



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Preparo e Avaliação de Sistemas Microemulsionados Biologicamente Ativos de  
Dapsona**

**Lidiane Mota Monteiro**

Rio de Janeiro

2011

**LIDIANE MOTA MONTEIRO**

**Preparo e Avaliação de Sistemas Microemulsionados Biologicamente Ativos de  
Dapsona**

**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.**

**Orientador:** Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral

Rio de Janeiro

2011

M775p Monteiro, Lidiane Mota.

Preparo e avaliação de sistemas microemulsionados biologicamente ativos de dapsona/ Lidiane Mota Monteiro; orientador Lúcio Mendes Cabral. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2011.  
xxiv, 124f. : il. col. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2011.  
Inclui bibliografia.

1. Hanseníase. 2. Microemulsão. 3. Dapsona.

CDD 615.19

**LIDIANE MOTA MONTEIRO**

**Preparo e Avaliação de Sistemas Microemulsionados Biologicamente Ativos de  
Dapsona**

**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:

Orientador:

---

Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral - Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues - Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof. Dr. Marcelo de Pádula - Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof. Dra. Lucia Cruz de Sequeira Aguiar – Instituto de Química – UFRJ

*Aos meus pais, Jorge e Luzia.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço inicialmente a **Deus** por me iluminar, me proteger e me guiar em todos os momentos da minha vida. Obrigada Senhor!*

*Aos meus pais, **Jorginho e Luzia**, pelo apoio incondicional, pelas palavras de carinho nos momentos mais difíceis, por acreditarem sempre em mim e me incentivarem a seguir em frente, independente do caminho escolhido. Vocês são a razão da minha vida. Obrigada!*

*Ao meu irmão, **Jean**, pela companhia, carinho e principalmente pela sua alegria e seu bom-humor. Obrigada por acreditar em mim e me ensinar a aproveitar cada momento da vida. Amo muito você!*

*Ao meu orientador, **prof. Dr. Lucio Mendes Cabral**, por todos os ensinamentos, sugestões e ajudas para a realização deste trabalho. Obrigada por todas as oportunidades e pela confiança depositada em mim!*

*A toda a minha **FAMÍLIA** por estarem presentes em todos os momentos felizes da minha vida e, principalmente, por entenderem o motivo das minhas (muitas) ausências. Obrigada pela torcida e por todas as orações!*

*Ao **Vinicius**, pela compreensão e pela paciência em todos os momentos de estudo e trabalho. Obrigada por todo o seu amor e, principalmente, pelo seu companheirismo!*

*A todos os meus amigos pelo apoio e pela torcida, em especial as minhas amigas de longa data **Ivana, Luciana, Natália e Chris**.*

Aos amigos do **Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica**: **Alex, Arídio** (*meu querido companheiro de viagem!*), **Camila, Carolzinha, Cide, Daniel, Flavinha** (*um anjo na minha vida!*), **Gabi, Giovani, Jaque, Karlinha, Letícia, Lilian, Lula, Lulú, Maíra, Maísa, Marcela, Marina, Michele, Patrícia (*minha estagiária!*), **Thiago Garcia, Thiago Honório, Túlio**. Obrigada pelas ajudas, pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração e, principalmente, pela amizade de vocês, vou morrer de saudades!**

Aos meus amigos da faculdade, em especial a **Flávia, Geisa, Nati Daflon, Letícia e Nati Bousquet**, foi maravilhoso ter conhecido cada uma de vocês! Obrigada!

A **profa. Dra. Valeria Pereira de Sousa**, pelas sugestões dadas para a realização deste trabalho e por permitir que eu utilizasse o aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência.

A **Viviane** e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para os experimentos de permeação em células Caco-2. Obrigada!

Aos amigos do **LabCQ**, principalmente a **Alice, Eduardo e Mayre**, pelas dicas, sugestões e pela amizade de vocês. Agradeço em especial ao **Vinicius**, pelas incansáveis análises no HPLC e discussões de resultados, por todos os ensinamentos e pela ótima convivência. Obrigada!

As pesquisadoras, **Maria Elizabeth Ferreira Garcia e Cristina Cardoso Pereira**, do Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros (PAM/COPPE) pelo suporte com o analisador de tamanho de gotículas.

*Aos professores da banca de acompanhamento prof. Dr. **Eduardo Ricci** e prof. Dr. **Marcelo de Pádula**, pelas correções e sugestões dadas durante a realização deste trabalho.*

*A banca examinadora, prof. Dr. **Carlos Rangel Rodrigues**, prof. Dr. **Marcelo de Pádula** e profa. Dra. **Lucia Sequeira**, por terem aceitado o convite de participar da defesa desta dissertação.*

*A todos os professores, funcionários e alunos do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.*

*Ao **CNPQ** pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.*

***“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.”***

*(Sócrates)*

## RESUMO

Monteiro, Lidiane Mota. **Preparo e avaliação de sistemas microemulsionados biologicamente ativos de dapsona**. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

A dapsona é um fármaco pertencente à classe das sulfonas. Seu mecanismo de ação consiste em inibir a enzima dihidropteroato sintase de microrganismos sensíveis como o *Mycobacterium leprae*, agente patológico da hanseníase. Ela apresenta alta permeabilidade nas membranas biológicas e baixa solubilidade em água, o que acarreta em baixa biodisponibilidade. As microemulsões, formas farmacêuticas obtidas a partir de soluções micelares, possuem vantagens como alta capacidade de solubilização, estabilidade termodinâmica e otimização da absorção e da permeação dos fármacos. A fim de melhorar os parâmetros de biodisponibilidade da dapsona e, conseqüentemente, reduzir os seus efeitos adversos, propôs-se neste trabalho a veiculação da dapsona em sistemas microemulsionados. Foram preparadas microemulsões com diferentes combinações de tensoativos, contendo isobutanol ou propilenoglicol como co-solvente. As proporções dos componentes foram definidas a partir dos diagramas pseudoternário de fases. As concentrações de 2,0% e 2,5% p/p de dapsona, solubilizadas na fase oleosa e na formulação pronta, foram caracterizadas quanto ao tamanho de gotículas, índice de refração, condutividade e teor. A partir do estudo de estabilidade, a formulação contendo propilenoglicol, com 2,0% p/p de dapsona solubilizada na fase oleosa, foi escolhida por apresentar os melhores parâmetros. Os perfis de liberação da microemulsão de dapsona em sucos gástrico e entérico simulados demonstraram alta taxa de dissolução do fármaco, principalmente quando comparados às soluções por dispersão do pó de dapsona. Esta formulação apresentou correlação com modelo de cinética de liberação de Higuchi. Foi ainda realizado o ensaio de permeação da dapsona em células Caco-2 para a previsão da sua absorção.

## ABSTRACT

Monteiro, Lidiane Mota. **Preparo e avaliação de sistemas microemulsionados biologicamente ativos de dapsona.** Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

Dapsone is a drug of the class of sulfones. Its mechanism of action is the inhibition of the enzyme dihydropteroate synthase of sensitive microorganisms as *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. It has high permeability in biological membranes and low solubility in water, which results in low bioavailability. Microemulsions, pharmaceutical forms obtained from micellar solutions, have advantages such as high solubilization, thermodynamic stability, and improvement of absorption and permeation of drugs. To improve the bioavailability parameters of dapsone and therefore reduce its adverse effects, it was proposed in this study the formulation of microemulsions systems with dapsone. The microemulsions were prepared with different combinations of surfactants containing propyleneglycol or isobutanol as cossolvent. The proportions of components were defined from the phase diagrams. Concentrations of 2.0% and 2.5% w/w of dapsone, dissolved in oil phase and the ready formulation, were characterized according to droplet size, refractive index, conductivity and percentage of drug. From the study of stability, the formulation with propylene glycol, 2,0% w/w of dapsone dissolved in the ready formulation, was chosen for exhibiting the best parameters. The release profiles of dapsone microemulsions in simulated gastric and enteric fluid showed high dissolution rate of the drug, especially when compared to the solution by dispersing the powder of dapsone. Formulation II was correlated with Higuchi's model of release kinetics. It was done the dapsone permeation study through Caco-2 cells to preview its absorption.

## LISTA DE FIGURAS

|          |  | <b>Página</b> |
|----------|--|---------------|
| Figura 1 | Fórmula estrutural da dapsona.   | 25            |
| Figura 2 | Pacientes com lesões dermatológicas provocadas pelo bacilo <i>Mycobacterium leprae</i> (ILEP, 2001).   | 32            |
| Figura 3 | Taxas da prevalência mundial da hanseníase (por 10.000 habitantes) no início de 2009 (Adaptada de WHO, 2009).  | 34            |
| Figura 4 | Escala de comparação de tamanhos desde 1m a 1 nm. A escala de comprimento da parte superior varia de 1 m a $10^{-10}$ m e representa os tamanhos da bola de futebol, da pulga, do fio de cabelo, dos glóbulos vermelhos e de partículas virais. A escala inferior varia de 100 nm a 1 nm e representa os tamanhos de partículas de dióxido de platina/titânio, de letras do logotipo IBM, da fita de DNA, do nanotubo de carbono e do carbono 60 (Adaptada de The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004). | 38            |
| Figura 5 | Efeito dos lipídios e excipientes lipídicos na absorção de fármacos: (a) aumento da solubilização do fármaco devido à formação de micelas, vesículas e micelas mistas; (b) transporte baseado nos enterócitos; (c) transporte intestinal linfática (Adaptada de PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007).  | 40            |
| Figura 6 | Representação esquemática de um diagrama pseudoternário de fases. Nesse diagrama observa-se a formação de micelas, lamelas, micelas reversas, e gotículas de microemulsão O/A ou A/O. Cada vértice do sistema representa um componente da formulação. O símbolo $\emptyset$ significa ângulo de fase (Adaptada de LAWRENCE & REES, 2000).  | 44            |
| Figura 7 | Equação de <i>Stokes Einstein</i> , sendo $R_h$ = raio hidrodinâmico; $k$ = constante de Boltzmann; $T$ = temperatura absoluta; $\pi = 3,14$ ; $\eta$ = viscosidade da fase contínua e $D$ = coeficiente de difusão (Adaptada de GODDEERIS <i>et al.</i> , 2006).  | 55            |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 8  | Equações da cinética de liberação do fármaco, sendo %F = percentual de liberação de fármaco; t = tempo (min.); $a_1$ , $a_2$ = interseções ao eixo do y; $b_1$ , $b_2$ = curvaturas das retas; $M_t$ e $M_\infty$ = quantidade cumulativa absoluta de fármaco liberado no tempo t e no infinito, respectivamente; b = quantidade inicial de fármaco na solução; $K_H$ = constante de liberação de Higuchi (adaptada de MANADAS, PINA & VEIGA, 2002). | 63 |
| Figura 9  | Espectro de infravermelho da dapsona.  | 70 |
| Figura 10 | Espectro de infravermelho do padrão de dapsona.  | 70 |
| Figura 11 | Diagrama pseudoternário de fases, utilizando como componente o isobutanol (IBT), o miristato de isopropila (MI), o Tween® 80, o Span® 80 e a água. A área demarcada em cinza escuro representa a área de microemulsão.   | 78 |
| Figura 12 | Gráfico de distribuição de tamanho de gotículas da formulação com isobutanol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases. Essa formulação apresentou diâmetro de gotícula igual a 8,8 nm.   | 79 |
| Figura 13 | Diagrama pseudoternário de fases, utilizando como componentes o propilenoglicol (PPG), o miristato de isopropila (MI), o Tween® 80 (T 80), o Span® 80 (S 80) e a água. A área demarcada em cinza escuro representa a área de microemulsão.   | 81 |
| Figura 14 | Gráfico de distribuição de tamanho de gotículas da formulação com propilenoglicol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases. Essa formulação apresentou diâmetro de gotícula igual a 9,1 nm.  | 82 |
| Figura 15 | Equação da viscosidade, onde $\eta$ = viscosidade (cP); k = constante; t = tempo de escoamento do volume; d = densidade (Farmacopéia Brasileira, 1988).  | 96 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 16 | Curva de calibração da dapsona em suco gástrico simulado para a avaliação da solubilidade do fármaco neste meio de dissolução. Esta figura corresponde à primeira replicata.  | 98  |
| Figura 17 | Curva de calibração da dapsona em suco gástrico simulado para a avaliação da solubilidade do fármaco neste meio de dissolução. Esta figura corresponde à segunda replicata.   | 98  |
| Figura 18 | Curva de calibração da dapsona em suco entérico simulado para a avaliação da solubilidade do fármaco neste meio de dissolução. Esta figura corresponde à primeira replicata.  | 99  |
| Figura 19 | Curva de calibração da dapsona em suco entérico simulado para a avaliação da solubilidade do fármaco neste meio de dissolução. Esta figura corresponde à segunda replicata.   | 99  |
| Figura 20 | Gráfico do perfil de liberação da formulação II em suco gástrico simulado.  | 101 |
| Figura 21 | Gráfico do perfil de liberação da formulação II em suco gástrico simulado com laurilsulfato de sódio 0,5% (p/p).  | 103 |
| Figura 22 | Gráfico de comparação do perfil de liberação da formulação II em suco gástrico simulado (representado pela cor lilás) e em suco gástrico simulado com laurilsulfato de sódio 0,5% (p/p) (representado pela cor rosa). | 104 |
| Figura 23 | Gráfico de liberação da formulação II em suco entérico simulado.  | 105 |
| Figura 24 | Gráfico de permeação da formulação II em células Caco-2.  | 109 |
| Figura 25 | Fórmula estrutural da sulfadiazina e do sulfametoxazol (ROCHA <i>et al.</i> , 2011).  | 111 |

**LISTA DE QUADROS**

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Quadro 1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica dos fármacos (Adaptado de STORPIRTIS <i>et al.</i> , 2009).  | 27            |
| Quadro 2 Determinação do tamanho de gotícula das formulações A, B e C, contendo isobutanol como cossolvente. Essas formulações foram realizadas em replicata (rep.), considerou-se a média.  | 74            |
| Quadro 3 Determinação do tamanho de gotícula da formulação A sem o efeito do ultrassom; com ultrassom em 50% e 100% de amplitude. Essas formulações foram realizadas em replicatas (rep.), considerou-se a média.  | 76            |
| Quadro 4 Determinação do tamanho de gotícula da formulação com isobutanol a partir do diagrama pseudoternário de fases. Essa formulação foi realizada em replicata (rep.), considerou-se a média.  | 79            |
| Quadro 5 Determinação do tamanho de gotícula da formulação com propilenoglicol a partir do diagrama pseudoternário de fases. Essa formulação foi realizada em replicata (rep.), considerou-se a média.   | 82            |
| Quadro 6 Determinação da distribuição do tamanho de gotícula da formulação com isobutanol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases. O fármaco foi solubilizado tanto na fase oleosa quanto na formulação pronta. As análises foram realizadas em replicata (rep.), e consideraram-se as médias.      | 85            |
| Quadro 7 Determinação da distribuição do tamanho de gotícula da formulação com propilenoglicol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases. O fármaco foi solubilizado tanto na fase oleosa quanto na formulação pronta. As análises foram realizadas em replicata (rep.), e consideraram-se as médias. | 86            |

## LISTA DE TABELAS

|           |  | Página |
|-----------|--|--------|
| Tabela 1  | Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) e seus respectivos agentes patológicos (Adaptada de FEASY <i>et al.</i> , 2009).  | 31     |
| Tabela 2  | Prevalência mundial da hanseníase no início de 2009, e número de novos casos detectados em 2008 (Adaptada de WHO, 2009).   | 35     |
| Tabela 3  | Evolução da detecção de novos casos de hanseníase de 2002 a 2008 (Adaptada de WHO, 2009).  | 35     |
| Tabela 4  | Formulações classificadas de A a H. T 80 = Tween 80®; T 40 = Tween 40®; S 20 = Span 20®; S 80 = Span 80®; IBT = Isobutanol; PPG = Propilenoglicol; MI = Miristato de Isopropila. | 52     |
| Tabela 5  | Proporções utilizadas na construção dos diagramas pseudoternário de fases. A = proporções de fase oleosa e cossolvente (8:1); B = proporções de tensoativos (1:1).               | 53     |
| Tabela 6  | Numeração das cápsulas e seus respectivos volumes, determinados em mililitros (Adaptada de ANSEL, ALLEN & POPOVICH, 2000).   | 61     |
| Tabela 7  | Determinação da faixa de fusão da dapsona. As análises foram feitas em triplicata (rep.), e obteve-se a média.   | 69     |
| Tabela 8  | Tensoativos e seus respectivos pesos moleculares, determinados em g/mol (Adaptada de WADE & WELLER, 1994).   | 73     |
| Tabela 9  | Determinação do índice de refração da água, do miristato de isopropila e das formulações A, B e C.   | 74     |
| Tabela 10 | Determinação do índice de refração da água, do miristato de isopropila e das formulações A sem o efeito de ultrassom e com ultrassom em 50% e 100% de amplitude.                 | 76     |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tabela 11 | Formulação, com isobutanol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases.  | 78 |
| Tabela 12 | Formulação, com propilenoglicol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases.   | 81 |
| Tabela 13 | Determinação do índice de refração da água, do miristato de isopropila e das formulações com propilenoglicol (PPG) e isobutanol (IBT), obtidas a partir do diagrama pseudoternário de fases.      | 86 |
| Tabela 14 | Determinação da condutividade elétrica da água, do miristato de isopropila e das formulações com propilenoglicol (PPG) e isobutanol (IBT), obtidas a partir do diagrama pseudoternário de fases.  | 87 |
| Tabela 15 | Formulações classificadas de I a IV, contendo propilenoglicol como cossolvente. As concentrações 2,0 ou 2,5% p/p de dapsona foram solubilizadas na fase oleosa (FO) ou na formulação pronta (FP). | 89 |
| Tabela 16 | Formulações classificadas de V a VIII, contendo isobutanol como cossolvente. As concentrações 2,0 ou 2,5% p/p de dapsona foram solubilizadas na fase oleosa (FO) ou na formulação pronta (FP).    | 89 |
| Tabela 17 | Caracterização das formulações I a VIII no tempo zero. Determinação do tamanho de gotícula (nm), índice de refração, condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e quantificação do fármaco (%).    | 90 |
| Tabela 18 | Determinação da distribuição do tamanho de gotícula das formulações I a VIII. As leituras foram realizadas em duplicata, e os valores obtidos correspondem às médias.                             | 91 |
| Tabela 19 | Determinação dos valores de índice de refração das formulações no tempo zero e após 90 dias do estudo de estabilidade.  | 92 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Tabela 20 | Determinação da condutividade das formulações I a VIII. As leituras foram realizadas em duplicata, e os valores expostos correspondem às médias.  | 93  |
| Tabela 21 | Quantificação da dapsona nas formulações I a VIII verificadas primeiramente no tempo inicial e após serem colocadas em condições forçadas de temperatura e umidade, foram verificadas em 15, 30, 60 e 90 dias. Avaliou-se o decaimento do teor do fármaco através da comparação de teor da dapsona no tempo inicial e no tempo final, 90 dias. Os valores obtidos correspondem às médias. | 94  |
| Tabela 22 | Medida da viscosidade da formulação II. Esta análise foi realizada nas velocidades de 6, 12, 30 e 60 rpm. O valor da viscosidade (cP) foi calculado pela multiplicação da constante (k) pelo tempo de escoamento (t) e densidade (d) da amostra.  | 96  |
| Tabela 23 | Viscosidade de alguns fluidos de interesse farmacêutico, medida em cP (Adaptada de AULTON, 2005).   | 97  |
| Tabela 24 | Solubilidade da dapsona em SGS (Suco gástrico simulado) e SES (Suco entérico simulado). Os ensaios foram realizados em replicata e considerou-se a média obtida.  | 100 |
| Tabela 25 | Quantificação da dapsona em suco gástrico simulado. Consideraram-se as médias das cubas. DPR = Desvio-padrão relativo.  | 101 |
| Tabela 26 | Quantificação da dapsona em suco gástrico simulado com laurilsulfato de sódio 0,5% (p/p). Considerou-se as médias das cubas. DPR = Desvio-padrão relativo.  | 103 |
| Tabela 27 | Quantificação da dapsona em suco entérico simulado. Considerou-se as médias das cubas. DPR = Desvio-padrão relativo.  | 104 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Tabela 28 | Cinética de liberação da formulação II nos meios suco gástrico simulado (SGS), suco gástrico simulado + laurilsulfato de sódio 0,5% p/p (SGS+LSS 0,5% p/p) e suco entérico simulado (SES), e seus respectivos coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ). | 106 |
| Tabela 29 | Comportamento da formulação II em sucos gástrico e entérico simulados (SGS e SES) após 2 horas de ensaio de liberação. Avaliou-se a aparência das amostras dissolvidas e os diâmetros das gotículas ( $\mu\text{m}$ ).                                     | 107 |
| Tabela 30 | Quantificação da solução por dispersão do pó de dapsona em suco gástrico simulado (SGS), suco gástrico simulado + LSS 0,5% (SGS + LSS 0,5%) e suco entérico simulado (SES). Considerou-se as médias das cubas.   | 108 |
| Tabela 31 | Quantificação da dapsona no estudo de permeação em células Caco-2.   | 109 |

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

|                  |   |
|------------------|---|
| A                | Absorbância                               |
| PABA             | Ácido para-aminobenzóico                  |
| A/O              | Água em Óleo                              |
| cP               | Centipoise (s)                            |
| NaCl             | Cloreto de sódio                          |
| R <sup>2</sup>   | Coeficiente de correlação                 |
| logP             | Coeficiente de partição em octano-água    |
| CLAE             | Cromatografia líquida de alta eficiência  |
| DHPS             | Dihidropteroato sintase                   |
| DTN              | Doenças Tropicais Negligenciadas          |
| DMEM             | Dulbeco's Modified Eagle's Medium         |
| ETL              | Etanol                                    |
| J                | Fluxo de liberação                        |
| IR               | Índice de refração                        |
| IV               | Infravermelho                             |
| IV-TF            | Infravermelho por transformada de Fourier |
| IBT              | Isobutanol                                |
| LSS              | Laurilsulfato de sódio                    |
| μS               | Microsiemen (s)                           |
| MI               | Miristato de Isopropila                   |
| <i>M. leprae</i> | <i>Mycobacterium leprae</i>               |
| nm               | Nanômetro (s)                             |
| Ω                | Ohm                                       |

|      |  |
|------|--|
| O/A  | Óleo em Água                             |
| OMS  | Organização Mundial da Saúde             |
| p/p  | Peso / peso                              |
| PPG  | Propilenoglicol                          |
| RET  | Resistência elétrica transeptelial       |
| rpm  | Rotações por minuto                      |
| SCB  | Sistema de Classificação Biofarmacêutica |
| SNC  | Sistema Nervoso Central                  |
| S 20 | Span® 20                                 |
| S 80 | Span® 80                                 |
| SES  | Suco entérico simulado                   |
| SGS  | Suco gástrico simulado                   |
| T    | Transmitância                            |
| TGI  | Trato gastrointestinal                   |
| T 80 | Tween® 80                                |
| T 40 | Tween® 40                                |
| UR   | Umidade relativa                         |
| UV   | Ultravioleta                             |
| VIH  | Vírus da imunodeficiência humana         |
| v/v  | Volume / volume                          |

## SUMÁRIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                         | <b>25</b>     |
| <b>1.1 Dapsona</b>                          | <b>25</b>     |
| <b>1.2 Doenças tropicais negligenciadas</b> | <b>29</b>     |
| <b>1.3 Hanseníase</b>                       | <b>31</b>     |
| <b>1.4 Nanotecnologia</b>                   | <b>36</b>     |
| <b>1.5 Formulações lipídicas</b>            | <b>39</b>     |
| <b>1.6 Formulações orais</b>                | <b>42</b>     |
| <b>1.7 Microemulsão</b>                     | <b>42</b>     |
| <b>2 OBJETIVOS</b>                          | <b>46</b>     |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>                 | <b>47</b>     |
| <b>3.1 Material</b>                         | <b>47</b>     |
| <b>3.1.1 Equipamentos</b>                   | <b>47</b>     |
| <b>3.1.2 Matérias-primas e reagentes</b>    | <b>48</b>     |
| <b>3.2 Métodos</b>                          | <b>50</b>     |
| <b>3.2.1 Caracterização do fármaco</b>      | <b>50</b>     |
| 3.2.1.1 Faixa de fusão                      | 50            |
| 3.2.1.2 Espectroscopia no infravermelho     | 50            |
| <b>3.2.2 Preparo das formulações</b>        | <b>51</b>     |
| 3.2.2.1 Seleção dos componentes             | 51            |
| 3.2.2.2 Obtenção das formulações            | 51            |
| 3.2.2.3 Construção do diagrama de fases     | 52            |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.2.4 Incorporação da dapsona nas microemulsões obtidas                            | 54        |
| <b>3.2.3 Caracterização das formulações</b>  | <b>54</b> |
| 3.2.3.1 Avaliação da distribuição de tamanho de gotícula                             | 54        |
| 3.2.3.2 Medida do índice de refração   | 55        |
| 3.2.3.3 Medida da condutividade elétrica   | 55        |
| 3.2.3.4 Medida da viscosidade  | 56        |
| <b>3.2.4 Quantificação da dapsona</b>  | <b>57</b> |
| 3.2.4.1 Preparo da solução mãe de dapsona  | 57        |
| 3.2.4.2 Preparo da curva padrão  | 58        |
| 3.2.4.3 Preparo da solução amostra   | 58        |
| <b>3.2.5 Estudo de estabilidade acelerado</b>  | <b>58</b> |
| <b>3.2.6 Estudo de solubilidade da dapsona nos meios de liberação</b>                | <b>59</b> |
| 3.2.6.1 Preparo da solução mãe de dapsona  | 59        |
| 3.2.6.2 Preparo da curva padrão  | 59        |
| 3.2.6.3 Preparo da solução amostra   | 60        |
| <b>3.2.7 Estudo de liberação do fármaco</b>  | <b>60</b> |
| 3.2.7.1 Preparo dos meios de dissolução  | 61        |
| 3.2.7.2 Preparo da solução mãe de dapsona  | 62        |
| 3.2.7.3 Preparo da curva padrão  | 62        |
| 3.2.7.4 Condições de análise   | 62        |
| 3.2.7.5 Estudo da cinética de liberação do fármaco                                   | 63        |
| 3.2.7.6 Avaliação do comportamento da microemulsão nos meios de liberação            | 64        |
| <b>3.2.8 Estudo da solução por dispersão do pó de dapsona nos meios de liberação</b> | <b>64</b> |
| 3.2.8.1 Preparo da solução mãe de dapsona  | 64        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.8.2 Preparo da curva padrão                                      | 65        |
| 3.2.8.3 Condições de análise   | 65        |
| <b>3.2.9 Estudo de permeação do fármaco em células Caco-2</b>        | <b>65</b> |
| 3.2.9.1 Cultivo das células Caco-2                                   | 66        |
| 3.2.9.2 Cultivo das células nas placas para ensaio de permeabilidade | 66        |
| 3.2.9.3 Preparo do meio de transporte                                | 66        |
| 3.2.9.4 Preparo da solução mãe de dapsona                            | 66        |
| 3.2.9.5 Preparo da curva padrão                                      | 67        |
| 3.2.9.6 Condições de análise   | 67        |
| <b>3.2.10 Análise Estatística</b>                                    | <b>68</b> |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                      | <b>69</b> |
| <b>4.1 Caracterização do fármaco</b>                                 | <b>69</b> |
| 4.1.1 Faixa de fusão   | 69        |
| 4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho                                | 70        |
| <b>4.2 Preparo das formulações</b>                                   | <b>71</b> |
| 4.2.1 Seleção dos componentes  | 71        |
| 4.2.2 Obtenção das formulações                                       | 73        |
| 4.2.2.1 Isobutanol   | 73        |
| 4.2.2.1.1 Caracterização da formulação                               | 78        |
| 4.2.2.2 Propilenoglicol  | 80        |
| 4.2.2.2.1 Caracterização da formulação                               | 82        |
| 4.2.2.2.2 Avaliação do efeito da agitação com ultrassom              | 83        |
| 4.2.3 Solubilização do fármaco                                       | 84        |
| <b>4.3 Estudo de estabilidade acelerado</b>                          | <b>88</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 4.3.1 Escolha da melhor formulação   | 95         |
| <b>4.4 Viscosidade</b>   | <b>96</b>  |
| <b>4.5 Estudo de solubilidade da dapsona nos meios de liberação</b>                        | <b>97</b>  |
| <b>4.6 Estudo de liberação do fármaco</b>  | <b>101</b> |
| 4.6.1 Estudo de liberação em suco gástrico simulado  | 101        |
| 4.6.2 Estudo de liberação em suco gástrico simulado<br>+ laurilsulfato de sódio 0,5% (p/p) | 102        |
| 4.6.3 Estudo de liberação em suco entérico simulado  | 104        |
| 4.6.4 Estudo da cinética de liberação do fármaco   | 105        |
| 4.6.5 Avaliação do comportamento da microemulsão<br>nos meios de liberação                 | 106        |
| <b>4.7 Estudo da solução por dispersão do pó de dapsona nos meios<br/>de liberação</b>     | <b>107</b> |
| <b>4.8 Estudo de permeação do fármaco em células Caco-2</b>                                | <b>109</b> |
| <b>5 CONCLUSÕES</b>  | <b>112</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>113</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Dapsona

A dapsona (4,4-sulfonilbisbenzamina) é o fármaco de maior utilidade clínica da classe das sulfonas (figura 1). Seu mecanismo de ação é idêntico ao mecanismo dos fármacos da classe sulfonamida, ou seja, inibe competitivamente a enzima bacteriana dihidropteroato sintase (DHPS) e, conseqüentemente, inibe a síntese do ácido fólico de organismos suscetíveis (HARDMAN, LIMBIRD & GILMAN, 2007; WOZEL, 2010).

