.; OTERO, F.; ANGUIANO, S. Influence of method of preparation on inclusion complex of naproxen with different cyclodextrins. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 17: 943-957, 1991.

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of carbopol gels in hydrophilic cosolvents. *Int. J. Pharm.* 282: 115-130, 2004.

BARDSLEY, A. Use of lubricant gels in urinary catheterisation. *Nursing Standard*, 20 (8): 41-46, 2005.

BRANNON-PEPPAS, L. Novel vaginal drug release applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11: 169-177, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lista de Medicamentos de Referência. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 25 abr. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. 29 mai 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lista de Medicamentos de Referência. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 27 mar. 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. 10 ago 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE n° 1, de 29 de julho de 2005. Autorizar ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, em anexo. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1 ago. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. 18 jan 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Determinar a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” anexo. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. 18 jan 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE n° 222, de 29 de julho de 2005b. Determinar a publicação do “Formulário Nacional 1ª Edição”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. 08 jul 2009.

BRIANT, J.; DENIS J.; PARC, G. Rheological properties of lubricants. Editions Technip, 1989.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceuticals solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59: 645-666, 2007.

BRITISH PHARMACOPEIA, v.1, London: Her Majesty's Stationery Office, 2008.

BULLOCK, K.; GRUNDY, J. Lignocaine hydrochloride and its solutions: purity, tests, stability and assay. *J. Pharm. Pharmacol.* 7: 755-773, 1955.

BURRANO, B. T.; SCNAARE, R. L.; MALAMUD, D. Synthetic cervical mucus formulation. *Contraception*, 66: 137-140, 2002.

CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topica formulations: pratical aspects. *European Journal of Pharm. and Biopharm.* 68: 467-478, 2008.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: um updated review. *AAPS PharmSciTech.* 6 (2): E329-357, 2005.

CHALUPOVÁ, Z.; MASTEIKOVÁ, R.; SAVICKAS, A. Pharmaceutical hydrophilic gels. *Ceska Slov. Farm.* 54 (2): 55-59, 2005.

CH'NG, H. S.; PARK, H.; KELLY, P.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery: II Synthesis and evaluation of some swelling water insoluble bioadhesive polymers. *J. Pharm. Sci.* 74: 399-405, 1985.

CHANG, J. Y.; OH, Y.; CHOI, H.; KIM, Y. B.; KIM, C. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. *Int. J. Pharm.* 241: 155-163, 2002.

COLLINS, M. K.; POTER, K. B.; BROOK, E.; JOHNSON, L.; WILLIAMS, M.; JEVITT, C. Vulvar applications of lidocaine for pain relief in spontaneous vaginal delivery. *Obstet. Gynecol.* 84 (3): 335-337, 1994.

COLUMB, M. O.; DAVIS, A. Local anaesthetic agents. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 8: 128-132, 2004.

CORKILL, A. B.; LAVENDER, T.; WALKINSHAW, S.; ALFIREVIC, Z. Reducing postnatal pain from perineal tears by using lignocaine gel: a double-blind randomized trail. *Birth*, 28 (1): 22-27, 2001.

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

CROSS, S. E.; INNES, B.; ROBERTS, M. S.; TSUZUKI, T.; ROBERTSON, T. A.; MCCORMICK, P. Human Skin Penetration of Sunscreen Nanoparticles: In-vitro

Assessment of a Novel Micronized Zinc Oxide Formulation. *Skin Pharmacol Physiol.* 20 (3): 148-154, 2007.

CUMMINS, T. R.; SHEETS, P. L.; WAXMAN, S. G. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanism of pain. *Pain*, 131 (3): 243-257, 2007.

DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B. Mechanism of action of disinfectants. *Inter. Biodet. Biodeg.* 41 (3-4): 261-68, 1998.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. Assessment of physical and antioxidant activity stability, in vitro release and in vivo efficacy of formulations added with superoxide dismutase alone or in association with alpha-tocopherol. *Eur J Pharm Biopharm.* 37:287-295, 2006.

