

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

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS MICROEMULSÕES DE DAPSONA
PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA HANSENÍASE**

Vinícius Raphael de Almeida Borges

Rio de Janeiro

2011

VINÍCIUS RAPHAEL DE ALMEIDA BORGES

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS MICROEMULSÕES DE DAPSONA PARA O
TRATAMENTO TÓPICO DA HANSENÍASE**

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

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral

RIO DE JANEIRO

2011

B732d Borges, Vinícius Raphael de Almeida.

Desenvolvimento de novas microemulsões de dapsona para o tratamento tópico da hanseníase/ Vinícius Raphael de Almeida Borges; orientadores Valéria Pereira de Sousa, Lúcio Mendes Cabral. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2011.

136f. : il. col. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Hanseníase. 2. Microemulsão. 3. Dapsona. 4. Tratamento tópico. I. Sousa, Valéria Pereira de. II. Cabral, Lúcio Mendes. III. Título.

CDD 616.998061

VINÍCIUS RAPHAEL DE ALMEIDA BORGES

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS MICROEMULSÕES DE DAPSONA PARA O
TRATAMENTO TÓPICO DA HANSENÍASE**

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 31 de maio de 2011

Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa – Orientadora

Departamento de Medicamentos – Faculdade de Farmácia – Universidade
Federal do Rio de Janeiro, RJ

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral – Orientador

Departamento de Medicamentos – Faculdade de Farmácia – Universidade
Federal do Rio de Janeiro, RJ

Prof^a. Dr^a. Carla Holandino Quaresma

Departamento de Medicamentos – Faculdade de Farmácia – Universidade
Federal do Rio de Janeiro, RJ

Prof^a. Dr^a. Gisela Dellamora Ortiz

Departamento de Medicamentos – Faculdade de Farmácia – Universidade
Federal do Rio de Janeiro, RJ

Prof^a. Dr^a. Luiza Rosária Sousa Dias

Departamento de Tecnologia Farmacêutica - Faculdade de Farmácia -
Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ

Às minhas filhas, Sarah e Marina, pela
alegria ímpar de todos os dias. À minha mãe
por seus sábios conselhos e incentivos
fundamentais para que esta dissertação
fosse realizada.

“O fator decisivo para vencer o maior obstáculo é, invariavelmente, ultrapassar o obstáculo anterior”

Henry Ford

AGRADECIMENTOS

A minha família por todo carinho, torcida e por serem essenciais em minha vida. Especialmente ao meu pai, Jucilande Borges, pelo amor incondicional aos filhos e ao meu irmão, Douglas, pela admiração e momentos de descontração.

A minha esposa, Lívia Cecília, pelo amor, otimismo e compreensão em entender meus momentos de ausência. Agradeço por estar sempre ao meu lado.

A toda equipe do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Complexo Tecnológico de Medicamentos de Farmanguinhos / FIOCRUZ por todos os ensinamentos e pela ótima convivência proporcionada. Um agradecimento em especial aos amigos: Daniel, Vítor, Messias, Helvécio Vinícius e Thiago Bandini.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica / UFRJ: Arídio, Lula, Carol, Jaque, Maíra, Flávia, Túlio, Michele, Daniel, Camila e, especialmente, Lidiane pela amizade e várias ajudas.

A equipe do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamento / UFRJ: João, Juliana, Alice, Gleiciane, Gisele, Taylane, Mayre, Aninha, Eduardo, Luís e Eliane pela convivência diária e pelo companheirismo.

A Maria do Socorro pelo modo feliz e divertido que encara a vida. E, claro, pelo papo descontraído de todas as manhãs.

A minha companheira de laboratório, Alice Simon, pelos conselhos, amizade e disponibilidade em sempre me ajudar.

A banca de acompanhamento, especialmente, a prof^a. Dr^a Gisela Dellamora Ortiz pelas dicas, cobranças e por todo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral por todas as oportunidades concedidas e pelos ensinamentos na contribuição deste trabalho.

A minha orientadora prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa pelo apoio, orientação e motivações essenciais para a conclusão deste trabalho. Agradeço por todo o apredizado. Muito obrigado!

RESUMO

BORGES, V.R.A. Desenvolvimento de novas microemulsões de dapsona para o tratamento tópico da hanseníase. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que se manifesta por sintomas dermatoneurológicos. O fármaco de eleição para o tratamento é a dapsona (DAP), e devido a suas propriedades bacteriostática e antiinflamatória, estudos estendem sua aplicabilidade a diversas enfermidades cutâneas de cunho inflamatório. A administração tópica de DAP constitui uma alternativa terapêutica auxiliar para o tratamento da hanseníase, além de fornecer novas aplicações terapêuticas ao fármaco. Entretanto, a DAP não apresenta características ideais para veiculação tópica em formulações convencionais e o estrato córneo representa uma barreira eficaz à penetração do fármaco. Sendo assim, pode-se considerar a veiculação de DAP em nanossistemas coloidais, como as microemulsões (MEs), pode ser uma importante ferramenta para aumentar a solubilização da DAP e promover a permeação cutânea. Neste presente trabalho foram desenvolvidas microemulsões contendo DAP. As MEs foram caracterizadas e avaliadas quanto a liberação *in vitro* e permeação epidérmica *in vitro* da DAP. Dois excipientes foram avaliados como fase oleosa, o miristato de isopropila (MIP) e o n-metil-pirrolidona (NMP). A caracterização físico-química demonstrou a formação de sistemas nanométricos com uniformidade de distribuição de gotículas e pH compatível com o da superfície da pele. A utilização do excipiente NMP proporcionou maior região microemulsionada ao sistema no diagrama pseudoternário de fases, além de maior capacidade de solubilização de DAP e, conseqüentemente, maior fluxo de liberação *in vitro* quando comparada a ME contendo MIP. O aumento da quantidade de

tensoativos proporcionou um menor fluxo de liberação do ativo nas ME contendo NMP. A utilização de MIP como fase oleosa promoveu o maior fluxo de permeação na epiderme, o qual apresenta cinética de permeação do tipo Higuchi, demonstrando que o nanossistema facilitou a transposição da DAP pela barreira cutânea. Estudos de estabilidade comprovaram a estabilidade física e química da ME utilizando-se o MIP como fase oleosa durante 180 dias. Este trabalho, portanto, indica que a incorporação de DAP em ME apresenta-se como um sistema promissor, estável e eficaz na administração tópica de DAP capaz de promover a permeação cutânea.

Palavras-chave: HANSENÍASE, DAPSONA, MICROEMULSÃO, TRATAMENTO TÓPICO.

ABSTRACT

BORGES, V.R.A. **Development of new microemulsions dapsone for topical treatment of leprosy**. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Leprosy is a chronic infectious disease that is manifested by dermatoneurological symptoms. Chosen drug for treatment is dapsone (DAP), due to its bacteriostatic and anti-inflammatory properties. Its applicability can be extended to various skin diseases of inflammatory nature. Topical administration of DAP can be an alternative adjunctive therapy for treatment of leprosy, and can provide new therapeutic applications of the drug. However, the characteristics of dapsone difficult its incorporation into conventional formulations and topical use in stratum corneum which is an effective barrier to the penetration of the drug. So one can consider the incorporation of DAP in colloidal nanosystems, such as microemulsions (MEs) as an important tool to increase the solubility of DAP and promote skin permeation. The purpose of this work was to develop MEs containing DAP. The MEs were characterized and evaluated for release and permeation in vitro epidermal. Two substances were evaluated as oily phase, isopropyl myristate (IPM) and n-methyl-pyrrolidone (NMP). The physicochemical characterization showed the formation of nanosystems with uniform distribution of droplets and pH compatible with the skin surface. The use of excipient NMP provided greater region of the microemulsion system, higher solubilization of DAP and increased flow release in vitro when compared to ME containing IPM. Increased amounts of surfactant resulted in a lower release of active flow in the ME containing NMP. However, the use of IPM as oily phase promoted the increased flow permeation in epidermis in vitro, through the

kinetics of permeation of the Higuchi type, demonstrating that the nanosystem has facilitated the implementation of DAP by the skin barrier. The studied microemulsion formulation showed a good physical and chemical stability for a period of 3 months. These results indicate that the incorporation of DAP in ME might be a promising, stable and effective mean to promote for topical delivery of DAP permeation.

Keywords: LEPROSY, DAPSONE, MICROEMULSION, TOPICAL TREATMENT

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Antiinflamatórios não-esteróides
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAP	Dapsona
DD	Dimorfo-dimorfo
DDS-NOH	Hidroxilamina dapsona
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DT	Dimorfo-tuberculoide
DV	Dimorfo virchowiano
EC	Estrato córneo
EE	Estado estacionário
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
FDA	Food and Drug Administration
FO	Fase oleosa
IC	Inclinação da curva de calibração
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MADDS	Monoacetildapsona
MB	Multibacilares
ME	Microemulsões
MIP	Miristato de isopropila
MP	Microemulsão pronta

NMP	N-metil-pirrolidona
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilares
pKa	Constante de dissociação ácida
PQT	Terapias poliquimioterápicas
r	coeficiente de correlação
rpm	rotação por minuto
SE	Solução estoque
SR	Solução receptora
T	Tuberculoide
t_{lag}	<i>Lag time</i>
UV	Ultravioleta
V	Virchowiano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxa de prevalência de hanseníase, no início de 2009.	27
Figura 2 – Tipos de lesões em pacientes de hanseníase.	28
Figura 3 - Histopatologia de lesões hansênicas: a) Hanseníase tuberculóide: um proeminente infiltrado granulomatoso de linfocitos ao longo dos nervos dérmicos. b) Hanseníase Virchowiana: Infiltrado difuso na derme por numerosos histiócitos, com a preservação dos papilares dérmicos.	29
Figura 4 – Rota metabólica da dapsona. MADDS = monoacetil dapsona. DDS-NOH = hidroxialamina dapsona.	33
Figura 5 – Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.	35
Figura 6 – Camadas da epiderme: Estrato córneo, granuloso, espinhoso e germinativo.	36
Figura 7 – Representação gráfica da 2ª Lei de Fick, num perfil cumulativo do fármaco permeado por área (Q/A) em função do tempo, com indicação do <i>lag-time</i> (t_{lag}).	40
Figura 8 - Esquema representativo das vias de penetração do fármaco através do estrato córneo.	40
Figura 9 – Representação esquemática da organização das microemulsões	44
Figura 10 – representação da célula de Franz. A) preenchimento do compartimento doador. B) Célula de Franz totalmente montada.	63
Figura 11 – Sistema de células de difusão tipo Franz.	64
Figura 12 – Procedimento de preparo da membrana natural até extração da epiderme. “A” e “B” – delimitação da epiderme a ser utilizada; “C” – Retirada da derme + epiderme; “D” – fragmento limpo da epiderme e derme; “E” – separação da epiderme da derme; “F” – fragmento do extrato córneo.	66
Figura 13 - Espectro de Infravermelho: A) Dapsona – matéria-prima B) Dapsona - padrão primário (USP).	71
Figura 14 – Visualização do aspecto homogêneo da ME A.	75
Figura 15 - Distribuição de tamanho de gotícula. A = representa uma análise da formulação A sem o fármaco. B = representa uma análise da	76

formulação B sem fármaco.

Figura 16 – Solubilidade da dapsona nas formulações.	78
Figura 17 - Diagrama pseudoternário de fases. Tensoativos = tween 80:span 20 (1:1); Fase Oleosa = NMP : isobutanol (8:1) ; Fase aquosa = água. Área demarcada corresponde a área de microemulsão.	83
Figura 18 – Diagrama pseudo-ternário indicando as formulações C e D. Área demarcada em cinza = microemulsão. Área demarcada em azul = região em que se possui maior quantidade de água e de tensoativos em relação a formulação E.	84
Figura 19 – Cromatograma de injeção obtido para DAP.	91
Figura 20 – Cromatograma de varredura tridimensional da microemulsão contendo DAP.	93
Figura 21 – Pureza cromatográfica obtida por similaridade amostra de DAP nas microemulsões.	93
Figura 22 – Razão cromatográfica do sinal obtido da injeção da amostra de DAP nas microemulsões.	94
Figura 23 – Curva padrão para teste de linearidade (N = 3).	95
Figura 24 - Cromatograma de injeção obtidos para estudos de liberação e permeação <i>in vitro</i> : a) formulação A sem o fármaco; b) formulação contendo DAP.	103
Figura 25 – Cromatograma de varredura tridimensional da amostra de DAP utilizando como diluente a solução receptora.	104
Figura 26 - Pureza cromatográfica obtida por similaridade de espectros de amostras de DAP diluídos na solução receptora.	104
Figura 27 – Razão cromatográfica do sinal obtido da injeção da amostra de DAP nas microemulsões diluídas em solução receptora.	
Figura 28 – curva padrão para teste de linearidade aplicados aos testes de liberação e permeação <i>in vitro</i> (n = 3).	99
Figura 29 – Quantidade de DAP liberada <i>in vitro</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em diferentes tempos (0-24h) das formulações A-FO, A-ME, B-FO, B-ME, C-FO, C-ME, D-FO, D-ME.	111
Figura 30 – Quantidade de DAP permeada <i>in vitro</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo através da epiderme de orelha suína das MEs A-FO, B-FO, C-FO e D-FO.	118

LISTA DE QUADROS

Quadros 1 – Poliquimioterapia para adultos	31
Quadros 2 – Poliquimioterapia para crianças	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Faixa de fusão de DAP	70
Tabela 2 - Percentual de DAP por Espectrofotometria por UV	72
Tabela 3 – Composição das formulações A e B propostas	75
Tabela 4 – Avaliação do tamanho de gotículas das formulações A e B sem o fármaco	76
Tabela 5 – Estabilidade visual da ME A com diferentes concentrações de ativo durante 60 dias	79
Tabela 6 – Estabilidade visual da ME B com diferentes concentrações de ativo durante 60 dias	80
Tabela 7 – Determinação do tamanho médio de gotícula das formulações A e B na presença do fármaco incorporado na fase oleosa (FO) e na microemulsão pronta (MP)	81
Tabela 8 – Composição e o planejamento das novas formulações propostas	84
Tabela 9 – Tamanho médio de gotículas das formulações C e D, na ausência do fármaco e na presença do fármaco incorporado na fase oleosa (FO) e na microemulsão pronta (MP)	85
Tabela 10 – Análises de condutividade e índice de refração das formulações A, B, C e D, na ausência do fármaco e na presença do fármaco incorporado na fase oleosa e na microemulsão já pronta	86
Tabela 11 - Análises de pH das formulações A, B, C e D, na ausência do fármaco e na presença do fármaco incorporado na fase oleosa e da microemulsão já pronta	89

Tabela 12 – Parâmetros provenientes das curvas padrão (5 níveis)	95
Tabela 13 – Precisão intra-dia e inter-dia	96
Tabela 14 – Resultados da análise de precisão de injeção	97
Tabela 15 – Porcentagem média de recuperação no teste de exatidão	98
Tabela 16 – Análise de DAP nas MEs	99
Tabela 17 - Concentração de saturação da DAP em solução salina, tampão fosfato pH 7,4 0,1M e tampão fosfato pH 6,8 0,1M na presença de diferentes quantidade de polissorbato 80 (T80)	101
Tabela 18 – Parâmetros provenientes das curvas padrão (5 níveis)	106
Tabela 19 – Resultados de precisão intra-dia e inter-dia, em cada dia de análise	107
Tabela 20 – Porcentagem média de recuperação no teste de exatidão	108
Tabela 21 - Quantidades cumulativas de DAP liberada em cada tempo na SR nos estudos de liberação <i>in vitro</i> (n = 6) das formulações A-FO, A-MP, B-FO, B-MP	110
Tabela 22 - Quantidades cumulativas de DAP liberada em cada tempo na SR nos estudos de liberação <i>in vitro</i> (n = 6) das formulações C-FO, C-MP, D-FO e D-MP	111
Tabela 23 – Tratamento estatístico (<i>one-way</i> ANOVA – Teste de Tukey) dos resultados dos estudos de liberação <i>in vitro</i> das formulações A-FO, A-ME, B-FO, B-ME, C-FO, C-ME, D-FO e D-ME	112

Tabela 24 – Cinética de liberação nos estudos de liberação <i>in vitro</i> das formulações desenvolvidas. Valores de fluxo (J), <i>Lag time</i> , quantidade liberada de DAP após 24 h e coeficiente de correlação linear	114
Tabela 25 - Quantidades cumulativas por área de DAP permeada em cada tempo na SR nos estudos de permeação <i>in vitro</i> das formulações A-FO, B-FO, C-FO, D-FO	117
Tabela 26 – Tratamento estatístico (<i>one-way</i> ANOVA – Teste de Tukey) dos resultados dos estudos de permeação <i>in vitro</i> das formulações A-FO, B-FO, C-FO, D-FO	118
Tabela 27 - Cinética de permeação nos estudos de liberação <i>in vitro</i> das formulações desenvolvidas. Valores de fluxo (J), <i>Lag time</i> , quantidade liberada de DAP após 24 h e coeficiente de correlação linear.	119
Tabela 28 – Resultados do estudo de estabilidade a temperatura ambiente da formulação A-FO contendo 2,0% de DAP	121

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
1.1.	HANSENÍASE	26
1.1.1.	Manifestações clínicas da hanseníase	28
1.1.2.	Histopatologia das lesões	29
1.1.3.	Tratamento	30
1.2.	DAPSONA	32
1.3.	ESTRUTURA DA PELE	35
1.4.	ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS	37
1.5.	NANOTECNOLOGIA	42
1.6.	MICROEMULSÕES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TÓPICA	43
2.	OBJETIVOS	46
2.1.	OBJETIVO GERAL	47
2.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO	47
3.	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1.	MATERIAL	49
3.1.1.	Equipamentos e acessórios	49

3.1.2. Excipientes e reagentes	50
3.1.3. Fármaco	51
3.1.4. Material Biológico	51
3.2. MÉTODOS	51
3.2.1. Caracterização da matéria-prima	51
3.2.1.1. Faixa de fusão	51
3.2.1.2. Espectrometria no infravermelho	51
3.2.2. Quantificação do fármaco dapsona	52
3.2.2.1. Preparo da solução padrão	52
3.2.2.2. Preparo da solução amostra	52
3.2.3. Desenvolvimento das microemulsões	52
3.2.3.1. Confecção do diagrama de fases	53
3.2.4. Incorporação da dapsona nas microemulsões desenvolvidas	54
3.2.5. Caracterização das microemulsões	54
3.2.5.1. Análise do tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de luz	54
3.2.5.2. Análise de Condutividade Elétrica	55
3.2.5.3. Análise de Índice de Refração	56
3.2.5.4. Análise de Teor da DAP nas MEs	56
3.2.5.4.1. <i>Preparo da curva padrão</i>	56

3.2.5.4.2. <i>Preparo da solução amostra</i>	57
3.2.6. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação da DAP nas formulações	57
3.2.6.1. Preparo da solução amostra	57
3.2.6.2. <i>Validação do método</i>	57
3.2.6.2.1. <i>Especificidade e seletividade</i>	58
3.2.6.2.2. <i>Linearidade</i>	58
3.2.6.2.3. <i>Precisão intra-corrída e inter-corrída</i>	58
3.2.6.2.4. <i>Precisão de volume de injeção</i>	59
3.2.6.2.5. <i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	59
3.2.6.2.6. <i>Exatidão</i>	59
3.2.7. Escolha e preparo do meio receptor para teste de liberação e permeação <i>in vitro</i>	60
3.2.8. Validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de DAP nos ensaios de liberação e permeação <i>in vitro</i>	60
3.2.8.1. Preparo da solução estoque (SE) de DAP	61
3.2.8.2. Preparo da solução amostra para ensaios de liberação e permeação <i>in vitro</i>	61
3.2.8.3. Validação do método	61
3.2.8.3.1. <i>Especificidade</i>	61
3.2.8.3.2. <i>Linearidade</i>	61

3.2.8.3.3.	<i>Precisão intra-corrída e inter-corrída</i>	62
3.2.8.3.4.	<i>LD e LQ</i>	62
3.2.8.3.5.	<i>Exatidão</i>	62
3.2.9.	Estudo de liberaçãõ <i>in vitro</i>	62
3.2.9.1.	Preparo da membrana sintética	62
3.2.9.2.	Montagem das células de Franz	63
3.2.9.3.	Coleta e quantificação das amostras	64
3.2.9.4.	Análise de cinética de liberaçãõ <i>in vitro</i>	65
3.2.9.5.	Tratamento estatístico	65
3.2.10.	Estudo de permeabilidade <i>in vitro</i>	66
3.2.10.1.	Preparo da membrana natural	66
3.2.10.2.	Montagem das células de Franz	67
3.2.10.3.	Coleta e quantificação das amostras	67
3.2.10.4.	Estudo de cinética de permeaçãõ <i>in vitro</i>	67
3.2.11.	Avaliaçãõ da estabilidade da microemulsãõ	68
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO	70
4.1.1.	Ponto de fusãõ	70

4.1.2. Infravermelho	70
4.1.3. Quantificação do fármaco dapsona	72
4.2. OBTENÇÃO DOS SISTEMAS MICROEMULSIONADOS	73
4.2.1. Seleção dos componentes	73
4.2.2. Obtenção dos sistemas microemulsionados	75
4.2.3. Seleção de novas formulações contendo NMP	81
4.2.4. Análise físico-química	86
4.3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DE DAP NAS FORMULAÇÕES	90
4.3.1. Condições cromatográficas	91
4.3.2. Validação da metodologia analítica	92
4.3.2.1. Especificidade e seletividade	92
4.3.2.2. Linearidade	94
4.3.2.3. Precisão intra-corrída e intermediária	96
4.3.2.4. Precisão de injeção	97
4.3.2.5. Exatidão	98
4.3.2.6. Limite de quantificação e detecção	98
4.4. ANÁLISE DE TEOR DE DAP NAS MICROEMULSÕES	99
4.5. ESCOLHA DA SOLUÇÃO RECEPTORA PARA OS ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i>	100
4.6. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE DAP EM ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E	102

DE PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i>	
4.6.1. Especificidade e Seletividade	102
4.6.2. Linearidade	105
4.6.3. Precisão intra e inter-dia	107
4.6.4. Exatidão	108
4.6.5. Limites de quantificação e de detecção	109
4.7. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	109
4.7.1. Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i>	114
4.8. TESTE DE PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i>	116
4.9. ESTUDO DE ESTABILIDADE	121
5. CONCLUSÕES	123
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

1. INTRODUÇÃO

1.1. HANSENÍASE

A Hanseníase conhecida popularmente como Lepra é uma doença infecto-contagiosa, que se manifesta por sintomas dermatoneurológicos. Sua principal característica é o comprometimento dos nervos periféricos, ocasionando grande potencial para provocar incapacidades físicas (ARAÚJO, 2003; FEASEY *et al.*, 2010).

Estas incapacidades e, principalmente, as deformidades causadas pela moléstia, são responsáveis por um passado de discriminações, preconceitos e tabus contra a doença e que ainda perduram até os dias atuais. Isso resulta numa diminuição da capacidade de esforço físico dos doentes, problemas psicológicos e limitação da vida social (PANIKER & LEVINE, 2001; MAGALHÃES & ROJAS, 2007).

Estima-se que no mundo hajam 6.000.000 de pessoas afetadas pela doença. Durante o ano de 2009, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 141 países foram notificados 244.796 casos novos da doença, dos quais 133.717 (54,6%) detectados na Índia, país com maior número de casos novos, seguido pelo Brasil com 37.610 (15,4%) e Indonésia com 17.260 (7,1%) (MAGALHÃES & ROJAS, 2007; WHO, 2010).

A prevalência de casos novos no território brasileiro, em 2009, foi de 2,04 por 10.000 habitantes e, de acordo, com esta estatística, ainda permanece distante de ser considerado como uma área não endêmica (1 caso em 10.000 habitantes) (Figura 1) (WHO, 2010). A hanseníase, portanto, constitui um problema de saúde pública brasileira, cuja eliminação está entre as ações prioritárias do Ministério da Saúde (MAGALHÃES & ROJAS, 2007; STONE *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010a).

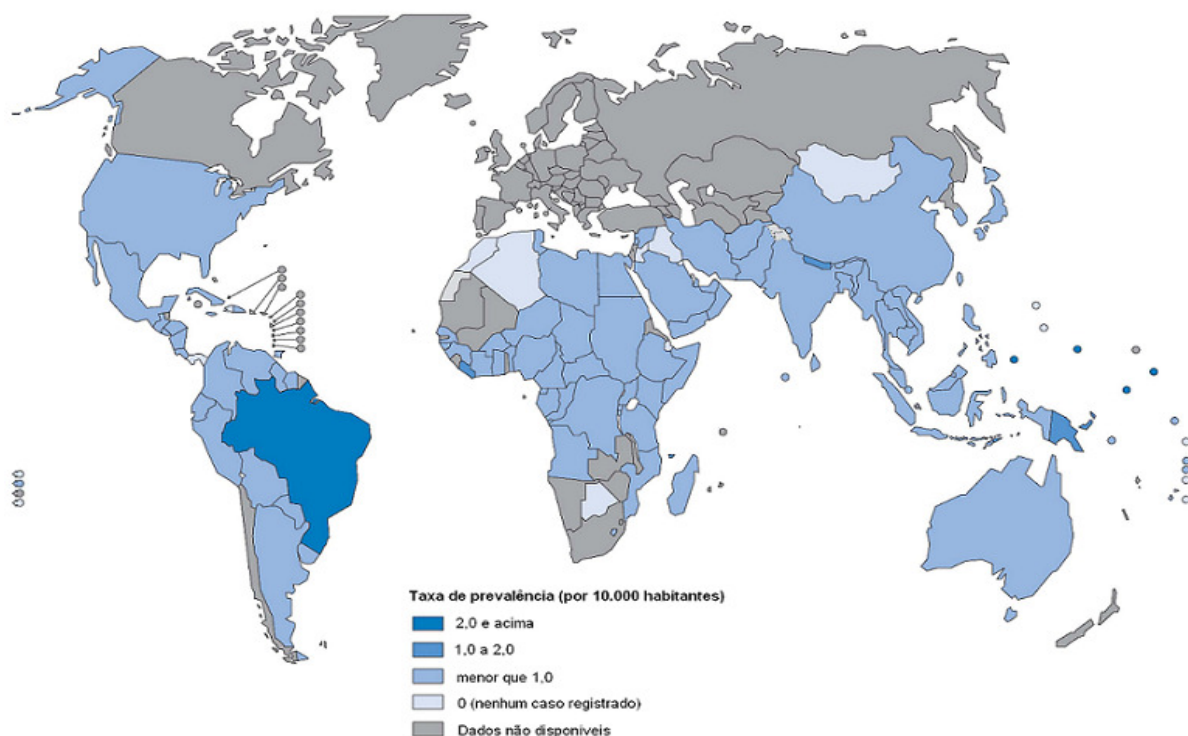


Figura 1 – Taxa de prevalência de hanseníase, no início de 2009 (adaptado de WHO, 2009).

O agente etiológico da hanseníase é o *Mycobacterium leprae*, conhecido também como *bacilo de Hansen*. É um parasita intracelular, com maior afinidade para as células de Schwann e macrófagos. É álcool-ácido resistente, de alta infectibilidade e baixa patogenicidade, ou seja, é capaz de infectar muitas pessoas, porém poucas manifestam a doença (ARAÚJO, 2003). O organismo infectado pelo *M. leprae* tem de apresentar uma temperatura de aproximadamente 35°C, por isso o bacilo se localiza preferencialmente na pele e, nas formas mais graves da doença, pode ser encontrado em regiões que não oferecem resistência à sua multiplicação, como linfonodos, olhos, testículos e fígado (ARAÚJO, 2003; PIRIS, LOBO & MOSCHELLA, 2010).