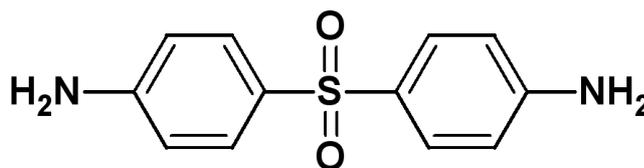


Figura 1: Fórmula estrutural da dapsona.

A dapsona possui ação bacteriostática, mas não bactericida, para o agente patológico da hanseníase *Mycobacterium leprae* (SAGO & HALL III, 2002). Os fármacos das classes sulfona e sulfonamida competem pelo ácido para-aminobenzóico (PABA) (HARDMAN, LIMBIRD & GILMAN, 2007). A partir de estudos de comparação realizados entre a dapsona e os fármacos da classe sulfonamida observou-se que, apesar das semelhanças, somente a dapsona possui atividade contra o *M. leprae* (SCIOR *et al.*, 1997).

O peso molecular da dapsona é igual a 248,30 g/mol. Essa substância apresenta-se como um pó cristalino branco ou levemente amarelado, sem odor característico, e fotossensível. Dissolve-se em etanol, metanol, acetona e ácido clorídrico, mas é praticamente insolúvel em água (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; The Merck Index, 2001). Seu processo de absorção por administração oral é rápido e quase completo, cerca de 80 a 90% (SAGO & HALL III, 2002). O tempo de meia-vida aproximado do fármaco é de 20 a 30 horas

e pode permanecer por maior período nos rins, fígado, pele e músculos. Cerca de 70% da dapsona circulante liga-se às proteínas plasmáticas (HARDMAN, LIMBIRD & GILMAN, 2007).

A dapsona encontra-se disponível no mercado para a administração oral e tópica. Para a hanseníase, em geral, recomenda-se iniciar o tratamento oral com doses menores, com aumento gradativo no decorrer de um a dois meses, até a quantidade recomendada (HARDMAN, LIMBIRD & GILMAN, 2007). A posologia habitual do fármaco para adultos é de 50 a 100 mg ao dia, e para crianças a dose deve ser ajustada de acordo com o peso corporal, normalmente de 1 a 2 mg/kg por dia (KATZUNG, 2005).

Até 1980, a dapsona era o único fármaco de escolha para o tratamento da hanseníase. A partir de 1981, no entanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um novo esquema terapêutico para o tratamento dessa doença, pois começaram a surgir microrganismos resistentes ao fármaco. Como alternativa, a OMS recomendou o uso da associação da dapsona à rifampicina e à clofazimina, ambos fármacos antimicrobianos. A introdução da poliquimioterapia como esquema de tratamento ajudou a controlar a resistência primária e a secundária, comum quando um desses fármacos é administrado isoladamente (HARDMAN, LIMBIRD & GILMAN, 2007).

Embora a recomendação do uso da poliquimioterapia tenha ocorrido somente na década de 80, sabe-se que a existência de cepas de *Mycobacterium leprae* resistentes à dapsona é reportada desde 1964 (PETTIT & REES, 1964; MAEDA *et al.*, 2001). O aparecimento da resistência é verificado, normalmente, em pacientes multibacilares que receberam doses muito baixas do fármaco, por tempo prolongado (KATZUNG, 2005).

O mecanismo de resistência desenvolvido pelo *M. leprae* à dapsona está associado à DHPS, da mesma maneira que ocorre com outros microrganismos resistentes à classe sulfonamida (WILLIAMS *et al.*, 2000). Tal resistência deve-se à ocorrência de duas mutações no gene *folP*, o qual codifica essa enzima (KAI *et al.*, 1999). Essas mutações ocorrem nos códons 53 (ACC) e 55 (CCC) do gene, que codificam a treonina e a prolina, respectivamente. Como consequência, ocorre modificação na conformação tridimensional da arginina-54,

reduzindo, desta forma, a capacidade de ligação da enzima com a dapsona (KAI *et al.*, 1999; MATSUOKA *et al.*, 2010; MATSUOKA, 2010).

Matsuoka e colaboradores (2007) estudaram a magnitude da resistência do *M. leprae* à dapsona em três países do sudeste asiático, com alta prevalência da doença. Das 252 bactérias isoladas de novos casos da doença, apenas 3% apresentaram resistência primária ao fármaco. Em 53 amostras obtidas de pacientes com recidiva de hanseníase, 15% apresentaram resistência secundária à dapsona, o que indica uma alta frequência. Esse alto índice pode ser justificado pelo pequeno número de amostras.

Avaliou-se a incidência, no México, da resistência do *M. leprae* à dapsona utilizando a mesma metodologia empregada para os países do Sudeste Asiático. Não foi desenvolvida resistência à dapsona, diferente do encontrado para rifampicina e ofloxacino, que atingiu 5,3 e 2,6% dos pacientes, respectivamente. A não incidência de microrganismos resistentes à dapsona, no México, foi relatada mesmo com a utilização do fármaco como monoterapia por mais de 30 anos (MATSUOKA *et al.*, 2010).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) classifica os fármacos de acordo com suas características de permeabilidade nas membranas biológicas e de solubilidade aquosa, pois estes são os dois fatores mais limitantes para a absorção (quadro 1) (AMINDON *et al.*, 1995; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

| <b>Classe</b> | <b>Solubilidade relacionada à dose</b> | <b>Permeabilidade intestinal</b> |
|---------------|--|----------------------------------|
| I             | Alta                                   | Alta                             |
| II            | Baixa                                  | Alta                             |
| III           | Alta                                   | Baixa                            |
| IV            | Baixa                                  | Baixa                            |

**Quadro 1: Sistema de Classificação Biofarmacêutica dos fármacos (Adaptado de STORPIRTIS *et al.*, 2009).**

O fármaco é considerado altamente solúvel quando a sua maior dose se solubiliza em até 250 mL de água, na faixa de pH entre 1,0 e 7,5, à 37°C. Por outro lado, caso a solubilidade do fármaco seja menor que 100 µg/mL, ou a quantidade de água necessária para solubilizar o fármaco seja maior que 250 mL, o fármaco será considerado pobremente solúvel (O'DRISCOLL & GRIFFIN, 2008).

Em relação à permeabilidade nas membranas biológicas, o fármaco é considerado altamente permeável quando apresentar mais de 90% de absorção de sua dose administrada (TALEGAONKAR *et al.*, 2008).

De acordo com Lindenberg e colaboradores (2004), a dapsona pertence à classe biofarmacêutica II, pois apresenta alta permeabilidade nas membranas biológicas e baixa solubilidade em água, a qual prejudica a sua biodisponibilidade (LINDENBERG, KOPP & DRESSMAN, 2004).

Uma molécula é considerada lipofílica quando seu coeficiente de partição em octano-água (logP) é maior que zero. Como o logP da dapsona é 0,97, ela é considerada lipofílica, e por isso apresenta problemas de solubilidade em água (PANICKER, 2006).

Outra limitação da dapsona está relacionada ao surgimento de efeitos adversos que ocorrem devido aos metabólitos gerados, sendo a N-hidroxil-dapsona o principal deles (COLEMAN, 1995; WOZEL, 2010). A N-hidroxilação do fármaco ocorre pela ação do complexo enzimático do citocromo P-450, incluindo as enzimas CYP2E1, CYP2C9 e CYP3A4 (SAGO & HALL III, 2002; WOZEL, 2010).

Os efeitos adversos mais comuns relacionados à dapsona são anemia hemolítica e metemoglobinemia. Outros efeitos, no entanto, podem ocorrer como anorexia, náuseas, vômitos, agranulocitose, dermatite alérgica, neuropatia periférica, entre outros (PANIKER & LEVINE, 2001; SAGO & HALL III, 2002; HARDMAN, LIMBIRD & GILMAN, 2007). As reações adversas são ampliadas quando o fármaco é administrado aos pacientes imunossuprimidos ou de idade avançada (AGRAWAL & AGARWALLA, 2005).

A dapsona é contra-indicada para os pacientes que possuem: alergia às sulfonas, anemia grave, deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase, doença pulmonar, doença cardíaca, e pacientes com insuficiência renal ou hepática (WOZEL, 2010).

A dapsona possui um mecanismo de ação dual: antimicrobiano e antiinflamatório/imunomodulatório, por isso é muito utilizada para tratar e prevenir infecções causadas por patógenos ou doenças inflamatórias crônicas, especialmente na área da dermatologia (HARDMAN, LIMBIRD & GILMAN, 2007).

Além de ser indicada para o tratamento da hanseníase, a dapsona é considerada eficaz no tratamento de processos mediados por neutrófilos e doenças auto-imunes (WOZEL, 2010). Essa substância apresenta utilidade clínica no tratamento de patologias como sarcoma de Kaposi, malária, artrite reumatóide, tuberculose pulmonar, asma e doenças dermatológicas, incluindo a dermatite herpetiforme e a acne, principalmente a acne severa refratária à isotretinoína (INGRAM, GRINDLAY & WILLIAMS, 2009; LEBEAU *et al.*, 2009; BETTOLI *et al.*, 2010).

Como uso profilático, a dapsona pode ser administrada sozinha ou em combinação na pneumonia (causada por *Pneumocystis carinii* ou *Pneumocystis jiroveci*) e na toxoplasmose (causada por *Toxoplasma gondii*) de pacientes infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH) (AGRAWAL & AGARWALLA, 2005; WOZEL, 2010; LIMPER, *et al.*, 2011).

## **1.2 Doenças tropicais negligenciadas**

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são doenças infecciosas que apresentam impacto, principalmente, na população mais pobre. As DTN, como o próprio nome já diz, são predominantes de países situados próximo à linha do Equador, caracterizados como lugares de temperatura elevada e onde, na maioria das vezes, concentra-se a pobreza (FEASY *et al.*, 2009).

Todos os países de baixa renda são afetados por pelo menos cinco DTN simultaneamente. Muitas dessas infecções são atribuídas à falta de acesso à água potável, de saneamento, e de condições adequadas de moradia. Devido à situação econômica desses países, tais doenças são menos estudadas e pesquisadas, pois não provocam o interesse das indústrias e dos laboratórios de países mais desenvolvidos (FEASY *et al.*, 2009).

As DTN apresentam impactos clínicos, sociais e /ou econômicos relevantes já que muitas dessas doenças causam morbidade e mortalidade entre as populações mais pobres. Elas são um grupo de treze infecções parasitárias e bacterianas (tabela 1) (FEASY *et al.*, 2009 POKHREL, REIDPATH & ALLOTEY, 2011).

**Tabela 1: Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) e seus respectivos agentes patológicos (Adaptada de FEASY *et al.*, 2009).**

| <i>DOENÇAS TROPICAIS<br/>NEGLIGENCIADAS</i> | <i>AGENTE PATOLÓGICO</i>   |
|---|--|
| Ascaridíase                                 | <i>A. lumbricóides</i>   |
| Dracunculose                                | <i>D. medinensis</i>   |
| Ancilostomose                               | <i>A. duodenale; N. Americanus</i>   |
| Filariose linfática                         | <i>W. bancrofti; B. malayi; B. Timori</i>                                    |
| Oncocercose                                 | <i>O. volvulus</i>   |
| Esquistossomose                             | <i>S. mansoni; S. haematobium; S. japonicum; S. intercalatum; S. mekongi</i> |
| Tricuríase                                  | <i>T. trichiura</i>  |
| Doença de Chagas                            | <i>T. cruzi</i>  |
| Tripanossomíase africana                    | <i>T. brucei</i>   |
| Leishmaniose                                | Mais de 20 espécies de <i>Leishmania</i>                                     |
| Úlcera de Buruli                            | <i>M. ulcerans</i>   |
| Hanseníase                                  | <i>M. leprae</i>   |
| Tracoma                                     | <i>C. trachomatis</i>  |

### 1.3 Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa-crônica causada pelo parasita intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae*, o qual possui tropismo pela pele e pelos nervos periféricos, mas pode afetar também olhos, nariz e testículos (JACOBSON & KRAHENBUHL, 1999). Esse microrganismo acumula-se principalmente nas extremidades do corpo, mais especificamente dentro de macrófagos. Como o alvo primário dessa bactéria são as células de *Schwann*, localizadas no Sistema Nervoso Central (SNC), podem ocorrer a perda

da produção de mielina e a destruição de células mediadas pela resposta imunológica do hospedeiro (COLE, EIGIMEIER & PARKHILL, 2001).

A hanseníase apresenta sinais e sintomas dermatológicos e neurológicos, como deficiências sensoriais e incapacidades neuromotoras (figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; DE FREITAS, 2007). As deformidades causadas pela doença podem acarretar dificuldades no trabalho e na vida social, além de problemas psicológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).



**Figura 2: Pacientes com lesões dermatológicas provocadas pelo bacilo *Mycobacterium leprae* (Adaptada de ILEP, 2001).**

De acordo com a OMS, os pacientes com hanseníase são classificados em paucibacilares e multibacilares, dependendo da carga do bacilo (ALVES *et al.*, 2010). Os pacientes paucibacilares apresentam até cinco lesões ou manchas visíveis na pele - que podem se apresentar hipopigmentadas ou avermelhadas - e ausência de bacilo no local. A hanseníase paucibacilar caracteriza-se como uma forma menos grave da doença. Os pacientes multibacilares possuem seis ou mais lesões na pele, apresentam baciloscopia positiva no local da lesão e acúmulo de alto número de bacilos nos nervos afetados (JACOBSON & KRAHENBUHL, 1999; RODRIGUES, MAEDA & MOREIRA, 2009). O risco de comprometimento dos nervos e da mucosa nasal é maior em pacientes multibacilares (FEASY *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2010).

Embora o modo exato de transmissão ainda seja desconhecido, a maioria dos pesquisadores acredita que a principal forma de contágio da hanseníase seja através da

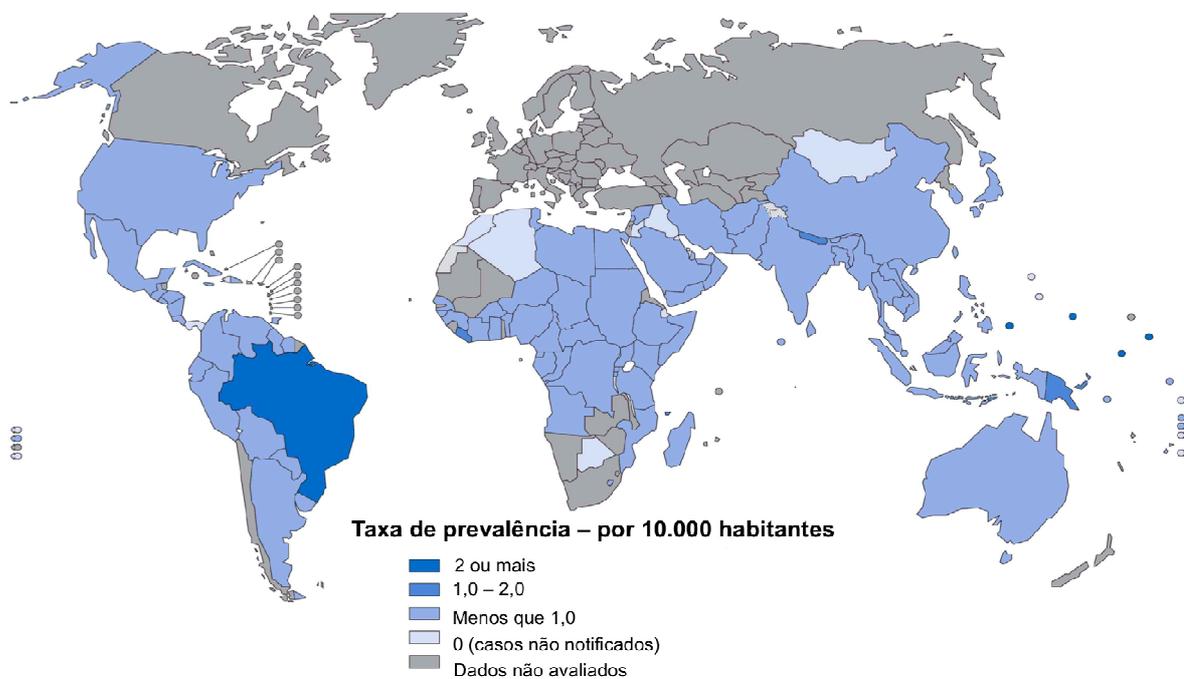
liberação do microrganismo pelo trato respiratório de pacientes infectados não tratados. Ocasionalmente, o contágio pode ocorrer pelo contato com a pele lesionada (JACOBSON & KRAHENBUHL, 1999; WHO, 2009; ALVES *et al.*, 2010). Os pacientes multibacilares são, normalmente, mais infecciosos (DEPS *et al.*, 2006).

A hanseníase é facilmente diagnosticada, e a baciloscopia é o exame complementar mais útil para o diagnóstico da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). A cura e o tratamento dependem do tempo de infecção do paciente. Quando a doença é descoberta logo no início, as chances de cura são maiores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Por isso, é importante diagnosticar os indivíduos infectados o mais cedo possível, pois assim o contágio é reduzido e as complicações neurológicas são limitadas. Quando diagnosticada e tratada tardiamente, a hanseníase pode trazer sérias consequências para os pacientes devido às incapacidades físicas e às deformidades geradas (COLE, EIGIMEIER & PARKHILL, 2001).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz para a hanseníase é bastante complexo. Sabe-se, entretanto, que a vacinação com BCG, normalmente utilizada para a prevenção da tuberculose, é conhecida por apresentar efeito protetor contra a hanseníase. Estudos com grupos distintos de pacientes que administraram a vacina BCG, isoladamente ou em associação, mostraram efeito protetor de 28 a 60% (ALVES *et al.*, 2010).

Em 1991, a OMS estabeleceu um acordo, a ser alcançado em um prazo de 10 anos, para a eliminação mundial da hanseníase (PENNA & PENNA, 2007). Até o ano de 2005, esse objetivo foi alcançado pela maioria dos países, com exceção de nove, dentre eles o Brasil (WHO, 2009).

Atualmente, a maior prevalência da hanseníase encontra-se no Sudeste Asiático, e em regiões da África e das Américas (figura 3) (WHO, 2009). Para que a erradicação da hanseníase se torne uma realidade, os países com alta incidência de doença devem intensificar suas pesquisas, a fim de obterem o controle e, posteriormente, a eliminação.

**TAXAS DE PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE – Dados notificados no início de Janeiro de 2009**

**Figura 3: Taxas da prevalência mundial da hanseníase (por 10.000 habitantes) no início de 2009 (Adaptada de WHO, 2009).**

No início de 2009, o registro da prevalência mundial da hanseníase foi de 213.036 casos, sendo 41.817 no Brasil. O Brasil ocupou a segunda posição em número absoluto de casos da doença no *ranking* mundial, atrás somente da Índia, com 86.331 casos. O número de novos casos da doença registrados durante o ano de 2008 foi de 249.007, sendo 38.914 no Brasil (tabela 2) (WHO, 2009).

**Tabela 2: Prevalência mundial da hanseníase no início de 2009, e número de novos casos detectados em 2008 (Adaptada de WHO, 2009).**

| <i>REGIÃO</i>         | <i>PREVALÊNCIA REGISTRADA</i> | <i>NOVOS CASOS DETECTADOS</i> |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| África                | 30.557                        | 29.814                        |
| América               | 47.069                        | 41.891                        |
| Sudeste Asiático      | 120.689                       | 167.505                       |
| Mediterrâneo Oriental | 4.967                         | 3.938                         |
| Pacífico Ocidental    | 9.754                         | 5.859                         |

De acordo com a tabela 3, observa-se a evolução da descoberta de novos casos em cada região, de 2002 a 2008. De maneira geral, nota-se que houve declínio na taxa de detecção de novos casos, e os números totais passaram de 620.638, em 2002, para 249.007, em 2008 (WHO, 2009).

**Tabela 3: Evolução da detecção de novos casos de hanseníase de 2002 a 2008 (Adaptada de WHO, 2009).**

| <i>REGIÃO</i>                | <i>NÚMERO DE NOVOS CASOS DETECTADOS</i> |             |             |             |             |             |             |
|------------------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                              | <i>2002</i>                             | <i>2003</i> | <i>2004</i> | <i>2005</i> | <i>2006</i> | <i>2007</i> | <i>2008</i> |
| <b>África</b>                | 48.248                                  | 47.006      | 46.918      | 45.179      | 34.480      | 34.468      | 29.814      |
| <b>América</b>               | 39.939                                  | 52.435      | 52.662      | 41.952      | 47.612      | 42.135      | 41.891      |
| <b>Sudeste Asiático</b>      | 520.632                                 | 405.147     | 298.603     | 201.635     | 174.118     | 171.576     | 167.505     |
| <b>Mediterrâneo Oriental</b> | 4.665                                   | 3.940       | 3.392       | 3.133       | 3.261       | 4.091       | 3.938       |
| <b>Pacífico Ocidental</b>    | 7.154                                   | 6.190       | 6.216       | 7.137       | 6.190       | 5.863       | 5.859       |

#### 1.4 Nanotecnologia

Muitos dos novos fármacos descobertos são ligeiramente solúveis ou praticamente insolúveis em água, o que compromete a biodisponibilidade deles após a administração oral (CERDEIRA, MAZZOTTI & GANDER, 2010). Uma parte significativa desses fármacos, 40% deles, não apresenta pleno desenvolvimento devido à sua limitada e variável absorção (GARDNER, WALSH & ALMARSSON, 2004; CERDEIRA, MAZZOTTI & GANDER, 2010).

Tanto a absorção quanto a biodisponibilidade dos fármacos de classificação biofarmacêutica II administrados por via oral não são adequadas (MULLER, JACOBS & KAYSER, 2001). Esses conceitos se diferenciam, pois a absorção é a etapa de permeação do fármaco na mucosa do trato gastrointestinal (TGI), mas que ainda não está disponível na circulação sistêmica; já a biodisponibilidade representa a quantidade do fármaco que alcança a circulação sistêmica (LOBENBERG & AMIDON, 2000).

O aumento da biodisponibilidade de fármacos pobremente solúveis pode ser alcançado por meio de recursos farmacotécnicos, capazes de promover a dissolução do fármaco no meio gastrointestinal. A aplicação da tecnologia farmacêutica no desenvolvimento de novas formulações permite o aumento da eficiência de fármacos já utilizados na terapêutica e a reintrodução daqueles que já haviam sido descartados (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Dessa forma, as indústrias farmacêuticas podem reformular seus produtos, o que implica novidades no mercado, de maneira mais econômica que o desenvolvimento de novos fármacos. A micronização e o emprego de formulações nanoestruturadas são exemplos de aplicação da tecnologia farmacêutica (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

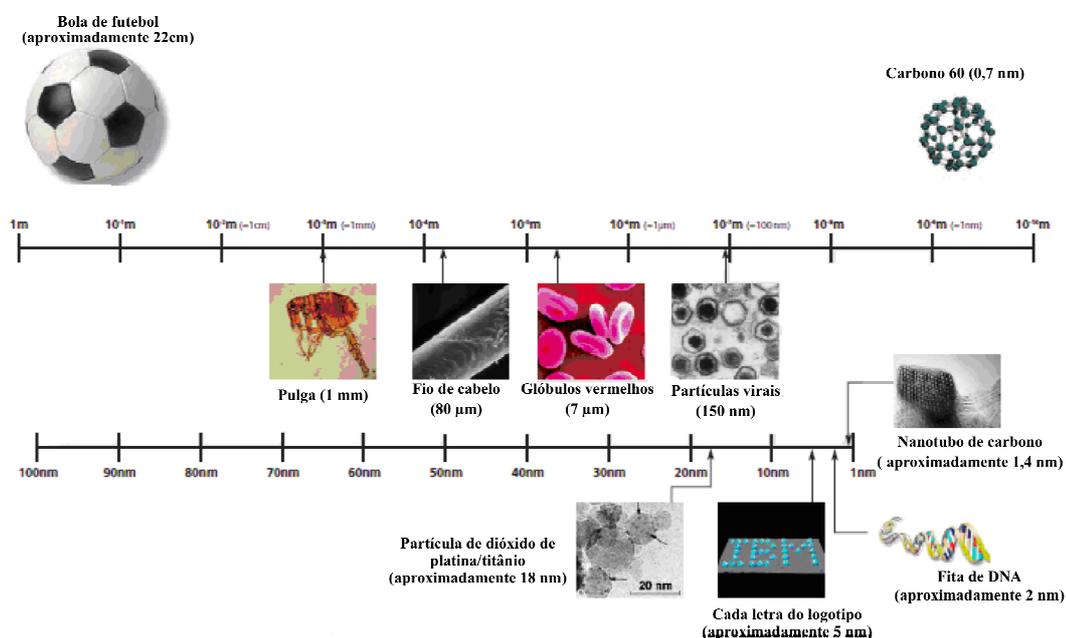
A micronização é uma alternativa bastante comum para aumentar adequadamente a taxa de dissolução do fármaco e a absorção no trato gastrointestinal, além de produzir partículas abaixo de 10  $\mu\text{m}$ . Quando a solubilidade do fármaco é muito baixa (por exemplo, 1 mg/mL) essa tecnologia é insuficiente (MULLER, JACOBS & KAYSER, 2001; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

A nanotecnologia também pode ser empregada para a melhoria da solubilidade e da taxa de dissolução do fármaco. A base dessa tecnologia consiste na utilização de sistemas nanoestruturados os quais apresentam limite de tamanho que variam da escala nanométrica à micrométrica, sendo ambas importantes na aplicação da medicina (PARK, 2007; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, a nanotecnologia sofreu avanços significativos em diferentes áreas. Depois de quase 30 anos de pesquisa básica e aplicada, o número de produtos nanométricos no mercado é cada vez maior (PIMENTEL *et al.*, 2007; STORPIRTIS *et al.*, 2009; GIL *et al.*, 2010).