DODANE, V.; VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm. Sci. Technol. Toda*, 1: 246-253, 1998.

DOHERTY, W. Instillagel: an anaesthetic antiseptic gel for use in catheterization. *Br. J. Nurs.* 8 (2): 109-12, 1999.

DUN, E. Antifungal resistance in yeast vaginitis. *Yale J. Biol. Med.* 72 (4): 281-5, 1999.

ELPERN, B. Chemistry of the biguanides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 148 (3): 570-572, 1968.

ELSON, C.; MILNE, A.; CURRAN, D.; KYDONIEUS, A. N,O-Carboxymethylchitosan as mucoadhesive for vaginal delivery of levonogestrel. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 27: 7201-7202, 2000.

ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; DRECHSLER, M.; PACCANICCIO, L.; MARIANI, P.; CONTADO, C.; STELLIN, E.; MNEGATTI, E.; BONINA, F.; PUGLIA, C. Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin. *Pharm Res.* 22(12): 2163-2173, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª edição, Parte I e Parte II: São Paulo, Ed. Atheneu, 1988.

FIJALEK, Z.; BACZYNSKI, E.; PIWONSKA, A.; WAROWNA-GRZESKIEWICZ, M. Determination of local anaesthetics and their impurities in pharmaceutical preparations using HPLC method with amperometric detection. *J Pharm Biomed Anal.* 37 (5): 913-918, 2005.

GALLEGOS, C.; FRANCO, J. M. Rheology of food, cosmetics and pharmaceuticals. *Cur. Op. Inter. Sci.* 4: 288-293, 2000.

GARNIER, T.; MANTYLQA, A.; JARVINEN, T.; LAWRENCE, M. J.; BROWN, M. B.; CROFT, S. L. Topical buparvaquone formulations for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Pharm Pharmacol.* 59 (1); 41-49, 2007.

GENC, L.; OGUZLAR, C.; GÜLER, E. Studies on vaginal bioadhesive tablets of acyclovir. *Pharmazie.* 55: 297-299, 2000.

GRENIER, D. Effect of chlorhexidine on the adherence properties of Porphyromonas gingivalis. *J. Clin. Periodontol.* 23 (2): 140-2, 1996.

HA, Y.; CHEUNG, A. P. New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine. *Jor. Pharm. Bio. Anal.* 14: 1327-1334, 1996.

HARRIS, P.; NAGY, S.; VARDAXIS, N. Mosby's Dictionary of Medicine, Nursing & Health Professions. Mosby/Elsevier. Sydney, Australia, 2005.

HAMDNE, M.; HEUZEY, M.; BÉGIN, A. Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels. *Inter. Jour. Bio. Macro.* 37: 134-142, 2005.

HAVLIKOVA, L.; MATYSOVÉ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; HAJKOVÁ, R.; SOLICH, P. HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. *J Pharm Biomed Anal.* 4 (): 1169-7, 2007.

HOLLER, S.; VALENTA, C. Effect of selected fluorinated drugs in a "ringing" gel on rheological behaviour and skin permeation. *Eur J Pharm Biopharm.* 66(1): 120-126, 2006.

HUANG, J.; WONG, H. L.; ZHOU, Y.; WU, X. Y.; GRAD, H.; KOMOROWISKI, R. In vitro studies and modeling of a controlled-release device for root canal therapy. *Journal Control. Release.* 67: 293-307, 2000.

ICH, Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 2005

ILLUM, L. Chitosan: and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.* 15 (9): 1326-1331, 1998.

IRWIN, C. R.; MCCULLOUGH, K. C.; JONES D. S. Chlorhexidine-containing mucoadhesive polymeric compacts designed for use in the oral cavity: an examination of their physical properties, in vitro/in vivo drug release properties and clinical acceptability. *J Mater Sci Mater Med.* 14 (10): 825-832, 2003.