O homem é considerado a única fonte de infecção da hanseníase. A transmissão da doença se dá através de uma pessoa doente, não tratada, que elimina o bacilo viável para o meio externo por meio, principalmente, das vias aéreas, contagiando as pessoas susceptíveis (MAGALHÃES & ROJAS, 2007).

1.1.1. Manifestações Clínicas da Hanseníase

A Hanseníase se manifesta através de lesões na pele, sempre associadas com diminuição ou ausência de sensibilidade. Esta associação confere seu grande diferencial em relação a outras doenças com sintomas semelhantes. As lesões características da hanseníase (Figura 2) são manchas avermelhadas ou discrômicas e lesões em placa, nódulos e infiltrações (BRASIL, 2002; ARAÚJO, 2003; MAGALHÃES & ROJAS, 2007).

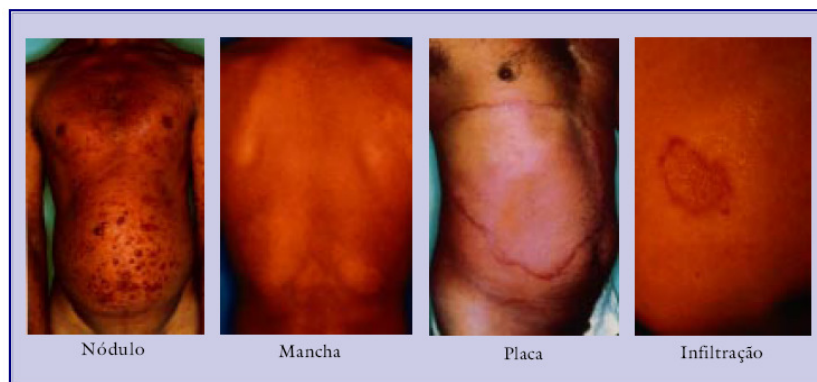


Figura 2 – Tipos de lesões em pacientes de hanseníase (BRASIL, 2002)

A variação da manifestação clínica da hanseníase está intimamente relacionada com a resposta imune do hospedeiro frente ao bacilo, em que dependendo da sua potencialidade de resposta há possibilidade de diversas formas clínicas (MARTINEZ, 2010). Segundo a classificação proposta por Ridley e Jopling (1966), cinco diferentes grupos podem ser enquadrados: a forma tuberculóide (T), a dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV) e virchowiano (V). Neste espectro, em um dos pólos da doença está a forma T, a qual apresenta uma vigorosa imunidade mediada por células contra o bacilo, resultando em poucas lesões na pele e uma baixa carga bacteriana (ARAÚJO, 2003; MARTINEZ, 2010).

No outro extremo, pacientes contendo a forma V apresentam reduzida ou muito fraca resposta celular específica aos antígenos do *M.leprae*, tendo como consequência muitas lesões na pele e alta carga bacteriana. Entretanto, a maioria dos pacientes em áreas endêmicas apresenta as formas intermediárias deste espectro, DT, DD ou DV.

Essas formas são imunologicamente instáveis, significando que um caso de hanseníase pode mudar de uma forma para outra (MOET *et al.*, 2004; MARTINEZ, 2010).

1.1.2. Histopatologia das lesões

Histologicamente, a forma T da hanseníase apresenta um infiltrado granulomatoso da derme, composto por células epitelióides e gigantes do tipo Langerhans, que são circundados por linfócitos. O infiltrado é caracterizado por um padrão linear ao longo dos nervos, que envolve a derme papilar até a epiderme. Enquanto os bacilos são muito difíceis de se encontrar, mesmo com colorações especiais (Figura 3) (PIRIS, LOBO & MOSCHELA, 2010).

A hanseníase V é caracterizada histologicamente por um infiltrado difuso na derme, constituído por macrófagos com um aspecto espumoso. Este infiltrado é separado da epiderme por uma zona de Grenz. As células de Virchow contêm numerosos bacilos e gotículas lipídicas no seu citoplasma (Figura 3) (PIRIS, LOBO & MOSCHELA, 2010).

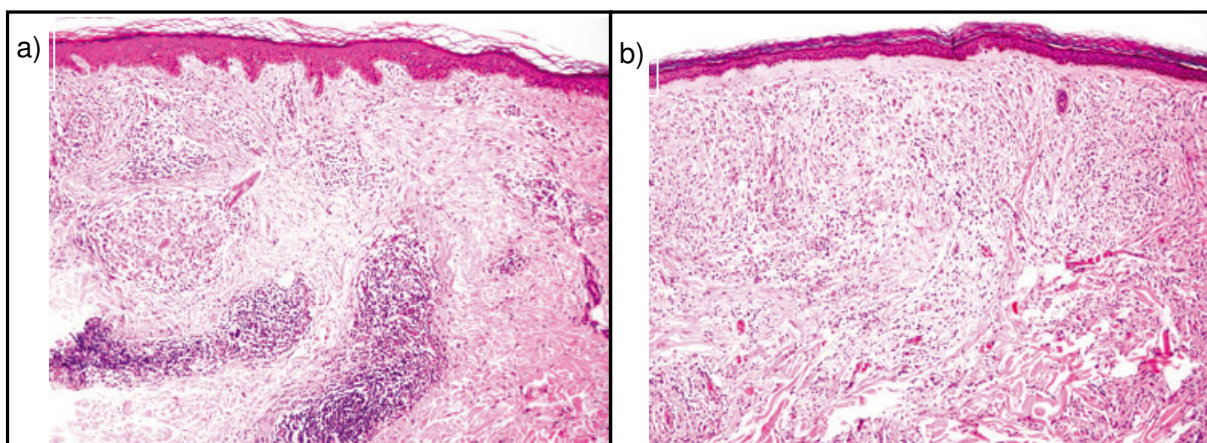


Figura 3 - Histopatologia de lesões hansênicas: a) Hanseníase tuberculóide: um proeminente infiltrado granulomatoso de linfohistiócitos ao longo dos nervos dérmicos. b) Hanseníase virchowiana: Infiltrado difuso na derme por numerosos histiócitos, com a preservação dos papilares dérmicos

Na hanseníase “*borderline*”, os achados histológicos são uma mistura das características observadas nas formas polares (T e V). As observações incluem um aumento do número de linfócitos, maior relação com nervos e aumento da circunscrição granulomatosa, à medida que se aproxima da forma polar T. Na forma subpolar V da hanseníase, são observadas células plasmáticas além dos histiócitos e linfócitos (PIRIS, LOBO & MOSCHELA, 2010).

1.1.3. Tratamento

O Ministério da Saúde Brasileiro define como um caso de hanseníase para tratamento, quando um indivíduo apresenta um ou mais dos seguintes sintomas: lesão na pele com alteração de sensibilidade, espessamento de tronco nervoso e/ou baciloscopia positiva na pele, que é o exame microscópico onde se observa o *M. leprae* diretamente nos esfregaços de raspados intradérmicos das lesões ou de outros locais de coleta selecionados: lóbulos auriculares e/ou cotovelos, e outras lesões, quando houver (BRASIL, 2002; ARAÚJO, 2003).

O tratamento de pacientes já diagnosticados com hanseníase é fundamental para a interrupção da cadeia de transmissão da doença, sendo estratégico na eliminação da hanseníase enquanto problema de saúde pública. A melhor estratégia de intervenção para a redução do número de casos da hanseníase se baseia na agilidade de detecção de novos casos, associada a um tratamento eficaz à disposição das unidades de saúde. Isso se deve ao fato, conforme mencionado anteriormente, de o hospedeiro ser o homem e o bacilo ser altamente transmissível, desta forma, quanto mais rápido se diagnosticar e tratar o paciente, mais rápida será a interrupção da cadeia de transmissão da doença (MOET *et al.*, 2004; WHO, 2010).

O Ministério da Saúde Brasileiro classifica os pacientes com hanseníase em paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB), baseado no número de lesões na pele. É denominado PB o paciente que possuir até cinco lesões na pele e MB, o paciente que apresentar mais de cinco lesões. Esta classificação permite designar terapias poliquimioterápicas (PQT) específicas aos pacientes PB ou MB adultos e infantis, as

quais são constituídas pelos fármacos: rifampicina, dapsona e clofazimina, com administração estritamente oral (quadro 1 e 2) (BRASIL, 2002; MOET *et al.*, 2004).

Quadro 1 – Poliquimioterapia para adultos

	Dapsona	Rifampicina	Clofazimina
Multibacilar	100mg/dia	600mg/mês	300mg/mês 50mg/dia
Paucibacilar	100mg/dia	600mg/mês	--

FONTE: Brasil, 2002.

Quadro 2 – Poliquimioterapia para crianças

	Faixa etária (anos)	Dapsona	Rifampicina	Clofazimina
Paucibacilar	0 a 5	25mg/dia	150 a 300mg/mês	---
	6 a 14	50 a 100mg/dia	300 a 450 mg/mês	---
Multibacilar	0 a 5	25mg/dia	150 a 300mg/mês	100mg/semana
	6 a 14	50 a 100mg/dia	300 a 450 mg/mês	150mg/semana

FONTE: Brasil, 2002.

Admite-se que a transmissão da hanseníase seja principalmente pelas vias respiratórias. Contudo, não existem indícios conclusivos de que a transmissão seja exclusivamente por esta via, podendo ocorrer por via cutânea quando existem lesões ulceradas ou traumáticas na pele. Neste contexto, pacientes multibacilares constituem a principal fonte de infecção por apresentar elevada carga bacilar na derme e em mucosas, o que pode eliminar bacilos para o meio externo (MOET *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2010a).

Como visto, a hanseníase é uma doença com manifestação clínica dérmica e com seu agente etiológico localizado, preferencialmente, nas camadas da pele. Sendo assim, uma interessante estratégia para auxiliar no tratamento das lesões hansênicas seria a administração tópica de medicamentos para direcionar o fármaco em seu sítio de ação e, com isto, proporcionar aumento de sua eficácia clínica com redução da toxicidade sistêmica.

Dentre os fármacos utilizados na PQT específica da hanseníase, destaca-se a dapsona, a qual através de suas ações anti-inflamatória e bacteriostática contra o *M. leprae*, possui efeitos tanto na inibição do agente etiológico quanto na diminuição dos eventos inflamatórios de suas manifestações clínicas (SAGO & HALL, 2002).

1.2. DAPSONA

A dapsona (DAP), 4,4'-diaminodifenilsulfona, é um fármaco pertencente ao grupo das sulfonas, descoberta em 1908 (FARHI *et al.*, 2005). Desde 1943, a DAP é utilizada no tratamento da hanseníase. É um fármaco que apresenta alta permeabilidade nas membranas biológicas e baixa solubilidade em água, sendo categorizada na Classe II, segundo classificação biofarmacêutica proposta por Amidon e colaboradores (1995) (LINDENBERG, KOPP & DRESSMAN, 2004).

Quando administrada por via oral, a dapsona possui absorção lenta e quase completa pelo trato gastrointestinal apresentando biodisponibilidade superior a 86% da dose ingerida. Em caso de hanseníase severa sua absorção é diminuída (ZHU & STILLER 2001; SAGO & HALL, 2002). Em voluntários adultos saudáveis, o pico da concentração plasmática ocorre de 1 a 4 horas. Possui tempo de meia-vida plasmática de 12 a 30 horas, apresentando concentração terapêutica plasmática para a hanseníase de 0,5 a 5,0 mg/L. Estes níveis são estabilizados a partir de 8 a 10 dias de tratamento. Em crianças, a farmacocinética é similar a dos adultos, em que uma dosagem de 2 mg/kg/dia resulta em concentrações equivalentes às encontradas em adultos, quando administrados 100 mg/dia (ZHU & STILLER, 2001; SAGO & HALL, 2002).

Após absorção, a dapsona é metabolizada pelo fígado e por leucócitos. No fígado, é acetilada pela n-acetiltransferase a monoacetildapsona (MADDS) e, através de hidroxilação enzimática, resulta no composto hidroxilamina dapsona (DDS-NOH) (Figura 4), sendo este último, o mais importante fator para eficácia e indução de efeitos adversos (WOZEL, 2010).

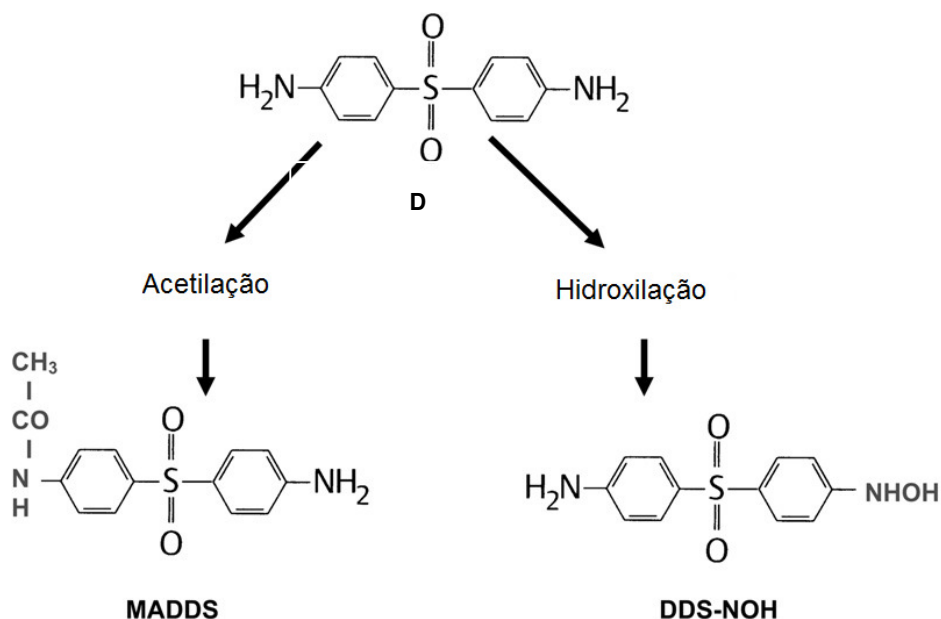


Figura 4 – Rota metabólica da dapsona. MADDS = monoacetil dapsona. DDS-NOH = hidroxilamina dapsona (fonte: adaptado de WOZEL, 2010)

Sua função bacteriostática está relacionada com a inibição da síntese de ácido fólico através da competição com o *p*-aminobenzoato pelo sítio ativo da dihidropteroato sintetase, inibindo, assim, o crescimento de microrganismos, como o *M. leprae* (SAGO & HALL, 2002). Enquanto que o mecanismo de ação bacteriostático é bem elucidado, sua ação anti-inflamatória ainda não é muito bem entendida.

São crescentes as pesquisas explorando a evidência de que a dapsona e seus metabólitos, MADDS e DDS-NOH, sejam, efetivamente, considerados compostos farmacologicamente ativos para atividade anti-inflamatória. Estudos indicam que a dapsona é efetiva em dermatoses com acumulação anormal de neutrófilos através de diferentes mecanismos, como por exemplo: inibição da síntese espontânea ou induzida

por prostaglandina E₂; inibição da ciclooxigenase; efeito protetor sobre o inibidor da protease A1. Entretanto, vale ressaltar que esses dados foram obtidos por variados métodos e em diferentes condições experimentais, não sendo possível definir qual mecanismo é o mais válido para uso humano (GRUNWALD & AMICHAÏ, 1996; ZHU & STILLER, 2001; WOZEL, 2010).

Também é relatado na literatura, que o fármaco dapsona através de seus metabólitos, o MADDS e o DDS-NOH, possui similaridades aos anti-inflamatórios não-esteróides (AINES), cujo mecanismo de ação envolve a inibição da ciclooxigenase, a enzima-chave para a síntese dos prostanóides e tromboxanos (WOZEL, 2010).

Atualmente, a dapsona é aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América para o tratamento de pacientes com hanseníase e também para dermatite herpetiforme. No mercado internacional, encontra-se disponível o medicamento Aczone[®], o qual tem sua apresentação na forma de géis contendo 5% de dapsona, recomendado para o tratamento da acne. No Brasil, não existe registro de medicamentos de aplicação tópica contendo o fármaco dapsona (ROBERTS *et al.*, 2005; THIBOUTOT *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2005; DRAELOS *et al.*, 2007).

Dado o exposto, nos últimos anos, são crescentes as pesquisas explorando a atividade anti-inflamatória da DAP em diversas enfermidades cutâneas, como a acne, doença de Behcet, epidermólise bolhosa adquirida, dermatite herpetiforme, sarcoma de Kaposi e lúpus eritematoso (FORD, 2000; PANIKER & LEVINE, 2001; FARHI *et al.*, 2005).

Neste contexto, a via de administração tópica da DAP seria uma eficiente estratégia tanto para o tratamento alternativo da hanseníase quanto para suas indicações cutâneas.

1.3. ESTRUTURA DA PELE

Como maior órgão do corpo humano, a pele exerce inúmeras funções vitais, como termorregulação, metabólica e é uma excelente barreira biológica contra patógenos, agressões ambientais e perda de nutrientes. Esta proteção só é possível devido à sua estrutura bem organizada, conferida por vários tecidos associados em três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 5) (BOWSTRA *et al.*, 2003; GELFUSO, 2009; CEVC & VIERL, 2010).

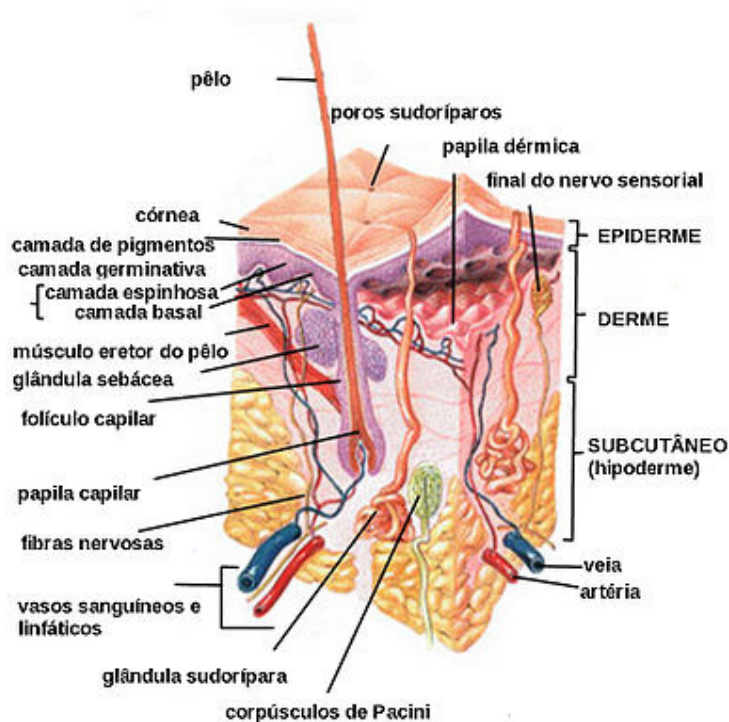


Figura 5 – Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de <http://bioaula.loja.ghi.com.br>)

A epiderme é o tecido mais externo da pele. Caracteriza-se por ser avascular e estratificada, com espessura oscilando de 0,006 mm nas pálpebras a 0,8 mm na sola dos pés. Suas células são originadas na ectoderme que, por processo de reprodução continuada, promovem a renovação da epiderme a cada 4 semanas. A diferenciação celular permite dividir a epiderme em camada basal ou germinativa, espinhosa, granulosa e estrato córneo (EC) (Figura 6) (SOUZA, 2003; HARRIS, 2009).

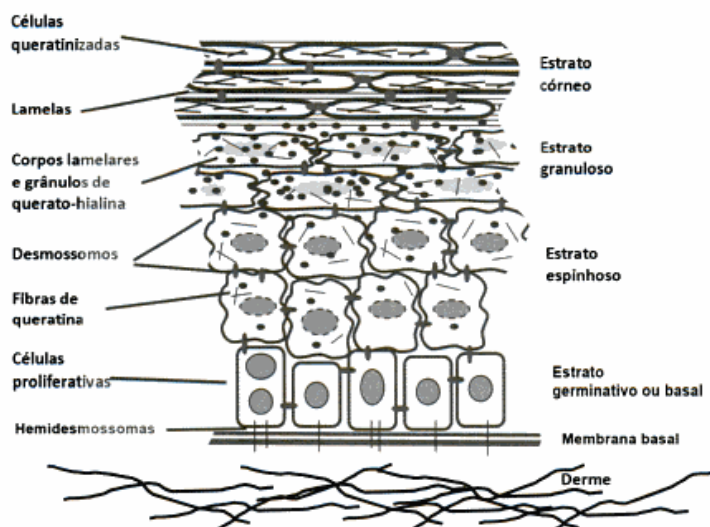


Figura 6 – Camada da epiderme: Estrato córneo, granuloso, espinhoso e germinativo (adaptado de HARRIS, 2009)

A camada germinativa é a camada mais interna da pele, estabelece a união com a derme e a sustentação da epiderme. Constituída por células matrizes (*stem cells*) e proliferativas, que iniciam o processo de diferenciação celular. Após profundas modificações estruturais e histoquímicas durante a migração em direção ao estrato espinhoso e granuloso, culminam na formação do EC (SOUZA, 2003; HARRIS, 2009).

A camada periférica da epiderme, o EC, é formada por fileiras de células mortas, anucleadas e constituídas por queratina, denominadas corneócitos. No espaço intercelular dos corneócitos, apresenta uma bicamada lipídica, constituída por ceramidas (40 a 49%), colesterol (20 a 25%), sulfato de colesterila (10%), éster de colesterila (0,7%), fosfolípidios (0,1%), triacilgliceróis (2,6%) e ácidos graxos livres (25%) (STORPIRTIS *et al.*, 2009). Esta constituição confere à matriz lipídica coesividade, com característica hidrofóbica, o que, associado ao alto grau de compactação dos corneócitos, desempenha um importante papel na função de barreira da pele, inibindo a passagem de microrganismos e de agentes tóxicos, além de reter água e eletrólitos (BOWSTRA *et al.*, 2003; HARRIS, 2009)

Subjacente à epiderme, apresenta-se a derme. Geralmente, é de 5 a 20 vezes mais espessa que a epiderme, compreendendo de 1 a 2 mm de espessura. Essa região da pele apresenta poucas células, predominantemente fibroblastos e adipócitos, em meio a uma substância amorfa e é responsável pela elasticidade e suporte mecânico. É a partir da derme que se desenvolvem o folículo piloso e as glândulas sebáceas e sudoríparas (BOWSTRA et al., 2003; CEVC & VIERL, 2010).

Por fim, a hipoderme é caracterizada por tecido gorduroso, constituído de lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos. Possui propriedades protetoras contra traumatismos e variações térmicas e de armazenamento energético (SOUZA, 2003; AULTON, 2005).

1.4. ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS

As formas farmacêuticas devem ser projetadas para ceder o fármaco de forma a se obter a melhor resposta terapêutica possível, a partir da via de administração selecionada (AULTON, 2005). Em enfermidades cutâneas, particularmente, a hanseníase que apresenta seu agente patológico e lesões localizados na pele, a administração tópica possui vantagens como: manutenção da eficácia com menor dose diária do ativo; redução dos efeitos adversos indesejados; direcionamento do fármaco diretamente ao sítio de ação e maior adesão pelo paciente. Estes fatores credenciam a administração tópica como uma via alternativa adequada ao tratamento desta afecção.

Três abordagens são realizadas no delineamento de formulações tópicos: a) formulações com objetivo de manipular a barreira funcional da pele, tais como, os antibióticos tópicos que auxiliam a eliminar a infecção quando a barreira está danificada e as formulações fotoprotetoras que protegem os tecidos viáveis contra radiação ultravioleta; b) formulações com direcionamento do fármaco para tecidos viáveis da pele sem utilizar outras vias de administração; c) formulações destinadas à ação sistêmica, os sistemas de liberação transdérmicos, como por exemplo, os já consagrados na medicina, adesivos transdérmicos de nicotina utilizados no tratamento da síndrome da abstinência ao fumo (PUERTA & GARCÍ, 2004; AULTON, 2005; CHORILLI *et al.*, 2007).

A abordagem ideal para formulações contra hanseníase é a do direcionamento do fármaco nas diferentes camadas da pele ou em apêndices cutâneos. Nesse caso é importante que se avalie o grau de penetração, pois sua eficácia dependerá da concentração do fármaco nesses locais (CEVC & VIERL, 2010). O grande desafio destes produtos, portanto, é vencer a complexa e elevada barreira cutânea, sem que haja uma rápida absorção sanguínea (CHORILLI *et al.*, 2007; MATHUR, SATRAWALA & RAIPUT, 2010).

A penetração cutânea de fármacos ocorre por difusão passiva através da epiderme intacta e dos apêndices cutâneos (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas). O EC, em geral, funciona como o passo limitante da penetração do fármaco às camadas mais internas da pele, ao contrário da derme que não apresenta função significativa de barreira (AULTON, 2005; MATHUR, SATRAWALA & RAIPUT, 2010).

A difusão passiva através do EC pode ser explicada por meio de três etapas: primeiro, o fármaco é liberado de dentro do veículo para a superfície do EC; segundo, ocorre passagem do fármaco para o interior do EC, orientada pelo coeficiente de partição; terceiro, e talvez a de maior importância nos estudos de penetração cutânea, o fármaco difunde-se através do EC (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

A hipótese básica desta difusão é a de que a taxa de transferência da substância difundida por unidade de área de uma seção é proporcional ao gradiente de concentração medido perpendicularmente a essa seção (AULTON, 2005). Desta forma, as leis de difusão de Fick podem ser empregadas para analisar os dados de permeação e prever este comportamento (FÖRSTER *et al.*, 2009; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

A primeira lei de Fick é empregada para descrever o fluxo (J) que se estabelece no estado estacionário (EE) por área através da expressão:

$$J_{EE} = \frac{A \cdot D \cdot K_p (c_1 - c_2)}{H}$$

onde, “A” corresponde a área de contato; “D” é o coeficiente de difusão no espaço intercelular do EC; “Kp” é o coeficiente de partição do permeante entre a formulação aplicada e a pele; $(c_1 - c_2)$ é a diferença de concentração e “H” é a espessura da membrana (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Como pode ser observado, a primeira lei de Fick relaciona o fluxo somente em EE. Entretanto, para uma membrana heterogênea como a pele, um longo tempo é requerido para se alcançar o EE. Isto se deve ao fato de que, o gradiente de concentração durante a permeação cutânea desenvolve-se em diferentes camadas, o que promove distintos coeficientes de permeabilidade ao longo da membrana biológica, impedindo que o fluxo do fármaco seja constante desde o início de sua administração. Desta forma, o perfil cumulativo do fármaco permeado em função do tempo é caracterizado por uma curva não linear no início do estudo, seguida de uma reta representando o estado estacionário (Figura 7). A quantificação do fármaco no interior da membrana pode ser feita pela segunda lei de Fick (FÖRSTER *et al.*, 2009; STORPIRTIS *et al.*, 2009; HADGRAFT & LANE, 2001).

Em experimentos *in vitro* com dose infinita, o tempo em que o gradiente de concentração do fármaco se estabiliza no interior da membrana, representa o *lag-time* (t_{lag}) e pode ser calculado através da extrapolação da linha do EE (trecho constante do gráfico) até o eixo do tempo, onde o intercepto corresponde ao t_{lag} (Figura 7) (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

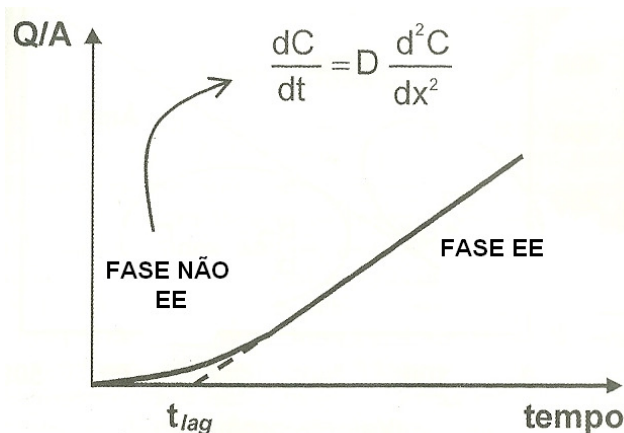


Figura 7 – Representação gráfica da 2ª Lei de Fick, num perfil cumulativo do fármaco permeado por área (Q/A) em função do tempo, com indicação do *lag-time* (t_{lag}). EE = estado estacionário.