A nanotecnologia é uma abordagem interdisciplinar que encontra aplicações em diversas áreas como eletrônica, meio ambiente, energia, segurança, robótica, tecnologia da informação, saúde, processamento de alimentos, entre outras. Seu emprego em materiais, estruturas ou sistemas acarretam novas funções e propriedades (físicas, químicas e/ou biológicas), decorrentes da estrutura nanométrica (ROCO, 2003; OCHEKPE, OLORUNFEMI & NGWULUKA, 2009).

Os sistemas biológicos possuem escala nanométrica em seu primeiro nível de organização. A largura de uma fita de DNA, por exemplo, mede aproximadamente 2,0 nm, e o tamanho de uma proteína pode variar de 1 a 20 nm (figura 4) (ROCO, 2003). Ou seja, a natureza apresenta evidências de sistemas nanoestruturados e da sua capacidade de trabalhar a níveis atômicos e moleculares (OCHEKPE, OLORUNFEMI & NGWULUKA, 2009).



**Figura 4:** Escala de comparação de tamanhos desde 1 m a 1 nm. A escala de comprimento da parte superior varia de 1 m a  $10^{-10}$  m e representa os tamanhos da bola de futebol, da pulga, do fio de cabelo, dos glóbulos vermelhos e de partículas virais. A escala inferior varia de 100 nm a 1 nm e representa os tamanhos de partículas de dióxido de platina/titânio, de letras do logotipo IBM, da fita de DNA, do nanotubo de carbono e do carbono 60 (Adaptada de The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004).

O emprego da nanotecnologia no tratamento, prevenção e diagnóstico de doenças é dividido em uma sub-área conhecida por nanomedicina (GIL *et al.*, 2010). Um dos aspectos importantes da nanomedicina é a liberação de fármacos em sistemas nanoestruturados, uma vez que a biodisponibilidade oral de fármacos pobremente solúveis em água é aumentada. Esse aumento deve-se a mecanismos como endocitose e à capacidade dos nanosistemas em permanecer por maior tempo na circulação sanguínea, liberando o fármaco de forma sustentada e contínua. (OCHEKPE, OLORUNFEMI & NGWULUKA, 2009). Devido ao pequeno tamanho desses sistemas, eles penetram através dos capilares, são captados pelas células e alcançam o local destinado (SAHOO & LABHASETWAR, 2003).

Além do aumento da biodisponibilidade os nanosistemas apresentam vantagens ao fármaco como liberação progressiva e controlada, proteção - o que garante maior estabilidade à formulação - minimização dos efeitos colaterais - devido à redução da dose e dos picos

plasmáticos de concentração máxima (MULLER, JACOBS & KAYSER, 2001; PIMENTEL *et al.*, 2007).

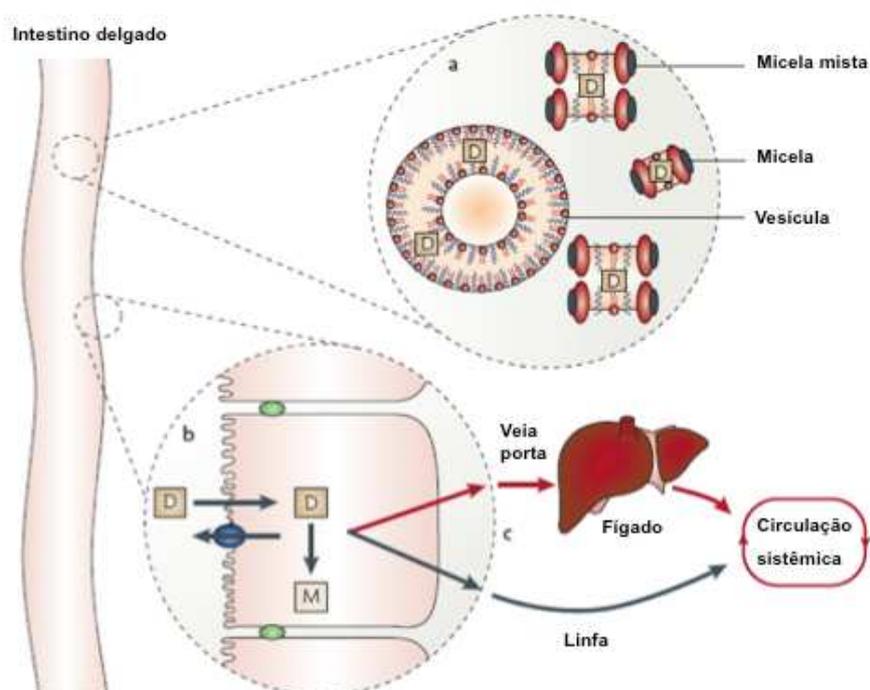
Apesar do potencial da nanotecnologia, sua segurança e seus efeitos para o homem, animais e meio ambiente ainda são motivos de preocupação. Embora existam muitos estudos em relação à segurança dos sistemas nanoestruturados, ainda não há resultados conclusivos dos seus possíveis efeitos maléficos (OCHEKPE, OLORUNFEMI & NGWULUKA, 2009).

### **1.5 Formulações lipídicas**

Os lipídios e os excipientes lipídicos são capazes de aumentar a absorção dos fármacos, principalmente dos lipofílicos, administrados por via oral (POUTON, 2000). De acordo com a literatura científica, refeições ricas em gorduras podem inibir transportadores de efluxo e, conseqüentemente, aumentar a absorção de fármacos que são conhecidos como substratos para esses transportadores. O desafio, então, está em simular esse efeito de “estado alimentado” através das formulações lipídicas (WU & BENET, 2005).

Um estudo realizado em cachorros no estado de jejum mostrou que a administração de uma única cápsula de lipídio de cadeia longa é capaz de aumentar a absorção de halofantrina, em até 27%, após administração oral (PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007).

Existem três mecanismos primários pelos quais os lipídios e os excipientes lipídicos afetam a absorção e a biodisponibilidade de fármacos administrados oralmente (figura 5). O aumento da solubilização do fármaco no meio intestinal é um desses mecanismos e ocorre devido a alterações na composição e nas características do ambiente coloidal, como a formação de micelas, vesículas e micelas mistas. O transporte baseado nos enterócitos e nos processos metabólicos também são capazes de modificar, potencialmente, a absorção do fármaco. O terceiro mecanismo deve-se ao transporte intestinal linfático, em vez da veia porta, o que reduz o metabolismo de primeira passagem do fármaco pelo fígado (PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007).



**Figura 5: Efeito dos lipídios e excipientes lipídicos na absorção de fármacos: (a) aumento da solubilização do fármaco devido à formação de micelas, vesículas e micelas mistas; (b) transporte baseado nos enterócitos; (c) transporte intestinal linfático (Adaptada de PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007).**

Além dos mecanismos explicados anteriormente, as formulações lipídicas também são capazes de influenciar a prevenção da precipitação do fármaco no intestino, o aumento da permeabilidade das membranas biológicas, a inibição dos transportadores de efluxo, a redução das enzimas do citocromo P450 e o aumento da produção de quilomícron (GURSOY & BENITA, 2004; PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007; CUINÉ, 2009).

As formulações lipídicas aumentam a solubilização dos fármacos no TGI devido à alteração desse ambiente e à estimulação de processos fisiológicos. Essas modificações causam aumento na secreção de derivados biliares endógenos e formação de colóides a partir de interações com os sais biliares e com os fosfolipídios presentes neste local (PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007; CUINÉ, 2009). No entanto, a quantidade de lipídios capaz de induzir essas modificações fisiológicas ainda é desconhecida (PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007).

A anatomia e a fisiologia do sistema intestinal linfático possuem uma série de vantagens no transporte de fármacos, comparado com o transporte pela veia porta. Uma dessas vantagens é não sofrer o metabolismo de primeira passagem no fígado, já que esta é uma limitação, pois reduz a biodisponibilidade dos fármacos administrados oralmente (PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007).

Como os fármacos de classificação biofarmacêutica II ou IV são substratos para transportadores intestinais de efluxo, como a glicoproteína P, eles sofrem redução da absorção intestinal (WU & BENET, 2005). De acordo com Wu & Benet (2005), os fármacos de classe II são mais seletivos para esses transportadores.

O potencial dos lipídios em inibir e/ou reduzir a atividade de efluxo dos transportadores tem despertado interesse nos pesquisadores. Mesmo que diferentes estudos tenham mostrado que os lipídios podem modular a glicoproteína P, poucos deles apresentam resultados conclusivos de que o aumento da absorção do fármaco *in vivo* se deve a essa modulação (PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007).

A veiculação de fármacos em formulações lipídicas que incluem tensoativos e cossolventes aumentou nos últimos anos. As razões se devem ao aumento da solubilidade dos fármacos, que muitas vezes é baixa em determinados tipos de lipídios, e com a adição de tensoativos e cossolventes torna-se maior. Esses componentes são capazes de modificar a natureza dos fluidos gastrointestinais e, por isso, aumentar a solubilização (PORTER, TREVASKIS & CHARMAN, 2007).

Microemulsões e sistemas de liberação auto-emulsificantes são exemplos de formulações lipídicas (O'DRISCOLL & GRIFFIN, 2008). Os medicamentos Sandimmun Neoral®, Norvir® e Fortavase® contendo os fármacos lipofílicos ciclosporina, ritonavir e saquinavir, respectivamente, são exemplos de formulações lipídicas de sucesso comercial (O'DRISCOLL & GRIFFIN, 2008; HAN *et al.*, 2009).

## 1.6 Formulações orais

Apesar das inovações realizadas na área de sistemas de liberação de fármacos, estima-se que 90% dos medicamentos sejam administrados pela via oral, que ainda hoje é a via de administração preferida pelos pacientes. Essa melhor aceitação se deve à sua conveniência e descomplicação, além do baixo custo associado (SASTRY, NYSHADHAM & FIX, 2000).

Embora possuam muitas vantagens, as formulações orais apresentam limitações, pois, para atingir a concentração terapêutica adequada, o fármaco deve apresentar adequada permeabilidade intestinal e solubilidade aquosa. A maioria das substâncias, entretanto, não possui essas características (BALIMANE, CHONG & MORRISON, 2000; O'DRISCOLL & GRIFFIN, 2008).

Dentre as formas farmacêuticas destinadas para o uso oral, incluem-se as cápsulas. A maior conveniência no transporte e a facilidade de deglutição são algumas de suas vantagens. Do ponto de vista farmacêutico, as cápsulas são produzidas em nível industrial de maneira eficiente (ALLEN, POPOVICH & ANSEL, 2007).

De acordo com o tipo de invólucro, as cápsulas são designadas duras ou moles. Normalmente, ambos os tipos apresentam em sua constituição a gelatina, que é uma substância atóxica, derivada do colágeno e que se solubiliza facilmente nos fluidos biológicos à temperatura ambiente (AULTON, 2005).

As formulações lipídicas, usualmente, são apresentadas ao paciente na forma de cápsulas gelatinosas moles. Elas, entretanto, também podem ser apresentadas em cápsulas gelatinosas duras, capazes de veicular desde sólidos secos até líquidos (AULTON, 2005).

## 1.7 Microemulsão

Na busca por novas formulações capazes de aumentar a absorção e a biodisponibilidade dos fármacos, como também reduzir seus efeitos colaterais, a união da nanotecnologia a formulações lipídicas se torna interessante. A utilização das microemulsões

se insere nesse contexto, uma vez que une as vantagens das formulações lipídicas com as vantagens dos sistemas nanoestruturados.

Nas últimas décadas, as microemulsões têm sido amplamente estudadas, devido ao seu potencial de aplicação em diferentes áreas (TALEGAONKAR *et al.*, 2008). A utilização desses sistemas no desenvolvimento de formulações farmacêuticas é interessante, visto que eles são capazes de veicular tanto fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos. As microemulsões possuem diferentes vias de aplicações que variam desde as mais comuns como a nasal, oral, ocular, tópica e intravenosa até as mais modernas como a pulmonar, transdérmica, intravaginal e intratecal (KOGAN & GARTI, 2006; YUAN *et al.*, 2006; TALEGAONKAR *et al.*, 2008).

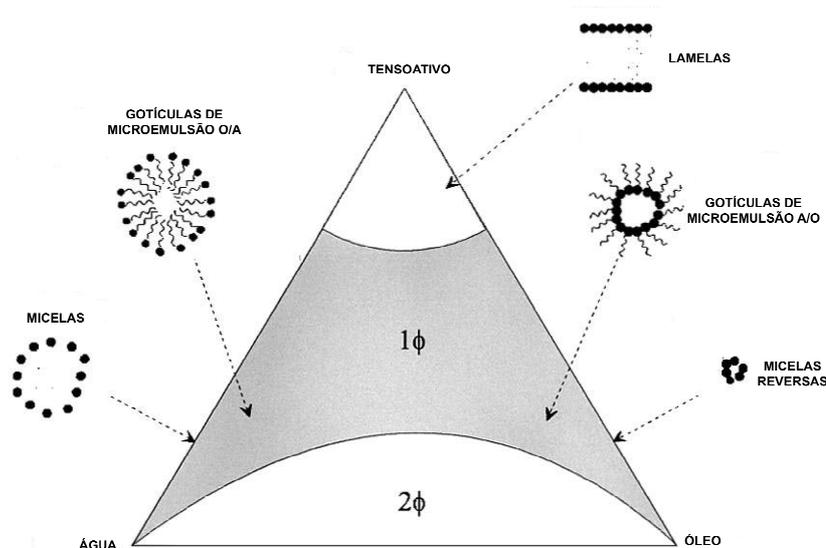
Microemulsões são formas farmacêuticas homogêneas, obtidas a partir de soluções micelares. Sua popularidade deve-se às vantagens apresentadas: alta capacidade de solubilização, estabilidade termodinâmica em ampla faixa de pH e meio iônico, dimensões nanométricas, proteção aos fármacos contra enzimas, transparência ótica, baixa viscosidade e formação espontânea pela simples mistura de vários componentes (YUAN *et al.*, 2006; JAIN, FERNANDES & PATRAVALE, 2010; DIXIT & NAGARSENKER, 2010).

As pequenas gotículas da microemulsão fornecem melhor aderência às membranas no transporte dos fármacos e, conseqüentemente, otimizam a absorção intestinal e a permeação dos fármacos (TALEGAONKAR *et al.*, 2008). Como consequência da melhoria dos parâmetros de absorção e permeabilidade, os efeitos colaterais e a dose utilizada são reduzidos. Outra vantagem das gotículas pequenas é transportar moléculas bioativas de maneira controlada (KOGAN & GARTI, 2006). Os fármacos incorporados em microemulsão apresentam a biodisponibilidade e o perfil de concentração plasmática reprodutíveis, o que é clinicamente importante no caso de fármacos que possuem efeitos adversos severos. (TALEGAONKAR *et al.*, 2008).

As microemulsões são constituídas de óleo, água, tensoativos e cossolvente. Uma vez definidos os componentes apropriados para seu preparo, constrói-se o diagrama de fases, a fim de definir a extensão e a natureza das regiões de microemulsão. O diagrama de fases é uma

ferramenta importante, pois caracteriza em que condições as microemulsões existem e quais são as proporções dos componentes utilizados para a formação delas. Ele pode ser classificado em ternário, quaternário e pseudoternário e diferenciados de acordo com os componentes utilizados e a quantidade destes (ROSSI *et al.*, 2007).

A construção do diagrama de fases é útil para estudar uma série de fenômenos que podem ocorrer quando diferentes componentes são misturados. No diagrama, outras estruturas associadas, além das microemulsões, podem ser formadas, incluindo micelas, lamelas e micelas reversas (figura 6). A formação dessas estruturas depende da composição química e da concentração de cada componente (TALEGAONKAR *et al.*, 2008).



**Figura 6:** Representação esquemática de um diagrama pseudoternário de fases. Nesse diagrama observa-se a formação de micelas, lamelas, micelas reversas, e gotículas de microemulsão O/A ou A/O. Cada vértice do sistema representa um componente da formulação. O símbolo  $\phi$  significa ângulo de fase (Adaptada de LAWRENCE & REES, 2000).

Estruturalmente, os sistemas microemulsionados classificam-se em três tipos básicos: óleo em água (O/A), sendo a água a fase dispersante; água em óleo (A/O), sendo o óleo a fase dispersante, e estruturas bicontínuas. Tanto as microemulsões A/O quanto O/A provocam o aumento da biodisponibilidade dos fármacos (ROSSI *et al.*, 2007; TALEGAONKAR *et al.*, 2008).

Dos diversos fármacos veiculados em microemulsões, destaca-se a formulação de moléculas muito lipofílicas, como a ciclosporina. A veiculação desse fármaco em microemulsão promoveu maior estabilidade e absorção e, principalmente, maior reprodutibilidade desses parâmetros comparados à sua dispersão oleosa convencional. A utilização dos sistemas micromulsionados para fármacos de características físico-químicas similares à ciclosporina é bastante interessante (MUELLER *et al.*, 1994).

A aplicação das microemulsões como sistemas de liberação tem sido estudada para alguns fármacos, como por exemplo, o felodipino (anti-hipertensivo), o tipranavir (anti-VIH) e o aciclovir (antiviral), além dos suplementos nutricionais como as vitaminas A, D, E e K (TALEGAONKAR *et al.*, 2008).

Pode-se, portanto, melhorar os parâmetros da dapsona incorporando-a em microemulsões, como uma alternativa ao tratamento da hanseníase disponível atualmente, já que os sistemas microemulsionados possibilitam a melhoria da absorção, da biodisponibilidade e da estabilidade do fármaco, e a redução dos efeitos adversos, em decorrência da possível diminuição da dose farmacologicamente ativa.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho consiste no desenvolvimento de sistemas microemulsionados capazes de veicular a dapsona. Ela poderá ter aplicação terapêutica em outras patologias, além da Hanseníase, como no tratamento de doenças dermatológicas e auto-imunes, ou na profilaxia da pneumonia e da toxoplasmose de pacientes infectados pelo VIH.

Como objetivos específicos do trabalho, consideram-se os seguintes aspectos:

- Preparar as microemulsões de dapsona e caracterizá-las, quanto a distribuição do tamanho de gotículas, o índice de refração, a condutividade, a viscosidade, o teor e a estabilidade;
- Avaliar o perfil de liberação do fármaco a partir de sua forma farmacêutica, utilizando como meios de dissolução o suco gástrico simulado, na ausência e presença de tensoativo, e o suco entérico simulado;
- Avaliar o perfil de permeabilidade intestinal do fármaco a partir de sua forma farmacêutica, utilizando cultura de células Caco-2.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Equipamentos

- Analisador de tamanho de gotícula - Horiba LB 550
- Balança analítica - Mettler Toledo AG 204
- Banho de ultrassom - Unique
- Câmara climática - Nova Ética 420/LCD 150
- Capela / Fluxo - Pachane
- Centrífuga - Sigma 6-15
- Condutivímetro - Quimis
- Coluna C8 (5 $\mu$ m) - 4,6 x 150 mm - Kromasil
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) - Elite Labchrom
- Destilador - Quimis
- Dissolutor - Nova Ética 299
- Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier - Perkin Elmer
- Espectrofotômetro de absorção no ultravioleta / visível (UV-Vis) - Bioespectro
- Estufa - Thermo Cientific
- Frascos de 75 cm<sup>2</sup> - TPP
- Filtros - Transwell Corning

- Membrana filtrante 0,45  $\mu\text{m}$  - Millipore
- Micropipeta automática - Eppendorf
- Placa aquecedora com agitação - Corning PC 230
- Placa com filtros de membrana 0,3  $\mu\text{m}$ /6,5 mm - Transwell Corning
- Ponto de fusão - Buchi 540
- Potenciômetro - Quimis
- Processador ultrassônico - UPH 100 H
- Refratômetro de Abbe - Analikjena
- Seringas descartáveis
- Software Chemix®
- Software Prisma 5.0®
- Vidraria - Pyrex
- Viscosímetro - Brookfield
- Voltímetro - Milli Cell / Millipore

### **3.1.2 Matérias-primas e reagentes**

- Ácido Clorídrico 37% P.A.- Tedia
- Água destilada
- Brometo de potássio P.A. - Vetec
- Cápsulas gelatinosas duras nº 00 - Laboratórios Pfizer

- Cloreto de sódio P.A. - Spectrum
- Cloreto de Potássio P.A. - Spectrum
- Dapsona - G. Amphaylab
- Dapsona grau farmacêutico - USP
- Etanol P.A. - Vetec
- Fluoresceína sódica - LGC
- Fosfato de potássio monobásico P.A. - Vetec
- Fosfato de sódio dihidratado P.A. - Vetec
- Hidróxido de Sódio P.A. - Vetec
- Isobutanol P.A. - Tedia
- Laurilsulfato de Sódio P.A. - Vetec
- Meio DMEM - Sigma
- Metanol grau CLAE - Tedia
- Miristato de Isopropila P.A. - Vetec
- Penicilina - Estreptomicina - LGC
- Propilenoglicol P.A. – Vetec Soro fetal bovino - LGC
- Span® 80 - Sigma Aldrich
- Span® 20 - Sigma Aldrich
- Tween® 80 - Sigma Aldrich
- Tween® 40 - Sigma Aldrich

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Caracterização do fármaco

#### 3.2.1.1 Faixa de fusão

A faixa de fusão de um composto corresponde ao intervalo entre a temperatura inicial, determinada quando a amostra começa a se fundir, e a temperatura final, quando ela se torna completamente líquida (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

A determinação da faixa de fusão da dapsona foi realizada pelo método do capilar, descrito pela Farmacopéia Brasileira. As amostras, feitas em triplicata, foram inseridas nos capilares de vidro e, então, levadas ao equipamento.

#### 3.2.1.2 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IV) é um método importante para a caracterização dos compostos orgânicos, pois permite identificar os seus principais grupos funcionais. As intensidades das bandas do espectro podem ser expressas tanto em Transmitância (T) quanto em Absorbância (A), enquanto que o número de ondas é expresso em  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2007).

A análise da dapsona pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IV-TF) foi realizada a partir do preparo de pastilhas do fármaco com brometo de potássio (KBr), sendo a varredura do espectro feita entre 400 a  $4.000 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . As amostras foram feitas em triplicata. As bandas observadas no espectro foram caracterizadas de acordo com seus grupos funcionais.

### 3.2.2 Preparo das formulações

#### 3.2.2.1 Seleção dos componentes

Os componentes utilizados nas formulações propostas foram selecionados de acordo com a literatura científica, por razões de já terem sido aplicados em outras microemulsões destinadas à incorporação de fármacos (LAWRENCE & REES, 2000; REGE, KAO & POLLI, 2002; NANDI, BARI & JOSHI, 2003; YUAN *et al.*, 2006; PADULA, NICOLI & ZANTI, 2009; BADAWI *et al.*, 2009). O Miristato de Isopropila foi utilizado como fase oleosa, e o Isobutanol e o Propilenoglicol como cossolventes. Os tensoativos Monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween® 80), Monopalmitato de polioxietileno de sorbitano (Tween® 40), Monooleato de sorbitano (Span® 80) e Monolaurato de sorbitano (Span® 20) foram empregados como tensoativos das formulações.

#### 3.2.2.2 Obtenção das formulações

As microemulsões foram obtidas de forma empírica, ou seja, propuseram-se modificações nas combinações de tensoativos - Tween® 80, Tween® 40, Span® 80 e Span® 20 - assim como nos cossolventes - Isobutanol e Propilenoglicol - a partir da formulação de referência descrita por Nandi e colaboradores (2003). O Miristato de Isopropila e a água foram utilizados em todas as formulações e sempre nas mesmas proporções.

As formulações foram preparadas de acordo com Nandi e colaboradores (2003). Os tensoativos foram misturados separadamente, sob agitação magnética. Em seguida, o óleo e o cossolvente foram adicionados a essa mistura e, por último, adicionou-se a água.

As microemulsões foram classificadas de A a H (tabela 4). De maneira geral, as proporções dos componentes foram mantidas, com exceção das formulações D e E, que foram alteradas em relação à proporção de tensoativos, de 20,5% p/p (1:1) para 18,55% e 22,55% p/p (0,90:1,10). A formulação classificada como A foi a formulação-base, retirada de Nandi e colaboradores (2003). Ela foi repetida com o propósito de avaliar o efeito da agitação com

ultrassom nesta formulação. As amplitudes de ultrassom utilizadas foram 50 e 100%, por 15 minutos. Além disso, sua formulação que não foi submetida ao ultrassom serviu de parâmetro para os novos sistemas preparados.

**Tabela 4: Formulações classificadas de A a H. T 80 = Tween 80®; T 40 = Tween 40®; S 20 = Span 20®; S 80 = Span 80®; IBT = Isobutanol; PPG = Propilenoglicol; MI = Miristato de Isopropila (p/p).**

| <i>Formulação</i> | <i>T 80</i> | <i>T 40</i> | <i>S 20</i> | <i>S 80</i> | <i>IBT</i> | <i>PPG</i> | <i>MI</i> | <i>ÁGUA</i> |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-----------|-------------|
| <b>A</b>          | 20,5%       | ---         | 20,5%       | ---         | 4,5%       | ---        | 36,3%     | 18,2%       |
| <b>B</b>          | 20,5%       | ---         | ---         | 20,5%       | 4,5%       | ---        | 36,3%     | 18,2%       |
| <b>C</b>          | ---         | 20,5%       | 20,5%       | ---         | 4,5%       | ---        | 36,3%     | 18,2%       |
| <b>D</b>          | 22,55%      | ---         | ---         | 18,45%      | 4,5%       | ---        | 36,3%     | 18,2%       |
| <b>E</b>          | 18,45%      | ---         | ---         | 22,55%      | 4,5%       | ---        | 36,3%     | 18,2%       |
| <b>F</b>          | 20,5%       | ---         | 20,5%       | ---         | ---        | 4,5%       | 36,3%     | 18,2%       |
| <b>G</b>          | 20,5%       | ---         | ---         | 20,5%       | ---        | 4,5%       | 36,3%     | 18,2%       |
| <b>H</b>          | ---         | 20,5%       | 20,5%       | ---         | ---        | 4,5%       | 36,3%     | 18,2%       |

### 3.2.2.3 Construção dos diagramas de fases

Dentre as formulações propostas empiricamente, duas, uma de cada cossolvente, foi escolhida. A construção dos diagramas de fases dessas formulações foi realizada, pois a partir dele é possível determinar as proporções exatas de cada componente da formulação para obtenção da microemulsão desejada (NORNOO *et al.*, 2009).