IWAMI, Y.; SCHACHTELE, C. F.; YAMADA, T. Mechanism of inhibition of glycolysis in Streptococcus mutans NCIB 11723 by chlorhexidine. *Oral Microbiol. Immunol.* 10 (6): 360-364, 1995.

JUNGINGER, H. E. Bioadhesive polymer system for peptide delivery. *Acta Pharm. Technol.* 36: 110-126, 1990.

KAST, C. E.; VALENTA, C.; LEOPOLD, D. M.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole. *J. Control. Release.* 81: 347-354, 2002.

KATZ, D. F.; DUNMIRE, E. N. Cervical mucus: problems and opportunities for drug delivery via the vagina and cervix. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11: 385-401, 1993.

KIKWAI, L.; BABU, R. J.; PRADO, R.; KOLOT, A.; ARMSTRONG, C. A.; ANSEL, J. C.; SINGH, M. In vitro and in vivo evaluation of topical formulations of spantide II. *AAPS PharmSciTech.* 6 (4): E565-E572, 2005.

KIM, K. W.; THOMAS, R. L.; LEE, C.; PARK, H. J. Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and O-carboxymethylated chitosan. *J. Food Prod.* 66: 1495-1498, 2003.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER J. H. Química Farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 362-365, 368-374, 522-527, 1988.

KUYYAKANOND, T; QUESNEL, L.B. The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiol. Lett.* 79 (1-3): 211-215, 1992.

LANGOTH, N.; KABLE, J.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Development of a Mucoadhesive and Permeation Enhancing Buccal Delivery System for PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). *International Journal of Pharmaceutics*, 206: 103-104, 2005.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic propriety in pharmaceutical formulations. *J. Control. Rel.* 136: 88-98, 2009.

LEHR, C. M. Bioadhesive technologies for the controlled delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 11: 177-218, 1995.

LIDE, D. R. Handbook of Chemistry and Physics 81th Edition, 2000-2001.

LPPACHER, A.; MILLER, R.H.; MADER, K. Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers. *Int. J. Pharm.* 19: 227-230, 2000.

LIN, C. C.; METTERS A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (12-13): 1379-408, 2006.

LOFTSSON, T.; DUNCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Inter. J. Pharm.* 329: 1-11, 2007.

LUESSEN, H. L. RENTEL, C. O.; KOTZÉ, A. F.; LEHR, C. M.; BOER, A. G.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery: VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug busserelin in vivo. *Pharm. Res.* 13: 1668-1672, 1996.

MANDAL, T. K. Swelling-controlled release system for the vaginal delivery of miconazole. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 337-343, 2000.

MARIS, P. Modes of action of disinfectants. *Rev. Sci. Tech.* 14 (1): 47-55, 1995.

MOFFAT, A. C.; OSSLETON, M. D.; WIDROP, B. Clarke's analysis of drugs and poisons, v.1 e 2. 3^a ed. Pharmaceutical Press: London, 2004.

MOHAMED, M. I. Optimization of chlorfenesin emulgel formulation. *AAPS J.* 6 (3): 1-6, 2004.

MOLTENI, B.; D'ANTUONO, A.; BANDINI, P.; GIUSEPPE, S.; BARCELLONA, E.; MILANI, M. Efficacy and tolerability of new chlorhexidine-based vaginal gel in vaginal infections. *Curr. Med. Res. Opin.* 20 (6): 849-53, 2004.

MOSHREFI, A. Chlorhexidine. *J. West Soc. Periodontol. Periodontal Abstr.* 50 (1): 5-9, 2002.

MUKNE, A. P.; NAGARSENKER, M. S. Triamterene- β -cyclodextrin systems: preparation, characterization and *in vivo* evaluation. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 5 (1): 1-9, 2004.