(Adaptado de STORPIRITIS *et al.*, 2009)

De maneira geral, existem três rotas de difusão do fármaco na pele, conforme ilustra a Figura 8: via apêndices cutâneos (folículo piloso, glândulas sebáceas e sudoríparas) que antigamente não tinham valor significativo, mas atualmente estão sendo vistos como depósitos ou até mesmo facilitadores de transporte de substâncias; via intercelular, em que o fármaco se difunde apenas na matriz lipídica e via transcelular, entre os corneócitos (GELFUSO, 2009; ELSHAFEEY, KAMEL & FATHALLAH, 2010).

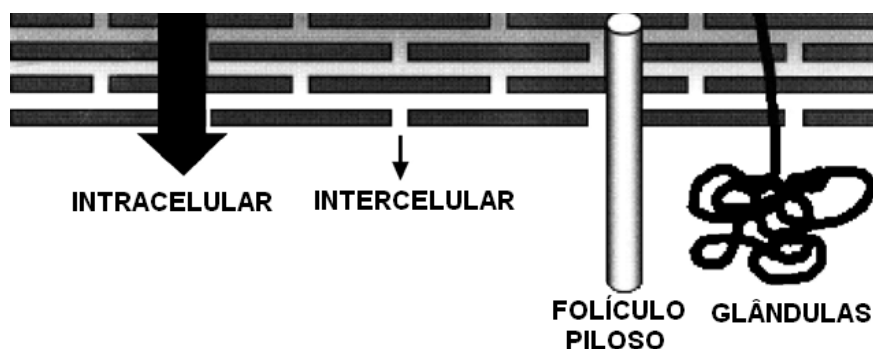


Figura 8 – Esquema representativo das vias de penetração do fármaco através do estrato córneo (adaptado de KOGAN & GARTI, 2006).

Em condições normais, a penetração é muito difícil, dependendo não apenas das características físico-químicas do fármaco, mas também dos processos de liberação do fármaco da formulação e da afecção da pele (CHORILLI *et al.*, 2007). Diferentes variáveis intrínsecas da membrana biológica podem causar modificações no fluxo do fármaco. Fluxo sanguíneo, idade, metabolismo e estado da pele (presença ou não de patologia) são considerados fatores biológicos. Fatores físico-químicos da pele também apresentam grande influência, como hidratação, temperatura e pH (AULTON, 2005).

Dentre as propriedades físico-químicas de um fármaco que influenciam seu perfil de penetração, estão incluídas a massa molar, o equilíbrio hidrofílico-lipofílico e o grau de ionização. Estes fatores desempenham um papel importante na determinação da solubilidade e do seu coeficiente de partição. É descrito na literatura que as moléculas devem possuir coeficiente de partição intermediária ($\log P_{\text{octanol} / \text{água}}$) entre 1 e 3 para permitir a difusão passiva, pois desta forma são suficientemente solúveis nos domínios lipídicos do estrato córneo, o que permite a difusão intercelular e ainda são hidrofílicas o bastante para permitir o particionamento no tecido viável da epiderme (FÖRSTER *et al.*, 2009). As características ideais para a absorção percutânea são, principalmente, baixo peso molecular e solubilidade adequada em meios hidrofílicos e hidrofóbicos (BRAIN *et al.*, 2007).

A DAP, um fármaco de classe II (classificação biofarmacêutica), não apresenta propriedades físico-químicas ideais para sua veiculação em formulações convencionais de administração tópica. Para contornar este empecilho farmacotécnico, pesquisas demonstram que novos sistemas de liberação de fármacos em escala nanométrica têm se mostrado uma importante ferramenta no desenvolvimento galênico. Esses sistemas são capazes de compartimentalizar fármacos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, e direcioná-los para o sítio de ação, representando uma alternativa eficaz para superar adversidades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de medicamentos (SILVA *et al.*, 2010b).

1.5. NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia pode ser definida como a área da ciência que envolve a criação, caracterização e a utilização de materiais, dispositivos ou sistemas em escala nanométrica (KOO, RUBINSTEIN & ONYUKSEL, 2005; NAYAK & DHARA, 2010). Suas novas e únicas aplicações em diversas áreas a tornaram tão importante que, atualmente, se faz presente em quase todos os segmentos da vida cotidiana, importância esta que levou alguns autores a denominarem o século atual de “nanoséculo” (OCHEKPE, OLORUNFEM & NGWULUKA, 2009; NAYAK & DHARA, 2010).

A nanotecnologia aplicada a sistemas de liberação de fármacos consiste na compartimentalização de fármacos em estruturas em escala nanométrica, em torno de 1 a 300 nm, com o intuito de otimizar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, promovendo, ainda, maior estabilidade aos fármacos, maior eficácia, direcionamento ao sítio de ação, bem como o aumento da segurança e adesão do paciente (TOLL, 2004; RUENRAROENGSACK, COOK & FLORENCE, 2010)

Estudos demonstram que nanossistemas podem transpor o EC sem alterar, irreversivelmente, a função barreira da pele. No entanto, o tamanho nanométrico é insuficiente para estimar a eficiência de uma nanoformulação no que diz respeito à permeação passiva de fármacos. É essencial que a nanoestrutura seja suficientemente maleável para não restringir a penetração do fármaco aos folículos pilosos ou nos sulcos da pele superficial (ÁLVAREZ-REGUEROA, 2001; SHIM, 2004; CESV & VIERL, 2010).

Dentre os nanossistemas, os nanocarreadores coloidais possuem características ideais para a penetração passiva dérmica: apresentam vesículas suficientemente deformáveis e elásticas capazes de penetrar na pele espontaneamente; formam uma camada semi-oclusiva que impede a eliminação de água pela pele, o que aumenta a hidratação e, assim, a permeabilidade do fármaco; adicionalmente, são capazes de modular a atividade termodinâmica do fármaco na superfície da pele permitindo uma otimização da velocidade de cedência (VERMA, *et al.*, 2003; CESV & VIERL, 2010).

Desta forma, os nanocarreadores coloidais de fármacos têm atraído crescente interesse como veículos de administração tópica de fármacos. Destacam-se as microemulsões por apresentarem excelente taxa de penetração em camadas profundas do estrato córneo quando comparadas a formulações convencionais, sendo consideradas como sistema terapêutico nanotecnológico bastante promissor na permeação e direcionamento eficiente de fármacos através da pele (GRAMPUROHIT, RAVIKUMAR & MALLYA, 2009; SILVA *et al.*, 2010b).

1.6. MICROEMULSÕES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TÓPICA

As microemulsões (MEs) podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos tensoativos localizados na interface óleo/água (TENJARLA, 1999).

As MEs são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados (LAWRENCE & REES, 2000; FORMARIZ *et al.*, 2005). Desta forma, modulam o perfil de biodisponibilidade alterando a constante de ionização do fármaco a fim de disponibilizá-lo em sua forma mais absorvível (não ionizada), além de poder controlar a velocidade de liberação, servindo como sistemas reservatórios de fármacos sem alterar a estrutura química da molécula transportada (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Sistemas micoemulsionados são formados a partir da combinação de três a cinco componentes, tais como, tensoativo, fase aquosa, fase oleosa e, quando necessário, o co-tensoativo, nos quais, em proporções adequadas entre seus componentes e em condições de temperatura, pressão e força iônica constantes, o sistema forma-se espontaneamente, quando a energia remanescente da interface está próxima de zero ($\Delta G \rightarrow 0$) (TENJARLA, 1999; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Estruturalmente, existem três tipos de MEs: óleo em água (o/a), água em óleo (a/o) e estruturas bicontínuas (Figura 9). Nas MEs tipo o/a, o componente lipofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente hidrofílico, nas MEs tipo a/o, ocorre o inverso, o componente lipofílico é disperso no componente hidrofílico. Já nas MEs do tipo estruturas bicontínuas, os componentes lipofílicos e hidrofílicos se caracterizam por canais adjacentes alongados com nanogotículas contendo volumes semelhantes entre a fase aquosa e oleosa. Estes tipos estruturais as microemulsões podem utilizadas como sistemas transportadores de fármacos tanto hidrofílico quanto lipofílico (FORMARIZ *et al.*, 2005).

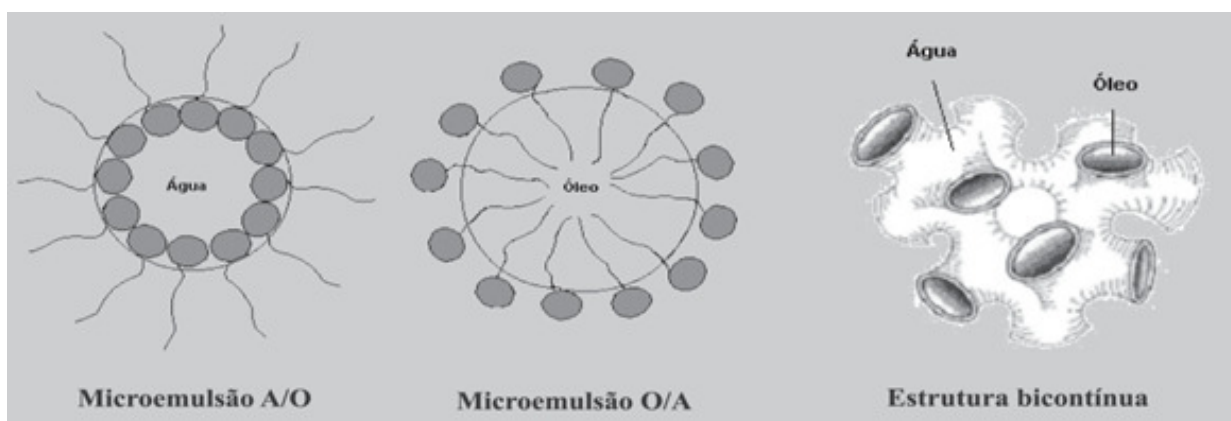


Figura 9 – Representação esquemática da organização das microemulsões (adaptado de FORMARIZ *et al.*, 2005).

Estudos demonstram grande potencial das MEs como veículos de liberação de fármacos lipofílicos para administração tópica, tais como anti-inflamatórios, antifúngicos e antioxidantes (GRAMPUROHIT, RAVIKUMAR & MALLYA, 2009). Puranajoti e colaboradores (2002) desenvolveram com sucesso microemulsões dos fármacos antifúngicos, miconazol, cetoconazol e itraconazol, todos fracamente hidrossolúveis. Nazar, Khan e Shah (2009) desenvolveram um sistema microemulsionado do tipo o/a estável capaz de solubilizar um fármaco anti-inflamatório altamente hidrofóbico, o piroxicam.

É descrito, ainda, que fluxos de permeação cutânea de fármacos contidos em microemulsões foram significativamente mais elevados do que os de formas farmacêuticas tradicionais como: soluções aquosas, soluções micelares, emulsões. Zhu e colaboradores (2008) demonstraram que a quantidade permeada de penciclovir veiculado em microemulsão foi 3,5 vezes maior que a formulação comercial em creme. Em outro trabalho científico, uma microemulsão tópica de aciclovir obteve maior permeação *in vitro* quando comparada à sua veiculação em pomada e creme (SHISHU, RAJAN & RAMALPREET, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é a incorporação da dapsona em novo sistema microemulsionado de administração tópica, assim como a avaliação da permeabilidade cutânea através da epiderme, a fim de avaliar sua utilização na terapia auxiliar da hanseníase e em outras enfermidades cutâneas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparação e caracterização físico-química de microemulsão tópica, quanto ao tamanho de gotícula, índice de refração, pH e condutividade elétrica;
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para DAP em sistemas microemulsionados;
- Avaliação da liberação *in vitro* da DAP a partir das formulações desenvolvidas em células de difusão vertical do tipo Franz;
- Avaliação da permeação epidérmica *in vitro* da DAP a partir das formulações desenvolvidas utilizando-se pele de orelha suína.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético MAG- MULTI MARTE;
- Balança Analítica METTLER TOLEDO – AG 204;
- Balança de precisão METTLER TOLEDO – PB 3002;
- Banho de ultrassom UNIQUE –USC 2850;
- Balões volumétricos;
- Béchers;
- Bomba a vácuo;
- Coluna cromatográfica Kromazil – C8 (5 μ m) – 150 x 4,6 mm – nº E57159;
- Coluna cromatográfica Rexchrom – C8 (5 μ m) – 150 x 4,6 mm – nº 100095;
- Cromatógrafo de alta eficiência à líquido – marca MERCK;
- Células de difusão vertical tipo FRANZ – HANSON RESEARCH GROUP. Orifício do compartimento doador de 150 mm de diâmetro e compartimento receptor com capacidade de 7 mL;
- Câmara climática NOVA ÉTICA modelo 420 / CLD – 150.
- Destilador de água QUIMIS;
- Eletrodo DME CV1 em KCl 3M DIGIMED;
- Eletrodo tipo escoamento c/ dupla junção DME-CV4 DIGIMED;
- Espectrofotômetro SHIMADZU UV – 2401 PC;
- Espectrômetro de infravermelho SHIMADZU – IR PRESTIGE-21;
- Medidor de ponto de fusão B'U'CHI B-540;
- Membrana filtrante 0,45 μ m MILLIPORE;

- Tubos de diálise de acetato de celulose com largura de 33mm – SIGMA-ALDRICH ;
- Pipetas graduadas e volumétricas;
- Pipetadora automática de 1000 µL;
- Refratômetro ANALYTIKJENA;
- Seringas descartáveis de 3, 5 e 20 mL;
- Tubos falcon;
- Unidade descartável filtrante 0,45 µm de poro MILLIPORE.

3.1.2. Excipientes e Reagentes

- Miristato de Isopropila (Vetec Química / Lote: 0707382);
- N-metil-pirrolidona
- Isobutanol (Sigma / 14896BJ-279);
- SPAN 20 (Sigma / Lote 087K1891);
- Tween 80 (Vetec / 0603298);
- Fosfato de potássio monobásico P.A. (PROQUÍMIOS);
- Lauril Sulfato de Sódio (VETEC);
- Cloreto de Sódio (VETEC);
- Metanol Grau HPLC (VETEC);
- Acetonitrila Grau HPLC (VETEC).

3.1.3. Fármaco

- Dapsona - matéria-prima (lote 02/572 A - fabricante G.Amphaylab);
- Dapsona – padrão primário USP (Lote: H0D260)

3.1.4. Material Biológico

- Pele de orelha de suíno jovem de até 6 meses devidamente fiscalizado pelo Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal, localizado no município de Viana / Espírito Santo.

3.2. MÉTODOS**3.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA – PRIMA****3.2.1.1. Faixa de fusão**

As amostras, em triplicata, foram introduzidas em capilares de vidro e levadas ao equipamento para determinação da faixa de fusão, BUCHI B-540, pelo método do capilar (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

3.2.1.2. Espectrometria no infravermelho

Foi realizado o espectro de varredura no espectrômetro de infravermelho, entre 400 e 4000 cm^{-1} , utilizando amostras previamente dessecadas e dispersas em brometo de potássio, para a verificação das bandas de identificação dos grupos funcionais idênticos a DAP padrão (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

3.2.2. Quantificação do fármaco dapsona

A determinação do teor da DAP matéria-prima foi realizada por espectrofotometria de absorção no ultravioleta em comprimento de onda de 295 nm (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

3.2.2.1. Preparo da solução padrão

Foram pesadas, analiticamente, quantidades equivalentes a 25 mg de DAP padrão USP (lote H0D260) e transferidos para balão volumétrico de 100 mL ao qual foi adicionado 40 mL de etanol. O balão foi submetido ao banho de ultrassom por 20 minutos e, em seguida, avolumado com o mesmo solvente. Diluição subsequente foi realizada com etanol, de modo a obter concentração final de 5 µg/mL. A solução padrão foi preparada em duplicata.

3.2.2.2. Preparo da solução amostra

O preparo da solução amostra foi realizado em quintuplicata, conforme procedimento descrito no item 3.2.2.1, utilizando-se matéria-prima de DAP.

3.2.3. Desenvolvimento das microemulsões

O preparo das formulações seguiu o seguinte procedimento descrito por Nandi, Bari e Joshi (2003):

- Homogeneização dos tensoativos sob agitação magnética moderada na proporção 1:1;
- Homogeneização do cotensoativo sobre a mistura de tensoativos;
- Adição da fase oleosa à mistura, de modo que a proporção fase oleosa/cotensoativo se mantivesse em 8:1;

- Gotejamento gradual e cuidadoso da fase aquosa até a formação visual do sistema isotrópico.

3.2.3.1. Confeção do Diagrama de Fases

O diagrama de fases foi utilizado para definir as concentrações entre os componentes capazes de formar sistemas microemulsionados (PATEL *et al.*, 2009). Dentre os diferentes tipos de diagramas, selecionou-se o diagrama do tipo pseudoternário, pois as microemulsões propostas possuem cinco componentes enquadrados em três grupos: fase aquosa; mistura de tensoativos (tween 80 e span 20) e Fase oleosa (óleo e isobutanol)

O método utilizado para a confecção do diagrama foi de titulação aquosa à temperatura ambiente, o qual consiste em preparar misturas binárias com posterior titulação avaliando-se visualmente a mistura a cada adição.

O procedimento de preparo do diagrama foi constituído num primeiro estágio, da homogeneização dos tensoativos sob agitação magnética moderada e sem aquecimento. No segundo estágio, verteu-se o cotensoativo e a fase oleosa sobre a mistura de tensoativos. As proporções entre as misturas de tensoativos e as de cotensoativo/fase oleosa foram definidas em 10:90; 20:80; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40; 70:30; 80:20; 90:10. Posteriormente, cada proporção foi titulada, em triplicata, com água de 10 em 10 μL até a verificação visual de um sistema heterogêneo, opaco. Por fim, as proporções foram recalculadas e os resultados foram analisados e representados graficamente com auxílio do software Chemix[®].

A representação gráfica foi feita por um triângulo equilátero, onde um vértice corresponde à mistura dos dois tensoativos, na proporção fixa de 1:1; o outro a proporção 8:1 de óleo e cotensoativo, e o terceiro, representa a água.

3.2.4. Incorporação da dapsona nas microemulsões desenvolvidas

A solubilidade do fármaco no sistema microemulsionado é um dos fatores que altera a liberação do fármaco. A solubilidade da DAP nas microemulsões foi verificada como duas possibilidades: primeiro, sua incorporação ao sistema microemulsionado já formado; e segundo, solubilizando-a durante o preparo das MEs, após a adição da fase oleosa e antes de se adicionar a água. A verificação da solubilidade máxima da DAP às ME foi visual, ou seja, foi incorporada quantidade de DAP até a formação de sistema heterogêneo.

3.2.5. Caracterização das microemulsões

Através de dados físico-químicos é possível confirmar a formação de microemulsões. Foram realizadas as seguintes análises nas formulações desenvolvidas.

3.2.5.1. Análise do tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de luz

Os meios dispersos apresentam a propriedade de espalhar as ondas eletromagnéticas (como a luz), que venham atravessá-los. Este fenômeno depende do tamanho das gotículas que compõem o sistema disperso e do comprimento de onda utilizado (URSICA *et al.*, 2005).

O diâmetro médio das gotículas internas das microemulsões pode ser avaliado pela técnica de "*Dynamic Light Scattering*", a qual fornece informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas das MEs e permite o cálculo do diâmetro médio da gotícula (d) através do valor do coeficiente de difusão (D) determinado pela equação de Stokes-Einstein (TENJARLA, 1999; FORMARIZ *et al.*, 2005):

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d}$$

onde: k = constante de Boltzmann, T = temperatura e η = viscosidade

O diâmetro médio das gotículas internas das formulações foi determinado, em duplicata, utilizando o analisador de tamanho de partícula HORIBA modelo LB-550. Neste equipamento também pode ser avaliada a extensão de distribuição do tamanho de gotículas da fase interna, caracterizada pelo SPAN que é definido pela expressão:

$$\text{SPAN} = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}}$$

onde: D_{90} é o valor do tamanho de gotículas que representa 90% das gotículas. D_{10} corresponde ao valor do tamanho de gotículas que representa 10% das gotículas. D_{50} é o valor correspondente ao tamanho de gotículas que representa 50% das gotículas (SARKAR *et al.*, 2005).

3.2.5.2. Análise da Condutividade Elétrica

Mudanças estruturais em sistemas microemulsionados podem ser investigadas através da condutividade elétrica, sendo possível determinar domínios aquosos ou oleosos do sistema (ROSSI *et al.*, 2007). A análise da condutividade elétrica das microemulsões foi realizada em condutímetro METTLER TOLEDO modelo MPC 227 à temperatura ambiente.

Os resultados foram apresentados como a média e o desvio padrão provenientes da análise de três lotes de cada formulação.

3.2.5.3. Análise de Índice de Refração

A determinação do índice de refração é importante para verificar a capacidade das MEs em desviar o plano de luz incidente. Através dela, pode-se avaliar a estabilidade do sistema, pois auxilia na determinação de processos de inversão de fases de uma ME (ROSSI *et al.*, 2007).

O índice de refração das formulações foi analisado pelo refratômetro ANALYTIKJENA à temperatura ambiente (25 °C). Os resultados apresentados correspondem à média e o desvio padrão provenientes da análise de três lotes de cada formulação.

3.2.5.4. Análise de Teor de DAP nas MEs

A determinação do teor da DAP foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, com metodologia desenvolvida e validada conforme item 3.2.6.

3.2.5.4.1. Preparo da curva padrão

Foram pesadas, analiticamente, quantidades equivalentes a 25 mg de DAP padrão de trabalho (teor 96,75%) e transferidas para balão volumétrico de 100 mL ao qual foi adicionado 40 mL de fase etanol. O balão foi submetido ao banho de ultrassom por 20 minutos e, em seguida, avolumado com o mesmo solvente.

A partir desta solução, foram realizadas diluições subsequentes, utilizando a fase móvel como diluente, obtendo-se soluções com concentrações de 10; 15; 20; 25 e 30 µg/mL, correspondendo a uma faixa de 40 a 120% da concentração de trabalho (25 µg/mL).

3.2.5.4.2. Preparo da solução amostra

Foram pesadas, analiticamente, quantidades equivalentes a 25 mg de DAP da formulação e transferidas para balão volumétrico de 100 mL ao qual foi adicionado 80 mL de fase móvel. O balão foi submetido ao banho de ultra-som por 20 minutos e, em seguida, avolumado com o mesmo solvente. Diluição subsequente (1:10) foi realizada em fase móvel de modo a obter a concentração final de 25 µg/mL.

3.2.6. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação da Dapsona na formulação

O desenvolvimento de uma metodologia de quantificação se fez necessário por se tratar da quantificação de DAP numa formulação inédita. O método foi desenvolvido em cromatógrafo de alta eficiência a líquido, marca MERCK, com detecção ultravioleta (UV) de arranjos de fotodiodo.

O estabelecimento das condições cromatográficas foi realizado através da análise dos valores de tempo de retenção, pressão do sistema, número de pratos teóricos e assimetria de pico obtidos por fase estacionária de fase reversa e diferentes proporções da fase móvel, composta por Metanol : Tampão fosfato 0,03 M pH 5,9.

3.2.6.1. Preparo da solução amostra

O procedimento de preparo da solução foi realizado conforme o item 3.2.5.4.2.

3.2.6.2. Validação do método

O método foi validado de acordo com a RE n. 899, de 29 de maio de 2003, que dispõe sobre o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA,

2003; ICH, 1996). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, precisão de injeção inter e intra-dia, exatidão, limite de detecção e de quantificação.

3.2.6.2.1. Especificidade e seletividade

Especificidade e seletividade comprovam se o método possui a capacidade de quantificar exatamente um fármaco na presença de outros componentes. Por ser um método cromatográfico, esta medida foi realizada no espectro obtido pela injeção da solução amostra preparada conforme item 3.2.5.4.2. utilizando-se o teste de pureza do sinal cromatográfico através do detector de arranjo de fotodiodos, o qual pode comprovar se o pico corresponde a uma única substância através de dois modos, a similaridade de picos e o *ratiograms*. A análise por similaridade de picos consiste em comparar espectros de absorção no UV em diferentes partes do pico cromatográfico. O pico é considerado puro quando os espectros forem similares nos diferentes tempos de retenção.

Na análise por *ratiograms*, a razão da absorbância obtida de dois comprimentos de onda é plotada contra o tempo de eluição da amostra. A indicação da pureza é obtida quando a razão cromatográfica for constante e próxima de 0,00, porém maior que o ruído.

3.2.6.2.2. Linearidade

Foram realizadas, em triplicata, curvas padrão com cinco níveis de concentração numa faixa correspondente de 40 a 120% da concentração de trabalho, conforme procedimento descrito em 3.2.5.4.1.

A linearidade do método foi determinada pela análise de regressão linear.

3.2.6.2.3. Precisão intra-corrída e inter-corrída

A partir da solução amostra, em triplicata, foram realizadas diluições subsequentes, 2:25, 1:10 e 3:25, utilizando-se como diluente a FM, obtendo-se, assim,

três níveis de concentrações: 20, 25 e 30 µg/mL, as quais contemplam 80, 100 e 120% da faixa de trabalho do método. Para a avaliação da precisão intermediária (intercorrida) este procedimento foi repetido em dias diferentes.

A precisão do método foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) dos valores de áreas encontrados, sendo permitido valor máximo de 5% (ICH, 1996; ANVISA, 2003).

3.2.6.2.4. Precisão de volume de injeção

A precisão de injeção do cromatógrafo foi avaliada em 10 injeções da solução amostra de DAP na concentração de trabalho de 25 µg/mL.

O DPR calculado a partir das áreas obtidas deve ser menor que 2% (USP, 2010).

3.2.6.2.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados através das equações:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

onde, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas e IC é a inclinação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

3.2.6.2.6. Exatidão

A exatidão do método foi realizada pelo método do placebo contaminado, no qual foi adicionada quantidade conhecida do padrão ao placebo obtendo-se três níveis de concentrações 20, 25 e 30 µg/mL, correspondentes a 80, 100 e 120%, respectivamente. Calculou-se a exatidão através da porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do padrão obtida experimentalmente em relação à teórica. A metodologia foi

considerada exata para um valor de exatidão compreendido na faixa de 98 a 102% (ICH, 1996).

3.2.7. Escolha e preparo do meio receptor para teste de liberação e permeação *in vitro*

A solubilidade do fármaco DAP foi realizada em meios constituídos de solução tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,4 e solução salina na ausência ou na presença de tensoativos em diferentes concentrações, são eles:

- Solução tampão pH 6,8 com 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de tween 80.
- Solução tampão pH 7,4 com 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de tween 80.
- Solução salina com 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de tween 80.

A metodologia consistiu em que, num bécher de 25 mL, foi adicionado um excesso de fármaco a 20 mL de cada solução testada, sob agitação moderada. Após 24 horas de agitação, as soluções foram centrifugadas a 4500 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado com membrana 0,45 µm e analisado por UV.

A quantificação foi realizada através da equação da reta obtida pela regressão linear da curva padrão preparada para cada meio receptor em questão, contendo cinco níveis.

