



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas**

**Desenvolvimento e Validação de Metodologia  
Analítica para Determinação de Alantoína em  
Lipossomas e Formulações Tópicas**

**RAQUEL RENNÓ BRAGA**

**Rio de Janeiro**  
**Setembro, 2010**

---

RAQUEL RENNÓ BRAGA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DE ALANTOÍNA EM LIPOSSOMAS E FORMULAÇÕES TÓPICAS

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisela Maria Dellamora Ortiz

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila Garcia

Rio de Janeiro

2010

---

RAQUEL RENNÓ BRAGA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DE ALANTOÍNA EM LIPOSSOMAS E FORMULAÇÕES TÓPICAS

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

Aprovada em:

Orientadores:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisela Maria Dellamora Ortiz  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila Garcia  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

---

Prof. Dr. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

---

Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

---

*Ao meu esposo, Rafael,  
que me encoraja a desafiar o futuro  
e dá sentido a todas as minhas  
conquistas e realizações.*

---

## AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar gostaria de agradecer a **Prof<sup>a</sup> Sheila Garcia**, orientadora deste trabalho e amiga que acreditou em mim e me acolheu em seu laboratório, tornando possível a realização de um sonho.*

*Meu obrigado a **Prof<sup>a</sup> Gisela Maria Dellamora Ortiz**, orientadora deste trabalho e Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela dedicação e apoio fundamentais para realização desta dissertação.*

*Especial agradecimento ao meu esposo, **Rafael**, pelas palavras sinceras nos momentos certos, por me encorajar sempre a buscar a realização dos meus sonhos e pelo exemplo de obstinação, perseverança e espírito vencedor. Acima de tudo, meu amor, por existir e estar ao meu lado. Eu te amo!*

*Aos meus pais a quem devo em grande parte tudo que sou hoje. Ao meu pai, **Mozart**, pela forte influência intelectual, pelo exemplo de competência e seriedade. Por me ensinar que a disciplina é a ponte que liga nossos sonhos às nossas realizações e por nos estimular o gosto pela ciência. A minha mãe, **Maria Aparecida**, pelo amor incondicional e por me apoiar em todas as decisões importantes da minha vida. Por não medir esforços para nos proporcionar a melhor educação e pela dedicação imensa.*

*Ao meu irmão, **Marcelo** pelo apoio e incentivo. Pelo exemplo e pela inspiração científica. Ao meu irmão **Raul**, pelo amor e amizade, pelo apoio e torcida. Por me proporcionar momentos inesquecíveis em baixo d'água em meio a tartarugas e moréias.*

*A todos os professores da Faculdade de Farmácia e do Programa de Pós-Graduação que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. Especial agradecimento a banca de acompanhamento: ao **Prof. Luis Mauricio**, pelo auxílio e disposição em colaborar, pelas sugestões e pelos esclarecimentos que foram de grande valia. A **Prof<sup>a</sup>. Carla Holandino** pela amizade e por acompanhar este trabalho e auxiliar na finalização do mesmo. A **Prof<sup>a</sup>. Rita de Cassia Estrela** pela amizade e pela preciosa ajuda nos experimentos no espectrômetro de massas. Obrigada por abrir mãos de alguns sábados de descanso para me ajudar a realizar esse trabalho. Ao **Prof. Antonio Jorge** por ajudar a interpretar os resultados da espectrometria de massas.*

*A minha querida amiga **Camila Siqueira**, pela sua amizade e incentivo. Pelas sábias palavras e conselhos valiosos.*

---

*Aos amigos do Biotecfar: ao **Luiz Henrique** pelas grandes idéias e sugestões, pela preciosa ajuda durante os momentos mais difíceis. A **Vivian** pela sua amizade e por torcer por mim. Aos demais amigos do laboratório pela convivência prazerosa: Adriana, Léo, Joana, Maely e Camile.*

*A **Bianca Henriques** por me acolher prontamente e pela ajuda imensa no início desta minha jornada.*

*Ao LabCQ que disponibilizou os equipamentos para realização dos experimentos de validação deste trabalho. A **Tailane** pela amizade e ajuda nos ensaios de validação. A querida **Eliane** por estar sempre disposta a ajudar. A **Prof. Valéria** pelos esclarecimentos preciosos. A **Maria** pelo carinho imenso. A todas do LabCQ pela amizade, pela torcida e por me aguentar quase todos os dias pedindo para usar espectrofotômetro: **Gleiciane, João, Alice, Juliana, Gisele, Máira, Luiz Francisco e Joyce.***

*Aos amigos da Farmácia Universitária: A **Prof. Rita de Cassia Barros** pela amizade, pelas conversas tão prazerosas durante as caronas pra casa. A **Prof. Elisabete Pereira** pelas matérias-primas e equipamentos concedidos. Aos demais amigos e professores do LADEG.*

*A todos os amigos da Faculdade de Farmácia e da Pós-Graduação pelo carinho e torcida. Aos amigos e familiares que mesmo de longe torcem e acreditam em mim.*

*Aos meus **alunos** pelo carinho e por me proporcionarem a oportunidade de aprender tentando ensinar. As alunas de IC **Camilla e Juliana** pela ajuda preciosa, pela amizade e torcida.*

*A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo carinho e respeito.*

*A banca examinadora que gentilmente aceitou o convite de participar na defesa desta dissertação.*

*A Indústria Farmacêutica PHOSPHOLIPID GmbH, pela doação da matéria-prima Phospholipon 90 G<sup>®</sup>, utilizada na produção dos lipossomas deste trabalho.*

*Agradeço também a Instituição Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela excelência em estudo oferecida e a CAPES pelo apoio financeiro em forma de bolsa de estudo.*

---

*“Sucesso é o estado de espírito resultante da consciência que você tem de haver se empenhado para ser o melhor que é capaz de ser”*

*John R. Wooden*

---

## RESUMO

BRAGA, Raquel Rennó. **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de alantoína em formulações tópicas e lipossomas**. Rio de Janeiro. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

O método potenciométrico é utilizado para determinação da alantoína matéria-prima segundo a Farmacopéia Americana e Britânica, porém não pode ser aplicado na determinação da alantoína em formulações tópicas por sofrer interferência dos componentes da formulação. Propõe-se neste trabalho, o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de alantoína matéria-prima, em lipossomas e outras preparações farmacêuticas de uso tópico por espectrofotometria derivada. Os parâmetros estabelecidos para o método foram: 2ª derivada,  $\Delta\lambda$  de 8 nm, faixa de varredura 190 a 400 nm, fator de escala de 10 vezes, leitura em 266,6 nm e solução de NaOH 0,1 N em etanol a 70% (v/v). O método foi validado segundo a RE 899/2003 da ANVISA e o Guia Q2 (R1) do ICH e apresentou-se linear, preciso, exato e robusto. A especificidade do método foi determinada para preparações farmacêuticas de uso tópico como creme, gel e lipossoma. Os resultados da determinação de alantoína em formulações tópicas e na matéria-prima apresentou variabilidade intra-dia satisfatória com DPR < 5%. A solução de alantoína em NaOH 0,1 N, utilizada nas medidas espectrofotométricas, foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrometria no infravermelho (IV) e espectrometria de massas. Os lipossomas contendo alantoína foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico utilizando a relação de 42 mM de fosfolipídio para 12 mM de colesterol. Para avaliar a eficiência de inclusão da alantoína nos lipossomas, variou-se a temperatura de preparo dos lipossomas, tempo de hidratação e a concentração de alantoína. No método de agitação mecânica utilizou-se 42 mM de fosfolipídio, variando-se o pH das preparações e a concentração de alantoína. Os lipossomas preparados foram filtrados através de membranas de policarbonato (0,4 e 0,2  $\mu\text{m}$ ).



---

O material não incluído foi eliminado por filtração em coluna gel Sephadex® G-50. A quantidade de alantoína incorporada no lipossoma aumentou quando foi empregado aquecimento durante a hidratação do filme lipídico. O método de hidratação do filme lipídico foi superior ao de agitação mecânica, com relação à eficiência de inclusão da alantoína, quando se utilizou solução tampão de pH 6,8 nas preparações. Os resultados de inclusão obtidos foram de  $22,3 \pm 1,81$  e  $6,5 \pm 1,78$  respectivamente. A melhor eficiência de inclusão pelo método de agitação mecânica foi de  $8,06 \pm 2,77\%$ , obtida quando se utilizou solução tampão pH 9,0 na preparação e a alantoína foi adicionada na fase aquosa. O lipossoma preparado com solução tampão pH 9,0 apresentou tamanho médio (MD) de vesículas em torno de  $119,8 \pm 6,1$  e polidispersividade de 0,275.

Palavras-chave: alantoína, espectrofotometria derivada, validação, lipossomas.

---

## ABSTRACT

BRAGA, Raquel Rennó. **Development and validation of an analytical method for allantoin determination in topical formulations and liposomes.** Rio de Janeiro. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

A potentiometric titration method is used for determination of allantoin as raw material in American and British Pharmacopeias. However, this method cannot be applied for allantoin determination in cosmetic and pharmaceutical samples because of the interference of other components of these formulations. A new derivative spectrophotometric method was developed and validated for determination of allantoin as raw material and in topical formulation such as liposomes, cosmetic cream and gel. The parameters of the developed method were: second derivative,  $\Delta\lambda$  of 8 nm, scanning range between 190 and 400 nm, scale factor of 10 times, absorbance at 266.6 nm and 0.1 N NaOH ethanol:water solution (70:30). The developed method was validated according to ANVISA 899 resolution and ICH, and was found to be linear, precise, accurate and robust. The method was found to be selective for determination of allantoin in liposomes, gels and creams. The experimental values obtained in the determination of allantoin in samples and in raw material, indicated a satisfactory intra-day variability expressed by RDS > 5%. Thin layer chromatography (TLC), infra-red spectrometry (IR) and mass spectrometry were applied in order obtain the characterization of the developed method. Liposomes prepared by the thin film hydration method were composed of phosphatidylcholine/cholesterol in a 42:12 molar ratio. Different allantoin concentrations (from 5.3 to 2.65 mM), temperatures and hydration times were applied during liposome preparation. Liposomes were also prepared by the mechanical agitation method with 42 mM of phospholipids. Different allantoin concentrations (from 2.65 to 1.32 mM) and pH were applied for liposome preparation. Liposomes were filtered through 0.4 and 0.2  $\mu\text{m}$  polycarbonate membranes to even the size of the vesicles. After this procedure, liposomes

---

were filtered through a Sephadex<sup>®</sup> G-50 column to separate the untrapped drug. The percentage of allantoin entrapped in the liposome increased when heating was used to prepare liposomes by the thin film hydration method. The entrapment yield obtained with liposomes prepared by the hydration film method was superior to that obtained with the mechanical agitation method when a pH 6.8 buffer solution was used. The entrapment percentages were  $22,3 \pm 1,81$  e  $6,5 \pm 1,78\%$ , respectively. The major entrapment efficiency obtained with the mechanical agitation method was  $8.06 \pm 2.77\%$ , when allantoin was added to the aqueous fase and a pH 9.0 buffer solution was used. The average size of vesicles was  $119,8 \pm 6,1$  and polydispersivity of 0,275.

Key words: allantoin, derivative spectrophotometry, validation, liposomes.

---

## LISTA DE FIGURAS

Pg

Figura 1: Espectro eletromagnético	22
Figura 2: Estrutura da pele	25
Figura 3: Localização da substância ativa no lipossoma	30
Figura 4: Formação de vesículas multilamelares por hidratação de filme lipídico	32
Figura 5: Formação das vesículas multilamelares, unilamelares pequenas e unilamelares grandes	33
Figura 6: Estrutura da alantoína	34
Figura 7: Decomposição hidrolítica da alantoína	37
Figura 8: Esquema representando o método de adição do padrão utilizado para a determinação da exatidão do método espectrofotométrico desenvolvido	53
Figura 9: Esquema representando a determinação do teor de fósforo	58
Figura 10: Preparação dos lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico	60
Figura 11: Preparação de lipossoma pelo método de agitação mecânica	62
Figura 12: Normalização dos lipossomas	64
Figura 13: Estrutura química da alantoína	66
Figura 14: Espectro no infravermelho da alantoína (0,5% em KBr)	67
Figura 15: Espectro no infravermelho do padrão de alantoína (Padrão CTFA)	67
Figura 16: Cromatografia em camada fina da alantoína	70
Figura 17: Espectro de absorção da alantoína 10 µg/ml em solução aquosa e NaOH 0,01 N	72
Figura 18: Espectro de absorção da alantoína 500 µg/ml em solução aquosa e NaOH 0,01 N	72
Figura 19: Curva analítica da alantoína em solução aquosa	73
Figura 20: Curva-analítica da alantoína em NaOH 0,01 N	74
Figura 21: Lipossoma em solução de NaOH aquoso e NaOH alcoólico (70:30)	75

---

Figura 22: Espectro da alantoína e Phospholipon <sup>®</sup> 90G + colesterol	76
Figura 23: Espectros da alantoína e Phospholipon <sup>®</sup> 90G + colesterol na primeira derivada	77
Figura 24: Espectros da alantoína, Phospholipon <sup>®</sup> 90G + colesterol e Phosal <sup>®</sup> 75SA na primeira derivada	78
Figura 25: Espectros da alantoína, Phospholipon 90G <sup>®</sup> + colesterol e Phosal <sup>®</sup> 75SA na segunda derivada	80
Figura 26: Linearidade do método para determinação da alantoína nos lipossomas preparados por agitação mecânica	81
Figura 27: Especificidade do método	85
Figura 28: Linearidade do método para determinação da alantoína matéria-prima	86
Figura 29: Linearidade do método para determinação da alantoína no creme	87
Figura 30: Cromatografia em camada fina da alantoína em solução aquosa e NaOH	93
Figura 31: Espectro no infravermelho da matéria-prima e da solução de alantoína em NaOH liofilizada	94
Figura 32: Espectro no infravermelho do ácido alantóico, da ureia, do ácido glioxílico e do ácido oxálico	96
Figura 33: Espectro de massa obtido da alantoína matéria-prima e do padrão	99
Figura 34: Espectro de massa obtido pela infusão direta da solução tampão acetato	100
Figura 35: Espectro de massa obtido da alantoína em água e em NaOH 0,1 N	101
Figura 36: Espectro de massa obtido da uréia	103
Figura 37: Espectro de massa obtido do ácido oxálico	103
Figura 38: Representação da quebra oxidativa da alantoína em solução de NaOH gerando ácido parabânico	105
Figura 39: Espectro obtido dos íons filhos da alantoína da literatura	106
Figura 40: Espectro obtido dos íons filhos da alantoína	107
Figura 41: Cromatografia em camada fina da alantoína hidrolisada	108
Figura 42: Espectro de massas das amostras de alantoína hidrolisada após 2 horas	109

---

Figura 43: Espectro de massas das amostras de alantoína hidrolisada após 4 horas	109
Figura 44: Acompanhamento da absorvância da solução de alantoína em NaOH 0,1 N por 1 hora	111
Figura 45: Curva analítica de fósforo	115
Figura 46: Distribuição de tamanho do lipossoma preparado por agitação mecânica	121

---

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>Pg</b>
Tabela 1: Composição dos lipossomas obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico	61
Tabela 2: Composição dos lipossomas obtidos pelo método de agitação mecânica	62
Tabela 3: Lipossomas obtidos pelo método de agitação mecânica variando-se o pH das preparações	63
Tabela 4: Determinação do teor de alantoína matéria-prima	68
Tabela 5: Determinação do teor de alantoína no padrão lote 12808150	68
Tabela 6: Valores de ponto de fusão da alantoína	69
Tabela 7: Rotação angular da alantoína	69
Tabela 8: Determinação dos teores de alantoína na matéria-prima com leituras de absorvância em 210 e 246 nm	74
Tabela 9: Variação dos $\Delta\lambda$ da 2 <sup>o</sup> derivada das curvas para verificar linearidade das absorvâncias nos $\lambda$ 269,2 e 266,6 nm	79
Tabela 10: Comparação dos métodos farmacopéico e espectrofotometria derivada no UV na determinação do teor de alantoína no padrão Sigma <sup>®</sup>	81
Tabela 11: Teores de alantoína obtidos pelo método desenvolvido na matéria-prima e em preparações farmacêuticas contendo alantoína	83
Tabela 12: Resultados de repetibilidade e precisão intermediária do método	88
Tabela 13: Resultados de precisão e precisão intermediária do método aplicado em creme de alantoína 1%	89
Tabela 14: Resultados de exatidão do método	90
Tabela 15: Resultados de exatidão do método aplicado em creme de alantoína 1%	90
Tabela 16: Resultados da comparação dos teores de alantoína obtidos pelo método após variações no pH, concentração e fornecedor da solução de NaOH	91
Tabela 17: Massa dos produtos de degradação da alantoína	102
Tabela 18: Teor da matéria-prima utilizada para preparação do lipossoma	113
Tabela 19: Resultados dos teores de alantoína e fosfolípidios nos lipossomas determinados por espectrofotometria, leitura a 246 nm	116

---

Tabela 20: Resultados de teores de alantoína nos lipossomas preparados por hidratação do filme lipídico	117
Tabela 21: Resultados dos teores de alantoína e fosfolipídios nos lipossomas preparados por agitação mecânica	118
Tabela 22: Resultados dos teores de alantoína nos lipossomas preparados por agitação mecânica utilizando-se soluções tampões com diferentes valores de pH	119



---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Reflectância total atenuada
BP	British Pharmacopoeia
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPR	Desvio padrão relativo
ICH	International Conference on Harmonization
mM	Mili Molar
M	Molar
N	Número de réplicas
PC	Fosfatidilcolina
pH	Potencial de hidrogênio iônico
R	Coefficiente de correlação
$r^2$	Coefficiente de determinação
SUVs	Vesículas unilamelares pequenas
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
USP	United States Pharmacopeia
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
VMLs	Vesículas multilamelares
VUGs	Vesículas unilamelares grandes
VUIs	Vesículas unilamelares de tamanho intermediário

---

$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda \text{ máx}$	Comprimento de onda em que ocorre a maior absorbância
$\Delta \lambda$	Delta lambda

---

## SUMÁRIO

	Pg
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1 Espectrofotometria	21
1.1.1 Espectrofotometria derivada	23
1.1.2 Validação de metodologia analítica	24
1.2 A Pele	
1.3 Tratamento de doenças inflamatórias crônicas de pele	27
1.4 Lipossomas	28
1.4.1 Aplicações dos lipossomas	28
1.4.2 Composição e classificação dos lipossomas	29
1.4.3 Preparação dos lipossomas	31
1.5 Alantoína	34
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>39</b>
2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico	39
2.2 Lipossomas e alantoína	39
<b>3 OBJETIVO GERAL</b>	<b>41</b>
3.1 Objetivos específicos	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
<b>4.1 MATERIAL</b>	<b>42</b>
4.1.1 Matérias-primas	42
4.1.2 Equipamentos	42
4.1.3 Outros materiais	43
4.1.4 Reagentes	43
<b>4.2 MÉTODOS</b>	<b>44</b>
<b>4.2.1 Preparo das soluções utilizadas nas análises</b>	<b>44</b>
4.2.1.1 Preparo da solução tampão TRIS pH 6,8	44
4.2.1.2 Preparo da solução reagente de molibdato de amônio	44
4.2.1.3 Preparo da solução de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 N	45
4.2.1.4 Preparo da solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	45
4.2.1.5 Preparo da solução de ácido ascórbico 10%	45
4.2.1.6 Preparo da solução de fosfotungstato de potássio 2%	45
<b>4.2.2 Caracterização físico-química da alantoína</b>	<b>45</b>
4.2.2.1 Análise do espectro de absorção na região do infravermelho	46
4.2.2.2 Determinação do teor da matéria-prima e do padrão	46
4.2.2.3 Determinação do ponto de fusão da alantoína	46
4.2.2.4 Determinação da rotação angular da alantoína	46
4.2.2.5 Determinação de impurezas por CCD	46
<b>4.2.3 Desenvolvimento de método por espectrofotometria no UV para determinação da alantoína em preparações farmacêuticas</b>	<b>48</b>
4.2.3.1 Análise do espectro na região do ultravioleta	48
4.2.3.2 Parâmetros estabelecidos para o método desenvolvido	48

<b>4.2.4 Comparação do método farmacopéico e espectrofotometria derivada</b>	<b>49</b>
<b>4.2.5 Aplicação do método desenvolvido para determinação de alantoína em matéria-prima e preparações cosméticas</b>	<b>49</b>
<b>4.2.6 Validação da metodologia de análise de alantoína por espectrofotometria derivada</b>	<b>49</b>
4.2.6.1 Especificidade	50
4.2.6.2 Linearidade	50
4.2.6.2.1 Matéria-prima	51
4.2.6.2.2 Creme não iônico de alantoína 1%	51
4.2.6.3 Precisão	51
4.2.6.3.1 Matéria-prima	51
4.2.6.3.2 Creme não iônico de alantoína 1%	52
4.2.6.4 Exatidão	52
4.2.6.4.1 Matéria-prima	52
4.2.6.4.2 Creme não iônico de alantoína 1%	52
4.2.6.5 Robustez	53
<b>4.2.7 Caracterização do método</b>	<b>54</b>
4.2.7.1 Análise por CCD	54
4.2.7.2 Análise por espectrometria no IV	55
4.2.7.3 Análise por espectrometria de massas	55
4.2.7.4 Hidrólise alcalina da alantoína	56
4.2.5.5 Espectro de absorbância <i>versus</i> tempo	56
<b>4.2.8 Determinação do teor de fosfolipídio no Phospholipon® 90G</b>	<b>56</b>
<b>4.2.9 Preparação dos lipossomas</b>	<b>58</b>
4.2.9.1 Preparação dos lipossomas contendo alantoína pelo método de hidratação do filme lipídico	59
4.2.9.2 Preparação dos lipossomas contendo alantoína pelo método de agitação mecânica	61
<b>4.2.10 Normalização dos lipossomas</b>	<b>63</b>
<b>4.2.11 Análise das frações lipossomais</b>	<b>64</b>
4.2.11.1 Determinação do teor de alantoína e fosfolipídios nas frações	64
4.2.11.2 Espalhamento dinâmico da luz laser	65
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>5.1 Caracterização físico-química da alantoína</b>	<b>66</b>
5.1.1 Análise do espectro de absorção na região do infravermelho	66
5.1.2 Determinação do teor da matéria-prima e do padrão	68
5.1.3 Determinação do ponto de fusão (PF) da alantoína	68
5.1.4 Determinação da rotação ótica da alantoína	69
5.1.5 Determinação de impurezas na alantoína por CCD	69
<b>5.2 Desenvolvimento de método por espectrofotometria para determinação de alantoína em preparações farmacêuticas</b>	<b>71</b>
5.2.1 Análise do espectro de absorção na região do ultravioleta	71
5.2.2 Parâmetros estabelecidos para o método desenvolvido	75
5.2.2.1 Solvente	75
5.2.2.2 Especificidade	76
5.2.2.3 Concentração de NaOH do solvente	80
<b>5.3 Comparação do método farmacopéico e espectrofotometria derivada</b>	<b>81</b>
<b>5.4 Aplicação do método desenvolvido para determinação de alantoína em matéria-prima e preparações farmacêuticas</b>	<b>82</b>

---

<b>5.5 Validação da metodologia de análise de alantoína por espectrofotometria derivada</b>	<b>83</b>
5.5.1 Especificidade	84
5.5.2 Linearidade	86
5.5.2.1 Matéria-prima	86
5.5.2.2 Creme não iônico de alantoína 1%	86
5.5.3 Precisão	87
5.5.3.1 Matéria-prima	87
5.5.3.2 Creme não iônico de alantoína 1%	88
5.5.4 Exatidão	89
5.5.4.1 Matéria-prima	89
5.5.4.2 Creme não iônico de alantoína 1%	90
5.5.5 Robustez	91
<b>5.6 Caracterização do método</b>	<b>92</b>
5.6.1 Análise por CCD	92
5.6.2 Análise por espectrometria no IV	94
5.6.3 Análise por espectrometria de massas	97
5.6.4 Hidrólise alcalina da alantoína	107
5.6.4.1 CCD	108
5.6.4.2 Espectrometria de massas	109
5.6.5 Absorbância <i>versus</i> tempo	110
<b>5.7 Importância do método desenvolvido</b>	<b>111</b>
<b>5.8 Determinação do teor de fosfolípido no Phospholipon® 90G</b>	<b>112</b>
<b>5.9 Preparação dos lipossomas</b>	<b>113</b>
5.9.1 Análise dos lipossomas contendo alantoína preparados pelo método de hidratação do filme lipídico	113
5.9.2 Análise dos lipossomas contendo alantoína preparados pelo método de agitação mecânica	118
<b>5.10 Avaliação da distribuição do tamanho das vesículas lipossomais e polidispersividade</b>	<b>120</b>
<b>5.11 Lipossomas e alantoína</b>	<b>121</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>125</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	<b>126</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ESPECTROFOTOMETRIA

A espectrometria de absorção molecular nas regiões espectrais do ultravioleta/visível (UV/Vis.) é utilizada para a determinação quantitativa de substâncias orgânicas. Esta se baseia na medida de transmitância ou absorbância de soluções contidas em células transparentes e a concentração do analito está relacionada linearmente com a absorbância, de acordo com a lei de Beer (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009).

O espectro eletromagnético é o intervalo que contém todas as radiações eletromagnéticas com frequências e comprimentos de onda que variam desde o infravermelho, passando pela radiação visível até a região ultravioleta (Figura 1). A radiação infravermelha compreende comprimentos de ondas superiores a 770nm. O comprimento de onda da radiação ultravioleta e visível está compreendido entre 200 a 900nm (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009).

As formas de interação da radiação eletromagnética com a matéria são: absorção da radiação eletromagnética, emissão, reflexão ou refração, dispersão e polarização (HARRIS, 2006).

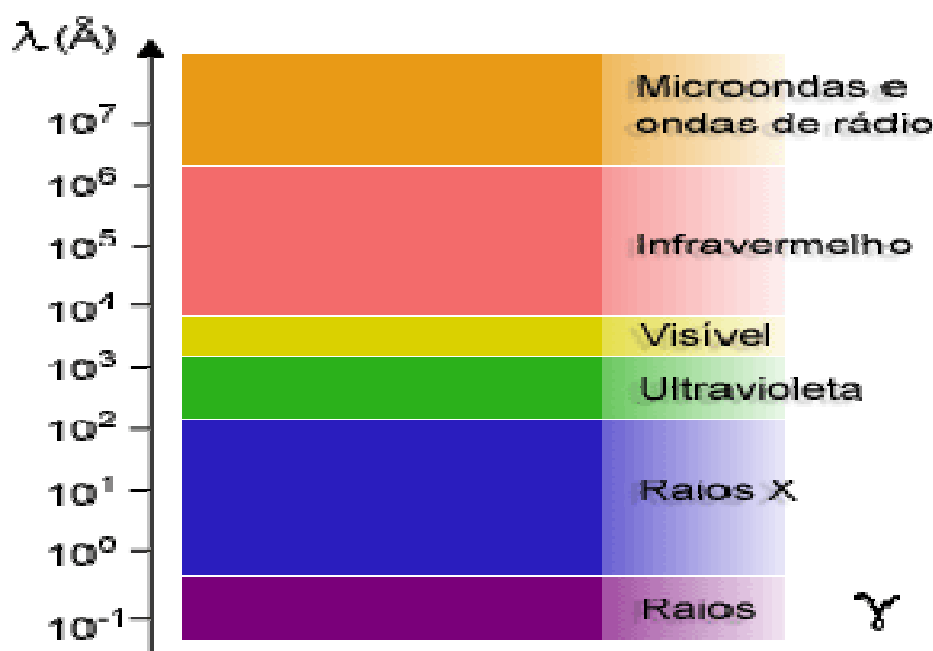


Figura 1: Espectro eletromagnético

<http://efisica.if.usp.br/optica/universitario/historico/eletromagnetismo/>

A maioria das moléculas orgânicas e grupos funcionais são transparentes na região ultravioleta do espectro eletromagnético. A absorção da energia radiante nas regiões ultravioleta depende, primeiramente, do número e arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes (EWING, 1998).

A absorção da radiação UV causa transferência de elétrons para orbitais de maior energia na molécula. (HARRIS, 2006). A absorção de uma dada substância é afetada pela presença de um grupo funcional que tem absorção característica na região do UV/Vis. (cromóforo) e grupos que deslocam o máximo da absorção para comprimentos de onda maiores ou menores (auxocromos) (VOGEL, 2002).

### 1.1.1 Espectrofotometria derivada

Os métodos espectrofotométricos são comumente utilizados pela simplicidade do procedimento, rapidez, economia das análises e maior disponibilidade da instrumentação quando comparados a métodos como cromatografia e eletroforese (ROJAS & OJEDA, 2009).

O tratamento dos dados espectrofotométricos tem como objetivo extrair o máximo de informações do espectro. A melhor técnica para esse fim é a derivação da curva espectrofotométrica de absorbâncias versus comprimento de onda. Esses gráficos revelam detalhes espectrais que não são observados em um espectro normal (ROJAS & OJEDA, 2009; KARPINSKA, 2004).

A espectrofotometria derivada tem sido amplamente aplicada na análise de produtos farmacêuticos (MARKOVIK *et al.*, 2010; DINÇ, 2007; KAPOOR, KHANDEVILLI & PANCHAGNULA, 2006; GARCIA *et al.*, 2005; LASTRA *et al.*, 2003).

Um problema analítico clássico é a determinação simultânea de dois ou mais componentes na mesma amostra, sem separação prévia. A espectrofotometria derivada na região UV-Vis. é uma técnica eficiente para determinação simultânea, pois melhora a resolução dos espectros com sinais sobrepostos e elimina a interferência de outros componentes presentes na amostra (MARKOVIK *et al.*, 2010; BENAMOR & AGUERSSIF, 2008; RANGNO *et al.*, 2006).

Outros trabalhos mais recentes utilizam a espectrofotometria derivada para determinação de fármacos, eliminando a interferência de outros fármacos presentes, produtos de degradação e excipientes das formulações (DINÇ *et al.*, 2007; RANGNO *et al.*, 2006; KAPOOR, KHANDEVILLI & PANCHAGNULA, 2006)



### **1.1.2 Validação de metodologia analítica**

A validação de uma metodologia analítica tem como objetivo demonstrar que o método é adequado para a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. (ANVISA, 2003).

O ICH (International Conference on Harmonization) estabelece normas para validação de metodologias analíticas internacionalmente (ICH, 2005). No Brasil, a legislação em vigor é a Resolução nº899 de 29 de maio de 2003, a qual estabelece parâmetros para a validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA, 2003).

Segundo a RE 899, os métodos analíticos são classificados em quatro categorias, de acordo com a finalidade, e para cada categoria é exigido um conjunto de testes necessários para validação do método analítico.

A validação deve garantir a confiabilidade dos resultados obtidos pelo método analítico. Para tanto, o método validado deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez. (ANVISA, 2003).

## **1.2 A PELE**

A pele (Figura 2) é constituída pela epiderme e derme subjacente (VERMA *et al.*, 2003). A camada superior da pele é a epiderme, formada por queratinócitos, melanócitos (pigmento), células de Langerhans (apresentação de antígenos) e células de Merkel (sensoriais) (HARDMAN *et al.*, 2003).

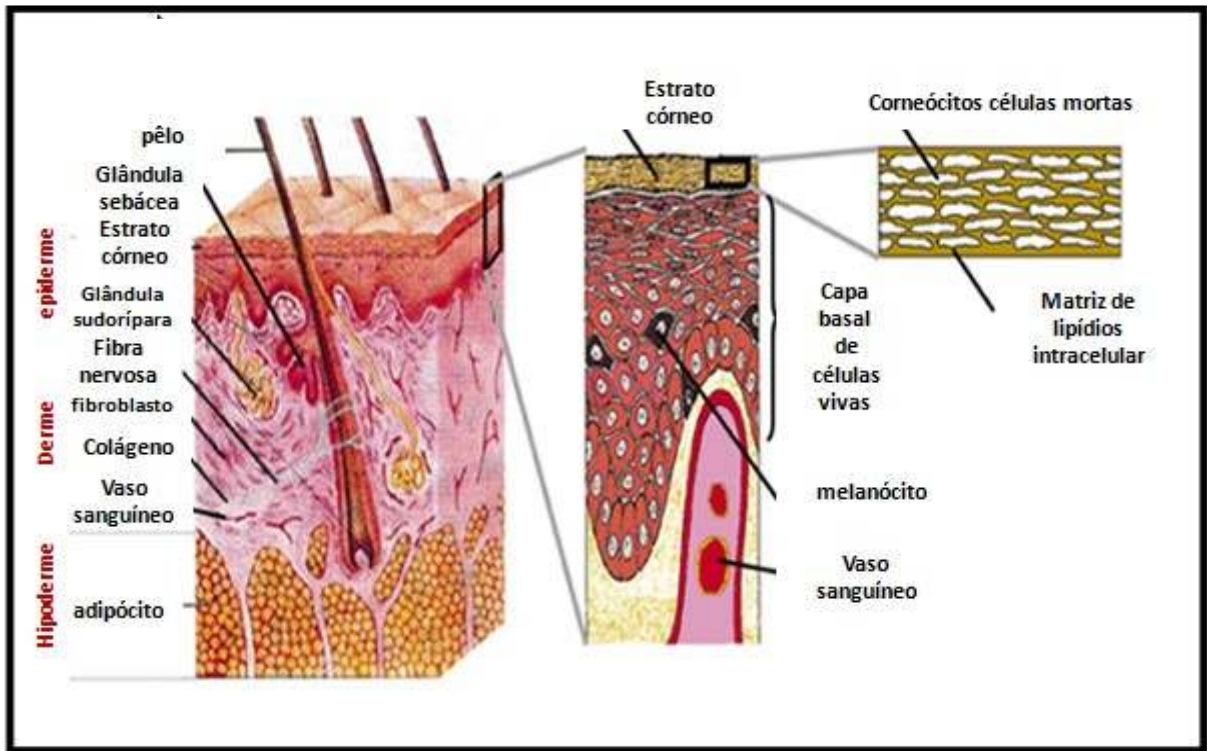


Figura 2: Estrutura da pele (adaptado de [http://laguna.fmedic.unam.mx/~adh/sobretiros/Vitaminas\\_cosmeticos/vitaminas1.jpe](http://laguna.fmedic.unam.mx/~adh/sobretiros/Vitaminas_cosmeticos/vitaminas1.jpe), em 01/09/2008).