Neste trabalho, o diagrama de fases foi empregado a fim de avaliar a quantidade de água a ser adicionada na formulação e, então, comparar a eficiência dos diferentes componentes utilizados, em termos dessa incorporação (NORNOO *et al.*, 2009). O tipo de diagrama utilizado no desenvolvimento das microemulsões de dapsona foi o pseudoternário

de fases, classificado assim, pois ele possui quatro componentes, além da água, que se agrupam de dois em dois. Um vértice do triângulo representa a mistura de dois tensoativos, na proporção fixa de 1:1. O outro vértice representa a proporção 8:1 de óleo e cossolvente, respectivamente e, por fim, o terceiro vértice representa a água (NANDI, BARI & JOSHI, 2003).

A construção do diagrama pseudoternário de fases foi realizada ao utilizar proporções de fase oleosa e cossolvente (*A*) e de mistura de tensoativos (*B*) iguais a 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90 (tabela 5). Em cada uma dessas proporções a água foi titulada e, por fim, as proporções foram recalculadas. Considerou-se como a melhor aquela capaz de incorporar maior quantidade de água.

**Tabela 5: Proporções utilizadas na construção dos diagramas pseudoternário de fases. A = proporções de fase oleosa e cossolvente (8:1); B = proporções de tensoativos (1:1).**

|          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>A</b> | 90% | 80% | 70% | 60% | 50% | 40% | 30% | 20% | 10% |
| <b>B</b> | 10% | 20% | 30% | 40% | 50% | 60% | 70% | 80% | 90% |

A primeira etapa do preparo das formulações foi conduzida pela mistura dos tensoativos, sob agitação magnética. Em seguida, o cossolvente selecionado e o óleo foram incorporados a essa mistura, também sob agitação. O último estágio de desenvolvimento das formulações foi avaliar a quantidade de água a ser adicionada no sistema contendo a mistura de tensoativos, o óleo e o cossolvente. A água foi titulada de 10 em 10  $\mu\text{L}$ , com o auxílio de uma micropipeta automática. A quantidade máxima de água adicionada mantém o sistema límpido e pouco viscoso, características essenciais das microemulsões (ROSSI *et al.*, 2007). Esses experimentos foram realizados em triplicata e considerou-se a média entre os três resultados.

A partir dos dados obtidos com o diagrama pseudoternário de fases, os gráficos foram construídos com o auxílio do software Chemix®.

#### 3.2.2.4 Incorporação da dapsona nas microemulsões obtidas

A solubilidade da dapsona nas formulações foi avaliada de duas maneiras distintas, tanto na formulação pronta, quanto na fase oleosa da formulação, ou seja, antes da água ser adicionada. Neste caso, a adição foi feita de 50 em 50  $\mu\text{L}$ . As concentrações de dapsona testadas foram 1,5%; 2,0%; 2,5%; 3,0%; 3,5% e 4,0% p/p.

Os estudos de solubilidade da dapsona foram realizados sob agitação vigorosa ao longo da noite. Durante as primeiras duas horas de ensaio, a cada 30 minutos, as formulações foram levadas ao banho de ultrassom por 20 minutos.

### 3.2.3 Caracterização das formulações

#### 3.2.3.1 Avaliação da distribuição do tamanho de gotícula

A análise da distribuição do tamanho de gotícula das formulações foi realizada por espalhamento dinâmico de luz, conhecido também por espectroscopia de correlação de fótons. Este método tem sido descrito como apropriado para determinar o tamanho de gotículas de microemulsões (MOULIK & PAUL, 1998). Essa técnica fornece informações sobre o movimento translacional das gotículas, o que permite calcular o seu tamanho (ABOOFAZELI, BARLOW & LAWRENCE, 2000). A medida do coeficiente de difusão é usada para calcular o raio hidrodinâmico das gotículas, utilizando a equação de *Stokes-Einstein* (GODDEERIS *et al.*, 2006).

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

**Figura 7: Equação de *Stokes Einstein*, sendo  $R_h$  = raio hidrodinâmico;  $k$  = constante de Boltzmann;  $T$  = temperatura absoluta;  $\pi = 3,14$ ;  $\eta$  = viscosidade da fase contínua e  $D$  = coeficiente de difusão (Adaptada de GODDEERIS *et al.*, 2006).**

As medidas, feitas em triplicata, foram realizadas à temperatura ambiente. O índice de refração (IR) da fase contínua da formulação foi determinado, pois ele é utilizado no cálculo do coeficiente de difusão, fundamental na determinação do tamanho de gotículas (ABOOFAZELI, BARLOW & LAWRENCE, 2000).

### 3.2.3.2 Medida do índice de refração

A determinação do índice de refração das amostras é importante, pois através desse parâmetro pode-se avaliar a estabilidade das microemulsões, uma vez que ela está relacionada à clareza ótica desses sistemas. Além disso, ele auxilia na determinação do tipo de microemulsão, A/O ou O/A (KAMILA *et al.*, 2009).

O IR das amostras foi determinado pelo refratômetro de Abbe. O aparelho foi calibrado com água destilada, à 25°C, obtendo-se o valor de 1,325 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). As medidas do IR foram feitas em triplicata, à temperatura ambiente. As amostras foram comparadas ao índice de refração da fase oleosa e da água.

### 3.2.3.3 Medida da condutividade elétrica

A condutividade elétrica é uma ferramenta muito utilizada na determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos da formulação. Ela também é empregada na observação de modificações estruturais das microemulsões (LAWRENCE & REES, 2000).

A condutividade das formulações foi medida pelo condutivímetro, sendo as medidas feitas em triplicata. O condutivímetro foi previamente calibrado por uma solução de cloreto de sódio (NaCl) de concentração igual a 5,0 mg/L, que apresenta a condutividade igual a 10,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Para determinar o tipo do sistema O/A ou A/O, avaliou-se, primeiramente, a condutividade do solvente aquoso e do solvente oleoso. Em seguida, realizou-se a medida de condutividade da amostra. Esses valores foram comparados com os da água e do óleo. Quando a condutividade da amostra é próxima da condutividade da água, a formulação é designada O/A, se for próxima à do óleo, ela é caracterizada como A/O (LAWRENCE & REES, 2000; AULTON, 2005).

#### 3.2.3.4 Medida da viscosidade

A viscosidade é a propriedade dos líquidos em relação à resistência ao fluxo, normalmente expressa em centipoise (cP) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; STORPIRTIS *et al.*, 2009). A avaliação desse parâmetro é importante, pois as microemulsões são sistemas conhecidos por apresentarem baixa viscosidade (TSAI *et al.*, 2010).

A determinação da viscosidade foi realizada no viscosímetro de Brookfield, utilizando o spindle nº 1 - empregado para sistemas líquidos - devido às características das microemulsões serem semelhantes a dos líquidos. As velocidades testadas foram iguais a 6, 12, 30 e 60 rpm. As medidas foram determinadas à temperatura de 25°C. Para o viscosímetro utilizado neste ensaio, o volume de amostra requerido deve ser maior ou igual a 100 mL, por isso, a medida da viscosidade foi realizada somente para a formulação caracterizada como a ideal.

### 3.2.4 Quantificação da dapsona

A determinação do teor de dapsona nas formulações foi realizada através da metodologia desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As condições de análise utilizadas foram:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência;
- Coluna: C8 - 4,6 x 150 mm - 5  $\mu$ m;
- Fase móvel: Tampão fosfato 0,03 M pH 5,9 : Metanol (70:30, v/v) – eluição isocrática;
- Fluxo: 1,0 mL/min.;
- Temperatura: 25°C;
- Comprimento de onda: 295 nm;

#### 3.2.4.1 Preparo da solução mãe de dapsona

Foi pesada uma quantidade de 25,0 mg de dapsona, teor 96,75% (lote: 02/572 A), e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com metanol. A concentração final dessa solução foi de 250,0  $\mu$ g/mL (sem correção).

#### 3.2.4.2 Preparo da curva padrão

A curva padrão foi preparada a partir da solução mãe de dapsona. Foram feitas diluições de 1:25, 3:50, 2:25, 1:10 e 3:25 com a fase móvel como diluente, obtendo-se soluções com concentrações de 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (sem correção).

#### 3.2.4.3 Preparo da solução amostra

As quantidades das formulações, equivalentes a 25,0 mg de dapsona, foram pesadas e transferidas para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com tampão fosfato (0,03 M) pH 5,9, e a solução foi filtrada em papel de filtro. Uma alíquota de 1,0 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com fase móvel. A concentração final da solução amostra foi de 25,0  $\mu\text{g/mL}$  (sem correção).

### 3.2.5 Estudo de estabilidade acelerado

O estudo de estabilidade acelerado, de acordo com a RE nº 1, de 29 de julho de 2005, é aquele realizado em condições forçadas de armazenamento, que tem como objetivo acelerar os processos de degradação química e as mudanças físicas do produto farmacêutico (ANVISA, 2005).

As microemulsões de dapsona consideradas dentro dos parâmetros desejáveis foram armazenadas em recipientes de vidro âmbar, tampados com batoque de borracha e lacre de alumínio, e colocadas em condições forçadas de temperatura e umidade - câmara climática a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa (UR) (ANVISA, 2005).

O estudo de estabilidade acelerado das microemulsões de dapsona foi realizado por 3 meses e as amostras foram recolhidas nos tempos de 15, 30, 60 e 90 dias. Em cada um desses intervalos as formulações foram caracterizadas quanto à distribuição de tamanho de gotículas,

índice de refração, teor de dapsona e condutividade, além de serem observadas visualmente.

Uma amostra de cada formulação, colocada em estabilidade, foi armazenada sob a bancada, sem controle de temperatura e umidade. Essas amostras, denominadas formulações de prateleira, foram comparadas àquelas armazenadas em condições forçadas de temperatura e umidade.

### 3.2.6 Estudo de solubilidade da dapsona nos meios de liberação

A determinação da solubilidade da dapsona nas soluções receptoras - sucos gástrico e entérico simulados - utilizadas nos ensaios de liberação é importante, pois elas devem assegurar as condições *sink*. A condição *sink* pode ser definida como o mínimo de três vezes o volume de meio de dissolução necessário para a obtenção de uma solução saturada do fármaco. Existem divergências na literatura científica quanto a esse número, que no lugar de três, utilizam cinco ou dez vezes o volume necessário para obter uma solução saturada como condição *sink* (STORPIRTIS *et al.*, 2009). Neste trabalho foi considerado o valor de dez vezes.

#### 3.2.6.1 Preparo da solução mãe de dapsona

Foi pesada uma quantidade de 25,0 mg de dapsona, teor 96,75% (lote: 02/572 A), e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com metanol. A concentração final dessa solução foi de 250,0 µg/mL (sem correção).

#### 3.2.6.2 Preparo da curva padrão

A curva padrão foi preparada a partir da solução mãe de dapsona. Foram feitas diluições de 1:25, 2:25, 3:25, 5:25 e 6:25, cujo volume foi completado com metanol. Em seguida, recolheram-se alíquotas de 1,0 mL de cada uma dessas soluções, que foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, utilizando o meio testado como diluente.

Soluções com concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 e 6,0 µg/mL foram obtidas, respectivamente (sem correção).

### 3.2.6.3 Preparo da solução amostra

Adicionou-se excesso de fármaco em 20,0 mL do meio testado, até a formação de resíduo sólido, que foram mantidos em agitação ao longo da noite, a 37°C. Os ensaios de solubilidade foram realizados nesta temperatura, pois é a temperatura utilizada no estudo de liberação, o qual simula as condições *in vivo*.

Na etapa seguinte, as soluções foram centrifugadas por 40 minutos a 3.500 rpm. O sobrenadante, obtido a partir dessa centrifugação, foi filtrado em membrana de 0,45 µm e analisado por espectrofotometria de ultravioleta (UV), em comprimento de onda de 295 nm (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

### 3.2.7 Estudo de liberação do fármaco

O estudo de liberação do fármaco foi realizado a partir dos ensaios de dissolução da dapsona em suco gástrico, suco gástrico com laurilsulfato de sódio 0,5% p/p e suco entérico. A importância desse estudo deve-se à previsão do comportamento da dapsona nas formulações propostas, pois avalia a liberação do fármaco ao longo do tempo.

A forma farmacêutica escolhida para veicular a microemulsão foi a cápsula gelatinosa dura que, além do baixo custo, é capaz de veicular formulações lipídicas, e pode, de certa forma, simular uma cápsula gelatinosa mole. Elas são classificadas em números, e cada uma delas possui um volume máximo (tabela 6). Para a realização dos ensaios de liberação do fármaco, as microemulsões foram veiculadas em cápsulas número 00 que corresponde ao volume total de 0,95 mL. A quantidade máxima de microemulsão de dapsona capaz de ser incorporada nesta cápsula é de aproximadamente 800,0 mg, o que equivale a 16,0 mg do fármaco, para a formulação de 2,0% (p/p), e a 20,0 mg, para a formulação de 2,5% (p/p).

**Tabela 6: Numeração das cápsulas e seus respectivos volumes, determinados em mililitros (Adaptada de ALLEN, POPOVICH & ANSEL, 2007).**

| Nº cápsula | Volume (mL) |
|------------|-------------|
| 000        | 1,40        |
| 00         | 0,95        |
| 0          | 0,68        |
| 1          | 0,50        |
| 2          | 0,37        |
| 3          | 0,30        |
| 4          | 0,21        |
| 5          | 0,13        |

### 3.2.7.1 Preparo dos meios de dissolução

O meio de dissolução suco gástrico simulado (SGS) foi preparado, de acordo com a Farmacopéia Americana 30 (USP 30, 2007), dissolvendo-se 2,0 g de NaCl em quantidade suficiente de água para solubilizá-lo. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 1,0 L. Em seguida, adicionaram-se 7,0 mL de ácido clóídrico (HCl) e, por fim, o volume final foi completado com água destilada. Como o valor final do pH dessa solução deve ser igual a  $1,2 \pm 0,1$ , este parâmetro foi monitorado através de potenciômetro previamente calibrado. O preparo do suco gástrico com laurilsulfato de sódio (LSS) diferencia-se somente na adição de 0,5% p/p desse tensoativo.

O suco entérico simulado (SES) foi preparado, de acordo com a Farmacopéia Americana 30 (USP 30, 2007), dissolvendo-se 6,8 g de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em quantidade suficiente de água para solubilizá-lo. Esta solução foi transferida para balão volumétrico de 1,0 L. Uma solução 0,2 N de hidróxido de sódio (NaOH) foi preparada, e em seguida, 77,0 mL desta solução foram transferidos para o balão. O volume

final foi completado com água destilada. Como o valor final do pH dessa solução deve ser igual a  $6,8 \pm 0,1$ , este parâmetro foi monitorado através de potenciômetro previamente calibrado.

#### 3.2.7.2 Preparo da solução mãe de dapsona

Foi pesada uma quantidade de 25,0 mg de dapsona, teor 96,75% (lote: 02/572 A), e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com metanol. A concentração final dessa solução foi de 250,0  $\mu\text{g/mL}$  (sem correção).

#### 3.2.7.3 Preparo da curva padrão

A curva padrão foi preparada a partir da solução mãe de dapsona. Foram feitas diluições de 1:100, 1:50, 1:25, 3:50, 2:25 e 1:10 com os meios de liberação como diluente, obtendo-se soluções com concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (sem correção).

#### 3.2.7.4 Condições de análise

Os estudos de liberação do fármaco foram realizados em aparelho de dissolução com a haste do aparato tipo cesta. Estas condições de ensaio estão descritas na Farmacopéia Americana, na parte de ensaio geral para a dissolução de cápsulas (USP 30, 2007). Durante o estudo, a temperatura foi mantida a 37°C, e a velocidade a 100 rpm. Cada cuba do dissolutor foi preenchida com 900 mL de meio. Os ensaios foram realizados para a formulação escolhida como ideal, com replicata para cada formulação.

As cápsulas gelatinosas duras foram pesadas, em balança analítica, antes e depois de serem preenchidas pelas microemulsões de dapsona.

Nos ensaios de SGS, SGS + LSS 0,5% p/p e SES, a cápsula contendo microemulsão de dapsona foi adicionada em cada uma das cubas, respeitando um intervalo de 1 minuto entre elas. Alíquotas de 5,0 mL foram recolhidas nos intervalos de 15, 30, 45, 60 e 120 minutos em cada uma das cubas, com reposição de meio. Os ensaios tiveram duração de 120 minutos. As amostras foram filtradas em membrana filtrante 0,45  $\mu\text{m}$  e, então, analisadas por CLAE em comprimento de onda de 295 nm.

### 3.2.7.5 Estudo da cinética de liberação do fármaco

A determinação da cinética de liberação do fármaco é de grande relevância no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, pois ela avalia parâmetros como cristalinidade, tamanho de partícula e solubilidade do fármaco (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002).

Os dados obtidos nos ensaios de perfil de liberação foram expressos em equações que descrevem as cinéticas de liberação do fármaco (figura 8)

|  |
|--|
| Zero ordem: $\%F = a_1 + b_1 \cdot t$                |
| Primeira ordem: $\ln(100 - \%F) = a_2 - b_2 \cdot t$ |
| Higuchi: $Mt/M_\infty = K_H \sqrt{t} + b$            |

**Figura 8: Equações da cinética de liberação do fármaco, sendo %F = percentual de liberação de fármaco; t = tempo (min.);  $a_1$ ,  $a_2$  = interseções ao eixo do y;  $b_1$ ,  $b_2$  = curvaturas das retas; Mt e  $M_\infty$  = quantidade cumulativa absoluta de fármaco liberado no tempo t e no infinito, respectivamente; b = quantidade inicial de fármaco na solução;  $K_H$  = constante de liberação de Higuchi (Adaptada de MANADAS, PINA & VEIGA, 2002).**

O modelo selecionado para o estudo da cinética foi aquele que apresentou maior valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), determinado a partir da análise de regressão linear em Excel®. Os valores de fluxo de liberação ( $J$ ) e tempo de latência da formulação foram calculados utilizando-se a equação da reta.

### 3.2.7.6 Avaliação do comportamento da microemulsão nos meios de liberação

Avaliou-se o comportamento da microemulsão de dapsona nos meios de liberação, suco gástrico e entérico simulados. Um dos objetivos desses ensaios foi verificar se após a dissolução da formulação, as gotículas permanecem na escala nanométrica. O outro foi avaliar a formação de precipitado do fármaco nesses meios.

Em um bécher de 1.000 mL, contendo 900 mL de meio, adicionou-se a microemulsão de dapsona. As condições de ensaio devem simular o que ocorre nos estudos de liberação. Para isso, os bécheres foram colocados sob agitação magnética, a 37°C. Após duas horas, as amostras foram coletadas. Esse tempo de coleta foi escolhido visto que é o tempo máximo do ensaio de liberação. A amostra para avaliação da precipitação do fármaco foi quantificada por CLAE. Ela foi filtrada em membrana filtrante 0,45 µm e analisada em comprimento de onda de 295 nm.

### 3.2.8 Estudo da solução por dispersão do pó de dapsona nos meios de liberação

A análise da solução por dispersão do pó de dapsona foi realizada nos mesmos meios utilizados no estudo de liberação da microemulsão. Este estudo tem a finalidade de avaliar o comportamento do fármaco quando ele não está incorporado na microemulsão e, posteriormente, comparar os resultados com aqueles encontrados para a liberação do fármaco a partir do sistema microemulsionado.

Os meios de dissolução para esse estudo foram preparados de acordo com a Farmacopéia Americana, conforme descrito anteriormente (USP 30, 2007).

#### 3.2.8.1 Preparo da solução mãe de dapsona

Foi pesada uma quantidade de 25,0 mg de dapsona, teor 96,75% (lote: 02/572 A), e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com metanol. A concentração final dessa solução foi de 250,0 µg/mL (sem correção).

### 3.2.8.2 Preparo da curva padrão

A curva padrão foi preparada a partir da solução mãe de dapsona. Foram feitas diluições de 1:100, 1:50, 1:25, 3:50, 2:25 e 1:10 com SGS, SGS + LSS 0,5% ou SES como diluente, obtendo-se soluções com concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 µg/mL, respectivamente (sem correção).

### 3.2.8.3 Condições de análise

Os ensaios da solução por dispersão do pó de dapsona foram realizados em aparelho de dissolução com a haste do aparato tipo pá. Estas condições de ensaio estão descritas na Farmacopéia Americana, na parte de ensaio geral para dissolução de pós (USP 30, 2007). Durante o estudo, a temperatura foi mantida a 37°C, e a velocidade a 100 rpm. Cada cuba do dissolutor foi preenchida com 900 mL de meio.

A quantidade de pó de dapsona adicionado nas cubas, contendo os meios, foi equivalente àquela contida na cápsula de microemulsão de dapsona. As alíquotas foram recolhidas nos intervalos de 5 e 120 minutos, em cada uma das cubas, com reposição de meio. Esses tempos de recolhimento no início e no fim do estudo foram estabelecidos dessa forma, pois esses ensaios foram realizados com o objetivo de comparação. As amostras foram filtradas em membrana filtrante 0,45 µm e, então analisadas por CLAE em comprimento de onda de 295 nm.

## 3.2.9 Estudo de permeação do fármaco em células Caco-2

O modelo de cultura de células Caco-2, extraídas do adenocarcinoma humano, é comumente utilizado nos estudos de absorção gastrointestinal de fármacos orais, sendo bastante relevante no processo de desenvolvimento de formulações farmacêuticas (BALIMANE, CHONG & MORRISON, 2000).

### 3.2.9.1 Cultivo das células Caco-2

O cultivo das células Caco-2 foi realizado em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino e com 100 UI/mL de Penicilina-Estreptomicina. Estas células foram armazenadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup>, incubados a 37°C, atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% UR (ANNAERT *et al.*, 1998).

### 3.2.9.2 Cultivo das células nas placas para ensaio de permeabilidade

Para a formação da monocamada celular, as células foram repicadas, razão 1:7, a cada três dias, e transferidas para placas contendo filtros de membrana (0,3 µm/6,5 mm) a uma densidade de 50.000 células/filtro. A permeabilidade dos fármacos através das monocamadas celulares foi avaliada no intervalo de 14 a 21 dias após a semeadura das células (ANNAERT *et al.*, 1998).

### 3.2.9.3 Preparo do meio de transporte

O meio de transporte utilizado para as diluições da formulação foi o tampão fosfato (0,1M) pH a  $7,2 \pm 0,1$ . Esse tampão foi preparado dissolvendo-se 13,6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em um balão volumétrico de 1.000 mL, que foi avolumado com água destilada. Como o valor final do pH dessa solução deve ser igual a  $7,2 \pm 0,1$ , este parâmetro foi monitorado através de potenciômetro previamente calibrado.

### 3.2.9.4 Preparo da solução mãe de dapsona

Foi pesada uma quantidade de 25,0 mg de dapsona, teor 96,75% (lote: 02/572 A), e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com metanol. A concentração final dessa solução foi de 250,0 µg/mL (sem correção).

### 3.2.9.5 Preparo da curva padrão

A curva padrão foi preparada a partir da solução mãe de dapsona. Foram feitas diluições de 1:100, 1:50, 1:25, 3:50, 2:25 e 1:10 com tampão fosfato (0,1M) pH 7,2, obtendo-se soluções com concentrações de 0,25; 0,50; 2,5 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (sem correção).

### 3.2.9.6 Condições de análise

Primeiramente, as monocamadas celulares foram rinsadas duas vezes com o meio de transporte e pré-incubadas por 30 minutos a 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% UR (ANNAERT *et al.*, 1998). Depois, foi realizada a medida da resistência elétrica transeptelial (RET) das monocamadas celulares. Esta medida é importante, pois avalia a integridade das células, consideradas íntegras quando apresentam voltagem acima de  $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (ANNAERT *et al.*, 1998).

Um volume de 200  $\mu\text{L}$  da formulação, de uma solução contendo 14,0  $\mu\text{g/mL}$  do fármaco, foi adicionado no compartimento doador, contendo as monocamadas celulares. No compartimento receptor, adicionou-se 400  $\mu\text{L}$  do meio de transporte. Nos intervalos de 30 min., 1 h, 2 h, 4 h e 6 h, amostras de 100  $\mu\text{L}$  foram coletadas no meio receptor. Houve reposição de meio.

No fim do ensaio, foram coletadas amostras no compartimento doador. A medida da RET das monocamadas celulares foi realizada, novamente, para confirmar a integridade das células. Outra forma de controle da integridade celular foi realizada por meio da verificação do transporte paracelular do marcador fluoresceína sódica, 4,0 mg/L. A passagem da fluoresceína foi realizada durante uma hora, após o último tempo de coleta, adicionando-se a solução do marcador no lado apical das células. A análise foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda a 490 nm (ANNAERT *et al.*, 1998; BALIMANE, CHONG & MORRISON, 2000).

As amostras coletadas foram filtradas em membrana filtrante 0,45  $\mu\text{m}$  e, então, analisadas por CLAE em comprimento de onda a 295 nm.

### **3.2.10 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey), utilizando o software Prisma 5.0®.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização do fármaco

#### 4.1.1 Faixa de fusão

A determinação da faixa de fusão da dapsona está representada na tabela 7. Os ensaios foram realizados em triplicata, e considerou-se a média desses resultados.

**Tabela 7: Determinação da faixa de fusão da dapsona. As análises foram feitas em replicata (rep.), e obteve-se a média.**

| <b>Amostra</b> | <b>Faixa de fusão</b>  |
|----------------|------------------------|
| Rep. 1         | 183,1 – 183,7°C        |
| Rep. 2         | 182,6 – 183,0°C        |
| Rep. 3         | 183,8 – 184,3°C        |
| <b>Média</b>   | <b>183,2 – 183,7°C</b> |

Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), a faixa de fusão da dapsona deve estar entre 175°C a 181°C. De acordo com Borka (1991), a dapsona apresenta duas formas polimórficas, com pontos de fusão próximos à 180°C, e à 175°C. A média da faixa de fusão obtida das replicatas foi igual a 183,2 - 183,7°C, próxima aos valores indicados na literatura, indicando ausência de impurezas e estabilidade (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### 4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho

As análises de espectroscopia de IV do fármaco foram realizadas em triplicata, e não foram observadas diferenças entre elas. Um desses espectros está representado na figura 9. Na figura 10 está representado o espectro da dapsona grau farmacêutico (USP), que foi utilizado como parâmetro de comparação.