3.2.8. Validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de DAP nos ensaios de liberação e permeação *in vitro*

O método desenvolvido e validado para a quantificação de DAP nas formulações foi também utilizado para a determinação de DAP nos estudos de liberação e permeação *in vitro*, visto a maior faixa de concentração de trabalho e a presença de tensoativos na solução receptora necessária para estes estudos.

3.2.8.1. Preparo da solução estoque (SE) de DAP

Foram pesadas, analiticamente, quantidades equivalentes a 25 mg de DAP padrão de trabalho (teor 96,75%) e transferidas para balão de 25 mL ao qual foi adicionado 20 mL solução receptora (SR), constituída de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e 2,0% de polissorbato 80. O balão foi submetido ao banho de ultrassom por 20 minutos e, em seguida, avolumado com o mesmo solvente.

3.2.8.2. Preparo da solução amostra para ensaios de liberação e permeação *in vitro*

Foram pesadas, analiticamente, quantidades equivalentes a 25 mg de DAP das formulações teste e transferidas para balão de 25 mL ao qual foi adicionado 20 mL de SR. O balão foi submetido ao banho de ultra-som por 20 minutos e, em seguida, avolumado com o mesmo diluente.

3.2.8.3. Validação do método

3.2.8.3.1. Especificidade

Foi realizada através da análise de pureza do espectro obtido da solução amostra preparada conforme item 3.2.8.2. utilizando-se o detector de arranjos de fotodiodo, conforme metodologia descrita no item 3.2.6.2.1.

3.2.8.3.2. Linearidade

A partir da solução estoque, foram preparadas três curvas padrão com cinco níveis de concentrações: 5, 20, 50, 80 e 100 µg/mL diluídas em SR. Os resultados foram tratados estatisticamente para determinação do coeficiente de correlação (r).

3.2.8.3.3. Precisão intra-corrída e inter-corrída

A partir da solução amostra, foram realizadas diluições subsequentes em solução receptora a fim de se obter três níveis de concentrações: 20, 50 e 80 µg/mL. Este procedimento foi feito em triplicata. A precisão intermediária (inter-corrída) foi realizada com o mesmo procedimento em dia diferente.

A precisão do método foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) dos valores de área encontrados.

3.2.8.3.4. LD e LQ

A determinação de LD e LQ foi feita através das equações descritas no item 3.2.6.2.5.

3.2.8.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi realizada pelo método do placebo contaminado conforme descrito no item 3.2.6.2.6, obtendo-se três níveis de concentrações 20, 50 e 80 µg/mL. Os resultados da exatidão foram expressos através da porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do padrão obtida experimentalmente em relação à teórica.

3.2.9. Estudo de liberação *in vitro*

3.2.9.1. Preparo da membrana sintética

Foi utilizada membrana de acetato de celulose (tubos de diálise) como membrana sintética. A membrana foi cortada nas laterais e aberta em água corrente. Posteriormente, segmentos de aproximadamente 5 cm foram cortados e fervidos em

cerca de 50 mL de água destilada durante 5 minutos por três vezes, com novo volume de água destilada em cada fervura (BEMVINDO, 2006).

3.2.9.2. Montagem das células de Franz

O compartimento receptor das células de Franz foi completamente preenchido pela solução receptora, previamente filtrada e degaseificada por exposição a banho de ultrassom. A membrana de acetato de celulose foi disposta na célula de modo que ficasse em contato com a solução receptora sem a formação de bolhas.

Acima da membrana foi adicionado o compartimento doador, constituído por anel de teflon, de 12 mm de diâmetro no orifício interno, o que corresponde a uma área de 1,767 cm². Este orifício foi totalmente preenchido pela formulação em estudo, resultando em aproximadamente 400 mg da formulação. A formulação foi ocluída por um disco de acrílico, sendo o sistema fechado por um anel de alumínio e fixado por uma garra metálica (Figura 10).



Figura 10 – representação da célula de Franz. A) preenchimento do compartimento doador. B) Célula de Franz totalmente montada.

O compartimento receptor foi mantido sob agitação (350 rpm) por meio de uma pequena barra magnética e hélice. As células foram mantidas em banho circulante a 37 °C (Figura 11).

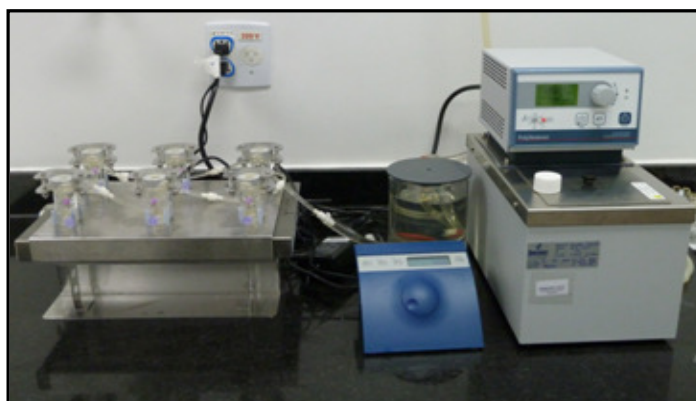


Figura 11– Sistema de células de difusão tipo Franz

3.2.9.3. Coleta e Quantificação das Amostras

A retirada de alíquotas foi realizada através da adição de 1 mL da SR a 37 °C no braço inferior da célula de Franz e, como consequência, alíquota de igual volume foi deslocada através do braço superior e recolhida em tubo eppendorf.

As alíquotas foram quantificadas por CLAE. As análises foram realizadas em seis replicatas para cada formulação. O período de amostragem manual foi de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 18, 23 e 24 horas da aplicação da formulação.

A quantidade liberada de DAP acumulada no compartimento receptor, em cada tempo, foi calculada levando-se em consideração o volume total da célula, a quantidade de fármaco retirada nas coletas anteriores e a área de exposição do compartimento doador.

3.2.9.4. Análise de cinética e análise de liberação *in vitro*

Para a avaliação da cinética de liberação da DAP nos sistemas microemulsionados, os resultados de liberação *in vitro* foram compilados em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética:

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

A partir da análise de regressão linear, determinou-se o coeficiente linear (r) para cada modelo de cinética. O modelo que apresentou maior valor de r foi o selecionado. O valor de fluxo de liberação (J) corresponde à inclinação (a) da porção linear do modelo de cinética selecionado (COSTA & LOBO, 2001).

3.2.9.5. Tratamento estatístico

Análise estatística foi realizada empregando-se o teste One-way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey), com auxílio do software GraphPadprisma[®].

3.2.10. Estudo de permeabilidade *in vitro*

3.2.10.1. Preparo da membrana natural

Orelhas retiradas de suínos de até 6 meses de idade e, logo após a obtenção, foram lavadas em água corrente. Com auxílio de uma tesoura cirúrgica, os pelos foram cortados próximo à superfície epidérmica e a camada subcutânea foi removida.

Após a derme e epiderme estarem limpas, procedeu-se à remoção da camada epidérmica. Pedacos de 5 x 5 cm foram imergidos em água destilada a 60 °C durante 1 min. Em seguida, a derme foi separada cuidadosamente da epiderme com auxílio de uma pinça (JUNYAPRASERT *et al.*, 2007). A epiderme foi lavada em água corrente e examinada quanto a sua integridade (Figura 12). Para armazenagem em freezer a -20°C, os segmentos de epiderme foram envoltos em papel de filtro embebido por solução salina e embalados por papel de alumínio (MOSER *et al.*, 2001; JUNYAPRASERT *et al.*, 2007). O tempo máximo de congelamento até o uso foi de 60 dias.

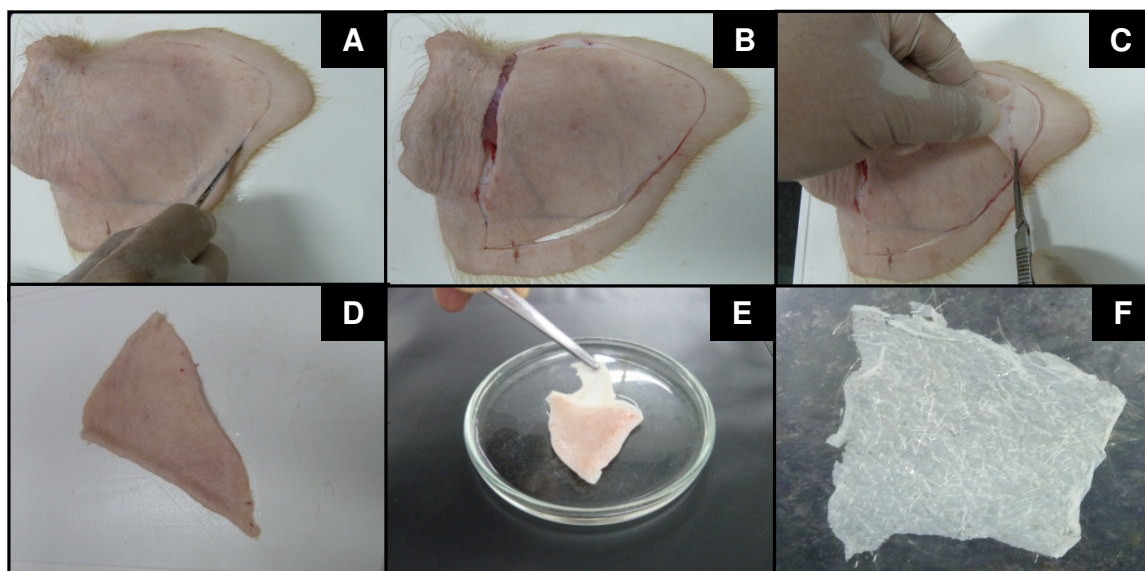


Figura 12 – Procedimento de preparo da membrana natural até extração da epiderme. “A” e “B” – delimitação da epiderme a ser utilizada; “C” – Retirada da derme + epiderme; “D” – fragmento limpo da epiderme e derme; “E” – separação da epiderme da derme; “F” – fragmento do extrato córneo.

3.2.10.2. Montagem das células de Franz

As células de Franz foram montadas conforme descrito no item 3.2.9.2, utilizando-se como membrana, a epiderme. Para tal, os segmentos da camada epidérmica foram descongelados em solução salina a temperatura ambiente e acoplados ao compartimento doador de forma que a parte externa, estrato córneo, ficasse voltada para o compartimento doador, e conseqüentemente, a parte interna da epiderme ficasse em contato direto com a SR, sem a formação de bolhas.

3.2.10.3. Coleta e quantificação das amostras

A retirada das alíquotas foi realizada conforme descrito no item 3.9.2.3. As alíquotas foram quantificadas por CLAE. O período de amostragem foi de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 18, 23 e 24 horas da aplicação da formulação. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

A quantidade de DAP permeada acumulada no compartimento receptor em cada tempo foi calculada levando-se em consideração o volume total da célula, a quantidade de fármaco retirada nas coletas anteriores e a área de exposição do compartimento doador. A análise estatística foi realizada empregando-se o teste One-way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey), com auxílio do software GraphPadprisma.

3.2.10.4. Estudo de cinética de permeação *in vitro*

A avaliação da cinética e determinação do fluxo de permeação *in vitro* foi realizada através da análise de regressão linear do gráfico de dispersão xy, aplicando três modelos de cinética, conforme descrito no item 3.2.9.4.

3.2.11. Avaliação da estabilidade da microemulsão

A formulação que apresentou melhor resultado de permeabilidade cutânea *in vitro* foi colocada para avaliação de estabilidade sob a bancada, exposta à temperatura e umidade ambientes ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $65 \pm 5\%$ U.R.). O estudo de estabilidade foi conduzido por 6 meses, tendo análises efetuadas no tempos zero e seis meses.

Dois lotes da formulação selecionada foram envasados em recipientes de vidro âmbar tampados com batoque de borracha. As amostras foram caracterizadas quanto ao aspecto visual, tamanho de gotícula, condutividade elétrica, índice de refração e teor de DAP, conforme metodologia apresentada nos itens 3.2.5.1, 3.2.5.2, 3.2.5.3 e 3.2.5.4, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO

4.3.1. Ponto de fusão

Os resultados da determinação do ponto de fusão do fármaco dapsona estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Faixa de fusão da DAP

Amostra	Faixa de fusão (°C)
1	183,1 a 183,7
2	182,6 a 183,0
3	183,8 a 184,3

A análise do ponto de fusão verifica a faixa de temperatura na qual uma substância começa a fluidificar-se e na qual está completamente fundida. Toda substância apresenta uma faixa de fusão característica, deste modo o ponto de fusão é um indicativo de pureza e identificação de substâncias (GIL, 2007). Os resultados demonstrados na Tabela 1, estão próximos da faixa descrita no compêndio utilizado como referência de 175 a 181 °C, o que indica a ausência de impurezas e a identidade da amostra (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.3.2. Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica analítica que se baseia em medidas de refletâncias ocasionadas pelas frequências vibracionais específicas de ligações químicas das substâncias (MOFFAT *et al.*, 1986). Desta forma, apresenta maior poder conclusivo na confirmação da identidade da substância quando comparada à análise de ponto de fusão.

Os espectros de varredura no infravermelho da amostra e da substância química de referência (lote H0D260) de DAP estão representados na Figura 13.

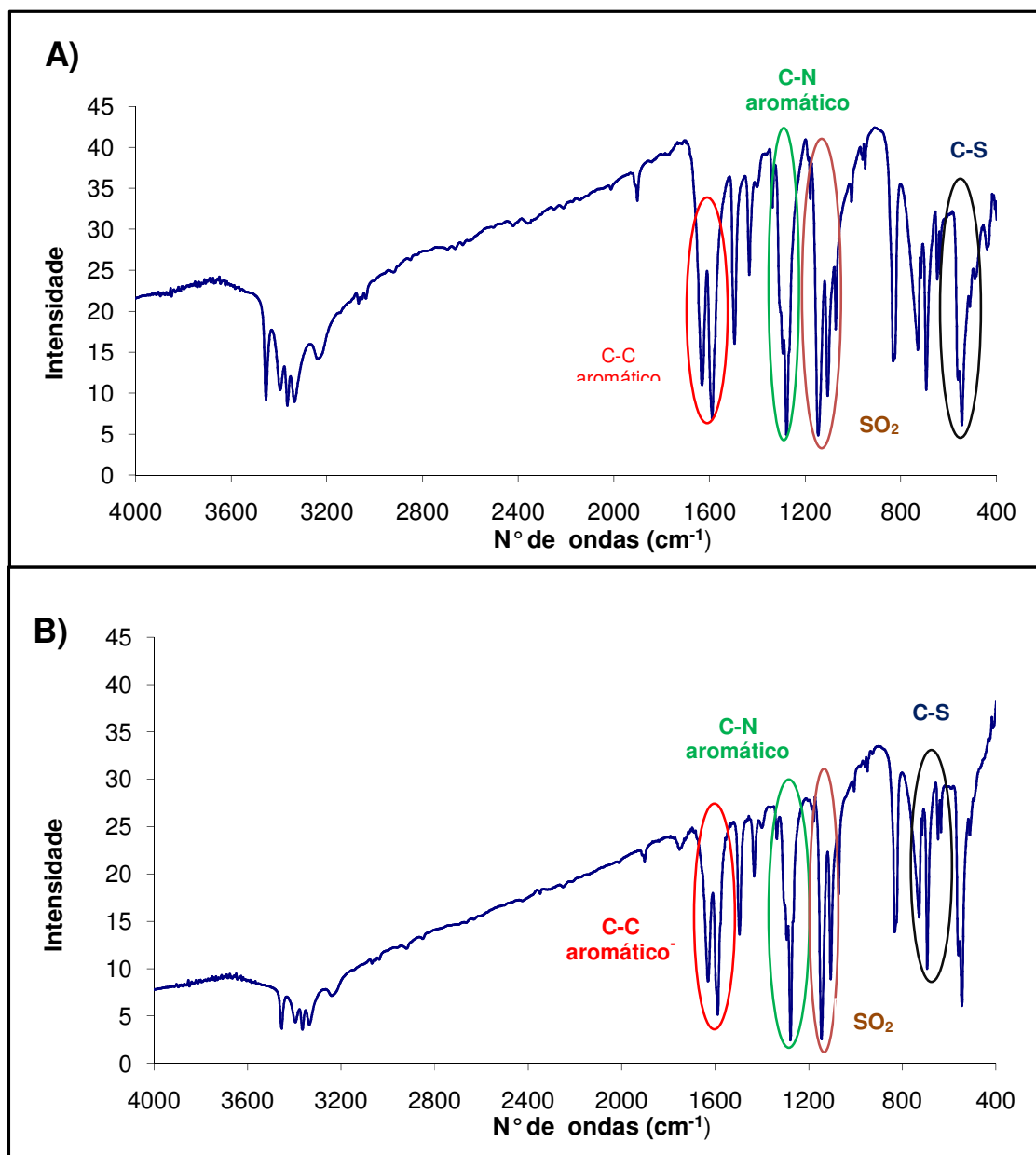


Figura 13 - Espectro de Infravermelho: A) Dapsona – matéria-prima B) Dapsona - padrão primário (USP).

Através da análise do espectro obtido (Figura 13), observa-se a identidade da DAP devido aos principais sinais característicos, presentes em: 685, 1107, 1150, 1276, 1592 e 1633 cm^{-1} . O sinal em 685 cm^{-1} é atribuído à deformação axial da ligação C-S. As deformações axiais simétricas do grupamento SO_2 , característico das sulfonas, estão representadas pela absorção intensa em 1150 cm^{-1} . A ligação C-N proveniente das aminas aromáticas provoca uma deformação axial identificada em 1276 cm^{-1} , assim como a ligação C-C do anel aromático identificada em 1592 cm^{-1} (MOFFAT *et al.*, 1986; SILVERSTEIN, NEBSTER & KIEMLE, 2007). A análise comparativa dos espectros de dapsona padrão e de matéria-prima corrobora com os dados da literatura, enfatizando a identidade da amostra.

A partir dos resultados satisfatórios dos testes de ponto de fusão e de espectroscopia pode-se afirmar que a matéria-prima possui a identidade comprovada para dapsona.

4.3.3. Quantificação do fármaco Dapsona

A Tabela 2 apresenta os resultados da quantificação da matéria-prima DAP por espectrofotometria de UV-Vis.

Tabela 2: Percentual de DAP por Espectrofotometria de UV

N	Teor (%)	Teor médio (%)	DP	DPR (%)
1	97,12			
2	98,76			
3	95,54	96,75	1,27	1,32
4	96,44			
5	95,90			

Diante dos resultados satisfatórios de caracterização da matéria-prima DAP, a mesma foi utilizada como padrão de trabalho neste estudo. A pureza ficou estabelecida em 96,75%.

4.4. OBTENÇÃO DOS SISTEMAS MICROEMULSIONADOS

4.4.1. Seleção dos componentes

A seleção de componentes é um fator crítico na formação de sistemas microemulsionados, principalmente na incorporação de fármacos de classe II, como a DAP, que apresentam dificuldade de solubilização durante a formação (KOGAN & GARTI, 2006). Nas microemulsões desenvolvidas neste trabalho, utilizou-se como referência o sistema microemulsionado proposto por Nandi, Bari e Joshi (2003) que obtiveram alta solubilidade de fármacos classe II.

Os tensoativos não iônicos selecionados, polissorbato 80 (tween 80) e o monolaurato de sorbitano (span 20), possuem menor toxicidade quando comparados aos tensoativos iônicos, apresentam boa compatibilidade cutânea e possuem a capacidade de manter seu desempenho numa ampla faixa de pH (TENJARLA, 1999; WARISNOICHAROEN, LANSLEY & LAWRENCE, 2000a e b). Essa associação de tensoativos é uma prática comum durante o desenvolvimento de microemulsões, com o intuito de se ajustar o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) através da potencialidade de performance adquirida com associação das características de cada tensoativo (KREILGAARD, 2002; ROSSI *et al.*, 2007).

Cadeias duplas de tensoativos podem reduzir a tensão interfacial na ausência de cotensoativos, contudo, podem ser necessárias grandes quantidades destes tensoativos o que atribui à formulação um grande potencial tóxico, inviabilizando sua utilização medicinal (GRAMPUROHIT, RAVIKUMAR & MALLYA, 2011).

A fim de se reduzir a quantidade de tensoativos adicionados à formulação, o EHL pode ser ajustado com a inclusão de cotensoativos, como alcoóis de cadeia pequena,

entre 2 a 10 carbonos, e de natureza anfifílica, como o isobutanol ($C_4H_{10}O$). A presença desses cotensoativos anfifílicos na parte polar da camada interfacial reduz a tensão interfacial necessária para a formação das gotículas em tamanho nanométrico (NANDI, BARI & JOSHI, 2003). Num recente estudo, Paul e Panda (2011) descreveram que a utilização do isobutanol como co-surfactante proporcionou maior região microemulsionada em comparação a outros alcoóis, como n-pentanol, n-hexanol e n-octanol.

Em se tratando da DAP, um fármaco fracamente hidrossolúvel, a seleção da fase oleosa é uma etapa de extrema importância para promover sua alta solubilização. Diversos excipientes são relatados na literatura como componentes da fase oleosa, como oleato de etila, óleos minerais, miristato de isopropila (MIP), óleos vegetais e triglicéridos de cadeia média (TENJARLA, 1999; KREILGAARD, 2002).

Um dos componentes avaliados como fase oleosa nos sistemas microemulsionados foi o MIP proposto por Nandi, Bari e Joshi (2003). O MIP é um excipiente largamente utilizado nas MEs, principalmente, em formulações transdérmicas devido à sua propriedade de incrementar a permeação (ELSHAFEEY, KAMEL & FATHALLAH, 2009).

Alternativamente, foi avaliado o n-metil-pirrolidona (NMP) como excipiente para fase oleosa das microemulsões. O NMP é utilizado como agente solubilizante em medicamentos de uso parenteral e oral e como intensificador de penetração de fármacos lipofílicos (JOUYBAN, FAKHREE & SHAYANFAR, 2010). Essas características proporcionaram ao NMP recentes aplicações em formulações de fármacos de uso tópico: lidocaína (LEE *et al.*, 2006), estradiol (FUJII *et al.*, 2006), bupranolol (BABU & PANDIT, 2005) e insulina (YERRAMSETTY *et al.*, 2010). Sua aplicação também é relatada em nanossistemas de liberação transdérmica de cloridrato de granisetron (ZHENG *et al.*, 2010). Devido às potenciais utilizações do MIP e do NMP, estes foram avaliados como fase oleosa nos sistemas microemulsionados que foram desenvolvidos.

4.4.2. Obtenção dos sistemas microemulsionados

Duas formulações foram propostas para avaliação da DAP nestes sistemas, baseadas na literatura científica (Tabela 3) (NANDI, BARI & JOSHI, 2003; PADULA, NICOLI & SANTI, 2009).

Tabela 3 – Composição das formulações A e B propostas

Formulações	Excipientes (%) p/p					
	MIP	NMP	ISO	T80	S20	Água
A	36,95	---	4,60	20,90	20,90	16,65
B	---	36,95	4,60	20,90	20,90	16,65

MIP = miristato de isopropila; NMP = n-metil-pirrolidona; ISO = isobutanol; T80 = tween 80; S20 = span 20.

As formulações foram preparadas por simples solubilização dos componentes sob agitação magnética e apresentaram características visuais de sistemas microemulsionados, ou seja, aspecto límpido, transparente e translúcido, e coloração amarelada, como pode ser observado na Figura 14.



Figura 14 – Visualização do aspecto homogêneo da formulação A.

Para confirmar a formação dos sistemas microemulsionados, as formulações A e B, foram caracterizadas quanto ao tamanho de gotícula (Tabela 4 e Figura 15).

Tabela 4 – Avaliação do tamanho de gotículas das formulações A e B propostas

Formulação	Tamanho de gotícula (nm)	Desvio padrão (nm)	SPAN
A	9,3	2,2	0,6167
B	9,0	2,3	0,6531

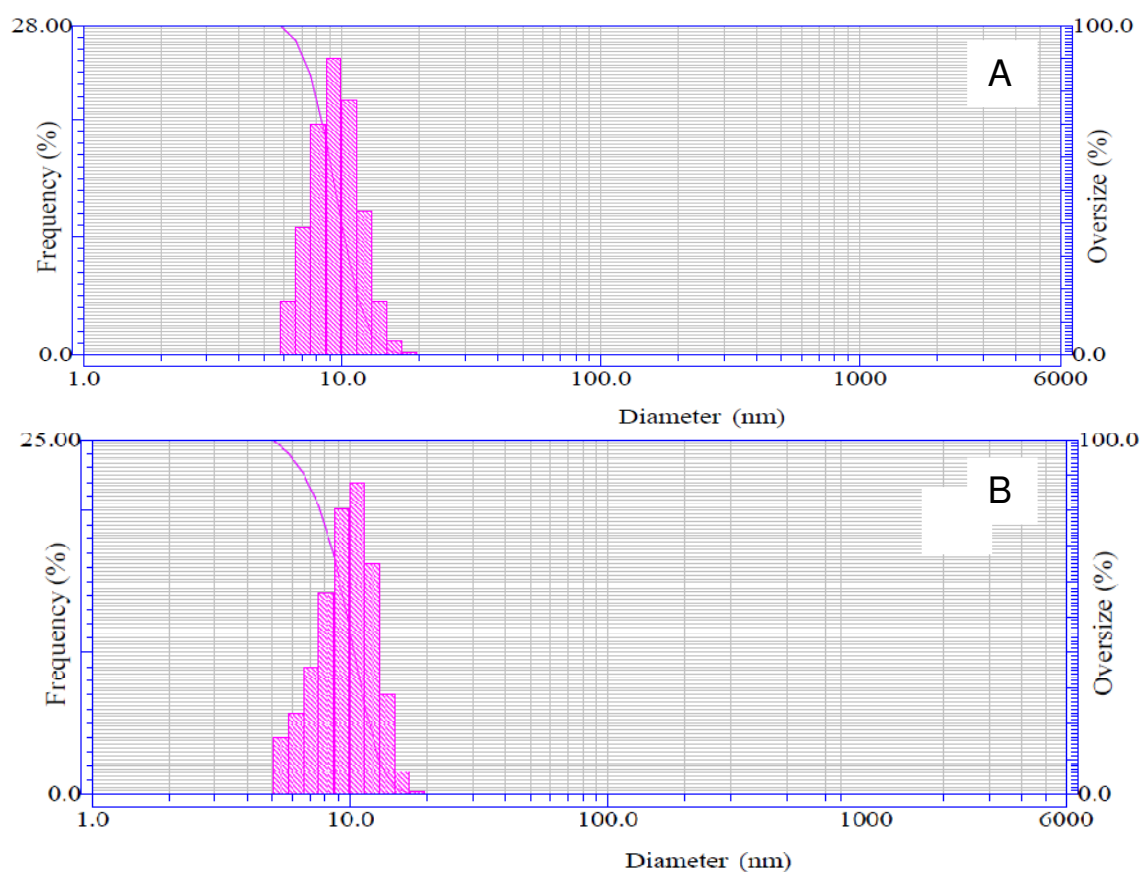


Figura 15 - Distribuição de tamanho de gotícula. A = Formulação A sem fármaco. B = Formulação B sem fármaco.

Os resultados de tamanho de gotícula demonstram a formação de sistemas com diâmetro da fase interna em escala nanométrica (gotícula inferior a 300 nm). Em sistemas nanométricos outra característica de grande relevância no desenvolvimento galênico é a polidispersibilidade do tamanho das gotículas. Valores altos de SPAN caracterizam sistemas grosseiros, ou seja, grande dispersão dos valores de tamanho de gotículas (SARKAR *et al.*, 2005). Conforme demonstrado na Tabela 4, as formulações A e B apresentaram valores de SPAN menores que 1,0, o que caracteriza boa uniformidade de distribuição do tamanho de gotículas da fase interna e dispensa técnicas auxiliares para obter uma maior uniformidade de distribuição do tamanho de gotícula como, a exposição ao ultrassom (DZIUBLA *et al.*, 2001).