A epiderme é um epitélio versátil cujas células se multiplicam, diferenciam-se para cumprir determinadas funções protetoras, como formação de queratina e síntese de melanina, e renovam-se periodicamente (VIGLIOGIA & RUBIN, 1989). As camadas que formam a epiderme são conhecidas como córnea, granulosa, espinhosa e basal (RIBEIRO, 2006). Logo abaixo, existe uma camada formada por tecido adiposo considerada como uma camada subcutânea, a hipoderme, que conserva a temperatura corporal, amortece traumas e funciona como depósito de calorias (RIBEIRO, 2006).

O estrato córneo ou camada córnea protege a pele da perda de água e evita a absorção de agentes nocivos. A região lipídica do estrato córneo forma uma estrutura contínua, responsável pela função de barreira da pele, composta por ceramidas, ácidos graxos e colesterol (NORLEN *et al.*, 2007; BOUWSTRA *et al.*, 2003; FORSLIND *et al.*, 1997).

A derme é um tecido fibroso (fibras colágenas, elásticas e reticulina), 20 a 30 vezes mais grossa que a epiderme. Contém anexos cutâneos que são de dois tipos: córneos (pêlos e unhas) e glandulares (glândulas sebáceas e sudoríparas) (VIGLIOGIA & RUBIN, 1989).

Na pele normal, as células epidérmicas se multiplicam e diferenciam-se para cumprir determinadas funções protetoras, como formação de queratina e síntese de melanina, e renovam-se periodicamente. Os queratinócitos, que são a parte proliferativa da epiderme, amadurecem e diferenciam-se formando o estrato córneo. O estrato córneo ou camada córnea protege a pele da perda de água e evita a absorção de agentes nocivos. A barreira de lipídios do estrato córneo é composta por ceramidas, ácidos graxos e colesterol (BOWSTRA & PONEC, 2006; HARDMAN *et al.*, 2003).

A dermatite atópica e a psoríase são doenças crônicas inflamatórias que acometem a pele. A dermatite atópica é caracterizada pela pele seca, presença de prurido e placas eritematosas (GUPTA *et al.*, 2008; AKDIS *et al.*, 2006). Pacientes portadores de dermatite atópica apresentam perda de água transepidérmica e mudanças no seu conteúdo lipídico, o que compromete a função de barreira da epiderme. Este quadro permite a entrada de alérgenos e propicia o surgimento de reações inflamatórias (CORK *et al.*, 2006; PROKSH, JENSEN & ELIAS, 2003; AALTO-KORTE, 1995).

A psoríase pode ser classificada, de acordo com o grau de comprometimento da qualidade de vida do paciente, como leve, moderada e severa. As lesões apresentam-se como placas descamativas eritematosas que podem ser dolorosas, acometendo várias regiões do corpo, como face, unhas, planta dos pés e das mãos, couro cabeludo, cotovelos e joelhos. A forma mais severa da doença atinge mais de 10% da superfície do corpo e causa grande impacto na qualidade de vida do paciente (KRUEGER *et al.*, 2000).

O desenvolvimento da psoríase está relacionado a um componente genético (BOWCOCK & BARKER, 2003). A doença é caracterizada pela diferenciação anormal das

células epidérmicas e sua patogênese está ligada à infiltração dérmica de linfócitos T, o que provavelmente contribui para a hiperproliferação dos queratinócitos observada nas lesões psoriáticas (KRUEGER & ELLIS, 2005).

### 1.3 TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS DE PELE

A terapia da dermatite atópica requer uso de emolientes, anti-inflamatórios e controle das infecções. A alantoína é utilizada pela sua atividade anti-inflamatória (SUGARMAN, 2008). Outros fármacos usados no tratamento são: corticosteróides, ciclosporinas e tacrolimus, que reduzem a inflamação e melhoram a função de barreira da epiderme. A aplicação de cremes e emolientes contendo lipídios, ácidos graxos, colesterol e triglicerídeos estimula o reparo da barreira lipídica e aumenta a hidratação do estrato córneo (PROKSCH, FOLSTER-HOLST & JENSEN, 2006).

O tratamento da psoríase é realizado por período prolongado, alternando-se a terapia tópica e sistêmica, a fim de minimizar os efeitos colaterais frequentemente provocados pelos tratamentos disponíveis. A escolha do tratamento deve ser realizada de acordo com a necessidade individual de cada paciente, levando em consideração a severidade da doença (LEBWOHL, 2005).

O tratamento tópico é indicado nos casos leves da doença, em que as lesões estão limitadas a certas regiões do corpo (KRUEGER & ELLIS, 2005). Entre os fármacos disponíveis para o tratamento tópico da psoríase estão os corticosteróides, a antralina, a vitamina D e análogos, os retinóides, o ácido salicílico e o 5-fluoracil (CARRASCOSA *et al.*, 2009). A alantoína é empregada associada a agentes antipsoriáticos em formulações tópicas (ASHCROFT *et al.*, 2000).

Os fármacos citados apresentam efeitos adversos e desvantagens particulares que devem ser consideradas na escolha do tratamento mais apropriado para o paciente portador de

psoríase (CARRASCOSA *et al.*, 2009; LEBWOHL & ALI, 2001). O calcipotriol causa irritação na pele e a antralina pode provocar sensação de queimação, irritação nos olhos e membranas das mucosas, sendo necessária a associação de substâncias ativas que possuam propriedades calmantes e anti-inflamatórias, como a alantoína (ASHCROFT *et al.*, 2000; PARTIF, 1999).

O uso de emolientes é fundamental para manter a pele do paciente portador de psoríase hidratada e minimizar o prurido (LEVINE & GOTTLIEB, 2009; BERTH-JONES, 2009).

#### **1.4 LIPOSSOMAS**

São vesículas microscópicas de tamanhos variados (em escalas de nm e  $\mu\text{m}$ ) com uma ou mais bicamadas fosfolipídicas organizadas de forma concêntrica, separadas por compartimentos aquosos (NEW, 1990).

A formação de micelas ocorre devido à presença de fosfolipídios que tendem a arranjar-se em estruturas nas quais as cadeias hidrocarbonadas não-polares são escondidas e as cabeças polares formam o compartimento aquoso (LEHNINGER, 2006).

As vesículas lipossomais têm sido estudadas intensamente, pois suas propriedades são muito semelhantes àsquelas das membranas naturais (MAGHRABY *et al.*, 2008; LIU & HU, 2007).

##### **1.4.1 Aplicações dos lipossomas**

Lipossomas têm sido propostos em vários estudos como carreadores de fármacos capazes de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade da substância ativa encapsulada (CHANG *et al.*, 2008; MURA *et al.*, 2007). Formulações lipossomadas são empregadas para

aumentar a eficiência da liberação e prolongar a ação de substâncias ativas administradas topicamente (CEVC & VIERL, 2010).

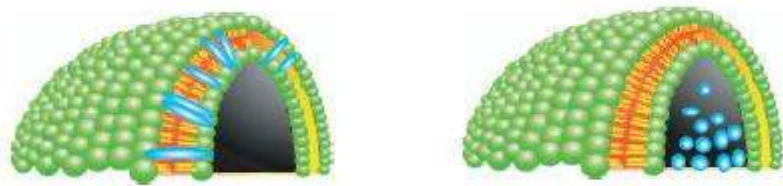
As maiores vantagens de se administrar uma substância ativa lipossomada topicamente se devem à propriedade deste tipo de formulação em reduzir os efeitos colaterais e as incompatibilidades que podem surgir com a absorção sistêmica do fármaco. Além disso, a formulação lipossomada é capaz de aumentar significativamente o acúmulo da substância ativa no sítio de administração, como resultado de sua semelhança com as membranas biológicas, e pode incorporar uma grande variedade de fármacos hidrofílicos e lipofílicos (CHANG *et al.*, 2008; TORCHILIN, 2005; EGBARIA & WEINER, 1990).

Avanços recentes relacionados a modificações na estrutura e na composição dos lipossomas aumentaram seu potencial terapêutico como sistemas de liberação dérmica e transdérmica com eficiência comparada à administração subcutânea das substâncias ativas (MAGHRABY *et al.*, 2008).

A similaridade da estrutura da bicamada das vesículas lipídicas com as membranas naturais confere aos lipossomas propriedades de regeneração da pele. Mesmo sem ingrediente ativo os lipossomas umidificam a pele melhorando a elasticidade e a função de barreira do tecido (BETZ *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 Composição e classificação dos lipossomas

Várias moléculas anfipáticas têm sido estudadas para formar lipossomas (Figura 3) podendo ser encapsuladas tanto no espaço aquoso, substâncias hidrofílicas, quanto intercaladas na bicamada lipídica, substâncias lipofílicas. A localização exata da substância ativa no lipossoma depende das características físico-químicas e da composição dos lipídios (MAGHRABY *et al.*, 2005; TORCHILIN, 2005; NEW, 1990).



Ingrediente lipofílico

Ingrediente hidrofílico

Figura 3: Localização da substância ativa no lipossoma. Ingrediente lipofílico representado em azul, intercalado na bicamada lipídica. Ingrediente hidrofílico representado em azul, no compartimento aquoso do lipossoma.

Adaptado de [http://www.cosmetic-liposome.com/images/liposome\\_new.jpg](http://www.cosmetic-liposome.com/images/liposome_new.jpg) em 13/09/2008.

Os fosfolipídios são os principais componentes estruturais das membranas biológicas e são de dois tipos. O fosfolipídio mais comum é a fosfatidilcolina, um fosfoglicerídeo que contém duas moléculas de ácido graxo esterificadas ao primeiro e ao segundo grupos hidroxila do glicerol. O terceiro grupo hidroxila do glicerol forma uma ligação éster com o ácido fosfórico. Possui um segundo álcool (colina), que também é esterificado a ácido fosfórico e está localizado na cabeça polar da molécula do fosfoglicerídeo (VEMURI, 1995; NEW, 1990).

As fosfatidilcolinas, também conhecidas como lecitinas (presentes no ovo e na soja), podem derivar de fontes naturais ou sintéticas e são usadas, com frequência, como principal constituinte dos lipossomas, por seu baixo custo, por serem quimicamente inertes e não possuírem carga (BETZ *et al*, 2001; NEW, 1990).

Em diferentes temperaturas, membranas constituídas de fosfatidilcolina assumem diferentes estados e transitam do estado gel ao estado de cristal-líquido de acordo com a temperatura. A temperatura de transição é influenciada pelo tipo de fosfolipídio presente e este comportamento da membrana determina propriedades importantes do lipossoma, que afetam diretamente a sua estabilidade e o seu comportamento em sistemas biológicos. Lipossomas na forma líquido-cristalina possuem maior flexibilidade da bicamada e liberdade

de movimento das moléculas de fosfolipídios (BERGH, VRIES & BOUWSTRA, 1998; NEW, 1990).

Esteróis são importantes constituintes da maioria das membranas naturais e sua incorporação nos lipossomas pode mudar propriedades da membrana. A adição do colesterol na membrana de fosfatidilcolina influencia na temperatura de transição e o aumento de sua concentração pode induzir alteração na fluidez da membrana (VEMURI, 1995; SULKOWSKI *et al.*, 2005; CODERCH *et al.*, 2000).

Os lipossomas são classificados quanto ao número de bicamadas em:

- Vesículas multilamelares (VMLs) – as vesículas variam de tamanho entre 100-1000 nm e cada vesícula consiste de cinco ou mais lamelas concêntricas.
- Vesículas pequenas unilamelares (VUPs) – menor limite de tamanho possível para vesículas fosfolipídicas e formam uma população de vesículas relativamente homogêneas em termos de tamanho (15 – 25 nm).
- Vesículas grandes unilamelares (VUGs) – possuem diâmetros na ordem de 1000 nm.
- Vesículas de tamanho intermediário unilamelares (VUIs) – possuem diâmetros na ordem de 100 nm (VEMURI, 1995; NEW, 1990).

#### 1.4.3 Preparação dos lipossomas

As membranas fosfolipídicas formam-se espontaneamente como resultado da interação entre os fosfolipídios e a água (VEMURI, 1995; NEW, 1990). Para aplicação como sistema de liberação de fármacos, as formulações lipossomais devem ter alta eficiência de inclusão, estabilidade em longo prazo e propriedades ideais de liberação da substância ativa (MOZAFARI, 2005).

Os lipossomas podem ser preparados por diferentes métodos. A sonicação, com posterior congelamento, é um método simples e rápido, resultando numa alta proporção de



vesículas unilamelares grandes, as quais podem ser utilizadas em estudos de fenômeno de transporte de membranas (NEW, 1990).

No método de hidratação do filme lipídico os lipídios formadores da membrana são solubilizados em solvente orgânico. Os compostos lipossolúveis a serem incorporados são adicionados ao solvente orgânico, enquanto os compostos a serem incorporados no compartimento aquoso do lipossoma são dissolvidos na solução aquosa inicial. O solvente orgânico é evaporado em um suporte sólido e, então, o filme lipídico formado é disperso com adição de um meio aquoso, seguido de agitação. Através da hidratação, os lipídios incham e desprendem do suporte em camadas, geralmente para formar vesículas multilamelares (Figura 4) (NEW, 1990; LASIC, 1988).

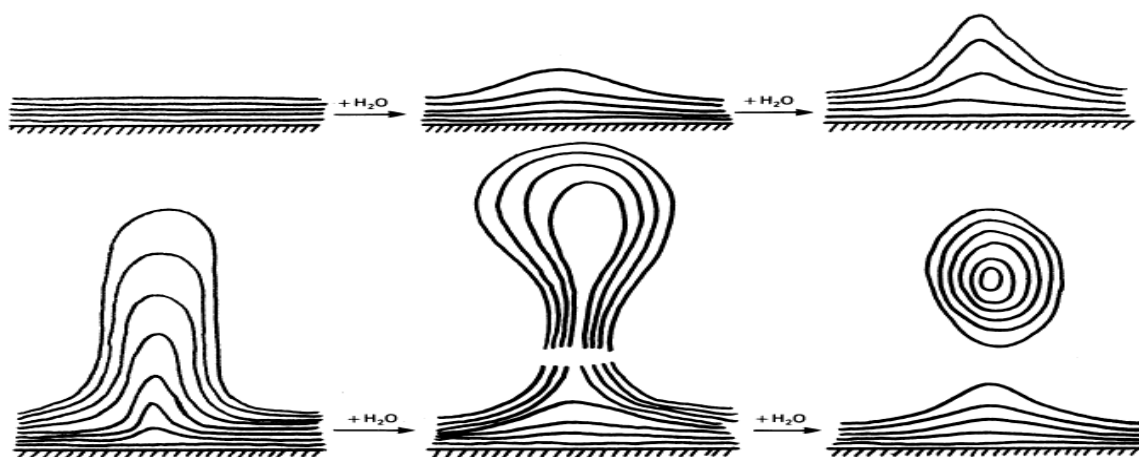


Figura 4: Formação de vesículas multilamelares por hidratação de filme lipídico – adaptado de LASIC, 1988.

A utilização de solventes orgânicos na preparação de lipossomas afeta a estrutura química das substâncias encapsuladas, além de serem necessários alguns passos adicionais para remover o solvente da formulação final: filtração em gel, vácuo ou diálise (MOZAFARI, 2005; VEMURI, 1995).

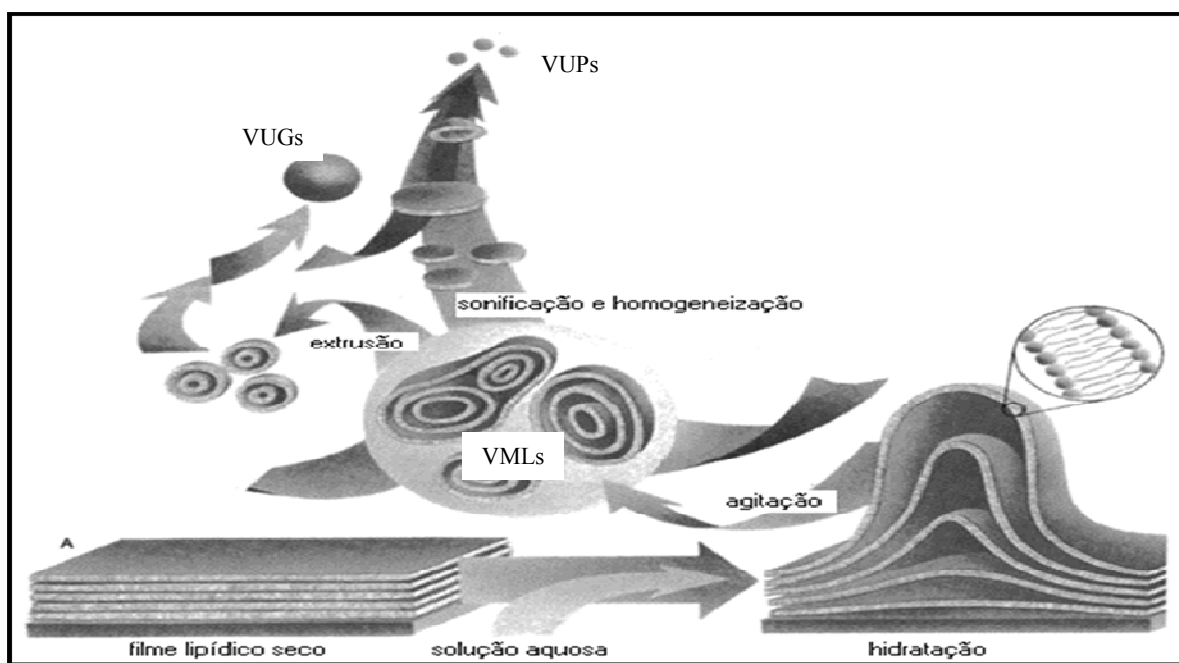
Para substituir o solvente orgânico, prejudicial ao meio ambiente e ao ser humano, utilizam-se fluidos não condensáveis que são altamente densos em temperaturas próximas a valores críticos. É um método semelhante à evaporação em fase reversa convencional,

existindo uma variação melhorada que tem ainda maior eficiência de englobamento usando menos passos no processo (OTAKE *et al.*, 2006).

Ativos podem ser incorporados nas vesículas lipídicas por métodos convencionais como: evaporação em fase reversa, injeção de éter/vaporização, congelamento e descongelamento, os quais geram vesículas grandes unilamelares ou multilamelares (SULKOWSKI *et al.*, 2005; MOZAFARI, 2005).

Para obter uma população de vesículas de tamanho homogêneo aplica-se o método de extrusão através de membrana de policarbonato. O tamanho das vesículas é definido de acordo com o tamanho do poro da membrana utilizada ((BERGER, 2001; NEW, 1990).

A obtenção de vesículas multilamelares (VMLs) por hidratação do filme lipídico, unilamelares pequenas (VUPs) por sonicação e unilamelares grandes (VUGs) por extrusão, está representada na figura 5.



(SANTOS & CASTANHO, 2002. Adaptado)

Figura 5: Formação das vesículas multilamelares, unilamelares pequenas e unilamelares grandes (Adaptado de SANTOS & CASTANHO, 2002).

## 1.5 ALANTOÍNA

A alantoína é o produto final do catabolismo das purinas em mamíferos onde o ácido úrico é degradado à alantoína, pela ação da enzima urato oxidase. Nos primatas, incluindo os humanos, que não possuem a enzima urato oxidase, a degradação das purinas resulta na formação do ácido úrico (MURATSUBAKI, SATAKE & ENOMOTO, 2006; FU, FERNG & HUANG, 2006; LEHNINGER, 2006). A alantoína é encontrada em vegetais como *Symphytum officinale L.* conhecido popularmente como confrey (GAO *et al.*, 2008; TEIXEIRA & DUARTE, 1985), *Zea mays* (HAGHI, ARSHI & SAFAEI, 2008) e em espécies da família *Dioscorea* (FU, FERNG & HUANG, 2006). Pode ser sintetizada a partir da oxidação alcalina do ácido úrico (DRAELOS, 2001).

A alantoína ou 5-ureído-hidantoína (Figura 6) possui propriedade calmante e cicatrizante, atividade anti-inflamatória, adstringente, queratolítica e estimula a regeneração do tecido. É frequentemente usada topicamente no tratamento da acne, seborréia, úlceras resistentes, hemorróidas, psoríase e dermatite atópica sendo largamente empregada na clínica em vários países, como na Polônia (Alantan<sup>®</sup>, Septalan<sup>®</sup>), na Austrália (Egopsoryl<sup>®</sup>) e nos Estados Unidos (Alphosyl<sup>®</sup>, Sebical<sup>®</sup>) (DOI *et al.*, 2009; SUGARMAN, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008; PARTIF, 1999; GORDON, 1998; DRAELOS, 1995).

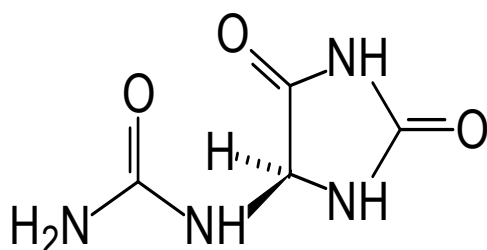


Figura 6: Estrutura da Alantoína.

Características físico-químicas da molécula (USP, 2009):

- $C_4H_6N_4O_3$
- PM= 158,1g
- PF= funde à temperatura em torno de 225°C com decomposição;
- Pó cristalino branco, pouco solúvel em água e muito pouco solúvel em álcool;
- pKa = 8,96

Está presente em enxaguatórios bucais (GAGARI & KABANI, 1995), sanitizantes para mãos (DYER, GERENRAICH & WADHAMS, 1998), formulações para tratamento de cicatrizes hipertróficas (KARAGOZ *et al.*, 2009) e dermatite atópica (SUGARMAN, 2008).

No tratamento da psoríase é empregada em formulações para aplicação tópica associada a outros agentes antipsoriáticos (ASHCROFT *et al.*, 2000). É também, frequentemente combinada a adstringentes, queratolíticos, alcatrão, antissépticos e antifúngicos. A alantoína é empregada na concentração de 0,2 a 2% em cremes, loções e xampus (VISSCHER, 2009; GENNARO *et al.*, 1995).

A alantoína matéria-prima pode ser quantificada por titulação potenciométrica frente ao hidróxido de sódio segundo a Farmacopéia Americana (USP, 2009) e Britânica (BP, 2004). Métodos titulométricos são utilizados por seu baixo custo e simplicidade de análise, porém muitas vezes não possuem sensibilidade e seletividade, sofrendo interferência de produtos de degradação e excipientes presentes nas amostras analisadas (BAKSHI & SINGH, 2002).

A determinação titulométrica da alantoína em cremes requer a purificação prévia da amostra para remover substâncias interferentes (WILLEMOT & PARRY, 1972; WEBER & HIGGINS, 1970).

Vários outros métodos têm sido desenvolvidos para análise da alantoína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (JIN *et al.*, 2009; FU, FERNG & HUANG, 2006; SHINGFIELD & OFFER, 1998; CZAUDERNA & KOWALCZYK, 1997),

cromatografia de interação hidrofílica (DOI *et al.*, 2009; DALLET, KUMMER & DUBOST, 2000), eletroforese capilar (KATTYGNARATH *et al.*, 2006; ZHANG, LIU & CHEN, 2004) e cromatografia acoplada a espectrômetro de massas (KIM *et al.*, 2009; BERTHEMY *et al.*, 1999) em preparações farmacêuticas, cosméticas e amostras biológicas.

Em algumas técnicas que utilizam cromatografia líquida e espectrofotometria, a alantoína é convertida a um derivado que absorve na região do UV, eliminando a interferência de outros componentes presentes em amostras biológicas (CZAUDERNA & KOWALKZYC, 1997; VRBASKI, GRUJIC-INJAC & GAJIC, 1978).

No trabalho de Zaidi, Sena e Basilio (1982) a alantoína foi degradada artificialmente em presença de um álcali e analisada por CLAE de fase reversa e detector UV a 220 nm. Os produtos de degradação pesquisados nas amostras foram o ácido alantóico, ácido glioxílico e uréia, que não interferiram na análise da alantoína pelo método desenvolvido (ZAIDI, SENA & BASILIO, 1982).

Alguns métodos espectrofotométricos conhecidos baseiam-se na reação de Rimini-Schryver que consiste na condensação de derivados de hidrazina com cetoácidos resultando em produto colorido (CHEN *et al.*, 1996).

No método descrito por Young e Conway (1942), a alantoína é convertida em ácido alantóico por hidrólise alcalina e, posteriormente, à uréia e ácido glioxílico por hidrólise ácida (Figura 30). A concentração da substância é determinada colorimetricamente ou espectrofotometricamente como fenilhidrazona. O ácido alantóico é comumente encontrado com a alantoína e interfere na estimativa, pois também gera ácido glioxílico na degradação. O total de alantoína e ácido alantóico é medido como “alantoína” incluindo ácido alantóico (YOUNG & CONWAY, 1942).

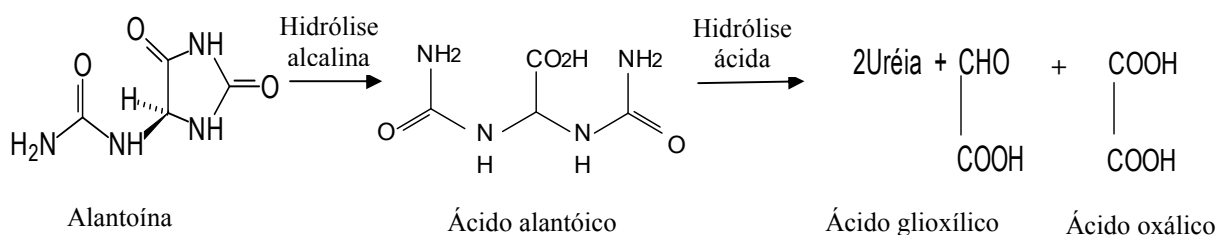


Figura 7: Decomposição hidrolítica da alantoína.

Este método é aplicado em amostras biológicas e sua principal desvantagem é a baixa estabilidade do cromóforo formado. Outros métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos para tentar eliminar a interferência de cetoácidos presentes em amostras biológicas (CHEN *et al.*, 1993).

Os métodos espectrofotométricos são comumente utilizados pela simplicidade do procedimento e rapidez das análises. A limitação desse método é a dificuldade de determinação simultânea de dois ou mais componentes na mesma amostra sem separação prévia. A espectrofotometria derivada na região UV-Vis. é uma técnica eficiente para determinação simultânea, eliminando a interferência de outros fármacos presentes, produtos de degradação e excipientes das formulações (DINÇ *et al.*, 2007; RANGNO *et al.*, 2006; KAPOOR, KHANDEVILLI & PANCHAGNULA, 2006).

A quantificação da alantoína como matéria-prima e em produtos farmacêuticos carece do desenvolvimento e validação de um método analítico que possa ser adaptado à rotina de análises de controle de qualidade da matéria-prima e produto acabado. O método titulométrico farmacopéico (USP, 2009) não pode ser aplicado aos produtos acabados, ficando restrito à análise da matéria-prima.

Como já discutido, anteriormente, muitos métodos disponíveis para determinação da alantoína em preparações farmacêuticas requerem separação prévia dos componentes da

formulação para eliminar a interferência dos mesmos, o que torna o procedimento demorado e trabalhoso.

Métodos que utilizam CLAE, cromatografia de interação hidrofílica, eletroforese capilar ou espectrometria de massas são caros e frequentemente não há disponibilidade de tais equipamentos em farmácias com manipulação ou indústrias farmacêuticas de pequeno porte.

O desenvolvimento de um método analítico através de espectrofotometria no UV é de grande valia, pois sendo um método simples, rápido e econômico, pode ser facilmente executado no laboratório de controle de qualidade de indústrias e farmácias com manipulação. A espectrofotometria derivada elimina a necessidade da preparação prévia das amostras de produtos dermatológicos contendo alantoína.

Neste cenário, o objetivo do presente estudo é desenvolver e validar um método analítico para quantificar a alantoína como matéria-prima e em formas farmacêuticas através de espectrofotometria derivada.

## **2. JUSTIFICATIVA**

### **2.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO**

A alantoína matéria-prima pode ser quantificada por titulação potenciométrica frente ao hidróxido de sódio segundo a USP (2009) e BP (2004), porém o método não é adequado para a determinação de alantoína em preparações de uso tópico. Vários outros métodos têm sido desenvolvidos para a análise de alantoína por CLAE, cromatografia de interação hidrofílica, eletroforese capilar e cromatografia acoplada a espectrômetro de massas em preparações farmacêuticas, cosméticas e amostras biológicas. Tais métodos requerem equipamentos caros que geralmente não estão disponíveis em farmácias de manipulação e pequenas indústrias farmacêuticas.

A quantificação da alantoína como matéria-prima e em produtos farmacêuticos carece do desenvolvimento e validação de um método analítico que possa ser adaptado à rotina de análises de controle de qualidade da matéria-prima e produto acabado.

O objetivo do presente estudo é o desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação da alantoína como matéria-prima e em formas farmacêuticas através de espectrofotometria derivada. O método desenvolvido foi aplicado no doseamento da alantoína em creme não-iônico e lipossomas.

### **2.2 LIPOSSOMAS E ALANTOÍNA**

A alantoína é utilizada em formulações tópicas no tratamento de peles sensíveis devido a suas propriedades calmante e anti-inflamatória. É utilizada no tratamento tópico da dermatite atópica e da psoríase. É comumente associada a outros fármacos em formulações tópicas para o tratamento de psoríase, pois pode minimizar os efeitos colaterais provocados pela aplicação tópica de fármacos como a antralina e calcipotriol.



A similaridade da estrutura da bicamada das vesículas lipídicas com as membranas naturais confere aos lipossomas propriedades de regeneração da pele. Mesmo sem ingrediente ativo os lipossomas umidificam a pele melhorando a elasticidade e a função de barreira do tecido.

O tratamento de doenças de pele como psoríase e dermatite atópica requer a aplicação de cremes e emolientes contendo lipídios, ácidos graxos, colesterol e triglicerídeos que estimulam o reparo da barreira lipídica e aumentam a hidratação do estrato córneo. O uso de emolientes é fundamental para manter a pele do paciente portador de psoríase e dermatite atópica hidratada e minimizar o prurido.

A inclusão da alantoína em lipossomas pode ser de grande utilidade para o tratamento de tais doenças, por combinar as propriedades calmante e anti-inflamatória da alantoína com as propriedades reparadora e hidratante do lipossoma.

### 3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar uma nova metodologia analítica para a determinação de alantoína matéria-prima e em preparações farmacêuticas de uso tópico por espectrofotometria derivada, bem como propor a inclusão de alantoína em lipossomas para o tratamento de doenças de pele que requerem as propriedades calmante e anti-inflamatória da alantoína e as propriedades reparadora e hidratante do lipossoma.

#### 3.1 Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer parâmetros para o desenvolvimento do método espectrofotométrico para a determinação de alantoína de modo a possibilitar a análise da mesma em preparações de uso tópico como creme e lipossoma em gel;
- ✓ Validar a metodologia para análise da alantoína;
- ✓ Incluir e caracterizar a alantoína nos lipossomas que foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e agitação mecânica;
- ✓ Aplicar o método desenvolvido no creme e lipossomas contendo alantoína.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1.MATERIAIS

#### 4.1.1.Matérias-primas

- Alantoína Padrão (SIGMA);
- Alantoína (DEG);
- Polifenilfosfatidilcolina - Phosal<sup>®</sup> 75 SA;
- Fosfatidilcolina de soja - Phospholipon<sup>®</sup> 90 G (PHOSPHOLIPID GmbH);
- Sephadex<sup>®</sup> G-50 (SIGMA-ALDRICH);
- Colesterol (SIGMA);
- Ácido ascórbico (SIGMA);
- Cera auto emulsionante não iônica - Polawax<sup>®</sup> NF CRODA (PHARMANOSTRA);
- Hidroxietilcelulose - Natrosol<sup>®</sup> (PURIFARMA).

#### 4.1.2.Equipamentos

- Espectrofotômetro UV-VIS SHIMADZU CORPORATION mod. UV-2401 PC com *software* UVPC;
- Espectrofotômetro no infravermelho SHIMADZU FTIR-8300;
- Espectrofotômetro no infravermelho NICOLET FTIR;
- Aparelho para determinação de ponto de fusão BÜCHI B-540;
- Potenciômetro METTLER TOLEDO MPC227;
- Polarímetro SCHMIDT HAENSCH NH8;
- Agitador de tubos PHOENIX AP56;
- Rota-evaporador BÜCHI R-114;
- Balança analítica METTLER TOLEDO AB204;
- Balança de precisão METTLER TOLEDO PB3002;

- Aparelho de ultra-som THORNTRON – 14;
- Titulador automático Mettler DL25;
- Placa de aquecimento com agitação magnética CORNING;
- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo, mod.QUATTRO LC, marca MICROMASS;
- Bomba de infusão KD Scientific.

#### **4.1.3. Outros materiais**

- Suporte para filtração SWINEX<sup>®</sup> em polipropileno com 25 mm de diâmetro;
- Colunas PD-10 vazias PHARMACIA BIOTECH;
- Seringas descartáveis de 5,0 ml BECKTON & DICKSON;
- Membranas de policarbonato ISOPORE<sup>®</sup> com poros de 0,4 µm e 0,2 µm;
- Placa de Cromatografia em camada delgada (CCD) Sílica gel em alumínio 20 x 20 cm ALDRICH<sup>®</sup>

#### **4.1.4. Reagentes**

- Hidróxido de sódio 0,1 M (PROQUIMIOS);
- Ácido ascórbico (ROCHE);
- Ácido sulfúrico P.A. (VETEC);
- Ácido fosfotúngstico (SIGMA);
- Clorofórmio P.A. (VETEC);
- Molibdato de amônio (MERCK);
- Peróxido de hidrogênio (VETEC);
- Solução padrão de fósforo (P) a 20 µg de P/mL (SIGMA);
- TRIS – Tris[hidroximetil]aminometano (SIGMA);
- Solução de acetato de amônio pH 6,9;

- Butanol P.A. (VETEC);
- Ácido acético glacial P.A. (VETEC);
- p-dimetilaminobenzaldeído P.A. (VETEC);
- Ácido Clorídrico P.A. (VETEC);
- Ácido Oxálico P.A. (REAGEN);
- Metanol P.A. (VETEC);
- Ureia (VIAFARMA);
- Álcool Etílico Absoluto P.A. (VETEC);

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NAS ANÁLISES

#### 4.2.1.1. Preparo da solução tampão TRIS pH 6,8

Pesar 2,42 g de Tris[hidroximetil]aminometano, transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada. Ajustar o pH da solução para 6,8 utilizando HCl concentrado, monitorando com o potenciômetro. A solução deve ser armazenada em frasco de vidro âmbar sob refrigeração.