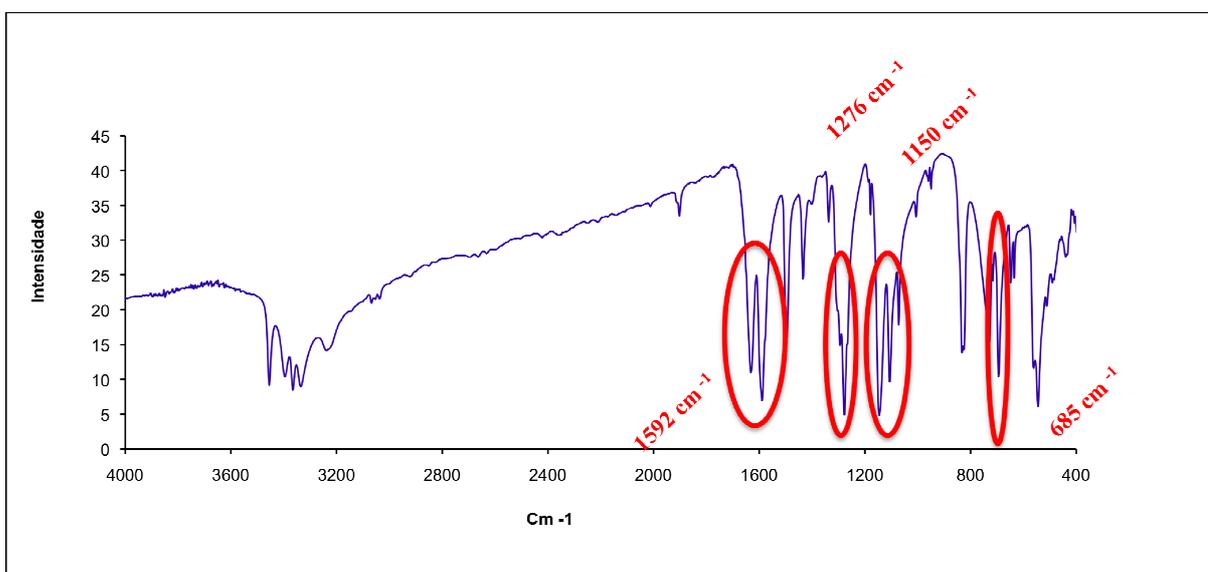


Figura 9: Espectro de infravermelho da dapsona.

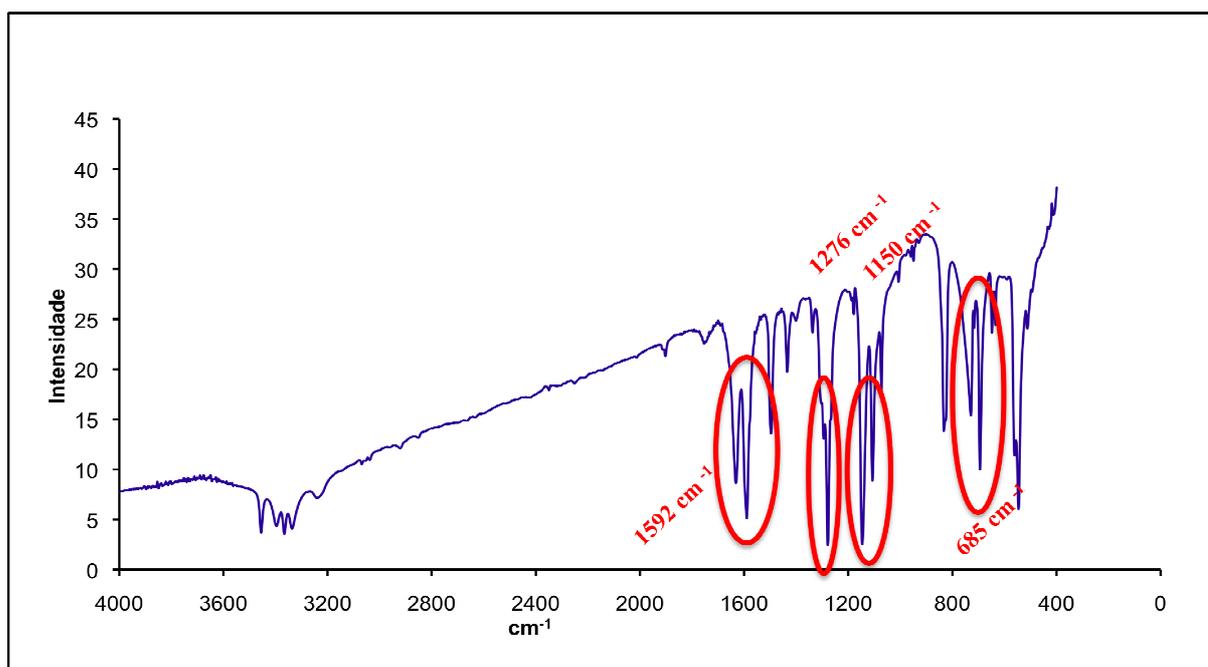


Figura 10: Espectro de infravermelho do padrão de dapsona.

A importância da espectroscopia por IV deve-se à caracterização das substâncias, através da identificação dos seus principais grupamentos funcionais. No espectro demonstrado na figura 9, a dapsona pode ser identificada pela presença de bandas intensas e características, de suas principais ligações químicas. O espectro de IV da matéria-prima de dapsona se apresentou bastante semelhante ao espectro da dapsona grau farmacêutico.

As vibrações de deformação axial atribuídas à ligação C-S ocorreram em  $685\text{ cm}^{-1}$ , apresentando-se dentro dos parâmetros desejados, já que de acordo com a literatura essa banda deve ocorrer entre  $700$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ . O grupo  $\text{SO}_2$ , característico da classe das sulfonas, apresenta banda de absorção intensa entre  $1160$  e  $1120\text{ cm}^{-1}$ , originada da deformação axial simétrica. No espectro, ele está representado em  $1150\text{ cm}^{-1}$ . O grupamento amino foi identificado pela presença da banda em  $1276\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de C-N, que devem ocorrer entre  $1342$ - $1266\text{ cm}^{-1}$ . As deformações axiais das ligações C-C do anel aromático estão representadas em  $1592\text{ cm}^{-1}$ , ou seja, dentro dos parâmetros, pois a literatura cita vibrações de esqueleto em  $1600$ - $1585\text{ cm}^{-1}$  e em  $1500$ - $1400\text{ cm}^{-1}$  (MOFFAT *et al.*, 1986; SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2007).

## 4.2 Preparo das formulações

### 4.2.1 Seleção dos componentes

As formulações de microemulsão de dapsona foram desenvolvidas de acordo com Nandi e colaboradores (2003). Além da composição utilizada por estes pesquisadores, outros componentes foram selecionados para o desenvolvimento das microemulsões. Para essa seleção, consideraram-se aqueles já conhecidos por sua aplicação em outros sistemas de liberação de fármaco e que apresentavam baixo potencial de toxicidade (NANDI, BARI & JOSHI, 2003; NORNOO *et al.*, 2009).

A escolha do óleo e dos tensoativos é um ponto crítico da formulação, pois ela influencia na formação ou não de uma microemulsão, no tamanho de gotícula do sistema e na solubilidade do fármaco (NORNOO *et al.*, 2009).

O componente de fase oleosa, Miristato de Isopropila, empregado por Nandi e colaboradores (2003), foi mantido para as microemulsões de dapsona. Esse óleo tem sido utilizado com sucesso em diferentes trabalhos científicos que abordam as microemulsões como sistemas de liberação de fármacos. De acordo com a literatura, o Miristato de Isopropila pode ser empregado em microemulsões A/O ou O/A (NANDI, BARI & JOSHI, 2003; YUAN *et al.*, 2006; PADULA, NICOLI & ZANTI, 2009; BADAWI, *et al.*, 2009).

Os tensoativos podem causar danos às membranas biológicas e, conseqüentemente, a perda da integridade celular. O Tween® 80, Tween® 40, Span® 80 e Span® 20 foram selecionados para o desenvolvimento das microemulsões, visto que são classificados como tensoativos não-iônicos, os quais apresentam um perfil menos tóxico quando comparado aos tensoativos iônicos (REGE, KAO & POLLI, 2002; WARISNOICHAROEN, LANSLEY & LAWRENCE, 2003).

Tensoativos de peso molecular menor que 1.500 g/mol (tabela 8), frequentemente, apresentam-se mais tóxicos, devido à maior probabilidade em atravessar as membranas celulares (WARISNOICHAROEN, LANSLEY & LAWRENCE, 2003). Os tensoativos não-iônicos descritos acima apresentam peso molecular menor que o valor estabelecido, no entanto, de acordo com a OMS, a ingestão diária aceitável para esses tipos de tensoativos é de 25 mg/kg de peso corporal (WADE & WELLER, 1994).

**Tabela 8: Tensoativos e seus respectivos pesos moleculares, determinados em g/mol (Adaptada de WADE & WELLER, 1994).**

| Tensoativo | Peso molecular (g/mol) |
|------------|------------------------|
| Tween® 20  | 1.128                  |
| Tween® 40  | 1.284                  |
| Tween® 80  | 1.310                  |
| Span® 20   | 346                    |
| Span® 80   | 429                    |

Os cossolventes são muito utilizados em sistemas microemulsionados, pois em alguns casos o uso somente de tensoativos não é capaz de diminuir, de maneira eficiente, a tensão interfacial entre o óleo e a água. Os cossolventes podem, também, reduzir a quantidade necessária de tensoativos na formulação (LAWRENCE & REES, 2000; YUAN *et al.*, 2006). Alcoóis de cadeia pequena, entre 2 a 10 carbonos, e de natureza anfifílica, como o Isobutanol ( $C_4H_{10}O$ ) e o Propilenoglicol ( $C_3H_8O_2$ ), são muito utilizados como cossolventes, pois são capazes de tornar o solvente polar menos hidrofílico (NORNOO, OSBORNE & CHOW, 2007).

#### 4.2.2 Obtenção das formulações

##### 4.2.2.1 Isobutanol

As formulações A, B e C, nas quais se utilizou o isobutanol como cossolvente, apresentaram-se límpidas e pouco viscosas, características essenciais das microemulsões (KOGAN & GARTI, 2006). Para confirmar o resultado, essas formulações, feitas em triplicata, foram caracterizadas quanto ao tamanho de gotícula e índice de refração (quadro 2; tabela 9).

| Formulação | Distribuição do tamanho de gotícula |             |             |               |              |
|------------|-------------------------------------|-------------|-------------|---------------|--------------|
|            | Rep. 1 (nm)                         | Rep. 2 (nm) | Rep. 3 (nm) | Desvio-padrão | Média (nm)   |
| <b>A</b>   | 8,8                                 | 8,3         | 5,9         | 1,550         | <b>7,7</b>   |
| <b>B</b>   | 7,6                                 | 7,9         | 6,2         | 0,907         | <b>7,2</b>   |
| <b>C</b>   | 122,7                               | 111,3       | 182,9       | 38,472        | <b>139,0</b> |

**Quadro 2: Determinação do tamanho de gotícula das formulações A, B e C, contendo isobutanol como co-solvente. Essas formulações foram realizadas em replicata (rep.), considerou-se a média.**

**Tabela 9: Determinação do índice de refração da água, do miristato de isopropila e das formulações A, B e C.**

| Formulação              | Medida do índice de refração |
|-------------------------|------------------------------|
| Água                    | 1,325                        |
| Miristato de Isopropila | 1,434                        |
| A                       | 1,435                        |
| B                       | 1,441                        |
| C                       | 1,433                        |

A partir dos resultados obtidos para as formulações A, B e C, observou-se que elas são classificadas como microemulsões, pois apresentaram média de tamanho de gotícula entre 7,2 a 139,0 nm (quadro 2). As formulações A e B apresentaram reprodutibilidade no tamanho das gotículas, visto que os seus valores de desvio-padrão foram pequenos. Já a formulação C apresentou valor elevado de desvio-padrão.

A faixa de tamanho de gotículas que uma formulação deve estar para ser classificada como microemulsão é uma questão muito discutida. Essa discussão não se restringe apenas às microemulsões, ela se estende às formulações farmacêuticas nanoestruturadas, em geral. De

acordo com Yuan e colaboradores (2007) e Rossi e colaboradores (2007) as microemulsões devem apresentar diâmetro de gotículas até 100 nm. Junping e colaboradores (2002) e Date & Nagarsenker (2008), no entanto, descrevem que o tamanho de gotícula até 150 nm é aceitável. Talegaonkar e colaboradores (2008) consideram a faixa de tamanho ideal até 200 nm.

Neste trabalho consideraremos o valor do diâmetro das gotículas até 200 nm, pois de acordo com a literatura científica normalmente a nanomedicina refere-se a esta faixa de tamanho como a mais aceitável (SINGH & LILLARD, 2009).

O miristato de isopropila e a água possuem valores de índices de refração iguais a 1,434 e 1,325, respectivamente, e caracterizam-se pela sua transparência. Os valores de IR obtidos para as formulações A, B e C, foram iguais a 1,435, 1,441 e 1,433 (tabela 9). De acordo com esses resultados, observou-se a maior semelhança das formulações com o IR da fase oleosa. Para caracterizar uma microemulsão como A/O ou O/A, é necessário análises mais conclusivas, como a da condutividade elétrica.

As formulações D e E apresentaram-se turvas e viscosas. Houve modificação de 20,5% p/p (1:1) para 18,55% e 22,55% p/p (0,90:1,10) nas proporções de mistura de tensoativos utilizadas nessas formulações. A turbidez e a alta viscosidade dessas formulações provavelmente estão relacionadas à proporção inadequada dos componentes. Como essas características não são representativas dos sistemas microemulsionados, esses experimentos não foram continuados (KOGAN & GARTI, 2006).

O efeito da agitação com ultrassom foi avaliado para a formulação A, visto que ela já tinha sido caracterizada por Nandi e colaboradores (2003) como um sistema microemulsionado.

Os resultados de tamanho de gotícula encontrados para a agitação com ultrassom em amplitudes de 50% e 100%, por 15 minutos cada, estão representados no quadro 3, e os valores de índice de refração, na tabela 10.

| Formulação A            | Distribuição do tamanho de gotícula |             |             |               |            |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|---------------|------------|
|                         | Rep. 1 (nm)                         | Rep. 2 (nm) | Rep. 3 (nm) | Desvio-padrão | Média (nm) |
| Sem efeito do ultrassom | 8,8                                 | 8,3         | 5,9         | 1,550         | 7,7        |
| 50% de amplitude        | 106,2                               | 8,0         | 115,8       | 59,660        | 76,7       |
| 100% de amplitude       | 8,2                                 | 6,9         | 25,1        | 10,153        | 13,4       |

**Quadro 3: Determinação do tamanho de gotícula da formulação A sem o efeito do ultrassom; com ultrassom em 50% e 100% de amplitude. Essas formulações foram realizadas em replicatas (rep.), considerou-se a média.**

**Tabela 10: Determinação do índice de refração da água, do miristato de isopropila e das formulações A sem o efeito do ultrassom e com ultrassom em 50% e 100% de amplitude.**

| Formulação              | Medida do índice de refração |
|-------------------------|------------------------------|
| Água                    | 1,325                        |
| Miristato de Isopropila | 1,434                        |
| A                       | 1,435                        |
| A – 50% de amplitude    | 1,443                        |
| A – 100% de amplitude   | 1,490                        |

Os diâmetros das gotículas encontrados para as formulações que foram submetidas ao ultrassom em 50% de amplitude foram iguais a 106,2; 8,0 e 115,8 nm, e o desvio-padrão, 59,660. Para as formulações submetidas ao ultrassom em 100%, os tamanhos foram de 8,2; 6,9 e 25,1 nm, e o desvio-padrão, 10,153. Comparadas à formulação A, as formulações que foram submetidas ao efeito do ultrassom não apresentaram homogeneidade entre suas replicatas. Os valores de desvio-padrão das formulações em 50% e 100% de amplitude foram

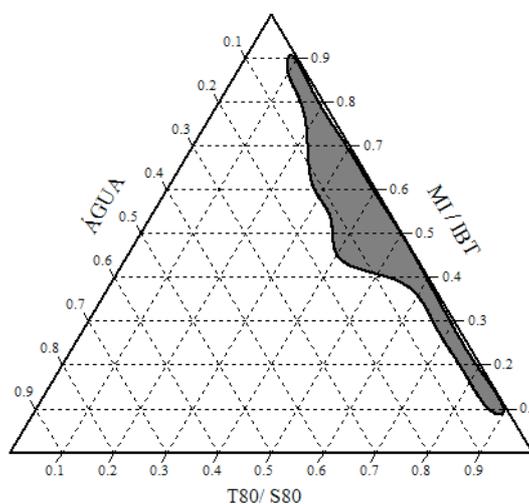
quase 40 e 7 vezes maiores, respectivamente, que o desvio encontrado para a formulação A (quadro 3).

As formulações A sem efeito do ultrassom, e com este efeito em 50 e 100% de amplitude apresentaram valores de IR iguais a 1,435; 1,443 e 1,490, respectivamente (tabela 10). O aumento da amplitude do ultrassom teve como consequência o aumento do IR das amostras. Mesmo com esse aumento, essas formulações apresentaram maior semelhança com o IR da fase oleosa (1,434) do que com o da água (1,325).

De acordo com Dziubla e colaboradores (2001), a agitação com ultrassom auxilia no processo de homogeneização na formação dos polímeros. Ela tem sido empregada no preparo das microemulsões, a fim de favorecer tanto a homogeneização, quanto a uniformidade de distribuição de tamanho de gotículas. A alta velocidade de agitação do processo de ultrassom, no entanto, pode acarretar na aglomeração das partículas/gotículas durante o armazenamento do produto (WISSING, KAYSER & MULLER, 2004). Outro inconveniente deste processo foi observado por Myamoto e colaboradores (1999), que avaliaram o efeito do tempo no preparo de emulsões. O tamanho das partículas era reduzido, à medida que o tempo de agitação com ultrassom aumentava, porém alguns resultados encontrados não apresentaram reprodutibilidade.

Os resultados de distribuição do tamanho de gotícula e índices de refração das formulações A, B e C que utilizaram o isobutanol como cossolvente mostraram-se promissores para a veiculação tópica de dapsona. Por esse motivo, com o objetivo de definir corretamente as proporções de cada componente, o diagrama pseudoternário de fases foi construído, uma vez que essas formulações foram propostas com base na literatura científica.

Os experimentos com a formulação A não foram continuados, visto que ela foi preparada como um parâmetro de comparação para as outras formulações, pois já havia sido descrita em literatura. Entre as formulações B e C, a primeira foi escolhida para a construção do diagrama de fases, pelo fato de apresentar menor tamanho das gotículas e maior reprodutibilidade. Os componentes utilizados foram: miristato de isopropila, água, isobutanol, Tween® 80 e Span® 80 (figura 11).



**Figura 11: Diagrama pseudoternário de fases, utilizando como componentes o miristato de isopropila (MI), o isobutanol (IBT), o Tween® 80 (T80), o Span®80 (S80) e a água. A área demarcada em cinza escuro representa a área de microemulsão.**

A formulação capaz de incorporar maior quantidade de água foi escolhida, pois a água auxilia no processo de diluição e previne a precipitação do fármaco (NORNOO *et al.*, 2009). De acordo com os dados obtidos a partir do diagrama pseudoternário de fases, a formulação com essa característica está representada na tabela 11.

**Tabela 11: Formulação, com isobutanol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases.**

| Composição              | Proporção (% p/p) |
|-------------------------|-------------------|
| Miristato de isopropila | 38,40             |
| Isobutanol              | 4,80              |
| Tween® 80               | 21,62             |
| Span® 80                | 21,62             |
| Água                    | 13,49             |

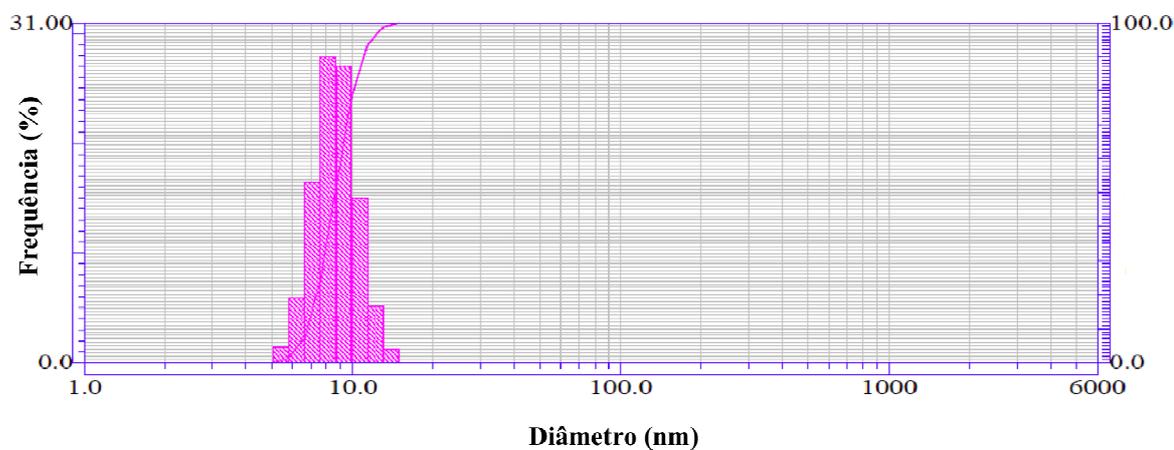
#### 4.2.2.1.1 Caracterização da formulação

Para confirmar a formação do sistema microemulsionado, a formulação contendo isobutanol, obtida a partir do diagrama, foi caracterizada quanto ao tamanho de gotícula

(quadro 4) e medida do índice de refração. As análises de distribuição de tamanho de gotículas foram realizadas em triplicata (quadro 4). Um dos gráficos obtidos está representado na figura 12.

| Formulação | Distribuição do tamanho de gotícula |             |             |               |            |
|------------|-------------------------------------|-------------|-------------|---------------|------------|
|            | Rep. 1 (nm)                         | Rep. 2 (nm) | Rep. 3 (nm) | Desvio-padrão | Média (nm) |
|            | 6,9                                 | 6,8         | 8,8         | 1,13          | 7,5        |

**Quadro 4:** Determinação do tamanho de gotícula da formulação com isobutanol obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases. Essa formulação foi realizada em replicatas (rep.), considerou-se a média.



**Figura 12:** Gráfico de distribuição de tamanho de gotículas da formulação com isobutanol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases. Essa formulação apresentou diâmetro de gotícula igual a 8,8 nm.

A partir dos resultados de diâmetro de gotículas, observou-se que a formulação contendo isobutanol pode ser classificada como microemulsão, pois apresentou média de tamanho de gotícula igual 7,5 nm (quadro 4). De acordo com a figura 12, observa-se uma distribuição do tipo gaussiana ou normal (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Essa formulação apresentou reprodutibilidade no tamanho das gotículas, visto que o seu valor de desvio-padrão foi pequeno. O IR da amostra foi igual a 1,441, mostrando-se mais semelhante à fase oleosa (IR = 1,434), do que à água (IR=1,325). A medida da condutividade elétrica confirmará o tipo de estrutura desta microemulsão.

Os efeitos tóxicos do etanol são bastante estudados, no entanto outros alcoóis alifáticos de cadeia curta, como o isobutanol, também apresentam toxicidade para as membranas. Eles podem causar o rompimento da barreira lipídica e, conseqüentemente, alterar a integridade da membrana e a sua função (MCKARNS, *et al.*, 1997).

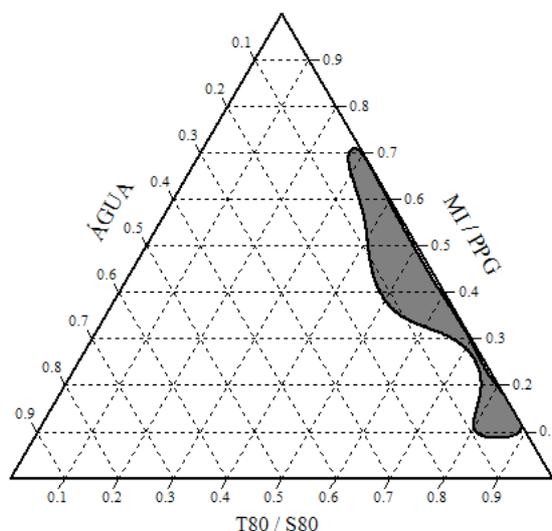
Esta formulação contendo isobutanol apresenta-se interessante para administração tópica. A utilização do isobutanol em formulações farmacêuticas orais não está descrita em literatura científica, enquanto que o seu uso tópico é bem mais difundido. Segundo Araújo e colaboradores (2010), o isobutanol pode ser utilizado como promotor de permeação em filmes bioadesivos contendo benzocaína, na proporção de 0,2% p/p. Padula e colaboradores (2009) empregaram o isobutanol como cossolvente em microemulsão de levotiroxina para administração tópica, proporção de 4,5% (p/p). Os sinais de toxicidade oral aguda incluem: lentidão, lacrimejamento, respiração lenta, prostração e sangue na urina (CRISTOPHER, 1993).

#### 4.2.2.2 Propilenoglicol

As formulações F, G e H, nas quais foram utilizadas o propilenoglicol como cossolvente, apresentaram-se turvas e viscosas. Como a proporção dos componentes utilizados para essas formulações foi baseada em uma formulação descrita na literatura, provavelmente este comportamento está relacionado às proporções inadequadas de um ou mais componentes. Além disso, a formulação da literatura utilizou o isobutanol, ou seja, houve troca de cossolvente. Sugere-se, neste caso, a construção do diagrama de fases, para que, assim, as proporções sejam definidas corretamente (NORNOO *et al.*, 2009).

A seleção da mistura de tensoativos, Tween® 80: Span® 80 (1:1), empregada na construção do diagrama de fases foi a mesma utilizada para a formulação com isobutanol,

para que posteriormente elas fossem comparadas. Os componentes utilizados para a construção do diagrama foram: miristato de isopropila, água, propilenoglicol, Tween® 80 e Span® 80 (figura 13).



**Figura 13: Diagrama pseudoternário de fases, utilizando como componentes o miristato de isopropila (MI), o propilenoglicol (PPG), o Tween® 80 (T80), o Span® 80 (S80) e a água. A área demarcada em cinza escuro representa a área de microemulsão.**

De acordo com os dados obtidos a partir da construção do diagrama pseudoternário de fases, a formulação, contendo propilenoglicol, capaz de incorporar maior quantidade de água está representada na tabela 12. A formulação com maior quantidade de água foi escolhida pelos mesmos motivos explicados anteriormente para o isobutanol.