Desta forma, as formulações A e B apresentam todas as características de sistemas microemulsionados, ou seja, constituintes agrupados em fase oleosa, tensoativos e fase aquosa; aspecto visual de sistema isotrópico, translúcido, límpido e transparente e tamanho de gotículas em escala nanométrica (TENJARLA, 1999; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Mediante estes resultados satisfatórios, foi avaliada a incorporação da DAP às formulações A e B. Devido a dificuldade de solubilização da DAP, dois modos de incorporação do fármaco foram avaliados: um solubilizando-o na microemulsão já pronta (MP) e o segundo, solubilizando-o na fase oleosa (FO), ou seja, antes de se adicionar a fase aquosa às formulações. Avaliou-se a quantidade de dapsona que se solubiliza nas MEs até um máximo de 5% (p/p), ou seja, 50 mg/g. A Figura 16 apresenta os resultados da incorporação de DAP nas MEs A e B.

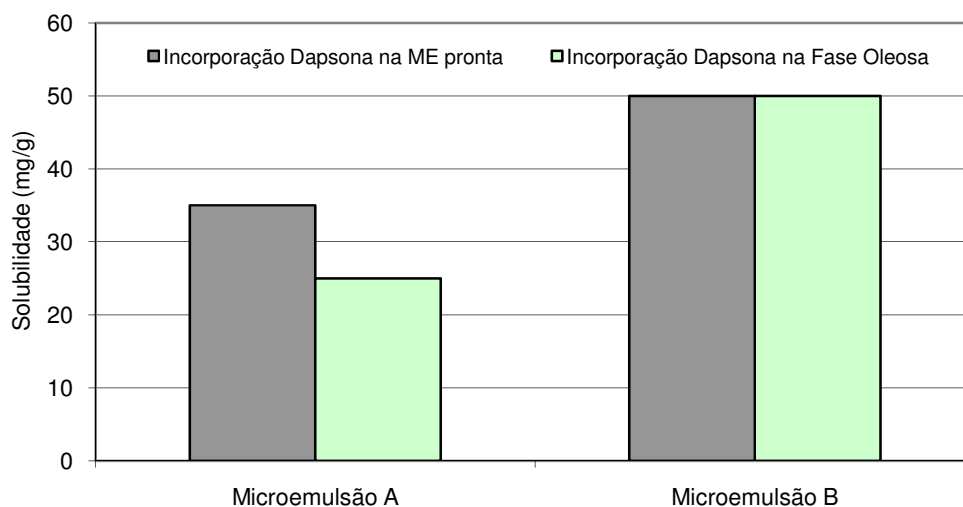


Figura 16 – Solubilidade da dapsona nas formulações A e B.

A utilização de NMP na fase oleosa (ME B) possibilitou a solubilidade máxima desejada neste trabalho da dapsona nas microemulsões quando comparada ao MIP (Figura 16). Isto pode ser explicado pela característica físico-química da molécula de NMP, a qual possui um carbono não polar, que pode enfraquecer a estrutura da ligação de hidrogênio da água, permitindo-lhe agir também como um cossolvente e, assim, aumentar a solubilização de fármacos (JOUYBAN, FAKHREE & SHAYANFAR, 2010).

Adicionalmente, foi possível observar que a maneira como se incorpora a dapsona interferiu na solubilidade das formulações contendo MIP (ME A). A incorporação da DAP com a microemulsão pronta provocou um aumento da solubilidade do ativo nestes sistemas quando comparada à incorporação na fase oleosa, enquanto que, nas MEs contendo NMP, não houve interferência na solubilidade de DAP em relação ao modo de incorporação do ativo. Em suma, observou-se que, em sistemas microemulsionados contendo MIP o modo de incorporação do ativo interfere na capacidade de solubilização das microemulsões, enquanto que nos sistemas contendo NMP não houve diferença.

Durante a avaliação da solubilidade verificou-se que as formulações contendo MIP como fase oleosa apresentavam precipitado após um curto período de tempo. A

fim de se verificar esta ocorrência, foi realizada a análise da estabilidade das formulações A e B em temperatura ambiente durante 60 dias.

As avaliações foram realizadas pela simples observação visual do sistema, sendo caracterizado por homogêneo, quando apresentava aspecto límpido, transparente e translúcido, ou por heterogêneo, quando havia separação de fases e/ou formação de precipitado. A quantidade de DAP nas MEs foi adicionada até o máximo possível de DAP para cada sistema segundo os resultados da Figura 16, ou seja, 3,5% (p/p) para as MEs contendo MIP e 5,0% (p/p) para MEs contendo NMP (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Estabilidade visual da ME A com diferentes concentrações de ativo durante 60 dias

Teor do ativo (%)	Incorporação do Ativo	Análise inicial	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
3,5	ME pronta	S	X	X	X	X
3,5	Fase oleosa	X	X	X	X	X
3,0	ME pronta	S	S	S	S	X
3,0	Fase oleosa	X	X	X	X	X
2,5	ME pronta	S	S	S	S	S
2,5	Fase oleosa	S	S	S	S	X
2,0	ME pronta	S	S	S	S	S
2,0	Fase oleosa	S	S	S	S	S

S = sistema límpido, transparente e translúcido. X = sistema heterogêneo

Tabela 6 – Estabilidade visual da ME B com diferentes concentrações de ativo durante 60 dias

Teor do ativo (%)	Incorporação do Ativo	Análise inicial	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
5,0	ME pronta	S	S	S	S	S
5,0	Fase oleosa	S	S	S	S	S
3,0	ME pronta	S	S	S	S	S
3,0	Fase oleosa	S	S	S	S	S
2,0	ME pronta	S	S	S	S	S
2,0	Fase oleosa	S	S	S	S	S

S = sistema límpido, transparente e translúcido. X = sistema heterogêneo

A estabilidade da formulação contendo MIP foi dependente da concentração do ativo, quanto maior a concentração do ativo menor a estabilidade. Adicionalmente, o modo de incorporação do ativo também interferiu na estabilidade, sendo que a incorporação do ativo à ME pronta conferiu maior estabilidade aos sistemas. Os melhores resultados obtidos após os 60 dias de estudo foram com as formulações que continham 2,0% do ativo que se mostraram estáveis tanto com a incorporação do ativo na FO quanto na ME pronta. Desta forma, mesmo sendo capaz de solubilizar até 3,5% (p/p), as formulações de MIP não apresentaram estabilidade com quantidades superiores a 2,0%.

O excipiente NMP proporcionou maior solubilidade do ativo e estabilidade ao sistema microemulsionado em concentrações elevadas do fármaco quando comparado ao MIP. A formulação B foi capaz de se manter estável com 5,0% (p/p) de DAP incorporado ao sistema durante 60 dias (Tabela 6).

As formulações consideradas estáveis, ou seja, ME A contendo 2,0% de DAP e ME B contendo 5,0% de DAP foram avaliadas quanto ao tamanho de gotícula (Tabela 7).

Tabela 7 – Determinação do tamanho médio de gotícula das formulações A e B na presença do fármaco incorporado na fase oleosa (FO) e na microemulsão já pronta (MP)

Formulação	Quantidade incorporada do ativo (%) p/p	Tamanho de gotícula (nm)*	SPAN
A – FO	2,0	9,6 ± 2,5	0,6765
A – MP	2,0	11,9 ± 2,3	0,5068
B – FO	5,0	9,0 ± 2,30	0,6531
B - MP	5,0	8,9 ± 2,3	0,7089

* média ± desvio padrão, n = 3.

A presença do ativo incorporado tanto na fase oleosa quanto na microemulsão pronta não provocou alterações no tamanho das gotículas quando comparado às MEs sem o fármaco. Conforme demonstrado na Tabela 7, todas as formulações apresentaram valores de SPAN menores que 1,0, o que caracterizou boa uniformidade de distribuição do tamanho de gotículas da fase interna.

Mediante os resultados de incorporação do ativo, para os estudos subsequentes deste trabalho serão incorporados 2,0% (p/p) de DAP na formulação A e 5,0% (p/p) na formulação B.

4.4.3. Seleção de novas formulações contendo NMP

Em formulações tópicas, a quantidade de fármaco incorporado ao sistema microemulsionado é de extrema importância para a sua performance. Segundo dados da literatura, a cedência do fármaco de seu veículo é uma função da concentração, da solubilidade no veículo e do coeficiente de partição entre o veículo e o sítio receptor (KREILGAARD, 2002; KOGAN & GARTI, 2006; ZHU *et al.*, 2008).

Adicionalmente, diferentes proporções dos componentes de um mesmo sistema também podem provocar alterações significativas no desempenho de MEs de

administração cutânea (KOGAN & GARTI, 2006). Patel e colaboradores (2009) descreveram que a eficiência de seus sistemas microemulsionados na liberação tópica de fluconazol era dependente da quantidade de fase aquosa e tensoativos assim como da proporção fase oleosa/cossolvente.

Visto a maior capacidade de solubilização da DAP na formulação B, MEs contendo NMP apresentam grande potencial para sistemas promotores de liberação tópica da DAP. Sugere-se assim, a definição de novas proporções entre os seus excipientes a fim de avaliar o efeito de modificações específicas em seus componentes sobre o seu desempenho.

Neste contexto, foi construído o diagrama pseudoternário de fases contendo NMP. Esta ferramenta permite identificar a melhor proporção dos excipientes da fórmula, a fim de produzir um sistema estável de incorporação de fármacos e, assim, tornar possível o planejamento de novas formulações (SILVA *et al.*, 2009). A proporção da mistura de tensoativos (1:1) e de cossolvente/óleo (8:1) empregada na construção do diagrama foi a mesma utilizada para a formulação contendo MIP a fim de permitir a posterior comparação entre as formulações (Figura 17). O diagrama utilizando como fase oleosa o MIP não foi realizado por já estar descrito na literatura (NANDI, BARI & JOSHI, 2003).

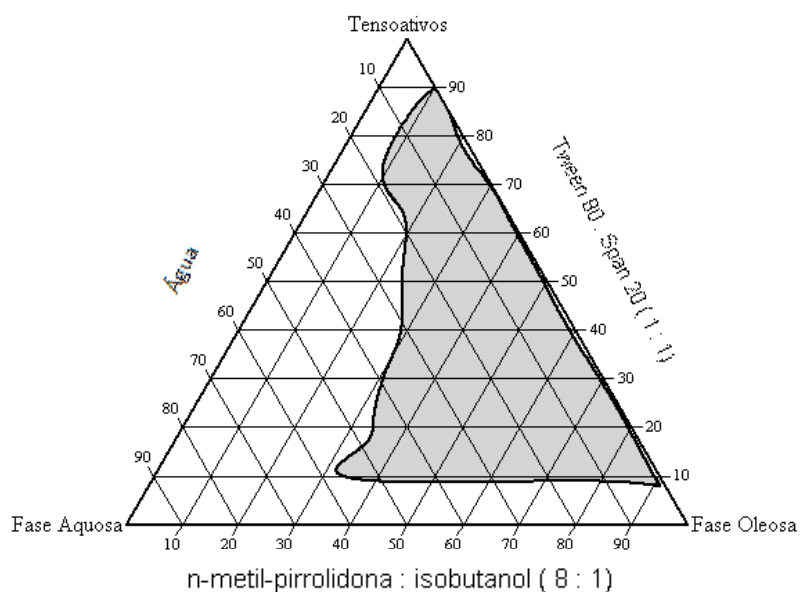


Figura 17 - Diagrama pseudoternário de fases. Tensoativos = tween 80:span 20 (1:1); Fase Oleosa = NMP : isobutanol (8:1) ; Fase aquosa = água. Área demarcada corresponde a área de microemulsão.

A avaliação do diagrama pseudoternário obtido demonstra que diversas proporções dos componentes foram capazes de formar um sistema homogêneo, límpido e translúcido, ou seja, a seleção dos excipientes foi satisfatória para o objetivo pretendido: formar MEs.

É descrito na literatura que a fase aquosa e os surfactantes afetam a permeabilidade da pele através da hidratação do estrato córneo e a quebra da matriz lipoprotéica, o que resulta na diminuição da resistência à difusão do fármaco (KREILGAARD, 2002; KOGAN & GARTI, 2006; ZHU *et al.*, 2008). Portanto, o planejamento para obtenção das formulações subsequentes baseou-se na verificação da interferência da proporção de fase aquosa e dos tensoativos na ME B.

Duas formulações foram propostas, uma aumentando-se ao máximo a proporção de fase aquosa, mantendo a mesma quantidade de tensoativo em relação à microemulsão B (formulação C); e a outra, seguindo o mesmo raciocínio, porém

aumentando-se ao máximo possível a proporção de tensoativos, mantendo-se a mesma quantidade de fase aquosa (formulação D) (Figura 18 e Tabela 8).

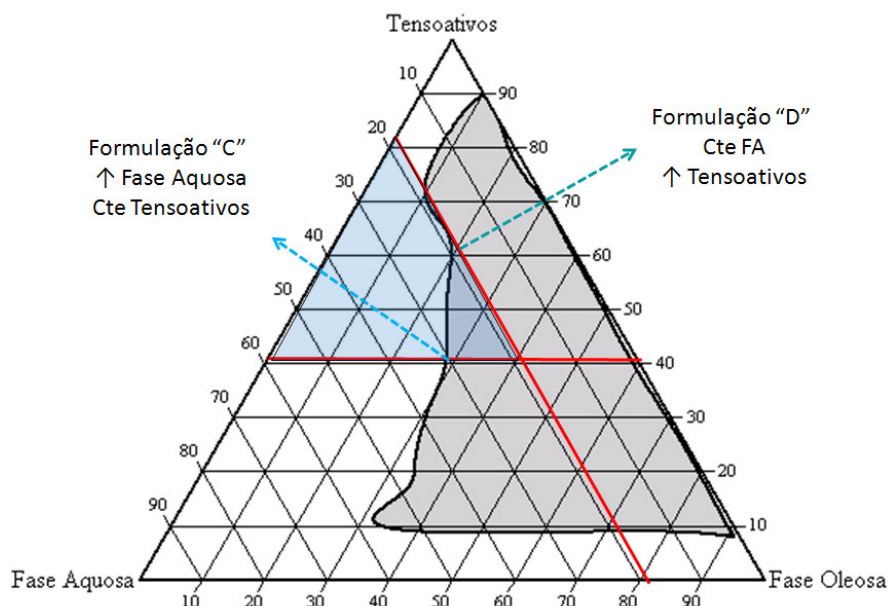


Figura 18 – Diagrama pseudo-ternário indicando as formulações C e D. Área demarcada em cinza = microemulsão. Área demarcada em azul = região em que se possui maior quantidade de água e de tensoativos em relação à formulação B.

Tabela 8 – Composição e o planejamento das novas formulações propostas C e D

Formulações	Excipientes(%)				Água	Planejamento Farmacotécnico
	NMP	ISO	T80	S20		
B	36,95	4,60	20,90	20,90	16,65	Formulação base
C	27,33	3,87	20,90	20,90	27,00	Maior quantidade de água em relação a "B"
D	15,14	1,89	33,16	33,16	16,65	Aumento da quantidade de Tensoativos em relação a "B"

NMP = n-metil-pirrolidona; ISO = isobutanol; T80 = tween 80; S20 = span 20.

As formulações C e D foram obtidas e caracterizadas quanto ao tamanho médio das gotículas da fase interna das formulações na ausência e na presença de 5,0% (p/p) de DAP incorporado tanto na fase oleosa (FO) quanto na microemulsão já pronta (MP). Os resultados do tamanho médio de gotículas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Tamanho médio de gotículas das formulações C e D, na ausência do fármaco e na presença do fármaco incorporado na fase oleosa (FO) e na microemulsão pronta (MP)

Formulação	Quantidade incorporada do ativo (%)	Tamanho médio de gotícula (nm)	SPAN	
C	Sem fármaco	--	11,2 ± 2,1	0,4801
	Fase oleosa	5,0	7,5 ± 1,7	0,6245
	ME pronta	5,0	9,9 ± 2,7	0,7195
D	Sem fármaco	--	10,0 ± 2,3	0,5998
	Fase Oleosa	5,0	9,0 ± 2,8	0,8288
	ME pronta	5,0	8,7 ± 2,4	0,7194

média ± desvio padrão, n = 3.

Os resultados obtidos na Tabela 9 demonstram que o tamanho médio das gotículas internas das formulações se manteve em escala nanométrica. A incorporação do fármaco na FO ou na MP não interferiu no tamanho médio das gotículas, sendo as as duas formulações consideradas satisfatórias para o andamento do trabalho.

4.4.4. Análise físico-química

A avaliação dos parâmetros físico-químicos de sistemas microemulsionados é de fundamental importância na caracterização completa da estrutura microemulsionada. Além de se confirmar a formação dos sistemas, podem ser utilizados como parâmetros para modificar seu comportamento para uma finalidade específica (ROSSI *et al.*, 2007). A Tabela 10 apresenta os resultados de condutividade elétrica e índice de refração das formulações A, B, C e D.

Tabela 10 – Condutividade e índice de refração das formulações A, B, C e D, na ausência do fármaco e na presença do fármaco incorporado na fase oleosa e na microemulsão já pronta

Formulação		Condutividade	Índice de Refração
A	Sem fármaco	0,63 ± 0,05	1,432 ± 0,001
	Fase Oleosa	0,08 ± 0,2	1,437 ± 0,001
	ME já pronta	0,05 ± 0,03	1,438 ± 0,000
B	Sem fármaco	17,52 ± 0,94	1,452 ± 0,001
	Fase Oleosa	15,20 ± 1,70	1,495 ± 0,003
	ME já pronta	15,35 ± 2,22	1,459 ± 0,003
C	Sem fármaco	34,87 ± 1,10	1,437 ± 0,001
	Fase Oleosa	28,43 ± 3,01	1,446 ± 0,001
	ME pronta	26,67 ± 0,59	1,445 ± 0,003
D	Sem Fármaco	11,73 ± 0,63	1,451 ± 0,001
	Fase Oleosa	11,63 ± 1,79	1,459 ± 0,004
	ME pronta	11,23 ± 1,70	1,460 ± 0,002
Excipientes		Condutividade	Índice de Refração
Água		2,85 ± 0,23	1,328 ± 0,001
Miristato de isopropila		0,00 ± 0,00	1,434 ± 0,002
N-metil-pirrolidona		1,40 ± 0,31	1,415 ± 0,001

média ± desvio padrão, n = 3.

Os valores de condutividade elétrica estão relacionados à microestrutura dos sistemas microemulsionados. As MEs podem ser do tipo água em óleo (a/o), óleo em água (o/a) ou estruturas bicontínuas, sendo que a formação destes tipos é dependente das características dos tensoativos, cotensoativos e da natureza do óleo (FORMARIZ *et al.*, 2005). A medida de condutividade é uma ferramenta sensível na determinação de domínios aquosos ou oleosos de uma ME, entretanto, quando não for aplicável, para a confirmação do tipo estrutural das MEs são necessárias técnicas mais sofisticadas, como microscopia eletrônica, difração de nêutrons e calorimetria exploratória diferencial (ROSSI *et al.*, 2007). Sabe-se que, microemulsões do tipo óleo em água (o/a) e de estruturas bicontínuas possuem valores de condutividade elétrica relativamente elevada quando comparadas às ME do tipo a/o (BUMAJDAD & EASTOE, 2004).

Os valores da condutividade elétrica da água e de MIP são de, respectivamente, ~ 3,00 e 0,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Conforme demonstrado na Tabela 10, os valores de condutividade elétrica para as MEs A são mais próximos da fase oleosa (MIP) do que a fase aquosa, o que se traduz na maior predominância de domínios oleosos, caracterizando a formulação como do tipo a/o. Estes resultados estão em concordância aos apresentados na literatura (NANDI, BARI & JOSHI, 2003). A medida de condutividade elétrica para a ME A foi eficaz na determinação do tipo estrutural.

Os valores de condutividade elétrica para as MEs B, C e D não apresentaram correlação com os excipientes da fase oleosa e nem com o da fase aquosa. O valor da condutividade elétrica obtido para o componente oleoso, a NMP, foi de ~1,40 $\mu\text{S}/\text{cm}$, enquanto que, para as formulações B, C e D foram superiores a 11,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Isto demonstra que em determinadas formulações, a análise de condutividade, por si só, não é capaz de definir seu tipo estrutural, sendo necessárias técnicas mais conclusivas. Entretanto, sua determinação é importante para as MEs, pois mesmo sem definir qual tipo estrutural, modificações em seus valores podem indicar alterações estruturais provenientes, por exemplo, de perda de estabilidade, processos inadequados de preparo e utilização de excipientes inadequados, ou seja, é um parâmetro sensível no controle de qualidade das microemulsões.

Como caracterização dos sistemas contendo NMP, a formulação contendo maior quantidade de fase aquosa (ME C) proporcionou maiores valores de condutividade elétrica frente aos obtidos para as MEs B e D, fato este condizente com a literatura (BUMAJDAD & EASTOE, 2004). A maior quantidade de tensoativos da ME D contendo DAP representou uma diminuição, porém não significativa ($P > 0,05$) da condutividade elétrica em relação a ME B contendo DAP.

Sistemas microemulsionados, quando não estão num processo de inversão de fases, são agregados esféricos incapazes de desviar o plano de luz incidente. Porém, durante um processo de inversão tornam-se anisotrópicos sem apresentar qualquer descontinuidade aparente nas suas propriedades físicas, mas que pode ser caracterizado pela variação do índice de refração (ROSSI *et al.*, 2007). Os resultados de índice de refração das formulações (Tabela 10), foram semelhantes entre si e próximos do valor encontrado para a fase oleosa, sugerindo que as formulações apresentam maior domínio oleoso.

O potencial hidrogeniônico (pH) cutâneo apresenta-se levemente ácido, o qual é fundamental para a proteção bacteriana e fungicida. Formulações de administração tópica devem ser compatíveis com relação a esses valores de pH, caso contrário, podem expor a pele a entrada de microrganismos. (LEONARDI, GASPAR & CAMPOS, 2002). Desta forma, procedeu-se a análise do pH dos sistemas microemulsionados desenvolvidos para avaliar sua adequabilidade como formulações de uso tópico. A Tabela 11 apresenta os resultados da determinação do pH das MEs A, B, C e D.

Tabela 11 - Análises de pH das formulações A, B, C e D, na ausência do fármaco e na presença do fármaco incorporado na fase oleosa e da microemulsão já pronta

	Formulação	pH
A	Sem fármaco	5,65 ± 0,05
	Fase Oleosa	5,42 ± 0,01
	ME já pronta	5,63 ± 0,10
B	Sem fármaco	6,78 ± 0,07
	Fase Oleosa	6,78 ± 0,02
	ME já pronta	6,89 ± 0,06
C	Sem fármaco	6,18 ± 0,00
	Fase Oleosa	6,10 ± 0,03
	ME pronta	6,07 ± 0,04
D	Sem Fármaco	6,22 ± 0,04
	Fase Oleosa	6,18 ± 0,04
	ME pronta	6,19 ± 0,03

média ± desvio padrão, n = 3.

De acordo com a Tabela 11, os valores de pH das microemulsões estão compatíveis com o da pele, aproximadamente de 5,4 a 6,9, o que as torna aptas para a utilização em administração tópica em relação ao pH.

Num processo de permeação passiva de fármacos, apenas moléculas não ionizadas passam prontamente pelas membranas lipídicas, desta forma, a quantidade de fármaco não-ionizado no veículo é um fator determinante no gradiente de difusão das membranas biológicas, e esse fator é determinado pelo pH da formulação (AULTON, 2005). Os valores de pH de todas as microemulsões desenvolvidas indicam

que a molécula de DAP estará na sua forma não ionizada (pK_a da DAP = 1,0), ou seja, ideal para sua permeação no estrato córneo (SCIOR *et al.*, 1997). Sendo assim, os valores de pH das ME foram considerados satisfatórios para a administração tópica.

O modo de incorporação do ativo não provocou alterações nas análises físico-químicas o que indica que não há mudança da microestrutura emulsionada.

4.5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DE DAP NAS FORMULAÇÕES

Por se tratar de uma formulação farmacêutica inédita, houve a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia de quantificação de DAP nas MEs. Várias técnicas analíticas constam na literatura para a determinação de dapsona em matéria-prima, em cápsulas ou em líquidos biológicos, urina, leite e plasma por exemplo. Estas técnicas englobam titulação, dosagem microbiológica, CLAE, espectrofotometria, espectrofluorimetria, entre outras (LEMNGE *et al.*, 1993; SUHREN & HEESCHEN, 1993; REVANASIDDAPPA & MANJU, 2001; WANG *et al.*, 2004; HADJIGEORGIU *et al.*, 2009).

O método analítico escolhido para este trabalho foi a CLAE em fase reversa devido à suas vantagens, onde destacam-se a capacidade de automação, o uso de fase móvel com baixa toxicidade e de menor custo, maior rapidez dos resultados em análises e boa reprodutibilidade (TONHI *et al.*, 2002; RUELA, ARAÚJO & PEREIRA, 2009).

4.5.1. Condições cromatográficas

O desenvolvimento desta metodologia iniciou-se com testes preliminares a fim de se definir a melhor condição cromatográfica. Após várias tentativas de adequação do sistema cromatográfico à fase estacionária de fase reversa, selecionou-se a coluna cromatográfica ligada a grupos octilsilanos (Coluna C8 (5 μ m) – 150 x 4,6 mm) e como fase móvel, tampão fosfato 0,03 M pH 7,4: Metanol (70 : 30). A Figura 19 representa um cromatograma obtido com amostra de dapsona.

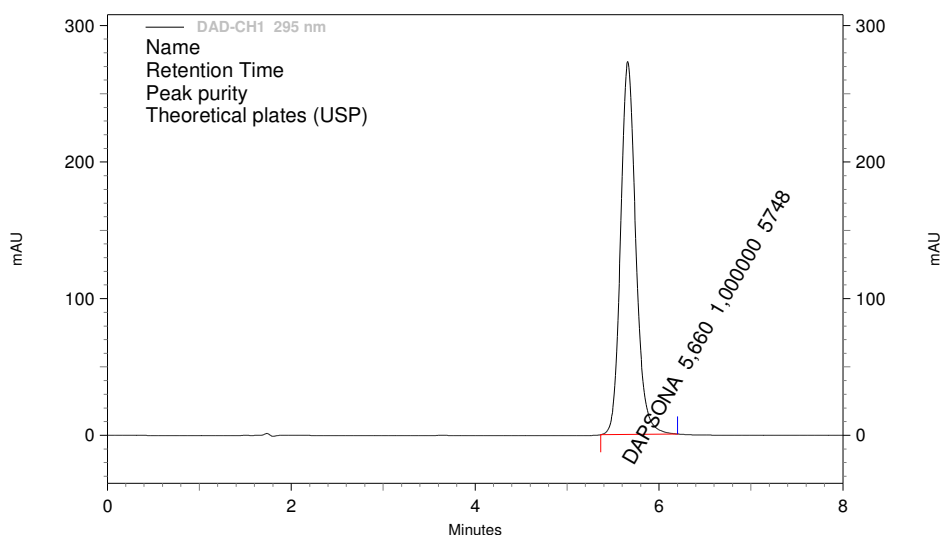


Figura 19 – Cromatograma de injeção obtido para microemulsão contendo DAP.