#### 4.2.1.2. Preparo da solução reagente de molibdato de amônio

Pesar 2,20 g de molibdato de amônio, transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL, adicionar cerca de 300 mL de água destilada. Colocar o balão em banho de gelo e adicionar lentamente a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> preparada (7 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado em 400 mL de água destilada). Retirar o balão volumétrico do gelo, aguardar o retorno à temperatura ambiente e completar o volume do balão com água destilada (MORITA & ASSUMPÇÃO, 2001).

#### 4.2.1.3. Preparo da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N

Em um balão volumétrico de 100 mL adicionar 50 mL de água destilada. Colocar o balão em banho de gelo e adicionar lentamente 30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Retirar o balão volumétrico do gelo, aguardar o retorno à temperatura ambiente e completar o volume do balão com água destilada (MORITA & ASSUMPÇÃO, 2001).

#### 4.2.1.4. Preparo da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10% de oxigênio liberado (v/v)

Pipetar 3,4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> P.A., transferir para balão volumétrico de 10 mL e completar com água destilada. Esta solução deve ser preparada no momento do uso (MORITA & ASSUMPÇÃO, 2001).

#### 4.2.1.5. Preparo da solução de ácido ascórbico 10% (p/v)

Pesar 1,00 g de ácido ascórbico, transferir quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL e completar com água destilada. Esta solução deve ser preparada no momento do uso (MORITA & ASSUMPÇÃO, 2001).

#### 4.2.1.6. Preparo da solução de fosfotungstato de potássio 2% (p/v)

Pesar 0,57 g de ácido fosfotúngstico em um bécher de 50 mL, adicionar cerca de 5 mL de água destilada. Neutralizar até pH 7,0 com solução aquosa de KOH 1 M.

### **4.2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ALANTOÍNA**

A matéria-prima do fornecedor DEG, lote 70804, adquirida pela Farmácia Universitária da Faculdade de Farmácia – UFRJ, foi analisada para o trabalho, seguindo as farmacopéias USP (2009) e BP (2004).

#### 4.2.2.1. Análise do espectro na região do infravermelho

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho da alantoína foi realizada. Os espectros obtidos no aparelho SHIMADZU FTIR-8300 foram comparados com o espectro existente na literatura (CTFA, 1991). O espectro foi obtido utilizando-se a alantoína a 0,5% (p/p) em pastilhas de KBr e a varredura foi realizada entre 200 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.2.2. Determinação do teor da matéria-prima e do padrão

A matéria-prima foi analisada por titulação potenciométrica com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N, segundo monografia descrita na Farmacopéia Americana (USP, 2009).

O padrão de alantoína lote 12808150 foi adquirido da empresa Sigma e analisado pelo mesmo método para o trabalho.

#### 4.2.2.3. Determinação do ponto de fusão (PF) da alantoína

Uma pequena quantidade de matéria-prima foi colocada em um capilar de vidro fechado em uma das pontas o qual foi colocado no suporte de amostra do aparelho Büchi B-540 para a determinação do PF (BP, 2004).

#### 4.2.2.4. Determinação da rotação ótica da alantoína

Preparou-se uma solução de alantoína com concentração de 10 mg/mL. O tubo polarímetro foi preenchido com 25 mL desta solução para determinação da rotação ótica no polarímetro, segundo monografia da USP, 2009.

#### 4.2.2.5. Determinação de impurezas na alantoína por CCD

As soluções abaixo foram preparadas para avaliar a ausência de produtos resultantes da decomposição da alantoína ou resíduos decorrentes do processo de síntese da matéria-

prima por CCD (USP, 2009). A fase móvel utilizada foi uma mistura 60:25:15 de butanol, água e ácido acético glacial. O revelador foi uma solução de p-dimetilaminobenzaldeído a 5 g/L em uma mistura 3:1 de metanol e ácido clorídrico. A placa de CCD foi ativada em estufa a 50 °C e foram aplicados 10 µL de cada solução descrita abaixo na placa cromatográfica.

A solução teste A 1 (STA1) foi preparada a partir de 0,10 g de alantoína lote 70804, dissolvidos, sob aquecimento leve, em 5 mL de água. Após esfriamento, a solução foi avolumada para 10 mL com metanol. Para o preparo da solução teste B 1 (STB1) utilizou-se 1 mL de STA1 que foi diluída para 10,0 mL em mistura de metanol:água (1:1).

As soluções STA2 e STB2 foram preparadas da mesma forma que STA1 e STB1 utilizando outro lote de alantoína (lote k33552715431), cujo prazo de validade já havia expirado, para comparação dos resultados.

A solução referência A (SRA) foi preparada pesando-se 0,10 g de alantoína padrão, posteriormente dissolvidos em 10 mL em uma mistura metanol:água (1:1).

A solução referência B (SRB) foi preparada a partir de 0,1 g de uréia, dissolvidos em 10 mL de água. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com metanol.

Para o preparo de solução referência C (SRC) foi realizada uma mistura em partes iguais das soluções referência A e B.



### 4.2.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV PARA DETERMINAÇÃO DA ALANTOÍNA EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

#### 4.2.3.1 Análise do espectro de absorção na região do ultravioleta

Os espectros de absorção das soluções contendo 10 e 500 µg/mL de alantoína em água e solução de NaOH 0,01 N foram determinados em espectrofotômetro UV/VIS no intervalo de 190 a 400 nm, usando cubetas de quartzo de 1 cm.

Com as concentrações escolhidas (de 25 a 300 µg/mL) foram construídas curvas analíticas (Absorbância x Concentração) para a alantoína em solução aquosa e em solução de NaOH 0,01 N e determinada a faixa de concentração de alantoína que possui resposta linear com a absorbância. Essa análise permitiu a construção das curvas analíticas e o cálculo da equação da reta com a determinação do coeficiente de correlação (r) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (ANVISA, 2003). Foram calculados os teores de alantoína a partir das duas curvas para comparação dos resultados.

#### 4.2.3.2 Parâmetros estabelecidos para o método desenvolvido

Outros parâmetros para o desenvolvimento de método espectrofotométrico para a determinação de alantoína foram estabelecidos de modo a possibilitar a análise da mesma em lipossomas:

1. Solvente;
2. Especificidade;
3. Concentração de NaOH do solvente.

#### **4.2.4 COMPARAÇÃO DO MÉTODO FARMACOPÉICO E ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA**

O padrão Sigma<sup>®</sup> de alantoína foi analisado pelo método titulométrico farmacopéico (USP, 2009) e pelo método desenvolvido no presente trabalho. Os resultados foram comparados utilizando-se teste *t* de *Student* como ferramenta estatística para avaliar se há diferença estatisticamente significativa entre as médias de dois grupos.

#### **4.2.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA DETERMINAÇÃO DE ALANTOÍNA COMO MATÉRIA PRIMA E EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS**

O método desenvolvido foi aplicado na determinação do teor de alantoína como matéria-prima e em preparações farmacêuticas de uso tópico como lipossomas preparados pelos métodos de hidratação do filme lipídico e agitação mecânica e creme.

#### **4.2.6 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE ALANTOÍNA POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA**

Para validação da metodologia de quantificação de alantoína por espectrofotometria derivada foram realizados os testes que comprovassem a especificidade e robustez do método, a linearidade de resposta e a precisão nos níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Os testes foram realizados para determinação da alantoína como matéria-prima e em uma preparação de uso tópico (creme).

A validação foi baseada no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e no Guia para Validação de Procedimentos Analíticos Q2 (R1) da

Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH, 2005).

Para realizar os testes de determinação de alantoína em creme preparou-se um creme de alantoína a 1%. O creme foi preparado com uma cera auto-emulsionante não-iônica O/A (Polawax®) e a alantoína foi incorporada na fase aquosa da emulsão.

#### **4.2.6.1 Especificidade**

É a capacidade que o método possui de medir exatamente o composto desejado na presença de outros compostos (ANVISA, 2003).

A especificidade foi avaliada a partir da realização de varredura entre 190 e 400 nm da solução amostra e da solução contendo os possíveis produtos de degradação da alantoína (ureia e ácido oxálico) com a finalidade de garantir que o método analítico não sofrerá interferências desses componentes se eles estiverem presentes na amostra.

Foi também realizada a varredura entre 190 e 400 nm de soluções contendo os componentes da formulação lipossomal de alantoína (Phospholipon® 90G e Phosal® 75SA) e os excipientes semi-sólidos das preparações tópicas (creme não iônico e gel natrosol), com a finalidade de garantir que o método analítico poderá ser aplicado posteriormente em produtos acabados para uso tópico.

#### **4.2.6.2 Linearidade**

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003).

#### 4.2.6.2.1 Matéria-prima

A linearidade foi determinada pela realização da curva de calibração. A partir da solubilização da substância padrão de alantoína em solução de NaOH 0,1 N em etanol (70:30), foram preparadas cinco soluções subsequentes, utilizando o mesmo solvente, nas concentrações de 50; 100; 150; 200; 250 e 300 µg/mL, dentro da faixa de 25-150%.

#### 4.2.6.2.2 Creme não iônico de alantoína 1%

A linearidade foi determinada pela realização da curva com diferentes tomadas de ensaio de creme não iônico de alantoína a 1%. Foram pesadas massas crescentes de 0,125; 0,250; 0,400; 0,500; 0,600 e 0,750 g do creme preparado e diluídas para 25 mL de solução de NaOH 0,1 N em etanol (70:30), resultando em soluções de concentrações de 50; 100; 160; 200; 240; 300 µg/mL de alantoína.

### 4.2.6.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003).

#### 4.2.6.3.1 Matéria-prima

A precisão do método para determinação da matéria-prima foi avaliada nos níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada utilizando-se 9 determinações de soluções com concentrações respeitando o intervalo de 75 a 125% da concentração teste de 200 µg/mL (3 concentrações em triplicata). A mesma análise foi realizada em dias diferentes por diferentes analistas para determinação da precisão intermediária.

#### 4.2.6.3.2 Creme não iônico de alantoína 1%

A precisão foi avaliada nos níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada utilizando-se 9 determinações de soluções com concentrações respeitando o intervalo especificado de 80 a 120% da concentração teste de 200 µg/mL (3 concentrações em triplicata). Foram pesadas alíquotas de 0,4; 0,5 e 0,6 g do creme em balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com solução de NaOH 0,1 N em etanol (70:30), resultando em soluções de 160, 200 e 240 µg/mL.

A mesma análise foi realizada em dias diferentes por diferentes analistas para determinação da precisão intermediária.

#### 4.2.6.4 Exatidão

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

##### 4.2.6.4.1 Matéria-prima

A exatidão foi avaliada analisando-se alantoína de pureza conhecida (padrão) e os resultados expressos em percentagem de recuperação. A análise foi realizada em triplicata de amostras de concentração conhecida (150; 200 e 250 µg/mL) equivalentes a 75, 100 e 125%, respectivamente, da concentração teórica analisada.

##### 4.2.6.4.2 Creme não iônico de alantoína 1%

A exatidão foi avaliada pelo método conhecido como adição do padrão. Transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL uma quantidade de creme equivalente a 2 mg de alantoína e o volume foi completado com solução de NaOH 0,1 N (40 µg/mL). Alíquotas de 1 mL dessa solução foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL contendo 0,8; 1,0;

e 1,2 mL de solução padrão de alantoína (1 mg/mL) e o volume foi completado com solução de NaOH 0,1 N, resultando em concentrações finais de 80; 100 e 120  $\mu\text{g/mL}$  respeitando o intervalo de 80 a 120% da concentração teste (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 8).

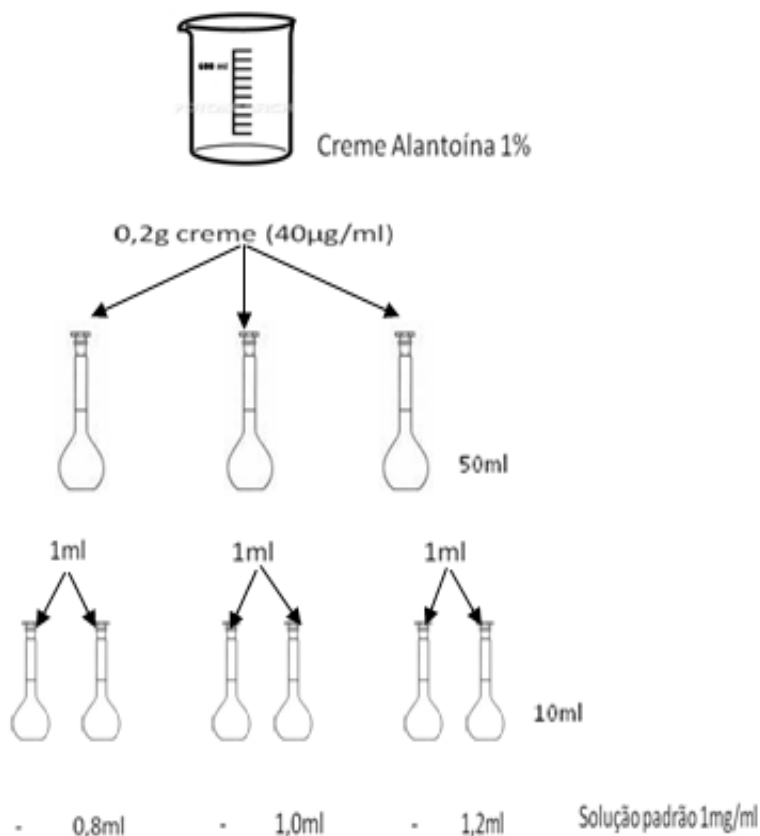


Figura 8: Esquema representando o método de adição do padrão utilizado para a determinação da exatidão do método espectrofotométrico desenvolvido.

Todas as soluções foram preparadas em triplicata e um branco foi feito para cada pesada de creme. Os resultados foram expressos em percentagem de recuperação.

#### 4.2.6.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada alterando-se o fornecedor do NaOH para VETEC, o pH da solução de NaOH para 12,8 e a concentração da solução para 0,2 N. Os resultados foram comparados utilizando-se o teste *t* de *Student* como ferramenta estatística para avaliar se as variações dos parâmetros influenciam a quantificação da alantoína.

## 4.2.7 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO

Para possibilitar a caracterização do método desenvolvido neste trabalho, as soluções de alantoína em NaOH 0,1 N, utilizadas nas medidas espectrofotométricas, foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrometria no infravermelho (IV) e espectrometria de massas.

### 4.2.7.1 Análise por CCD

As soluções descritas a seguir foram preparadas para avaliar a presença de produtos de degradação na solução de alantoína em NaOH 0,1 N. A fase móvel utilizada foi uma mistura 60:25:15 de butanol, água e ácido acético glacial. O revelador foi uma solução de p-dimetilaminobenzaldeído a 5 g/L em uma mistura 3:1 de metanol e ácido clorídrico. A placa de CCD foi ativada em estufa a 50 °C por 1 hora e foram aplicados, na placa cromatográfica, 10 µL de cada solução descrita abaixo.

A solução teste A 1 (STA1) foi preparada a partir de 0,10 g de alantoína lote 70804, dissolvidos sob aquecimento leve em 5 ml de solução hidroalcoólica de NaOH 0,1 N. Após esfriamento, completou-se o volume para 10 mL com metanol. A solução teste A 2 (STA2) foi preparada a partir de 0,10 g de alantoína lote 70804, dissolvidos a frio em 5 ml de água.

A solução STA3 foi preparada a partir de 0,10 g de alantoína lote 70804, dissolvidos sob aquecimento leve em 5 ml de água.

A solução referência A (SRA) foi preparada pesando-se 0,10 g de alantoína padrão, que foram posteriormente dissolvidos em 10 mL em uma mistura metanol:água (1:1).

A solução referência B (SRB) foi preparada a partir de 0,1 g de ureia, que foram dissolvidos em 10 mL de água. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e a solução foi avolumada com metanol.

Para o preparo de solução referência C (SRC) foi realizada uma mistura em partes iguais das soluções referência A e B.

#### 4.2.7.2 Análise por espectrometria no IV

Foi realizada a análise do espectro de absorção na região do infravermelho da alantoína em solução hidroalcoólica de NaOH 0,1 N liofilizada. O resultado foi comparado com o espectro da alantoína matéria-prima para verificar mudanças no espectro devido à solubilização da amostra em NaOH.

Para obtenção da amostra liofilizada foi preparada uma solução de alantoína 2,5 mg/mL em solução hidroalcoólica de NaOH 0,1 N. A solução foi levada ao evaporador rotatório por 4 horas para evaporação do álcool. Foram adicionados 30 mL de água e a amostra foi, então, congelada a 8 °C e mergulhada em nitrogênio líquido para proceder à liofilização.

O espectro da amostra foi obtido no aparelho NICOLET FTIR por reflectância total atenuada (ATR) após liofilização e a varredura foi realizada entre 500 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.7.3 Análise por espectrometria de massas

Todas as amostras foram diluídas em solução tampão acetato 0,01 M, pH 6,9, ajustado com solução de ácido fórmico a 1%, para infusão direta no espectrômetro de massas.

A alantoína foi diluída em água e em solução hidroalcoólica de NaOH 0,1 N na concentração de 1 mg/mL. A partir dessas soluções preparou-se as soluções a 100  $\mu\text{g/mL}$  em tampão acetato pH 6,9 e foi feita infusão direta no espectrômetro de massas triplo quadrupolo, modelo Quattro LC, marca Micromass, para elucidar a composição das soluções.

O modo de ionização utilizado foi eletrospray negativo, empregando bomba de infusão KD Scientific com fluxo de 600  $\mu\text{L/hora}$ . A voltagem do cone foi ajustada para 20



volts e do capilar para 2,5 kV. A temperatura da fonte foi de 100 °C. O fluxo de gás de dissolvatação foi de 600 L/h e a temperatura de dessolvatação de 250 °C.

Foi feita infusão direta da solução tampão acetato 0,01 M pH 6,9 e de amostras de alantoína padrão Sigma, ureia e ácido oxálico diluídas na solução tampão acetato, na concentração de 100 µg/mL, para comparação dos resultados das amostras.

Posteriormente, foi realizada uma análise MS-MS. A energia de colisão aplicada foi de 12 para quebrar a molécula de alantoína e possibilitar a visualização dos seus íons filhos no espectro. A pressão na célula de colisão foi de  $3,95 \times 10^{-3}$  mbar.

#### 4.2.7.4 Hidrólise alcalina da alantoína

A alantoína foi submetida à hidrólise alcalina artificial. A alantoína foi dissolvida em solução de NaOH 0,5 M na concentração de 2%, sendo levada para refluxo à temperatura de 100 °C por 4 horas. Foram coletadas amostras nos tempos de 2 e 4 horas que foram analisadas por CCD e espectrometria de massas.

#### 4.2.7.5 Espectro de absorbância *versus* tempo

A mudança nas medidas de absorbância da solução durante a reação entre a alantoína e o NaOH foram acompanhadas no espectrofotômetro.

A solução de alantoína solubilizada em NaOH 0,1 N foi analisada no espectrofotômetro no modo *Time Course* para monitorar as absorbâncias da solução ao longo de 1 hora, sendo os resultados plotados em um gráfico de absorbância versus tempo.

### **4.2.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FOSFOLIPÍDIO NO Phospholipon® 90 G**

A construção da curva analítica de fósforo foi feita sempre que o método de Bartlett, para determinação do teor de fosfolipídios, foi realizado (BARTLETT, 1959; NEW, 1990).

Para a construção da curva analítica foram pipetados 1,0 mL de água destilada em dois tubos de ensaio, que serviram de brancos, e quatro tubos contendo volumes crescentes de solução padrão de fósforo: 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{L}$ , nos quais as concentrações de P em  $\mu\text{g}$  foram de 0,999, 1,998, 2,996 e 3,996  $\mu\text{g}$ , respectivamente. Utilizou-se a solução padrão de fósforo Sigma<sup>®</sup> 20  $\mu\text{g P/mL}$  em HCl 0,05 N.

Foram adicionados nos 6 tubos 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 N, com auxílio de pipeta automática. Os tubos foram colocados em um bloco de aquecimento por 30 minutos a 180 °C. Na segunda etapa, quando as amostras já estavam frias, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10% em cada tubo. O bloco contendo os tubos foi levado novamente a aquecimento por 30 minutos, à temperatura de 180 °C. Na terceira etapa, foram adicionados 4,6 mL de molibdato de amônio em cada tubo e 0,5 mL de solução de ácido ascórbico a 10%. O bloco foi levado a aquecimento por 20 minutos a 90 °C e, ao final do ensaio, foi observada a formação de coloração azul de intensidades diferentes em cada tubo (Figura 9). Os tubos foram levados para leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 800 nm.

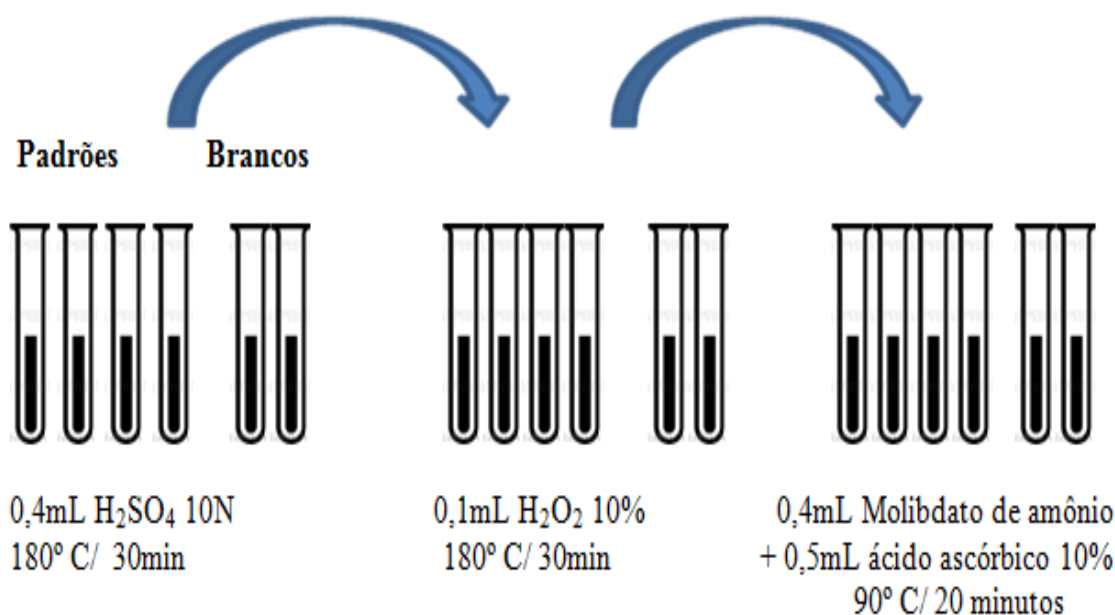


Figura 9: Determinação do teor de fósforo para construção da curva analítica. As soluções padrão foram compostas por alíquotas de 50, 100, 150 e 200  $\mu$ L do padrão de fósforo Sigma<sup>®</sup> 20  $\mu$ g P/mL em HCl 0,05 N, nas quais as concentrações de P em  $\mu$ g foram de 0,999, 1,998, 2,996 e 3,996  $\mu$ g, respectivamente. Os brancos foram compostos por 1,0 mL de água destilada.

A concentração de fosfolípidios foi determinada indiretamente pela quantificação do conteúdo de fósforo (P). Por se tratar de um método com muitas variáveis, foi realizada a construção de uma curva analítica de fósforo sempre que o método foi realizado.

A seguir, o teor da matéria-prima utilizada na fabricação do lipossoma foi determinado. As amostras de Phospholipon 90G<sup>®</sup> foram diluídas, baseando-se na massa inicial de fosfolípido presente, para obter as soluções finais com concentração de aproximadamente 2  $\mu$ g de fósforo/mL, ponto central da curva-analítica obtida.

#### 4.2.9. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Várias metodologias são descritas na literatura para o preparo de lipossomas. O método de hidratação do filme lipídico já foi descrito em estudos anteriores com filtros solares (GARCIA, 1998) e é capaz de garantir uma melhor incorporação de substâncias sólidas lipofílicas quando comparado com o método de agitação mecânica (HENRIQUES,

SANTOS & GARCIA, 2005). A alantoína é uma substância sólida, pouco solúvel em água, muito pouco solúvel em álcool e praticamente insolúvel em solventes orgânicos (clorofórmio, éter e diclorometano). Desta forma, os dois métodos foram testados para avaliar a incorporação da alantoína.

#### **4.2.9.1 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO ALANTOÍNA PELO MÉTODO DE HIDRATAÇÃO DO FILME LIPÍDICO**

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico utilizando-se os componentes: fosfolípidios (Phospholipon<sup>®</sup> 90G); colesterol (Sigma<sup>®</sup>); e alantoína (DEG). O método consiste na preparação inicial de uma solução dos componentes em solvente orgânico que é, posteriormente, evaporada em evaporador rotatório. Após a evaporação há a formação de uma película fina do material lipídico no fundo do balão. Este filme é disperso com a adição de um meio aquoso (tampão TRIS) por agitação (Figura 1à). Através da hidratação, os lípidios incham e se desprendem do balão em camadas, geralmente formando vesículas multilamelares (NEW, 1990).

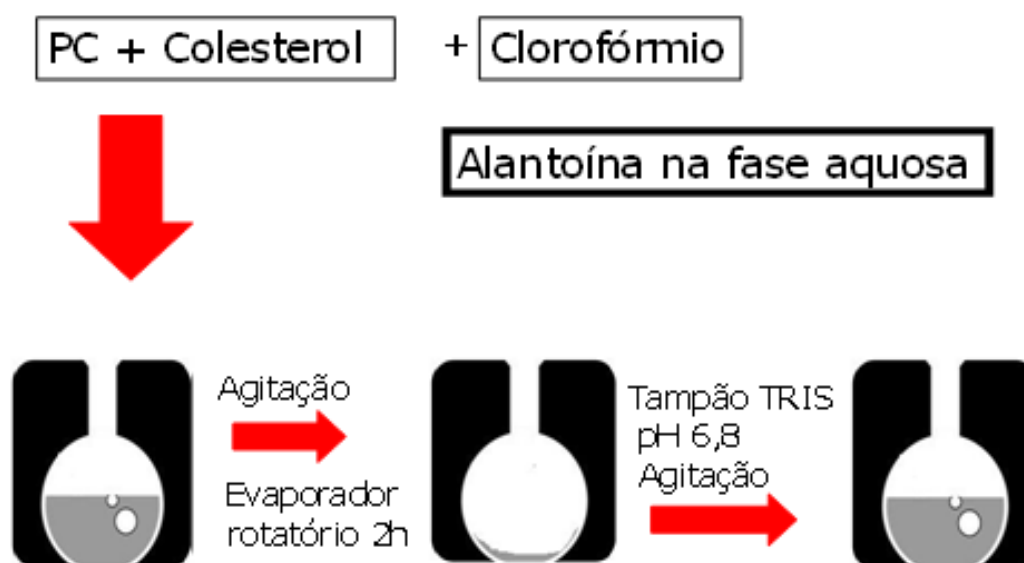


Figura 10: Esquema representando a preparação dos lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico.

O volume final estabelecido de preparação lipossômica foi de 50 mL. A concentração lipídica usada foi 42 mM (GARCIA, 1998), a concentração de colesterol foi 12 mM (GARCIA, 1998) e variou-se a concentração da alantoína para definir a melhor relação alantoína:fosfolípido.

Inicialmente a proporção de fosfatidilcolina e alantoína utilizada foi de  $42:5.3 \times 10^{-2}$  M. A alantoína foi dissolvida na fase aquosa da preparação e a hidratação foi feita por 96 horas. A fração filtrada dos lipossomas foi aquecida em banho-maria a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  para atingir a temperatura de transição de fase da fosfatidilcolina onde há maior flexibilidade da bicamada e liberdade de movimento das moléculas de fosfolípidios, o que permitiria a incorporação de maior quantidade de alantoína nas vesículas.

A segunda preparação foi realizada com proporção de fosfatidilcolina e alantoína de  $42:2,7 \times 10^{-2}$  M. O tempo de hidratação pode influenciar as características das vesículas

produzidas (VEMURI & RHODES, 1995). Por isso, o tempo de hidratação foi modificado para 24 horas para avaliar a interferência na quantidade de alantoína incorporada nas vesículas.

A alantoína foi adicionada em metade da fase aquosa (25 mL) e procedeu-se à hidratação no rota-evaporador com banho-maria à temperatura de 59 °C, para atingir 55 °C no lipossoma. Após resfriamento, adicionou-se o restante da fase aquosa (25 mL). A composição dos lipossomas preparados encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Composição dos lipossomas obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico.

Composição dos lipossomas	Quantidade mM	
	Formulação A	Formulação B
Phospholipon 90G	42	42
Colesterol	12	12
Alantoína	5,3	2,7
Tampão Tris pH 6,8	50 mL	50 mL

#### 4.2.9.2 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO ALANTOÍNA PELO MÉTODO DE AGITAÇÃO MECÂNICA

Neste procedimento, o lipossoma é formado a partir de uma mistura comercial de PC com outros adjuvantes (Phosal<sup>®</sup>). Foram calculadas as massas de Phosal<sup>®</sup> e alantoína a serem utilizadas para obter 25 mL da suspensão lipossomal. O lipossoma final possuía concentração de 42 mM. Os dois constituintes foram pesados diretamente em um becher de 100 mL, misturados por 15 minutos com o auxílio de um bastão de vidro e, por fim, adicionou-se 25 mL do tampão TRIS pH 6,8. A mistura foi deixada sob agitação mecânica por 2 horas (Figura 11).

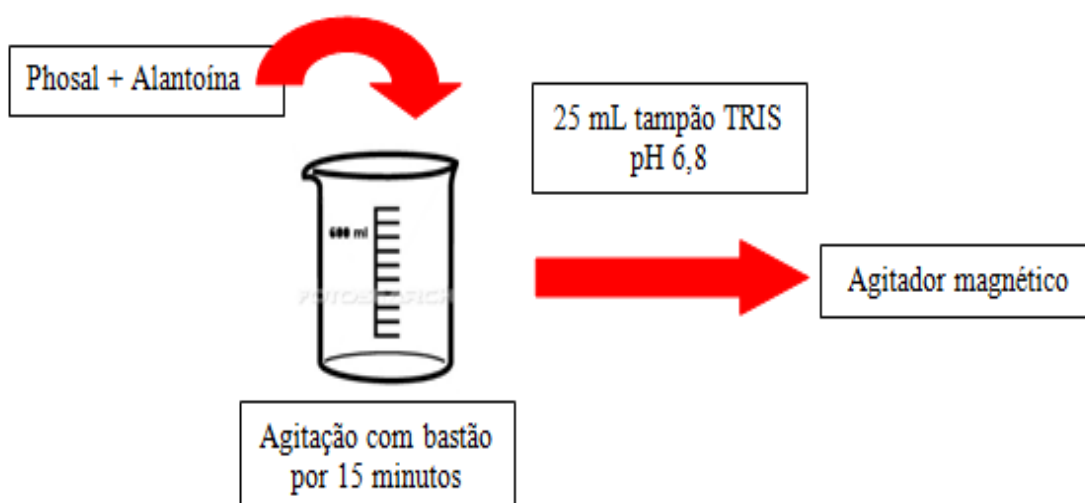


Figura 11: Preparação de lipossoma pelo método de agitação mecânica usando um pré-lipossoma.

A proporção PC:alantoína foi otimizada para avaliar a eficiência de inclusão da alantoína pelo método de agitação mecânica. Para isso, os lipossomas foram preparados nas proporções de PC:alantoína de  $42:2.7 \times 10^{-2}$  M e  $42:1.32 \times 10^{-2}$  M. A composição dos lipossomas preparados encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2: Composição dos lipossomas obtidos pelo método de agitação mecânica.

Composição dos lipossomas	Quantidade mM	
	Formulação A	Formulação B
Phospholipon 90G	42	42
Alantoína	2,7	1,32
Tampão Tris pH 6,8	25 mL	25 mL

Para tentar verificar a influência da solubilidade da alantoína na eficiência de inclusão, foram preparados lipossomas na proporção PC:alantoína de  $42:2.7 \times 10^{-2}$  M utilizando-se soluções tampões com diferentes valores de pH.

O **Lipossoma 1** foi preparado com solução tampão de pH 6,8 e a alantoína foi adicionada à fase aquosa, o **Lipossoma 2** foi preparado com solução tampão de pH 5,5 e a

alantoína foi adicionada à fase aquosa, o **Lipossoma 3** foi preparado com solução tampão de pH 9,0 e a alantoína foi adicionada à fase lipídica, o **Lipossoma 4** foi preparado com solução tampão de pH 9,0 e a alantoína foi adicionada na fase aquosa. Os lipossomas preparados estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Lipossomas obtidos pelo método de agitação mecânica variando-se o pH das preparações.

<b>Lipossomas PC:alantoína 42:2,7 mM</b>	<b>pH da solução tampão</b>	<b>Incorporação da alantoína</b>
<b>Lipossoma 1</b>	6,8	fase aquosa
<b>Lipossoma 2</b>	5,5	fase aquosa
<b>Lipossoma 3</b>	9,0	fase lipídica
<b>Lipossoma 4</b>	9,0	fase aquosa

#### 4.2.10 NORMALIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e agitação mecânica foram normalizados quanto ao tamanho das vesículas. Para isso, os lipossomas foram filtrados utilizando seringas descartáveis de 5,0 mL (Beckton & Dickson) acopladas a suportes de filtração Swinex<sup>®</sup>, em polipropileno com 25 mm de diâmetro, contendo as membranas de policarbonato (Isopore<sup>®</sup>) com poros de 0,4 µm e de 0,2 µm. Foi realizada a extrusão da solução dos lipossomas por duas vezes pela membrana de 0,4 µm e uma vez pela de 0,2 µm. Após a passagem pela membrana de 0,2 µm, uma fração dos lipossomas foi separada para análise (OLSON *et al.*, 1979; GARCIA, 1998; SANTOS, 2007).