**Tabela 12: Formulação, com propilenoglicol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases.**

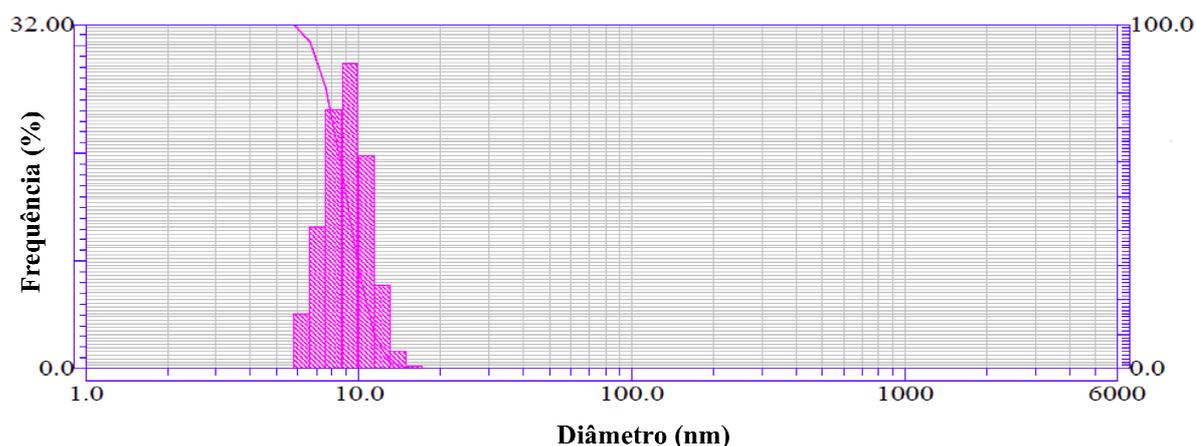
| Composição              | Proporção (% p/p) |
|-------------------------|-------------------|
| Miristato de isopropila | 31,64             |
| Propilenoglicol         | 3,95              |
| Tween® 80               | 26,69             |
| Span® 80                | 26,69             |
| Água                    | 11,03             |

#### 4.2.2.2.1 Caracterização da formulação

As análises de distribuição de tamanho de gotículas da formulação contendo propilenoglicol foram realizadas em triplicata (quadro 5). Estes resultados, junto com o índice de refração, são importantes para confirmar a formação do sistema microemulsionado. Na figura 14 está representado o gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da formulação de uma das replicatas.

| Formulação | Distribuição do tamanho de gotícula |             |             |               |             |
|------------|-------------------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
|            | Rep. 1 (nm)                         | Rep. 2 (nm) | Rep. 3 (nm) | Desvio-padrão | Média (nm)  |
|            | 11,0                                | 9,1         | 9,9         | 0,95          | <b>10,0</b> |

**Quadro 5: Determinação do tamanho de gotícula da formulação com propilenoglicol a partir do diagrama pseudoternário de fases. Essa formulação foi realizada em replicatas (rep.), considerou-se a média.**



**Figura 14: Gráfico de distribuição de tamanho de gotículas da formulação com propilenoglicol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases. Essa formulação apresentou diâmetro de gotícula igual a 9,1 nm.**

A partir dos resultados de diâmetro de gotículas obtidos para a formulação com propilenoglicol, observou-se que ela pode ser classificada como microemulsão, pois

apresentou média de tamanho de gotícula igual 10,0 (quadro 5). De acordo com a figura 15, observa-se uma distribuição do tipo gaussiana ou normal (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Essa formulação apresentou reprodutibilidade no tamanho das gotículas, visto que o seu valor de desvio-padrão foi pequeno. O IR da amostra foi igual a 1,445, mostrando-se mais semelhante à fase oleosa (IR = 1,434), do que à água (IR=1,325).

A formulação com propilenoglicol mostra-se promissora para a veiculação oral de dapsona. O emprego do propilenoglicol em formulações farmacêuticas orais é bastante comum na literatura científica. Yang e colaboradores (2004) utilizaram esse excipiente no preparo de micromeulsão de paclitaxel, enquanto que Sharma e colaboradores (2010) o utilizaram em formulações orais de insulina.

#### 4.2.2.2 Avaliação do efeito da agitação com ultrassom

O efeito da agitação com ultrassom na microemulsão contendo propilenoglicol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases, foi avaliado. Existem relatos na literatura científica dos efeitos benéficos deste processo quando empregado em microemulsões, como a uniformidade da distribuição do tamanho de gotículas (DZIUBLA, *et al.*, 2001). O efeito do ultrassom, em 50 e 100% de amplitude por 15 minutos, da microemulsão com isobutanol, entretanto não mostrou resultados positivos, visto que os valores do diâmetro das gotículas aumentaram consideravelmente e não houve homogeneidade entre suas replicatas.

Os resultados de tamanho de gotículas encontrados para as formulações com propilenoglicol com amplitudes em 50% e 100% foram iguais a 3,23  $\mu\text{m}$  e 3,72  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Quanto ao aspecto visual, elas se apresentaram completamente turvas. Como demonstrado no quadro 5, a média do diâmetro das gotículas dessa mesma formulação, que não foi submetida ao efeito do ultrassom, foi próxima a 10,0 nm, e com aspecto visual característico de microemulsão, ou seja, límpido e de baixa viscosidade. Dessa forma, conclui-se que a aplicação do ultrassom nessa formulação também não apresentou resultados satisfatórios.

Assim como foi justificado para a formulação com isobutanol, o aumento do tamanho de gotículas das microemulsões que são submetidas à agitação com ultrassom pode estar relacionado à aglomeração delas, pois a alta velocidade de agitação facilita esse processo (WISSING, KAYSER & MULLER, 2004).

O efeito da agitação com ultrassom na formulação contendo propilenoglicol, mas com 20% acima da quantidade de água da formulação do diagrama, também foi observado. O objetivo foi avaliar se um sistema, considerado emulsão, que não se encontra estabelecido na área de microemulsão do diagrama, pode tornar-se microemulsionado.

Os resultados de tamanho de gotículas encontrados para a emulsão de propilenoglicol foi igual a 7,1 nm. Quando agitadas em 50% e 100% de amplitude, durante 15 minutos, os diâmetros foram iguais a 7,5 nm e 7,9 nm, respectivamente. Essas formulações, submetidas ou não ao processo de ultrassom, apresentaram-se turvas e instáveis, já que houve separação de fases duas horas após o preparo. Embora os tamanhos estejam na escala nanométrica, a turbidez e a instabilidade desses sistemas não as caracterizam como microemulsão (KOGAN & GARTI, 2006). Como o aparelho de distribuição de tamanho de gotículas possui resolução máxima de 6,0  $\mu\text{m}$ , possivelmente esses sistemas apresentaram um tamanho de gotícula maior do que o aparelho é capaz de analisar.

#### 4.2.3 Solubilização do fármaco

A solubilidade é definida pela capacidade máxima do soluto se dissolver em um solvente específico (AMIDON *et al.*, 1995). De acordo com a Farmacopéia Brasileira, a solubilidade das substâncias pode ser descrita em termos do número de partes do volume de solvente necessário para dissolver um grama de um determinado sólido, ou um mililitro de um líquido (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

A solubilidade da dapsona foi avaliada nas duas formulações obtidas a partir do diagrama pseudoternário de fases. Conforme já descrito, elas diferenciam-se no cossolvente empregado, isobutanol e propilenoglicol, e na finalidade, sendo destinadas para o uso tópico e oral, respectivamente.

A concentração máxima de dapsona solúvel nas formulações com propilenoglicol e com isobutanol foi igual a 3,0% p/p, o que corresponde a 30,0 mg do fármaco, em cada 1,0 g de formulação. Através da observação do comportamento dessas formulações, no entanto, notou-se que a precipitação do fármaco ocorria em menos de 24 horas após o seu preparo.

O comportamento das formulações contendo 2,0 e 2,5% p/p de dapsona foi avaliado por oito semanas. Essas formulações mantiveram suas características iniciais, ou seja, não houve precipitação do fármaco nem separação de fases da formulação. Além disso, as microemulsões conservaram-se límpidas e pouco viscosas.

Os resultados de distribuição do tamanho de gotículas, índice de refração e condutividade, foram realizados para as microemulsões contendo 2,5% p/p de dapsona (quadros 6 e 7, tabelas 13 e 14). Estas análises são importantes, pois avaliam se a incorporação da dapsona nas formulações acarretou modificação no tamanho das gotículas e na estrutura da formulação.

| Formulação com<br>2,5% p/p | Distribuição do tamanho de gotícula |             |             |               |             |
|----------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
|                            | Rep. 1 (nm)                         | Rep. 2 (nm) | Rep. 3 (nm) | Desvio-padrão | Média (nm)  |
| Fase oleosa                | 6,8                                 | 8,6         | 8,75        | 1,08          | <b>8,05</b> |
| Formulação pronta          | 8,1                                 | 9,3         | 7,8         | 0,79          | <b>8.4</b>  |

**Quadro 6: Determinação da distribuição do tamanho de gotícula da formulação com isobutanol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases. O fármaco foi solubilizado tanto na fase oleosa quanto na formulação pronta. As análises foram realizadas em replicatas (rep.), e consideraram-se as médias.**

| Formulação com<br>2,5% p/p | Distribuição do tamanho de gotícula |             |             |               |             |
|----------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
|                            | Rep. 1 (nm)                         | Rep. 2 (nm) | Rep. 3 (nm) | Desvio-padrão | Média (nm)  |
| Fase oleosa                | 10,1                                | 9,2         | 6,7         | 1,76          | <b>8,67</b> |
| Formulação pronta          | 8,8                                 | 10,4        | 9,4         | 0,81          | <b>9,54</b> |

**Quadro 7: Determinação da distribuição do tamanho de gotícula da formulação com propilenoglicol, obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases. O fármaco foi solubilizado tanto na fase oleosa quanto na formulação pronta. As análises foram realizadas em replicatas (rep.), e consideraram-se as médias.**

**Tabela 13: Determinação do índice de refração da água, do miristato de isopropila e das formulações com propilenoglicol (PPG) e isobutanol (IBT), obtidas a partir do diagrama pseudoternário de fases.**

| Formulação              | Medida do índice de refração |
|-------------------------|------------------------------|
| Água                    | 1,325                        |
| Miristato de Isopropila | 1,434                        |
| PPG - sem fármaco       | 1,447                        |
| PPG - 2,5% p/p dapsona  | 1,452                        |
| IBT – sem fármaco       | 1,441                        |
| IBT – 2,5% p/p dapsona  | 1,449                        |

**Tabela 14: Determinação da condutividade elétrica da água, do miristato de isopropila e das formulações com propilenoglicol (PPG) e isobutanol (IBT), obtidas a partir do diagrama pseudoternário de fases.**

| Formulação              | Medida da condutividade elétrica ( $\mu\text{S/cm}$ ) |
|-------------------------|---|
| Água                    | próxima de 3,0  |
| Miristato de Isopropila | 0,0   |
| PPG - sem fármaco       | 0,0   |
| PPG - 2,5% p/p dapsona  | 0,0   |
| IBT – sem fármaco       | 0,0   |
| IBT – 2,5% p/p dapsona  | 0,0   |

A solubilização de 2,5% p/p da dapsona nas microemulsões, com isobutanol e propilenoglicol, seja na fase oleosa, seja na formulação pronta, não ocasionou diferenças nos tamanhos das gotículas, comparados a essas mesmas formulações sem a incorporação do fármaco (quadros 4 e 5).

Os índices de refração das formulações com isobutanol e propilenoglicol foram 1,441 e 1,447, respectivamente. Com a adição da dapsona, esses valores aumentaram para 1,449 e 1,452. Comparadas aos valores de IR da água e do óleo, as formulações com dapsona continuaram apresentando maior semelhança ao IR do miristato de isopropila (tabela 13).

De acordo com as medidas de condutividade, observou-se que a incorporação do fármaco não provocou uma inversão de fases das microemulsões. Todas as formulações apresentaram-se como A/O, já que seus valores de condutividade elétrica foram iguais à condutividade da fase oleosa, confirmando os resultados previstos pela medida de IR.

O paclitaxel é um quimioterápico que, assim como a dapsona, apresenta baixa solubilidade aquosa e alta lipofilicidade, o que resulta em problemas de biodisponibilidade. (DATE & NAGARSENKER, 2008). As microemulsões de paclitaxel são muito descritas na literatura científica como sistemas capazes de aumentar a solubilidade dessa substância (GURSOY *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2004; NORNOO, OSBORNE & CHOW, 2007;

NORNOO, 2009). Embora seja mais comum em literatura encontrar fármacos lipofílicos incorporados em microemulsões do tipo O/A, Nornoo e colaboradores (2007) desenvolveram a microemulsão de paclitaxel A/O, a qual apresentou um aumento na eficácia clínica do fármaco (NORNOO, OSBORNE & CHOW, 2007).

De acordo com os resultados de solubilidade e aparente estabilidade, a máxima concentração de dapsona solúvel nas microemulsões é de 2,5% p/p, ou seja, em cada 1,0 g de formulação há 25,0 mg do fármaco. Como a dapsona está sendo veiculada em um sistema capaz de melhorar a biodisponibilidade do fármaco, caso os estudos de liberação e permeação apresentem resultados satisfatórios, possivelmente a sua dose poderá ser reduzida (NANDI *et al.*, 2003).

O tratamento da hanseníase é feito por administração oral de comprimidos, e a posologia habitual de dapsona é de 50 a 100 mg ao dia (KATZUNG, 2005). No mercado farmacêutico existe um medicamento contendo dapsona destinado para uso tópico, o Aczone®. Ele é um gel que contém 5,0% do fármaco. A sua indicação, no entanto, destina-se para o tratamento da acne vulgar (WOZEL, 2010). Não existe formulação tópica de dapsona para o tratamento das lesões dos pacientes com hanseníase.

#### **4.3 Estudo de estabilidade acelerado**

A formulação com propilenoglicol selecionada para o estudo de estabilidade acelerado foi aquela obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases: miristato de isopropila (31,64%), propilenoglicol (3,95%), Tween® 80 (26,69%), Span® 80 (26,69%), e água (11,03%), todos na proporção p/p. Conforme observado no estudo de solubilidade, a maior concentração do fármaco capaz de se solubilizar nessa formulação, sem ocorrer precipitação, foi 2,5% p/p. As formulações de propilenoglicol com 2,5% p/p de dapsona, solubilizada na fase oleosa e na formulação pronta, foram colocadas em estabilidade, assim como aquelas contendo 2,0% p/p do fármaco, solubilizado, também, de ambas as formas. Elas foram nomeadas de I a IV (tabela 15).

**Tabela 15: Formulações classificadas de I a IV, contendo propilenoglicol como cossolvente. As concentrações 2,0 ou 2,5% p/p de dapsona foram solubilizadas na fase oleosa (FO) ou na formulação pronta (FP).**

| Formulação | Concentração de dapsona<br>(% p/p) | Forma de solubilização |
|------------|------------------------------------|------------------------|
| I          | 2,0                                | FO                     |
| II         | 2,0                                | FP                     |
| III        | 2,5                                | FO                     |
| IV         | 2,5                                | FP                     |

A formulação com isobutanol selecionada para o estudo de estabilidade acelerado foi aquela obtida a partir do diagrama pseudoternário de fases: miristato de isopropila (38,40%), isobutanol (4,80%), Tween® 80 (21,62%), Span® 80 (21,62%) e água (13,49%), todos na proporção p/p. Assim como as formulações com propilenoglicol, para estas formulações, a maior concentração de dapsona solubilizada, sem apresentar precipitação do fármaco, foi 2,5% p/p. Foram colocadas em estabilidade as formulações com 2,5% e 2,0% p/p de dapsona, solubilizada na fase oleosa e na formulação pronta (tabela 16).

**Tabela 16: Formulações classificadas de V a VIII, contendo isobutanol como cossolvente. As concentrações 2,0 ou 2,5% p/p de dapsona foram solubilizadas na fase oleosa (FO) ou na formulação pronta (FP).**

| Formulação | Concentração de dapsona(%<br>p/p) | Forma de solubilização |
|------------|-----------------------------------|------------------------|
| V          | 2,0                               | FO                     |
| VI         | 2,0                               | FP                     |
| VII        | 2,5                               | FO                     |
| VIII       | 2,5                               | FP                     |

Antes de armazenar as formulações em condições forçadas de temperatura e umidade, elas foram caracterizadas quanto à distribuição do tamanho de gotículas, condutividade, teor e índice de refração (tabela 17). Essa caracterização inicial foi importante, pois serviu como

parâmetro para os resultados obtidos no fim do estudo de estabilidade. O tempo inicial foi denominado tempo zero.

**Tabela 17: Caracterização das formulações I a VIII no tempo zero. Determinação do tamanho de gotícula (nm), índice de refração, condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e quantificação do fármaco (%).**

| Formulação | Tamanho de gotícula (nm) | Índice de refração | Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) | Quantificação do fármaco (%) |
|------------|--------------------------|--------------------|---|------------------------------|
| I          | 11,0                     | 1,450              | 0,0                                       | 102,09                       |
| II         | 9,7                      | 1,450              | 0,0                                       | 103,50                       |
| III        | 7,4                      | 1,451              | 0,0                                       | 106,27                       |
| IV         | 6,3                      | 1,451              | 0,0                                       | 106,90                       |
| V          | 9,2                      | 1,445              | 0,0                                       | 105,94                       |
| VI         | 9,05                     | 1,442              | 0,0                                       | 107,36                       |
| VII        | 8,6                      | 1,450              | 0,0                                       | 105,15                       |
| VIII       | 8,75                     | 1,443              | 0,0                                       | 103,79                       |

No tempo zero, os tamanhos de gotículas das formulações I a VIII variaram entre 6,3 a 11,0 nm, apresentando-se conforme os parâmetros de microemulsão. Os índices de refração das amostras variaram entre 1,442 a 1,451 e mostraram maior semelhança ao índice do miristato de isopropila (1,434) que ao da água (1,325), o que indica maior similaridade das formulações com a fase oleosa do sistema. De acordo com os resultados de condutividade, as formulações foram classificadas como A/O, pois elas apresentaram condutividade igual a 0,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , assim como a fase oleosa. O miristato de isopropila possui a condutividade igual a 0,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , enquanto que a condutividade elétrica da água é em torno de 3,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Os IR e a medida de condutividade elétrica se complementam na determinação da estrutura das microemulsões.

A quantificação da dapsona nas formulações variou de 102,09 a 107,36% de teor. Segundo a Farmacopéia Americana os comprimidos de dapsona devem conter não menos que 92,5% e não mais que 107,5% de dapsona (USP 30, 2007). Como não existe especificação

farmacopeica para microemulsão de dapsona, esses valores foram utilizados como parâmetro de teor. Dessa forma, as formulações estão de acordo com o especificado.

Os resultados de tamanho de gotícula obtidos durante o estudo de estabilidade acelerado estão representados na tabela 18. As formulações foram analisadas nos tempos zero, 15, 30, 60 e 90 dias. As leituras das amostras foram realizadas em duplicata, e os valores abaixo correspondem às médias.

**Tabela 18: Determinação da distribuição do tamanho de gotícula das formulações I a VIII. As leituras foram realizadas em duplicata, e os valores obtidos correspondem às médias.**

| <b>Formulação</b> | <b>Tempo zero<br/>(nm)</b> | <b>15 dias<br/>(nm)</b> | <b>30 dias<br/>(nm)</b> | <b>60 dias<br/>(nm)</b> | <b>90 dias<br/>(nm)</b> |
|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>I</b>          | 11,0                       | 8,3                     | 6,95                    | 7,2                     | 10,55                   |
| <b>II</b>         | 9,7                        | 10,6                    | 11,05                   | 11,95                   | 7,1                     |
| <b>III</b>        | 7,4                        | 8,75                    | 983,8                   | 3.649,35                | 10,75                   |
| <b>IV</b>         | 6,3                        | 7,5                     | 9,55                    | 7,25                    | 8,65                    |
| <b>V</b>          | 9,2                        | 10,25                   | 11,45                   | 11,1                    | 11,85                   |
| <b>VI</b>         | 9,05                       | 9,1                     | 11,15                   | 9,4                     | 7,85                    |
| <b>VII</b>        | 8,6                        | 10,1                    | 1.927,15                | 11,175                  | 8,05                    |
| <b>VIII</b>       | 8,75                       | 8,05                    | 11,2                    | 6,45                    | 10,15                   |

No tempo zero, as formulações apresentaram tamanhos de gotículas entre 6,3 a 11,0 nm. Depois de 90 dias, em condições forçadas de umidade e temperatura, os diâmetros das gotículas variaram entre 7,1 a 11,85 nm. A formulação III, quando analisadas em 30 e 60 dias, e a formulação VII, em 30 dias, no entanto, apresentaram diâmetro muito acima do encontrado para as outras formulações. Ambas contêm 2,5% p/p de dapsona, solubilizada na fase oleosa. Elas se diferenciam em relação aos co-solventes, a III contém propilenoglicol e a VII, isobutanol, e nas proporções dos outros componentes. O aumento do diâmetro das gotículas possivelmente está relacionado à aglomeração dessas gotículas. Ao longo do estudo, entretanto, houve processo de reversão das gotículas para a escala nanométrica, já que os dados demonstram que elas voltaram a apresentar tamanhos nanométricos.

Os valores de índices de refração das formulações foram avaliados no início do estudo, tempo zero; e, ao término, 90 dias, conforme representado na tabela 19. As formulações não foram caracterizadas quanto ao IR, ao longo do estudo, visto que estes resultados são utilizados apenas como complementação às medidas de condutividade elétrica.

**Tabela 19: Determinação dos valores de índice de refração das formulações no tempo zero e após 90 dias do estudo de estabilidade.**

| Formulação | Tempo zero | 90 dias |
|------------|------------|---------|
| I          | 1,450      | 1,452   |
| II         | 1,450      | 1,454   |
| III        | 1,451      | 1,451   |
| IV         | 1,451      | 1,452   |
| V          | 1,445      | 1,445   |
| VI         | 1,442      | 1,444   |
| VII        | 1,450      | 1,450   |
| VIII       | 1,443      | 1,444   |

No tempo zero, os índices de refração variaram entre 1,442 a 1,451 e, após 90 dias de estudo, os valores estavam entre 1,444 a 1,454. A variação dos valores de IR no início e no fim do estudo foi pequena. Os resultados obtidos demonstram que todas as formulações se apresentaram mais semelhantes à fase oleosa das microemulsões, indicando que esta é a fase externa do sistema, ou seja, uma estrutura A/O. Este resultado, porém, só pode ser confirmado após os resultados de condutividade. Além disso, a medida do IR das formulações é importante, pois avalia a estabilidade dos sistemas microemulsionados, já que ela está ligada à clareza ótica desses sistemas (KAMILA, *et al.*, 2009).

As medidas de condutividade das formulações foram realizadas a fim de avaliar uma possível inversão de fases, ou seja, uma microemulsão caracterizada como O/A, durante o seu armazenamento pode tornar-se A/O e vice-versa. As leituras foram feitas em duplicata, e os valores obtidos correspondem às médias (tabela 20).

**Tabela 20: Determinação da condutividade das formulações I a VIII. As leituras foram realizadas em duplicata, e os valores abaixo correspondem às médias.**

| <b>Formulação</b> | <b>Tempo zero</b><br>( $\mu\text{S/cm}$ ) | <b>15 dias</b><br>( $\mu\text{S/cm}$ ) | <b>30 dias</b><br>( $\mu\text{S/cm}$ ) | <b>60 dias</b><br>( $\mu\text{S/cm}$ ) | <b>90 dias</b><br>( $\mu\text{S/cm}$ ) |
|-------------------|---|--|--|--|--|
| <b>I</b>          | 0,0                                       | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    |
| <b>II</b>         | 0,0                                       | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    |
| <b>III</b>        | 0,0                                       | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    |
| <b>IV</b>         | 0,0                                       | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    |
| <b>V</b>          | 0,0                                       | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    |
| <b>VI</b>         | 0,0                                       | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    | 0,0                                    |
| <b>VII</b>        | 0,0                                       | 0,1                                    | 0,1                                    | 0,1                                    | 0,0                                    |
| <b>VIII</b>       | 0,0                                       | 0,1                                    | 0,1                                    | 0,1                                    | 0,0                                    |

As condutividades das formulações mantiveram-se iguais a 0,0  $\mu\text{S/cm}$ , com exceção das formulações VII e VIII, que houve modificação de 0,0  $\mu\text{S/cm}$  para 0,1  $\mu\text{S/cm}$ , nos tempos de 15, 30 e 60 dias. As análises em 90 dias de estabilidade, no entanto, não apresentaram esta variação. Estas alterações nas formulações VII e VIII não são significativas para a classificação da estrutura das microemulsões, visto que, mesmo apresentando o valor de 0,1  $\mu\text{S/cm}$ , elas são classificadas como A/O, pois a condutividade do miristato de isopropila é 0,0  $\mu\text{S/cm}$ , enquanto que o da água destilada é próxima de 3,0  $\mu\text{S/cm}$ .

As leituras de quantificação da dapsona nas formulações, realizadas por CLAE, foram realizadas em triplicata. Essa quantificação é importante, pois avalia, ao longo do tempo do estudo de estabilidade, o decaimento do teor do fármaco nas formulações. Os valores de dapsona encontrados na tabela 21 correspondem às médias obtidas.

**Tabela 21: Quantificação da dapsona nas formulações I a VIII verificadas primeiramente no tempo inicial e após serem colocadas em condições forçadas de temperatura e umidade, foram verificadas em 15, 30, 60 e 90 dias. Avaliou-se o decaimento do teor do fármaco através da comparação de teor da dapsona no tempo inicial e no tempo final, 90 dias. Os valores de teor obtidos correspondem às médias.**

| <b>Formulação</b> | <b>Tempo zero (%)</b> | <b>15 dias (%)</b> | <b>30 dias (%)</b> | <b>60 dias (%)</b> | <b>90 dias (%)</b> | <b>Decaimento do teor (%)</b> |
|-------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|
| <b>I</b>          | 102,09                | 97,43              | 97,47              | 95,04              | 89,15              | 13,75                         |
| <b>II</b>         | 103,50                | 99,44              | 98,70              | 96,76              | 89,10              | 14,40                         |
| <b>III</b>        | 106,27                | 101,16             | 96,70              | 94,92              | 91,61              | 14,66                         |
| <b>IV</b>         | 106,90                | 99,76              | 101,02             | 95,92              | 91,94              | 14,96                         |
| <b>V</b>          | 105,94                | 99,52              | 99,18              | 93,39              | 93,06              | 12,88                         |
| <b>VI</b>         | 107,36                | 98,85              | 98,52              | 95,94              | 93,16              | 14,20                         |
| <b>VII</b>        | 105,15                | 102,25             | 100,75             | 95,52              | 115,80             | 9,63                          |
| <b>VIII</b>       | 103,79                | 88,05              | 96,07              | 99,81              | 93,12              | 10,67                         |

O decaimento do teor de dapsona nas formulações teve uma variação de 10,67 a 14,96% p/p de dapsona, comparando o valor inicial e o final. A formulação VII apresentou um valor aberrante na análise realizada 90 dias após o início do estudo, que, provavelmente, está associado a erro de procedimento ou de análise. Por esse motivo, este valor foi desconsiderado e, especificamente para esta formulação, o decaimento do teor foi calculado pela diferença do resultado em 60 dias e no tempo inicial.