O comprimento de onda selecionado foi de 295 nm e volume de injeção de 20 μ L. O fluxo de 1mL/min resultou num tempo de retenção de aproximadamente 5,7 minutos e pressão do sistema em torno de 1600 psi. O pico da dapsona apresentou assimetria igual a 1,07, tendo pratos teóricos de cerca de 5700. Esses parâmetros cromatográficos foram considerados satisfatórios, o que demonstra a adequabilidade das condições cromatográficas para a quantificação da DAP em sistemas microemulsionados.

4.5.2. Validação da metodologia analítica

A fim de se assegurar a confiabilidade dos resultados da metodologia analítica desenvolvida e demonstrar que o método é apropriado para a análise de teor das MEs, foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação e de detecção.

4.5.2.1. Especificidade e Seletividade

Entende-se por seletividade e especificidade a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. O método cromatográfico com detecção de arranjo de fotodiodos possui a capacidade de demonstrar que o sinal cromatográfico é atribuído a um único componente através da análise de pureza. Os resultados das análises das microemulsões de DAP utilizando o detector de arranjo de fotodiodos estão apresentados nas Figuras 20, 21 e 22.

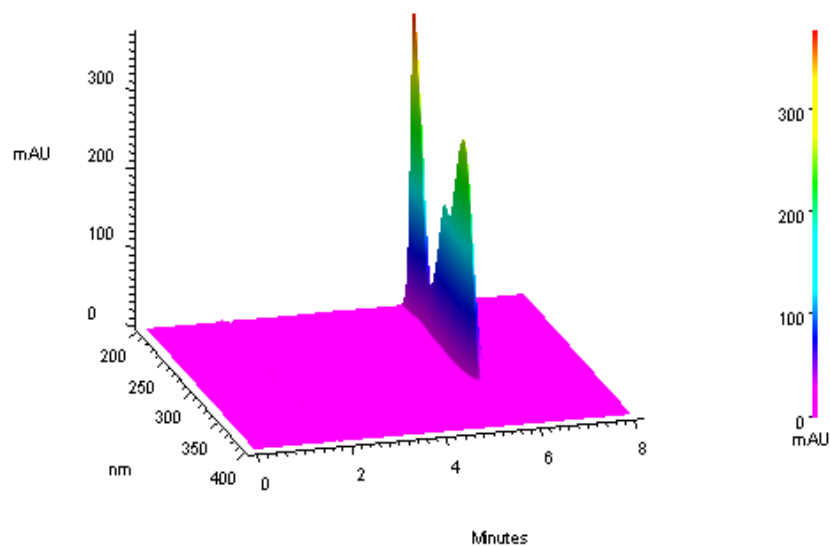


Figura 20 – Cromatograma de varredura tridimensional da microemulsão contendo DAP

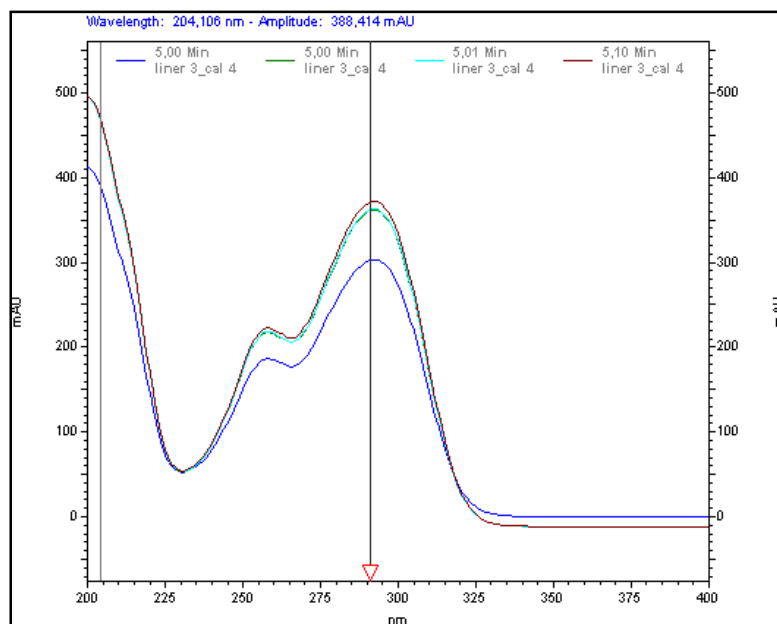


Figura 21 – Pureza cromatográfica obtida por similaridade da amostra de DAP nas microemulsões.

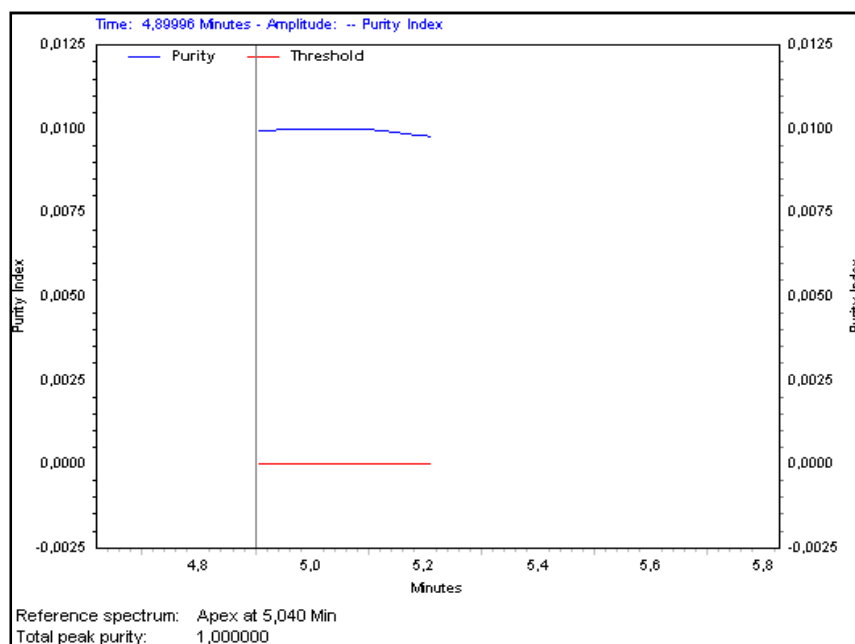


Figura 22 – Razão cromatográfica do sinal obtido da injeção da amostra de DAP nas microemulsões.

O cromatograma tridimensional da análise de DAP por CLAE demonstra a presença de apenas uma substância, a dapsona, sem interferências (Figura 20). Na Figura 21, os espectros de varredura obtidos em tempos distintos do pico cromatográfico não apresentaram diferenças em sua identidade, apenas em sua intensidade, o que indica a ausência de interferência. Corroborando com estes resultados, a Figura 22, demonstra que a razão cromatográfica foi constante e próxima de 0,00, porém maior que o ruído, confirmando que o método é seletivo e específico para análise de DAP em microemulsões

4.5.2.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo de concentração especificado. Na Figura 23, está representada a curva padrão média obtida, em triplicata, com cinco níveis de

concentração e na Tabela 12 o tratamento estatístico adequado com intuito de se comprovar a linearidade do método.

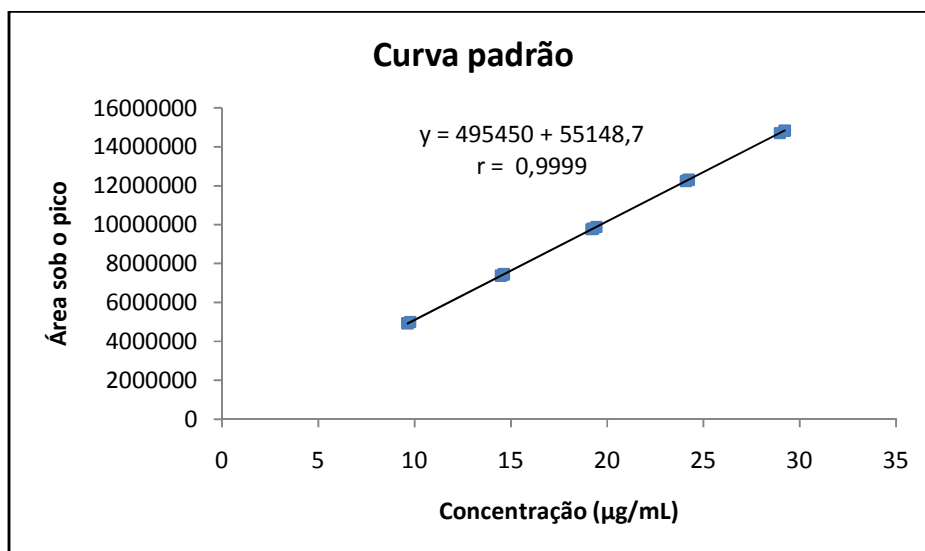


Figura 23 – Curva padrão para teste de linearidade (n = 3).

Tabela 12 – Parâmetros provenientes das curvas padrão (5 níveis)

Curva	Inclinação da curva (a)	Intercepto com eixo y (b)	Coefficiente de correlação (r)
1	506296,9	45017,2	1,0000
2	490533,7	46260,5	0,9998
3	489519,9	74168,3	0,9999
Média	495450,0	55148,7	0,9999
DP	9407,4	16843,2	0,0001

De acordo com a Tabela 12, os coeficientes de correlação obtidos ($r = 0,9999$) estão acima do critério mínimo aceitável pela legislação vigente ($r = 0,99$), o que demonstra a linearidade do método numa faixa de trabalho de 10 a 30 µg/mL.

4.5.2.3. Precisão intra-corrída e intermediária

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos no ensaio de precisão intra-corrída e precisão intermediária.

Tabela 13 – Precisão intra-dia e inter-dia

Concentração (µg/mL)	Dia	Área sob o pico	DP	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
20	1	9916334	63881,39	0,64	0,78
		9932939			
		10047354			
	2	9816093	50715,54	0,52	
		9917448			
		9870172			
25	1	12122533	17635,15	0,15	0,29
		12120413			
		12154843			
	2	12154999	47833,20	0,39	
		12059476			
		12111772			
30	1	15083494	30466,28	0,20	0,33
		15048838			
		15015865			
	2	15137257	64132,47	0,42	
		15014724			
		15108826			

O teste de precisão de uma metodologia analítica é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas repetidas de uma mesma amostra e expresso como desvio padrão relativo (ANVISA, 2003). De acordo com a Tabela 13, os resultados de desvio padrão relativo (DPR) das análises intra-ensaio relevaram que o

método proposto apresenta boa repetibilidade, por apresentar valores abaixo de 5,0% exigidos pela legislação vigente. A reprodutibilidade do método foi comprovada pelo grau de concordância entre os resultados das medições das amostras efetuadas em dias alternados (inter-dia). Desta forma, pode-se afirmar que o método foi preciso.

4.5.2.4. Precisão de injeção

A Tabela 14 relaciona os resultados para a precisão de injeção, realizada através de 10 injeções da concentração de trabalho (25 µg/mL).

Tabela 14 – Precisão de injeção realizada com 10 injeções na concentração 25 µg/mL

N	Área sob pico	Média	DP	DPR (%)
1	12635469			
2	12621589			
3	12621589			
4	12630462			
5	12625252			
6	12618017	12628491,2	6042,5	0,05
7	12625442			
8	12627405			
9	12636496			
10	12633662			

De acordo com a Tabela 14, a precisão do volume de injeção do cromatógrafo também demonstrou ser satisfatória, visto que o valor de DPR das injeções foi inferior a 2%.

4.5.2.5. Exatidão

A exatidão de uma metodologia analítica é a proximidade dos resultados obtidos pelo método desenvolvido em relação ao valor verdadeiro. A Tabela 15 demonstra os resultados do ensaio de exatidão pelo método do placebo contaminado.

Tabela 15 – Porcentagem média de recuperação no teste de exatidão

Nível	Quantidade adicionada (mg)	Quantidade recuperada (mg)	Recuperação (%)	DPR(%)
Baixo	25,70	25,78	100,33	0,15
Médio	31,08	31,06	99,93	1,54
Alto	37,30	37,47	100,46	0,75

n = 3

Os resultados apresentados na Tabela 15 demonstram que o método é capaz de medir com exatidão o fármaco dapsona, visto que os valores de recuperação estão dentro dos limites especificados de $\pm 2,0\%$, ou seja, entre 98,0 e 102,0% (ICH, 1996).

4.5.2.6. Limite de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico é a menor quantidade do analito numa amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Enquanto que o limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito que possa ser detectado, porém não necessariamente quantificado (ANVISA, 2003). Os valores estimados de LQ e LD foram realizados a partir dos dados provenientes da análise de regressão linear da curva de calibração (Tabela 12). O LD para o método cromatográfico foi de 0,10 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ de 0,33 $\mu\text{g/mL}$, valores bem abaixo da concentração de trabalho.

Os resultados da validação demonstraram que a metodologia de quantificação foi linear, seletiva, precisa e exata, sendo considerada adequada e eficaz para a quantificação de DAP nas formulações desenvolvidas.

4.6. ANÁLISE DE TEOR DE DAP NAS MICROEMULSÕES

Em complementação ao controle de qualidade, na Tabela 16 estão representadas as determinações do teor de DAP nas microemulsões através da metodologia desenvolvida e validada por CLAE.

Tabela 16 – Teor de DAP nas MEs

	Formulação	Teor (%)
A	Fase Oleosa	101,07
	ME pronta	98,66
B	Fase Oleosa	100,69
	ME pronta	97,90
C	Fase Oleosa	100,67
	ME pronta	97,07
D	Fase Oleosa	100,35
	ME pronta	103,27

Todas as formulações apresentaram valores de teor dentro dos critérios de aceitação preconizados pela Farmacopéia Brasileira (2010). Estes resultados, associado aos da caracterização físico-química possibilitam empregar as MEs como sistemas adequados para aplicação em formulações farmacêuticas de administração tópica. Dessa forma, o próximo passo do desenvolvimento galênico foi a avaliação de sua performance através de estudo de liberação e de permeação *in vitro*.

4.7. ESCOLHA DA SOLUÇÃO RECEPTORA PARA OS ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO *IN VITRO*

A principal característica que um meio receptor deve possuir é a biorrelevância, ou seja, que apresente composição e característica similar ao fluido corporal a que se destina nos estudos *in vitro* (SIEWERT *et al.*, 2003). Em estudos de liberação e permeação *in vitro*, fármacos com baixa solubilidade em água, como a DAP, dificultam a seleção de meios receptores (SILVA & VOLPATO, 2002). Este fato é agravado pelo volume do compartimento receptor das células de Franz deste trabalho ser pequeno, apenas 7 mL, e fixo.

A utilização de tensoativos em meios receptores é uma das estratégias para aumentar a hidrossolubilidade de fármacos. Segundo recomendação do FDA, soluções tamponadas contendo até 5% (p/v) de tensoativos podem ser utilizadas como meio receptor em estudos de liberação e permeação *in vitro* (SILVA & VOLPATO, 2002; U.S. FDA/CDER, 1997).

Desta forma, a solubilidade da DAP foi avaliada em diferentes soluções biorrelevantes candidatas à solução receptora: tampão fosfato 0,1 M pH 6,8, tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e fisiológica (cloreto de sódio a 0,9% (p/v)), na presença de diferentes concentrações de polissorbato 80, conforme demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17 - Concentração de saturação da DAP em solução salina, tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e tampão fosfato 0,1 M pH 6,8 na presença de diferentes quantidade de polissorbato 80 (T80)

Solução	Quantidade de T80 (% p/v)	Concentração de saturação de DAP (mg/mL)
Salina	0,0	0,1558
	0,5	0,5959
	1,0	1,1391
	2,0	3,9004
Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4	0,0	0,1348
	0,5	0,4972
	1,0	1,0123
	2,0	3,1944
Tampão fosfato 0,1 M pH 6,8	0,0	0,1488
	0,5	0,5322
	1,0	1,8993
	2,0	3,5475

Um dos critérios de escolha do meio receptor é a verificação da solubilidade em caso de liberação total do fármaco do compartimento doador e, neste quesito, as três soluções contendo 2,0% de polissorbato 80 foram satisfatórias. Em termos de dificuldades de preparo, as três soluções também se assemelharam.

Em todas as soluções avaliadas a dapsona se encontra na forma não ionizada, pois a molécula de dapsona apresenta pKa no valor de 1, o que não altera suas propriedades físico-químicas, principalmente a solubilidade (SCIOR *et al.*, 1997). A solução salina apresenta pH de 5,9, portanto, as soluções salina, tampão fosfato 0,1 M pH 6,8 e tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 adicionadas de 2,0% de polissorbato 80 são

adequadas para os estudos de liberação e permeação. Entretanto, foi selecionada solução tampão 0,1 M pH 7,4 + 2,0% de polissorbato 80, por possuir pH próximo da neutralidade e ser uma solução amplamente utilizada para este fim (LEE, LANGER & SHASTRI, 2003; BOLZINGER *et al.*, 2008).

4.8. VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DAP EM ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E DE PERMEAÇÃO *IN VITRO*

Conforme visto anteriormente, a validação da metodologia analítica por CLAE demonstrou ser eficiente para a quantificação de teor de DAP nos sistemas microemulsionados. Entretanto, a fim de se aplicar esta metodologia de quantificação de DAP nos estudos de liberação e de permeação *in vitro* é necessário comprovar a sua eficácia frente à novas condições analíticas: maior faixa de concentração de trabalho e presença de tensoativo na composição do diluente.

As condições cromatográficas foram as estabelecidas durante o desenvolvimento da metodologia de quantificação de DAP em sistemas microemulsionados, conforme demonstrado no item 4.3.1.

4.8.1. Especificidade e Seletividade

A Figura 24 representa o cromatograma de injeção da formulação de DAP em comparação com a injeção das formulações sem o fármaco e das microemulsões contendo DAP, ambas diluídas na SR (tampão fosfato 0,03 M pH 7,4 + 2,0% de tween 80).

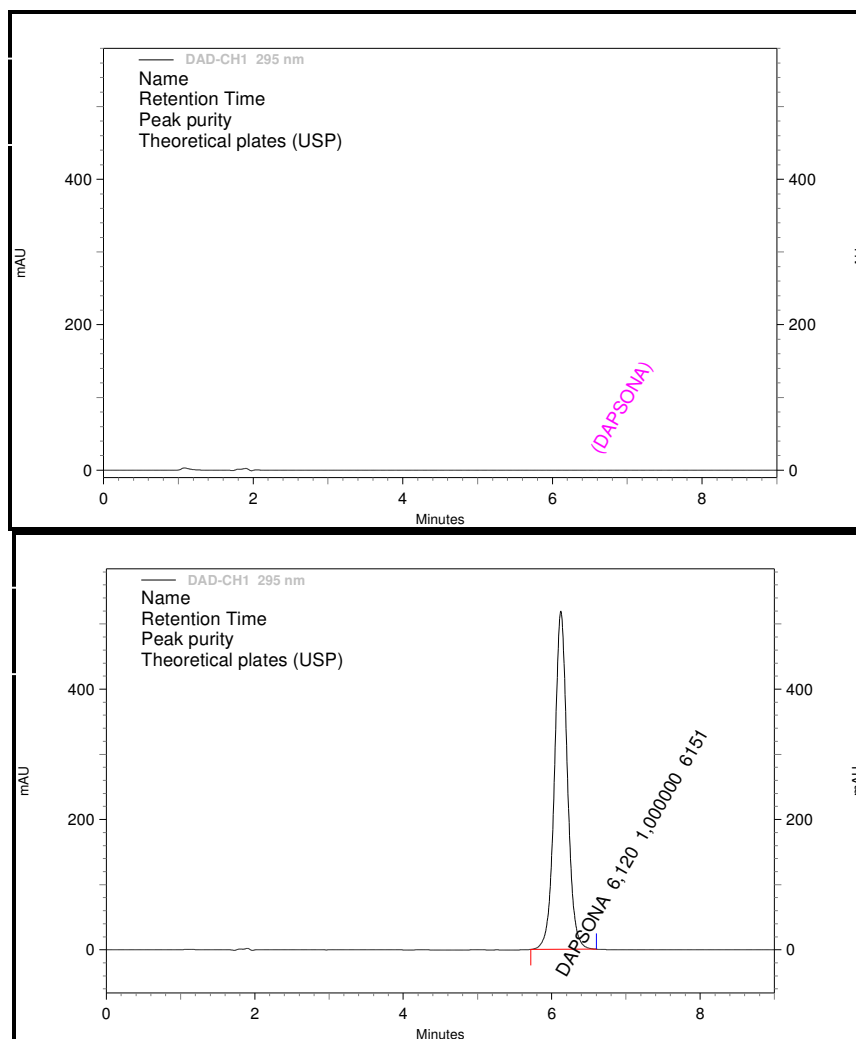


Figura 24 - Cromatogramas de injeção obtidos para estudos de liberação e permeação *in vitro*: a) formulação A sem o fármaco; b) formulação contendo DAP.

Os cromatogramas obtidos pelas injeções das formulações sem o fármaco demonstram que não há interferentes derivados dos constituintes da solução receptora, conforme representado pelo cromatograma da formulação A sem o fármaco na Figura 25. Os resultados da análise de pureza, realizado com auxílio do detector de arranjos de fotodiodo estão representados nas Figuras 25, 26 e 27.

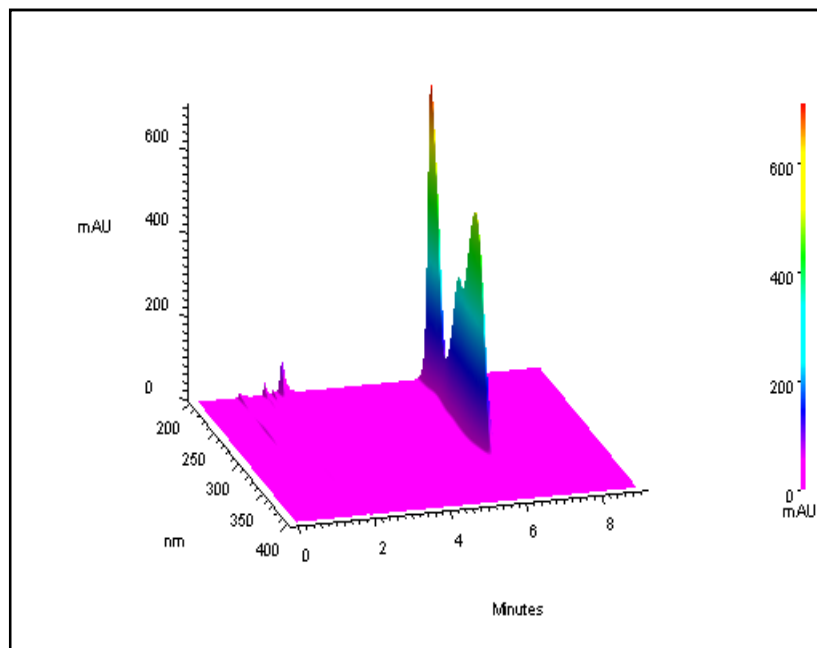


Figura 25 – Cromatograma de varredura tridimensional da amostra de DAP utilizando como diluente a solução receptora.

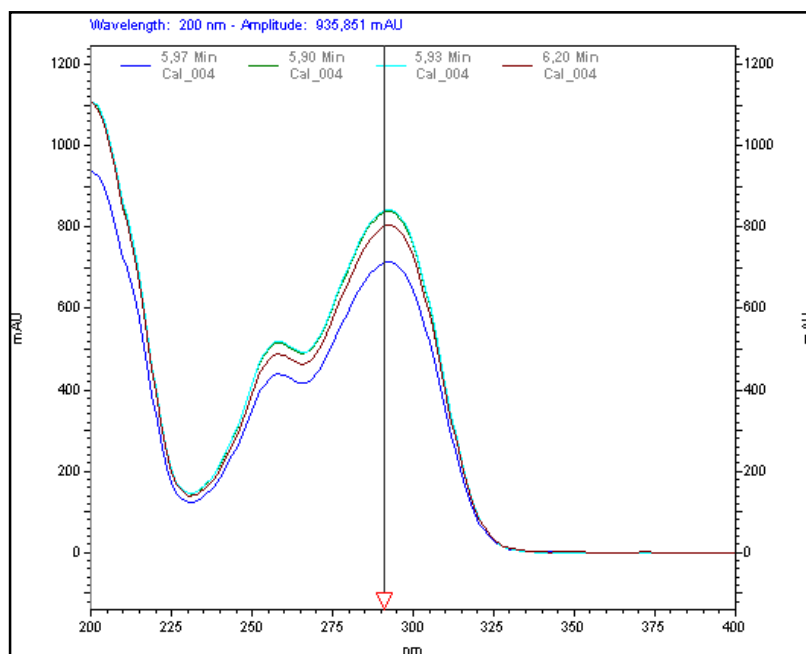


Figura 26 - Pureza cromatográfica obtida por similaridade de espectros de amostras de DAP diluídas na solução receptora.

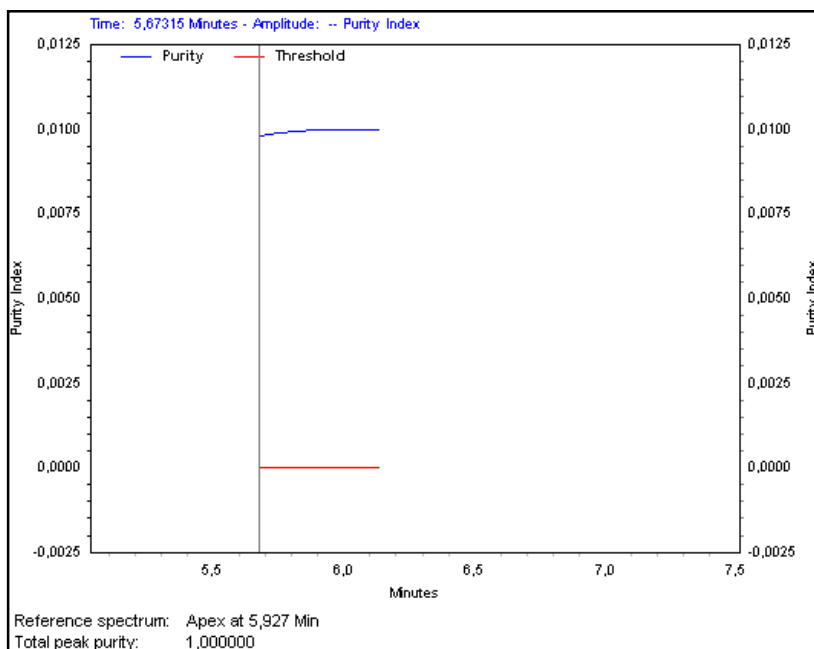


Figura 27 – Razão cromatográfica do sinal obtido da injeção da amostra de DAP nas microemulsões diluídas em solução receptora.

A seletividade pode ser demonstrada pela ausência de interferência no sinal cromatográfico. Os espectros de varredura (Figura 26) obtidos em tempos distintos do sinal cromatográfico variaram apenas pela sua intensidade. A razão cromatográfica (Figura 27) foi constante e próxima de 0,00. Estes resultados confirmam que o método é seletivo e específico para a quantificação de DAP na solução receptora utilizada nos estudos de liberação e permeação *in vitro*.

4.8.2. Linearidade

Na Figura 28 está representada a curva padrão obtida com faixa de concentração de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de DAP na solução receptora ($n = 3$) e na Tabela 18 o tratamento estatístico.