Uma alíquota de 5 mL da fração filtrada em membrana de 0,2 µm foi separada para que fossem filtrados em uma coluna PD-10 contendo gel Sephadex<sup>®</sup> G-50. A eluição da amostra pela coluna foi realizada por meio de solução tampão TRIS pH 6,8. As vesículas muito grandes são excluídas das aberturas da rede do gel Sephadex<sup>®</sup>, enquanto que as



vesículas menores podem entrar no interior das partículas do gel e serem retidas. Desta forma, todo o material que não estava incorporado no lipossoma ficaria retido no gel da coluna, e a fração que passava por toda coluna era recolhida para análise (Figura 12).

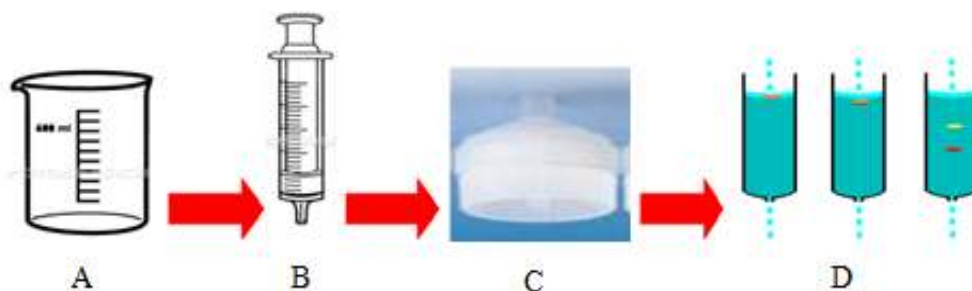


Figura 12: Esquema do processo de normalização dos lipossomas. A preparação lipossomal (A) foi passada para uma seringa (B) que é acoplada a um suporte filtrante (C) contendo uma membrana de policarbonato de tamanhos variando entre 0,4 e 0,2  $\mu\text{m}$ . A seguir, foi realizada a separação dos lipossomas através de uma coluna PD-10 (D) contendo gel Sephadex® G-50.

As frações lipossomais obtidas foram analisadas por espectrofotometria no UV/VIS quanto ao teor de alantoína e teor de fosfatidilcolina (método de Bartlett). Após a determinação do melhor método de preparação dos lipossomas, estes foram analisados quanto ao tamanho das vesículas por espalhamento dinâmico da luz.

## 4.2.11 ANÁLISE DAS FRAÇÕES LIPOSSOMAIS

### 4.2.11.1 Determinação do teor de alantoína e fosfolipídios nas frações

Utilizando a massa de alantoína inicialmente pesada para o preparo dos lipossomas, foi calculada a diluição necessária das amostras para obter soluções com concentrações próximas a do ponto central da curva analítica.

Para cada fração foram preparadas três diluições que foram lidas no espectrofotômetro. A concentração de alantoína em cada fração foi determinada pela equação da reta obtida da curva analítica correspondente. As determinações espectrofotométricas dos lipossomas preparados por hidratação no filme lipídico em proporções de PC:alantoína de  $42:5.3 \times 10^{-2}$  M e de  $42:2.7 \times 10^{-2}$  M foram realizadas com leituras a 246 nm. A seguir, a

segunda preparação foi analisada pelo método por espectrofotometria derivada de primeira ordem e leitura a 263,9 nm, desenvolvido neste trabalho. Os lipossomas preparados por agitação mecânica foram analisados por espectrofotometria derivada de segunda ordem com leitura a 266,6 nm.

Foi realizada a determinação indireta da concentração de fosfolipídios, avaliando-se o conteúdo de fósforo (P) em cada amostra. Por se tratar de um método com muitas variáveis, foi realizada a construção de uma curva analítica de fósforo sempre que o método foi realizado. As amostras foram diluídas, baseando-se na massa inicial de fosfolipídio presente, para obter as soluções finais com concentração de aproximadamente 2 µg de fósforo/mL. Foi pipetado 1,0 mL de cada solução diluída para um tubo de ensaio, em dois tubos foram pipetados 1,0 mL de água destilada que serviram de brancos e quatro tubos contendo volumes crescentes de solução padrão de fósforo para construção da curva analítica.

#### **4.2.11.2 Espalhamento dinâmico da luz laser**

Para avaliar a estabilidade da preparação obtida com solução tampão pH 9,0 foi realizada a análise de distribuição do tamanho e polidispersividade das vesículas. A formulação de lipossomas contendo alantoína foi diluída em água e analisada no equipamento de espalhamento de luz ZetaPlus Zeta Potential Analyzer - Brookhaven Instruments Corporation, do CBPF.

## 5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ALANTOÍNA

A matéria-prima foi adquirida pela Farmácia Universitária da Faculdade de Farmácia – UFRJ, do fornecedor DEG lote 70804, com o respectivo laudo de análise. Foram realizados ensaios de caracterização físico-química e teor na matéria-prima seguindo as farmacopéias USP (2009) e BP (2004), e os resultados estão apresentados a seguir.

#### 5.1.1 Análise do espectro na região do infravermelho

Os espectros no infravermelho são provocados pelos diferentes modos de interação da radiação eletromagnética com a molécula. A estrutura da alantoína encontra-se na figura 13. Na figura 14 apresenta-se o espectro na região do infravermelho obtido com a amostra de alantoína. A amostra apresentou bandas muito semelhantes ao seu padrão da literatura (Figura 15), sendo um indicativo da similaridade entre a estrutura química da alantoína e seu respectivo padrão.

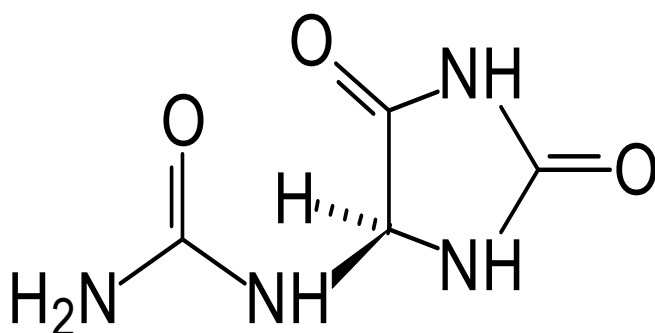


Figura 13: Estrutura química da alantoína.

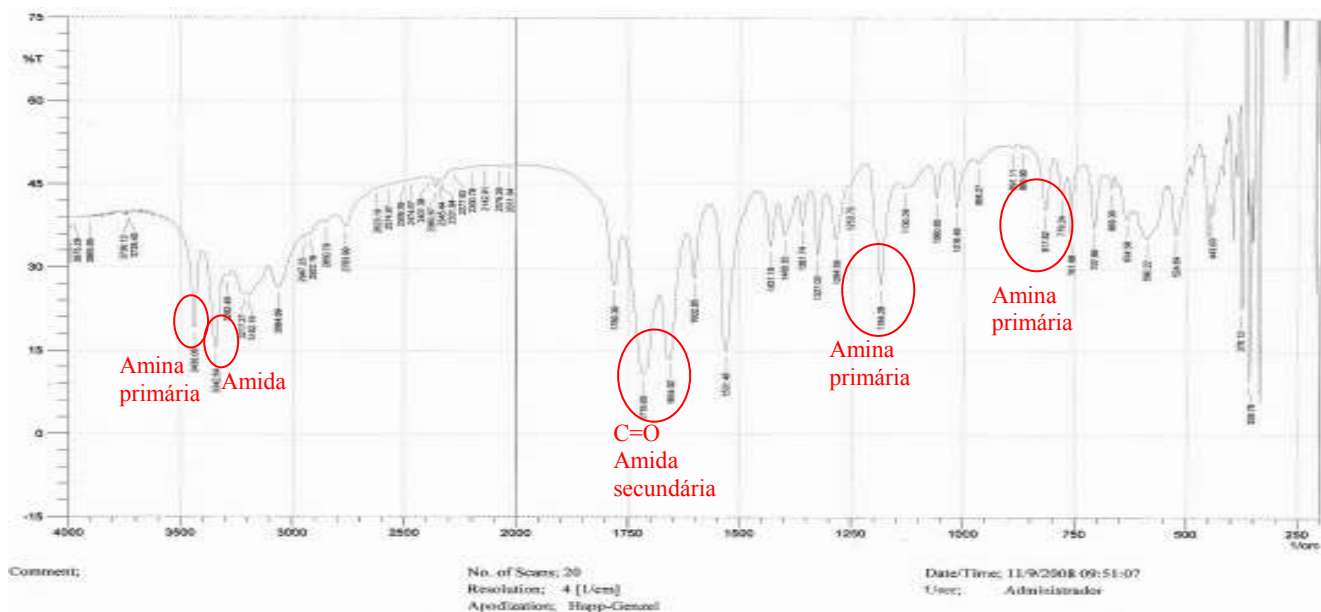


Figura 14: Espectro no infravermelho da alantoína (0,5% em KBr).

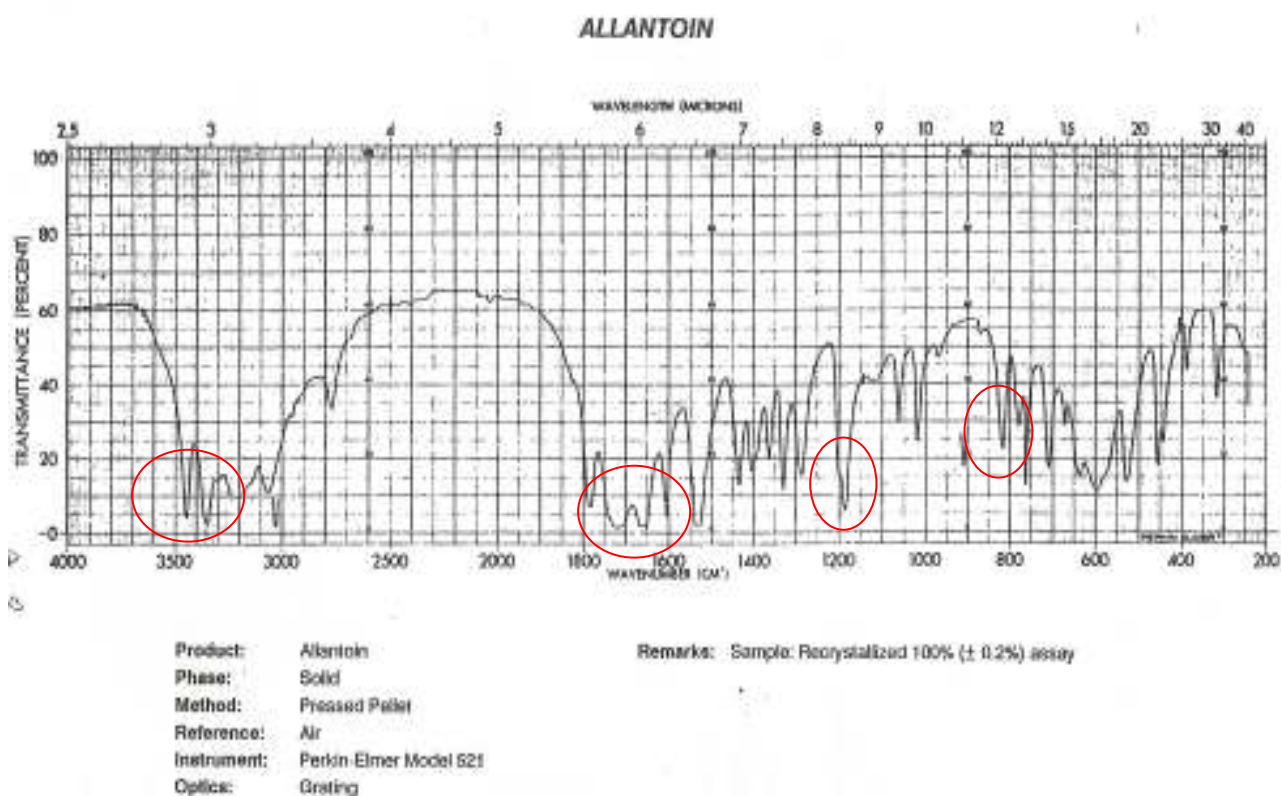


Figura 15: Espectro no infravermelho do padrão de alantoína (CTFA, 1991).

### 5.1.2 Determinação do teor da matéria-prima e do padrão

A matéria-prima foi analisada pelo método farmacopéico de titulação potenciométrica frente ao NaOH 0,1 N. A matéria-prima apresentou teor dentro da especificação farmacopéica (Tabela 4).

Tabela 4: Determinação do teor de alantoína matéria-prima.

<b>Teor da alantoína matéria-prima</b>	
Matéria-prima (n=3) (%)	Literatura*
	(%)
98,6 ± 0,18	98,5 a 101,0%

\*(USP, 2009)

O padrão de alantoína lote 12808150 foi adquirido da empresa Sigma e analisado. O padrão se apresentou adequado com teor dentro do descrito na literatura (Tabela 5).

Tabela 5: Determinação do teor de alantoína no padrão lote 12808150 (Val.: 09/06/2014).

<b>Teor da alantoína Padrão</b>	
Análise em fev/2009 (n=3) (%)	Literatura*
	(%)
98,97 ± 0,88	98,5 a 101,0%

\*(USP, 2009)

### 5.1.3 Determinação do ponto de fusão (PF) da alantoína

A determinação do ponto de fusão da alantoína foi realizada em triplicata e o resultado médio encontra-se na Tabela 6. A amostra apresentou uma faixa próxima daquela descrita na literatura.

Tabela 6: Valores de ponto de fusão da alantoína.

<b>Ponto de Fusão</b>	
Análise (n=3) (°C)	Literatura* (°C)
223,5 ± 0,05 - 225,5 ± 0,15	cerca de 225

\* (BP, 2004)

#### 5.1.4 Determinação da rotação ótica da alantoína

A magnitude e a direção de rotação ótica da radiação linearmente polarizada, ao passar através de uma espessura conhecida de um líquido, são usadas para fins de identificação de uma substância opticamente ativa (GIL, 2007).

O resultado obtido para o desvio do plano da luz polarizada da solução de alantoína no polarímetro encontra-se na Tabela 7 e está de acordo com a especificação da literatura.

Tabela 7: Rotação angular da alantoína.

<b>Rotação Ótica</b>	
Análise	Literatura*
-0,01	de -0,1 a + 0,1

\* (USP, 2009)

#### 5.1.5 Determinação de impurezas na alantoína por CCD

A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para investigar a possível presença da ureia como impureza orgânica decorrente do processo de decomposição da matéria-prima ou resíduo do processo de síntese da mesma (USP, 2009). A solução de referência B (SRB) é constituída de ureia. Na figura 16 apresenta-se a placa cromatográfica da alantoína onde STA1, STB1 são aplicações das soluções das matérias-primas, lotes 70804 e k33552715431, respectivamente. A alantoína lote K33552715431, cujo prazo de validade havia expirado, foi utilizada para comparação dos resultados. STA2 e STB2 são aplicações

das soluções das mesmas matérias-primas diluídas (1:1). SRA corresponde ao padrão de alantoína e a solução de referência B (SRB) é constituída de ureia. SRC é uma mistura em partes iguais do padrão de alantoína e ureia.

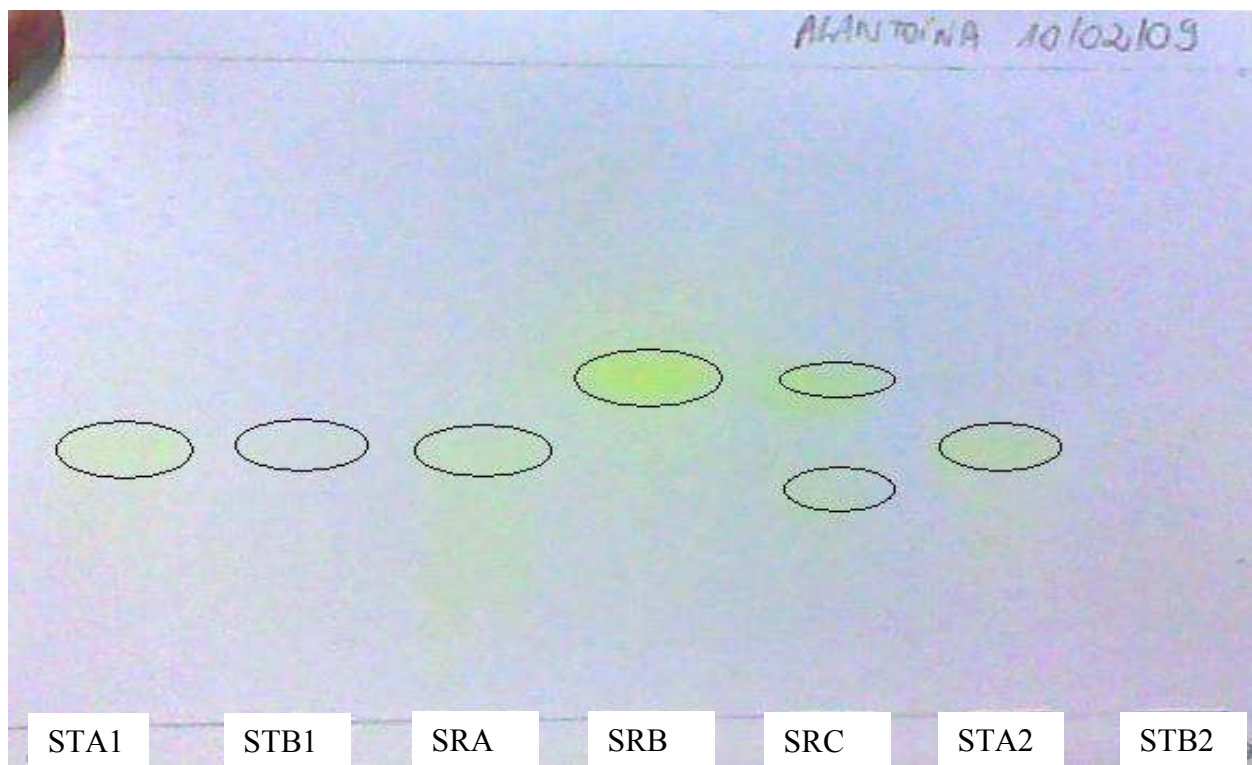


Figura 16: Cromatografia em camada delgada da Alantoína onde STA1, STB1, STA2 e STB2 são aplicações das soluções das matérias-primas. SRA: alantoína padrão, SRB: ureia e SRC: mistura de alantoína padrão e ureia.

Observa-se na figura 16 que as manchas da matéria-prima (STA1, STA2 e STB1) apresentaram-se na mesma altura da SRA, que corresponde ao padrão de alantoína. STB2 não apresentou mancha, o que pode ter sido devido à revelação deficiente na extremidade da placa. Nenhuma mancha correspondente à impureza pesquisada (ureia) foi revelada. A matéria-prima, cujo prazo de validade já havia expirado (lote k33552715431), também não apresentou mancha referente à impureza pesquisada (ureia).

Após serem concluídas as análises da matéria-prima, apresentando resultados satisfatórios, esta foi utilizada para a inclusão no lipossoma. Durante a preparação dos lipossomas de alantoína, empregou-se o método titulométrico farmacopéico para monitorar a

inclusão da mesma nos lipossomas. Os resultados de teor de alantoína nas formulações com lipossomas foram acima de 100%, quando se utilizou o método farmacopéico, levando a concluir que o método não possui seletividade e, portanto, é específico apenas para a matéria-prima, não sendo adequado para determinação de alantoína em presença de lipossomas.

Desta forma, um novo método foi desenvolvido e validado utilizando a espectrofotometria no ultravioleta (UV).

## **5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV PARA DETERMINAÇÃO DE ALANTOÍNA EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS**

A espectrofotometria na região ultravioleta é um método usado nas determinações analíticas, aplicada para identificação e determinação quantitativa de princípios ativos, desde que estes apresentem grupos funcionais com características para absorver a radiação ultravioleta. A absorção da radiação ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada (HARRIS, 2005).

O método por espectrometria no UV foi escolhido por ser um método rápido para monitorar o teor de alantoína durante o desenvolvimento dos lipossomas.

### **5.2.1 Análise do espectro de absorção na região do ultravioleta**

O espectro de absorção obtido a partir de uma solução de alantoína a 10 µg/mL em água e em NaOH 0,01 N, mostrou que a molécula apresenta baixa absorção em água e aumento na intensidade de absorção quando em NaOH, conforme ilustrado na figura 17.



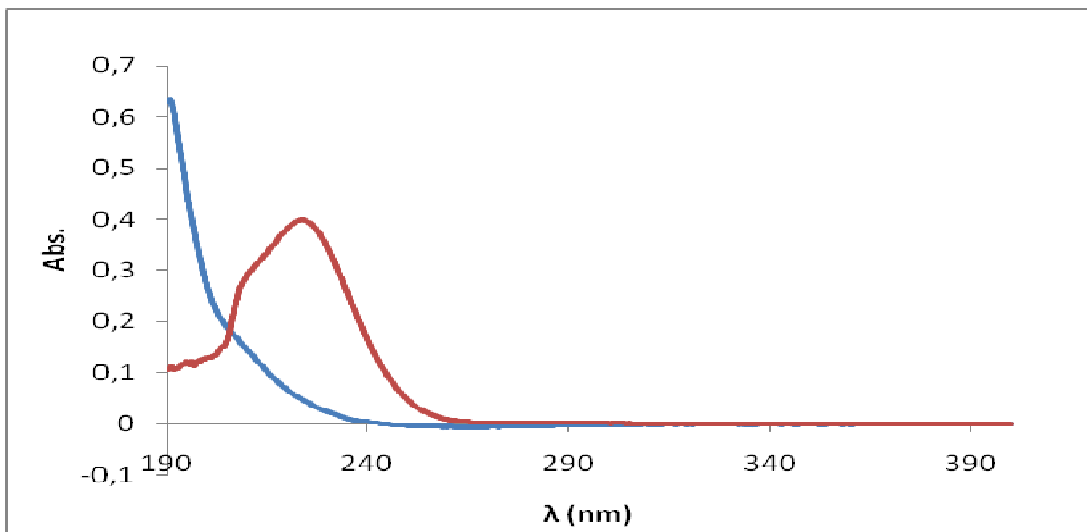


Figura 17: Espectro de absorção da alantoína 10  $\mu\text{g/ml}$  em solução aquosa (linha azul) e em solução de NaOH 0,01 N (linha vermelha).

Aumentando-se a concentração da alantoína para 500  $\mu\text{g/mL}$  nos mesmos solventes, água e NaOH 0,01 N, verificou-se que a molécula apresentou uma absorção máxima em 210 nm quando em solução aquosa e 246 nm quando em NaOH 0,01 N (Figura 18).

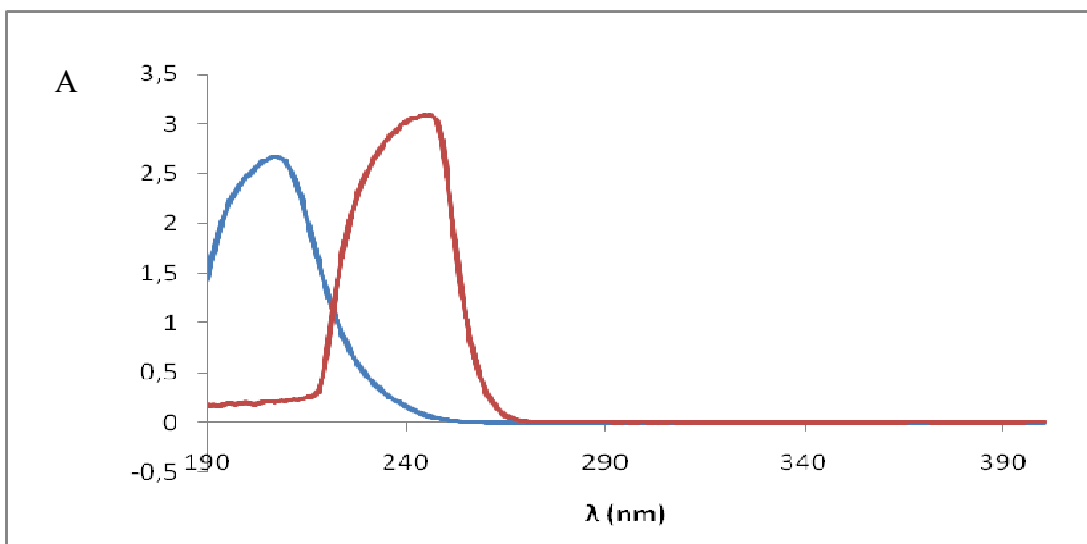


Figura 18: Espectro de absorção da alantoína 500  $\mu\text{g/mL}$  em solução aquosa (linha azul) e em solução de NaOH 0,01 N (linha vermelha).

O espectro de absorção na região ultravioleta (UV) é uma forma de estabelecer o perfil espectrofotométrico e determinar o comprimento de onda máximo ( $\lambda$  máx) de absorção

de um determinado composto. A solubilização da alantoína em NaOH provoca aumento da intensidade da absorção (efeito hiperacrômico) e um deslocamento para comprimento de onda maior (deslocamento batocrômico) no espectro.

Para iniciar o desenvolvimento do método por espectrofotometria, foram utilizadas as soluções da matéria-prima em água e em NaOH 0,01 N, a fim de possibilitar a comparação dos resultados e estabelecer as condições de análise mais adequadas para o método em desenvolvimento. O primeiro passo foi determinar a faixa de concentração de alantoína em solução aquosa e de NaOH que possui uma resposta linear com a absorbância em 210 e 246 nm, respectivamente.

Foram preparadas soluções de concentrações variando de 25 a 300 µg/mL. A faixa linear determinada ficou entre 50 e 200 µg/ml para a solução aquosa e entre 50 e 300 µg/mL para a solução de NaOH. Foi construída uma curva-analítica e foi calculada a equação da reta (Figuras 19 e 20).

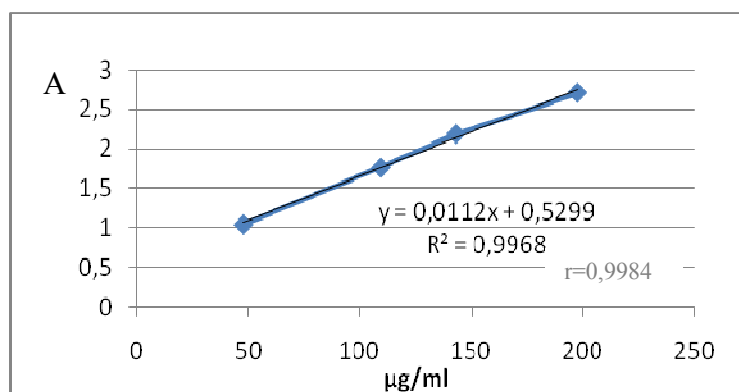


Figura 19: Curva analítica da alantoína em solução aquosa utilizada para determinação do teor da matéria-prima lote 70804.

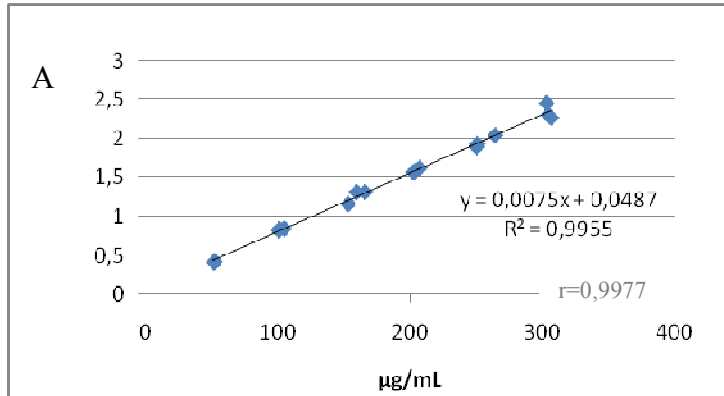


Figura 20: Curva analítica da alantoína em solução alcalina de NaOH utilizada para determinação do teor da matéria-prima lote 70804.

A curva obtida com soluções aquosas de alantoína apresentou linearidade, com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9984 e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9968, indicando um ajuste de 99,68% entre a proposta e os resultados obtidos (Figura 19).

A curva obtida com soluções de NaOH 0,01N apresentou linearidade, com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9977 e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9955, indicando um ajuste de 99,6% entre a proposta e os resultados obtidos (NETO, 2002) (Figura 20).

A seguir foram calculados os teores da alantoína lote 70804 em solução aquosa com leitura em 210 nm e em solução alcalina com leitura a 246 nm (Tabela 8).

Tabela 8: Determinação dos teores de alantoína na matéria-prima com leituras de absorvância em 210 e 246 nm.

<b>Amostra</b> <b>100 µg/ml</b>	<b><math>\lambda</math></b> <b>(nm)</b>	<b>Teor</b> <b>(%)</b>
Alantoína em solução aquosa	210	100,37
Alantoína em solução alcalina	246	101,44

Os resultados mostram que não há diferença de teores de alantoína quando se emprega uma solução aquosa ou solução de NaOH 0,01 N nas leituras espectrofotométricas. Como a alantoína deve estar presente em baixas concentrações nas alíquotas dos lipossomas a serem analisados, optou-se pela solubilização da alantoína em NaOH para melhorar a intensidade de absorção da mesma.

### 5.2.2 Parâmetros estabelecidos para o método desenvolvido

Foram estabelecidos outros parâmetros para desenvolvimento do método espectrofotométrico e determinação da alantoína de modo a possibilitar a análise da mesma em lipossomas.

#### 5.2.2.1 Solvente

O fosfolípido do lipossoma não se solubiliza em água (Figura 21A). Portanto, foi necessário adicionar etanol e otimizar a proporção de etanol:água da solução de hidróxido de sódio a fim de dissolver completamente os componentes lipídicos do lipossoma, eliminando a turvação da solução e permitindo a transmissão da luz UV. A solução com alta concentração de etanol provocava precipitação da alantoína, que é muito pouco solúvel neste solvente. Assim, a proporção ideal escolhida para preparar a solução de NaOH 0,01 N foi 70:30 (etanol:água), pois foi capaz de solubilizar os componentes do lipossoma sem provocar precipitação da alantoína (Figura 21B).

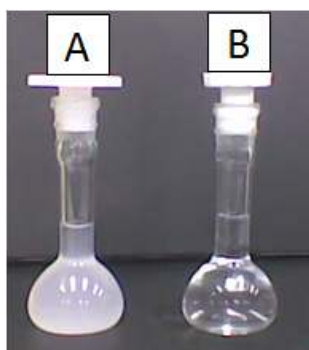


Figura 21: Lipossoma em solução de NaOH 0,01 N aquoso (A) e em solução etanol:água (70:30) de NaOH 0,01 N (B).

### 5.2.2.2 Especificidade

Os resultados das análises dos lipossomas com leitura a 246 nm apresentaram teores de alantoína acima de 100% (122,46%, 126,32%, 124,41%, 137,82%) indicando possível interferência do material lipídico.

Para investigar a especificidade do método foi realizada a varredura entre 190 e 400 nm da solução de alantoína em NaOH alcoólico e da solução contendo os componentes da preparação lipossomal pelo método de hidratação do filme lipídico (Phospholipon<sup>®</sup> 90G+colesterol). Na figura 22 observa-se que as bandas da alantoína e do controle do lipossoma se sobrepõem, impossibilitando a determinação da alantoína em presença dos componentes do lipossoma nas amostras. Não foi encontrado um  $\lambda$  nos espectros em que esses interferentes tivessem absorção desprezível.

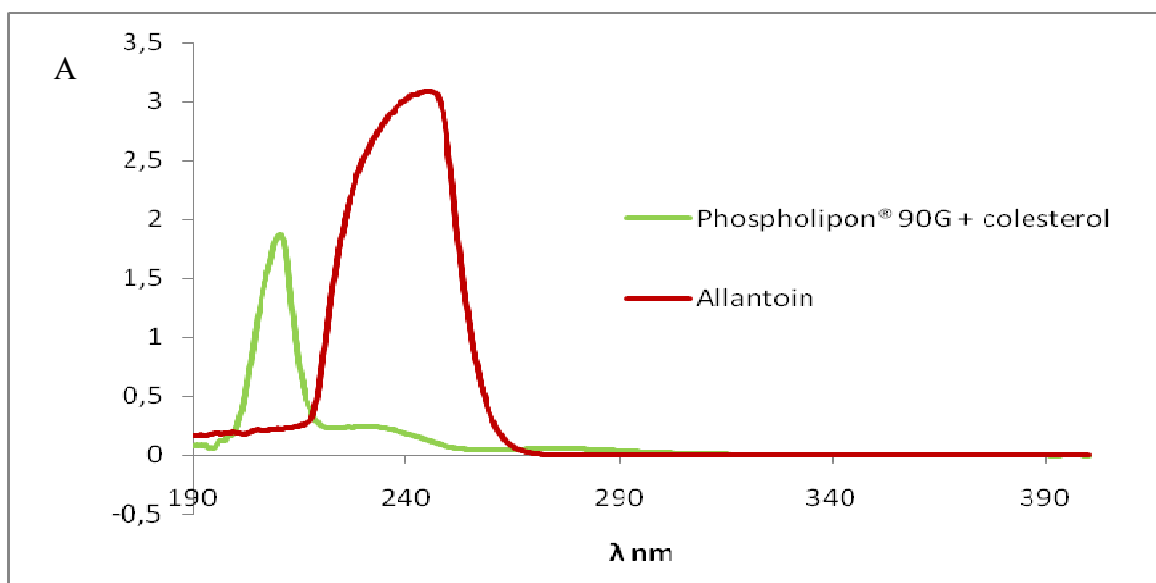


Figura 22: Espectro de absorção da solução de alantoína em NaOH 0,01 N (linha vermelha) e do controle do lipossoma constituído de Phospholipon<sup>®</sup> 90G + colesterol (linha verde).

A espectrofotometria derivada na região do UV-vis. é uma técnica eficiente para determinação simultânea de dois ou mais componentes na mesma amostra, pois melhora a resolução dos espectros com sinais sobrepostos e elimina interferência de outros componentes

presentes na amostra (MARKOVIK *et al.*, 2010; BENAMOR & AGUERSSIF, 2008; RANGNO *et al.*, 2006).

Optou-se, portanto, pela derivação da curva. Na Figura 23, observa-se a 1ª derivada da curva da alantoína e do Phospholipon® 90G, com  $\Delta\lambda$  de 16 nm, faixa de varredura 190 a 400 nm e fator de escala de 10 vezes.