NAU, C.; WANG, G. K. Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na⁺ channels. *J. Membr. Biol.* 201 (1): 1-8, 2004.

NEVES, J.; BAHIA, M. F. Gels as vaginal drug delivery systems. *Inter. Jour. Pharm.* 318:1-14, 2006.

NEVES, J.; AMARAL, M. H.; BAHIA, M. F. Performance of an *in vitro* mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: influence of different testing conditions and instrumental parameters. *Eur. Jour. Pharm. Biophar.* 69: 622-632, 2008.

NEWTON, D. W. Drug incompatibility chemistry. *American Journal of Health Sust. Pharm.* 66 (4): 348-57, 2009.

O'CONNOR, S. M.; GEHRKE, S. H. Particulate size distribution analysis as a characterization method for gel particles produced in suspension reactors. *Polymer.* 42: 1541-1546, 2001.

OWEN, D. H.; KATZ, D. F. A vaginal fluid simulant. *Contraception.* 59: 91-95, 1999.

OWEN, D. H.; PETERS, J. J.; KATZ, D. F. Rheological properties of contraceptive gels. *Contraception.* 62: 321-326, 2000.

PATEL, H. M.; SUHAGIA, B. N.; SHAH, S. A.; RATHOD, I. S.; PARMAR, V. K. Preparation and characterization of etoricoxib- β -cyclodextrin complexes prepared by kneading method. *Acta Pharma*. 57: 351-359, 2007.

PARK, J. H.; RYU, Y. K.; LIM, H. J.; LEE, H. S.; PARK, J. K.; LEE, Y. K.; JANG, M. D.; SUH, J. K.; CARR, P. W. Effect of Triethylamine in the Mobile phase on the Retention Properties of Conventional polymerc and Horizontally Polymerized Octadecylsilica in RPLC. *Chormatographia*, 62: 321-326, 2000.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 50 (1): 27-46, 2000.

POWELL, M. F. Stability of Lidocaine in Aqueous Solution: Effect of Temperature, pH, Buffer, and Metal Ions on Amide Hydrolysis. *Pharm. Res*. 4 (1): 42-45, 1987.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 5^a. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

RASIMICK, B. J.; NEKICH, M.; HLADEK, M. M.; MUSIKANT, B. L.; DEUTSCH, A. S. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J. Endod*. 34 (12): 1512-3, 2008.

RAWAT, S.; JAIN, S. K. Solubility enhancement of celecoxib using β -cyclodextrin inclusion complexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 57: 263-267, 2004.

RICCI, E. J.; LUNARDI, L. O.; NANCLARES, D. M. A.; MARCHETTI, J. M. Sustained release of lidocaine from poloxamer 407 gels. *Inter. J. Pharm*. 288: 235-244, 2005.

RICHARDSON, J. L.; TREVOR, T.I. Vaginal delivery of calcitonin by by hyaluronic acid formulations. *Drug Pharm. Sci*. 98: 563-599, 1999.

ROWLAND, M.; TOWZER, T. N. Elimination. In: Balado D, ed. Clinical pharmacokinetics, concepts and applications, 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott & Wilkins, 157, 1995.

OZGUNEY, I. S.; KARASULU, H. Y.; KANTARCI, G.; SÖZER, S.; GÜNERI, T.; ERTAN, G. Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium Through Rat Skin From Various Formulations. *AAPS PharmSciTech*. 7 (4): E88, 2006.

SARKAR, N.; WALKER, L.. C. Hydration-dehydration properties of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*. Barking GB. 27: 177-185, 1995.

SENEL, S.; KREMER, M. J.; KAS, S.; WERTZ, P. W.; HINCAL, A. A.; SQUIER, C. A. Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across bucal mucosa. *Biomaterials* 21: 2067-2071, 2000.

SENEL, S.; IKINCI, G.; KAS, S.; YOUSEFI-RAD, A.; SARGON, M. F. HINCAL, A. A. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Inter. J. Pharm.* 193: 197-203, 2000.