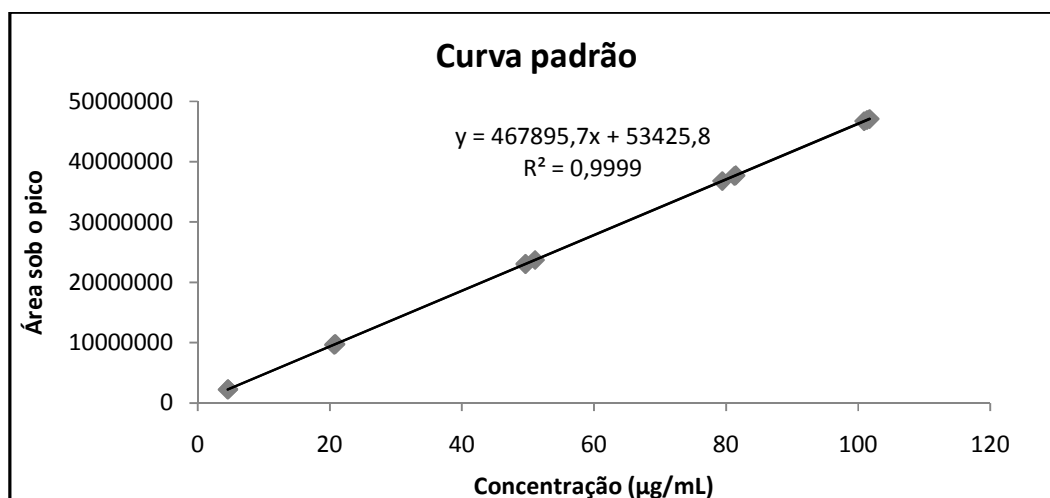


Figura 28 – Curva padrão para teste de linearidade aplicado ao ensaio de liberação e permeação *in vitro* (n = 3).

Tabela 18 – Parâmetros provenientes das curvas padrão (5 níveis)

Curva	Inclinação da curva (a)	Intercepto com eixo y (b)	Coefficiente de correlação (r)
1	463381,8	94371,0	0,9998
2	470406,8	-26183,9	0,9998
3	469895,4	92090,3	0,9999
Média	467895,7	53425,8	0,9999
DP	3916,6	68954,5	0,00005

A linearidade do método utilizada nos estudos de liberação e de permeação *in vitro* foi comprovada pela análise de regressão linear das curvas padrão (n=3), onde o valor de coeficiente linear obtido foi superior a 0,99, exigido para o teste. Isto demonstra que os resultados obtidos pelo método são diretamente proporcionais à concentração

do fármaco na solução receptora num intervalo de trabalho adequado aos estudos de liberação e de permeação *in vitro* consistindo de 5 a 100 µg/mL.

4.8.3. Precisão intra e inter-dia

A Tabela 19 representa os resultados obtidos no ensaio de precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária).

Tabela 19 – Precisão intra-dia e inter-dia

Concentração (µg/mL)	Dia	Área sob o pico	DP	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
20	1	9816093	55777,02	0,56	0,66
		9917448			
		9870172			
	2	9916334	46588,96	0,47	
		9932939			
		10047354			
50	1	24357900	181835,96	0,75	1,20
		24470419			
		24114664			
	2	24875632	91023,17	0,37	
		24823546			
		24698523			
80	1	39257360	159119,13	0,40	0,85
		39339103			
		39564587			
	2	39998542	63291,08	0,16	
		40012535			
		39896587			

A precisão pode ser verificada pelos valores de desvio padrão inferiores aos 5,0% aceitáveis para o teste. Os resultados da Tabela 19, demonstram que o método apresenta repetibilidade entre suas análises e precisão inter-dia, ou seja, o método é capaz de apresentar concordância de seus resultados tanto num curto período de tempo quanto em dias diferentes.

4.8.4. Exatidão

A Tabela 20 apresenta os resultados do ensaio de exatidão realizado pelo método do placebo contaminado.

Tabela 20 – Porcentagem média de recuperação no teste de exatidão

Nível	Quantidade adicionada (mg)	Quantidade recuperada (mg)	Recuperação (%)	DPR(%)
Baixo	48,57	48,38	99,60	0,47
Médio	121,42	120,22	99,01	0,40
Alto	194,27	196,28	101,03	0,75

n = 3

Na verificação da exatidão do método (Tabela 20), os três níveis avaliados, baixo, médio e alto, foram satisfatórios, pois apresentaram valores de desvio padrão relativo em cada nível inferiores aos 2,0% preconizados na legislação vigente. Isto demonstra que o método é exato para análise de DAP. A precisão e a exatidão juntas determinam o erro de uma medida analítica. O método desenvolvido foi considerado exato e preciso.

4.8.5. Limites de quantificação e de detecção

Os ensaios de liberação e permeação *in vitro* são considerados testes de performance de formulações e, por isto, são de fundamental importância as determinações de LQ e LD para garantir a quantificação e a detecção do fármaco desde os pontos iniciais de amostragem. Os valores estimados de LD e LQ foram de 0,44 µg/mL e 1,47 µg/mL, respectivamente, sendo considerados satisfatórios.

Os resultados da validação demonstraram que a metodologia de quantificação por CLAE desenvolvida é adequada para os estudos de liberação e permeação *in vitro*, visto que foi comprovada sua seletividade, linearidade, precisão e exatidão na análise quantitativa de DAP na solução receptora.

4.9. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os estudos de liberação *in vitro* visam a avaliação da liberação/cedência do fármaco a partir da formulação desenvolvida, podendo refletir o efeito combinado de vários parâmetros físicos e químicos do sistema (SILVA *et al.*, 2010b). Apesar de sua significativa importância, atualmente não há nenhum compêndio oficial que preconize uma metodologia específica para avaliação da liberação *in vitro* de produtos tópicos.

A avaliação da liberação de DAP nas MEs foi realizada num sistema bicompartimental consagrado na literatura científica, a célula de difusão vertical tipo FRANZ (FDA, 1997; SIEWET *et al.*, 2003; SINTOV & BOTNER, 2006; ZHU *et al.*, 2008). Nas Tabelas 21 e 22 estão apresentados os resultados dos estudos de liberação *in vitro* das formulações A, B, C e D, contendo o fármaco incorporado na fase oleosa (FO) e na microemulsão pronta (MP).

Tabela 21 - Quantidades cumulativas de DAP liberada em cada tempo na SR nos estudos de liberação *in vitro* (n = 6) das formulações A-FO, A-ME, B-FO, B-ME

Tempo (h)	Quantidade de DAP liberada (ug/cm ²) ± DP			
	A - FO	A-MP	B-FO	B-MP
1	79,50 ± 35,05	81,13 ± 18,58	529,96 ± 49,44	476,19 ± 43,32
2	193,46 ± 35,76	187,24 ± 17,82	887,62 ± 43,21	856,53 ± 85,69
3	295,98 ± 46,71	282,71 ± 28,89	1236,75 ± 55,71	1093,43 ± 97,71
4	384,20 ± 59,08	366,72 ± 39,09	1516,51 ± 61,08	1324,44 ± 126,42
5	446,64 ± 52,83	429,41 ± 39,42	1771,21 ± 66,40	1564,96 ± 128,28
6	505,71 ± 59,27	491,68 ± 53,43	1943,73 ± 49,08	1734,96 ± 158,78
7	572,59 ± 46,52	544,54 ± 55,38	2132,99 ± 55,07	1885,91 ± 160,70
8	616,63 ± 69,41	595,76 ± 61,10	2291,08 ± 77,24	2048,45 ± 174,67
23	1221,55 ± 146,06	1149,09 ± 115,21	3977,16 ± 81,74	3596,78 ± 323,14
24	1326,06 ± 120,26	1270,64 ± 144,54	4176,05 ± 97,99	3747,92 ± 336,19

Tabela 22 - Quantidades cumulativas de DAP liberada em cada tempo na SR nos estudos de liberação *in vitro* (n = 6) das formulações C-FO, C-MP, D-FO, D-MP

Tempo (h)	Quantidade de DAP liberada (ug/cm ²) ± DP			
	C-FO	C-MP	D-FO	D-MP
1	444,79 ± 41,40	398,33 ± 20,80	214,01 ± 26,05	192,73 ± 19,70
2	777,71 ± 57,83	705,79 ± 58,76	416,21 ± 67,32	388,12 ± 26,84
3	1077,84 ± 71,03	982,94 ± 79,61	570,31 ± 54,37	512,90 ± 43,06
4	1332,64 ± 88,21	1237,72 ± 98,23	741,92 ± 66,81	672,73 ± 43,05
5	1546,33 ± 106,71	1437,16 ± 103,36	909,32 ± 97,53	795,42 ± 80,33
6	1752,01 ± 124,11	1634,41 ± 115,80	1085,58 ± 110,44	955,30 ± 68,63
7	1924,22 ± 149,53	1785,58 ± 123,46	1225,84 ± 93,24	1089,24 ± 86,34
8	2102,68 ± 148,31	1935,34 ± 141,99	1387,53 ± 109,78	1202,92 ± 105,21
23	3595,71 ± 341,83	3390,18 ± 197,86	2800,76 ± 234,37	2500,66 ± 332,99
24	3837,34 ± 339,50	3668,41 ± 229,45	3140,12 ± 187,66	2738,88 ± 387,97

A Figura 29 representa o perfil de liberação da DAP encontrado ao longo de 24 horas para as formulações desenvolvidas.

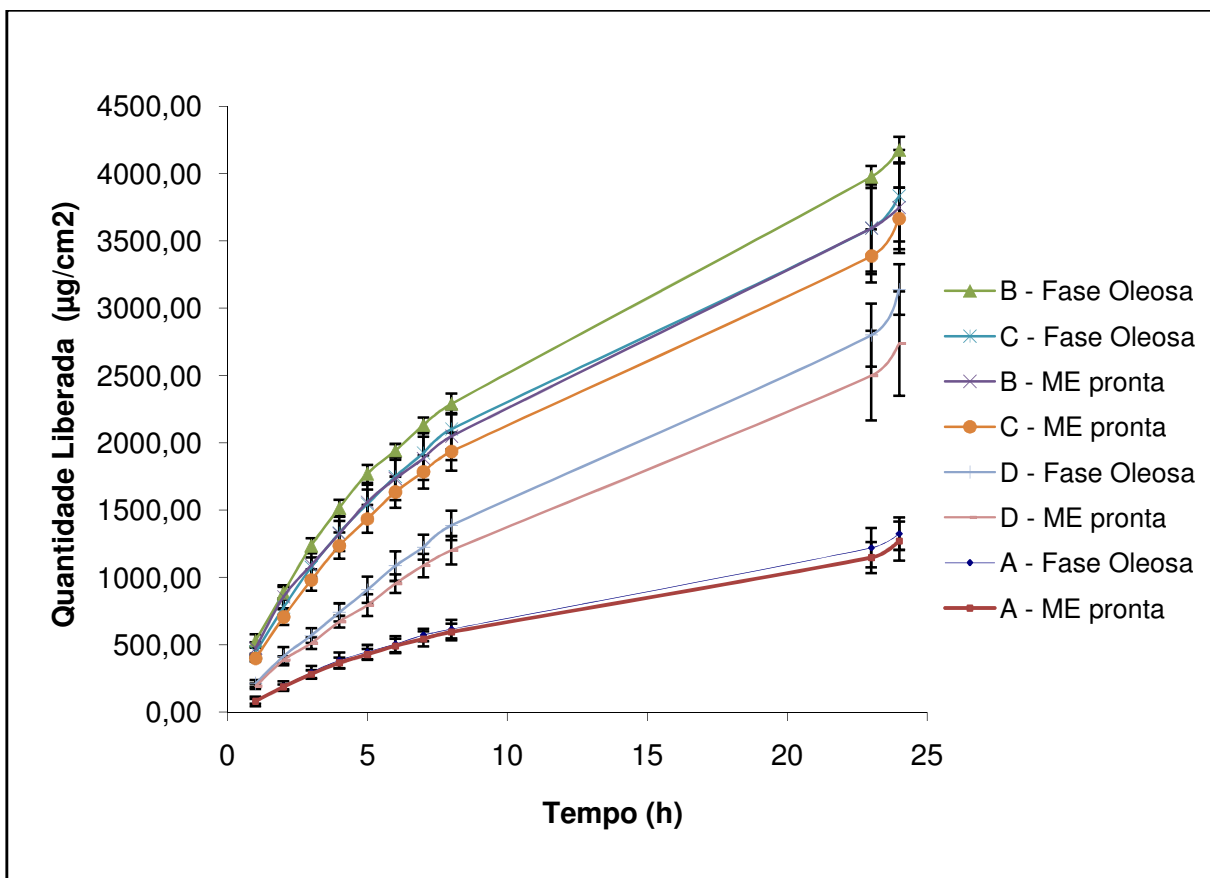


Figura 29 – – Quantidade de DAP liberada *in vitro* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em diferentes tempos (0-24h) das formulações A-FO, A-ME, B-FO, B-ME, C-FO, C-ME, D-FO, D-ME.

A Tabela 23 representa o tratamento estatístico para os estudos de liberação *in vitro* após 24h das formulações desenvolvidas.

Tabela 23 – Tratamento estatístico (*one-way* ANOVA – Teste de Tukey) dos resultados dos estudos de liberação *in vitro* das formulações A-FO, A-ME, B-FO, B-ME, C-FO, C-ME, D-FO e D-ME

FORMULAÇÃO	Significância^a
A - FO vs A - ME	> 0,05
A - FO vs B – FO	< 0,05 ***
A - FO vs B – ME	< 0,05 ***
A - FO vs C – FO	< 0,05 ***
A - FO vs C – ME	< 0,05 ***
A - FO vs D – FO	< 0,05 **
A - FO vs D – ME	< 0,05 *
A - ME vs B – FO	< 0,05 ***
A - ME vs B – ME	< 0,05 ***
A - ME vs C – FO	< 0,05 ***
A - ME vs C – ME	< 0,05 ***
A - ME vs D – FO	< 0,05 **
A - ME vs D – ME	< 0,05 *
B - FO vs B – ME	> 0,05
B - FO vs C – FO	> 0,05
B - FO vs C - ME	> 0,05
B - FO vs D - FO	< 0,05 ***
B - FO vs D - ME	< 0,05 ***
B - ME vs C - FO	> 0,05
B - ME vs C - ME	> 0,05
B - ME vs D - FO	< 0,05 *
B - ME vs D - ME	< 0,05 **
C - FO vs C - ME	> 0,05
C - FO vs D - FO	< 0,05 **
C - FO vs D - ME	< 0,05 ***
C - ME vs D - FO	< 0,05 *
C - ME vs D - ME	< 0,05 *
D - FO vs D - ME	> 0,05

(a) = significativo para $P < 0,05$, sendo * = Valor de P entre 0,01 a 0,05. ** = Valor de P entre 0,001 a 0,01. *** = Valor de P < 0,001.

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados utilizando a técnica da dosagem infinita, para que não ocorresse o esgotamento do fármaco no compartimento doador durante o experimento. Deste modo, garante-se uma força motriz constante entre o compartimento doador e o receptor, permitindo a obtenção do estado estacionário, necessário para a aplicação da avaliação da cinética de liberação baseada nas leis de difusão de Fick.

Após 24 horas de estudo, as formulações contendo NMP (B-FO, B-ME, C-FO, C-ME, D-FO e D-ME) proporcionaram maior liberação acumulada da DAP frente as MEs A-FO e A-ME, as quais contêm o MIP como fase oleosa. Considerando que a membrana de acetato de celulose utilizada não apresenta função barreira como a pele, a avaliação da taxa de liberação fica restrita a interações fármaco/veículo que afetem as características de liberação para o meio receptor.

O aumento da capacidade de solubilização proporcionado pelo NMP pode ser o fator dominante da maior performance de liberação *in vitro* do fármaco das MEs A, B e C frente a ME A, visto que a maior quantidade do fármaco no veículo, promove um aumento da atividade termodinâmica, induzindo maior liberação. As formulações B, C e D apresentam 2,5 vezes maior quantidade de fármaco incorporado do que a ME A.

O desempenho na liberação do fármaco também foi avaliado quanto ao modo de incorporação da DAP durante o preparo das MEs. As formulações foram preparadas com ativo incorporado na microemulsão já formada e, paralelamente, com o fármaco solubilizado na fase oleosa (FO). De acordo com os resultados da Tabela 23, não houve diferença significativa entre os modos de incorporação em todas as formulações desenvolvidas.

Apesar de não haver dados na literatura que indiquem uma maior eficiência proveniente de modos de incorporações distintos de fármacos em sistemas microemulsionados, essa avaliação se tornou importante, já que o modo de preparo durante a avaliação de solubilidade da DAP às MEs interferiu tanto na quantidade de fármaco solubilizada quanto na estabilidade dos sistemas contendo MIP. Os resultados da caracterização físico-química das MEs não indicaram a ocorrência de alteração estrutural proveniente dos modos de incorporação. Conclui-se que o modo de preparo

não interfere na estrutura e, conseqüentemente, na performance do sistema microemulsionado.

4.9.1. Avaliação da cinética de liberação

A interpretação quantitativa dos valores obtidos num estudo de liberação *in vitro* de fármacos é realizada pela determinação do modelo de cinética de liberação de fármacos, que relaciona o mecanismo de liberação dos fármacos em função das características da formulação (COSTA & LOBO, 2001).

A partir dos dados de perfil de liberação (Tabelas 21 e 22) foram determinados, matematicamente, o fluxo e o *lag time* baseado no modelo de cinética obedecido para cada formulação, conforme demonstrado na Tabela 24.

Tabela 24 – Cinética de liberação nos estudos de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas. Valores de fluxo (J), *Lag time*, quantidade liberada de DAP após 24 h e coeficiente de correlação linear

Formulações	Fluxo (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \sqrt{\text{h}}$)	<i>Lag Time</i> (min)	Quantidade liberada após 24h ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Modelo Cinético	Correlação Linear (r)
A-FO	292,14	30,08	1326,06	Higuchi	0,9984
A-ME	283,47	31,10	1270,64	Higuchi	0,9994
B-FO	958,29	10,58	4176,05	Higuchi	0,9978
B-ME	870,49	13,25	3747,92	Higuchi	0,9986
C-FO	930,90	19,49	3837,34	Higuchi	0,9999
C-ME	866,89	20,18	3668,41	Higuchi	0,9989
D-FO	746,24	58,81	3140,12	Higuchi	0,9975
D-ME	635,01	53,02	2738,88	Higuchi	0,9973

Todas as formulações apresentaram modelo de cinética de pseudo-primeira ordem (Higuchi). Este modelo, baseado nas leis de Fick, descreve que a quantidade de fármaco a ser liberado pelo veículo é diretamente proporcional à raiz quadrada do tempo. Em outras palavras, as formulações desempenham um papel importante no processo de liberação do fármaco ao meio receptor a partir da membrana selecionada. Este tipo de modelo é aplicado para formas farmacêuticas de liberação modificada (COSTA & LOBO, 2001). Tais resultados traduzem, portanto, que a quantidade de DAP liberada é afetada pela composição das MEs.

A influência da quantidade de fase aquosa na liberação da DAP foi avaliada para as MEs contendo NMP. A quantidade de 27% de fase aquosa na ME C em relação aos 16,88% presentes na ME B não proporcionou alterações significativas em seus perfis de liberação. Entretanto, o *lag time*, ou seja, o tempo em que o fármaco começa a ser liberado, foi menor na formulação com a menor quantidade de água. As MEs B apresentaram *lag time* de aproximadamente 10 a 13 min, enquanto que as MEs C de 19 a 20 minutos.

É descrito na literatura que a estrutura do tensoativo e do cotensoativo podem ser um importante fator na capacidade das MEs em liberar o ativo por afetar a camada interfacial e, assim, a liberação do fármaco das gotículas internas (KOGAN & GARTI, 2006). No presente trabalho avaliou-se o efeito provocado pela variação da quantidade de tensoativos na liberação do fármaco. A composição de tensoativos nas MEs D corresponde a 66,32% da formulação total, enquanto que na ME B representa 41,76%. Este aumento de aproximadamente 58% de tensoativos da ME D em relação a B, proporcionou um menor fluxo e maior *lag time* na liberação da DAP (Tabela 24), o que representa uma diminuição da capacidade de liberação da DAP. Apesar de não se alterar a estrutura da camada interfacial, o aumento da quantidade de tensoativos modificou a capacidade de liberação do ativo a partir do sistema microemulsionado proporcionando menor liberação do ativo.

Os resultados obtidos no estudo de liberação *in vitro* foram promissores e demonstraram que as MEs promoveram e interferiram na liberação do fármaco. Contudo, os testes de liberação *in vitro* não garantem maior disponibilidade dérmica do

fármaco, visto as particularidades dos mecanismos de penetração cutânea (SIEWERT *et al.*, 2003). Para complementação da avaliação da performance dos sistemas desenvolvidos, fazem-se necessários estudos de permeação *in vitro*.

4.10. TESTE DE PERMEÇÃO *IN VITRO*

Para que os estudos de permeação *in vitro* se aproximem da realidade, é preciso que se utilize membranas naturais em seus sistemas. Particularmente, na avaliação da permeação cutânea deste trabalho utilizou-se o modelo animal mais semelhante em substituição à pele humana, a pele suína, a qual possui propriedades histológicas e bioquímicas que fornecem resultados comparáveis aos obtidos de pele humana, sendo a mais indicada para estudos de permeação *in vitro* (MOSER *et al.*, 2001). Sendo mais específico, somente a epiderme da orelha de porco foi utilizada como membrana para avaliação da permeação de DAP a partir das microemulsões. A utilização da epiderme é justificada pelo fato de se desejar avaliar a capacidade das MEs em transpor a barreira cutânea e não os processos de difusão nas camadas profundas da pele. Estudos demonstram que a excisão da epiderme não altera sua permeabilidade, contanto que o estrato córneo permaneça intacto, seu desempenho como barreira *in vitro* é muito semelhante a *in vivo* (BEMVINDO, 2006).

Conforme discutido anteriormente, o modo de incorporação de DAP não interferiu na estrutura das MEs formadas e, conseqüentemente, no seu desempenho em liberar o fármaco *in vitro*. Desta forma, a avaliação da permeação *in vitro* foi realizada apenas nas MEs obtidas com a incorporação do fármaco na fase oleosa devido à sua facilidade de preparo. Na Tabela 25 estão apresentados os resultados de permeação *in vitro* realizados nas formulações A-FO, B-FO, C-FO e D-FO.

Tabela 25 - Quantidades cumulativas por área de DAP permeada em cada tempo na SR nos estudos de permeação *in vitro* (n = 6) das formulações A-FO, B-FO, C-FO, D-FO

Tempo (h)	Quantidade de DAP permeada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP			
	A - FO	B - FO	C - FO	D - FO
0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
1	126,9 \pm 16,62	5,3 \pm 1,24	23,2 \pm 6,52	14,7 \pm 8,89
2	266,4 \pm 70,66	6,3 \pm 1,70	28,4 \pm 7,74	19,3 \pm 11,65
3	520,6 \pm 121,39	7,1 \pm 1,68	32,5 \pm 8,66	21,7 \pm 5,25
4	625,7 \pm 160,26	8,6 \pm 1,84	36,7 \pm 9,64	24,4 \pm 5,52
5	780,6 \pm 210,27	9,0 \pm 1,77	41,0 \pm 10,56	27,8 \pm 5,72
6	869,4 \pm 239,51	10,1 \pm 1,94	45,6 \pm 12,11	31,0 \pm 6,11
7	964,2 \pm 252,48	11,4 \pm 2,05	50,7 \pm 13,37	34,6 \pm 6,74
8	1031,4 \pm 288,88	12,5 \pm 2,19	56,0 \pm 15,16	39,5 \pm 7,37
23	1436,9 \pm 304,16	17,8 \pm 3,92	140,4 \pm 42,05	107,7 \pm 23,30
24	1480,7 \pm 324,88	19,8 \pm 4,87	161,4 \pm 47,39	135,0 \pm 31,16

A Figura 30 representa os perfis de permeação *in vitro* da DAP obtidos ao longo de 24 horas para as formulações A-FO, B-FO, C-FO e D-FO.

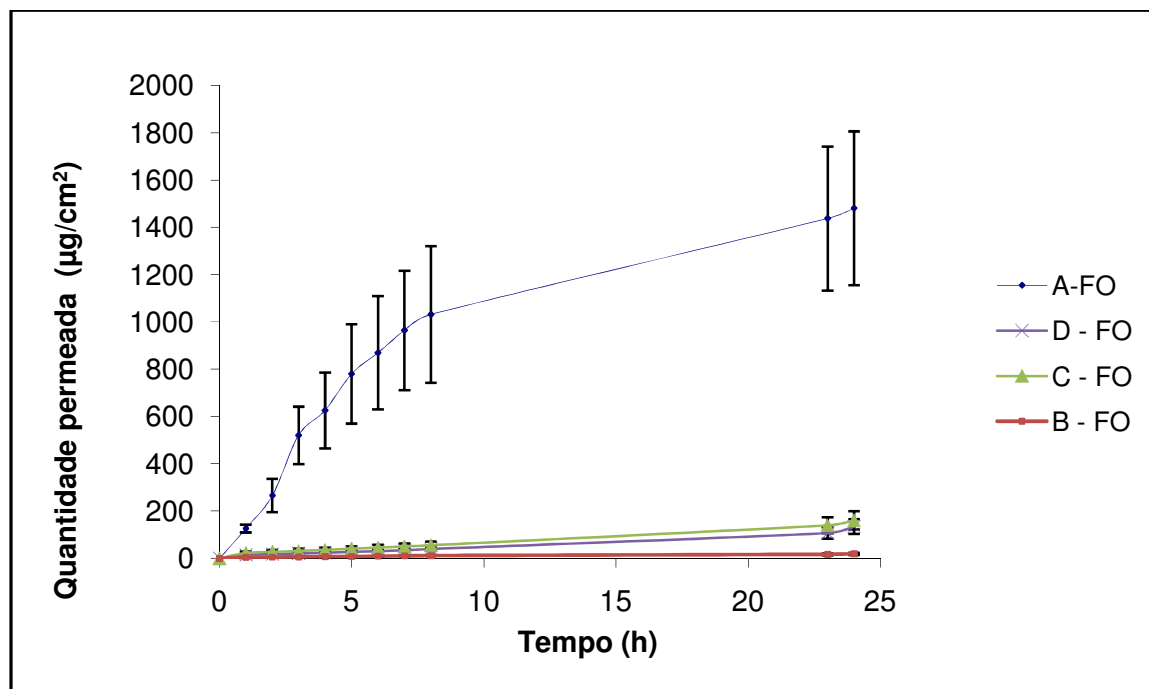


Figura 30 – Quantidade de DAP permeada *in vitro* (µg/cm²) em função do tempo através da epiderme de orelha suína das MEs A-FO, B-FO, C-FO e D-FO.

A Tabela 26 representa o tratamento estatístico para os estudos de permeação *in vitro* para as formulações A-FO, B-FO, C-FO e D-FO.

Tabela 26 – Tratamento estatístico (*one-way* ANOVA – Teste de Tukey) dos resultados dos estudos de permeação *in vitro* das formulações A-FO, B-FO, C-FO, D-FO

FORMULAÇÃO	Significância ^a
A - FO vs B - FO	< 0,05 ***
A - FO vs C - FO	< 0,05 ***
A - FO vs D - FO	< 0,05 ***
B - FO vs C - FO	> 0,05
B - FO vs D - FO	> 0,05
C - FO vs D - FO	> 0,05

(a) = significativo para P < 0,05, sendo *** = Valor de P < 0,001.

Conforme demonstrado na Tabela 25, a maior quantidade permeada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 horas através da epiderme suína foi obtida pela formulação A-FO, correspondendo a $1480,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Estatisticamente, os perfis de permeação *in vitro* das formulações contendo NMP foram semelhantes entre si e inferiores aos encontrados com a formulação contendo MIP (ME A-FO).