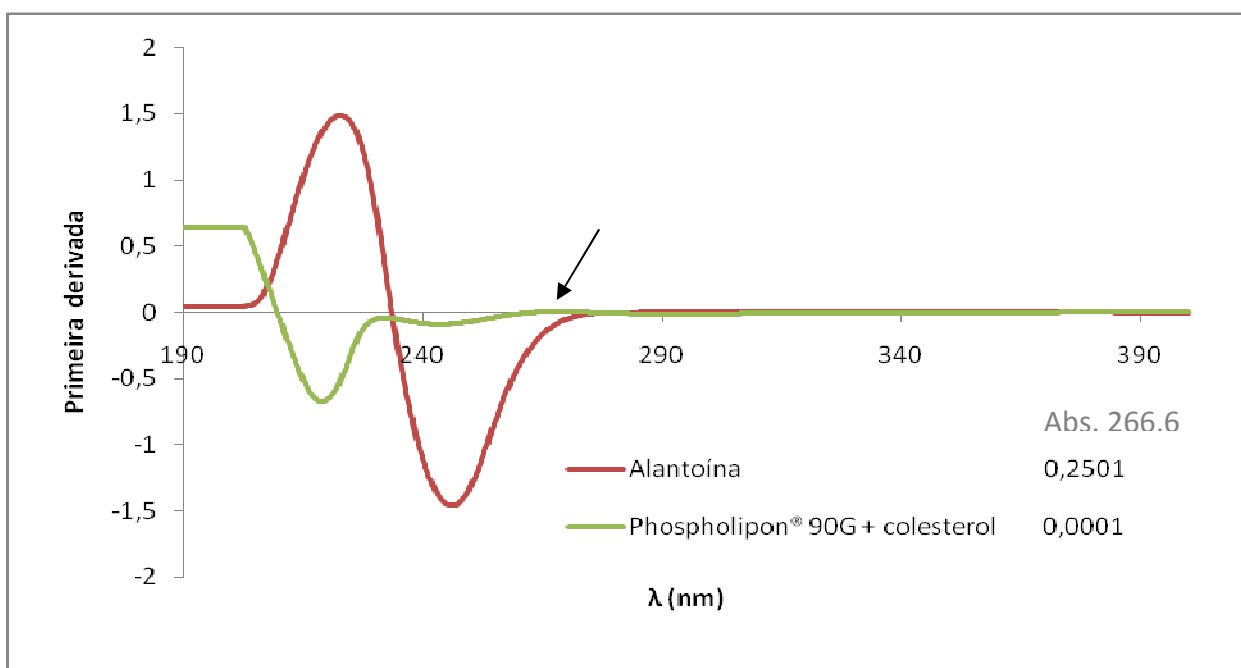


Figura 23: Espectros da alantoína (A) e Phospholipon® 90G + colesterol (B) na primeira derivada com  $\Delta\lambda$  de 16 nm, faixa de varredura 190 a 400 nm e fator de escala de 10 vezes. Especificidade do método para determinação de alantoína em lipossomas preparados pelo método de hidratação do filme lipídico. A seta indica o  $\lambda$  de 263,9 nm onde a alantoína possui leitura de absorvância de 0,2501 e Phospholipon® 90G + colesterol de 0,0001.

O branco do lipossoma não apresentou interferência no comprimento de onda de 263,9 nm. O teor de alantoína inclusa nos lipossomas foi de  $22,3 \pm 1,81\%$  pelo método de hidratação do filme lipídico.

Uma nova técnica de preparação dos lipossomas por agitação mecânica foi testada a fim de obter maior eficiência de inclusão da alantoína. No entanto, a matéria prima utilizada (Phosal® 75SA) apresentou absorvância de 0,0244 no  $\lambda$  263,9 nm, impossibilitando a análise

da alantoína nos novos lipossomas (Figura 24). Assim, foi necessário estabelecer novos parâmetros para que o método pudesse ser aplicado nos lipossomas preparados por hidratação do filme lipídico e por agitação mecânica.

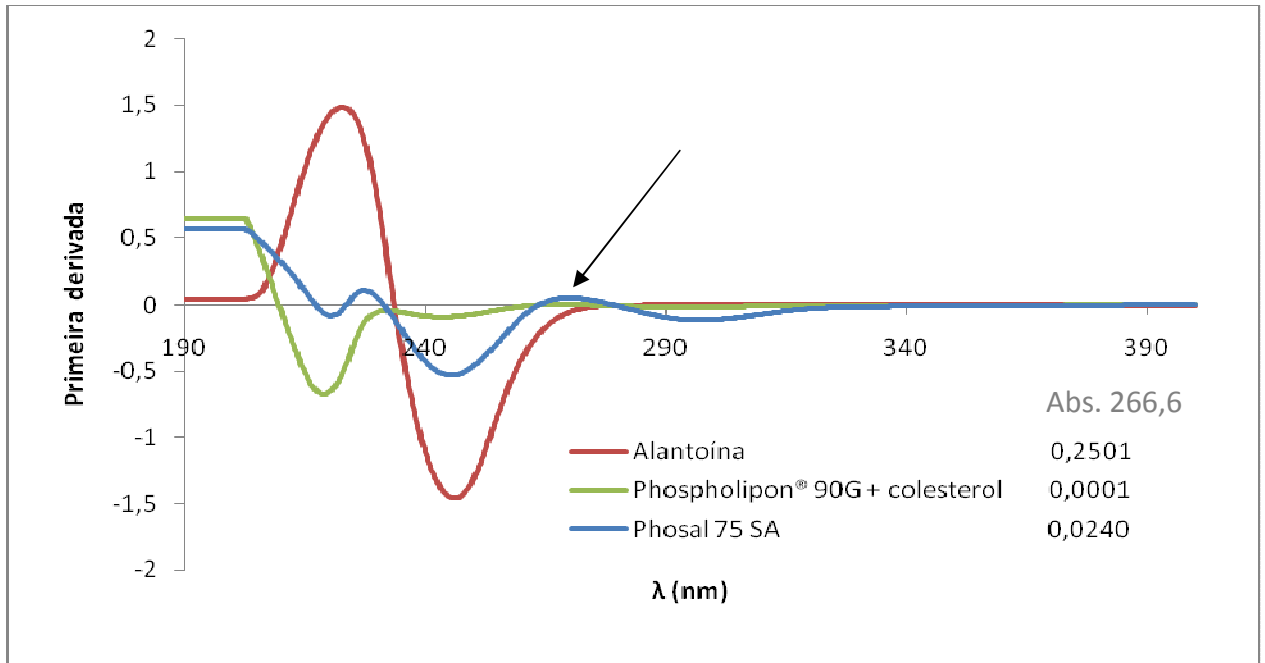


Figura 24: Espectros da alantoína (A) e Phospholipon® 90G + colesterol (B) e Phosal® 75SA (C) na primeira derivada com  $\Delta\lambda$  de 16 nm, faixa de varredura 190 a 400 nm e fator de escala de 10 vezes. Especificidade do método para determinação de alantoína em lipossomas preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e agitação mecânica. A seta indica o  $\lambda$  de 263,9 nm onde o Phosal apresentou interferência com absorvância de 0,024.

Na primeira derivada não foi possível encontrar um  $\lambda$  adequado em que não houvesse interferência dos componentes das formulações. Optou-se pela segunda derivada, onde os  $\lambda$  de 269,2 nm, 267,2 nm e 266,6 nm foram testados com relação à interferência dos componentes dos lipossomas (Phospholipon® 90G + Colesterol e Phosal®) e verificou-se que o  $\lambda$  de 267,2 nm apresentou interferência do Phosal®.

A seguir variou-se o  $\Delta\lambda$  das derivadas e foram construídas as curvas de calibração com os valores de absorvância nos  $\lambda$  de 269,2 e 266,6 nm, conforme ilustrado na Tabela 9.

Tabela 9: Variação dos  $\Delta\lambda$  da 2<sup>o</sup> derivada das curvas para verificar linearidade das absorvâncias nos  $\lambda$  269,2 e 266,6 nm.

<b>2<sup>o</sup> derivada/ FS10/ <math>\Delta\lambda</math> (nm)</b>	<b>269,2 nm</b>	<b>266,6 nm</b>
16	não apresentou linearidade	não apresentou linearidade
8	não apresentou linearidade	apresentou linearidade
4	não apresentou linearidade	não apresentou linearidade

No comprimento de onda 266,6nm e  $\Delta\lambda$  8 nm foi possível obter uma curva linear da absorvância *versus* concentração.

Optou-se então, pela 2<sup>a</sup> derivada com  $\Delta\lambda$  de 8 nm, faixa de varredura 190 a 400 nm, fator de escala de 10 vezes e leitura em 266,6 nm (Figura 25).

Foi realizada a varredura entre 190 e 400 nm da solução amostra e das soluções contendo os componentes da preparação lipossomal (Phospholipon<sup>®</sup> 90G + colesterol e Phosal<sup>®</sup> 75SA). Após derivação da curva observou-se que as leituras das absorvâncias do Phosal<sup>®</sup> 75SA e do Phospholipon<sup>®</sup> 90G em 266,6nm foram desprezíveis.



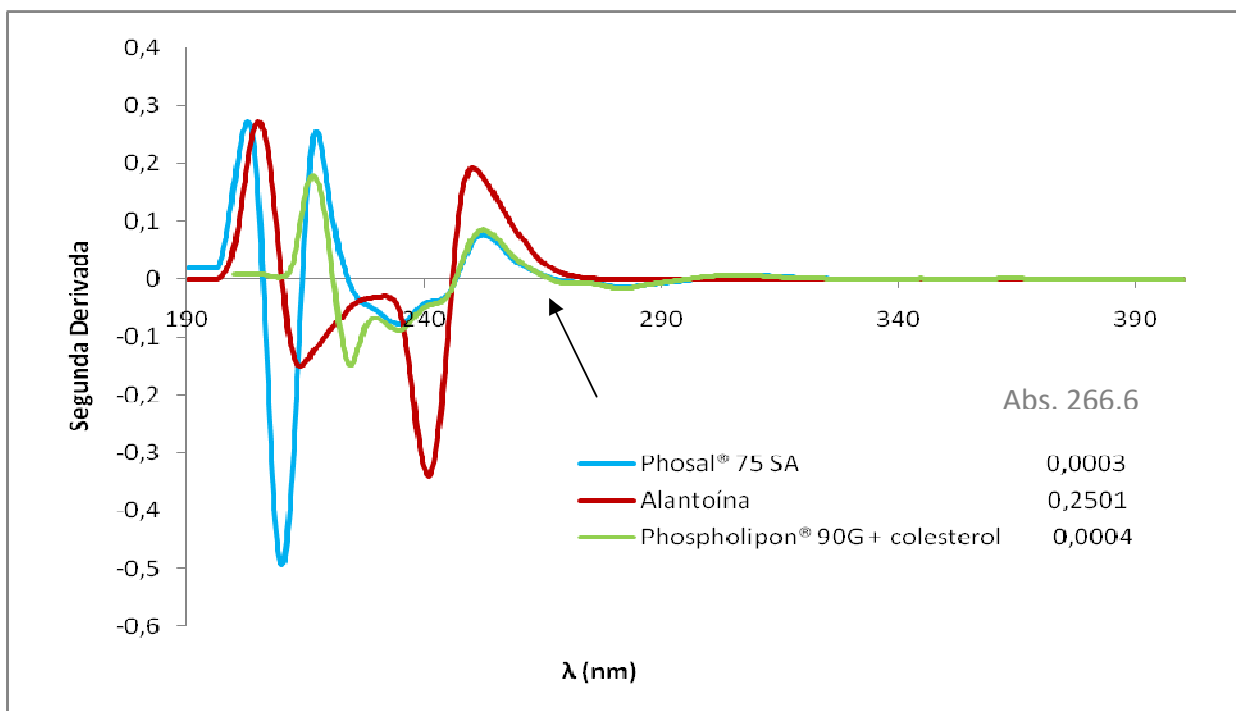


Figura 25: Espectros da alantoína, Phosal<sup>®</sup> 75SA e Phospholipon<sup>®</sup> 90G + colesterol na segunda derivada com  $\Delta\lambda$  de 8 nm, faixa de varredura 190 a 400 nm e fator de escala de 10 vezes. A seta indica o  $\lambda$  de 266,6 nm onde a alantoína possui leitura de absorvância de 0,2501, Phosal<sup>®</sup> 75SA de 0,0003 e Phospholipon<sup>®</sup> 90G + colesterol de 0,0004 (C).

Os parâmetros estabelecidos garantem, portanto, que o método analítico não sofrerá interferências desses componentes se estiverem presentes na amostra.

### 5.2.2.3 Concentração de NaOH do solvente

Foi verificada uma variação nos resultados de teores de alantoína nos lipossomas quando se utilizava alíquotas de volumes diferentes. Optou-se então, por uma solução de NaOH 0,1 N para realização das diluições das amostras. Foram pipetadas alíquotas de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mL da preparação lipossomal e diluídas em 10 mL de solução de NaOH 0,1 N. A curva obtida apresentou boa linearidade, possuindo um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9983 e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9991, eliminando, portanto, as variações ocorridas quando se utilizava solução de NaOH 0,01 N (Figura 26).

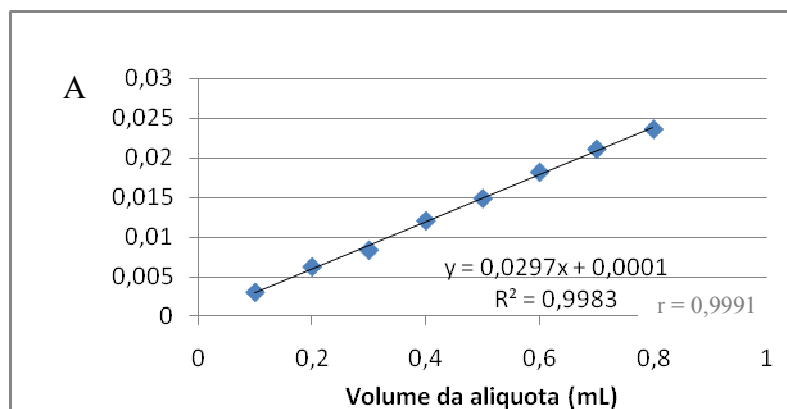


Figura 26: Curva demonstrando a linearidade do método para determinação da alantoína nos lipossomas preparados por agitação mecânica.

Os parâmetros estabelecidos para o método foram: 2° derivada,  $\Delta\lambda$  de 8 nm, faixa de varredura 190 a 400 nm, fator de escala de 10 vezes, leitura em 266,6 nm e solução etanol:água (70:30) de NaOH 0,1 N.

### 5.3 COMPARAÇÃO DO MÉTODO FARMACOPÉICO E ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA

O método desenvolvido foi aplicado na determinação do teor do padrão Sigma<sup>®</sup> de alantoína e comparado com o método titulométrico farmacopéico (USP, 2009). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Comparação dos métodos farmacopéico e espectrofotometria derivada no UV na determinação do teor de alantoína no padrão Sigma<sup>®</sup>.

Teor da alantoína Padrão	
Método Farmacopéico (n=3) (%)	Método espectrofotométrico (n=3) (%)
98,97 ± 0,88	100,32 ± 2,36

O Teste *t* de Student é uma ferramenta estatística que permite comparar dois conjuntos de dados e foi aplicado para avaliar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos (CALLEGARI-JAQUES, 2004). Com 4 graus

de liberdade, o valor de  $t$  tabelado para distribuição bicaudal é 2,78 com nível de significância de 5% ( $p=0,05$ ). O valor de  $t$  encontrado foi de -0,9228, sendo menor que o  $t$  tabelado e, portanto, não há diferença entre as médias. O valor de  $p$  encontrado de 0,4083 é maior que 0,05 e, portanto, os grupos avaliados são iguais.

Observa-se, pela comparação dos resultados de teores de alantoína obtidos pelos dois métodos, que o método desenvolvido no presente trabalho é adequado para determinação da alantoína uma vez que não há diferença estatisticamente significativa entre os teores obtidos pelo método desenvolvido e pelo método farmacopéico.

#### **5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA DETERMINAÇÃO DE ALANTOÍNA COMO MATÉRIA PRIMA E EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS**

O método desenvolvido foi aplicado na determinação do teor de alantoína como matéria-prima e em preparações farmacêuticas para uso tópico, como lipossomas preparados pelos métodos de hidratação do filme lipídico e agitação mecânica e creme. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11: Teores de alantoína obtidos pelo método desenvolvido na matéria-prima e em preparações farmacêuticas contendo alantoína.

	<b>Média (%) *</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>Lipossoma A **</b>	97,15±1,22	1,25
<b>Lipossoma B ***</b>	102,02±1,76	1,73
<b>Creme 1%</b>	99,18±2,17	2,18
<b>Matéria-prima</b>	98,81±1,62	1,64

\*n=6

\*\*lipossoma preparado pelo método de hidratação do filme lipídico

\*\*\*lipossoma preparado pelo método de agitação mecânica

Foi observado que os valores de DPR calculados para cada série de determinações se apresentaram abaixo de 5%, indicando variabilidade intra-dia satisfatória.

## 5.5 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA ALANTOÍNA POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA

O método desenvolvido (item 5.2) foi validado para análise da alantoína matéria-prima, segundo a Resolução 899 (ANVISA, 2003) e o Guia Q2 (R1) (ICH, 2005). O método também foi validado para uma preparação tópica. A preparação selecionada para realização dos testes de validação foi o creme não-iônico, por apresentar maior facilidade de preparação em comparação com os lipossomas, cuja técnica precisa ser aperfeiçoada para melhorar a inclusão da alantoína nas vesículas.

Segundo a RE 899 da ANVISA e o Guia Q2 (R1) do ICH, testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas se enquadram na categoria I e os parâmetros avaliados para validação são: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

### 5.5.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada a partir da realização de varredura entre 190 e 400 nm da solução amostra e da solução contendo as possíveis impurezas da alantoína (ureia e ácido oxálico), com a finalidade de garantir que o método analítico não sofrerá interferências desses componentes se eles estiverem presentes na amostra (Figura 27A).

Foi também realizada a varredura entre 190 e 400 nm das soluções contendo os excipientes semi-sólidos das preparações tópicas (creme não iônico e gel) (Figura 27B) e os componentes da formulação lipossomal de alantoína (Phospholipon<sup>®</sup> + colesterol e Phosal<sup>®</sup>) (Figura 27C).

Observa-se que leituras realizadas no comprimento de onda de 266,6 nm na segunda derivada não sofrerão interferência dos possíveis produtos de degradação da alantoína, nem dos excipientes de formulações tópicas, garantindo que o método analítico poderá ser aplicado posteriormente em produtos acabados para uso tópico.

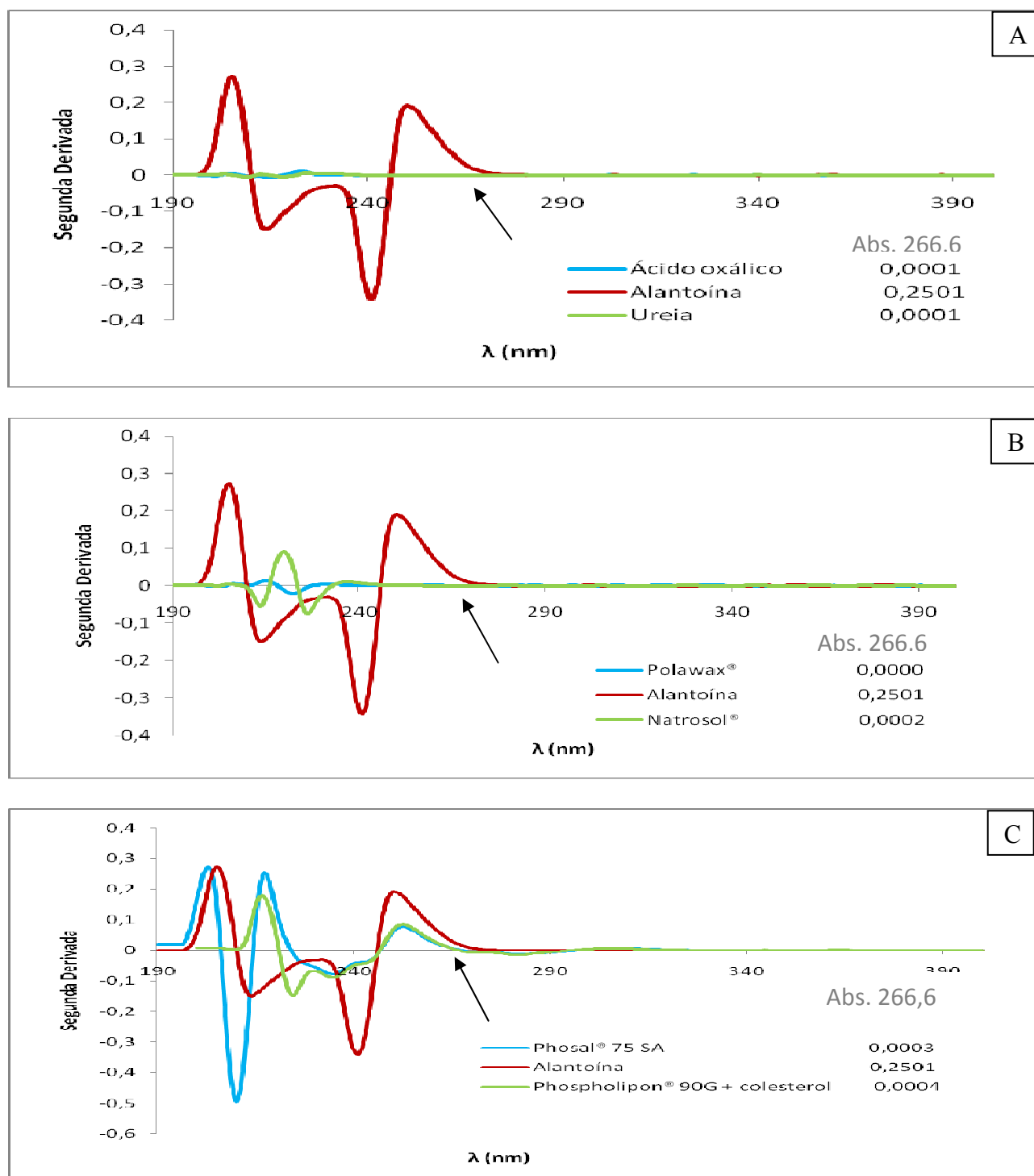


Figura 27: Espectros da alantoína, ureia e ácido oxálico (A) alantoína, natrosol<sup>®</sup> e polawax<sup>®</sup> (B) alantoína, Phosal<sup>®</sup> 75SA e Phospholipon<sup>®</sup> 90G + Colesterol (C) na segunda derivada com  $\Delta\lambda$  de 8 nm, faixa de varredura 190 a 400 nm e fator de escala de 10 vezes. Especificidade do método para determinação de alantoína sem interferências dos produtos de degradação (A), dos excipientes das preparações tópicas (B) e dos componentes dos lipossomas (C). A seta indica o  $\lambda$  de 266,6 nm onde a alantoína possui leitura de absorvância de 0,2501 e uréia e ácido oxálico de 0,0001 (A), natrosol de 0,0002 e polawax<sup>®</sup> de 0,0000 (B), Phosal<sup>®</sup> 75SA de 0,0003 e Phospholipon<sup>®</sup> 90G + colesterol de 0,0004 (C).

## 5.5.2 Linearidade

### 5.5.2.1 Matéria-prima

A linearidade foi determinada pela realização da curva de calibração. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) foi de 0,99 (ANVISA, 2003). Foi construída uma curva-analítica e foi calculada a equação da reta (Figura 28).

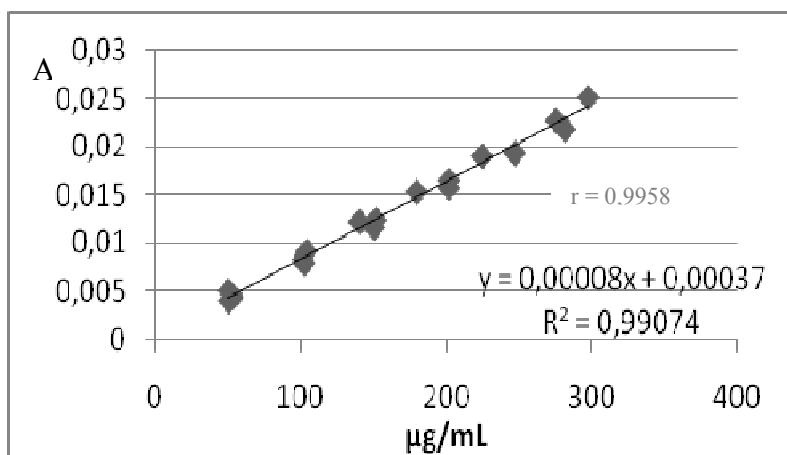


Figura 28: Curva analítica da alantoína demonstrando a linearidade do método para determinação da alantoína.

A curva obtida com soluções de alantoína apresentou linearidade, com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9958 e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,99074, indicando um ajuste de 99,07% entre a proposta e os resultados obtidos (NETO *et al.*, 2002)..

### 5.5.2.2 Creme não iônico de alantoína 1%

A linearidade foi determinada pela realização da curva com diferentes pesadas de creme de alantoína a 1%. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) foi de 0,99 (ANVISA, 2003). Foi construída uma curva-analítica e foi calculada a equação da reta (Figura 29).

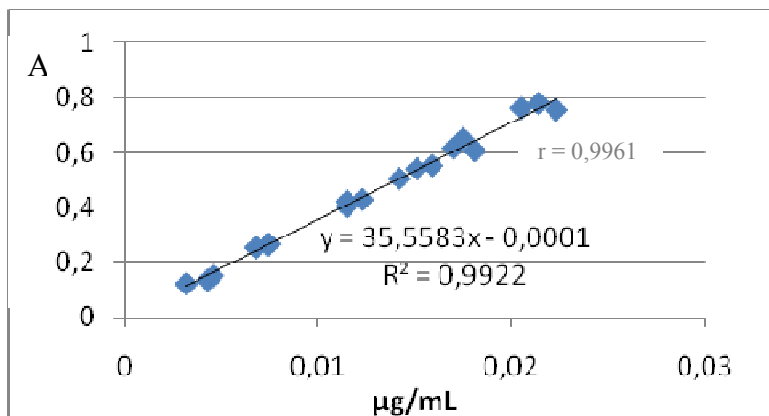


Figura 29: Curva analítica da alantoína demonstrando a linearidade do método para determinação da alantoína em creme não iônico.

A curva obtida com soluções de alantoína apresentou linearidade, com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9961 e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9922, indicando um ajuste de 99,22% entre a proposta e os resultados obtidos (NETO *et al.*, 2002).

### 5.5.3 Precisão

#### 5.5.3.1 Matéria-prima

A precisão do método para determinação da matéria-prima foi avaliada nos níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A mesma análise foi realizada em dias diferentes por diferentes analistas para determinação da precisão intermediária (Tabela 12).



Tabela 12: Resultados de repetibilidade e precisão intermediária do método.

Níveis	Alantoína (%)		Média (%)		Repetibilidade DPR (%)		Precisão intermediária DPR (%)
	dia 1	dia 2	dia 1	dia 2	dia 1 (n=6)	dia 2 (n=6)	
75%	97,5	100,5	96,5±1,7	98,95±1,6	1,7	1,6	2,04
	97,4	97,23					
	94,6	99,12					
100%	97,0	100,67	97,6±0,8	99,99±1,3	0,9	1,3	1,63
	98,6	100,81					
	97,3	98,51					
125%	98,2	101,04	100±3,8	100,21±0,7	3,8	0,7	1,91
	102,6	99,54					
	97,3	100,04					

Valores de DPR menores que 2% são excelentes e valores menores que 5% são aceitáveis (HASWELL, 1992). Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária do método para matéria-prima apresentaram-se abaixo de 5%.

O Teste *t* de Student foi aplicado para avaliar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos no primeiro e segundo dia de análise. Com 4 graus de liberdade, o valor de *t* tabelado para distribuição bicaudal é 2,78 com nível de significância de 5% ( $p=0,05$ ). O valor de *t* encontrado foi de -1,5248, sendo menor que o *t* tabelado e, portanto, não há diferença entre as médias. O valor de *p* encontrado de 0,2020 é maior que 0,05 e, portanto, os grupos avaliados são iguais.

### 5.5.3.2 Creme não iônico de alantoína 1%

Para determinação da precisão do método preparou-se um creme não iônico de alantoína a 1%. A precisão foi avaliada nos níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A mesma análise foi realizada em dias diferentes por diferentes analistas para determinação da precisão intermediária (Tabela 13).

Tabela 13: Resultados de precisão e precisão intermediária do método aplicado em creme de alantoína 1%.

Níveis	Alantoína (%)		Média (%)		Repetibilidade DPR (%)		Precisão intermediária RSD (%)
	dia 1	dia 2	dia 1	dia 2	dia 1 (n=6)	dia 2 (n=6)	
80%	99,66	96,87	99,2	98,05	0,68	1,11	1,02
	99,43	99					
	98,4	98,28					
100%	98,59	98,89	97,8	100,59	1,07	2,12	2,16
	96,61	99,9					
	98,2	102,98					
120%	97,12	95,06	97,5	96,27	1,63	1,71	1,64
	96,06	95,61					
	99,19	98,14					

Valores de DPR menores que 2% são excelentes e valores menores que 5% são aceitáveis (HASWELL, 1992). Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária do método para o creme de alantoína apresentaram-se abaixo de 5%.

O Teste  $t$  de Student foi aplicado para avaliar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos no primeiro e segundo dia de análise. Com 4 graus de liberdade, o valor de  $t$  tabelado para distribuição bicaudal é 2,78 com nível de significância de 5% ( $p=0,05$ ). O valor de  $t$  encontrado foi de -0,1006, sendo menor que o  $t$  tabelado e, portanto, não há diferença entre as médias. O valor de  $p$  encontrado de 0,9247 é maior que 0,05 e, portanto, os grupos avaliados são iguais.

#### 5.5.4 Exatidão

##### 5.5.4.1 Matéria-prima

A exatidão foi avaliada analisando-se alantoína de pureza conhecida (padrão) e os resultados expressos em percentagem de recuperação (Tabela 14).

Tabela 14: Resultados de exatidão do método.

Níveis	Conc.real ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação (%)	Exatidão DPR (%)
75%	148,56	103,21 $\pm$ 1,24	1,2
	146,37		
	146,37		
100%	194,36	100,32 $\pm$ 2,36	2,4
	198,72		
	195,44		
125%	253,25	100,09 $\pm$ 3,39	3,4
	257,60		
	246,70		

Os valores de recuperação do método aplicado à matéria-prima apresentaram-se dentro da faixa de 98 e 102%. Valores de DPR menores que 2% são excelentes e valores menores que 5% são aceitáveis (HASWELL, 1992).

#### 5.5.4.2 Creme não iônico de alantoína a 1%

A exatidão foi avaliada pelo método conhecido como adição do padrão (Tabela 15).

Tabela 15: Resultados de exatidão do método aplicado em creme de alantoína 1%.

Níveis	Conc. Real ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação (%)	Exatidão DPR (%)
80%	82,00	99,52 $\pm$ 1,63	1,6
	79,50		
	80,00		
100%	101,87	100,68 $\pm$ 1,61	1,6
	100,13		
	103,37		
120%	119,25	98,25 $\pm$ 0,26	0,3
	119,50		
	118,87		

Os valores de recuperação do método aplicado ao creme de alantoína apresentaram-se dentro da faixa de 98 e 102%. Valores de DPR menores que 2% são excelentes (HASWELL, 1992).

### 5.5.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada alterando-se a concentração da solução de NaOH para 0,2 N, o pH da solução para 12,8 e o fornecedor do NaOH para VETEC (Tabela 16).

Tabela 16: Resultados da comparação dos teores de alantoína obtidos pelo método após variações no pH, concentração e fornecedor da solução de NaOH.

Teor da alantoína	
Método Espectrofotométrico* (n=3) (%)	Variações de parâmetros** (n=3) (%)
100,32 ± 2,36	98,72 ± 2,29

\*solução de NaOH 0,1N pH 12,8 fornecedor Proquímios

\*\*solução de NaOH 0,2N pH 13,25 fornecedor Vetec

De acordo com o teste  $t$  de *Student* não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos, quando alterou-se o pH, a concentração da solução e a fonte fornecedora do NaOH durante as análises realizadas. Com 4 graus de liberdade, o valor de  $t$  tabelado para distribuição bicaudal é 2,78 com nível de significância de 5% ( $p=0,05$ ). O valor de  $t$  encontrado de 1,2095 é menor que o  $t$  tabelado e, portanto, não há diferença entre as médias. O valor de  $p$  encontrado de 0,2931 é maior que 0,05 e, portanto, os grupos avaliados são iguais, ou seja, as variações dos parâmetros analisados não influenciam a quantificação da alantoína, indicando a robustez do método.

O método espectrofotométrico na segunda derivada com  $\Delta\lambda$  de 8 nm, faixa de varredura 190 a 400 nm e fator de escala de 10 vezes apresentou-se, portanto, robusto, linear,

preciso e exato. O método apresentou-se, ainda, específico para determinação da alantoína em preparações farmacêuticas de uso tópico como creme, gel e lipossoma.

## **5.6 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO**

Para possibilitar a caracterização do método desenvolvido neste trabalho, a solução de alantoína em NaOH 0,1 N, utilizada nas medidas espectrofotométricas, foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrometria no infravermelho (IV) e espectrometria de massas.

### **5.6.1 Análise por CCD**

A técnica de CCD foi utilizada para investigar a presença de produtos de degradação da alantoína na solução de NaOH 0,1 N (STA1) utilizada nas leituras espectrofotométricas.

Na Figura 30 apresenta-se a placa cromatográfica da alantoína onde STA1, STA2, STA3 são aplicações das soluções da matéria-prima solubilizada em NaOH 0,1 N, em água sem aquecimento e em água com leve aquecimento, respectivamente. SRA é a alantoína padrão, SRB é a ureia e SRC uma mistura de alantoína padrão e ureia.

A solução de alantoína em NaOH 0,1 N (STA1) apresentou uma mancha na altura do padrão de alantoína (SRA) e uma segunda mancha abaixo. As soluções aquosas de alantoína (STA2 e STA3) apresentaram manchas apenas na altura da SRA correspondente ao padrão de alantoína. A solução de referência B (SRB) é constituída de ureia, que é um dos produtos de degradação da alantoína. Nenhuma mancha correspondente à impureza pesquisada foi revelada. Observa-se que SRC, constituída de ureia e alantoína padrão, não apresentou a separação adequada na placa cromatográfica.