SIDGWICK, N. V. in R. Millar and S. Pringall (Eds.), *The Organic Chemistry of Nitrogen*, Oxford, p. 437, 1966.

SINGLA, A. K.; CHAWALA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 1047-1167, 2001.

SIEWET, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. B.; SHAH, V. P. FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 4 (1), 2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. Bookman. 5ª Edição: 2002.

SMART, J. D.; KELLAWAY, I. W.; WORTHINGTON, H. E. C. An in vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 295-299, 1984.

STEPHEN, R. D.; PHILIP, S.L. Anesthetic-ion channel interactions: The effect of lidocaine on the stability and transport properties of the membrane domain of band 3. *Arch. Biochem. Biophys.* 218 (2): 421-428, 1982.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery – A promising option for orally less efficient drugs. *Jour. Contr. Rel.* 114: 15-40, 2006.

SWEETMAN, S. C. *Martindale: The Compleat Drug Reference*. 32rd ed. London, UK: *The Pharmaceutical Press*. 1107-1109, 1293-1297, 1999.

TATAI, A.; AIGNER, Z.; ERÖS, I.; KATA, M. Preparation and investigation of mixtures containing lidocaine base and β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 59: 105-113, 2007.

THE MERCK INDEX. *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Thirteenth Edition, 2001.

THE INTERNATIONAL PHARMACOPEIA, forth edition, Originador: World Health Organization – WHO, 2008.

U.S. FDA /CDER. *Guidance for validation of chromatographic methods*, 1994.

U.S. FDA /CDER. *Nonsteril Semisolid Dosage Form. Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls. In vitro Release Testing and In vitro Bioequivalence Documentation*, 1997.

UNITED States Pharmacopeia. Official Monographs. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2007.

UNITED States Pharmacopeia. Official Monographs. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2008.

VALLE, E. M. M. D. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Bioche.* 39: 1033-1046, 2003.

VALENTA, C. The mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv. Dru. Del. Rev.* 57: 1692-1712, 2005.

VALENTA, C.; KAST, C.; HARICH, I.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. *J Control. Release.* 77: 323-332, 2001.

VALENTA, C.; MARSCHÜTZ, M.; EGYED, C.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Evaluation of the inhibitory effect of thiolated poly(acrylates) on vaginal membrane bound aminopeptidase N. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 603-610, 2002.

VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *Eur. Jour. Pharm. Biophar.* 58: 279-289, 2004.

WATERMAN, K. C.; ADAMI, R. C. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceutical. *Inter. J. Pharm.* 293:101-125, 2005.

WIBERG, K.; HAGMAN, A.; JACOBSSON, S, P. Rapid determination of lidocaine solutions with non-column chromatographic diode array UV spectroscopy and multivariate calibration. *J Pharm Biomed Anal.* 30 (5): 1575-1586, 2003.

WILLITS, R. K.; SALTZMAN, W. M. Synthetic polymers alter the structure of cervical mucus. *Biomaterials.* 22: 445-452, 2001.

YANAGIDATE, F.; STRICHARTZ, G. R. Local anesthetics. *Handbook Exp. Pharmacol.* 177: 95-127, 2007.

ZHANG, D.; LIANG, H.; ZENG, J.; RAO, G. A study on the simultaneous HPLC determination of chlorhexidine and its impurity 4-chloroaniline. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 26 (4): 447-451, 1995.

ZIVANOVIC, L.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; VASILJEVIC, M.; NEMCOVA, I. Comparison of high-performance and thin-layer chromatographic methods for the assay of lidocaine. *J Pharm Biomed Anal.* 14 (8-10): 1229-1232, 1996.

XU, Y.; WONG, G. Y. Simultaneous determination of lignocaine hydrochloride, chlorhexidine gluconate, and triamcinolone acetonide in suspension by reversed-phase HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 22 (13): 2071-2091, 1999.