De acordo com a RE nº 01 de 2005, o decaimento aceitável de teor do fármaco é no máximo 10% (ANVISA, 2005). Desconsiderando o valor da formulação VII, na qual não se utilizou os mesmos parâmetros de cálculo, todas as formulações apresentaram um decaimento maior que o valor permitido. A razão disso, entretanto, deve-se ao fato de que como essa formulação ainda está sendo estudada, não há adição de nenhum excipiente farmacêutico que auxilie no aumento da estabilidade, como um conservante ou um antioxidante, por exemplo.

As formulações armazenadas em condições normais de temperatura e umidade, denominadas “formulações de prateleira”, foram comparadas com as suas respectivas amostras, armazenadas em câmara climática. Essa comparação foi realizada nos mesmos tempos determinados para os ensaios de estabilidade acelerados.

De acordo com a observação visual, em 15 e 30 dias após o início do estudo, tanto as formulações dispostas em câmara climática quanto as de prateleira apresentaram o mesmo comportamento, mantiveram-se límpidas, sem nenhum indício de precipitação do fármaco ou separação de fases.

Em 60 dias de ensaio de estabilidade houve formação de precipitado nas formulações de prateleira III, IV, V, VII e VIII, enquanto que as restantes mantiveram-se límpidas. No fim do estudo, em 90 dias, além das formulações que já não tinham se apresentado estáveis, houve precipitação da dapsona na formulação VI, armazenada em prateleira. Das formulações mantidas sem controle de temperatura e umidade, somente a I e a II não apresentaram formação de precipitado.

As diferenças nas condições de armazenamento das formulações podem explicar a variação dos resultados, pois de acordo com a entalpia do sistema ( $\Delta H$ ), o aumento da temperatura aumenta ou diminui a solubilidade dos fármacos. A variação de entalpia é descrita pela quantidade de calor absorvido ou liberado quando o sistema muda o seu estado termodinâmico, isto é quando a dissolução do fármaco ocorre. Normalmente o valor de  $\Delta H$  é positivo, e o processo é denominado endotérmico. Nesses casos, o aumento da temperatura leva ao aumento da solubilidade (AULTON, 2005). Dessa forma as formulações armazenadas em câmara climática podem ter sido favorecidas pelo aumento da temperatura.

#### 4.3.1 Escolha da melhor formulação

A formulação selecionada para os ensaios de liberação e permeação do fármaco foi aquela que demonstrou características importantes para que o produto final possa ser administrado por via oral. Como as formulações de V a VIII contêm isobutanol, elas não são indicadas para a via oral, devido ao perfil tóxico desse solvente, e por isso foram desconsideradas (CRISTOPHER, 1993).

Os diâmetros das gotículas das formulações I, II e IV mantiveram-se uniformes e na escala nanométrica durante o estudo de estabilidade acelerado. O mesmo não aconteceu para a formulação III, a qual não apresentou homogeneidade de distribuição de tamanho de gotícula. A partir da comparação realizada entre as formulações dispostas em câmara climática e

aquelas armazenadas sem controle de temperatura e umidade, a formulação IV não se apresentou estável, houve precipitação do fármaco e, por isso, ela foi desconsiderada.

As formulações I e II apresentaram resultados desejáveis, no entanto, a II foi escolhida para a realização dos estudos de liberação e permeação, visto que, em geral, as formulações que solubilizaram o fármaco na formulação pronta apresentaram melhores resultados.

#### 4.4 Viscosidade

As medidas da viscosidade da formulação II foram realizadas em quatro velocidades diferentes, 6, 12, 30 e 60 rpm, à 25°C. Os valores de viscosidade foram obtidos pela multiplicação da constante ( $k$ ) pelo tempo de escoamento ( $t$ ) e densidade ( $d$ ) da amostra (figura 15). O valor de  $k$  encontra-se estabelecido no manual do aparelho, enquanto que  $t$  e  $d$  correspondem à leitura que o viscosímetro realiza em função da amostra e da velocidade (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Os resultados encontrados estão representados na tabela 22.

$$\eta = k.t.d$$

**Figura 15: Equação da viscosidade, onde  $\eta$  = viscosidade (cP);  $k$  = constante;  $t$  = tempo de escoamento do volume;  $d$  = densidade (Farmacopéia Brasileira, 1988).**

**Tabela 22: Medida da viscosidade da formulação II. Esta análise foi realizada nas velocidades de 6, 12, 30 e 60 rpm. O valor da viscosidade (cP) foi calculado pela multiplicação da constante ( $k$ ) pelo tempo de escoamento ( $t$ ) e densidade ( $d$ ) da amostra.**

| Velocidade (rpm) | $k$ | $t \times d$ | Viscosidade (cP) |
|------------------|-----|--------------|------------------|
| 6                | 10  | 9,5          | 95,0             |
| 12               | 5   | 19           | 95,0             |
| 30               | 2   | 48           | 96,0             |
| 60               | 1   | 96,5         | 96,5             |

Os valores da viscosidade da formulação II foram próximos à 95,0 cP, independente da velocidade empregada no viscosímetro. As microemulsões são sistemas conhecidos pela sua baixa viscosidade, no entanto, a faixa ideal que uma microemulsão deve apresentar não está descrita em literatura científica. Os resultados encontrados foram comparados à viscosidade de fluidos de interesse no meio farmacêutico (tabela 23), observando-se maior semelhança da microemulsão de dapsona com o óleo de oliva, o qual possui viscosidade igual a 84,0 cP (AULTON, 2005).

**Tabela 23: Viscosidade de alguns fluidos de interesse farmacêutico, medida em cP (Adaptada de AULTON, 2005).**

| Fluidos        | Viscosidade (cP) |
|----------------|------------------|
| Clorofórmio    | 0,58             |
| Água           | 1,002            |
| Etanol         | 1,20             |
| Óleo de oliva  | 84,0             |
| Óleo de rícino | 986,0            |
| Glicerina      | 1490,0           |

A viscosidade é importante para a obtenção de informações sobre forma, tamanho e grau de hidratação das micelas (ROSSI *et al.*, 2007). As microemulsões são conhecidas por apresentarem um baixo valor de viscosidade. De modo geral, o aumento da viscosidade tende a diminuir a taxa de liberação do fármaco, por aumentar a rigidez da estrutura das microemulsões (TSAI *et al.*, 2010).

#### **4.5 Estudo de solubilidade da dapsona nos meios de liberação**

Os ensaios de solubilidade da dapsona nos meios de liberação foram realizados em espectrofotometria de UV. As curvas de calibração do fármaco em suco gástrico e entérico simulados foram realizadas em replicata (figuras 16, 17, 18 e 19).

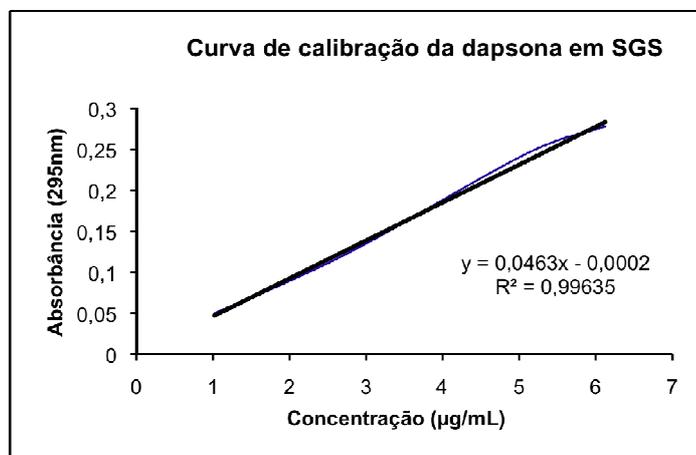


Figura 16: Curva de calibração da dapsona em suco gástrico simulado para a avaliação da solubilidade do fármaco neste meio de dissolução. Esta figura corresponde à primeira replicata.

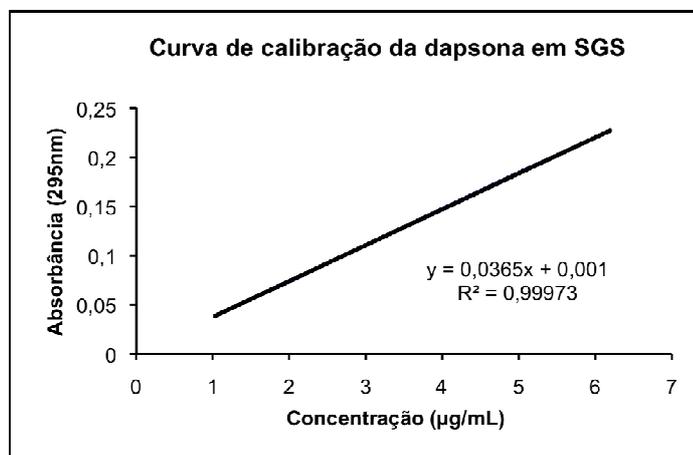


Figura 17: Curva de calibração da dapsona em suco gástrico simulado para a avaliação da solubilidade do fármaco neste meio de dissolução. Esta figura corresponde à segunda replicata.

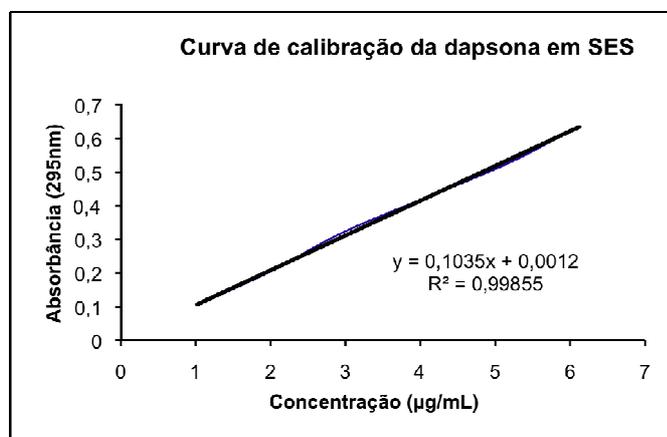


Figura 18: Curva de calibração da dapsona em suco entérico simulado para a avaliação da solubilidade no fármaco neste meio de dissolução. Esta figura corresponde à primeira replicata.

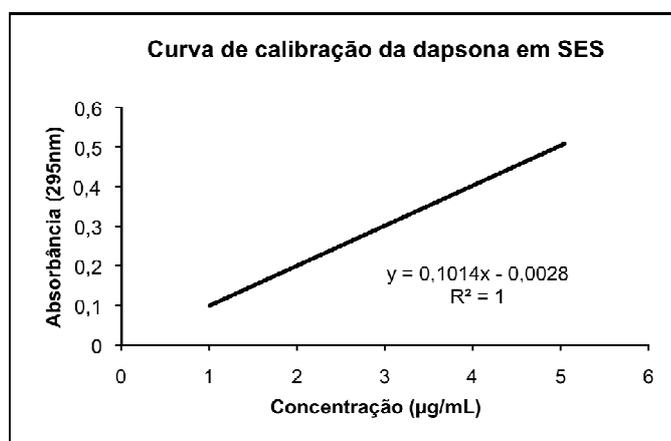


Figura 19: Curva de calibração da dapsona em suco entérico simulado para a avaliação da solubilidade do fármaco neste meio de dissolução. Esta figura corresponde à segunda replicata.

Os valores de solubilidade da dapsona em sucos gástrico e entérico simulados obtidos a partir da equação da reta estão representados na tabela 24.

**Tabela 24: Solubilidade da dapsona em SGS (Suco gástrico simulado) e SES (Suco entérico simulado). Os ensaios foram realizados em replicata e considerou-se a média obtida.**

| Meios      | Solubilidade da dapsona ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                            |                            |
|------------|--|----------------------------|----------------------------|
|            | Rep 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )                   | Rep 2 ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Média ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
| <b>SGS</b> | 2.844,9                                      | 2.471,2                    | <b>2.658,05</b>            |
| <b>SES</b> | 177,9  | 207,9                      | <b>192,9</b>               |

Devido às divergências existentes na literatura quanto ao volume necessário para afirmar que a solução alcança a condição *sink*, considerou-se, para esse cálculo, o maior valor, ou seja, dez vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada. De acordo com os resultados de solubilidade da dapsona nas soluções do estudo de liberação, pode-se afirmar que as condições *sink* foram atingidas.

A partir do valor da média da solubilidade da dapsona em SGS (2.658,05  $\mu\text{g}$  de fármaco em cada 1,0 mL de SGS), considerou-se que cada cápsula de microemulsão de dapsona continha 16,0 mg do fármaco. O volume de meio necessário para solubilizar esta quantidade de fármaco é aproximadamente 6,0 mL, que multiplicado por 10 é igual a 60,0 mL. Como o estudo de liberação é realizado em 900 mL de meio, que é o volume da cuba do aparelho de dissolução, a condição *sink* foi atingida.

A partir do valor da média da solubilidade da dapsona em SES (192,9  $\mu\text{g}$  de fármaco em cada 1,0 mL de SES), considerou-se que cada cápsula de microemulsão de dapsona continha 16,0 mg do fármaco. O volume de meio necessário para solubilizar esta quantidade de fármaco é aproximadamente 82,94 mL, que multiplicado por 10 é igual a 829,4 mL. Como o estudo de liberação é realizado em 900 mL de meio, a condição *sink* foi atingida.

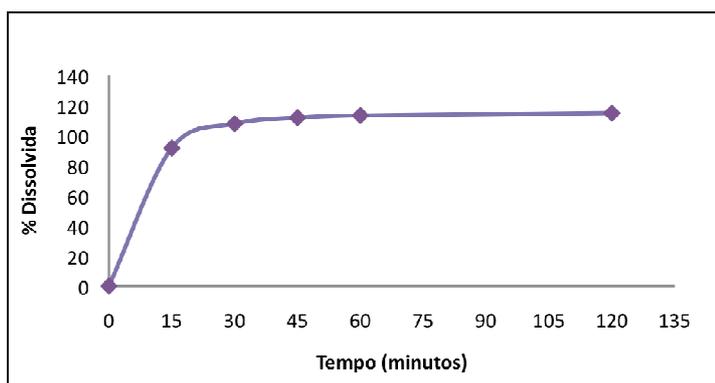
## 4.6 Estudo de liberação do fármaco

### 4.6.1 Estudo de liberação do fármaco em suco gástrico simulado

O perfil de liberação da formulação II foi avaliado em suco gástrico simulado. Os ensaios de liberação, realizados no aparelho de dissolução, foram feitos em replicata, e consideraram-se as médias de cada tempo. As porcentagens da dapsona dissolvidas, os valores de desvio-padrão e desvio-padrão relativo estão representados na tabela 25, e na figura 20.

**Tabela 25: Quantificação da dapsona em suco gástrico simulado. Consideraram-se as médias das cubas.  
DPR = Desvio-padrão relativo.**

| Tempo (min.) | Média (% dissolvido) | Desvio Padrão | DPR (%) |
|--------------|----------------------|---------------|---------|
| 15           | 91,49                | 2,85          | 3,11    |
| 30           | 107,65               | 3,01          | 2,80    |
| 45           | 111,63               | 1,43          | 1,28    |
| 60           | 113,07               | 1,90          | 1,68    |
| 120          | 114,61               | 2,14          | 1,87    |



**Figura 20: Gráfico do perfil de liberação da formulação II em suco gástrico simulado.**

Analisando-se os dados do perfil de liberação da formulação II em suco gástrico observou-se que em 120 minutos de ensaio houve uma liberação próxima de 115% do fármaco, sendo que mais de 90% dessa liberação ocorreu nos primeiros 15 minutos de ensaio.

#### 4.6.2 Estudo de liberação do fármaco em suco gástrico simulado + laurilsulfato de sódio 0,5% (p/p)

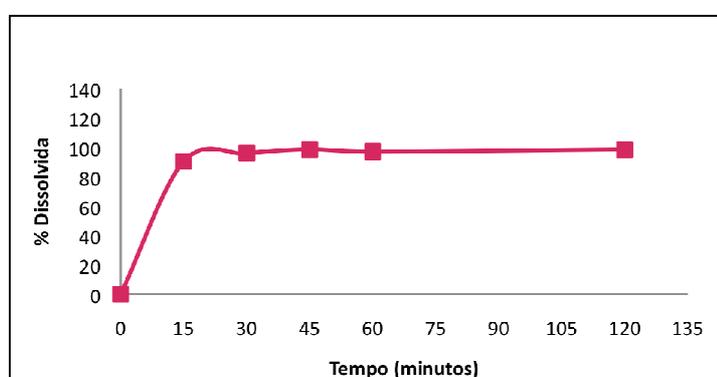
Usualmente os tensoativos são adicionados aos meios de dissolução para aumentar a solubilidade de fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água e, assim, evitar a precipitação desses compostos. Os tensoativos endógenos aumentam o grau de dissolução de fármacos de baixa hidrossolubilidade e auxiliam a solubilização deles no organismo antes de serem absorvidos (SILVA & VOLPATO, 2002; BROWN *et al.*, 2006).

De forma a simular o ambiente *in vivo*, muitas vezes tensoativos sintéticos são adicionados aos meios de dissolução, sua concentração pode variar de 0,5 a 5,0% p/p. A fim de avaliar o efeito do tensoativo no meio de dissolução, selecionou-se para esse estudo o laurilsulfato de sódio a 0,5% (p/p), por ser um dos tensoativos mais utilizados nas monografias da Farmacopéia Americana (USP) (SILVA & VOLPATO, 2002).

O perfil de liberação da formulação II foi avaliado em suco gástrico simulado com a adição de laurilsulfato de sódio. Os ensaios de liberação, realizados no aparelho de dissolução, foram feitos em replicata, e consideraram-se as médias de cada tempo. As porcentagens da dapsona dissolvidas, os valores de desvio-padrão e desvio-padrão relativo estão representados na tabela 26, e na figura 21.

**Tabela 26: Quantificação da dapsona em suco gástrico simulado com laurilssulfato de sódio 0,5% (p/p). Consideraram-se as médias das cubas. DPR = Desvio-padrão relativo.**

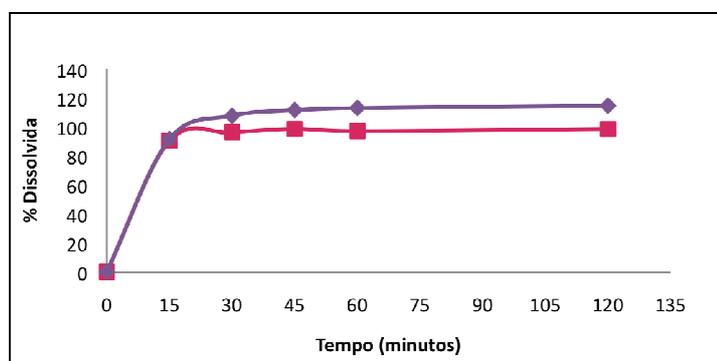
| Tempo (min.) | Média (% dissolvido) | Desvio Padrão | DPR (%) |
|--------------|----------------------|---------------|---------|
| 15           | 90,42                | 6,98          | 7,72    |
| 30           | 96,13                | 6,38          | 6,64    |
| 45           | 98,45                | 2,00          | 2,03    |
| 60           | 97,19                | 1,80          | 1,85    |
| 120          | 98,39                | 0,16          | 0,16    |



**Figura 21: Gráfico do perfil de liberação da formulação II em suco gástrico simulado com laurilssulfato de sódio 0,5% (p/p).**

Os dados obtidos a partir do perfil de liberação da formulação II em suco gástrico simulado + laurilssulfato de sódio 0,5% (p/p) mostraram que mais de 98% do fármaco é liberado no tempo total de ensaio. E assim como o que foi observado no ensaio com suco gástrico sem a adição de tensoativo, a liberação inicial de dapsona foi maior que 90%.

Os dados do perfil de liberação da formulação II em suco gástrico, na ausência e presença de tensoativo, foram plotados em Excel® para a construção de um gráfico de comparação do comportamento da formulação nestes meios (figura 21).



**Figura 22:** Gráfico de comparação do perfil de liberação da formulação II em suco gástrico simulado (representado pela cor lilás) e em suco gástrico simulado com laurilssulfato de sódio 0,5% (p/p) (representado pela cor rosa).

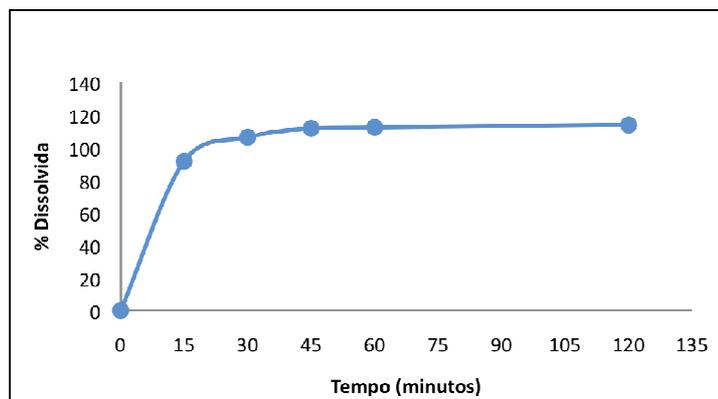
Analisando-se os dados e o gráfico de comparação, observou-se que a adição do laurilssulfato de sódio ao meio não provocou o aumento da liberação do fármaco. De acordo com a análise estatística, os meios de liberação SGS e SGS+LSS apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), sendo que o suco gástrico sem tensoativo apresentou-se melhor.

#### 4.6.3 Estudo de liberação em suco entérico simulado

O perfil de liberação da formulação II foi avaliado em suco entérico simulado. Os ensaios de liberação, realizados no aparelho de dissolução, foram feitos em replicata, e consideraram-se as médias de cada tempo. As porcentagens da dapsona dissolvidas, os valores 91,51 de desvio-padrão e desvio-padrão relativo estão representados na tabela 27, e na figura 23.

**Tabela 27:** Quantificação da dapsona em suco entérico simulado. Considerou-se as médias das cubas. DPR = Desvio-padrão relativo.

| Tempo (min.) | Média (% dissolvido) | Desvio Padrão | DPR (%) |
|--------------|----------------------|---------------|---------|
| 15           | 91,51                | 5,53          | 6,04    |
| 30           | 106,37               | 3,03          | 2,85    |
| 45           | 111,80               | 2,13          | 1,90    |
| 60           | 112,41               | 1,26          | 1,12    |
| 120          | 113,90               | 1,30          | 1,14    |



**Figura 23: Gráfico do perfil de liberação da formulação II em suco entérico simulado.**

A partir dos ensaios de liberação em suco entérico simulado da formulação II observou-se uma liberação inicial de 91,51% do fármaco, e uma liberação final igual a 113,90%.

Os dados do perfil de liberação da formulação II em suco entérico demonstraram que no tempo total desse ensaio, a liberação do fármaco é próxima de 114%. Da mesma forma que ocorreu em suco gástrico, na ausência e presença de tensoativo, mais de 90% do fármaco é liberado logo no início do ensaio.

As liberações da formulação II nos meios de dissolução serão comparadas aos ensaios de liberação da solução por dispersão do pó de dapsona.

#### 4.6.4 Estudo da cinética de liberação do fármaco

As cinéticas de liberação do fármaco em sucos gástrico e entérico simulados foram realizadas a partir dos dados obtidos no perfil de liberação da formulação II. Estes dados foram aplicados em modelos matemáticos específicos para os cálculos. Os dados obtidos estão representados na tabela 28. Como os resultados de liberação em suco gástrico com laurilsulfato de sódio apresentaram-se piores, o estudo da cinética de liberação do fármaco foi realizado somente para o suco gástrico sem tensoativo.

**Tabela 28: Cinética de liberação da formulação II nos meios suco gástrico simulado (SGS), suco gástrico simulado + laurilssulfato de sódio 0,5% p/p (SGS+LSS 0,5% p/p) e suco entérico simulado (SES), e seus respectivos coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ).**

| Modelo                | Meio de liberação | $R^2$   |
|-----------------------|-------------------|---------|
| <b>Ordem Zero</b>     | SGS               | 0,93134 |
|                       | SES               | 0,82451 |
| <b>Primeira ordem</b> | SGS               | 0,94231 |
|                       | SES               | 0,82273 |
| <b>Higuchi</b>        | SGS               | 0,95441 |
|                       | SES               | 0,86026 |

O modelo de cinética de liberação de Higuchi apresentou melhor adequação com os dados obtidos de acordo com os coeficientes de correlação linear. Nesse modelo a taxa de liberação do fármaco está relacionada com a raiz quadrada do tempo, e o seu mecanismo de liberação dos fármacos é descrito como um processo de difusão baseado na lei de Fick (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002; LOPES, LOBO & COSTA, 2005).

O fluxo de liberação ( $J$ ) foi obtido através do valor de inclinação da reta. Em suco gástrico esse valor foi igual a 2,4146 mg/min., enquanto que em suco entérico ele foi 2,717 mg/min.. Os tempos de latência da formulação foram determinados a partir da equação da reta, sendo igual a 39,24 minutos em SGS e 33,91 minutos em SES.

#### 4.6.5 Avaliação do comportamento da microemulsão nos meios de liberação

O comportamento da formulação II nos meios de liberação foi avaliado, adicionando-a em suco gástrico e entérico simulados por 120 minutos de ensaio. Foram recolhidas alíquotas de cada ensaio para a análise de distribuição do tamanho da gotícula, observação visual, e quantificação do fármaco. Essa avaliação não foi realizada para o meio de suco gástrico simulado com laurilsulfato de sódio, pois a adição de tensoativo não demonstrou vantagens nos ensaios de liberação. Os dados encontrados estão representados na tabela 29.

**Tabela 29: Comportamento da formulação II em sucos gástrico e entérico simulados (SGS e SES) após 2 horas de ensaio de liberação. Avaliou-se a aparência das amostras dissolvidas e o diâmetro das gotículas ( $\mu\text{m}$ ).**

| Meio de liberação | Diâmetro da gotícula ( $\mu\text{m}$ ) | Aparência | Quantificação do fármaco (%) |
|-------------------|--|-----------|------------------------------|
| SGS               | 2,5                                    | Turva     | 92,90                        |
| SES               | 5,5                                    | Turva     | 91,10                        |

Analisando-se os dados de distribuição de tamanho de gotículas, observou-se que a formulação não se mantém na escala nanométrica quando ela é dissolvida nos meios de liberação em estudo. Em suco gástrico simulado o diâmetro da gotícula foi igual a 2,5 $\mu\text{m}$ , enquanto que em suco entérico este valor foi igual a 5,5  $\mu\text{m}$ . A aparência turva deve-se aos componentes oleosos da microemulsão.

As alíquotas da formulação II foram recolhidas e analisadas por CLAE. A formulação apresentou liberação de 92,90% e 91,10%, em sucos gástrico e entérico, respectivamente. Portanto, conclui-se que não ocorre precipitação da dapsona nesses meios, o que confirma os resultados de liberação.

#### **4.7 Estudo da solução por dispersão do pó de dapsona nos meios de liberação**

Os ensaios de liberação realizados com a dispersão do pó de dapsona têm o objetivo de comparar a liberação do fármaco não incorporado em sistema microemulsionado com as microemulsões de dapsona 2,0% - formulação II.

Os tempos de recolhimento das alíquotas foram estabelecidos em 5 e 120 minutos de ensaio. Na tabela 30 estão representados os dados obtidos. Como os ensaios foram realizados em triplicata, consideraram-se as médias.