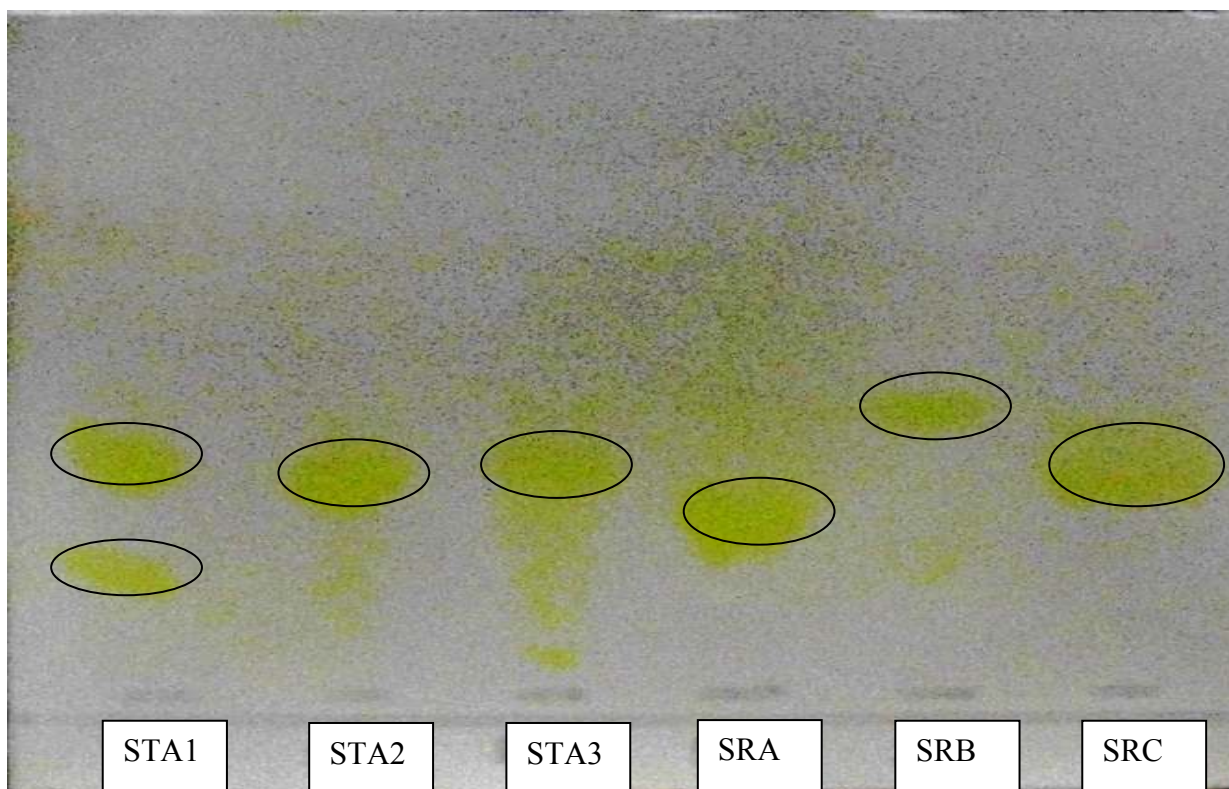


Figura 30: Cromatografia em camada delgada da Alantoína onde STA1, STA2 e STA3 são aplicações das soluções das matérias-primas solubilizadas em NaOH 0,1 N, em água sem aquecimento, e em água com leve aquecimento, respectivamente. SRA: alantoína padrão, SRB: ureia e SRC: mistura de alantoína padrão e ureia.

A ureia pode estar presente na matéria-prima como impureza proveniente do processo de síntese da alantoína. A segunda mancha em STA1, abaixo da mancha correspondente à alantoína na placa de CCD, não corresponde à ureia (SRB).

Observa-se que a segunda mancha não ocorre quando a alantoína é solubilizada em água à temperatura ambiente (STA2) ou com leve aquecimento (STA3). Os resultados indicam que STA1 apresenta composição diferente de STA2 e STA3. Essa diferença é evidenciada pela separação de duas substâncias na placa cromatográfica em STA1. Pode-se propor que a segunda mancha presente na CCD em STA1 seja um produto da reação entre alantoína e o NaOH ou, ainda, uma impureza solúvel em NaOH, presente na matéria-prima.

### 5.6.2 Análise por espectrometria no infravermelho

A mesma solução testada na CCD foi liofilizada e analisada por espectrometria no infravermelho. Os espectros obtidos para a matéria-prima e para a amostra de alantoína tratada por solução de NaOH 0,1 N e liofilizada estão representados na Figura 31.

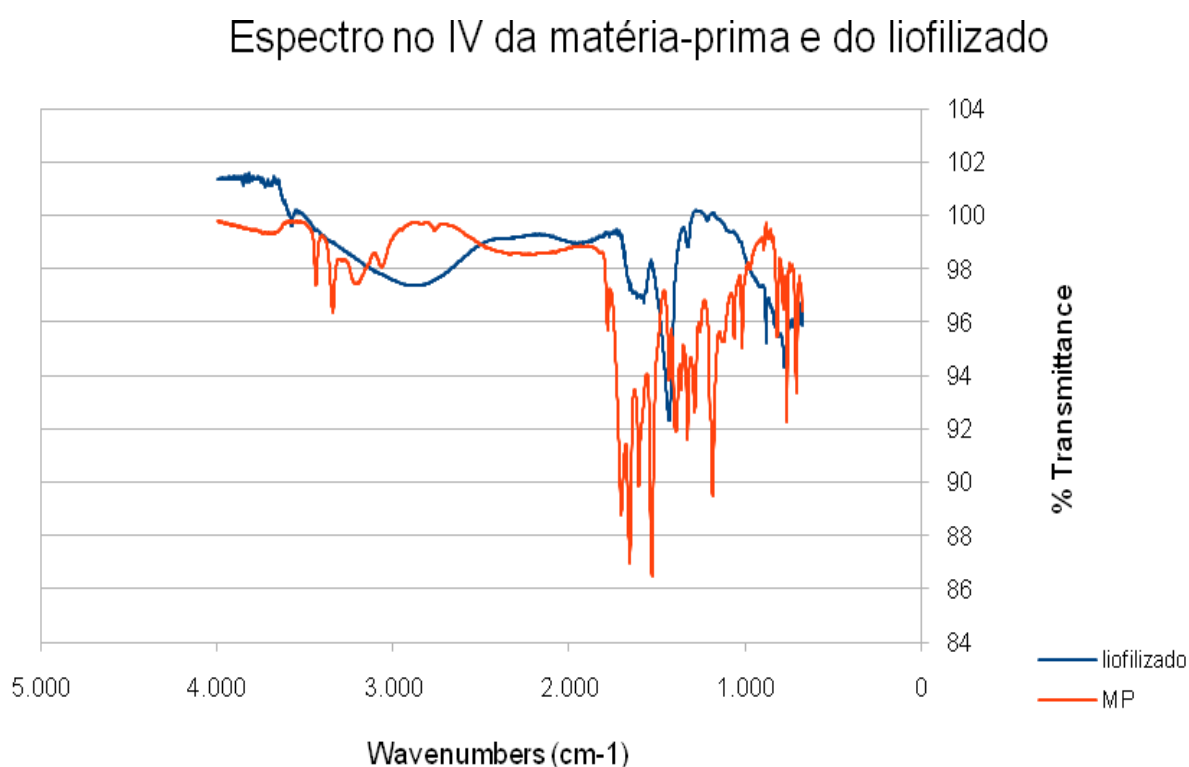


Figura 31: Espectro no infravermelho da matéria-prima lote 70804 (linha vermelha) e da solução de alantoína em NaOH liofilizada (linha azul).

O espectro no infravermelho da amostra de alantoína que havia sido previamente solubilizada em NaOH 0,1 N apresentou-se diferente da matéria-prima. No espectro da alantoína temos bandas das amins primárias em 3439,08; 1184,29 e 817,82  $\text{cm}^{-1}$ , bandas da amida em 3342,64 e C=O da amida secundária em 1715,60 e 1654,92  $\text{cm}^{-1}$ . No espectro da solução de alantoína em NaOH liofilizada, observamos a ausência das bandas das amins primárias em 3439,08 e 1184,29  $\text{cm}^{-1}$ . A identificação exata do composto presente na solução de alantoína em NaOH não é possível, porém mudanças significativas na distribuição dos

máximos de absorção no espectro da matéria-prima e da solução liofilizada de alantoína em NaOH foram observadas.

A região de impressão digital do espectro ( $1200$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) é útil para identificar compostos com base em comparações espectrais. Para verificar a semelhança com algum dos produtos de degradação da alantoína, buscou-se na literatura o espectro dessas substâncias. Na Figura 32 observam-se os espectros no infravermelho do ácido alantóico, da ureia, do ácido oxálico e do ácido glioxílico que são os possíveis produtos de degradação da alantoína.



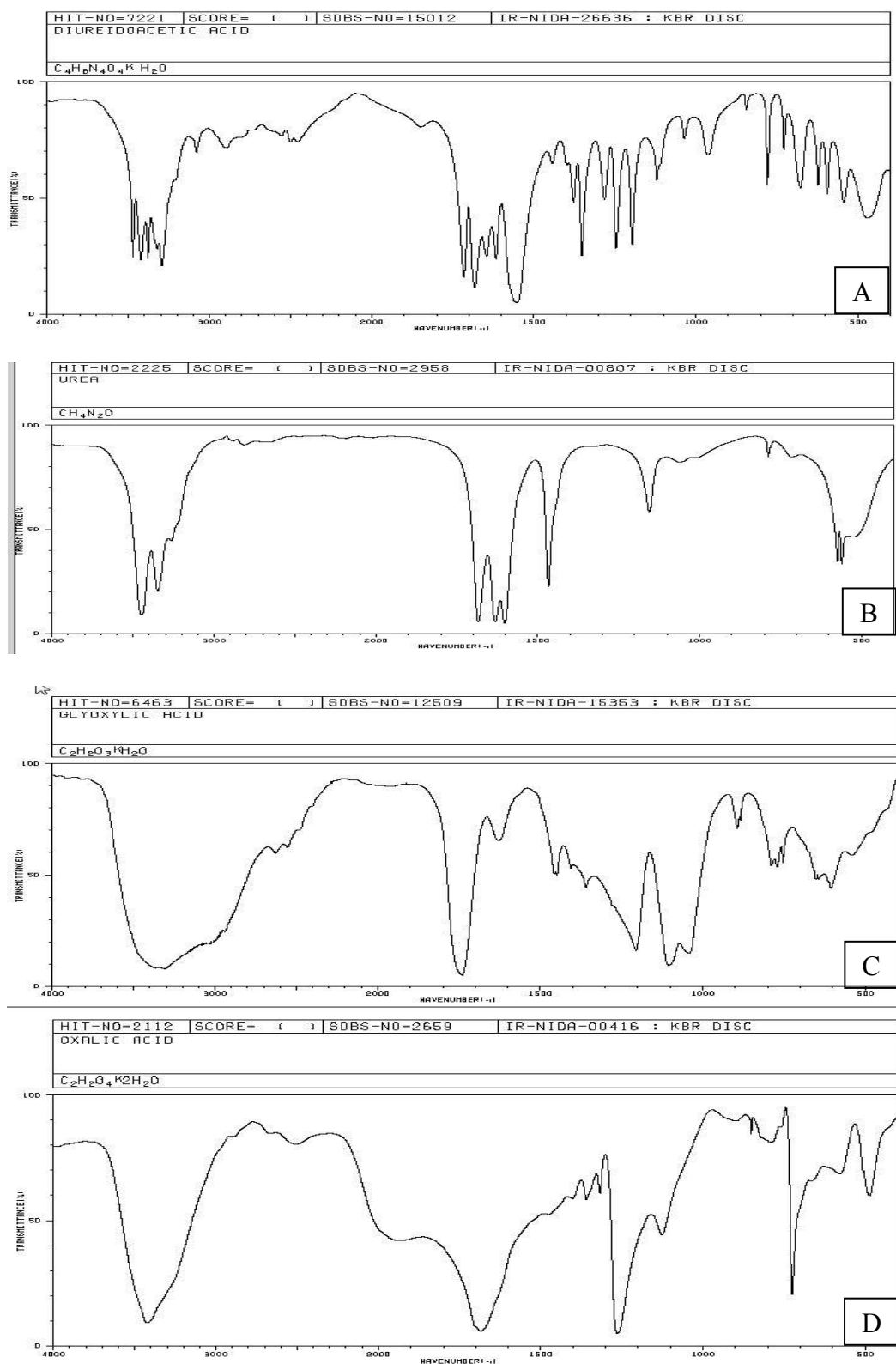


Figura 32: Espectros no infravermelho do ácido alantóico (A), da ureia (B), do ácido glioxílico (C) e do ácido oxálico (D). [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=eng](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng) acessado em 01 de setembro de 2009.

A comparação dos espectros desses produtos de degradação da alantoína com o resultado obtido no presente trabalho, não permite concluir se a mudança ocorrida no espectro se deve à presença desses produtos de degradação.

As técnicas utilizadas (CCD e IV) sugerem a presença de uma substância diferente da alantoína na solução analisada (alantoína em NaOH). Pode-se atribuir a mudança no espectro vibracional da alantoína quando a mesma é solubilizada em NaOH ao surgimento de um produto resultante da reação entre a alantoína e o NaOH. No entanto, é necessário utilizar outra técnica que forneça mais informações sobre a identidade desta substância.

### **5.6.3 Análise por espectrometria de massas**

A técnica é usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas e pode quantificar e elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas. Envolve geração de íons que são depois detectados. Para se obter um espectro de massa, as moléculas no estado gasoso ou as espécies dessorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. Os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre sua massa e sua carga elétrica,  $m/z$  (HARRIS, 2005 & HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009). A técnica foi utilizada, pois pode fornecer informações mais precisas sobre a composição da solução de alantoína em NaOH 0,1 N.

As análises foram realizadas em espectrômetro de massas triplo quadrupolo, modelo Quattro LC, marca Micromass, com fonte de ionização, operado no modo de ionização (eletrospray) negativo e equipado com bomba de infusão KD Scientific que infunde 600  $\mu\text{L}$  da solução a ser analisada por hora. Na técnica de eletrospray negativo, um elétron da molécula é removido e o que se vê no espectro é a massa da molécula menos 1 elétron.

A alantoína foi diluída em água e em solução hidroalcoólica de NaOH 0,1 N na concentração de 1 mg/mL. A partir dessas soluções preparou-se as soluções a 100  $\mu\text{g/ml}$  em

tampão acetato pH 6,9 e foi feita infusão direta no espectrômetro de massas triplo quadrupolo através da bomba de infusão KD Scientific.

Os espectros apresentados relacionam as intensidades relativas dos picos de massa às suas razões massa/carga. Em cada espectro, ao pico maior é atribuído um valor de 100. As alturas dos picos remanescentes são calculadas como porcentagens da altura do pico maior.

Na figura 33A e B observa-se o espectro obtido a partir da infusão direta da solução da alantoína matéria-prima (lote 70804) e alantoína padrão sigma (lote 12808150) em tampão acetato 0,01 molar, pH 6,9.

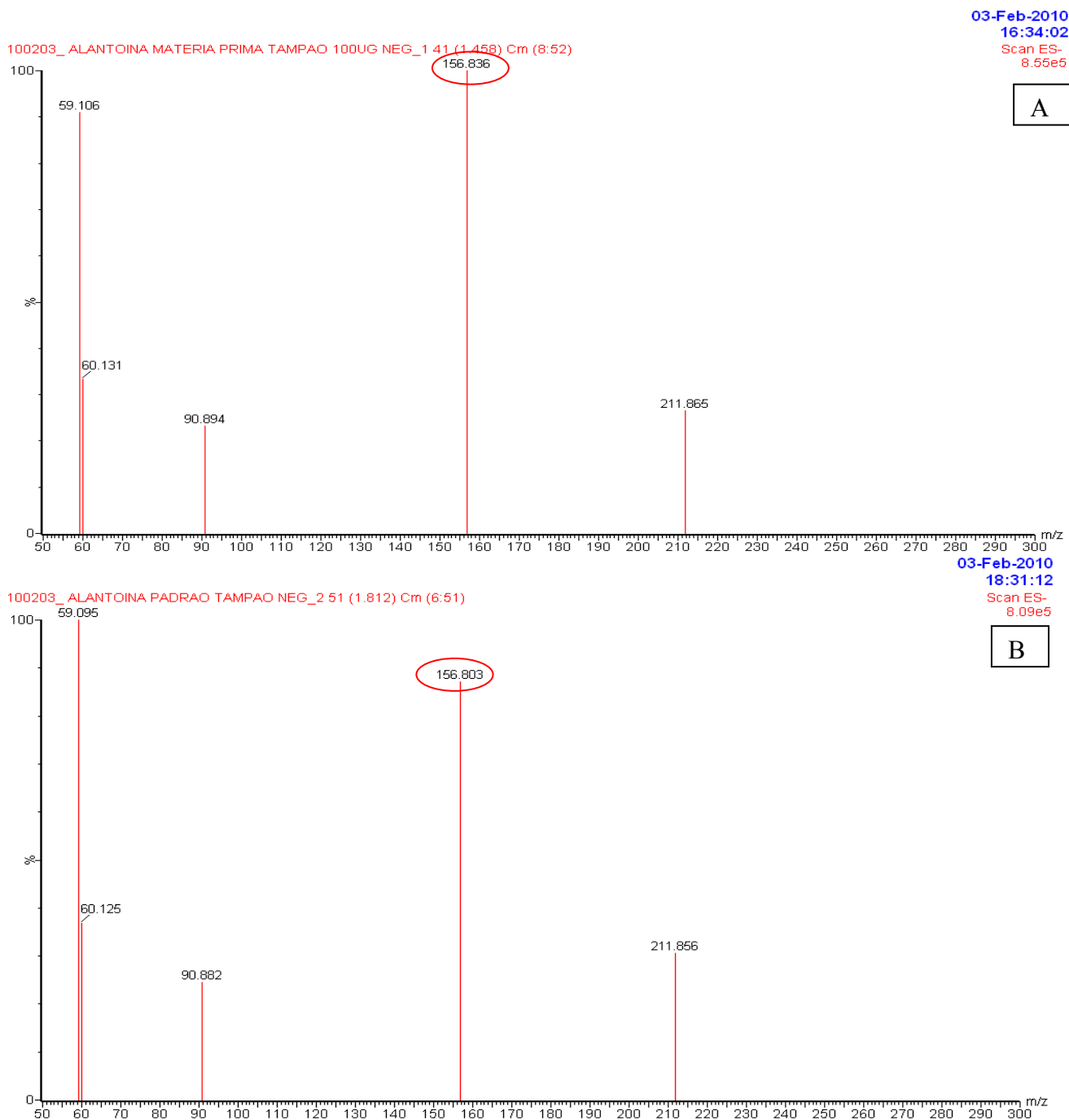


Figura 33: Espectros obtidos das soluções aquosa de alantoina matéria-prima (A) e padrão sigma (B) (1 mg/mL), diluídas no tampão acetato pH 6,9 na concentração de 100 µg/ml.

A alantoina ( $C_4H_6N_4O_3$ ) tem massa 158. Na técnica de eletrospray negativo, um elétron da molécula é removido e o que se vê no espectro é a massa da molécula (158) menos 1 elétron (157). Nos espectros obtidos no presente trabalho, a alantoina matéria-prima e padrão Sigma<sup>®</sup> aparecem como 156,838 e 156,803, respectivamente. Observa-se um

deslocamento das massas, tanto no padrão de alantoína como na matéria-prima. Esse padrão de deslocamento se repete em todos os experimentos realizados no presente trabalho, não comprometendo a interpretação dos resultados. A comparação dos espectros da matéria-prima e do padrão confirma a identidade do composto e a adequação da técnica para visualização da molécula analisada.

Além da massa correspondente à alantoína, foram verificadas as massas 59,1; 60,1; 90,8 e 211,8 no espectro. A infusão direta do tampão acetato demonstrou que essas massas já estavam presentes na solução tampão utilizada (Figura 34).

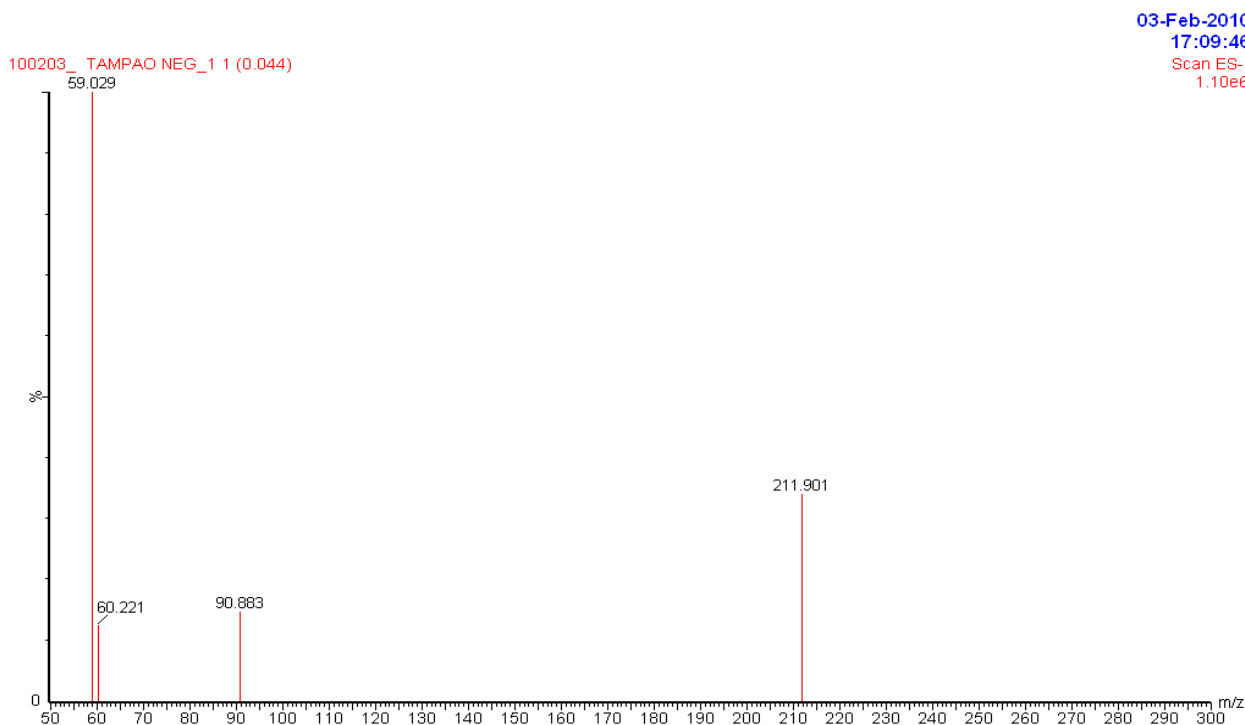


Figura 34: Espectro obtido pela infusão direta da solução tampão acetato.

Após identificação da alantoína no espectro da matéria-prima e do padrão, a técnica foi utilizada para obter informações sobre a composição da solução de alantoína em NaOH 0,1 N. Os espectros obtidos com a alantoína dissolvida em água (1 mg/mL) e em solução de NaOH 0,1 N (1 mg/mL), diluídas em solução tampão acetato pH 6,9 (100 µg/mL) foram comparados (Figuras 35A e B).

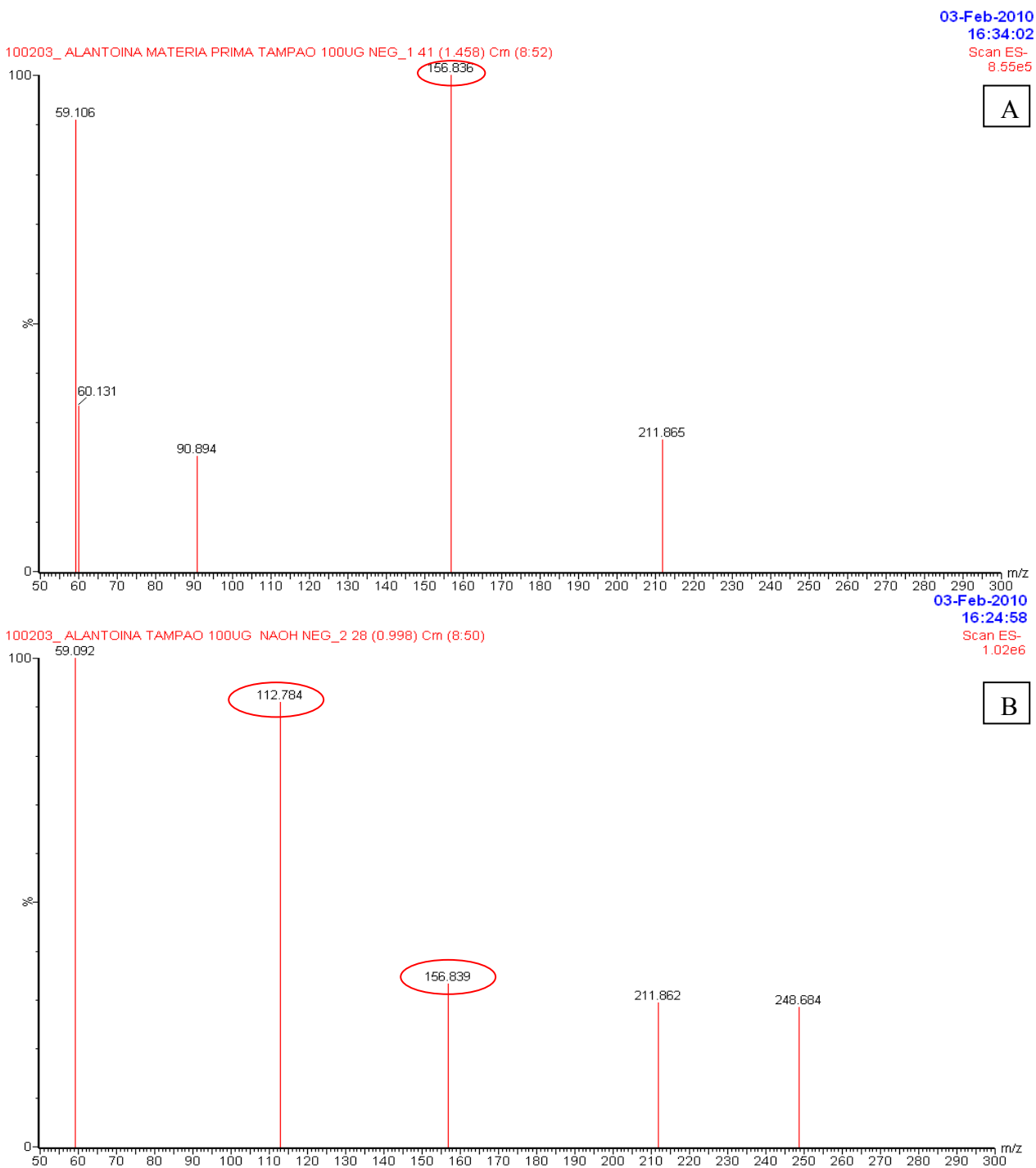


Figura 35: Espectros das soluções da matéria-prima em água (1 mg/mL) (A) e em NaOH (1 mg/mL) (B), diluídas em tampão acetato na concentração de 100 µg/mL.

O espectro da alantoina dissolvida em água apresentou massa mais abundante correspondente à alantoina, que foi identificada pela sua massa menos 1 elétron (156,838) (Figura 35A). O espectro obtido da alantoina dissolvida em solução de NaOH 0,1 N

apresentou massa mais abundante correspondente a 112,786 e a massa correspondente à alantoína (156,838) aparece menos abundante em relação ao novo composto presente (Figura 35B).

As massas presentes no espectro não correspondem à massa dos conhecidos produtos de degradação da alantoína, que seriam identificados pela massa de cada produto menos 1 elétron (Tabela 17).

Tabela 17: Massa da alantoína e de seus produtos de degradação.

	<b>Massa da molécula</b>	<b>Massa que seria vista no espectro</b>
<b>Alantoína</b>	158,1	157
<b>Ácido alantóico</b>	176,1	175
<b>Ácido oxálico</b>	90	89
<b>Ácido glioxílico</b>	74	73
<b>Ureia</b>	60,07	59

Foi realizada a infusão direta no espectrômetro de massas das soluções contendo alguns dos prováveis produtos de degradação da alantoína. Os produtos disponíveis para análise foram a ureia e o ácido oxálico (Figuras 36 e 37).

100203\_ UREIA TAMPAO 100UG NEG\_1 36 (1.281) Cm (7:50)

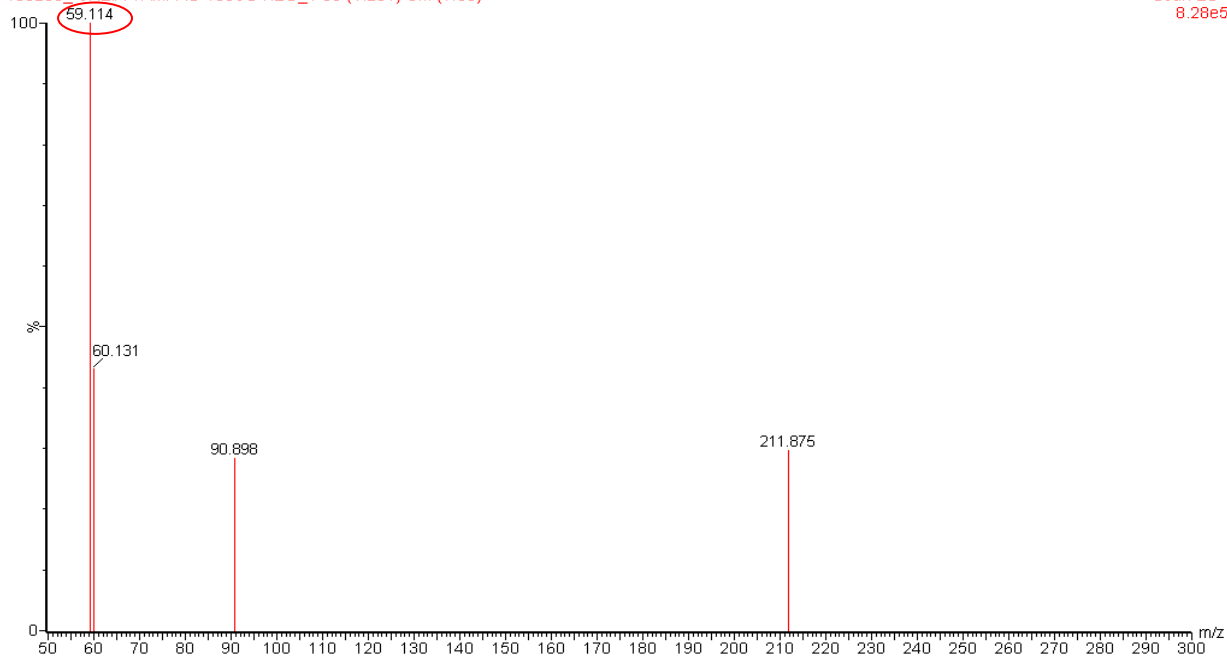


Figura 36: Espectro obtido pela infusão direta de solução aquosa de ureia (1 mg/mL) diluída em tampão acetato pH 6,9 na concentração de 100 µg/mL.

100203\_ ACIDO OXALICO TAMPAO 100UG NEG\_1 51 (1.812) Cm (8:53)

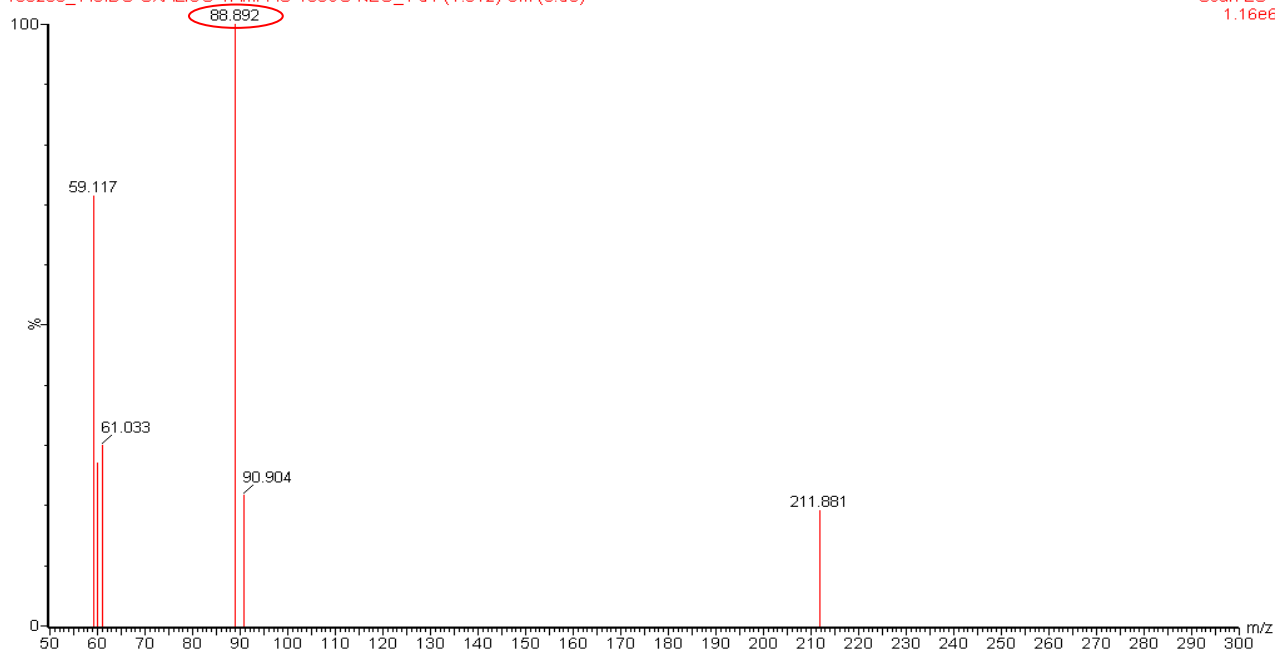


Figura 37: Espectro obtido pela infusão direta de solução aquosa de ácido oxálico (1 mg/mL) diluída em tampão acetato na concentração de 100 µg/mL.