Comparando-se os resultados de liberação *in vitro* de DAP das ME B, C, D com os resultados de permeação *in vitro*, é possível observar que após 24 horas, a quantidade liberada de DAP pelo veículo foi maior do que a permeada através da epiderme. Isto sugere que o fator limitante para a permeação de DAP para as ME contendo NMP foi o mecanismo de permeação através da pele. Estes resultados diferem do que ocorreu com a ME A, para a qual o perfil de liberação em 24 horas foi semelhante ao de permeação, o que indica que o processo de permeação desta formulação foi limitado pela liberação do fármaco de seu veículo.

A Tabela 27 apresenta os resultados de fluxo e *lag time* obtidos a partir dos dados de permeação *in vitro* (Tabela 26).

Tabela 27 - Cinética de permeação nos estudos de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas. Valores de fluxo (J), *Lag Time*, quantidade liberada de DAP após 24 h e coeficiente de correlação linear

Formulações	Fluxo (J)	Lag Time (h)	Quantidade permeada após 24h ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Modelo Cinético	Correlação Linear (r)
A-FO	292,14 ⁱ	0,42	1480,66	Higuchi	0,9941
B-FO	1,0452 ⁱⁱ	3,86	19,76	Ordem zero	0,9858
C-FO	4,6928 ⁱⁱ	3,83	161,40	Ordem zero	0,9977
D-FO	3,5134 ⁱⁱ	2,99	135,04	Ordem zero	0,9918

i – unidade $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \sqrt{\text{h}}$; ii – equivale a unidade $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$;

A avaliação dos resultados obtidos (Tabela 27) demonstra que as formulações contendo NMP apresentam cinética de permeação *in vitro* do tipo ordem zero. A cinética de permeação ordem zero indica que o fluxo de permeação independe da concentração do fármaco nestes veículos. Neste tipo de cinética a permeação do fármaco é alterada, fundamentalmente, por suas características físico-químicas (AULTON, 2005).

A literatura relata que derivados lipofílicos da pirrolidona, como o NMP, são capazes de penetrar nas regiões hidrofóbicas do estrato córneo e reduzir a função barreira nestas áreas (TROMMER & NEUBERT, 2006). Este fenômeno era esperado para as MEs B, C e D, porém a cinética de permeação do tipo ordem zero obtida para estas formulações indicou que os excipientes utilizados não interferiram na permeação do fármaco. Este fato justifica a semelhança estatística entre os perfis de permeação *in vitro* observados nas MEs B, C, D (Tabela 26).

Dentre as formulações estudadas, a ME A proporcionou os melhores resultados de permeação *in vitro*, apresentando fluxo de 292,14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \sqrt{\text{h}}$ e *lag time* de aproximadamente 25 min (0,42 h) através da epiderme.

A maior permeação proporcionada pela ME A frente as ME B, C e D, está relacionada à característica da fase oleosa (MIP), já que a DAP por possuir valor de coeficiente de partição óleo/água ($\log P$) de 1,32 está dissolvida, preferencialmente, no domínio oleoso das MEs (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2005). Sabe-se que o domínio oleoso de MEs pode direcionar o fármaco diretamente aos domínios lipídicos da epiderme ou se intercalar entre as camadas lipídicas do estrato córneo e, assim, desestabilizá-las (PATEL *et al.*, 2009). Apesar de ser desconhecido o mecanismo de permeação proporcionado pelo excipiente MIP, este pode ter promovido os efeitos supracitados, ocasionando a maior permeação da ME A.

Os resultados de estudos de permeação e de liberação identificaram diferenças de performances das formulações, os quais podem ser explorados quanto sua finalidade na aplicação clínica. Onde, as formulações contendo NMP, principalmente ME B e C, promoveram alta liberação do fármaco e baixa permeabilidade, portanto, são formulações que podem ser exploradas quanto sua utilização em enfermidades

cutâneas superficiais, como a acne. Enquanto que, a microemulsão contendo MIP (ME A) promove a alta permeação de DAP frente ao estrato córneo, sendo melhor aplicada em enfermidades cujo sítio de ação do fármaco se localize nas camadas internas da pele.

Visto que, a concentração bacteriostática da dapsona é de aproximadamente 5 $\mu\text{g/mL}$ (SCIOR *et al.*, 1997), o fluxo de permeação *in vitro* encontrado para a ME A ($\sim 292,14 \mu\text{g/cm}^2 \times \sqrt{h}$) a credencia como a formulação mais promissora para a eficácia clínica no tratamento da hanseníase. Desta forma, esta formulação foi selecionada para os estudos de estabilidade durante 6 meses.

4.11. ESTUDO DE ESTABILIDADE

As ME A-FO foram avaliadas quanto ao aspecto visual, tamanho médio de gotícula, índice de refração, condutividade elétrica e teor do ativo, as quais são indicadores de estabilidade de um sistema microemulsionado. A Tabela 28 demonstra os resultados de estabilidade no tempo 0 e após 6 meses em temperatura ambiente.

Tabela 28 – Resultados do estudo de estabilidade à temperatura ambiente da formulação A-FO contendo 2,0% de DAP.

Teste Analítico	Resultados de estabilidade	
	Análise Inicial	6 meses
Aspecto	Homogêneo, límpido e transparente	Homogêneo, límpido e transparente
Índice de refração	$1,437 \pm 0,001$	$1,435 \pm 0,002$
Tamanho média de gotícula (nm)	$9,6 \pm 2,5$	$12,1 \pm 1,07$
Condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}$)	$0,08 \pm 0,2$	$0,06 \pm 0,13$
Teor (%)	$100,31 \pm 0,91$	$93,72 \pm 1,28$

resultados apresentados em duplicata (n=2) \pm DP.

Após 180 dias de estudo, o aspecto visual da ME A manteve-se límpido, sem indícios de separação de fases e transparente, característico de microemulsões. A verificação da alternância estrutural da microemulsão foi realizada através do índice de refração e da condutividade elétrica. O valor constante do índice de refração obtido caracteriza o sistema como isotrópico, ou seja, a ME A não apresentou birrefringência característica de casos onde há inversão de fases. Este fato foi confirmado pelo valor de condutividade elétrica, que se manteve próximo ao valor do componente oleoso da formulação, o MIP, que apresenta condutividade elétrica de aproximadamente 0,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Os resultados de índice de refração e de condutividade elétrica são coerentes e confirmam que a formulação ME A-FO se manteve estruturalmente do tipo a/o.

Ao fim do estudo de estabilidade, o diâmetro médio das gotículas apresentou-se em tamanho nanométrico ($< 300 \text{ nm}$), indicando que não houve aglomeração entre as gotículas. Isto sugere que a composição dos excipientes da formulação foi adequada em manter a mínima tensão interfacial requerida para sistemas microemulsionados.

O monitoramento do teor do fármaco em formulações farmacêuticas é uma ferramenta analítica indicativa da estabilidade química de uma especialidade farmacêutica (SILVA *et al.*, 2009). Segundo a ANVISA (2005), na ausência de monografia farmacopeica para o produto farmacêutico, a variação do teor do fármaco durante o estudo de estabilidade deve permanecer na faixa de $\pm 10\%$ em relação ao inicial. Conforme demonstrado na Tabela 28, o teor encontrado de DAP ao fim dos 6 meses foi de $\sim 93,72\%$ p/p, correspondendo a um decaimento de 6,56% em relação ao inicial, estando dentro da faixa preconizada.

Os resultados de estabilidade em temperatura ambiente são satisfatórios, o que credencia a formulação A contendo 2,0% de DAP como um sistema promissor para aplicação em formulações farmacêuticas.

5. CONCLUSÕES

- Foi possível a obtenção de sistemas microemulsionados contendo dapsona por simples agitação de seus componentes. A caracterização físico-química indicou tamanho médio de gotículas em escala nanométrica com boa uniformidade de distribuição de diâmetro e pH adequado para formulações de uso tópico.
- As MEs contendo n-metil-pirrolidona, como fase oleosa, são capazes de solubilizar maior quantidade de dapsona frente as formulações contendo o miristato de isopropila.
- O modo de incorporação do ativo nas microemulsões, seja na fase oleosa quanto na microemulsão pronta, não proporciona mudanças estruturais na ME e tampouco na performance de liberação *in vitro*.
- A metodologia analítica desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência foi validada, demonstrando ser linear, precisa, seletiva e exata para análise de teor de DAP em sistemas microemulsionados e nos estudos de liberação e permeação *in vitro*, sendo considerada adequada para os devidos fins.
- Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que o aumento da quantidade de DAP nas formulações acarreta em aumento do fluxo de liberação, enquanto que o aumento dos tensoativos nas microemulsões contendo n-metil-pirrolidona o diminui. Desta forma, o estudo de liberação apresentou poder discriminativo capaz de caracterizar as formulações quanto ao fluxo de liberação, confirmando sua utilização como uma importante ferramenta no controle de qualidade.
- Os estudos de permeação *in vitro* demonstraram que a ME contendo miristato de isopropila (ME A) apresentou a maior permeação através da epiderme, sendo a única a obter cinética de permeação do tipo Higuchi, o que indica que a formulação foi

fundamental no processo de permeação. Este resultado sugere que a DAP quando administrada em pacientes poderá atingir a camada dérmica e, assim, exercer seu efeito bacteriostático contra o agente patológico da hanseníase, o *Mycobacterium leprae*.

- A formulação ME A contendo 2,0% de DAP mostrou ter estabilidade física e química durante 180 dias de estudos de estabilidade, mediante aos resultados satisfatórios de tamanho de gotícula, aspecto visual, índice de refração, condutividade elétrica e teor de DAP, os quais não indicaram alterações no sistema microemulsionado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ-REGUEROA, M.J. **Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate**. International journal of pharmaceutics. V. 212, P. 101-107, 2001.
- AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. **A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability**. Pharmaceutical Research, v.12, n.3, p.413- 420, 1995.
- ANVISA, Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 17 de junho de 2010.
- ANVISA, Resolução RE n. 1, de 01 de agosto de 2005. **Guia para realização de estudos de estabilidade**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. trad. ORTEGA, et al. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 504-536, 2005.
- ARAÚJO, M.G. **Hanseníase no Brasil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.36, n.3, p. 373-382, maio/jun. 2003.
- BABU, R.J.; PANDIT, J.K.; **Effect of penetration enhancers on the transdermal delivery of bupranolol through rat skin**. Drug Delivery, v. 12, p.165-169, 2005.
- BEMVINDO, C.S. **Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.
- BOWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; GOORIS, G.S.; PONEC, M. **Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations**. Progress in Lipid Research, v.42, p.1-36, 2003.
- BOLZINGER, M.A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; FESSI, H.; CHEVALIER, Y. **Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 68, p. 446-451, 2008.
- BRAIN, K.R.; GREEN, D.M.; LALKO, J. API, A.M. ***In-vitro* human skin penetration of the fragrance material geranyl nitrile**. Toxicology in vitro, v. 21, n.1, p. 133-138, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 3ª ed., p. 89, 2002.

BUMAJDAD, A.; EASTOE, J. **Conductivity of mixed surfactant water-in-oil microemulsions**. Physical Chemistry Chemical Physics, v. 6, p. 1597 – 1602, 2004.

BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British Pharmacopoeia**. London: The Stationery Office, v.1. 2005.

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

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A.C.; RODRIGUES, C.A.; SALGADO, H.R.N. **Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos**. Revista Brasileira de Farmácia, v. 88, n. 1, p.7-13, 2007.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. **Modeling and comparison of dissolution profiles**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.13, p.123-133, 2001.

DRAELOS, Z.D; CARTER, E; MALONEY, M; ELEWSKI, B; POULIN, Y; LYNDE, C; GARRETS, S. **Two randomized studies demonstrate the efficacy and safety of dapson gel, 5% for the treatment of acne vulgaris**. Journal American Academy of Dermatology, v. 56, n. 3, p.439.e1-10, mar. 2007.

DZIUBLA, T.D.; TORJMAN, M.C.; JOSEPH, J.I.; MURPHY-TATUM, M.; LOWMAN, A.M. **Evaluation of porous networks of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) as interfacial drug delivery devices**. Biomaterials, v. 22, p. 2893-2899, 2001.

ELSHAFEEY, A.H.; KAMEL, A.O.; FATHALLAH, M.M. **Utility of nanosized microemulsion for transdermal delivery of tolterodine tartrate: Ex-vivo permeation and in-vivo pharmacokinetic studies**. Pharmaceutical Research, v. 26, n. 11, nov., p. 2446 – 2453, 2009.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Monografia Dapsona**, 5ª ed., v. 2, 2010. Fiocruz: Brasília, 2010.

FARHI, D; BÉGON, E; WOLKENSTEIN, P; CHOSIDOW, O. **Dapson in dermatology**. EMC – Dermatologie Cosmétologie, v.2, p. 103-107, 2005.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D.C.W.; SOLOMON, A.W. **Neglected tropical diseases**. British Medical Bulletin, v. 93, p. 179-200, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Reviewer guidance: Validation of Chromatographic methods**. Center for Drug Evaluation and Research, Nov. 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>>. Acesso em: 28 de julho de 2009.

Guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms - scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. Center for Drug Evaluation and Research, May. 1997. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070930.pdf>>. Acesso em: 09 de novembro de 2010.

FORD, P. **Dapsone**. Current Probl Dermatol, set./out. 2000.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; JÚNIOR, A.A.S.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A.G. **Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 41, n. 03, p. 301 – 313, jul./set. 2005.

FÖRSTER, M.; BOLZINGER, M.A.; FESSI, H.; BRIANÇON, S. **Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery**. European Journal of Dermatology, v.19, n.4, p.309-323, 2009.

FUJII, M.; KOIZUMI, A.; KINOSHITA, Y.; SUZUKI, R.; NIO, J.; KONDOH, M.; WATANABE, Y. **Effect of n-methyl-2-pyrrolidone on the skin permeation of estradiol and levonorgestrel from adhesive strips prepared using Eudragit EPO**. Journal of Drug Delivery Science Technology, v. 16, p.121-125, 2006.

GELFUSO, G.M. **Desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração tópica passiva e iontoforética do minoxidil no tratamento da alopecia androgênica**. 2009. 158f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GIL, E.S. **Controle Físico Químico de Qualidade de Medicamentos**. São Paulo: Pharmabooks, 7ª edição, 485 p., 2007.

GRAMPUROHIT, N.; RAVIKUMAR, P.; MALLYA R. **Microemulsions For Topical Use– A Review**. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, v.45, n.1, p.100 – 108, jan./mar., 2011.

GRUNWALD, M.H; AMICHAÏ, B. **Dapsone – the treatment of infectious and inflammatory diseases in dermatology**. International Journal of Antimicrobial Agents, v.7, p. 187-192, 1996.

HADGRAFT, J.; LANE, M.E. **Skin, the final frontier**. International Journal of Pharmaceutics, v. 224, p. 1-18, 2001.

HADJIGEORGIOU, M.; PAPACHRYSTOMOU, Ch.; THEODOROU, Z.; KANARI, P.; CONSTANTINOÛ, S. **Determination of dapsone in meat and milk chromatography tandem mass spectrometry**. Analytica Chimica Acta, v. 637, p. 220-224, 2009.

HARRIS, M.I.N.C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3ª edição. São Paulo: Senac São Paulo. 353 p. 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 1996.

JOUYBAN, A.; FAKHREE, M.A.A; SHAYANFAR A. **Review of Pharmaceutical Applications of N-Methyl-2-Pyrrolidone**. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, v. 13, n. 4, p. 524-535, 2010.

JUNYAPRASERT, V.B.; BOOME, P.; SONGKRO, S.; KRAUEL, K.; RADES, T. **Transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic local anesthetics from o/w and w/o Brij 97-based microemulsion**. Journal of Pharmaceutical Science, v. 3. n.3, p.288-298, 2007.

KOGAN, A; GARTI, N. **Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles**. Advances in Colloid and Interface Science, v.123-126, p.369-385, jul. 2006.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H.; **Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review**. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v. 1, p. 193 – 212, 2005.

KREILGAARD, M. **Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery**. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 54, n. 1, p. 77-98, 2002.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. **Microemulsion-based media as novel drug delivery systems**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.45, p. 89-121, 2000.

LEE, P.J.; LANGER, R.; SHASTRI, V.P. **Novel Microemulsion Enhancer Formulation for Simultaneous Transdermal Delivery of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs**. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 2, p. 264-269, Feb., 2003.

LEMNGE, M.M.; RONN, A.; FLACHS, H.; BYGBJERG, I.C. **Simultaneous determination of dapsone, monoacetyldapsone and pyrimethamine in whole blood and plasma by high-performance liquid chromatography**. *Journal of chromatography – Biomedical Applications*, v. 613, n. 2, p. 340 – 346, 1993.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.M.B.G.M. **Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva**. *Anais Brasileiro de dermatologia*, v. 77, n. 5, p. 563 – 569, set./out., 2002.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. **Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p. 265 – 278, 2004.

MAGALHÃES, M.C.C; ROJAS, L.I. **Diferenciação Territorial da hanseníase no Brasil**. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.16, n.2, p.75-84, 2007.

MARTINEZ, T. S. **Presença de *M.leprae* na mucosa bucal: identificação de uma potencial via de infecção e transmissão da hanseníase**. 2010. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2010.

MATHUR, V.; SATRAWALA, Y.; RAJPUT, M.S. **Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system**. *Asian Journal of Pharmaceutics*, v.4, n.3, p.173-183, 2010.

MOET., F.J.; MEIMA, A.; OSKAM, L.; RICHARDUS, J.H. **Risck factors for the development of clinical leprosy among contacts, and thei relevance for targeted interventions**. *Leprosy Review*, v. 75, p.310-326, 2004.

MOFFAT, A.C.; JACKSON, J.V.; MOSS, M.S.; WIDDOP, B. **Clarke's Isolation and Identification of drugs**. p. 509, 1986.

- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIKA, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. **Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 52, n.2, p.103-112, Sep., 2001.
- NANDI, I.; BARI, M.; JOSHI, H. **Study of isopropyl myristate microemulsion system containing cyclodextrins to improve the solubility of 2 model hydrophobic drugs**. AAPS PharmSciTech, v.4, n. 1, p.1-9, 2003.
- NAZAR, M.F.; KHAN, A.M.; SHAH, S.S. **Microemulsion system with improved loading of piroxicam: a study of microstructure**. AAPS PharmSciTech, v.10, n. 4, dec., 2009.
- NAYAK, A.K.; DHARA, A.K. **Nanotechnology in drug delivery applications: A review**. Archives of Applied Science Research, v. 2, n.2, p.284-293, 2010.
- OLIVEIRA, A.O; SCARPA, M.V; CORREA, M.A; CERA, L.F.R; FORMARIZ, T.P. **Microemulsões: Estrutura e Aplicações como sistema de liberação de fármacos**. Química Nova, v.27, n.1, p.131-138, 2004.
- OCHEKPE, N.A.; OLORUNFEMI, P.O.; NGWULUKA, N.C. **Nanotechnology and drug delivery part 1: background and applications**. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 8, n.3, p.265-274, 2009.
- PADULA, C.; NICOLI, S.; SANTI, P. **Innovative formulations for the delivery of levothyroxine to the skin**. International Journal of Pharmaceutics, v. 372, p. 12-16, maio, 2009.
- PANIKER, U; LEVINE, N. **Dapsone and sulfapyridine**. Dermatologic Clinics, v. 19, n.1, p.79-86, jan. 2001.
- PATEL, M.R.; PATEL, R.B.; PARIKH, J.R.; SOLANKI, A.B.; PATEL, B.G.; **Effect of formulation components on the *in vitro* permeation of microemulsion drug delivery system of fluconazole**. AAPS PharmSciTech, v.10, n.3, p. 917-923, 2009.
- PAUL, S.; PANDA, A.K. **Physico-chemical studies on microemulsion: effect of cosurfactant chain length on the phase behavior, formation dynamics, structural parameters and viscosity of water/(polysorbate-20 + n-alkanol)/n-heptane water-in-oil microemulsion**. Journal of Surfactants and Detergents, mar., 2011.
- PIRIS, A.; LOBO, A. Z.; MOSCHELLA, S. L. **Global dermatopathology: Hansen's disease – current concepts and challenges**. Journal of Cutaneous Pathology, v. 37, suppl. 1, p.125–136. 2010.

- PUERTA, I. N.D.L.; GARCÍA, C.R. **Pharmacological treatment. Nicotine replacement therapy.** Adicciones, v. 16, suppl. 2, p. 264-274, 2004.
- PURANAJOTI P.R.; PATIL, T.; SHETH, P.D.; BOMMAREDDY, G.P.; EGBARIA, D.K. **Design and development of topical microemulsion for poorly water-soluble antifungal agents.** The Journal of Applied Research, v. 2, n. 1, p. 27-28, 2002.
- REVANASIDDAPPA, H.D.; MANJU, B. **A spectrophotometric method for the determination of metoclopramide HCl and dapsone.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 25, p. 631-37, 2001.
- RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. **Classification of leprosy according to immunity: a five group system.** International Journal of leprosy, v.34, p.255-273, 1996.
- ROBERTS, J; MALONEY, M; LING, M; LUCKY, A.W. **5% dapsone topical gel: safety and efficacy with long-term (1 year) treatment for acne vulgaris.** Journal American Academy of Dermatology, p.20, mar. 2005.
- ROSSI, C.G.F.T; DANTAS, T.N.C; NETO, A.A.D ; MACIEL, M.A.M. **Microemulsões: Uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial.** Revista da Universidade Rural de Seropédica Ciências Exatas e da Terra, v.26, n. 1-2, p. 45-66, jan./dez. 2007.
- RUELA, A.L.M; ARAÚJO, M.B; PEREIRA, G.R. **Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação *in vitro*.** Química Nova, v.32, n.1, p.165-168, 2009.
- RUENRAROENGSAK, P.; COOK, J.M.; FLORENCE, A.T. **Nanosystem drug targeting: Facing up to complex realities.** Journal of Controlled Release, v.141, p. 265–276, 2010.
- SAGO, J; HALL, R.P. **Dapsone.** Dermatologic Therapy, v. 15, p. 340-351, 2002.
- SARKAR, A.; RANO, R.; MISHRA, K.K.; SINHA, I.N. **Particle size distribution profile of some Indian fly ash – a comparative study to assess their possible uses.** Fuel Processing Technology, v. 86, p. 1221 – 1238, 2005.
- SCIOR, T.; RADDATZ, G.; FIGUEROA, R.; ROTH, H.J.; BISSWANGER, H.A. **Molecular modeling study on dapsone and sulfonamides comparing structures and properties with respect to anti-leprosy activities.** Journal of molecular modeling, v. 3, p.332-337. 1997.

- SHIM, J. **Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles**. Journal of Controlled Release, v. 97, n. 3, p. 477-484, 2004.
- SHISHU; RAJAN,S.; KAMALPREET. **Development of Novel Microemulsion-Based Topical Formulations of Acyclovir for the Treatment of Cutaneous Herpetic Infections**. AAPS PharmSciTech, v.10, n.2, Jun., 2009.
- SIEWERT, M.;DRESSMAN, J.; BROWN, C.K.; SHAH, V.P. **FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms**. AAPS PharmSciTech, v.4, n.1, p.1-10, 2003.
- SILVA, R.L.; VOLPATO, N.M. **Meios de dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 38, n. 2, abr./jun. 2002.
- SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. **Modelos de Avaliação da estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica**.Revista de Ciências de Farmácia Básica e Aplicada, v. 30, n.2, p.1-8, 2009.
- SILVA, D.R.X.; IGNOTTI, E.; SOUZA-SANTOS, R.; HACON, S.S. **Hanseníase, condições sociais e desmatamento na Amazônia Brasileira**. Revista Panamericana de Salud Pública, v. 27, n. 4, p. 268-275. 2010a.
- SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. **Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 31, n. 3, p.125-134, 2010b.
- SILVERSTEIN, R.M.; NEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª edição, Rio de Janeiro: LTC, p. 84 – 102, 2007 .
- SINTOV, A.C.; BOTNER, S. **Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems**. International Journal of Pharmaceutics, v. 311, p. 55–62, 2006.
- SOUZA.,V.M. **Ativos dermatológicos: um guia dos novos ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação,para médicos e farmacêuticos**. São Paulo: Tecnopress, 2003. 214p.

SUHREN, G.; HEESCHEN, W. **Detection of eight sulphonamides and dapsone in milk by a liquid chromatographic method.** *Analytica Chimica Acta*, v. 275, n.1-2, p. 329-333, 1993.

STONE, A. C.; WILBUR, A.K.; BUIKSTRA, J.E.; ROBERTS, C.A. **Tuberculosis and leprosy in perspective.** *Yearbook of physical anthropology*, v. 52, p. 66 - 94, 2009.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321p.

TENJARLA, S. **Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications.** *Critical Reviews in Therapeutic Drug carrier Systems*, v.16, n.5, p. 461-521. 1999.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). **United States Pharmacopoeial Convention:** Rockville, 33^{ed.}, 2010.

THIBOUTOT, D; SHARATA, H; TAYLOR, S; HALDER, R. **Pharmacokinetics of 5% dapsone topical gel demonstrates minimal systemic exposure.** *Journal American Academy of Dermatology*, p.140, mar.2005.

TOLL, R. **Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles.** *Journal of Investigative Dermatology*, v. 123, p. 168-176, 2004.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H. **Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados.** *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TROMMER, H.; NEUBERT, R.H.H. **Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration.** *Skin Pharmacol Physiol*, v.19, p.106-121, 2006.

URSICA, L; TITA, D; PALICI, I; TITA, B; VLAIA, V. **Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.37, p. 931-936, 2005.

U.S.FDA/CDER. **Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation.** 1997.

- VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. **Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin**. International Journal of Pharmaceutics, v. 258, n.1-2, p.141-151, 2003.
- WARISNOICHAROEN, W.; LANSLEY, A.B.; LAWRENCE, M.J. **Light scattering investigations on dilute non-ionic oil-in-water microemulsions**. AAPS PharmSciTech, v. 2, p. 429–448, 2000a.
- WARISNOICHAROEN, W.; LANSLEY, A.B.; LAWRENCE, M.J. **Nonionic oil-in water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour**. International journal of Pharmaceutics, v. 198, p. 7-27, 2000b.
- WANG, H.Y.; XU, L.X.; XIAO, Y.; HAN, J. **Spectrophotometric determination of dapsone in pharmaceutical products using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic as the chromogenic reagent**. Spectrochimica Acta Part A, v. 60, p. 2933-2939, 2004.
- WILSON, D; HERDON, J; WHITING, D; SHALITA, A. **Dapsone gel 5% is an effective, safe, novel topical treatment of acne vulgaris**. Journal American Academy of Dermatology, p.21, mar. 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global leprosy situation, 2010**. Weekly Epidemiological Record, n.35, 85, p. 337-348, ago. 2010. Disponível em: < <http://www.who.int/wer/en/> >. Acesso em: 22 de janeiro de 2011.
- WOZEL, V.E.G. **Innovative use of dapsona**. Dermatologic clinic, v. 28, p.599-610, 2010.
- YERRAMSETTY, K.M.; NEELY, B.J.; MADIHALLY, S.V.; GASEM, K.A.M. **A skin permeability model of insulin in the presence of chemical penetration enhancer**. International Journal of Pharmacy, v. 388, p.13-23, 2010.
- ZHENG, W.W.; ZHAO, L.; WEI, Y.M.; YE, Y.; XIAO, S.H. **Preparation and the in vitro evaluation of nanoemulsion system for the transdermal delivery of granisetron hydrochloride**. Chem Pharm Bull, v. 58, p.1015-1019, 2010.
- ZHU, Y.I; STILLER, M.J. **Dapsone and sulfones in dermatology: Overview and update**. Journal American Academy of Dermatology, p. 419-434, set. 2001.
- ZHU, W.; YU, A.; WANG, W.; DONG, R.; WU, J.; ZHAI, G. **Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir**. International Journal of Pharmaceutics, v.360, p. 184–190, 2008.