**Tabela 30: Quantificação da solução por dispersão do pó de dapsona em suco gástrico simulado (SGS), suco gástrico simulado + LSS 0,5% (SGS + LSS 0,5%) e suco entérico simulado (SES). Considerou-se as médias das cubas.**

| Meios          | Tempo (min.) | Média (%<br>dissolvido) | Desvio padrão | DPR (%) |
|----------------|--------------|-------------------------|---------------|---------|
| SGS            | 05           | 27,85                   | 10,95         | 39,32   |
| SGS            | 120          | 76,02                   | 1,17          | 1,54    |
| SGS + LSS 0,5% | 05           | 37,64                   | 5,80          | 15,41   |
| SGS + LSS 0,5% | 120          | 74,43                   | 0,69          | 0,93    |
| SES            | 05           | 5,58                    | 2,86          | 51,25   |
| SES            | 120          | 78,84                   | 1,69          | 2,14    |

Em suco gástrico simulado, a liberação do fármaco no tempo total do ensaio foi igual a 76,02%. Com a adição do laurilsulfato de sódio no meio de liberação, o resultado encontrado foi 74,43%, e em suco entérico essa liberação foi igual a 78,84%.

Os valores de desvio padrão e desvio padrão relativo dos ensaios de liberação por dispersão do pó no tempo de recolhimento em 5 minutos mostraram-se elevados. Isso provavelmente aconteceu devido ao recolhimento da alíquota ser logo após a adição do pó ao meio de liberação, pois os pós podem flutuar sobre o meio, ou ainda flocular-se já que está sendo adicionado ao meio hidrofílico e a dapsona é hidrofóbica.

Comparado aos resultados de liberação da formulação II, a solução por dispersão do pó ao fim do ensaio apresentou uma liberação menor que o resultado encontrado para a microemulsão de dapsona em apenas 15 minutos.

A taxa de dissolução de fármacos de classificação biofarmacêutica II, na maioria das vezes, é um fator limitante para a sua absorção (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002). De acordo com os resultados de liberação obtidos para a formulação II observou-se que a incorporação da dapsona, classificada como fármaco de classe II, em microemulsão demonstrou um aumento significativo na taxa de liberação do fármaco.

#### 4.8 Estudo de permeação do fármaco em células Caco-2

Os ensaios de permeabilidade células Caco-2 é, atualmente, a ferramenta *in vitro* mais utilizada para prever a absorção oral dos fármacos. Essas células apresentam características morfológicas e bioquímicas semelhantes às características das células intestinais humanas (PAIXÃO, GOUVEIA & MORAIS, 2010).

Os dados de permeação da dapsona ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em função do tempo (horas) estão representados na tabela 31 e na figura 24.

Tabela 31: Quantificação da dapsona no estudo de permeação em células Caco-2.

| Tempo (min.) | Fármaco Permeado ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |
|--------------|--|
| 30 min.      | 0,082  |
| 1 hora       | 0,187  |
| 2 horas      | 0,420  |
| 4 horas      | 0,828  |
| 6 horas      | 1,239  |

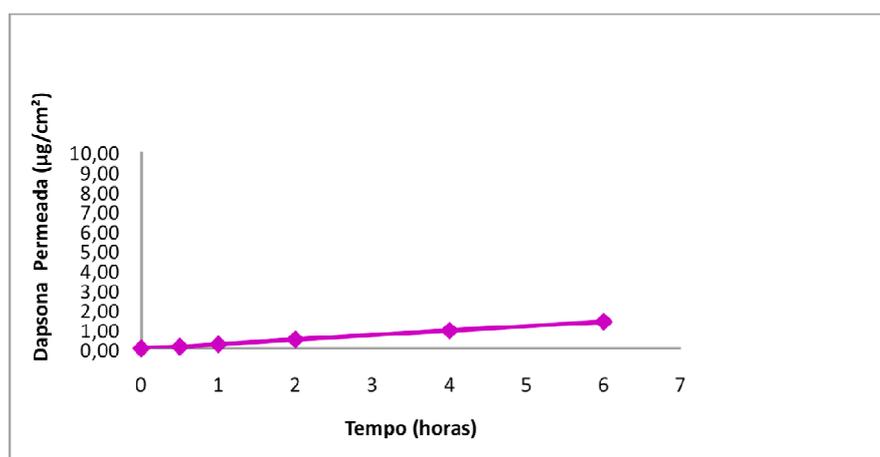


Figura 24: Gráfico de permeação da formulação II em células Caco-2.

O coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) calculado a partir dos dados obtidos no ensaio de permeabilidade foi igual a  $5,05 \times 10^{-6}$  cm/s. Os fármacos que apresentam absorção entre 70 a 100% possuem  $P_{app}$  maior que  $10,0 \times 10^{-6}$  cm/s, os moderadamente absorvidos, são aqueles que apresentam de 20 a 70% de absorção e apresentam valor de  $P_{app}$  de  $1,0$  a  $10,0 \times 10^{-6}$  cm/s. Por fim, os fármacos com  $P_{app}$  menor de  $1,0 \times 10^{-6}$  cm/s são classificados como de baixa permeabilidade. (LAM, XU & NG, 2010). A dapsona pertence à classe biofarmacêutica II, pois possui alta permeabilidade nas membranas biológicas e baixa solubilidade em água (LINDENBERG, KOPP & DRESSMAN, 2004). O valor obtido, no entanto, vai de encontro a tal afirmativa. Desta forma, é necessária a repetição deste ensaio para a obtenção de resultados em triplicata, para confirmar o valor obtido.

Para efeito de comparação, Lam e colaboradores (2010) calcularam o coeficiente de permeabilidade aparente da dapsona, encontrando um valor igual a  $27,9 \times 10^{-6}$  cm/s, o que demonstra boa absorção através da monocamada de Caco-2 (LAM, XU & NG, 2010). De acordo com Paixão e colaboradores (2010), os fármacos antimicrobianos sulfadiazina e sulfametoxazol (figura 25), que são estruturalmente relacionados à dapsona, visto serem aminas que possuem um grupamento sulfona ligado ao anel aromático, apresentam valores de coeficientes de permeabilidade iguais a  $17,78 \times 10^{-6}$  cm/s e  $13,18 \times 10^{-6}$  cm/s, respectivamente.

Embora esses valores sejam utilizados como referências, as variáveis existentes entre diferentes laboratórios devem ser consideradas, pois elas podem apresentar influências na obtenção dos resultados. As condições experimentais e a heterogeneidade das linhagens celulares são alguns exemplos dessas variáveis (PAIXÃO, GOUVEIA & MORAIS, 2010). Esta afirmativa corrobora com a necessidade da realização do ensaio em triplicata.

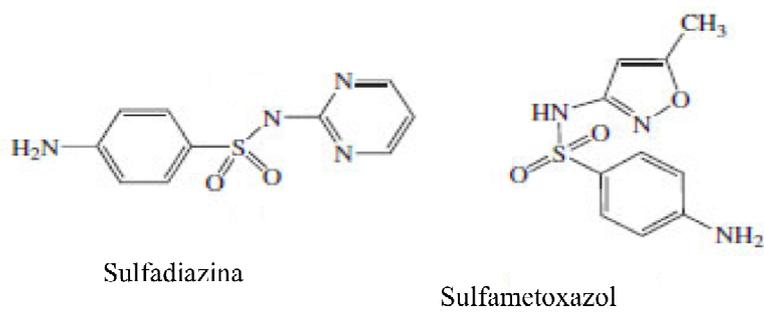


Figura 25: Fórmula estrutural da sulfadiazina e do sulfametoxazol (ROCHA *et al.*, 2011).

## 5 CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver microemulsões de dapsona, utilizando tanto o isobutanol como o propilenoglicol como cossolventes. As microemulsões apresentaram tamanho de gotícula nanométrico, e índice de refração e condutividade que as caracterizaram como sistemas A/O. No ensaio de estabilidade acelerado, no entanto, a maioria das formulações mostrou-se instável. Esse parâmetro pode ser melhorado, pois neste trabalho não houve adição de excipientes capazes de prolongar a estabilidade das formulações farmacêuticas, como conservantes e antioxidantes. A formulação II foi escolhida para os estudos de liberação e permeação do fármaco por apresentar melhores características.

Foram preparadas cápsulas de gelatina dura contendo microemulsão de dapsona para os ensaios de liberação do fármaco em SGS e SES. A liberação do fármaco a partir da formulação II apresentou um aumento considerável na taxa de dissolução, comparado aos ensaios realizados para a solução por dispersão do pó de dapsona. Esta formulação seguiu a cinética de liberação de Higuchi.

As microemulsões de dapsona desenvolvidas podem melhorar os parâmetros de absorção, biodisponibilidade e estabilidade do fármaco, e reduzir seus efeitos adversos, em decorrência da possível diminuição da dose farmacologicamente ativa. Alguns ensaios, portanto, devem ser ainda realizados para confirmação de tais afirmativas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.J.; LAWRENCE, M.J. **Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: II Photon correlation spectroscopy.** *AAPS PharmaSci*, v.2, n. 2, p. 1-10, 2000.

AGRAWAL, S.; AGARWALLA, A. **Dapsone hypersensitivity syndrome: A clinico-epidemiological review.** *Journal of Dermatology*, v. 32, n.11, p. 883-889, 2005.

ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 8ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ALVES, C.J.M.; BARRETO, J.A.; FOGAGNOLO, L.; CONTIN, L.A.; NASSIF, P.W. **Avaliação do grau de incapacidade dos pacientes com diagnóstico de hanseníase em Serviço de Dermatologia do Estado de São Paulo,** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n.4, p. 460-461, 2010.

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.** *Pharm. Res.*, v.12, n.3, p.413-420, 1995.

ANNAERT, P.; GELDER, J.V.; NAESEMS, L.; DE CLERCQ, E.; MOOTER, V.; KINGET, R.; AUGUSTIJNS, P. **Carrier mechanisms involved in the transepithelial transport of bis(POM)-PMEA and its metabolites across Caco-2 monolayers.** *Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 1168-1173, 1998.

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>.

ARAÚJO, D.R.; PADULA, C.; CEREDA, C.M.S.; TÓFOLI, G.R.; BRITO JR., R.B.; PAULA, E.; NICOLI, S.; SANTI, P. **Bioadhesive films containing benzocaine: Correlation between *in vitro* permeation and *in vivo* local anesthetic effect.** *Pharmaceutical Research*, v. 27, p. 1677-1686, 2010.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas.** 2º ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BADAWI, A.A.; NOUR, S.A.; SAKRAN, W.S.; EL-MANCY, S.M.S. **Preparation and evaluation of microemulsion systems containing Salicylic Acid.** *AAPS PharmaSciTech*, v.10, p.1081-1084, 2009.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. **Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption.** *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v.44, p. 301-312, 2000.

BETTOLI, V.; SARNO, O.; ZAULI, S.; BORGHI, A.; MINGHETTI, S.; RICCI, M.; MANTOVANI, L.; TONI, G.; VIRGILI, A. **What's new in acne? New therapeutic approaches.** *Annales de dermatologie*, v. 5, p. 34-38, 2010.

BORKA, L. **Review on crystal polymorphism of substances in the European pharmacopeia.** *Pharm Acta Helv*, v. 66, p. 16-22, 1991.

BROWN, C.K.; CHOKSHI, H.P.; NICKERSON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B.R.; SHAH, P.J. **Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds.** *Pharm. Technol*, p. 56-65, 2004.

CERDEIRA, A.M.; MAZZOTTI, M.; GANDER, B. **Miconazole nanosuspensions: Influence of formulation variables on particle size reduction and physical stability.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 396, p. 210-218, 2010.

COLE, S.T.; EIGIMEIER, K.; PARKHILL, J. **Massive gene decay in the leprosy bacillus.** *Nature*, v. 409, p. 1007-1011, 2001.

COLEMAN, M.D. **Dapsone Toxicity: Some Current Perspectives.** *Gen. Pharmac.*, v. 26, n. 7, p. 1461-1467, 1995.

CRISTOPHER, S.M. **Isobutanol: Acute toxicity and irritancy testing using the rat (peroral and inhalation toxicity) and the rabbit (cutaneous and ocular tests).** *Bushy Run Research Center*, 1993.

CUINÉ, J.F. **Lipid-based oral drug delivery systems to enhance solubility and absorption of poorly water-soluble drugs.** *American Pharmaceutical Review*. 2009.

DATE, A.A.; NAGARSENKER, M.S. **Parenteral microemulsions: an overview.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, p. 19-30, 2008.

DE FREITAS, M.R.G. **Infectious neuropathy.** *Current Opinion in Neurology*, v. 20, p. 548-552, 2007.

DEPS, P.D.; GUEDES, B.V.S.; FILHO, J.B.; ANDREATTA, M.K.; MARCARI, R.S.; RODRIGUES, L.C. **Characteristics of known leprosy contact in a high endemic area in Brazil.** *Leprosy Review*, v. 77, p. 34-40, 2006.

DIXIT, R.P.; NAGARSENKER, M.S.; **Optimized microemulsions and solid microemulsion systems of simvastatin: characterization and *in vivo* evaluation.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 12, p. 4892 – 4902, 2010.

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.

**FARMACOPÉIA BRASILEIRA.** 4<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FEASY, N.F.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D.C.N.; SOLOMON, A.W. **Neglected tropical diseases.** *British Medical Bulletin*, v. 93, p. 179-200, 2009.

GARDNER C.R.; WALSH, C.T.; ALMARSSON, O. **Drugs as materials: Valuing physical form in drug discovery.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 926-934, 2004.

GIL, P.R.; HUHN, D.; DEL MERCATO, L.L.; SASSE, D.; PARAK, W.J. **Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds.** *Pharmacological Research*, v.62, p. 115-125, 2010.

GODDEERIS, C.; CUPPO, F.; REYNAERS, H.; BOUWMAN, W.G.; VAN DEN MOOTER, G. **Light scattering measurements on microemulsions: Estimation of droplet sizes.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 312, p.187-195, 2006.

GURSOY, N. GARRIGUE, J.S.; RAZAFINDRATSITA, A.; LAMBERT, G.; BENITA, S. **Excipient effects on *in vitro* cytotoxicity of a novel paclitaxel self-emulsifying drug delivery system.** *Journal of Pharmaceutics Science*, v.92, p. 2411-2418, 2003.

GURSOY, R.N.; BENITA, S. **Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, p. 173-182, 2004.

HAN, S.; YAO, T.; ZHANG, X.; GAN, L.; ZHU, C.; YU, H.; GAN, Y. **Lipid-based formulations to enhance oral bioavailability of the poorly water-soluble drug anethol trithione: Effects of lipid composition and formulation.** *International Journal of Pharmaceutics*, v.379, p. 18-24, 2009.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 11 ed., 2007.

ILEP. **How to diagnose and treat leprosy.** *Warning guide one*, 2001.

INGRAM, J.R.; GRINDLAY, D.J.C.; WILLIAMS, H.C. **Management of acne vulgaris: an evidence-based update.** *Clinical and Experimental Dermatology*, v.35, p.351-354, 2009.

JACOBSON, R.R.; KRAHENBUHL, J.L. **Leprosy.** *The Lancet*, v.353, p. 653-660, 1999.

JAIN, J.; FERNANDES, C.; PATRAVALE, V. **Formulation development of parenteral phospholipid-based microemulsion of etoposide.** *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 2, p.826-831, 2010.

JUNPING, W.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T.; MAITANI, Y. **Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 251, p. 13-21, 2003.

KAI, M.; MATSUOKA, M.; NAKATA, N.; MAEDA, S.; GIDOH, M.; MAEDA Y.; HASHIMOTO, K.; KOBAYASHI, K.; KASHIWABARA, Y. **Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene.** *FEM Microbiology Letters*, v. 177, p. 231-235, 1999.

KAMILA, M.M.; MONDAL, N.; GUPTA, B.K.; GOSHI, L.K. **Preparation, characterization and in vitro evaluation of Sunflower oil-Tween 80-Glycerol based microemulsion formulation of a BCS class-II drug.** *Latin American Journal of Pharmacy*, v.28, p. 621-627, 2009.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica.** 9 edição, 2005. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan.

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

LAM, K.W.; XU, J.; NG, K.M., **Pharmaceutical salt formation guided by phase diagrams.** *Ind. Chem. Res*, v. 49, p. 12503-12512, 2010.

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

LEBEAU, S.; MULLER, R.; MASOUYÉ, I.; HERTL, M.; BORRADORIT, L. **Pemphigus herpetiformis: analysis of the autoantibody profile during the disease course with changes in the clinical phenotype.** *Clinical and Experimental Dermatology*, v.35, p.366-372, 2009.

LIMPER, A.H.; KNOX K.S.; SAROSI, G.A.; AMPEL, N.M.; BENNETT, J.E.; CATANZARO, A.; DAVIES, S.F.; DISMUKES, W.E.; HAGE, C.A.; MARR, K.A.; MODY, C.H.; PERFECT, J.R.; STEVENS, D.A. **An official american thoracic society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients.** *American Thoracic Society Documents*, v.183, p. 96-128, 2011.

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.

LOBENBERG, R.; AMIDON, G.L. **Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, p. 3-12, 2000.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. **Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, p. 143-154, 2005.

MAEDA, S.; MATSUOKA, M.; NAKATA, N.; KAI, M.; MAEDA, Y.; HASHIMOTO, K.; KIMURA, H.; KOBAYASHI, K.; KASHIWABARA. **Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, p. 3635-3639, 2001.

MANADA, R.; PINA, W.E.; VEIGA, F. **A dissolução *in vitro* na previsão absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, p. 375-399, 2002.

MATSUOKA, M.; BUDIAWAN, T.; AYE, K.S.; KIAW, K.; TAN, E.V.; DELA CRUZ, E.; GELBER, R.; SAUNDERSON, P.; BALAGON, V.; PANNIKAR, V. **The frequency of drug resistance mutations in *Mycobacterium leprae* isolates in untreated and relapsed leprosy patients from Myanmar, Indonésia and the Philippines.** *Leprosy Review*, v.78, p.343-352, 2007.

MATSUOKA, M.; SUZUKI, Y.; GARCIA, I.E.; FAFUTIS-MORRIS, M.; VARGAS-GONZÁLEZ, A.; CARRENOS-MARTINEZ, C.; FUKUSHIMA, Y.; NAKAJIMA, C. **Possible mode of emergence for drug-resistant leprosy is revealed by an analysis of samples from México.** *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v.63, p.412-416, 2010.

MCKARNS, S.C.; HANSCH, C.; CALDWELL, W.S.; MORGAN, W.T.; MOORE, S.K.; DOOLITTLE, D.J. **Correlation between hidrofobicity of short-chain aliphatic alcohol and their ability to alter plasma membrane integrity.** *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 36, p. 62-70, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Políticas de Saúde.** Guia para utilização de medicamentos e imunobiológicos na área de hanseníase, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase, 2002.

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

MOULIK, S.P., PAUL, B.K. **Structure, dynamics and transport properties of microemulsions.** *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 78, p. 99-195, 1998.

MUELLER, E.A.; KOVARIK, J.M.; VAN BREE, J.B.; TETZLOFF, W.; GREVEL, J.; KUTZ, K. **Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation.** *Pharmaceutical Research*, v. 11, p. 301-304, 1994.

MULLER, R.H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. **Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rationale for development and what we can expected for the future.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 3-19, 2001.

MYAMOTO, M.; HIRANO, K.; ICHIKAWA, H.; FUKUMORI, Y.; AKINE, Y.; TOKUUYE, K. **Preparation of gadolinium-containing emulsions stabilized with phosphatidylcholine-surfactant mixtures for neutron-capture therapy.** *Chem. Pharm. Bull.*, v. 47, p. 203-2-8, 1999.

NANDI, I.; BARI, M.; JOSHI, H. **Study of isopropyl myristate micremulsion systems containing cyclodextrins to improve the solubility of two model hydrophobic drugs.** *AAPS PharmaSciTech*, v. 4, p. 1-9, 2003.

NORNOO, A.O.; OSBORNE, D.W.; CHOW, D.S.L. **Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel I: Formulation, citotoxicity and hemolysis.** *International Journal of Pharmaceutics*, v.349, p.108-116, 2007.

NORNOO, A.O.; ZHENG, H.; LOPES, L.B.; RESTREPO, B.J.; KANNAN, K.; REED, R. **Oral microemulsions of paclitaxel: In situ and pharmacokinetic studies.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.71, p. 310-317, 2009.

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.

O'DRISCOLL, C.M.; GRIFFIN, B.T. **Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility – The potential impact of lipid-based formulations.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 617-624, 2008.

PANICKER, L. **Influence of the leprosy drug, dapsone on the model membrane dipalmitoyl phosphatidylethanolamine.** *Thermochimica Acta*, v.447, p.123-130, 2006.

PADULA, C.; NICOLI, S.; ZANTI, P. **Innovative formulations for the delivery of levothyroxine to the skin.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 372, p. 12-16, 2009.

PAIXÃO, P.; GOUVEIA, L.F.; MORAIS, J.A.G. **Prediction of the in vitro permeability determined in Caco-2 cells by using artificial neural networks.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, p. 107-117, 2010.

PANIKER, U.; LEVINE, N. **Dapsone and Sulfapyridine.** *Dermatol Clin.*, v. 19, p. 79-86, 2001.

PARK, K. **Nanotechnology: What it can do for drug delivery?.** *J. Control. Rel.*, v. 120, p. 1-3, 2007.

PENNA, M.L.F.; PENNA, G.O. **Trend of case detection and leprosy elimination in Brazil.** *Tropical Medicine and Leprosy Health*, v.12,p. 647-650,2007.

PETTIT, J.H.; REES, R.J. **Sulphone resistance in leprosy. An experimental and clinical study.** *Lancet*, p. 673-674, 1964.

PIMENTEL, L.F.; JUNIOR, A.T.J.; MOSQUEIRA, V.C.F.; MAGALHAES, N.S.S. **Nanotecnologia aplicada ao tratamento da malaria.** *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas*, v. 43, p. 503-513, 2007.

POKHREL, S.; REIDPATH, D.; ALLOTEY, P. **Social sciences research in neglected tropical diseases 3: Investment in social science research in neglected diseases of poverty: a case study of Bill and Melinda Gates Foundation.** *Health Research Policy and Systems*, v. 9, p. 1-6, 2011.

PORTER, C.J.H.; TREVASKIS, N.L.; CHARMAN, W.N. **Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs.** *Nature Publishing Group*, v. 6, p. 231-248, 2007.

REGE, B.D.; KAO, J.P.Y.; POLLI, J.E. **Effects of ionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers.** *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 16, p. 237-246, 2002.

ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.A.; GUERRA, W.; FONTES, A.P.S.; TAVARES, T.T.; MARZANO, I.M.; MAIS, E.C.P. **Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana.** *Química Nova*, v. 34, p. 111-118, 2011.

ROCO, M.C. **Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine.** *Current Opinion*, v. 14, p. 337-346, 2003.

RODRIGUES, L.S.; MAEDA, E.S.; MOREIRA, M.E.C. **Mycobacterium leprae induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal.** *Cellular Microbiology*, v. 12 (1), p. 42-54, 2009.

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.** *Rev. Univ. Sér. Ci. Exatas e da Terra*, v. 26, n.1-2, p. 45-66, 2007.

SAGO, J.; HALL III, R.P. **Dapsone.** *Dermatologic Therapy*, v.15, p.340-351, 2002.

SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, V. **Nanotech approaches to drug delivery and imaging.** *Drug Discovery Today*, v. 8, p. 1112-1120, 2003.

SASTRY, S.V.; NYSHADHAM, J.R.; FIX, J.A. **Recent technological advances in oral drug delivery – a review.** *PSTT*, v. 3, p. 138-145, 2000.

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 activity.** *Journal of Molecular Modeling*, v. 3, p. 332-337, 1997.

SHARMA, G.; WILSON, K.; VAN DER WALLE, C.F.; SATTAR, N.; PETRIE, J.R.; RAVI KUMAR, M.N.V. **Microemulsions for oral delivery of insulin: Design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 76, p. 159-169, 2010.

SILVA, R.L.; VOLPATO, N.M. **Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.38, p. 163-172, 2002.

SILVERSTEIN, R.M.;WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** Ed. LTC; Rio de Janeiro, 2007. p. 84, 98, 101, 102.

SINGH, R.; LILLARD JR, J.W. **Nanoparticle-based targeted drug delivery.** *Experimental and Molecular Pathology*, v. 86, p. 215-223, 2009.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica.** Ed. Guanabara Koogan, 2009.

TALEGAONKAR, S.; AZEEM, A.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K.; PATHAN, S.A.; KHAN, Z.I. **Microemulsion: a novel approach to enhanced drug delivery.** *Recent Patentes on Drug Delivery & Formulation*, v.2, p. 238-257, 2008.

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

The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. **Nanoscience and Nanotechnologies**. p. 1-116, 2004. Disponível em [www.nanotc.org.uk](http://www.nanotc.org.uk). Acesso em 14 de Janeiro de 2011.

TSAI, Y.H.; HSIEH, Y.H.; HUANG, Y.B.; CHANG, J.S.; HUANG, C.T.; WU, P.C. **Microemulsions for intravesical delivery of gemcitabine**. *Chem. Pharm. Bull.* V. 11, p. 1461-1465, 2010.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). 30<sup>a</sup> Ed. Rockivalle: U.S.P. Convention, 2007.

WADE, A.; WELLER, P.J. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 2<sup>o</sup> ed., p. 375-378; 473-476, 1994.

WARISNOICHAROEN, W.; LANSLEY, A.B.; LAWRENCE, M.J. **Toxicological evaluation od mixtures of nonionic surfactants, alone and in combination with oil**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 92, p. 859-868, 2003.

WILLIAMS, D.L.; SPRING, L.; HARRIS, E.; ROCHE, P.; GILLIS, T.P. **Dihydropteroate Synthase of *Mycobacterium leprae* and Dapsone Resistance**. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, v. 44, p. 1530-1537, 2000.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MULLER, R.H. **Solid lipid nanoparticles for parenteral delivery**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

WHO, World Health Organization, **Global Leprosy Situation, beginning of 2008**, v. 83, p.293 – 300, 2009.

WOZEL, V.E.G. **Innovative use of dapsone**. *Dermatol Clin*, v.28, p.599-610, 2010.

WU, C.Y.; BENET, L.Z. **Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/ Absorption/ Elimination interplay and development of a biopharmaceutical drug disposition classification system.** *Pharmaceutical Research*, v. 22, p. 11-23, 2005.

YANG, S.; GURSOY, R.N.; LAMBERT, G.; BENITA, S. **Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self-microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P-glycoprotein inhibitors.** *Pharmaceutical Research*, v. 21, p. 261-270, 2004.

YUAN, Y.; LI, S.; MO, F.; ZHONG, D. **Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam.** *International Journal of Pharmaceutics*, v.321, p. 117-123, 2006.

YUAN, Y.; LI, S.M.; DENG, P.; ZHONG, D.F. **Physicochemical properties and evaluation of microemulsion systems for transdermal delivery of meloxicam.** *Chem. Res. Chinese*, v. 23, p.81-86, 2007.