As massas presentes nos espectros da ureia e do ácido oxálico correspondem a suas respectivas massas menos 1 elétron (59,1 e 88,89) (Tabela 17). A massa correspondente à



ureia aparece no espectro da alantoína (em água e em NaOH) porém, como discutido anteriormente, a massa 59,1 corresponde ao tampão acetato utilizado na análise. Além disso, nenhuma mancha correspondente à uréia foi verificada na placa de CCD, como demonstrado na figura 31. A massa correspondente ao ácido oxálico (88,89) não foi observada nos espectros da alantoína.

Observa-se na Figura 35B que o pico mais abundante no espectro corresponde a um composto de massa 114 que é visto no espectro como massa 113 (112,786). A solubilização da alantoína em NaOH poderia favorecer a fragmentação da alantoína no espectrômetro de massas resultando em composto de massa 112,8. Os resultados obtidos na CCD sugerem, porém, que a composição da solução de alantoína em NaOH é diferente da solução de alantoína em água. Portanto, há presença de um produto resultante da reação entre a alantoína e o NaOH na solução, antes da infusão da mesma no espectrômetro de massas.

Pode-se propor que a massa vista no espectro corresponda ao ácido parabânico, proveniente da quebra oxidativa da alantoína em solução de NaOH. A alantoína e o ácido parabânico são produtos da oxidação do ácido úrico (HICKS, 1993). A decomposição oxidativa do urato leva à formação inicialmente da alantoína e prossegue gerando o ácido alantoínico, ácido cianúrico, ácido parabânico, ácido oxálico e ácido glioxílico (BARREIROS & DAVID, 2006).

Nesse contexto, pode-se propor a quebra oxidativa da alantoína em solução de NaOH, gerando o ácido parabânico ( $C_3H_2N_2O_3$ ) de massa 112,8, conforme esquema a seguir (Figura 38).

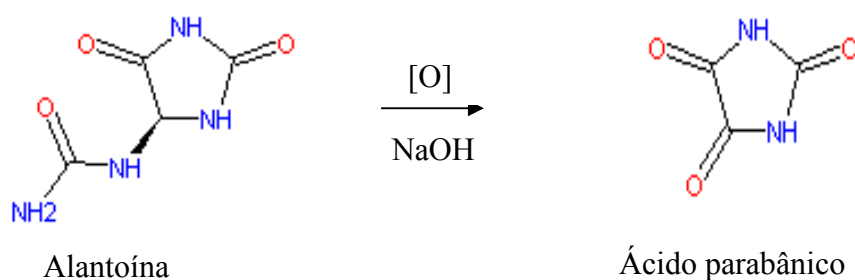


Figura 38: Representação da quebra oxidativa da alantoína em solução de NaOH gerando ácido parabânico (composto de massa 112,8).

O resultado obtido pela análise no IV da solução de alantoína em NaOH liofilizada, corrobora a hipótese da presença do ácido parabânico na mesma. A ausência das bandas correspondentes à amina primária em 3439,08 e 1184,29  $\text{cm}^{-1}$  ocorre devido à mudança na estrutura da alantoína, que em solução de NaOH, gerou o ácido parabânico.

A técnica utilizada no presente trabalho não seguiu uma metodologia padronizada e os parâmetros do método foram estabelecidos durante a análise. Para verificar a pertinência dos parâmetros estabelecidos e confirmar que a massa vista no espectro (156,8) corresponde, de fato, à alantoína, foi realizada uma análise por MS-MS seguindo a metodologia padronizada por Berthemey e cols. (1999).

No trabalho de Berthemey e cols. (1999) a análise foi realizada por monitoração de reação simples. O íon pai, correspondente à alantoína, foi admitido no primeiro quadrupolo e o íon filho (114) foi monitorado após colisão.

Na figura 39A observa-se o espectro obtido pelos pesquisadores, onde 157 corresponde à massa da alantoína. Os íons filhos foram identificados no espectro como massas 114,1; 97,3; 71,1; 139,9 conforme a figura 39B (BERTHEMEY *et al.*, 1999).

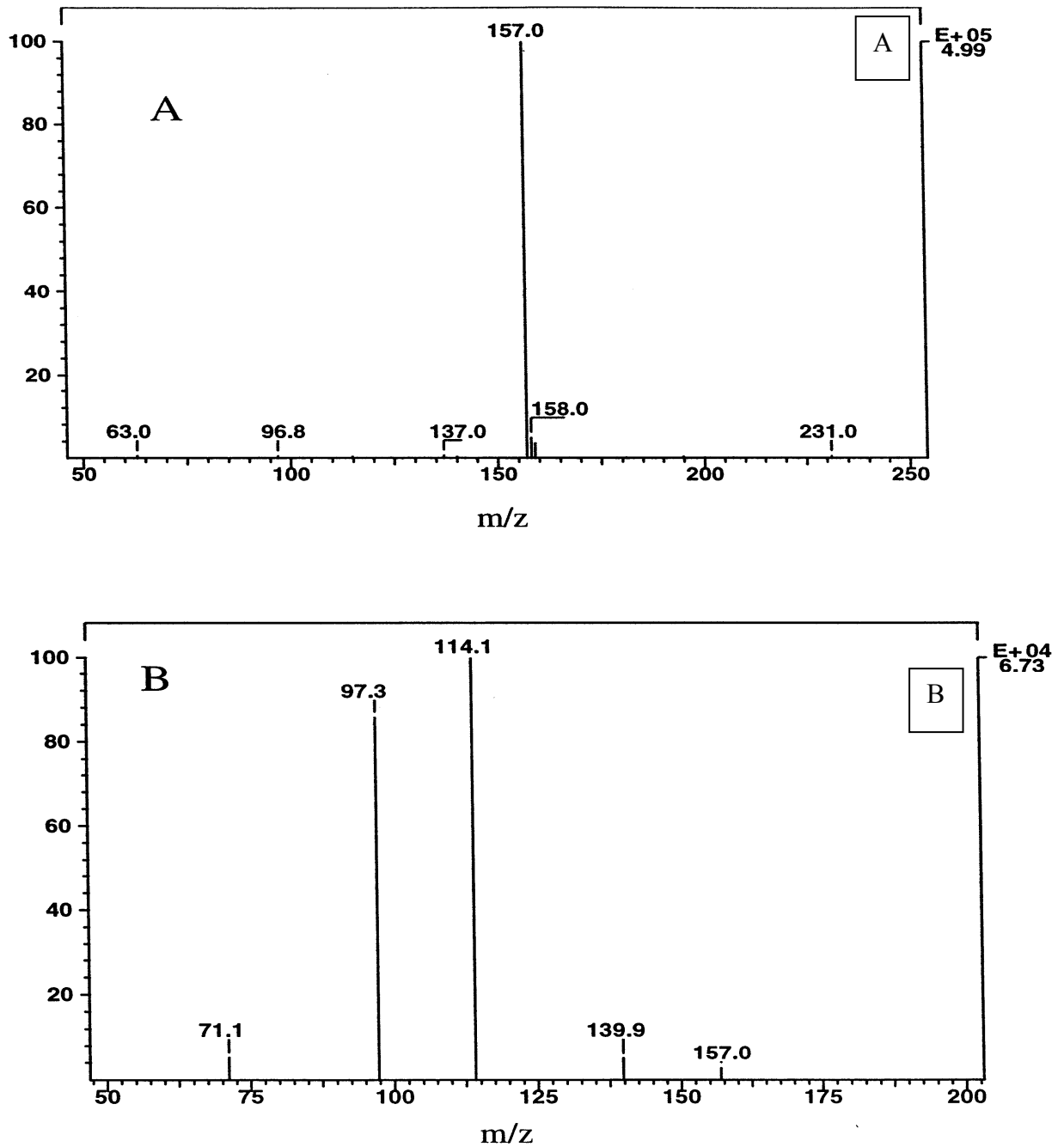


Figura 39: Alantoína m/z 157 (A) e íons filhos m/z 114,1; 97,3; 71,1; 139,9 (B) (BERTHEMY *et al.*, 1999).

No presente trabalho, utilizou-se o método “*daughter scan*”, em que foi aplicada uma energia de colisão para quebrar a molécula de alantoína e possibilitar a visualização dos seus íons filhos no espectro, confirmando a identidade da matéria-prima utilizada nas análises por espectrometria de massas. Na figura 40 observam-se os íons filhos da alantoína: 113,6; 96,67; 139,6 e 70,8.

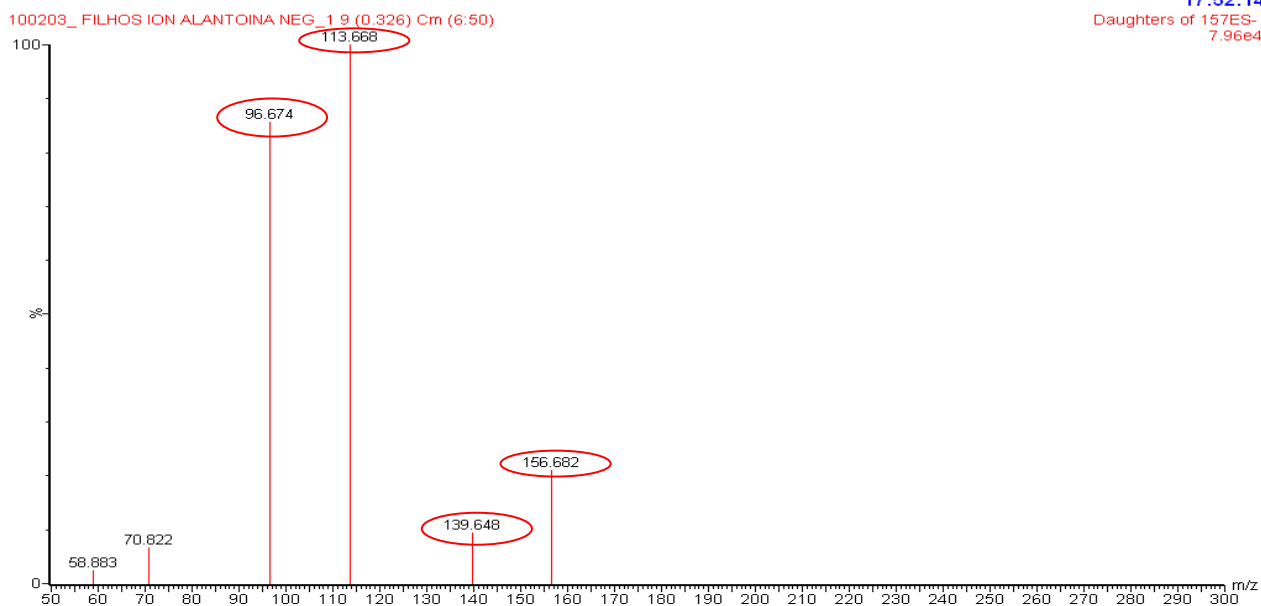


Figura 40: Espectro obtido dos íons filhos da alantoína após a colisão da molécula de alantoína por MS-MS.

Os resultados confirmaram que a massa vista no espectro corresponde, de fato, à alantoína. Após quebra, a alantoína gerou os mesmos íons filhos demonstrados no trabalho de Berthemly e cols (1999). Os parâmetros estabelecidos no presente trabalho estão, portanto, adequados para a análise da alantoína por espectrometria de massas.

#### 5.6.4 Hidrólise alcalina da alantoína

Segundo Young e Conway (1942), a alantoína pode ser completamente convertida a ácido alantóico em 6 minutos quando aquecida a 100 °C em solução alcalina de pH 12.

A matéria-prima foi, então, solubilizada em uma solução mais concentrada de NaOH (0,5 M) e sua hidrólise alcalina foi forçada utilizando altas temperaturas (de 100 a 150 °C), sob refluxo durante 4 horas. Foram coletadas amostras nos tempos de 2 e 4 horas, que foram analisadas por CCD e espectrometria de massas.

### 5.6.4.1 CCD

Na placa cromatográfica (Figura 41) STA1 e STA2 correspondem a aplicação das soluções de alantoína em água e em NaOH 0,1 N, respectivamente. As aplicações seguintes são das amostras coletadas da hidrólise da alantoína nos tempos 2 e 4 horas.

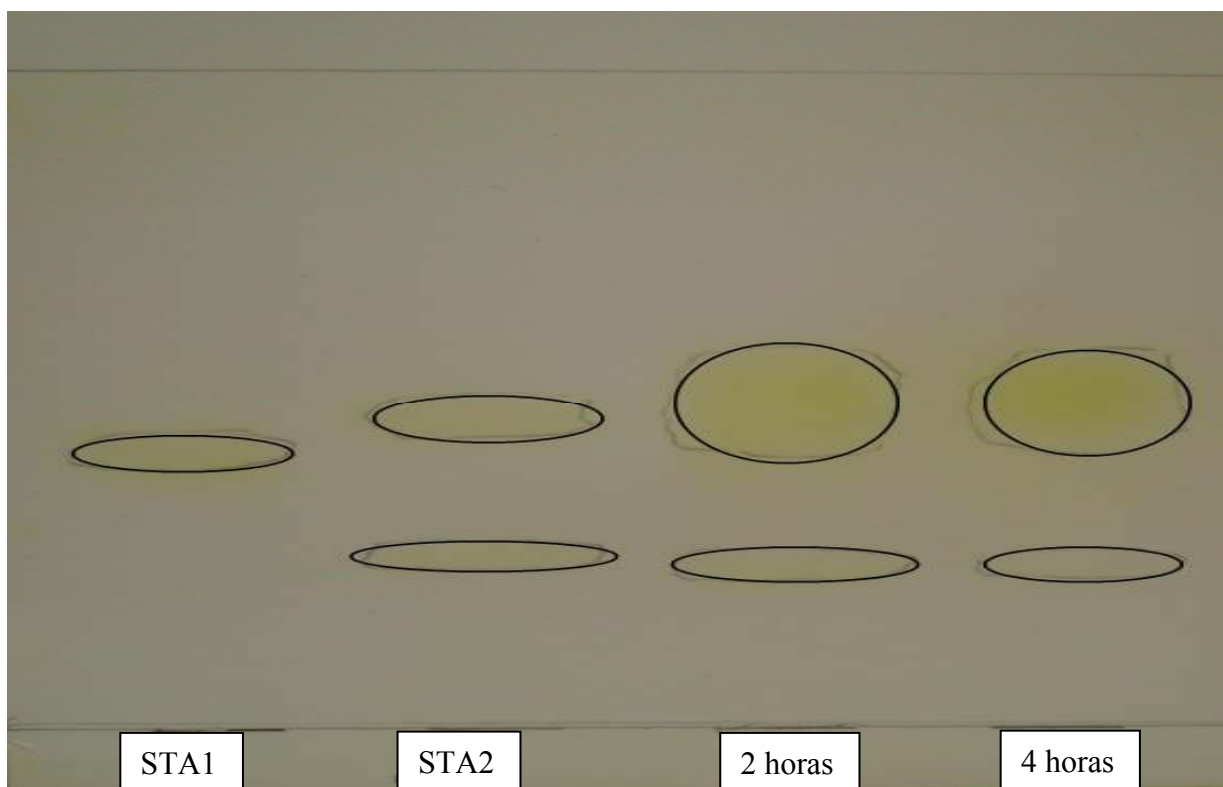


Figura 41: Cromatografia em camada delgada da alantoína em que STA1, STA2 são aplicações das soluções das matérias-primas em água e em NaOH 0,1 N. As aplicações seguintes são da alantoína hidrolisada durante 2 e 4 horas.

Observa-se na Figura 42, que a presença da segunda mancha na placa cromatográfica (STA2) também ocorre nas amostras coletadas do refluxo nos tempos de 2 e 4 horas. Assim como observado no experimento da Figura 30, a segunda mancha não ocorre quando a alantoína é solubilizada em água (STA1).

A substância presente na solução de alantoína em NaOH 0,1 N, observada pela segunda mancha na placa de CCD, corresponde com a substância gerada na hidrólise artificial da alantoína.

### 5.6.4.2 Espectrometria de massas

Na figura 42 observa-se a massa 112,793 no espectro de massas da amostra coletada após 2 horas de hidrólise. O espectro da amostra de 4 horas (Figura 43) apresentou a mesma massa (112,739).



Figura 42: Espectro das amostras de alantoina hidrolisadas após 2 horas e diluídas em tampão acetato na concentração de 100 µg/mL.



Figura 43: Espectro das amostras de alantoina hidrolisadas após 4 horas e diluídas em tampão acetato na concentração de 100 µg/mL.

O pico mais abundante no espectro corresponde a um composto de massa 114 que é visto no espectro como massa 113 (112,787). A mesma massa se apresenta no espectro da solução de alantoína em NaOH observada nos resultados anteriores (Figura 35B).

A massa de 112,8, presente nos espectros, não corresponde com a massa do ácido alantóico que, segundo Young e Conway, é o produto da hidrólise alcalina da mesma. Pode-se propor que a massa vista no espectro corresponda ao ácido parabânico, proveniente da quebra oxidativa da alantoína em solução de NaOH, como discutido anteriormente.

Os resultados das análises por CCD e espectrometria de massas indicam que o produto gerado na solução usada nas medidas espectrofotométricas do método desenvolvido neste trabalho corresponde ao produto gerado na hidrólise artificial da mesma.

#### **5.6.5 Absorbância *versus* tempo**

A mudança nas medidas de absorbância da solução durante a reação entre a alantoína e o NaOH foi acompanhada no espectrofotômetro. A absorbância da solução foi monitorada por um período de 60 minutos.

A solução de alantoína solubilizada em NaOH 0,1 N foi analisada no espectrofotômetro no modo *Time Course* para monitorar as absorbâncias da mesma ao longo de 1 hora (Figura 44).

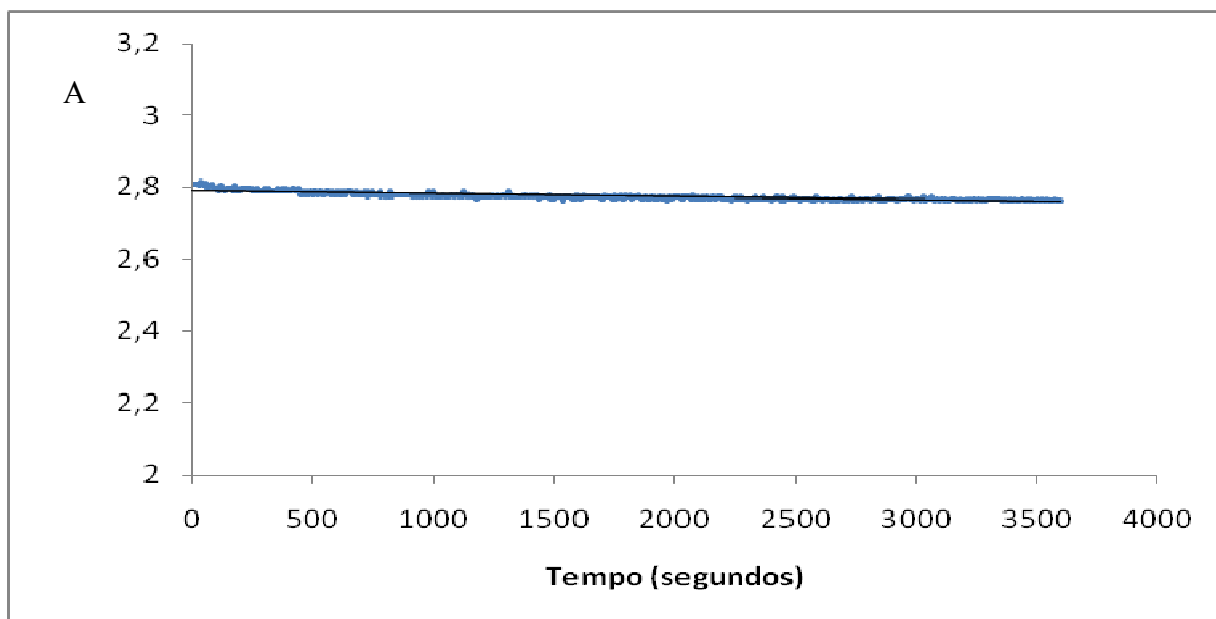


Figura 44: Acompanhamento da absorvância da solução de alantoína em NaOH 0,1 N ao longo de 1 hora (3600 segundos).

O teor calculado da solução analisada no tempo zero foi de 100% e no tempo de 60 minutos de 98,4%, representando uma queda de 1,6% no teor de alantoína na solução analisada após 1 hora que pode ter ocorrido devido à degradação do cromóforo. As análises realizadas no presente trabalho levavam em média de 5 a 10 minutos.

### 5.7 IMPORTÂNCIA DO MÉTODO DESENVOLVIDO

O método analítico desenvolvido, utilizando espectrofotometria derivada, elimina a necessidade da preparação prévia das amostras de produtos dermatológicos contendo alantoína, tornando a análise simples, rápida e facilmente executável no laboratório de controle de qualidade de indústrias de pequeno porte e farmácias com manipulação.

O Brasil já é o maior mercado mundial de farmácias com manipulação. De acordo com dados da Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais (ANFARMAG), existem mais de 7 mil farmácias magistrais no país, correspondendo a um crescimento de 40% sobre



2002. O faturamento do segmento é da ordem de R\$ 1,3 bilhão por ano, o que representa 9% do mercado de medicamentos (LANDI, 2010).

A expansão do setor magistral levou a uma heterogeneidade muito grande entre os estabelecimentos. A tradicional farmácia magistral executa fórmulas individualizadas, porém alguns desses estabelecimentos podem ser considerados indústrias de médio porte. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz, constata com frequência, erros importantes em produtos manipulados. Laudos da instituição mostram resultados em que as concentrações encontradas nos produtos manipulados chegam a mais de 30.000% da dose prescrita (<http://www.anvisa.gov.br/divulga/artigos/subsidios.pdf>).

A qualidade do produto manipulado tem sido objeto de inúmeras discussões e debates, sendo o tema mais frequente nos últimos anos, em função das novas regulamentações que buscam a padronização dos processos e rotinas da manipulação magistral. O controle de qualidade é ferramenta indispensável para garantir um produto final com qualidade e que possa ser reproduzido com os mesmos parâmetros de qualidade (FERREIRA, 2002).

Assim, o desenvolvimento de um método analítico que possa ser adaptado à rotina de análises de controle de qualidade é de grande valia especialmente para o setor magistral.

### **5.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FOSFOLIPÍDIO Phospholipon 90 G<sup>®</sup>**

O teor da matéria-prima utilizada na fabricação do lipossoma foi determinado indiretamente avaliando-se o conteúdo de fósforo (P) pelo método de Bartlett (BARTLETT, 1959). Foi realizada a construção de uma curva-analítica de fósforo e um branco sempre que o método foi realizado, devido aos estágios críticos de aquecimento e aos contaminantes nos reagentes.

As amostras de Phospholipon<sup>®</sup> 90G foram diluídas, baseando-se na massa inicial de fosfolípido presente, para obter as soluções finais com concentração de aproximadamente 2 µg de fósforo/mL, ponto central da curva-analítica obtida. O resultado de teor do Phospholipon<sup>®</sup> 90G é apresentado na Tabela 18. A matéria-prima apresentou teor dentro da especificação presente no laudo do fornecedor.

Tabela 18: Teor da matéria-prima utilizada para preparação do lipossoma.

<b>Teor do Phospholipon 90G<sup>®</sup> lote 228154</b>	
<b>Análise (n=3)</b>	<b>Laudo do fornecedor</b>
<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
99,92 ± 6,94	97,7

## 5.9 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Várias metodologias são descritas na literatura para o preparo de lipossomas. O método de hidratação do filme lipídico já foi relatado em estudos anteriores com filtros solares (GARCIA, 1998), e foi capaz de garantir uma melhor incorporação de substâncias sólidas lipofílicas quando comparado com o método de agitação mecânica (HENRIQUES, SANTOS & GARCIA, 2005). A alantoína é uma substância sólida, pouco solúvel em água, muito pouco solúvel em álcool e praticamente insolúvel em solventes orgânicos. Desta forma, os dois métodos foram testados para avaliar a incorporação da alantoína.

### 5.9.1 ANÁLISE DOS LIPOSSOMAS CONTENDO ALANTOÍNA PREPARADOS PELO MÉTODO DE HIDRATAÇÃO DO FILME LIPÍDICO

O lipossoma foi preparado pelo método de hidratação do filme lipídico utilizando-se proporção de fosfatidilcolina e alantoína de  $42:5,3 \times 10^{-2}$  M, no qual a alantoína foi dissolvida na fase aquosa da preparação. O tempo de hidratação de 96 horas foi escolhido por ter se

mostrado mais eficiente na incorporação de filtros solares nos lipossomas em trabalhos anteriores (SANTOS, 2007).

Para tentar aumentar a incorporação da alantoína, a fração filtrada dos lipossomas foi aquecida em banho-maria a 55 °C para atingir a temperatura de transição de fase da fosfatidilcolina, na qual há maior flexibilidade da bicamada e liberdade de movimento das moléculas de fosfolipídios, o que permitiria a incorporação de maior quantidade de alantoína nas vesículas.

O tempo de hidratação pode influenciar as características das vesículas produzidas (VEMURI & RHODES, 1995). Por isso, o segundo lipossoma foi preparado utilizando-se proporção de fosfatidilcolina e alantoína de  $42:2,65 \times 10^{-2}$  M e tempo de hidratação de 24 horas. A alantoína foi adicionada em metade da fase aquosa (25 mL) e procedeu-se à hidratação no rota-evaporador com banho-maria à temperatura de 59 °C, para atingir 55 °C no lipossoma. Após resfriamento, adicionou-se o restante da fase aquosa (25 mL).

Cabe salientar que o método espectrofotométrico para determinação de alantoína estava sendo desenvolvido concomitantemente a esta etapa do desenvolvimento da formulação. Deste modo, nas frações dos primeiros lipossomas preparados neste trabalho a determinação da alantoína foi realizada pelo método espectrofotométrico com leitura em 246 nm, pois ainda não havia sido verificada a interferência do material lipídico do lipossoma.

O teor de fosfatidilcolina nas frações dos lipossomas foi determinado indiretamente, avaliando-se o conteúdo de fósforo (P) pelo método de Bartlett (BARTLETT, 1959).

Na figura 45 apresenta-se a curva-analítica de fósforo com quatro pontos de concentração entre 0,999 e 3,996 µg/mL.

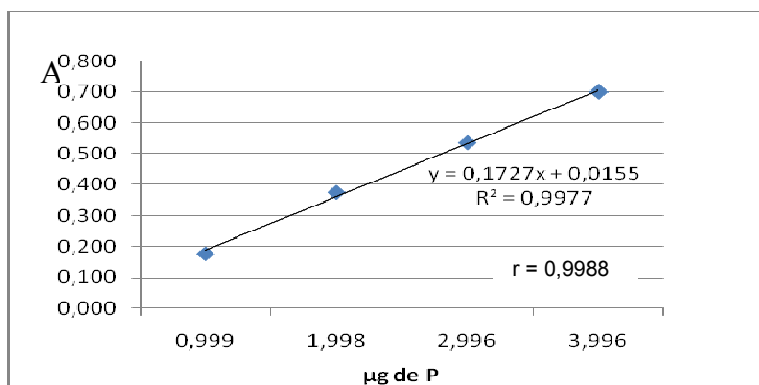


Figura 45: Curva-analítica de fósforo.

A curva obtida apresentou linearidade possuindo um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9988. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi próximo de 1 (0,9977), indicando um ajuste de 99,77% entre o modelo e as respostas observadas (NETO *et al.*, 2002).

Neste método, primeiro as amostras sofrem uma hidrólise ácida, no qual os fosfolipídios passam a fosfato inorgânico. A solução de molibdato de amônio reage com o fosfato inorgânico formando o ácido fosfomolibdico. Este por sua vez forma um complexo azul, na presença de ácido ascórbico como agente redutor. A intensidade da cor azul é diretamente proporcional à quantidade de fósforo presente e é medida espectrofotometricamente (BARTLETT, 1959; GARCIA, 1998). A quantidade de fósforo encontrada é diretamente proporcional à quantidade de PC presente na amostra (1,0 mg de P corresponde a 25,0 mg de PC).

Os resultados obtidos dos teores de alantoína e fosfolipídios nos lipossomas são apresentados na tabela 19.

Tabela 19: Resultados dos teores de alantoína e fosfolipídios nos lipossomas determinados por espectrofotometria, leitura a 246 nm.

Frações separadas	Alantoína (%) 42:5,3x10 <sup>-2</sup> M (n=3)*	Fosfolipídio (%) (n=3)	Alantoína (%) 42:2,65x10 <sup>-2</sup> M (n=3)**	Fosfolipídio (%) (n=3)
Sem filtrar	112,72±3,40	86,77±3,86	137,82±7,77	115,98±1,40
Após membrana 0,2 µm	112,66±1,99	70,82±1,57	96,65±9,86	105,19±8,38
Após G-50	22,76±0,29	57,2±1,03	-----	57,87±1,94
G-50 com aquecimento	53,45±4,84	-----	98,62±0,59	-----

\*96 horas de hidratação    \*\*24 horas de hidratação

Após a separação do material não incorporado do lipossoma preparado pelo método de hidratação do filme lipídico, utilizando-se proporção de fosfatidilcolina e alantoína de 42:5,3x10<sup>-2</sup> M com tempo de hidratação de 96 horas, observou-se que apenas 22,76% da alantoína inicial foi incorporada às vesículas. O aquecimento da preparação provocou um aumento de 30,69% de alantoína incorporada nas vesículas. Esse resultado pode ser devido ao aumento da flexibilidade da bicamada e da liberdade de movimento das moléculas de fosfolipídios que ocorre na temperatura de transição de fase da fosfatidilcolina (NEW, 1990).

Quando a quantidade de alantoína foi alterada para a razão de PC:alantoína 42:2,65x10<sup>-2</sup> M e o tempo de hidratação para 24 horas, o teor encontrado após passagem por coluna P-10 contendo gel SEPHADEX<sup>®</sup> G-50 foi de 98,62%, indicando um aumento na quantidade de alantoína incorporada nas vesículas. Porém, como os dois parâmetros (tempo de hidratação e proporção de PC:alantoína) foram alterados ao mesmo tempo, não é possível afirmar qual deles foi responsável pelo aumento na eficiência de inclusão da alantoína nos lipossomas.

Durante o desenvolvimento do método para determinação de alantoína em lipossoma, verificou-se a interferência do material lipídico nas leituras de absorbância. A especificidade do método foi determinada a partir da realização de varredura entre 190 e 400 nm da solução amostra e da solução contendo os componentes da preparação lipossomal (Phospholipon<sup>®</sup> 90G + Colesterol), com a finalidade de garantir que o método analítico não sofreria interferências desses componentes se estivessem presentes na amostra.

O teor de alantoína nas frações dos lipossomas foi determinado novamente utilizando a espectrofotometria derivada de 1ª ordem, com leitura em 263,9 nm, e a comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos espectrofotométricos encontra-se na Tabela 20.

Tabela 20: Resultados de teores de alantoína nos lipossomas preparados por hidratação do filme lipídico.

Frações lipossomas	Alantoína (%) 42:2,65x10 <sup>-2</sup> M (n=3)**	Alantoína (%) 42:2,65x10 <sup>-2</sup> M (n=3)**
SF	137,82±7,77	102,46±1,44
Após memb. 0,2 µm	96,65±9,86	100,23±0,96
G-50 com aquecimento	98,62±0,59	22,3±1,81

\*\*24h hidratação



Determinação da alantoína no lipossoma por espectrofotometria a 246 nm.

Determinação da alantoína no lipossoma por espectrofotometria derivada de primeira ordem a 263,9 nm.

Observou-se uma queda do teor de alantoína e de fosfolipídios nos lipossomas após a passagem por coluna P-10 contendo gel Sephadex<sup>®</sup> G50. A diminuição do teor de fosfolipídio pode ter ocorrido devido à concentração da solução lipossomal após a passagem pela coluna e, desta forma, parte da alantoína pode ter sido perdida (Tabela 19). Depois de estabelecida a especificidade do método, verificou-se que o rendimento real de inclusão de alantoína nos lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico foi de 22,3%.

## 5.9.2 ANÁLISE DOS LIPOSSOMAS CONTENDO ALANTOÍNA PREPARADOS PELO MÉTODO DE AGITAÇÃO MECÂNICA

O método de hidratação do filme lipídico mostrou-se eficiente em estudos anteriores para substâncias sólidas e lipofílicas (HENRIQUES, SANTOS e GARCIA, 2005). No presente trabalho, verificou-se que este método apresentou baixa eficiência de inclusão para a alantoína. O método de agitação mecânica foi, então, testado a fim de se obter maior eficiência de inclusão da alantoína.

A proporção PC:alantoína foi otimizada para avaliar a eficiência de inclusão da alantoína pelo método de agitação mecânica. O primeiro lipossoma foi preparado com proporção de PC:alantoína de  $42:2,65 \times 10^{-2}$  M e o segundo lipossoma na proporção  $42:1,32 \times 10^{-2}$  M.

Para proceder à análise do teor de alantoína no lipossoma preparado pelo método de agitação mecânica foi necessário determinar outro  $\lambda$  no qual não houvesse interferência da nova preparação lipossômica. As frações dos lipossomas preparados por agitação mecânica foram analisadas quanto ao teor de alantoína por espectrofotometria derivada de 2ª ordem e leitura em 266,6nm. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Resultados dos teores de alantoína e fosfolipídios nos lipossomas preparados por agitação mecânica.

Frações Lipossomas	Alantoína (%) $42:2,7 \times 10^{-2}$ M (n=3)	Fosfolipídios (%) (n=3)	Alantoína (%) $42:1,32 \times 10^{-2}$ M (n=3)	Fosfolipídios (%) (n=3)
SF	76,35±1,87	95,63±2,76	94,11±2,63	108,59±0,81
Após membrana 0,2 $\mu$ m	45,73±1,33	67,38±0,98	23,85±0,81	113,8±1,09
G50	6,5±1,78	29,05±1,46	4,015±0,4	100,63±3,47

Observou-se uma queda acentuada do teor de alantoína e de fosfolipídios nos lipossomas preparados na proporção de  $42:2,7 \times 10^{-2}$  M após passagem por coluna contendo

gel SEPHADEX<sup>®</sup> G-50. Esta diminuição do teor de fosfolipídios pode ter ocorrido devido à concentração da solução lipossomal durante a passagem da formulação pela coluna contendo gel SEPHADEX<sup>®</sup> G-50. Desta forma, parte da alantoína pode ter sido perdida.

Verificou-se uma queda do teor de alantoína nos lipossomas preparados na proporção de  $42:1,32 \times 10^{-2}$  M após passagem através da coluna contendo gel SEPHADEX<sup>®</sup> G-50, porém o teor de fosfolipídios permaneceu inalterado. Os lipossomas preparados por agitação mecânica utilizando-se as proporções  $42:2,7 \times 10^{-2}$  M e  $42:1,32 \times 10^{-2}$  M apresentaram rendimento de inclusão insatisfatória.

A alantoína pode ser considerada um ácido fraco (OLIVEIRA *et al.*, 2008), cujo pKa é 8,96. Portanto, em pH alcalino, a alantoína se encontrará mais ionizada e, por consequência, mais hidrossolúvel. Para tentar verificar a influência da solubilidade da alantoína na eficiência de inclusão, os lipossomas foram preparados na proporção PC:alantoína de  $42:2,7 \times 10^{-2}$  M utilizando-se soluções tampões com diferentes valores de pH. Todos os lipossomas foram preparados adicionando-se a alantoína na fase aquosa, com exceção do Lipossoma 3, em que a alantoína foi adicionada na fase lipídica da preparação.

Os resultados dos teores de alantoína nas quatro formulações encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22: Resultados dos teores de alantoína nos lipossomas preparados por agitação mecânica utilizando-se soluções tampões com diferentes valores de pH.

Frações lipossomas	Lipossoma 1*	Lipossoma 2**	Lipossoma 3***	Lipossoma 4****
	Alantoína (%) $42:2,7 \times 10^{-2}$ M (n=3)	Alantoína (%) $42:2,7 \times 10^{-2}$ M (n=3)	Alantoína (%) $42:2,7 \times 10^{-2}$ M (n=3)	Alantoína (%) $42:2,7 \times 10^{-2}$ M (n=3)
SF	100,04±1,21	99,73±5,28	102,36±2,19	90,64±1,93
Após memb. 0,2 µm	58,96±0,96	65,37±1,69	101,67±1,61	90,62±3,52
G50	3,27±0,99	4,23±0,73	5,49±1,17	8,06±2,77

\*pH6,8 \*\* pH 5,5 \*\*\*pH 9,0 (fase lipídica) \*\*\*\*pH 9,0 (fase aquosa)



O lipossoma preparado com tampão pH 9,0 e com adição da alantoína na fase aquosa (Lipossoma 4) apresentou o melhor resultado de eficiência de inclusão da alantoína ( $8,06\% \pm 2,77$ ). No entanto, todos os lipossomas testados apresentaram inclusão insatisfatória e a variação do pH na preparação não melhorou a inclusão da alantoína nas vesículas (Tabela 22).

### **5.10 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS VESÍCULAS LIPOSSOMAS E POLIDISPERSIVIDADE**

Ottiger e Wunderli-Allenspach avaliaram a estabilidade de preparações lipossomais em função do pH (OTTIGER & WUNDERLI-ALLENSPACH, 1997). Lipossomas foram incubados a 37 °C em soluções com pH 2,0; 6,7 e 12,2. Até 8 h de incubação, nenhum lipossoma apresentou alteração nos resultados de polidispersividade. Em pH 12,2 a desintegração do lipossoma ocorreu entre 8 e 24 h. Nos meios, ácido e neutro nenhuma alteração foi observada.

Para avaliar a estabilidade da preparação obtida por agitação mecânica com solução tampão pH 9,0 (Lipossoma 4) foi realizada análise da distribuição do tamanho e polidispersividade das vesículas.

A determinação do diâmetro médio das vesículas da fração dos lipossomas preparados filtrada em membranas de policarbonato 0,2  $\mu\text{m}$  foi realizada pela técnica de espalhamento da luz laser. Os valores são obtidos em função da média de tamanho das vesículas. Os valores de dispersão indicam a homogeneidade dos resultados que variam de 0,0 (dispersão completamente homogênea) a 1,0 (sistema completamente heterogêneo).

A figura 46 corresponde ao gráfico de distribuição e a média do tamanho da preparação dos lipossomas estudada.

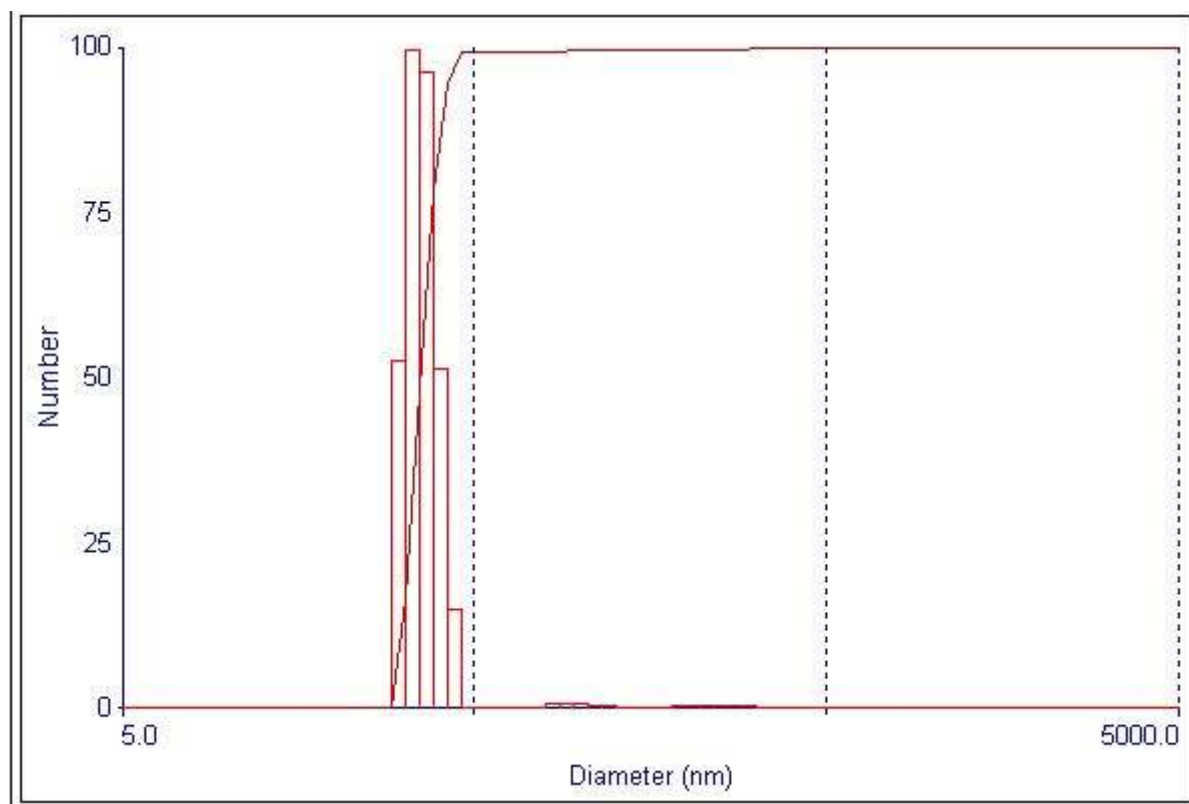


Figura 46: Distribuição de tamanho dos lipossomas preparados por agitação mecânica – fração filtrada, MD= 119,8±6,1.

A preparação avaliada (Lipossoma 4) apresentou tamanho médio (MD) de vesículas em torno de 119,8 nm. O resultado de polidispersividade de 0,275 indica que a preparação tem vesículas de tamanho homogêneo.

Os resultados demonstram que a utilização de solução tampão pH 9,0 na preparação não comprometeu a estabilidade das vesículas dos lipossomas.

### 5.11 LIPOSSOMAS E ALANTOÍNA

Os resultados do presente trabalho demonstram que a alantoína pode ser incluída com baixa eficiência nas vesículas lipossomais pelos métodos de hidratação do filme lipídico e agitação mecânica.

Vários fatores podem afetar a eficiência de inclusão de fármacos em lipossomas. Casals, Gallardo e Estelrich (1996) estudaram os fatores que afetam a eficiência de inclusão

da tioguanina, substância anfifílica que tende a escapar da membrana lipossômica. Os parâmetros avaliados foram pH, conteúdo de colesterol, carga dos lipídios e tempo de sonicação. Os melhores rendimentos de inclusão foram obtidos com lipossomas de carga positiva, 50% de colesterol, pH 7,4 preparados com 120 segundos de sonicação. O pior rendimento foi obtido com lipossomas de carga negativa, 50% de colesterol, pH 4,7 preparados com 30 segundos de sonicação. A análise estatística dos resultados mostrou que o tempo de sonicação foi o único parâmetro que afetou significativamente a eficiência de inclusão da tioguanina nas vesículas. O aumento do tempo de sonicação resultou em vesículas de tamanho menor e mais homogêneo. Os autores atribuem a melhor distribuição da substância ativa nessas vesículas, à capacidade da energia de sonicação de superar as forças repulsivas entre as moléculas lipídicas e a substância ativa (CASALS, GALLARDO & ESTELRICH, 1996).

No presente trabalho, alguns fatores como elevação da temperatura e proporção de fosfolipídio e alantoína foram testados para avaliar a influência na eficiência de inclusão da alantoína nos lipossomas preparados por hidratação do filme lipídico. No método de agitação mecânica, os fatores avaliados foram: proporção de fosfolipídio e alantoína e variação do pH das preparações.

Nenhuma das preparações testadas apresentou eficiência de inclusão próxima de 100%. O melhor resultado (22,3%) foi obtido pelo método de hidratação do filme lipídico, quando se utilizou a razão de PC:alantoína  $42:2,65 \times 10^{-2}$  e tempo de hidratação de 24 horas.

Pesquisadores têm demonstrado que a polaridade da substância a ser incorporada e a composição dos lipossomas podem afetar a eficiência de inclusão no lipossoma (SUN *et al.*, 2008; NII & ISHII, 2005; IMMORDINO *et al.*, 2004; GULATI *et al.*, 1998; KULKARNI & VARGHA-BUTLER, 1995).

Substâncias como o 5-fluoracil e gencitabina são moléculas hidrofílicas que tendem a difundir das vesículas lipossomais limitando a utilidade clínica desses lipossomas. Derivados lipofílicos desses fármacos possuem melhor eficiência de inclusão nos lipossomas (SUN *et al.*, 2008; IMMORDINO *et al.*, 2004).

Kulkarni e Vargha-Butler avaliaram a influência da hidrofobicidade de vários esteróides na eficiência de inclusão em vesículas multilamelares. A substância mais hidrofóbica e menos solúvel em água teve maior eficiência de inclusão do que as outras. Os pesquisadores demonstraram que a eficiência de inclusão aumenta com o aumento da característica hidrofóbica da substância incluída nas vesículas multilamelares (KULKARNI & VARGHA-BUTLER, 1995).

De acordo com a solubilidade, as moléculas podem ser divididas em muito hidrofílicas, muito lipofílicas, substâncias que exibem boa solubilidade bifásica ou anfífilicas e substâncias que exibem insolubilidade bifásica (GULATI *et al.*, 1998).

A baixa eficiência de inclusão da alantoína nos lipossomas obtida no presente trabalho pode ser devida à sua baixa solubilidade bifásica. A alantoína é pouco solúvel em água, muito pouco solúvel em álcool e praticamente insolúvel em solventes orgânicos. Tais características dificultam a inclusão da alantoína tanto no compartimento aquoso quanto na bicamada lipídica do lipossoma.

A produção de vesículas unilamelares grandes (VUGs) pode ser testada futuramente a fim de se obter maior quantidade de alantoína incluída nas vesículas. Nas VUGs, há maior volume de água no compartimento aquoso comparado com as vesículas multilamelares (VMLs) produzidas neste trabalho. A solubilidade da alantoína em água é crítica quando a mesma está presente em altas concentrações. Neste contexto, vesículas, cujo compartimento aquoso é maior, poderiam facilitar a permanência da alantoína dentro das mesmas.

As formulações lipossômicas são empregadas para aumentar a eficiência da liberação de substância ativa por meio de várias vias de administração. Segundo Verma e cols. (2003) lipossomas preparados com fosfolípidios podem carrear substâncias hidrofílicas inclusas e não inclusas nas vesículas para a epiderme. O estudo demonstrou que a presença da substância hidrofílica dentro e fora das vesículas fosfolipídicas são capazes de carrear para o estrato córneo, não apenas fármacos hidrofílicos inclusos nas mesmas, mas também aqueles presentes na formulação, que não estão inclusos nas vesículas (VERMA *et al.*, 2003).

Neste contexto, lipossomas contendo alantoína podem ser preparados mesmo com baixa eficiência de inclusão da substância ativa uma vez que a presença de lipossomas poderia aumentar o acúmulo da substância ativa no sítio de administração mesmo estando fora das vesículas.

## 6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação da alantoína por espectrofotometria derivada em presença de produtos de degradação e excipientes de formulações tópicas, que se mostrou linear, específico, exato, preciso e robusto. Foi demonstrado que o método proposto, além de dispensar a necessidade de separação prévia da amostra, pode ser aplicado no controle de qualidade de rotina para determinação quantitativa da alantoína em preparações farmacêuticas de uso tópico como creme, gel e lipossomas preparados por hidratação do filme lipídico e agitação mecânica.

Quanto à obtenção dos lipossomas, o método de hidratação do filme lipídico foi superior ao de agitação mecânica, com relação à eficiência de inclusão da alantoína, quando se utilizou solução tampão de pH 6,8 nas preparações. Os resultados de inclusão obtidos foram de  $22,3 \pm 1,81$  e  $6,5 \pm 1,78\%$ , respectivamente. A quantidade de alantoína incorporada no lipossoma aumentou quando foi empregado aquecimento durante a hidratação do filme lipídico. A maior eficiência de inclusão da alantoína nas vesículas lipossomais pelo método de agitação mecânica foi de  $8,06 \pm 2,77$ , quando se utilizou solução tampão de pH 9,0 na preparação e a alantoína foi adicionada à fase aquosa.

## 7.REFERÊNCIAS

AALTO-KORTE, K. Improvement of skin barrier function during treatment of atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 33:969-72, 1995.

AKDIS, C.A., AKDIS, B., BIEBER, T., BINDSLEY-JENSEN, C., BOGUNIEWICZ, M., EIGENMANN, P., HAMID, Q., KAPP, A., LEUNG, D.Y., LIPOZENCIC, J., LUGER, T.A., MURARO, A., NOVAK, N., PLATTS-MILLS, T.A.E., ROSENWASSER, L., SCHEUNIG, A., SIMONS, E.R., SPERGEL, J., TURJANMAA, K., WAHN, U., WEIDINGER, S., WERFEL, T., ZUBERBIER, T. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/ American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Journal of Allergy Clin. Immunol.* 118:152-169, 2006.

ANVISA - Resolução-RE nº899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>. Acesso em 23 mar. 2010.

ANVISA – Subsídios à Discussão sobre a proposta de Regulamentação para Farmácias Magistrais. Diretoria Colegiada da ANVISA, Junho de 2005. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/artigos/subsidios.pdf> Acesso em 31 de julho de 2010.

ASHCROFT, D.M., PO, A.L.W., WILLIAMS, H.C., GRIFFITHS, E.M. Systematic review of comparative efficacy and tolerability of calcipotriol in treating chronic plaque psoriasis. *BMJ*, 320: 963-967, 2000.

BAKSHI, M., SINGH, S. Development of validated stability- indicating assay methods- critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 28: 1011-1040, 2002.

BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M., DAVID, J.P. Estresse oxidativo: reação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*. 29(1): 113-126, 2006.

BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 234n (3): 466-468, 1959.

BENAMOR, M., AGUERSSIF, N. Simultaneous determination of calcium and magnesium by derivative spectrophotometry in pharmaceutical products. *Spectrochimica acta Part A*, 69: 676-681, 2008.

BERGER, N., SACHSE, A., BENDER, J., SCHUBERT, R., BRAND, M. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*. 223: 55–68, 2001.

BERGH, B.A.I., VRIES, I.S., BOUWSTRA, J.A. Interactions between liposomes and human stratum corneum studied by freeze-substitution electron microscopy. *International Journal of Pharmaceutics*. 167: 57–67, 1998.

BERTH-JONES, J. Psoriasis. *Common Dermatoses*. 235-241, 2009.

BERTHEMY, A., NEWTON, J., WU, D., BUHRMAN, D. Quantitative determination of extremely polar compound allantoin in human urine by LC-MS/MS based on the separation on a polymeric amino column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19: 429-434, 1999.

BETZ, G., AEPPLI, A., MENSHUTINA, N., LEUENBERGER, H. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *International Journal of Pharmaceutics*, 296: 44-54, 2005.

BETZ, G., IMBODEN, R., IMANIDIS, G. Interaction of liposome formulations with human skin in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. 229: 117-129, 2001.

BOUWSTRA, J., HONEYWELL-NGUYEN, P.L., GOORIS, G.S., PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*. 42: 1-36, 2003.

BOWSTRA, J.A., PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758: 2080-2095, 2006.

BOWCOCK, A.M., BARKER J.N. Genetics of Psoriasis: potential impact on new therapies. *J. Am. Acad. Dermatol*, 49: S51-6, 2003.

BERTHEMY, A. NEWTON, J. WU, D. BUHRMAN, D. Quantitative determination of an extremely polar compound allantoin in human urine by LC-MS/MS based on separation on a polymeric amino column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19: 429-434, 1999.

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP, Farmacopéia Britânica), v. 2, p. 685, 2004.



CALLEGARI-JAQUES, S.M. Bioestatística: Princípios e Aplicações. 1ª ed. São Paulo: Artmed, 2004.

CARRASCOSA, J.M., VANACLOCHA, F., BORREGO, L., FERNANDEZ-LOPEZ, E., FUERTES, A., RODRIGUEZ-FERDANDEZ-FREIRE, L., ZULAICA, A., TUNEU, A., CABALLE, G., COLOME, E., BORDAS, X., HERNANZ, J.M., BRUFAU, C., HERRERA, E. Update of the topical treatment of psoriasis. *Actas Dermofiliogr.* 100: 190-200, 2009.

CASALS, E., GALLARDO, M., ESTELRICH, J. Factors influencing encapsulation of thioguanine in DRV liposomes. *International Journal of Pharmaceutics.* 143: 171-177, 1996.

CHANG, C.C., LIU, D.Z., LIN, S.Y., LIANG, H.J., HOU, W.C., HUANG, W.J., CHANG, C.H., HO, F.M., LIANG, Y.C. Liposome encapsulation reduces cantharidin toxicity. *Food and chemical toxicology.* 46: 3116-3121, 2008.

CHEN, X.B., KOWALCZYK, W.M. Determination of allantoin in biological, cosmetic and pharmaceutical samples. *Journal of AOAC International.* 79(3): 628-635, 1996.

CHEN, X.B., KYLE, D.J., ORSKOV, E.R. Measurement of allantoin in urine and plasma by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Journal of Chromatography.* 617: 241-247, 1993.

CODERCH, L., FONOLLOSA, J., DE PERA, M., ESTELRICH, J., DE LA MAZA, A., PARRA, J.L. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *Journal of Controlled Release.* 68: 85-95, 2000.

CORK, M.J., ROBINSON, D.A., VASILOPOULOS, Y., FERGUSON, A., MOUSTAFA, M., MACGOWAN, A., DUFF, G.W., WARD, S.J., TAZI-AHNINI, R. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: Gene-environment interactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118: 3-21, 2006.

CTFA, Cosmetic Ingredient Dictionary. 5<sup>a</sup> ed., ed.: NIKITAKIS, J. M.; Mcwen Junior, G. N., Washington DC, 1991.

CVEC, G., VIÉRL, U. Nanotechnology and transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release.* 141: 277-299. 2010.

CZAUADERNA, M., KOWALCZYK, J. Simultaneous measurement of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in blood by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B.* 704: 89-98, 1997.

DALLET, P., LABAT, L., KUMMER, E., DUBOST, J.P. Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B. Short communication.*: 742: 447-452, 2000.

DINÇ, E., KAYA, S., DOGANAY, T., BALEANU, D. Continuous wavelet and derivative transforms for the simultaneous quantitative analysis and dissolution test of levodopa-benserazide tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 44: 991-995, 2007.

DOI, T. KAJIMURA, K. TAKATORI, S. FUKUI, N. TAGUCHI, S. IWAGAMI, S. Simultaneous measurement of diazolidinyl urea, urea, and allantoin in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B. Short communication,* 2009.

DRAELOS, Z.D. Botanical as topical agents. *Clinics in Dermatology.* 19: 474-477, 2001.

DRAELOS, Z.D. Cosmetics: An Overview. *Curr. Probl. Dermatol.* 45-64, 1995.

DYER, D.L., GERENRAISH, K.B., WADHAMS, P.S. Testing a new alcohol-free hand sanitizer to combat infection. *Aorn Journal.* 68: 239-251, 1998).

EGBARIA, K., WEINER, N. Liposomal as a topical drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 5: 287-300, 1990.

EWING, G.W. Métodos Instrumentais de Análise Química. Editora Edgard Blücher Ltda. Vol.II, 1998.

FERREIRA, A.O. Guia Prático da Farmácia Magistral. 2ª Ed. Juiz de Fora, 2002, 845p.

FORSLIND, B., ENGSTROM, S., ENGBLOM, J., NORLEN, L. A novel approach to understanding of human skin barrier function. *Journal of Dermatological Science.* 14: 115-125, 1997.

FU, Y.-C., FERNG, L.-H.A., HUANG, P.-Y. Quantitative analysis of allantoin and allantoic acid in yam tuber, mucilage, skin and bulb of *Dioscorea* species. *Food Chemistry,* 94: 541-549, 2006.

GAGARI, E., KABANI, S. Adverse effects of mouthwash use. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology.* 80: 432-9, 1995.

GAO, X.H., ZHANG, L., WEI, H., CHEN, H.D. Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology*. 26: 367-374, 2008.

GARCIA, P.L., SANTORO, M.I.R.M, KEDOR-HACKMAN, E.R.M, SINGH, A.K. Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in a gel and cream preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 764-768, 2005.

GARCIA, S. Lipossomas com filtro solar: preparação e controle de qualidade. 1998. 161f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

GENNARO, A.R., CHASE, G., MARDEROSION, A.D., HANSON, G.R., HUSSAR, D.A., MEDWICK, T., RIPPIE, E.G., SCHWARTZ, J.B., ZINK, G.L. Remington: The science and Practice of Pharmacy. 19<sup>o</sup>ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995.

GIL, E.S. Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. 2<sup>a</sup>.ed, São Paulo: Pharmabooks, 2007.485p.

GORDON, M.L. The role of clobetasol propionate emollient 0,05% in the treatment of patients with dry, scaly, corticosteroid- responsive dermatoses. *Clinical Therapeutics*. 20: 26-39, 1998.

GULATI, M., GROVER, M., SINGH, S., SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 165: 129-168, 1998.  
GUPTA, J., GRUBE, E., ERICKSEN, M.B., STEVENSON, M.D., LUCKY, A.W., SHETH, A.P., ASSA'AD, A.H., HERSHEY, G.K.K. Intrinsically defective skin barrier function in children with atopic dermatitis correlates with disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121(3): 725-730, 2008.

HAGHI, G., ARSHI, R., SAFAEI, A. Improved High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Quantitative Analysis of Allantoin in *Zea mays*. *J. Agric. Food and Chem*, 56: 1205-1209, 2008.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 10ed. Rio de Janeiro: Mc graw-Hill, 2003.1647p.

HARRIS, D.C. Análise Química Quantitativa. Editora LTC, 6<sup>a</sup> edição, 2006.

HASWELL, S.J. Statistical evaluation of data. Pratical Guide to Chemometrics. New York: Marcel Dekker, 1992.

HENRIQUES, B. G.; SANTOS, E. P.; GARCIA, S. Inclusão de 3-(4-metilbenzilideno) cânfora em lipossomas. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 2005, Cuscu.

HICKS, M., WONG, L.S., DAY, R.O. Identification of products from oxidation of uric acid induced by hydroxyl radicals. *Free Radic. Res. Commun.*, 18(6): 337-51, 1993.

HOLLER, F.J., SKOOG, D.A., CROUCH, S.R. Princípios de Análise Instrumental. Editora Bookman, 6ª edição, 2009.

ICH: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Harmonised Tripartite Guidelines, 2005, pp. 1–13.

IMMORDINO, M.L., BRUSTA, P., ROCCO, F., ARPICCO, S., CERUTI, M., CATTEL, L. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gencitabine prodrugs. *Journal of Controlled Release*. 100: 331-346, 2004.

JIN, P., MA, J., WU, X., ZOU, D., SUN, C., HU, X. Simultaneous determination of chondroitin sulfate sodium, allantoin and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical eye drops by an ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 50: 293-297, 2009.

KAPOOR, N., KHANDAVILLI, S., PANCHAGNULA, R. Simultaneous determination of lamivudine and stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 761-765, 2006.

KARAGOZ, H., YUKSEL, F., ULKUR, E., EVINC, R., Comparison of efficacy of silicone gel, silicone gel sheeting and topical onion extract including heparin and allantoin for the treatment of postburn hypertrophic scars. *Burns*. 35: 1097-1103, 2009.

KARPINSKA, J. Derivative Spectrophotometry – Recent applications and directions of developments. *Talanta*. 64: 801-822, 2004.

KATTYGNARATH, D., MOUNIER, N., MEDELAIN-CHAMBRIN, I., GOURMEL, B., LE BRICON, T., GISSELBRECHT, C., FAURE, P., HOUZE, P. Quantification of urinary allantoin by capillary zone electrophoresis during recombinant urate oxydase (rasburicase) therapy. *Clinical Biochemistry*. 39: 86-90, 2006.

KIM, K.M., HENDERSON, G.N., FRYE, R.F., GALLOWAY, C.D., BROWN, N.J., SEGAL, M.S., IMARAM, W., ANGERHOFER, A., JOHNSON, R. Simultaneous determination of uric acid metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 877: 65-70, 2009.

KINUGASA, S., TANABE, K., TAMURA, T. Spectral Database of organic compounds. *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*. Disponível em [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=eng](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng). Acesso em 01 de setembro de 2009.

KRUEGER, G.G., ELLIS, C.N. Psoriasis-recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53: 95-100, 2005.

KRUEGER, G.G., FELDMAN, S.R., CAMISA, C., DUVIC, M., ELDER, J.T., GOTTLIEB, A.B., et al. Two considerations for patients with psoriasis and their clinicians: What defines mild, moderate, and severe psoriasis? What constitutes a clinically significant improvement when treating psoriasis? *J. Am. Acad. Dermatol.*, 43: 281-285, 2000.

KULKARNI, S.B., VARGHA-BITLER, E.I. Study of liposome drug delivery systems 2. Encapsulation efficiencies of some steroids in MLV liposomes. *Coloids and surfaces B: Biointerfaces* 4: 77-85, 1995.

LANDI, A.C. Farmácia de manipulação lança tendência. Valor Econômico, Rio de Janeiro, 30 jul. 2010. Pequenas e médias empresas, p.F8.

LASIC, D.D. The mechanism of vesicle formation. *Biochem.J.*, 256: 1-11, 1988.

LASTRA, O.C., LEMUS, I.G., SANCHEZ, H.J., PEREZ, R.F. Development and validation of an UV derivative spectrophotometric determination of Losartan potassium in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 33: 175-180, 2003.

LEBWOHL, M. A clinician's paradigm in the treatment of psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53 (1): S59-S69, 2005.

LEBWOHL, M., ALI, S. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* Vol.45(4): 487-498, 2001.

LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica. 4<sup>a</sup>.ed., São Paulo: Sarvier, 2006. 1232p.

LEVINE, D., GOTTLIEB, A. Evaluation and management of psoriasis: An Internist's guide. *Med. Clin. M. Am.* 93: 1219-1303, 2009.

LIU, J., HU, G. Advances in studies of phospholipids as carriers in skin topical application. *Journal of Nanjing Medical University.* 21(6): 349-353, 2007.

MARKOVIK, B., VLADIMIROV, S., CUDINA, O., SAVIC, A., KARLJIKOVIC-RAJIC, K. An application of second-order UV-derivative spectrophotometry for study of solvolysis of a novel fluocinolone acetonide ester. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 75: 930-935, 2010.

MAGHRABY, G.M.L., BARRY, B.W. WILLIAMS, A.C. Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas *International Journal of Pharmaceutics* 292: 179–185, 2005.

MAGHRABY, G.M.L., BARRY, B.W. WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 34: 203-222, 2008.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, M.V. Manual de soluções, reagentes e solventes. 11<sup>a</sup> ed., [s.l.]: Edgard Blücher, 2001.

MOZAFARI, M.R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10: 711-719, 2005.

MURA, P., MAESTRELLI, F., GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.L., MICHELACCI, I., CHELARDINI, C., RABASCO, A.M. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *European Journal of Pharmaceutics ans Biopharmaceutics.* 67: 86-95, 2007).

MURATSUBAKI, H., SATAKE, K., ENOMOTO, K. Enzymatic assay of allantoin in serum using allantoinase and allantoate amidohydrolase. *Anal. Biochem.* 359: 161–166, 2006.

NETO, B.B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na ciência e na indústria. 2<sup>a</sup> ed., Campinas: UNICAMP, 2002.

NEW, R.R.C. Liposomes: a practical approach. Oxford: Oxford University, 1990.

NII, T., ISHI, S. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by microencapsulation vesicle method. *International Journal of Pharmaceutics*. 298: 198-205, 2005.

NORLEN, L., GIL, I.P., SIMONSEN, A., DESCOUTS, P. Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir–Blodgett films. *Journal of Structural Biology*. 158: 386-400, 2007.

OLIVEIRA, S.M., SILVA, J. B. P., HERNANDES, M. Z., LIMA, M. C. A., GALDINO, S. L., PITTA, I. R. Estrutura, Reatividade e Propriedades Biológicas de Hidantoínas. *Química Nova*, 31(3): 614-622, 2008.

OTAKE, K., SHIMOMURA, T., GROTO, T., IMURA, T., FURUYA, T., YODA, S., TAKEBAYASHI, Y., SAKAI, H., ABE, M., Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method. *Langmuir*, 22(6): 2543-2550, 2006.

OTTIGER, C., WUNDERLI-ALLENSPACH, H., Partition behavior of acids and basis in a phosphotidilcholine liposome-buffer equilibrium dialysis system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5: 223-231, 1997.

PARTIF, K. Martindale, the Complete Drug Reference. 32ed. Pharmaceutical Press, 1999. p1082, 1078.

PROKSCH, E., JENSEN, J.M., ELIAS, P.M. Skin Lipids and Epidermal differentiation in atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology*. 21: 134-144, 2003.

PROKSCH, E., FOLSTER-HOLST, R., JENSEN, J.M. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *Journal of Dermatological Science*. 43: 159-169, 2006.

RANGNO, G., IOELE, G., DE LUCA, M., GAROFALO, A., GRANDE, F., RISOLI, A. A critical study on the application of the zero-crossing derivative spectrophotometry to the photodegradation monitoring of lacidipine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 42: 39-45, 2006.

RIBEIRO, C.J. Cosmetologia aplicada a dermocosmética. São Paulo: Pharmabooks, 2006. 270p

ROJAS, F. S. OJEDA, C. B. Recent Development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004-2008. *Analytica Chimica Acta*, 635: 22-44, 2009.

SANTOS, N.C. CASTANHO, M.A.R.B., Lipossomas: a bala mágica acertou? *Quim. Nova*, 25(6B): 1181-1185, 2002.

SANTOS, V. M. Preparação de filtros solares em nanosistema visando a maior ação protetora. 2007. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)—Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SHIGFIELD, K.J., OFFER, N.W. Determination of allantoin in bovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. Short communication. 706: 342-345, 1998.

SUGARMAN, J. The epidermal barrier in atopic dermatitis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 27: 108-114, 2008.

SULKOWSKI, W.W., PENTAK, D., NOWAK, K., SULKOWSKA, A. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*. 744-747:737-747, 2005.

SUN, W., ZHANG, N., LI, A., ZOU, W., XU, W. Preparation and evaluation of N3-O-toluyfl-fluoracil-loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 353: 243-250, 2008.

TEIXEIRA, J.P.F., DUARTE, F.R. Avaliação do Teor de Ureídeos em Plantas de Confrei. *Bargantia*, 44(1): 487-492, 1985.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews*, 4: 145-160, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 31, Farmacopéia Americana). v. 1, p. 810, v.2, p. 1323, 1324, 1426, 2009.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70: 95-111, 1995.

VERMA, D.D., VERMA, S., BLUME, G., FAHR, A. Particle size of liposome influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 258: 141-151, 2003.



- VERMA, D.D., VERMA, S., BLUME, G., FAHR, A. Liposome increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 55: 271-277, 2003.
- VIGLIOGLIA, P.A.; RUBIN, J. *Cosmiatria II*. Buenos Aires: AP Americana de Publicaciones S/A, 1989. 406p.
- VISSCHER, M. O., Update on the use of topical agents in neonates. *Newborn and Infant Nursing Reviews*.9: 31-47, 2009.
- VOGEL, A. *Análise Química Quantitativa*. Editora LTC, 6ª edição, 2002.
- VRBASKI, M.M., GRUJIC-INJAC, B., GAJIC, D. A new method for allantoin determination and its application in allantoin determination in *Agrostemma githago* L. seed. *Analytical Biochemistry*. 91: 304-308, 1978.
- WEBER, D.J., HIGGINS, J.W. Potentiometric Titration of Allantoin in Cream Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 59(12): 1819-1821, 1970.
- WILLEMOT, J., PARRY, G. Une method acidimétrique non aqueuse de dosage, en pharmacie, de l'allantoïne (5-uréido-hydantoïne). *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 30(5): 389-390, 1972.
- YOUNG, E. G., CONWAY, C.F. On the estimation of allantoin by the rimini-schryver reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 142: 839-853, 1942.
- ZAIDI, Z.R., SENA, F.J., BASILIO, C.P. Stability assay of allantoin in lotions and creams by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 71(9): 997-999, 1982.
- ZHANG, L., LIU, Y., CHEN, G. Simultaneous determination of allantoin, choline and L-arginine in *Rhizoma Dioscoreae* by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1043: 317-321, 2004.